



**HAL**  
open science

# Etude des mécanismes de translocation des peptides pénétrateurs de cellules (cpp) à l'aide de techniques biophysiques

Pierre Soule

► **To cite this version:**

Pierre Soule. Etude des mécanismes de translocation des peptides pénétrateurs de cellules (cpp) à l'aide de techniques biophysiques. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066563 . tel-01331017

**HAL Id: tel-01331017**

**<https://theses.hal.science/tel-01331017>**

Submitted on 13 Jun 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 Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale Interdisciplinaire pour le vivant

Laboratoire des BioMolécules (LBM - UMR 7203)

Équipe « Analyse, Interactions Moléculaires et Cellulaires »

**Étude des mécanismes de translocation des  
Peptides Pénétrateurs de Cellules (CPP) à  
l'aide de techniques biophysiques**

Par *Pierre Soule*

Thèse présentée pour l'obtention du grade de  
**Docteur de l'université Pierre et Marie Curie**

Discipline : **Biologie et Physique**

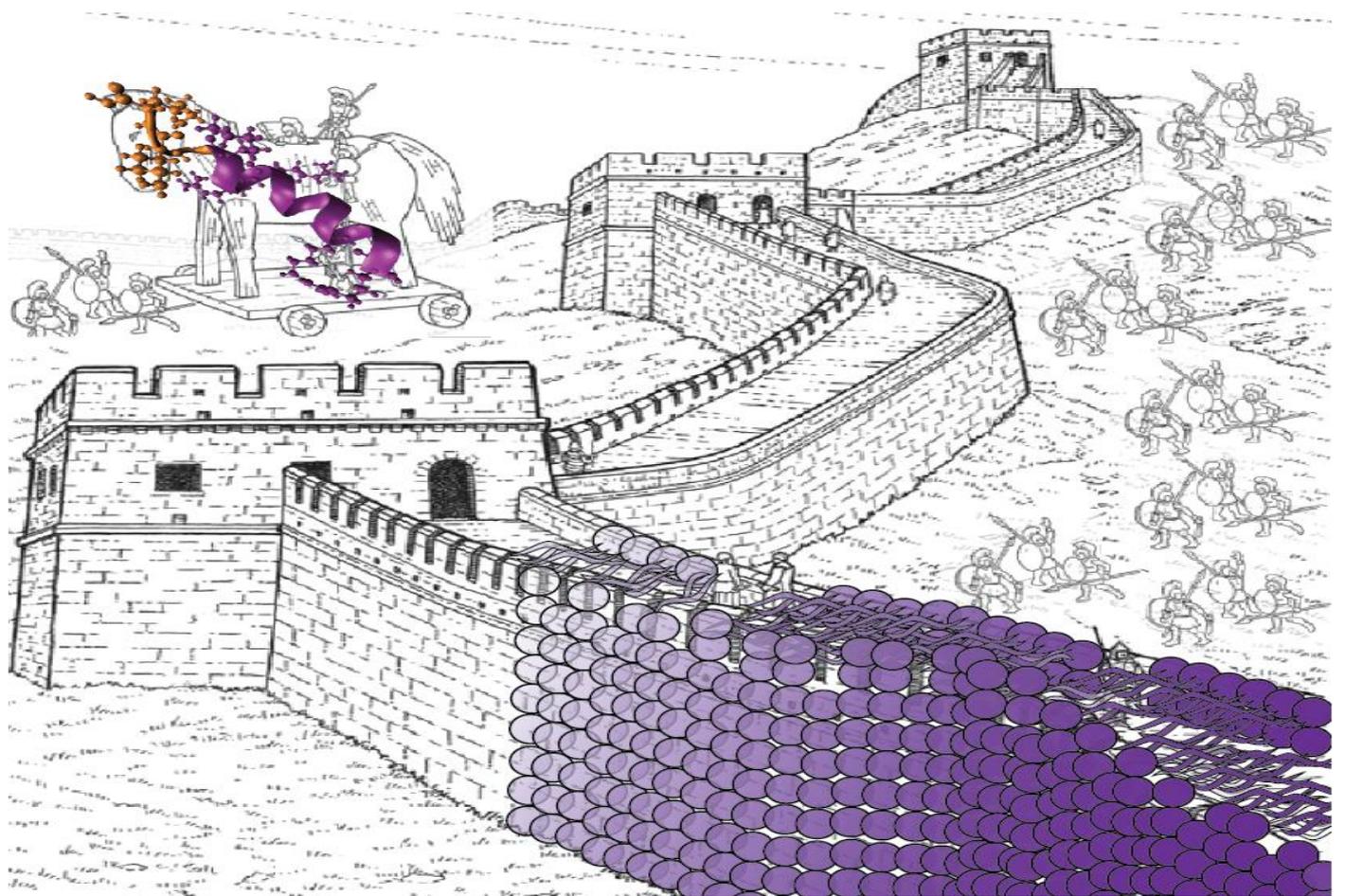
Dirigée par **Sophie Cribier**

Encadrée par **Nicolas Rodriguez**

Soutenance prévue le 21 Octobre 2015

Devant un jury composé de :

Pr. Atef Asnacios	Professeur d'université	Rapporteur
Pr. Agnès Girard-Egrot	Professeure d'université	Rapporteuse
Dr. Stéphanie Bonneau	Maître de conférences	Examinatrice
Pr. Christine Ménager	Professeure d'université	Examinatrice
Dr. David Taresté	Chargé de Recherche	Examinateur
Dr. Christine Gourier	Chargée de Recherche	Invitée
Dr. Nicolas Rodriguez	Maître de conférences	Encadrant



## Remerciements

Je ne sais trop par où commencer et je n'ai pas vraiment pris le temps de réfléchir à la façon dont je vais formuler ça, donc je m'excuse par avance pour le non-sens qui risque de suivre.

Je souhaite remercier toutes les personnes du laboratoire des BioMolécules qui m'ont accueilli il y a déjà 3 ans et m'ont supporté jusqu'à présent et tout particulièrement l'équipe 2. Astrid, Claire, Dominique, Emmanuelle, Fabienne, Gérard et Sandrine que j'ai pu importuner avec mes diverses questions scientifiques, ou non. Françoise pour avoir toujours réussi à satisfaire mes demandes tardives en cellules. Thierry à qui j'ai pu emprunter toutes sortes de consommables de laboratoire, et qui m'a aiguillé dans mes recherches d'ustensiles. Mais aussi toutes les personnes que je viens de citer, pour les moments de convivialités autour d'un café (ou d'un thé) de fin de journée.

Un grand merci aussi à tous les doctorants, en particulier Anaïs et Mehdi avec qui j'ai pu partager l'intégralité de ces 3 années. Anaïs H avec qui j'ai partagé plus d'une bière en fin de journée afin de refaire le monde et Mehdi (qui ne boit pas d'alcool pour des raisons obscures) qui a gentiment accepté de s'occuper de synthétiser les peptides dont j'avais besoin, mais aussi de combler mes lacunes en chimie. J'ai aussi eu le plaisir de partager avec lui pas mal de discussions, sur des sujets plutôt variés allant de la religion aux jeux vidéo afin de s'aérer l'esprit dans le bureau comme à la cantine. Mais aussi toute l'équipe de nouveaux arrivants Claudia, Fred, et Seb avec qui j'ai passé une excellente dernière année, dommage que cela n'ait pas duré un peu plus longtemps ! Mais je compte bien repasser au laboratoire de temps à autre !

Je voudrais aussi remercier les doctorants des autres équipes (ou bien qui ont fini leur thèse trop vite) Anaïs T, Aude, Mathilde, Lucile, Séverine et Tom avec qui j'ai partagé pas mal de repas et de bons moments aussi.

L'équipe surfaces moléculaires organisées du Laboratoire de Physique Statistique a aussi été très importante pour moi. Ils m'ont accueilli pendant ces 3 années comme un doctorant de leur équipe afin de pouvoir travailler sur le BFP, ou utiliser leurs microscopes. Je tiens à remercier toute l'équipe, Andréa, Christine, Éric, Frédéric, Jérôme, Jim et Wladimir pour toutes les discussions scientifiques que j'ai pu avoir avec eux au cours des pauses café et des réunions d'équipe. Je remercie aussi tout particulièrement les doctorants, Ben, Claire, Kévin (bien que postdoc), Isabelle, Myriam et Vladimir pour avoir rendu le sous-sol de l'ENS aussi convivial et avoir fait des journées de BFP de super moments.

Dans les aspects pratiques de la conduite de ce travail je remercie José Quintas et tout son atelier de mécanique qui s'est démené pour nous permettre de conceptualiser et réaliser les pièces manquantes sur les différentes expériences (et tout particulièrement les différents compartiments du TIRF). Toujours dans la fabrication d'éléments je tiens à remercier Jean Chevalet qui nous a aussi offert un accès à son atelier de mécanique et à son savoir-faire pour réaliser les premières ébauches des compartiments du microscope. Et bien sûr je souhaite remercier les stagiaires, Ali, Naoual, Nastassia et Sonia, que j'ai eu l'honneur de martyriser et qui ont apporté une énorme contribution à mon travail, tout particulièrement sur les gouttelettes. Je remercie Agnès Girard-Egrot et Atef Asnacios pour avoir accepté de rapporter sur mon travail de thèse et m'avoir permis de corriger mon manuscrit. Mais aussi le reste de mon jury qui a accepté d'évaluer mon travail.

Je voudrais dire un grand merci à ma Cheffe, Sophie, qui m'a enseigné beaucoup plus que ce que je pensais apprendre au cours d'une thèse, et qui va rester pour moi un modèle à atteindre un jour. J'espère avoir un jour les mêmes qualités de discernement, de rigueur scientifique, de pédagogie, accompagnée d'une culture scientifique quasiment sans faille. Mais en attendant d'avoir toutes ces qualités, je vais continuer à prendre mes après-midi à 18h. Merci Sophie !

Enfin, je souhaite remercier Nicolas, avec qui j'aurais passé 3 années exceptionnelles, j'ai eu le plaisir d'évoluer sur les projets comme je le souhaitais en ayant toujours son regard critique pour me guider lorsque cela été nécessaire, mais sans pour autant me réprimer sur mes idées. J'ai découvert un excellent ami, avec qui j'ai eu le plaisir de partager plus que mes journées de laboratoire. Le repas traditionnel de la semaine, pris à l'extérieur afin de discuter science avec les différents collègues des autres instituts (Andrea, Jim, Gamal, et d'autres que j'oublie) va vraiment me manquer. Mais aussi, nos discussions autour du café matinal pour parler de tout et de rien, tandis que nos bières du soir, et autres repas nous permettaient de discuter de science. On se revoit sur les pistes quoi qu'il arrive ☺

Pour quitter le cadre du laboratoire et conclure ces remerciements, je tiens à remercier ma famille qui m'a soutenu jusqu'ici. Particulièrement les petits repas du dimanche à Champigny (Maman, Mika et Dim'), mais aussi les week-ends à Troyes (Papa, Laurence, Romain et Quentin) ! Les quelques vacances dans le Cantal (tous les restes de la famille !) m'ont aussi offert un super dépaysement de temps à autres.

Je remercie aussi tous mes amis (Jer, Jo, Lisa, Seb, Solenne et Vava), qui m'ont supporté ces dernières années, et qui ont acceptés de se traîner plus d'une fois jusqu'à Ivry pour profiter de quelques soirées afin de se changer un peu les idées. Quitte à parler des amis, je remercie aussi mon coloc' La Trace qui a accepté de partager un loyer avec moi, mais aussi les galères de la thèse.

Quoi qu'il en soit si c'était à refaire ça serait avec grand plaisir, car je me suis vraiment bien plu pendant ces années de thèse, même si la fin fut fastidieuse !

## Résumé

La nécessité de délivrer des médicaments directement dans les cellules est grandissante avec le développement des thérapies géniques. Les peptides pénétrants (Cell Penetrating Peptides : CPP) représentent une possibilité pour administrer ces médicaments dans les cellules sans effet délétère sur la membrane. Ce sont des peptides d'une dizaine d'acides aminés, généralement cationiques. Ils sont capables de traverser la membrane cellulaire, et conservent cette propriété lorsqu'une cargaison leur est attachée. Cependant, leurs mécanismes d'entrée ne sont toujours pas tous connus.

Nous avons caractérisé quelques aspects des mécanismes permettant aux CPP de traverser directement la membrane plasmique à l'aide de trois techniques biophysiques.

i) Nous avons ainsi pu mettre en évidence le rôle des sulfates d'héparane comme partenaire d'adhésion forte du CPP pénétrant, à l'aide d'un outil de mesure de force : le Biomembrane Force Probe. ii) Nous avons montré la possibilité pour la pénétrant de franchir la bicouche lipidique (sans mécanisme cellulaire actif) si celle-ci est suffisamment riche en lipides chargés négativement. Ce passage a été étudié sur bicouches modèles, formées à l'interface entre gouttelettes obtenues par émulsion inverse dans de l'huile en présence de lipides. iii) Pour visualiser la translocation de CPP à l'échelle de la molécule unique nous avons développé un montage original de microscopie à onde évanescente sur bicouche suspendue.

## Abstract

Gene therapy relies on an efficient and specific delivery of drugs into targeted cells. For this purpose, the use of carriers that will help the drugs to cross the membrane, without introducing deleterious effect due to the membrane disruption, are promising. A family of such carriers is known as Cell Penetrating Peptides (CPPs). These peptides are short, about ten amino acids, and often cationic. They are able to translocate through the membrane with different cargos and deliver them into the cytosol. However the mechanisms are still, to a great extent, unknown.

We used three biophysical techniques to gain insights into the mechanisms leading to the translocation of a CPP.

i) We found the heparan sulfates to be the strongest partner of the CPP penetratin at the cell surface. This adhesion has been pointed out using the Biomembrane Force Probe, a force measuring tool. ii) We evidenced the translocation of penetratin through the lipid bilayer (without any cell mechanism) as long as it contains enough negatively charged lipids. This has been carried out using model bilayers formed at the interface between droplets generated by an inverted emulsion: water in an oil and lipid mixture. iii) To view the translocation of CPPs at the single molecule level we developed a total internal reflection fluorescence microscope (TIRFM) on a suspended bilayer.

# Table des matières

<b>I. Que sont les peptides pénétrants ?</b> .....	<b>I-16</b>
<b>A. Définition et intérêt biomédical des peptides pénétrants</b> .....	<b>I-17</b>
<b>B. La compartimentation cellulaire</b> .....	<b>I-18</b>
<b>C. Les portes d'entrée des cellules</b> .....	<b>I-19</b>
<b>D. Les différents vecteurs</b> .....	<b>I-21</b>
1. Les débuts de la vectorisation .....	I-21
2. La vectorisation chimique .....	I-22
3. La vectorisation « physique » .....	I-23
4. Les vecteurs .....	I-25
5. L'intérêt des CPP ? .....	I-26
<b>E. Origine des CPP</b> .....	<b>I-27</b>
1. Trans-activator protéine, Tat .....	I-27
2. Pénétratine.....	I-28
3. Transportane, TP10 .....	I-30
4. Peptides synthétiques .....	I-32
<b>F. Mécanismes d'entrées</b> .....	<b>I-33</b>
1. Une entrée plus compliquée qu'il n'y paraît .....	I-33
2. Les sucres de surface comme partenaires .....	I-34
3. Les approches modèles, l'hypothèse de la translocation .....	I-38
<b>G. Quelques succès des CPP</b> .....	<b>I-45</b>
1. Quelques cargaisons.....	I-46
2. Optimisations .....	I-49
<b>H. Questions soulevées</b> .....	<b>I-51</b>
<b>II. Détermination de la force d'adhésion entre les CPP et la membrane</b> .....	<b>II-52</b>

<b>A.</b>	<b>Les mesures de forces .....</b>	<b>II-53</b>
1.	Mesure de force.....	II-53
2.	Le BFP, un outil de choix pour les échantillons biologiques.....	II-55
<b>B.</b>	<b>Matériels &amp; méthodes .....</b>	<b>II-57</b>
1.	Principe du Biomembrane Force Probe .....	II-57
2.	Préparation du Biomembrane Force Probe .....	II-57
3.	Expérience de Biomembrane Force Probe.....	II-59
4.	Acquisition des données .....	II-60
5.	Echelle de temps et de force, raideur du globule rouge et taux de charge.....	II-62
6.	Traitement des données.....	II-63
7.	Culture cellulaire.....	II-64
8.	Préparation des cellules.....	II-64
9.	Préparation des vésicules .....	II-65
10.	Biotinylation des globules rouges .....	II-66
11.	Préparation des billes .....	II-66
12.	Synthèse des peptides .....	II-66
<b>C.</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>II-67</b>
1.	Déterminer la densité de pénétration pour une approche en molécule unique... II-67	
2.	Un partenaire de choix, les glycosaminoglycanes .....	II-69
3.	Interaction avec des membranes modèles.....	II-72
4.	Importance des acides sialiques .....	II-73
5.	Quelques modèles énergétiques .....	II-75
6.	Densité des différents éléments de la surface de contact.....	II-79
<b>D.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>II-81</b>
<b>III.</b>	<b>Étude de la translocation à l'aide de bicouches à l'interface entre gouttelettes</b>	<b>III-83</b>
<b>A.</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>III-84</b>

1.	Les systèmes modèles pertinents .....	III-84
2.	Histoire et évolution de la bicouche à l'interface entre gouttelettes .....	III-86
3.	Les applications des DIB .....	III-93
4.	Un outil de choix pour les CPP .....	III-94
<b>B.</b>	<b>Matériel &amp; méthode .....</b>	<b>III-96</b>
1.	Préparation du mélange huile-lipide .....	III-96
2.	Réalisation des émulsions .....	III-97
3.	Préparation des lames d'observation .....	III-97
4.	Réalisation de l'expérience .....	III-98
5.	Nettoyage des lames .....	III-98
6.	Tampon pour stabiliser les émulsions .....	III-98
7.	Montage en épifluorescence .....	III-98
8.	Synthèse de la Pénétratine-FP488 .....	III-99
9.	Mise au point de mesures électriques .....	III-99
<b>C.</b>	<b>Travail préliminaire : caractérisation des émulsions .....</b>	<b>III-100</b>
1.	Caractérisation du système .....	III-100
2.	Stabilisation des gouttelettes .....	III-102
<b>D.</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>III-105</b>
1.	Mise en évidence de la translocation à travers une bicouche anionique .....	III-105
2.	Quantification de la translocation .....	III-106
3.	L'influence de la composition lipidique .....	III-109
4.	Déstabilisation de la membrane .....	III-112
5.	Détermination du coefficient de perméabilité .....	III-114
<b>E.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>III-116</b>
<b>F.</b>	<b>Perspectives .....</b>	<b>III-117</b>
1.	Membranes asymétriques .....	III-117
2.	Automatisation par microfluidique .....	III-118

## IV. Mise au point d'un microscope pour l'observation de la translocation à l'échelle de la molécule unique ..... IV-121

<b>A.</b>	<b>La molécule unique sur bicouche .....</b>	<b>IV-122</b>
1.	TIRF .....	IV-122
2.	Limitation des membranes modèles actuelles.....	IV-124
3.	La molécule unique sur film noir ? .....	IV-125
<b>B.</b>	<b>Matériels .....</b>	<b>IV-127</b>
1.	Microscopie.....	IV-127
2.	Peptides et consommables .....	IV-127
3.	Conditions d'acquisition .....	IV-127
<b>C.</b>	<b>Conception initiale.....</b>	<b>IV-128</b>
1.	Obtention de la différence d'indice optique.....	IV-128
2.	Une microscopie à l'aide d'un objectif TIRF .....	IV-129
3.	Alignement du TIRF .....	IV-130
4.	Conception du film noir .....	IV-131
5.	Réalisation du compartiment supérieur pour le film noir .....	IV-132
6.	Mise en place dans la chambre .....	IV-133
7.	Imagerie en molécule unique .....	IV-134
<b>D.</b>	<b>Évolutions.....</b>	<b>IV-136</b>
1.	Consolidation de la chambre supérieure .....	IV-136
2.	Modification du chemin optique .....	IV-138
3.	Support de membrane .....	IV-140
4.	Compartiment inférieur.....	IV-141
5.	Fibre optique .....	IV-142
<b>E.</b>	<b>Perspectives pour l'étude de la translocation.....</b>	<b>IV-143</b>
1.	Utilisation du champ évanescent .....	IV-143
2.	Expérience d'extinction .....	IV-145

3.	Transfert d'énergie par résonance de Forster.....	IV-146
4.	TIRF avec émulsion.....	IV-146
<b>V.</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>V-148</b>
<b>VI.</b>	<b>Annexes.....</b>	<b>VI-150</b>
<b>A.</b>	<b>Programme d'analyse du BFP (partie II.B.6).....</b>	<b>VI-151</b>
<b>B.</b>	<b>Simulation de la distribution des estimateurs (partie III.D.4).....</b>	<b>VI-162</b>
<b>C.</b>	<b>Simulations de déplacement 1D (partie IV.E.1).....</b>	<b>VI-164</b>

## Liste des abréviations des modèles et des techniques

- AFM : atomic force microscope
- BFP : biomembrane force probe
- BLM : film noir (*Black Lipid Membrane*)
- CHO : cellules Ovariennes d'Hamster Chinois
- DHB : bicouche entre le gel et gouttelette (*Droplet-Hydrogel Bilayer*)
- DIB : bicouche à l'interface d'émulsions inverses (*Droplet Interface Bilayer*)
- FRET : transfert d'énergie par résonance de Förster
- GPMV : vésicule géante de membrane plasmique
- GR : globule rouge
- GUV : vésicule unilamellaire géante
- GV : vésicule géante
- IRM : Imagerie par résonance magnétique
- ITC : calorimétrie de titration isotherme
- PALM : microscope à localisation par photoactivation (*PhotoActivation Localization Microscopy*)
- PWR : résonance de plasmons de surface (*Plasmon Waveguide Resonance*)

## Liste des abréviations des composés

- ADN : acide désoxyribonucléique
- ARN : acide ribonucléique
- ATP : adénosine triphosphate
- BSA : albumine de sérum bovin
- CPP : peptide pénétrant (*Cell Penetrating Peptide*)
- CS : chondroïtine sulfate
- DOPC : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
- DOPG : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)
- DOPS : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine
- DPhPC : 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
- DPhPS : 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine
- EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
- FP488 : fluoprobe™ 488
- GAG : glycosaminoglycane
- GFP : Protéine fluorescente verte
- G $\alpha$  : gramicidine  $\alpha$
- HP : peptides d'indentification
- HS : sulfate d'héparane
- lysoMC : lysomethylcoumarin
- NBD : nitrobenzoxadiazole
- OmpG : outer membrane protein G
- PBS : tampon phosphate salé
- PDMS : polydimethylsiloxane
- PEG : polyéthylène glycol
- POPC : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
- POPG : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)
- PTFE : polytétrafluoroéthylène
- QD : quantum dot
- $\gamma$ CD :  $\gamma$ -cyclodextrine

Dans de nombreuses maladies il est nécessaire de pouvoir introduire les agents thérapeutiques dans les cellules à traiter. Les méthodes actuelles permettant d'administrer les médicaments reposent sur des thérapies lourdes où l'organisme entier est traité avec une efficacité d'administration très faible (c'est le cas de la chimiothérapie). Ainsi, la recherche de produits permettant d'accroître l'efficacité avec laquelle les médicaments atteignent leur cible est d'un intérêt majeur. Les peptides pénétrants sont des candidats pour améliorer les thérapies ciblant les cellules, cependant leur mode de fonctionnement n'est pas encore compris. Au cours de cette thèse, nous avons cherché à mieux caractériser les mécanismes d'entrée des peptides pénétrants dans les cellules, nous avons mené ces études sur différents types de cellules en culture et sur des systèmes modèles en développant de nouvelles approches.

## I. Que sont les peptides pénétrants ?

---

## **A. Définition et intérêt biomédical des peptides pénétrants**

Les peptides pénétrants, aussi nommés peptides pénétrateurs de cellules (en anglais Cell Penetrating Peptides : CPPs), sont des peptides capables de pénétrer à l'intérieur des cellules et qui conservent cette propriété avec de nombreuses molécules qui leur sont conjuguées, entraînant donc la traversée de ces dernières.

Une cellule est l'entité de base du vivant, sa membrane plasmique délimite son intérieur. Le principal constituant de la membrane plasmique est la bicouche lipidique dont le cœur est occupé par les chaînes carbonées des lipides qui constituent une zone hydrophobe entre deux milieux aqueux : le cytoplasme de la cellule et le milieu extra-cellulaire. Les CPP ont des courtes séquences d'une trentaine d'acides aminés au plus dont certains sont basiques et donc chargés positivement et hydrophiles. Si les CPP traversent directement la bicouche lipidique, il est nécessaire que ces peptides hydrophiles traversent une couche hydrophobe. Nous verrons cependant plus loin qu'il leur est aussi possible d'entrer dans la cellule sans traverser la bicouche lipidique de sa membrane plasmique.

Les molécules pouvant traverser la membrane cellulaire sont d'une importance majeure pour la médecine. En effet, la majorité des désordres physiologiques ont pour origine un déséquilibre dans la machinerie d'une cellule. Cette dernière est régulée par le matériel génétique de la cellule qui, par mutation ou modification environnementale, peut déréguler la machinerie cellulaire. Afin de rétablir l'état natif d'une cellule malade, il est nécessaire de pouvoir influencer sur son génome ou son contenu. Il est possible de détruire la cellule nocive lorsqu'elle est isolée, mais dans de nombreuses maladies les cellules délétères coexistent avec les cellules saines au sein d'un tissu. Il arrive aussi que l'ensemble du tissu devienne instable, ce dernier devenant délétère pour l'organisme. Il est donc nécessaire de pouvoir pénétrer avec des molécules thérapeutiques (matériel génétique, médicaments, protéines, etc.) afin de restaurer le phénotype natif des cellules dysfonctionnelles sans altérer le reste de l'organisme.

Les CPP se présentent comme prometteurs puisqu'ils peuvent transporter des médicaments dans les cellules. Cependant, les mécanismes permettant aux CPP d'entrer dans les cellules avec leur cargaison sont complexes. Au cours de cette introduction, je me propose de revenir sur les mécanismes d'entrée dans une cellule et les méthodes de vectorisation classiques avant de m'intéresser à l'origine des CPP, leurs mécanismes d'entrée, et les cargaisons déjà délivrées grâce à eux, pour conclure sur les avancés concernant le développement de vecteurs idéaux.

## B. La compartimentation cellulaire

Afin de comprendre les problématiques de la vectorisation, il est nécessaire de considérer l'adressage du médicament à administrer. L'adressage désigne les mécanismes permettant d'introduire une molécule donnée dans son compartiment cellulaire de destination. En effet, chez les cellules eucaryotes, c'est-à-dire les cellules qui composent la majorité des organismes pluricellulaires, l'intérieur de la cellule est compartimenté. La compartimentation correspond à la séparation par une membrane de sous-ensembles de la cellule possédant une fonction spécifique. Ces compartiments possèdent chacun une fonction propre et la compartimentation permet d'isoler leurs activités pour les rendre plus efficaces, voire protéger la cellule. Il existe de nombreux compartiments dans la cellule, mais nous ne présenterons que quelques compartiments ayant un intérêt thérapeutique :

- **Le noyau** est le compartiment le plus volumineux dans la majorité des cellules, pouvant aller jusqu'à 80 % du volume d'une cellule. Ce compartiment contient l'ADN de la cellule, permettant l'expression des gènes. Cependant, très peu de produits cellulaires y sont adressés afin de ne pas perturber l'expression génétique de la cellule.
- **Les mitochondries** sont les « usines » énergétiques de la cellule. Elles possèdent un génome qui leur est propre et sont séparées du cytosol par une double membrane. C'est ce compartiment qui assure la respiration des cellules, il est donc sensible aux altérations respiratoires telles que la présence de radicaux libres.
- **Les endosomes et lysosomes** sont des vésicules formées lors de l'ingestion de molécules extérieures à la cellule. Ce sont des compartiments dont le pH est généralement acide et où se produit la dégradation des composés biologiques en unités élémentaires.
- **Le cytosol** qui n'est pas un compartiment, puisqu'il constitue tout l'espace fluide séparé du milieu extérieur par la membrane plasmique dans lequel se trouvent les différents organites (compartiments internes dans le cytosol, délimités par une membrane). C'est dans ce dernier que se produit la majorité des réactions spécifiques d'une cellule, réactions enzymatiques, réponse électrique, détection d'hormones.

Il est donc nécessaire de connaître le compartiment cible, c'est à dire celui vers lequel le médicament doit être délivré afin d'adapter la stratégie de vectorisation pour s'assurer de son effet thérapeutique.

## C. Les portes d'entrée des cellules

Les cellules ont besoin d'apports en nutriments et en eau afin de synthétiser leurs constituants (protéines, sucres, lipides, matériels génétiques, etc.). Or, la bicouche lipidique de la membrane plasmique n'est pas perméable à la majorité des molécules nécessaires à ces fins. Seules les molécules hydrophobes telles que les gaz  $O_2$ ,  $CO_2$ , etc. peuvent traverser la bicouche, permettant ainsi la respiration. Quelques molécules plus complexes, dont les CPP, peuvent aussi la traverser directement. Les mécanismes permettant cette traversée sont regroupés sous le terme de translocation et sont encore mal compris. Les petites molécules non chargées telles que l'eau et l'éthanol, peuvent aussi pénétrer lentement au travers de la bicouche, mais pas les molécules de plus grande taille telles que le glucose.

De nombreux mécanismes physiologiques reposent sur l'entrée et la sortie d'ions, tels que le déplacement de signaux électriques dans les neurones ou la contraction musculaire. Il existe deux grandes familles de protéines transmembranaires permettant le transport de petites molécules chargées. Les canaux protéiques sont des protéines qui forment des pores dans la membrane, sélectifs ou non d'une molécule en particulier, afin de permettre son passage selon le gradient électrochimique. L'ouverture des canaux peut être dépendante de certaines conditions telles que la présence d'un potentiel transmembranaire précis ou la reconnaissance d'un ligand. Les transporteurs sont des molécules qui permettent le passage de molécules contre leur gradient électrochimique à l'aide d'un apport en énergie, soit l'hydrolyse d'ATP (le carburant des cellules), soit l'utilisation d'une deuxième molécule qui est échangée selon le sens favorable de son gradient électrochimique.

En dehors de ces exceptions, il existe plusieurs mécanismes permettant à la cellule d'incorporer des matériaux exogènes. Ces processus sont tous regroupés sous le nom d'endocytose.

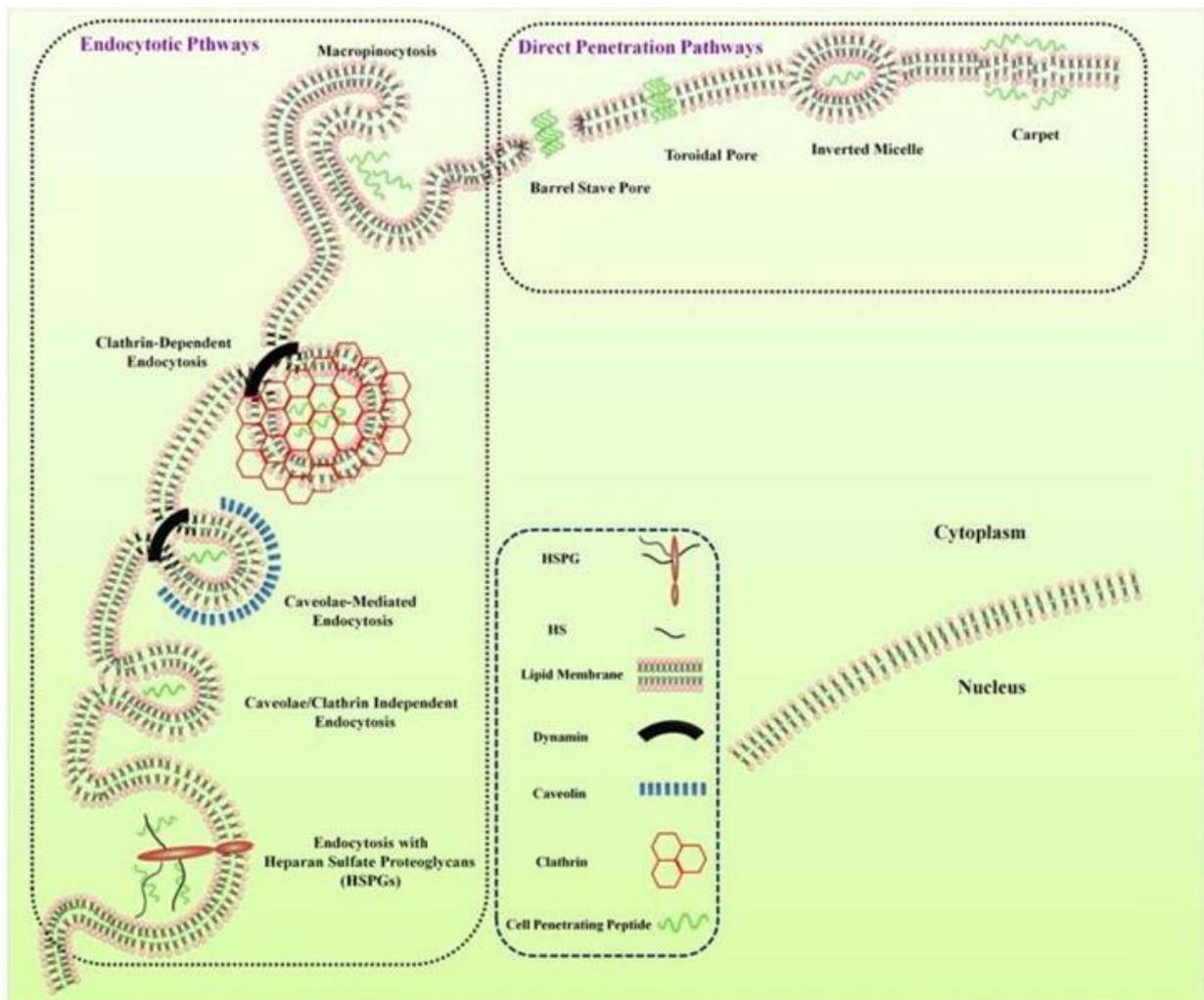


Figure I-1 : Schéma présentant les différentes voies d'entrée dans la cellule. Les macromolécules à internaliser sont représentées en vert. Ces voies sont classées en deux catégories : les voies endocytiques (à gauche) et la translocation (à droite). Schéma extrait de (Farkhani et al. 2014).

L'endocytose repose sur une modification de la membrane, soit une invagination, soit une protrusion. Il existe deux mécanismes majoritaires. Le premier, les voies d'endocytose dépendante de récepteurs ont lieu après la reconnaissance, par la membrane plasmique de la cellule, des molécules à ingérer. Le second, la pinocytose se produit sans reconnaissance particulière (Figure I-1).

La vésicule est formée par l'invagination de la membrane de sorte qu'il n'y ait pas de communication avec le milieu extérieur. Les vésicules ainsi formées sont appelées endosomes. Ainsi, des molécules extérieures entrent dans la cellule sans que la membrane ne devienne perméable. Les endosomes sont ensuite dirigés vers les différents compartiments cellulaires selon les éléments reconnus au moment de l'endocytose. En l'absence de reconnaissance particulière les molécules sont alors dirigées vers les lysosomes, qui sont les compartiments où se produit la dégradation des protéines et autres molécules biologiques afin de pouvoir être

converties en molécules énergétiques, telles que l'ATP, ou en composants constitutifs, comme les acides aminés.

Il existe plusieurs voies d'endocytose, dont les plus connues sont la voie dépendante de la clathrine, la voie dépendante de la cavéoline, regroupées toutes les deux comme étant des voies d'endocytose nécessitant des récepteurs, et la macropynocitose. L'étude des mécanismes d'internalisation est complexe, car plusieurs voies peuvent reposer sur des mécanismes communs, rendant difficile l'inactivation d'une voie sans perturber tous les processus.

Contrairement à l'endocytose, la translocation présente l'avantage de pouvoir introduire le produit directement dans le cytosol, ce qui en fait le mode d'entrée préférable pour la vectorisation. (GM., 2000).

## **D. Les différents vecteurs**

### **1. Les débuts de la vectorisation**

La vectorisation regroupe les méthodes permettant de faire pénétrer les molécules exogènes qui ne pénètrent habituellement, pas dans les cellules.

Les premières idées de vectorisation apparaissent, il y a un demi-siècle, lors des études portant sur l'infectiosité des virus. En effet, le cycle de reproduction des virus repose sur la possibilité de s'introduire dans une cellule hôte et de rediriger la machinerie cellulaire afin de fabriquer des virus, qui à leur tour feront de même. Les virus sont donc capables de vectoriser du matériel génétique incapable de pénétrer spontanément dans une cellule.

Afin, de déterminer la virulence de virus, le matériel génétique (ADN ou ARN) de ces derniers était extrait, puis laissé incuber sur des cultures cellulaires (Vaheiri & Pagano 1965). L'infectiosité était ensuite déterminée par le nombre de cellules qui développaient les effets délétères dus à l'incorporation du matériel génétique pathogène. Par la suite de nombreuses méthodes ont été développées dans les années 70 afin d'augmenter l'infectiosité de ces acides nucléiques viraux.

## **2. La vectorisation chimique**

### **a) Transfection à l'aide de calcium**

Les premières méthodes voyant le jour consistent à optimiser le milieu de culture des cellules pour permettre l'entrée de la molécule souhaitée. En l'occurrence pour le matériel génétique, les méthodes reposent sur la précipitation de ce dernier, à l'origine à l'aide de diethylaminoethyl-dextrane en solution, dont la fonction amine précipite avec les acides nucléiques, chargés négativement, ce qui permet d'augmenter l'infectiosité de l'ARN viral lui permettant d'infecter  $10^5$  fois plus de cellules (McCutchan & Pagano 1968) qu'en l'absence de traitement. Pour augmenter cette efficacité, le diethylaminoethyl-dextrane a été remplacé par du calcium qui augmente l'infectiosité de 7 ordres de grandeur (Graham & van der Eb 1973). De plus, par ajout de calcium il devient possible d'incorporer du matériel génétique non viral dans les cellules, c'est cette découverte qui a conduit aux premières idées de modification génétique des cellules (Chen & Okayama 1987). Il est supposé que l'ADN précipité déclenche les mécanismes d'endocytose, eux-mêmes favorisés par la présence de calcium extracellulaire. Cependant, ce mécanisme repose sur l'endocytose qui est un phénomène rare, et seuls quelques pourcents des cellules en cultures présentent une insertion de l'ADN. Enfin, il n'est possible que sur des cellules pour lesquelles les mécanismes d'endocytoses sont renforcés et n'est avéré que pour l'incorporation de matériel génétique.

### **b) La lyse osmotique**

Des méthodes mettant en œuvre des variations de pressions osmotique stimulant le processus de pinocytose, mécanisme d'endocytose non dépendant de récepteurs, ont été développées. Dans ce processus la lyse des endosomes n'était pas suffisamment spécifique, déclenchant parfois des effets délétères (Okada & Rechsteiner 1982).

Les techniques de vectorisation chimique présentent l'avantage d'utiliser les voies d'entrées de la cellule, cependant leur efficacité est minime, ainsi des alternatives visant à perturber la structure de la membrane ont été développées pour augmenter cette efficacité.

### **3. La vectorisation « physique »**

Afin d'augmenter l'efficacité avec laquelle sont délivrées les macromolécules d'intérêts, de nouvelles pistes ont été explorées, n'influant plus sur le déclenchement de mécanismes cellulaires, mais plutôt en forçant l'entrée du matériel exogène.

#### **a) La micro-injection**

Les premières micro-injections, consistant en l'injection, directement dans le cytosol ou dans le noyau de la cellule, à l'aide d'un capillaire en verre, sont réalisées avec du matériel génétique (Capecchi 1980) ou des protéines (Celis 1984). L'efficacité de transformation, c'est-à-dire à incorporer du matériel génétique dans la cellule et l'exprimer, est proche de 100%. Cependant, cette technique est très fastidieuse puisqu'elle nécessite que les cellules soient traitées une à une. Elle reste actuellement utilisée pour des manipulations sur cellule unique et permet l'incorporation de matériel exogène de tailles très variées. Un exemple connu est un mode de fécondation *in vitro* dans laquelle les spermatozoïdes sont directement micro-injectés dans le cytoplasme de l'ovocyte.

#### **b) L'électroporation**

La micro-injection étant une technique lente et fastidieuse, d'autres méthodes de perméabilisation transitoire de la membrane ont été entreprises. Les premières études du comportement des membranes sous champ électrique ont montré que ces dernières deviennent perméables sous des pulses électriques suffisamment intenses ( $6-10 \text{ kV.cm}^{-1}$ , pendant  $5 \mu\text{s}$ ). Les cellules peuvent alors échanger de la matière avec l'extérieur et les membranes ne semblent pas perturbées après suppression du champ électrique (Neumann & Rosenheck 1972). Les résultats suggèrent que des pores se forment transitoirement dans la membrane, les molécules de plus grande taille pénétrant moins efficacement. Cette technique permet de faire entrer des molécules telles que du matériel génétique ou des protéines, avec une grande efficacité (Neumann et al. 1982). Bien qu'une telle opération passe par une déstabilisation partielle de la membrane, ce qui perturbe *a priori* les cellules, des essais cliniques, sur animaux pour le traitement de tumeurs superficielles par électro-chimiothérapie ont été concluants (Cemazar et al. 2008).

### **c) La « trituration »**

Une autre alternative à l'application d'un champ électrique est la trituration, ou « scrap loading ». Cette technique consiste à décoller des cellules adhérentes, à l'aide d'un grattoir souple, en présence du produit à incorporer, et à les transférer rapidement dans un milieu de culture sain. Ce décollement brutal est supposé créer des pores dans la membrane au niveau des zones d'adhésion des cellules sur le support. L'efficacité d'entrée des molécules est inversement proportionnelle à leur taille, et les molécules plus massives que 800 kDa ne pénètrent pas, ce qui montre que ces pores possèdent une taille maximale (diamètre d'environ 10 nm). Il se peut aussi que la présence de cytosquelette au niveau de des points de contact influe sur la taille des objets pouvant entrer.

Cette méthode présente l'avantage de pouvoir faire entrer des molécules de tailles variées allant jusqu'à des sucres fluorescents de 800 kDa (McNeil et al. 1984). Près de 40% des cellules viables après la vectorisation sont ainsi transfectées. Cependant, la méthode présente une mortalité importante chez les cellules avec près de 50% des cellules qui meurent pendant l'étape de grattage et de transfert. Cette méthode est aussi impossible à appliquer pour traiter un organisme.

### **d) La biobalistique**

La transfection sur des cellules dont la membrane est protégée par une matrice extracellulaire, comme c'est le cas pour les cellules végétales, n'était pas possible avec les techniques décrites ci-dessus. En effet, il fallait dans un premier temps supprimer cette barrière pour laisser la membrane plasmique à nu afin de pouvoir appliquer ces méthodes. Or une suppression de la matrice provoque souvent l'apoptose de la cellule, (mécanisme de mort contrôlée de la cellule). Il a fallu développer une technique permettant l'insertion de molécules exogènes au travers de la matrice extracellulaire et de la membrane simultanément. L'équipe de Sanford (Klein et al. 1988) a ainsi développé une méthode appelée biobalistique. Des billes micrométriques, décorées de la molécule d'intérêt sont envoyées avec une grande vitesse sur les cellules. Généralement, les billes sont chargées dans une arme à feu et le tir est fait à quelques centimètres des cellules dans une atmosphère où la pression est diminuée afin de limiter le frottement de l'air sur les billes. Les billes perforent ainsi les cellules ce qui permet d'introduire la molécule d'intérêt aussi bien dans des cellules végétales que des cellules animales. Une fois

de plus, cette méthode passe par une étape de disruption de la membrane qui peut s'avérer délétère pour des cellules et est impossible à appliquer dans un organisme.

#### **4. Les vecteurs**

##### **a) Viraux**

La possibilité de modifier le génome viral a conduit aux premiers essais de l'utilisation de virus comme vecteurs. Ainsi le gène de la  $\beta$ -globine du lapin a pu être ajouté au génome du virus SV40, à l'aide d'une restriction (découpage) du gène de la  $\beta$ -globine et du plasmide viral, puis d'une ligation. Le plasmide chimérique ainsi obtenu a ensuite été incubé sur des cellules de singe afin de produire les virus (Hamer et al. 1979). Des cellules de singe ont ensuite été incubées en présence de ce virus. Après cette incubation, les cellules se sont mises à produire de la  $\beta$ -globine de lapin. De plus, les virus issus de cette première infection contenaient de nouveau ce gène de la  $\beta$ -globine, et après infection sur un nouveau lot de cellules de singe, ces dernières exprimaient aussi la  $\beta$ -globine. Cependant, ces virus conservaient leur potentiel d'infectiosité, rendant cette méthode de vectorisation dangereuse puisque le virus conservait son pouvoir pathogène.

Actuellement, les avancées de la génétique ont permis d'inactiver progressivement ces virus afin de ne conserver que la machinerie essentielle à l'intégration de gènes dans la cellule hôte. Désormais, les vecteurs viraux se distinguent selon la famille de virus utilisée pour réaliser la transfection. Ce mode de vectorisation permet l'intégration stable de gènes dans des cellules en division, grâce aux rétrovirus, ou en phase latente, grâce aux lentivirus. Cependant, l'utilisation de vecteurs viraux est réduite au transfert de matériel génétique. De plus, cette méthode repose sur une intégration virale dans la cellule hôte, et donc stimule les processus cellulaires induits par une infection virale, tels que la modification de la machinerie d'expression des gènes, voire dans le cas d'un organisme des réactions immunitaires liées à une infection, bien que les virus ne soient plus pathogènes.

##### **b) Vésiculaires**

Une alternative à l'utilisation de virus est l'utilisation de vésicules (système modèle constitué d'une bicouche lipidique séparant son milieu intérieur de l'extérieur) comme vecteur. Les vésicules peuvent être formées en présence d'ADN, ou d'autres macromolécules, à faire pénétrer. Une fois les vésicules formées elles sont incubées avec les cellules cibles et leur

internalisation a lieu selon un mécanisme non connu encore aujourd'hui. Il est supposé que l'endocytose doit être la méthode d'internalisation principale. À l'aide de ces vésicules, il est possible d'introduire tout type de macromolécules tant que ces dernières peuvent être encapsulées dans des liposomes (Fraley et al. 1980). Cependant cette méthode de vectorisation est peu efficace, puisqu'elle possède une infectiosité pour l'ADN de SV40 inférieure à l'infectiosité du même ADN en présence de diethylaminoethyl-dextrane (I.D.2.a)).

Afin d'améliorer l'efficacité des transfections vésiculaires, il est possible d'utiliser des agents fusogènes, tels que le virus de Sendai. Ce virus induit la fusion entre cellules en insérant une de ses protéines dans la membrane de la cellule cible, cette insertion nécessitant une température minimum de 21°C (Hoekstra et al. 1989). Dans les expériences menées par Furusawa *et al.*, le virus est préalablement incorporé aux cellules à 4°C. Les vésicules contenant le matériel à faire pénétrer sont ici des fantômes de globule rouge, c'est-à-dire des globules rouges dépourvus d'hémoglobine. Ils sont incubés avec les cellules contenant le virus et le retour à 37°C promeut la fusion des fantômes avec les cellules cibles. Cette méthode permet de faire pénétrer tout type de molécule directement dans le cytosol, mais elle présente l'inconvénient d'introduire une partie du protéome et des lipides des fantômes de globule rouge dans les cellules cibles (Furusawa et al. 1974).

## **5. L'intérêt des CPP ?**

Toutes les techniques décrites ci-dessus présentent des inconvénients surtout lorsqu'il s'agit de faire pénétrer des médicaments. Tout d'abord, nombre d'entre elles reposent sur l'endommagement de la membrane plasmique, comme c'est le cas pour les vectorisations « physiques » (I.D.3) et les conséquences d'une telle perturbation ne sont pas connues. Concernant les méthodes plus douces, comme la précipitation de l'ADN, cette dernière n'est pas généralisable à d'autres molécules. Et quand bien même elle le serait son efficacité reste faible, et l'accès au cytosol pour les molécules thérapeutiques n'est pas immédiat.

Les méthodes les plus prometteuses sont celles ayant recours à un vecteur. L'utilisation de virus suppose une infection de la cellule, et même si ce dernier n'est plus pathogène, le mécanisme d'infection stimule des réponses de la part de la cellule, ce qui peut altérer les effets du médicament souhaité et le bon fonctionnement de la cellule cible. Enfin, l'utilisation de vésicules, bien que sans effets délétères évidents, repose sur un mécanisme d'entrée dans les cellules peu compris, et de très faible efficacité. Leur entrée semble dépendre de l'endocytose, rendant une fois de plus l'accès au cytosol difficile.

Ainsi il est nécessaire de pouvoir améliorer le domaine de la vectorisation afin d'obtenir des vecteurs permettant de transporter tous types de produit, et de les introduire dans le cytosol en limitant les effets négatifs sur la cellule. Les nano vecteurs, qui seront présentés dans le chapitre I.G.2.c) répondent à ce cahier des charges. Les CPP semblent aussi être de bons candidats, même s'il y a moins de recul sur leur utilisation.

## **E. Origine des CPP**

Les CPP « naturels » sont pour la plupart des fragments de protéines et permettent dans l'environnement physiologique, de promouvoir l'entrée de la protéine entière afin qu'elle puisse fonctionner dans une autre cellule, ou un autre organisme, que celui dans laquelle elle a été synthétisée. Ils sont généralement dérivés de peptides viraux ou de facteurs de transcription (Frankel & Pabo 1988) (Joliot et al. 1991).

Nous nous proposons de revenir sur les découvertes des principaux CPP que nous présenterons un à un dans cette partie.

### **1. Trans-activator protéine, Tat**

La protéine Tat fait partie du protéome du virus du SIDA (VIH-1). Elle est nécessaire à la réplication du virus, car elle permet d'activer l'expression des gènes viraux dans la cellule hôte. Dans les années 1990, de nombreuses hypothèses ont été émises quant à la façon dont cette protéine permettait le contrôle de ces gènes. Cependant, il n'existait pas de moyen d'évaluer son activité indépendamment d'une infection par le virus. Ainsi les premières expériences de mutation sur cette protéine, nécessitaient la mise au point d'une méthode d'étude. C'est ainsi que l'équipe de Pabo décida de modifier génétiquement des cellules pour qu'elles présentent un gène rapporteur de l'activité de Tat, puis d'introduire Tat dans les cellules à l'aide d'une vectorisation physique : la trituration (présentée en I.D.3.c)). Cependant, à la surprise de l'équipe, la protéine était capable d'activer le gène rapporteur en l'absence de technique de vectorisation et à une concentration aussi faible que 1 nM dans le milieu extracellulaire (Frankel & Pabo 1988). Le fait que Tat puisse pénétrer dans les cellules peut présenter un avantage évolutif pour les virus. Les virus sont souvent en phase latente dans les cellules, insérés dans le génome mais non fonctionnels jusqu'à ce qu'un événement déclencheur se produise. Ainsi lorsque la synthèse d'un virus commence, Tat est synthétisé et capable de stimuler les cellules voisines. Cela permet d'accélérer l'entrée en phase lytique, période de production des virus et de destruction des cellules hôtes, après la lyse de la première cellule. Une phase lytique rapide

permet au virus de se reproduire rapidement sans que le système immunitaire n'ait le temps de le détecter.

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'entrée de Tat, ce dernier a été tronqué en différents fragments conjugués à des enzymes pour voir s'il conservait ses propriétés de translocation (Fawell et al. 1994). L'une des chimères contenant Tat (32-72) (Figure I-2) est toujours capable de pénétrer dans les cellules, et par fixation des cellules et ajout de substrats chromophores des enzymes il a pu être montré que les enzymes conjuguées à Tat sont localisées dans le noyau, et donc Tat aussi. De plus, l'ajout de chloroquine, un composé basique auquel les membranes sont perméables, dans le milieu extracellulaire améliore l'efficacité de Tat. La chloroquine est connue pour empêcher l'acidification des endosomes, et donc la dégradation de leur contenu (Fawell et al. 1994). Ceci suggère donc que Tat entre au moins par l'une des voies endocytiques, et qu'il est dégradé dans les endosomes après leur acidification. En empêchant sa dégradation, son efficacité d'activation des gènes est donc augmentée et il s'accumule dans le noyau des cellules (observé par marquage radioactif de Tat et isolation du noyau).

<b>TAT 32-72</b>	<b>CFITKALGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQ</b>
<b>TAT48-60</b>	<b>C(Acm)GRKKRRQRRRPPQC</b>
<b>TAT43-60</b>	<b>C(Acm)<u>L</u>GISYGRKKRRQRRRPPQC</b>
<b>TAT37-60</b>	<b>C(Acm)<u>F</u>ITK<u>A</u>L<u>G</u>ISYGRKKRRQRRRPPQC</b>
<b>TAT37-53</b>	<b>C(Acm)<u>F</u>ITK<u>A</u>L<u>G</u>ISYGRKKRRC</b>

Figure I-2 : Tableau présentant les différentes séquences tronquées de Tat qui ont été utilisées dans l'identification de la séquence minimale permettant l'activité CPP. C(Acm) correspond au groupe protecteur utilisé pendant la synthèse et permettant l'accrochage de cargaison si souhaité. Figure adaptée de (Vives et al. 1997).

Enfin, il a été montré que la séquence minimale permettant à Tat de vectoriser des molécules exogènes contient seulement 13 acides aminés et ne présente pas de structure secondaire. Ce fragment correspond à Tat (48-60) (Vives et al. 1997).

## **2. Pénétratine**

La pénétratine fut le second CPP à être découvert. C'est un fragment de l'homéoprotéine antennapedia. Les homéoprotéines sont des protéines possédant une séquence caractéristique d'acides aminés appelée homéodomaine (environ 60 acides aminés structurés en 3 hélices alpha). Elles régulent l'expression génétique des cellules durant le développement. Elles sont responsables des changements morphologiques qui interviennent dans l'organisme pendant cette période. Tout comme Tat, il s'agit de protéines pouvant activer de nombreux gènes afin de modifier le phénotype des cellules dans lesquelles elles sont synthétisées. C'est

l'homéodomaine qui reconnaît l'ADN et en permet une modification d'expression. Dans le cadre de l'étude d'antennapedia il a pu être montré que l'homéodomaine, couramment nommé pAntp, ne nécessitait pas de méthode de vectorisation pour pénétrer dans les cellules neuronales (Joliot et al. 1991). Outre le fait que pAntp puisse entrer dans les cellules en absence de méthode de vectorisation, tout comme Tat, il est capable de modifier le phénotype des neurones dans lesquels il entre. Par observation en microscopie à épifluorescence de pAntp marqué à l'aide d'un fluorophore, après fixation des cellules, il a pu être montré que l'internalisation de pAntp conduit à une localisation essentiellement nucléaire. Des observations sur cellules vivantes, en microscopie confocale, ont montré que le peptide pénètre dans les neurones pour des concentrations de 1 à 10  $\mu\text{M}$ . De plus, le changement de morphologie des neurones incubés en présence de pAntp suggère aussi que ce dernier permet la modification de la machinerie cellulaire. Le lien avec l'ADN n'a pas clairement été observé *in vivo*, mais le changement de phénotype ne se produit pas en présence de cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique.

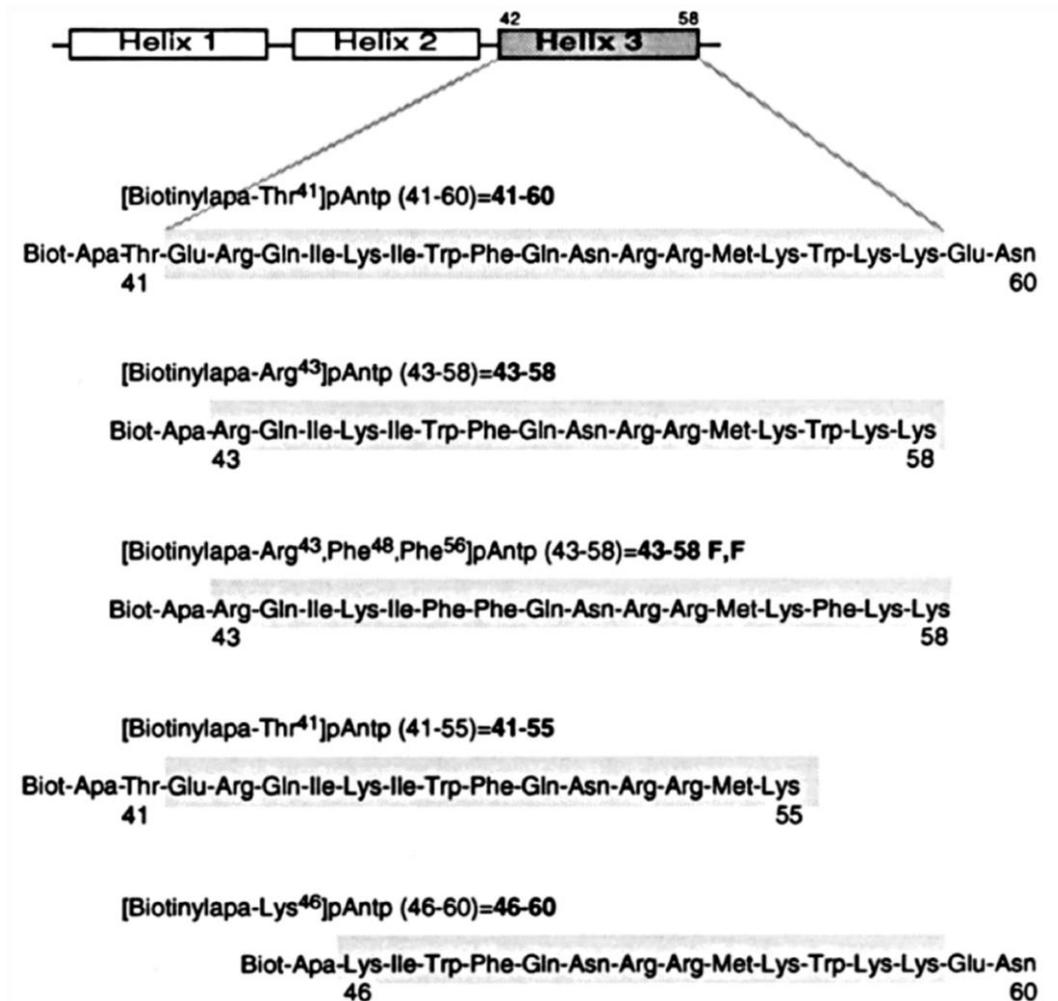


Figure I-3 : Figure présentant les différentes séquences de la pénétratine qui ont été utilisées dans l'identification de la séquence minimale permettant l'activité CPP de pAntp. Tiré de (Derossi et al. 1994).

Tout comme pour Tat, l'identification de la séquence minimale à l'entrée de pAntp a été recherchée. Ainsi, il a été montré qu'un fragment de 16 acides aminés (pAntp 43-58) constituant la troisième hélice  $\alpha$  de pAntp était nécessaire et suffisant à la traversée des membranes (Figure I-3). Ce fragment, nommé pénétratine, est capable d'entrer dans la cellule avec une cargaison, dans l'étude qui l'a identifiée une biotine (Derossi et al. 1994). Cette biotine a ensuite été utilisée pour révéler la localisation de la pénétratine sur cellules fixées, à l'aide de streptavidine, un partenaire fort de la biotine, couplée à la fluorescéine. Pour des concentrations allant de 1 à 100  $\mu$ M l'entrée de la pénétratine a pu être montrée. Cette entrée a aussi été confirmée à l'aide d'électrophorèse sur les extraits cellulaires totaux. Cette entrée est aussi observée à 4°C, température à laquelle l'endocytose est considérée comme inhibée. Pour les concentrations testées, il ne semble pas y avoir de saturation quant à l'entrée de la pénétratine. Ces résultats suggèrent que l'entrée se fait indépendamment de récepteurs et par un mécanisme passif. Cependant, toutes les concentrations n'ont pu être testées, car au-delà de 100  $\mu$ M la pénétratine devient cytotoxique.

Enfin, la mutation des deux tryptophanes présents dans la séquence de la pénétratine (pAntp 43-58 F, F) supprime l'activité CPP du peptide. Cette mutation inhibe aussi la capacité de la pénétratine à former des agrégats en présence de détergent, ce qui suggère que ce peptide est capable d'interagir avec les molécules hydrophobes. Il semble donc que cette capacité d'agrégation avec les molécules hydrophobes soit corrélée avec la translocation de la pénétratine. La pénétratine peut donc s'insérer dans les milieux hydrophobes, tels que le cœur de la bicouche, suggérant éventuellement qu'un récepteur ne serait pas nécessaire pour le processus de translocation.

### **3. Transportane, TP10**

Le transportane est le premier CPP chimérique à faire son apparition, il est aussi couramment rencontré dans les études de vectorisation. L'équipe de Bartfai a décidé de synthétiser une chimère appelée galaparane couplant la mastoparane, une toxine du venin de la guêpe inhibant, entre autre, l'activité de la pompe Na-K ATPase, et la galanine un peptide amphipathique possédant de nombreux effets dans le système nerveux central, dont le relargage de l'insuline. De façon surprenante, cette chimère présente des propriétés opposées aux effets de chacun des peptides seuls, activant la pompe Na-K ATPase et inhibant les décharges d'insuline (Langel et al. 1996). La même équipe a décidé de s'intéresser aux propriétés de la galaparane, à l'aide de mutation, afin de comprendre pourquoi la chimère ne présentait pas les caractéristiques de

chacun des deux peptides. Parmi les mutants, celui possédant une modification de la lysine 13 de la galaparane pénètre mieux dans les cellules (Pooga et al. 1998). Enfin, cette entrée est indépendante de la cargaison liée à ce peptide, ce qui en fait un CPP. Les auteurs ont donc renommé ce mutant : le transportane. Ce dernier exhibe toutes les caractéristiques déjà observées pour la pénétratine et Tat concernant la vectorisation. Les observations en fluorescence montrent une accumulation dans les nucléoles et la membrane nucléaire et plasmique. De plus, l'entrée du transportane ne dépend pas de la reconnaissance de récepteur puisqu'elle ne présente pas d'effet de saturation quant à sa vitesse d'internalisation, cependant aucune concentration supérieure à 50  $\mu\text{M}$  n'a pu être testée, car il devenait lytique pour les cellules. Enfin, son entrée n'est pas affectée par une diminution de la température à 4°C ni par l'utilisation d'inhibiteurs d'endocytose.

Cependant, le transportane étant dérivée de peptides actifs sur de nombreux canaux et récepteurs cellulaires, il est nécessaire de s'assurer qu'il ne présente pas d'effet délétère dans l'organisme. Le transportane présente une forte affinité pour les récepteurs à la galanine, ainsi qu'une activité inhibitrice d'une des classes majeures de récepteur membranaire (les Récepteurs Couplés à la Protéine G).

	Sequence	Length <sup>a</sup>	Cellular uptake <sup>d</sup>	
			0°C	37°C
Galanin	GWTLNSAGYLLGPHAVGNHRFSFDKNGLTSE	30	—	+/-
MP	INLKALAALAKKIL <sup>f</sup>	14	+	+
TP	GWTLNSAGYLLGK <sup>g</sup> INLKALAALAKKIL	27	+++	+++
TP7	...LNSAGYLLGK <sup>g</sup> INLKALAALAKKIL	24	+++	+++
TP8	.....LLGK <sup>g</sup> INLKALAALAKKIL	18	—	+/-
TP9	GWTLNSAGYLLGK <sup>g</sup> ..LKALAALAKKIL	25	+++	+++
TP10	.....AGYLLGK <sup>g</sup> INLKALAALAKKIL	21	+++	+++
TP11	GWTLNS.....K <sup>g</sup> INLKALAALAKKIL	21	+	+
TP12	...LNSAGYLLGK <sup>g</sup> ..LKALAALAKKIL	22	++	++
TP13	...LNSAGYLLGK <sup>g</sup> ...ALAALAKKIL	20	—	+/-
TP14	.....AGYLLGK <sup>g</sup> ..LKALAALAKKIL	19	++	++
TP15	...LNSAGYLLGK <sup>g</sup> ..LKALAALAK...	19	—	+/-

Figure I-4 : Tableau présentant les séquences de la galanine, de la mastoporane (MP), et le transportane (TP) ainsi que des variants qui ont été évalués afin de déterminer la séquence minimale permettant l'activité CPP. Le nombre d'acides aminés de chaque peptide est communiqué, ainsi que leur efficacité d'internalisation en présence ou non d'endocytose. La figure est adaptée de (Soomets et al. 2000).

Afin de limiter ces effets délétères et faire du transportane un vecteur potentiel, de nouvelles études de mutagenèse ont été réalisées. Il s'avère qu'une délétion des 6 premiers acides aminés du transportane permet de lever l'inhibition des récepteurs membranaires et de réduire l'affinité pour les récepteurs à la galanine (Soomets et al. 2000). De plus, l'effet de translocation avec une cargaison reste préservé avec une efficacité seulement 2 fois moindre que le transportane.

Ce mutant, TP10 (car c'était le 10<sup>e</sup> mutant du transportane dans l'étude), est la version du transportane actuellement utilisée dans la vectorisation à l'aide de CPP (Figure I-4).

#### 4. Peptides synthétiques

Tous les peptides présentés précédemment sont chargés positivement, mais ne présentent aucune autre similitude de séquence ou de structure, il a donc été suggéré que si le mécanisme d'entrée dans les cellules leur est commun, il doit leur être conféré par leur charge. La principale source de charge de ces peptides étant la présence d'arginines, de nombreux peptides naturels présentant des séquences riches en arginines ont été testés quant à leurs capacités de translocation. Il en ressort que la plupart des peptides partageant cette richesse en arginine peuvent traverser les membranes parmi lesquels des protéines liant l'ARN comme HIV-Rev, BMV Gag et des protéines liant l'ADN tel que cFos et cJun (Shiroh Futaki et al. 2001). Tous ces peptides présentent une activité de vectorisation à 4°C, avec une efficacité similaire à Tat, suggérant là encore un mécanisme indépendant de l'endocytose et de la machinerie cellulaire.

Nom du peptide	Séquence	Première publication
<b>R<sub>9</sub></b>	<b>RRRRRRRRR</b>	(Shiroh Futaki et al. 2001)
<b>pénétratine</b>	<b>RQIKIWFQNRRMKWKK</b>	(Derossi et al. 1994)
<b>pénétratine synthétique</b>	<b>RRWRRWRRWRRWRR</b>	(Williams et al. 1997)
<b>R<sub>6</sub>W<sub>3</sub> / RW<sub>9</sub></b>	<b>RRWRRWRR</b>	(Delaroche et al. 2007)

Figure I-5 : Tableau présentant les CPP synthétiques communs. Les acides aminés chargés positivement sont en gras, et ceux hydrophobes sont en bordeaux.

Ainsi au cours des mêmes travaux, l'équipe de Sugiura s'est intéressée aux peptides de synthèse polyarginines. Ces peptides sont aussi capables de rentrer dans les cellules, y compris avec une cargaison et il existe un optimum quant au nombre d'arginines. Le peptide contenant 9 arginines, R<sub>9</sub>, présente la meilleure efficacité d'internalisation (Figure I-5).

À la même période, l'équipe de Doherty en collaboration avec l'équipe de Prochiantz, s'est intéressée à des peptides mimétiques de la pénétratine permettant l'entrée de facteurs de croissance épidermiques dans des cellules. Ils sont arrivés à la conclusion que ces peptides mimétiques devaient non seulement être riches en arginines, mais aussi que la présence des deux tryptophanes était essentielle pour la translocation (Derossi et al. 1998). Ils ont ainsi montré qu'un peptide constitué de la répétition d'arginines et de tryptophanes (sorte de pénétratine synthétique) suffisait à promouvoir l'entrée du facteur de croissance épithéliale dans

des cellules musculaires, déclenchant les cascades de signalisation dues à la présence du facteur de croissance (Williams et al. 1997) (Figure I-5).

Tenant compte des informations sur le nombre d'arginines nécessaires à la translocation et l'importance des tryptophanes, différents variants de nonapeptides ont vu le jour, dont R<sub>6</sub>W<sub>3</sub>, aussi appelé RW<sub>9</sub>, qui fait encore partie des CPP prometteurs par sa simplicité de synthèse et son efficacité de translocation (Delaroche et al. 2007) (Figure I-5).

## F. Mécanismes d'entrées

### 1. Une entrée plus compliquée qu'il n'y paraît

Tous les travaux ci-dessus portant sur la découverte des différents CPP usuels (Figure I-6) montrent que leur entrée ne dépend pas uniquement de l'endocytose puisqu'ils s'internalisent, aussi, à 4°C.

Nom du peptide	Séquence	Première publication
<b>Tat</b>	<b>GRKKRRQRRRPPQ</b>	(Fawell et al. 1994)
<b>pénétratine</b>	<b>RQIKIWFQNRRMKWKK</b>	(Derossi et al. 1994)
<b>TP10</b>	<b>AGYLLGKINLKALAALAKKIL</b>	(Soomets et al. 2000)
<b>R<sub>9</sub></b>	<b>RRRRRRRRR</b>	(Shiroh Futaki et al. 2001)
<b>R<sub>6</sub>W<sub>3</sub> / RW<sub>9</sub></b>	<b>RRWRRRWR</b>	(Delaroche et al. 2007)

Figure I-6 : Tableau présentant les CPP historiques. Les acides aminés chargés positivement sont en gras, et ceux hydrophobes sont en bordeaux.

Cependant, toutes ces études ont été faites sur des cellules fixées. Les peptides et leurs rapporteurs étaient incubés en présence de cellules, mais après l'incubation le milieu était changé, et les cellules fixées pour observation en microscopie, ou en quantifiant l'internalisation sans dégrader le peptide membranaire.

Ces expériences ont été reproduites sur les peptides cités précédemment. L'observation par fluorescence était réalisée avec et sans fixation afin de voir l'effet de cette dernière étape sur la translocation. Il apparaît clairement que Tat et R<sub>9</sub>, après internalisation sur cellules intactes, ont une localisation ponctuelle et sont colocalisés avec la transferrine, qui est un marqueur de l'endocytose, tandis qu'après fixation le peptide est concentré dans les nucléoles et diffus dans le cytosol, tout comme la transferrine (Figure I-7). Les observations réalisées jusqu'à présent souffraient d'un artefact dû à la fixation (Richard et al. 2003).

Richard et al. se sont aussi intéressés aux résultats pouvant être obtenus sur extraits cellulaires totaux. Ils ont ainsi étudié la translocation à l'aide d'un cytomètre en flux (FACS) et il apparaît

que la majorité du signal est due à l'affinité des CPP pour la membrane et non à leur entrée dans les cellules (Richard et al. 2003). Il est ainsi nécessaire de traiter les cellules à la trypsine, une protéase non spécifique, afin de dégrader les CPP liés à la membrane avant de réaliser les mesures. Les mesures après traitement à la trypsine montrent que l'entrée des CPP est majoritairement inhibée à 4°C et par les inhibiteurs d'hydrolyse de l'ATP. Ainsi les CPP entrent dans les cellules majoritairement grâce à la machinerie cellulaire, sûrement des mécanismes d'endocytose. Cependant, une faible proportion de CPP entre tout de même en absence d'ATP ou à 4°C.

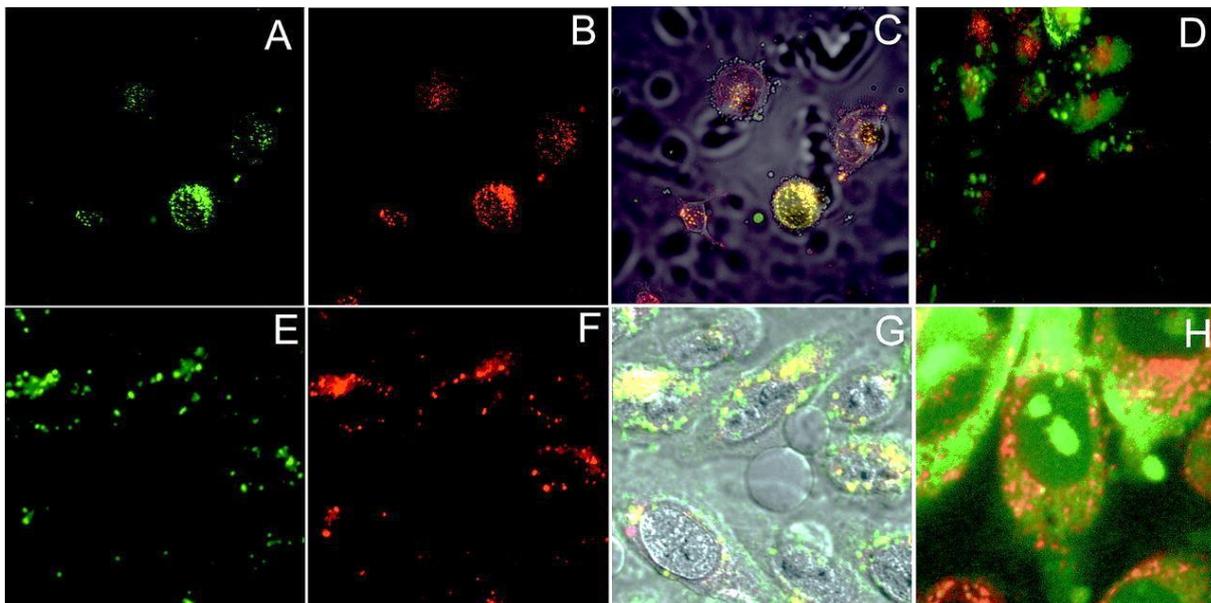


Figure I-7 : influence de l'étape de fixation sur l'observation de l'entrée de Tat dans des cellules HeLa (A-D) et dans cellules CHO (E-H). Tat est conjugué à Alexa-488 (vert) et le marqueur d'endocytose est conjugué à Alexa-546 (rouge). Observation sur cellules non fixées (A-C, E-G) présentant la localisation de Tat (A, E), les endosomes (B, F), et une superposition des deux avec la lumière blanche (C, G). La même superposition sans la lumière blanche a été réalisée sur cellules fixées (D, H). L'illustration provient de la publication d'origine (Richard et al. 2003).

## 2. Les sucres de surface comme partenaires

La partie qui suit dresse un état des lieux sur les connaissances des mécanismes d'entrées des CPP.

### a) Suggestion d'un partenaire des CPP

Les premières études sur la translocation des CPP suggéraient qu'aucun récepteur n'était nécessaire pour l'entrée de ces molécules (Derossi et al. 1998). En effet, une inversion de la séquence de la pénétratine ou bien l'utilisation d'acides aminés D, au lieu de leur conformation naturelle L, ne modifie pas les propriétés d'entrée de ces peptides. De plus la découverte

d'analogues possédant des propriétés physico-chimiques similaires mais des séquences différentes corrobore l'absence de récepteurs spécifiques pour un CPP donné.

Cependant, il a été observé que la concentration de peptides internalisés présente une saturation et que deux peptides peuvent entrer en compétition. Citons pour exemple, l'absence d'internalisation de Tat (à 1  $\mu\text{M}$  dans le milieu extérieur) lorsqu'il est incubé en présence de 100 $\mu\text{M}$  de Rev non marqué, et inversement (Suzuki et al. 2002). Ceci suggère l'existence de partenaires des CPP à la surface des cellules qui pourraient être saturés par les peptides, mais que ces partenaires ne sont pas spécifiques de certaines séquences. Il se peut aussi qu'il y ait plusieurs partenaires impliqués dans la reconnaissance des CPP. Rappelons par ailleurs que la majorité des CPP sont chargés positivement et présentent un caractère amphiphile. Il est donc fortement probable que les sucres de surface, dont certains sont porteurs de charges négatives jouent un rôle dans leur internalisation, ainsi que la bicouche lipidique comportant des lipides chargés négativement.

### **b) Le glycocalyx**

Afin de mieux comprendre les interactions des CPP avec la membrane il est nécessaire d'examiner les différents constituants de cette dernière. La membrane plasmique cellulaire n'est pas seulement composée de lipides et de protéines. En effet, elle est entourée d'une épaisseur de sucre, le glycocalyx. Cette structure permet, entre autres, de protéger la cellule des forces mécaniques auxquelles elle peut être soumise. Ces sucres peuvent être liés à la tête hydrophile des lipides, que l'on appelle alors glycolipides, mais aussi à la surface des protéines, formant ainsi les protéoglycanes. Ces sucres sont pour la majorité des polysaccharides nommés glycosaminoglycanes (GAG). Il existe de nombreux GAG à la surface de la cellule. Ces sucres sont souvent impliqués dans les processus de reconnaissance précédant l'endocytose (Christianson & Belting 2014), plus particulièrement les sucres porteurs de charges négatives telles que les sulfates d'héparane (HS) (ou héparines, selon la voie de synthèse), et les chondroïtines sulfates (CS) dont les structures sont présentées en Figure I-8. Ainsi dans l'hypothèse où les CPP entrent par endocytose, les GAG pourraient être des partenaires de leur reconnaissance.

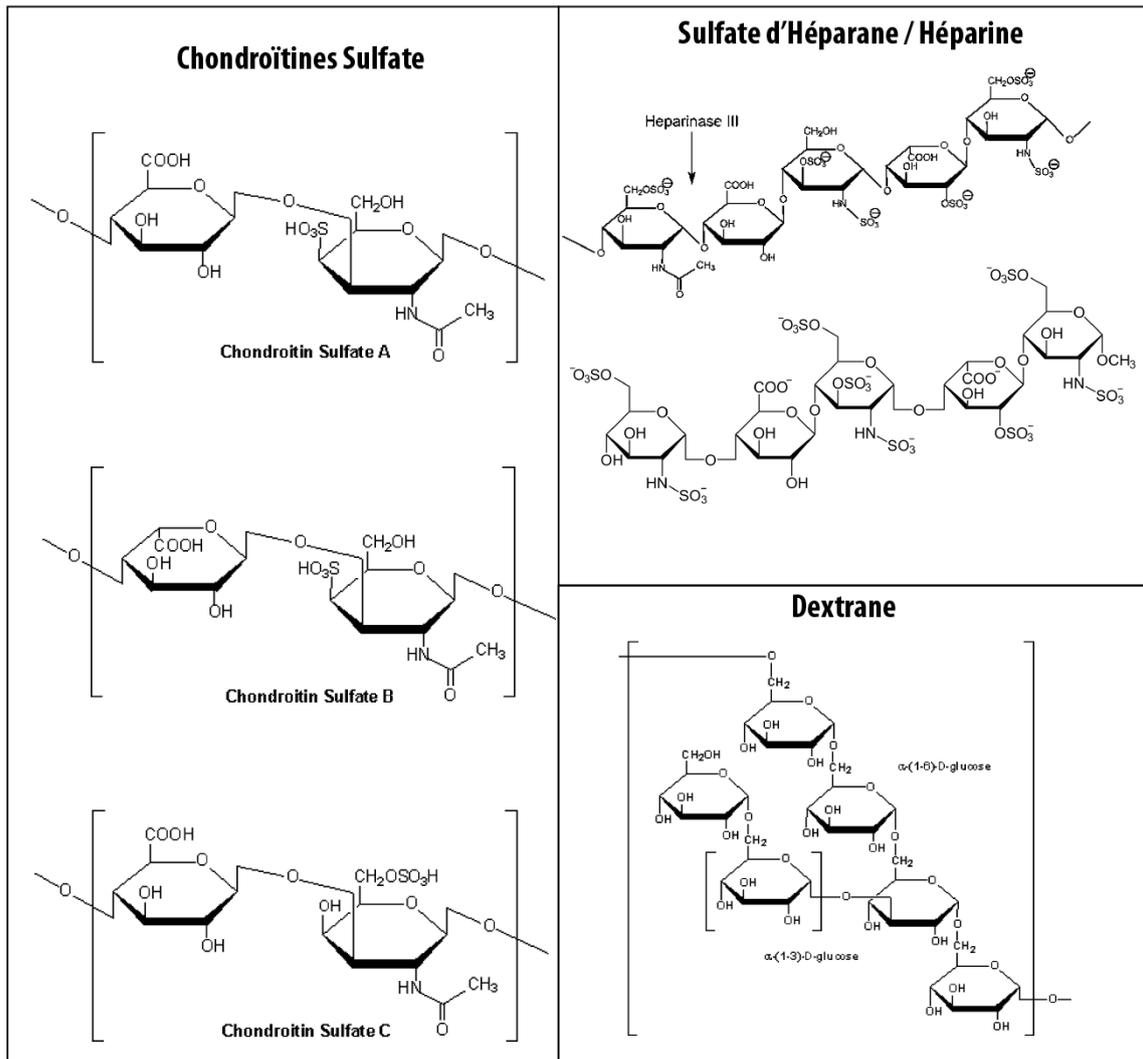


Figure I-8 Formules semi-développées des différents sucres mentionnés. Les formules représentent les motifs les plus fréquents mais les sucres sulfatés peuvent présenter leurs groupements sulfates à des endroits différents. Toutes les formules ont été obtenues à partir du site internet de la compagnie Sigma-Aldrich®.

### c) Les sucres de surface

L'ajout de CS ou de HS solubles, dans le milieu d'incubation des cellules, entraîne une diminution de moitié de l'internalisation de Rev, Tat, ou R<sub>8</sub>, montrant une compétition entre ces sucres et le partenaire des CPP. Ainsi il semble que les CPP possèdent une forte affinité pour les sucres. L'utilisation de cytochalasine D, un inhibiteur de la macropynocitose, a montré une inhibition de l'entrée de Tat couplé à Cre (Wadia et al. 2004) suggérant une possible entrée par endocytose et appuyant ainsi une interaction potentielle avec les GAG. Cependant Tat, Rev, ou R<sub>8</sub> couplés à des fluorophores ne semblent pas voir leurs entrées inhibées par les inhibiteurs d'endocytose usuels (Suzuki et al. 2002). Ceci suggère que malgré une reconnaissance potentielle des sucres nécessaire à l'internalisation il est possible que le mécanisme d'entrée induit par cette étape ne soit pas toujours dépendant de la machinerie cellulaire.

De plus, il n'existe pas d'inhibiteur spécifique à chaque voie d'endocytose. En général, l'inhibition d'une voie d'endocytose modifie totalement le comportement cellulaire, expliquant les différences observées quant aux effets de l'inhibition dans des conditions semblables, comme c'est le cas pour l'entrée de Tat qui peut être inhibée, ou non, par la cytochalasine D.

#### **d) Quelques partenaires candidats ?**

Afin de mieux comprendre l'importance des sucres de surface dans un environnement membranaire, des études complémentaires ont été réalisées à l'aide de cellules dont les voies de synthèse de certains des sucres de surface sont altérées.

Le type cellulaire le plus commun pour l'étude des sucres de surface est une lignée dérivée de cellules Ovariennes d'Hamster Chinois (CHO), appelée CHO K1 dans son état sauvage, CHO 745 ou CHO GAG<sup>-</sup> lorsqu'elles sont déficientes en sucres de surface, CHO 677 lorsqu'elles sont déficientes en sulfate d'héparane (HS) (Deutscher et al. 1984) (Esko et al. 1985). Il a été montré que dans les CHO 677 (sans HS) l'internalisation de la pénétratine diminue, tandis que celle de Tat n'est pas modifiée. En revanche, dans CHO 745 (sans GAG) on observe une diminution de l'internalisation de Tat et de la pénétratine. De façon surprenante, la présence d'un sucre non chargé, le dextrane, dans le milieu de culture inhibe l'entrée de Tat mais pas de la pénétratine. Cependant lorsque la pénétratine transporte un liposome comme cargaison, son entrée est inhibée par les dextrans solubles. Ceci met en évidence la modification du type d'internalisation en fonction de la cargaison (Console et al. 2003). Certains CPP sont donc capables de reconnaître des sucres non chargés, et ce caractère peut être conféré par la présence d'une cargaison. Cette modification de l'entrée du CPP selon sa cargaison souligne qu'ils ne sont pas des vecteurs idéaux.

La présence d'une cargaison lipidique altère les mécanismes d'entrée du peptide, il se peut donc que ce soit le cas de toutes les cargaisons. Pour vérifier cette influence de la cargaison, une technique d'analyse en absence de marquage a été développée. À ces fins des expériences reposant sur l'identification des peptides par spectrométrie de masse ont été développées au laboratoire des BioMolécules de l'UPMC (Burlina et al. 2006). Ces expériences permettent de mesurer d'une part la quantité de peptides internalisée, et d'autre part celle liée à la membrane. La partie liée à la membrane est déterminée par la différence de quantité avec et sans dégradation des peptides liés à la membrane à l'aide de trypsine (comme expliqué dans le paragraphe I.F.1). Ces expériences conduites avec différents CPP (la pénétratine, Tat et R<sub>6</sub>W<sub>3</sub>)

et sur des mutants CHO ont montré que les cellules déficientes en GAG présentent une internalisation des CPP réduite (Jiao et al. 2009a).

De plus, l'affinité des CPP pour des HS libres (non liés à un GAG cellulaire) a été confirmée par deux expériences (Åmand et al. 2012). D'une part, des agrégats se forment lorsque de l'héparine est ajoutée à une solution de CPP, d'autre part, le temps de rétention de mutants de la pénétratine en colonne d'affinité décorée à l'héparine augmente avec le nombre d'arginines. De telles approches sont seulement qualitatives et des mesures calorimétriques ont été menées pour quantifier l'affinité entre les CPP et les HS (Ziegler & Seelig 2011) (Bechara et al. 2013). Quel que soit le CPP considéré il semble toujours avoir une affinité pour les sucres de surfaces porteurs de charges négatives, les CS comme les HS.

L'importance des acides sialiques (SA) a aussi été étudiée à l'aide de mutants CHO déficients dans la synthèse des SA, les CHO-lec2. En absence de SA, R<sub>6</sub>W<sub>3</sub> et la pénétratine pénètrent plus rapidement dans les cellules à 37°C. Il semble que ces sucres soient responsables d'une inhibition de l'entrée des CPP, peut être en masquant d'autres partenaires, car l'interaction directe entre les CPP et les SA n'a pas été montrée.

Les CPP ont donc une affinité pour les HS et les CS, tandis que les SA semblent inhiber partiellement l'internalisation de ces peptides. Cependant les effets varient selon le CPP considéré. De plus, on peut se demander si la nature chargée de certains sucres est à l'origine des interactions observées avec les CPP contenant des acides aminés chargés positivement (lysine ou arginines).

Il apparait clairement que l'étude des CPP sur membrane cellulaire présente de nombreuses limitations. En effet, le modèle cellulaire étudié peut varier, et au sein d'une même lignée il est possible que les dérives génétiques puissent expliquer les différences observées quant aux mécanismes d'entrée des CPP. De plus les CPP présentent chacun leur voie d'entrée selon leur nombre d'arginines, de tryptophanes, voire d'autres critères non encore identifiés.

### **3. Les approches modèles, l'hypothèse de la translocation**

Des travaux réalisés en spectrométrie de masse (Jiao et al. 2009b), montrant que l'affinité membranaire de la pénétratine, Tat et RW<sub>9</sub> n'est pas modifiée par la présence des GAG, suggèrent une interaction avec la bicouche. Cette affinité pour les cellules déficientes en sucres de surface est surprenante mais des mesures de la charge des cellules ont montré que les mutants étaient autant chargés que les cellules sauvages (Åmand et al. 2012). Ainsi il se peut que la reconnaissance de la membrane soit dépendante seulement de la charge de la cellule, conférée

entre autres par les HS, mais qu'en revanche l'internalisation dépende de la présence des GAG. De plus, que ce soit en inhibant la machinerie cellulaire, essentiellement en abaissant la température, ou en utilisant des cellules déficientes en GAG une partie des CPP entre toujours dans les cellules (Jiao et al. 2009a). Ces travaux ont aussi été confirmés en FACS (Richard et al. 2003). Ainsi il semble qu'un mécanisme permettant cette entrée des peptides indépendamment de la machinerie cellulaire et des GAG existe. D'où l'idée d'utiliser des systèmes modèles, moins complexes que les cellules, pour étudier cette voie d'entrée.

Il existe différents systèmes modèles, permettant de réduire la complexité membranaire, et la variabilité cellulaire, afin de ne s'intéresser qu'à l'influence de quelques composantes. Nous nous proposons de revenir sur les différents modèles utilisés dans le cadre de l'étude des CPP afin de mieux comprendre le rôle des différents éléments de la membrane dans le mécanisme d'entrée des CPP.

#### **a) Les GPMV**

Dans le domaine de l'interaction des CPP avec les composants de la membrane le système modèle le plus proche de la cellule est la vésicule de membrane plasmique (GPMV). Les GPMV sont des vésicules sécrétées par les cellules en condition de stress chimique. De ce fait elles conservent une composition membranaire, lipides et protéines, proche de la cellule qui les sécrète. Cependant leur composition lipidique est altérée par le traitement chimique choisi, et l'asymétrie lipidique de la bicouche est perdue. En routine elles sont générées par une incubation dans le formaldéhyde ou le N-éthylmaléimide, puis isolées par des étapes de centrifugation et de dialyse. Les CPP R<sub>9</sub>, Tat, TP10 et la pénétratine, marqués avec une sonde fluorescente, sont capables de s'accumuler dans la lumière et la membrane des GPMV, ce qui n'est pas le cas de peptides non CPP (Säälik et al. 2011).

Il a été montré qu'un traitement à la trypsine des GPMV inhibait l'internalisation de ces CPP. Ce traitement dégrade, entre autre, le cœur protéique des protéoglycanes portant les GAG, ce qui suggère qu'il est nécessaire que ces GPMV conservent leurs protéines et peut-être leurs sucres de surface, pour une internalisation des CPP. Cependant la dégradation des sucres seuls n'a pas été réalisée sur ces modèles, ce qui ne permet pas de dissocier le rôle des GAG de celui des protéines membranaires.

Par ailleurs la coexistence de deux phases lipidiques fluides, L<sub>o</sub> et L<sub>d</sub>, pour liquide ordonnée et liquide désordonnée, dans les GPMV (Baumgart et al. 2007), pourrait jouer un rôle dans l'entrée

des CPP. L'ajout de cholestérol dans une membrane rigidifie cette membrane favorisant la phase  $L_0$ , tandis que sa déplétion favorise la phase  $L_d$ . Il a été montré que l'entrée des CPP dans des GPMV, est favorisée par la déplétion en cholestérol et inhibée par l'ajout de cholestérol (Pae et al. 2014). Ceci suggère que les CPP s'insèrent d'autant plus facilement que les membranes sont fluides. Les protéines sont supposées favoriser l'existence de domaines, permettant ainsi la formation de la phase  $L_d$  dans des membranes majoritairement  $L_0$  par exemple (Scheve et al. 2013). Ainsi il se peut que l'effet observé lors de la dégradation des protéines soit dû à une disparition des domaines  $L_d$ .

La translocation des CPP dépend donc de la présence de protéines dans les GPMV, et peut-être de celle de GAG, et il semble que la fluidité membranaire puisse jouer un rôle (Pae et al. 2014). Cependant l'obtention des GPMV repose sur un stress cellulaire, il se peut donc que ces vésicules présentent des défauts, rendant difficiles les conclusions sur ce modèle.

### **b) Les vésicules**

Les expériences en vésicules sont très contradictoires et nous allons revenir sur les expériences déjà réalisées sur ces systèmes afin de dégager les critères qui semblent pertinents pour observer la traversée des CPP. Toutes les expériences qui suivent utilisent majoritairement des vésicules chargées par environ 25% de phosphatidylsérine, (PS) ou phosphatidylglycerol (PG), et des lipides zwitterioniques, neutres (phosphatidylcholine, PC).

Le mécanisme d'entrée de la pénétratine dans des vésicules fut le premier à être caractérisé. La pénétratine couplée à la fluorescéine est capable de pénétrer dans des GUV (vésicule unilamellaire géante,  $\varnothing > 1 \mu\text{m}$ ) composées d'asolectine de soja, un mélange lipidique complexe extrait du soja contenant une partie de lipides chargés négativement. En observation en microscopie confocale après 1 h d'incubation en présence de pénétratine dans le milieu extérieur, les GUV présentent le même signal à l'intérieur qu'à l'extérieur (Thorén et al. 2000). Ceci suggère donc que la concentration en pénétratine s'équilibre entre l'intérieur et l'extérieur des GUV. Par ailleurs, il apparaît que la pénétratine a une forte affinité pour la bicouche lipidique puisque les membranes des GUV sont nettement plus fluorescentes que le milieu aqueux. Cette entrée a aussi été observée sur des GUV (DOPC:DOPG 6:4) (Persson et al. 2004). De même, TP10-fluorescéine pénètre dans des GUV (DOPC:DOPG 8:2). Il y a une accumulation de TP10 dans les vésicules pendant les 100 premières secondes, puis, pour des concentrations en TP10 supérieures à  $1 \mu\text{M}$ , des pores s'ouvrent dans la membrane après 200 s

d'incubation. Ainsi il semble que TP10 entre par un mécanisme indépendant de l'ouverture de pores, mais que suite à son entrée des pores se forment de manière stochastique (Islam et al. 2014). RW<sub>9</sub> marqué à la fluorescéine (RW<sub>9</sub>-fluorescéine) est aussi capable de traverser la membrane de GUV (100% POPG), s'accumulant à la membrane de petites vésicules encapsulées dans les GUV, certifiant la présence de RW<sub>9</sub> libre dans les GUV. Cependant, à des concentrations atteignant 5 µM, un peptide *a priori* non CPP, RL<sub>9</sub>, marqué à la fluorescéine est aussi capable d'entrer dans ces GUV, et au-delà de 10 µM, les vésicules sont lysées en présence de RW<sub>9</sub> ou RL<sub>9</sub> marqués à la fluorescéine (Walrant et al. 2013).

Ces résultats ont été reproduits en formant des GUV et des GV (vésicule dont la membrane n'est pas unilamellaire), la pénétratine-fluorescéine pénètre dans les GV, chargées négativement (3 :1 POPC/POPG), mais en revanche les GUV ne présentent pas de fluorescence dans leur lumière ce qui est en contradiction avec les observations précédentes (Bárány-Wallje et al. 2005).

Tous ces résultats suggèrent que la translocation de CPP sur GV contenant les lipides chargés négativement semble possible, et se fait en l'absence d'ouverture de pores. En revanche, la présence d'un fluorophore lié au CPP, induit la formation de pores dans la membrane.

Les expériences sur membranes présentant des courbures importantes (contrairement aux GUV et GV dont la courbure peut être considérée nulle) semblent donner des résultats opposés. En 2001, la translocation de la pénétratine a été étudiée sur des SUV (petite vésicule unilamellaire ø 31 nm) comportant des lipides chargés négativement dans leur membrane (POPC:POPG 3:1). Les SUV étant trop petites pour être résolues individuellement par microscopie à fluorescence, il est nécessaire de quantifier l'internalisation différemment. Les SUV sont incubées dans un premier temps avec la pénétratine marquée en fluorescence (à l'aide de nitrobenzoxadiazole : NBD), puis l'ajout d'un extincteur de fluorescence (la dithionite) permet de n'observer que la pénétratine protégée par la membrane des SUV, donc celle qui a pu pénétrer dans les vésicules. Or, après l'ajout de l'extincteur l'échantillon ne présente plus de signal suggérant que la pénétratine n'est pas capable d'entrer dans les SUV (Drin et al. 2001). L'utilisation de la trypsine (qui clive les peptides collés à la membrane mais ne peut accéder à ceux qui ont pénétré) a aussi confirmé l'absence d'entrée de la pénétratine (Drin et al. 2003). La présence de deux tryptophanes dans la séquence de la pénétratine, permet aussi d'évaluer sa translocation sans ajout de fluorophore exogène. Des SUV (POPC:POPG 3:1) ont été incubées en présence de pénétratine puis lavées. La fluorescence avant le lavage suggère que les tryptophanes sont dans un environnement hydrophobe, et donc que la pénétratine est

emprisonnée dans les feuillettes et non en solution. Après lavage, il n'y a plus de pénétatine dans l'échantillon suggérant qu'elle n'est pas entrée dans les SUV (Bárány-Wallje et al. 2005).

La translocation des CPP n'est donc pas observable sur les membranes de forte courbure. Sur des membranes de courbure moindre, les LUV, les résultats semblent suggérer une absence de translocation aussi. Les résultats de Bárány-Wallje et al. ont été confirmés sur des LUV (grande vésicule unilamellaire  $\varnothing$  100 nm), suggérant une absence de translocation de la pénétatine dans ces modèles (Bárány-Wallje et al. 2007). La translocation de Tat dans des LUV (100% Egg PC ou Egg PC:Egg PS 4:1) n'a pas été observée non plus (Krämer & Wunderli-Allenspach 2003). De même, la translocation de la pénétatine et quelques-uns de ses mutants sur des LUV (DOPC:DOPG 6:4), n'a pu être observée par transfert par résonance de Förster (en anglais : Förster Resonance Energy Transfer, FRET) (Persson et al. 2004). Le FRET consiste à suivre le transfert de fluorescence entre un fluorophore « donneur » et un fluorophore « accepteur ». Les conditions sont que la longueur d'onde d'émission du premier soit dans la plage d'absorption du second et que les fluorophores soient proches l'un de l'autre (de 1 à 10 nm selon le couple (Jares-Erijman & Jovin 2003)). Le couple tryptophane - lysométhylcoumarin (lysoMC) possède une distance de FRET de 25 Å, tandis que l'épaisseur de la membrane des liposomes utilisés est d'environ 40 Å. La lysoMC incorporée à l'intérieur des LUV nous renseigne, par FRET, sur la quantité de pénétatines ayant pénétré dans les LUV. Cependant, aucune entrée des peptides ainsi testés n'a pu être détectée.

Bien que l'entrée des CPP n'ait pas été observée lors de nombreuses expériences en LUV, il existe quelques études ayant pu quantifier l'entrée des CPP dans ces modèles.

Tout d'abord Terrone *et al.* : bien qu'ils n'aient pas observé la translocation de la pénétatine dans des LUV, quelle que soit la composition lipidique utilisée, ils ont montré que la translocation devenait possible une fois que la membrane des vésicules présente un potentiel transmembranaire, négatif pour l'intérieur de la vésicule. Le potentiel est généré à l'aide de valinomycine, une toxine qui perméabilise les membranes exclusivement pour le potassium, tandis que les vésicules sont les seules à contenir cet ion. Ces résultats suggèrent que la présence d'un gradient électrique joue le rôle de force motrice dans l'entrée des CPP, chargés positivement (Terrone et al. 2003). Récemment, l'entrée de R<sub>6</sub>W<sub>3</sub> dans des LUV, par spectrométrie de masse, a été observée à condition que ces dernières contiennent des lipides chargés négativement (Walrant et al. 2013). De façon assez surprenante, les expériences conduites par Drin *et al.* ont été reproduites avec des LUV (100 % DOPG) ou bien avec une composition mixte (DOPC:DOPG:cholestérol 3:1:6), et la translocation de plusieurs CPP a montré une accumulation de ces derniers dans les vésicules, jusqu'à 1000 fois plus concentré

que le milieu extérieur. Par exemple, une concentration 100 nM de R<sub>9</sub> dans le milieu extérieur induit une accumulation jusqu'à 450 µM dans les vésicules. Il a aussi été suggéré que la translocation de la pénétratine s'accompagne flip-flop de la POPG (quantifiée aussi par extinction de fluorescence). La présence de cholestérol dans la membrane, qui augmente la fluidité, accroît cet effet (Swiecicki et al. 2014).

Il semble donc que l'entrée des CPP sur des membranes de courbure non nulle nécessite la présence d'un potentiel transmembranaire et une courbure pas trop importante, vésicules de diamètre supérieur à 100 nm (Terrone et al. 2003). En revanche, il existe de nombreuses contradictions sur des études utilisant les mêmes modèles et les mêmes peptides. Il est donc nécessaire d'étudier plus en détail le phénomène de translocation afin de statuer sur son existence et son mécanisme.

### c) Les films noirs

Les films noirs (BLM) sont des bicouches planes (donc de courbure similaire aux GUV) suspendues entre deux compartiments couplés à un appareillage de mesures électriques (détaillées dans le chapitre IV). Sur ce système les résultats concernant la translocation restent contradictoires.

L'étude de la pénétratine marquée à la fluorescéine a montré que cette dernière ne traverse pas une bicouche PC:PS 3:1, mais s'accumule dans cette dernière. L'application d'un potentiel entre les deux compartiments ne provoque pas la traversée de la pénétratine (Bárány-Wallje et al. 2005). De façon contradictoire Herce *et al.* ont observé que la présence d'une différence de potentiel de -50 mV de part et d'autre d'un film noir (100% DOPC ou DOPC:DOPG 3:1), augmentait la conductance du film en présence de divers CPP, dont la pénétratine, suggérant que ces derniers sont capables de former des pores transitoires dans ces membranes, et donc de traverser les BLM. De plus l'ajout de calcium inhibe la formation de pores en présence de CPP, suggérant que le calcium écranterait les groupements phosphate de la bicouche, empêchant toute interaction électrostatique avec les peptides. Ceci suggère donc que la traversée des CPP en présence d'un potentiel peut se faire par la formation de pores, suite à la reconnaissance des charges des lipides (Herce et al. 2009).

Les expériences en BLM ne permettent cependant pas de conclure quant au mécanisme de translocation puisque leurs résultats sont contradictoires.

#### d) Les modes de translocation

Certaines de ces approches suggèrent que les CPP peuvent entrer par translocation, mais cela reste controversé. De plus, le mécanisme permettant la translocation reste discuté. Les différents mécanismes supposés pour une entrée en l'absence de machinerie sont exposés Figure I-9. Les hypothèses de ces mécanismes peuvent être appuyées par certains des travaux ci-dessus, mais aucune conclusion n'est possible. Les mécanismes de poration sont essentiellement suggérés par les expériences en BLM (Herce et al. 2009). Le mécanisme impliquant la formation de micelles inverses semble être suggéré par l'existence d'un mouvement de flip-flop avec une stoechiométrie d'environ 16 lipides chargés négativement pour la translocation de 2 R<sub>9</sub> (Swiecicki et al. 2014). Cependant, ce mouvement de flip-flop pourrait aussi s'expliquer par la formation de pores. Enfin de nombreuses études ne présentent pas de pores, et n'ont pas évalué la présence de flip-flop. De plus, l'observation fréquente des CPP insérés dans les feuillettes de la membrane, comme le montre les décalages de l'émission de fluorescence des tryptophanes (Bárány-Wallje et al. 2005), suggère que ces peptides pourraient traverser directement la bicouche (Walrant et al. 2013).

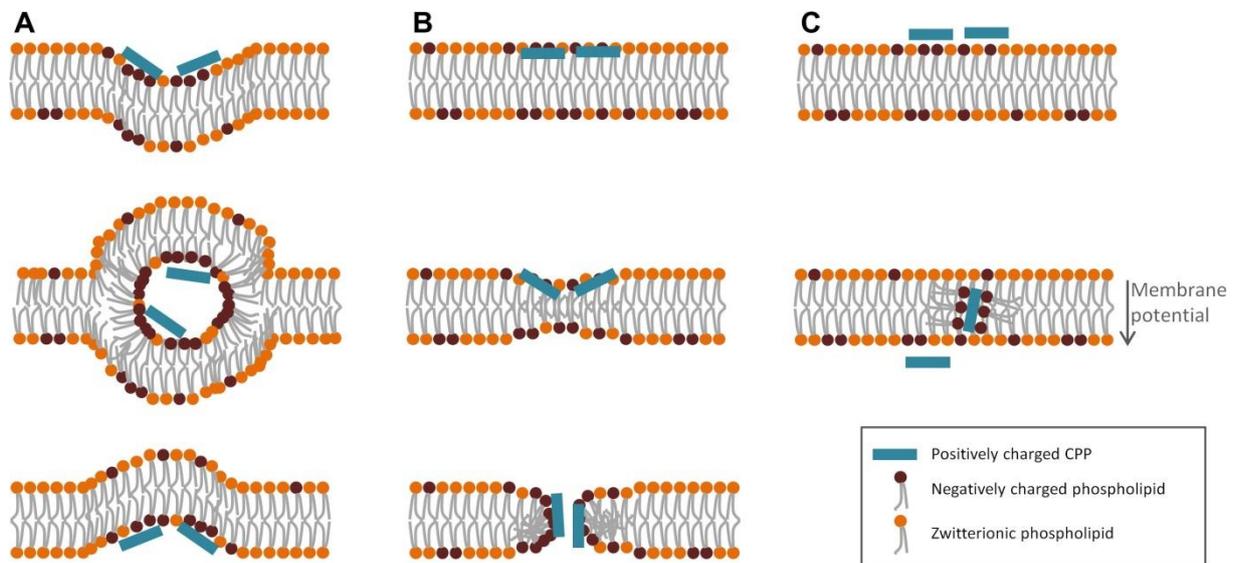


Figure I-9 : schéma présentant les différentes hypothèses de mécanismes d'entrées des CPP par translocation. A) Le mécanisme de micelle inverse ou le peptide peut courber la membrane afin de former une micelle dans cette dernière. La micelle s'ouvre ensuite sur le milieu intracellulaire permettant de faire pénétrer le CPP dans le cytosol. B) Mécanisme de poration, où plusieurs peptides s'associent afin de former des pores transitoires dans la membrane permettant l'entrée de plusieurs CPP tant que le pore est stabilisé. C) Mécanisme de translocation où le peptide diffuse à travers la membrane afin d'atteindre le cytosol de la cellule. Figure extraite de (Bechara & Sagan 2013)

Enfin il semble que la concentration du peptide soit un facteur important dans le déclenchement de certains mécanismes (Islam et al. 2014) (Walrant et al. 2013) suggérant que la translocation

ne se produit que lorsque la concentration du peptide dépasse un certain seuil, en général par un mécanisme de poration.

### e) La translocation en dehors des systèmes modèles

Il existe d'autres approches s'appuyant sur des méthodes électriques qui permettent de mesurer la perméabilité, entre autres les expériences de patch-clamp qui permettent de travailler sur cellules entières. Elles consistent à connecter une première électrode dans la cellule (en aspirant un morceau de membrane à l'aide d'une pipette contenant l'électrode). La seconde électrode est placée dans le milieu extérieur et sert de référence. La mesure électrique se fait comme pour les BLM et le peptide est ajouté à l'extérieur de la cellule pour voir si des pores se forment dans la membrane. Les résultats produits par cette technique sont cependant contradictoires. Les premières expériences publiées ont montré que R<sub>9</sub>, à 7  $\mu\text{M}$  et en présence d'un potentiel de -50 mV, est capable d'induire des pores dans les membranes et que ces derniers disparaissent lors de l'écrantage des charges des lipides par ajout de calcium (Herce et al. 2009). Des expériences similaires sur un autre type cellulaire et avec une autre peptide (Tat) ne montrent en revanche aucune perméabilisation de la membrane pour des concentrations allant jusqu'à 8  $\mu\text{M}$  et des potentiels variant de -80 mV à +80 mV (Fasoli et al. 2014).

Ces données, et certaines de celles présentées précédemment sont appuyées par des simulations numériques (Herce & Garcia 2007) que je ne décris pas plus ici. Il existe aussi des informations structurales sur les CPP dans divers milieux obtenus à l'aide de la RMN (Kwon et al. 2013) et de la cristallographie par rayon X, que je ne commenterai pas non plus.

## G. Quelques succès des CPP

Malgré les contradictions concernant les voies d'entrées des CPP et l'influence que la cargaison peut avoir sur les mécanismes d'entrée, ces derniers ont déjà pu être utilisés comme vecteurs afin de faire pénétrer des cargaisons très diverses. Pour pouvoir utiliser les CPP comme vecteur il est nécessaire de les fonctionnaliser avec une cargaison. Il existe essentiellement deux méthodes pour associer les CPP à leur cargaison. Ils peuvent être liés de façon covalente, souvent en utilisant un pont disulfure sur une cystéine, introduite *a posteriori* ou initialement présente dans la séquence du CPP. Le pont disulfure permet d'accrocher des cargaisons variées tant que ces dernières présentent une fonction soufre, il peut s'agir de protéines, d'acides nucléiques modifiés, ou de particules thérapeutiques. Les CPP peuvent aussi être liés de façon

non covalente avec leur cargaison, en profitant des interactions électrostatiques ou de l'hydrophobicité (Deshayes et al. 2010). C'est essentiellement le cas dans le transport d'acides nucléiques qui sont chargés négativement (Copolovici et al. 2014).

Nous nous proposons de revenir sur les différentes cargaisons déjà délivrées à l'aide des CPP, puis de présenter les mécanismes permettant la sélection de cibles, avant de présenter les optimisations pour obtenir des vecteurs plus efficace.

## **1. Quelques cargaisons**

De nombreuses cargaisons différentes ont pu être vectorisées dans les cellules à l'aide des CPP. Nous allons donner quelques exemples de cargaison ainsi délivrée. Cependant, cette liste n'est pas exhaustive, il existe de nombreuses revues faisant l'état de l'art sur les possibilités de vectorisation à l'aide des CPP parmi lesquelles : (Farkhani et al. 2014), (Dietz & Bähr 2004) et (Fonseca et al. 2009)

### **a) Matériel génétique**

L'entrée de matériel génétique a fait partie des premiers essais de vectorisation à l'aide de CPP. En effet, ce dernier permet de contrôler la totalité des processus cellulaires et reste donc une des molécules centrales en thérapie tout comme en biotechnologie (Bolhassani 2011). De plus les CPP étant chargés positivement ils précipitent en présence d'acides nucléiques, chargés négativement. Il est ainsi possible d'associer les CPP et l'ADN de manière non covalente permettant d'introduire le produit d'intérêt sans son vecteur. Le mécanisme d'entrée semble similaire à celui observé lors de l'entrée de l'ADN à l'aide de vectorisation calcique (Baoum et al. 2012)(Deshayes et al. 2010). En utilisant, des polyarginines modifiées par l'ajout d'un groupement stéarique il est possible de transfecter des plasmides exprimant la luciférase avec la même efficacité qu'à l'aide d'une transfection avec la lipofectamine, un liposome cationique qui se complexe avec l'ADN et fusionne ensuite avec la membrane pour faire pénétrer l'ADN dans la cellule (S. Futaki et al. 2001). Actuellement, il est possible d'utiliser les CPP pour permettre la vectorisation ciblée de matériel génétique dans un organisme. Parmi les études les plus remarquables, il a entre autres été possible d'inhiber l'expression de gènes spécifiquement dans les cellules neuronales de souris à l'aide d'un ARN « silencieux » couplé à une chimère RVG-R<sub>9</sub>. RVG est un peptide détectant spécifiquement les récepteurs de l'acétylcholine, il permet ainsi d'augmenter l'affinité du vecteur pour les cellules exprimant ces récepteurs, les neurones. À l'aide de cette chimère, les auteurs ont ainsi pu inhiber l'expression d'un gène GFP

introduit dans l'organisme, quantifiable par fluorescence. Mais ils ont aussi montré qu'en ciblant un gène ménager (ubiquitaire), ils arrivent à diminuer son niveau d'ARNm dans le cerveau et pas dans les autres cellules de la souris (Kumar et al. 2007).

### **b) Protéines**

Les protéines ne sont que rarement parmi les cibles essentielles de la vectorisation. En effet, leur synthèse est contrôlée par le génome, et il est donc plus avantageux d'introduire l'ARN ou l'ADN, souvent plus petit, et permettant de synthétiser plus de protéines que si elles avaient été vectorisées. Néanmoins, les protéines restent un moyen de détection de la translocation avantageux. Ces dernières sont détectables en l'absence de la machinerie cellulaire, et parmi les protéines utilisées afin de vérifier la translocation des CPP on retrouve des enzymes tels que HRP ou la  $\beta$ -galactosidase déjà mentionnée plus tôt dans cette introduction (Fawell et al. 1994). D'autres protéines souvent délivrées avec les CPP sont les protéines fluorescentes, telles que la GFP (Green Fluorescent Protein), qui est souvent plus simple, et moins coûteuse, à coupler aux CPP que les fluorophores synthétiques. Citons entre autres, la fusion de la GFP avec Tat, qui permet de faire pénétrer efficacement cette dernière dans de nombreux types cellulaires (Caron et al. 2001).

### **c) Nanoparticules**

Les CPP ont permis de faire pénétrer de nombreuses nanoparticules, allant des agents thérapeutiques aux nanoparticules pour la biotechnologie.

La détection des CPP est souvent faite à l'aide de fluorophores tel que la fluorescéine ou le NBD. Cependant ces fluorophores ont de nombreux inconvénients dont leur intensité de fluorescence éventuellement trop faible et leur photoblanchiment rapide. Les quantum dots (QD), des nanocristaux diélectriques, présentent des propriétés de fluorescence intéressantes, ils sont stables (non sujets au photoblanchiment) et très brillants. Ils sont devenus un outil privilégié dans les expériences de fluorescences, malgré leur taille ( $> 10$  nm, contre 1 nm pour un fluorophore synthétique) qui rend leur entrée dans les cellules difficile. Ainsi, ils ont fait partie des premières nanoparticules à être vectorisées à l'aide de CPP. Il a été montré qu'un conjugué Tat-QD pénètre de façon plus efficace dans les cellules que des QD seuls. Ainsi profitant des propriétés de fluorescence des QD il est aisé de quantifier leur internalisation dans les cellules (Xue et al. 2007). De plus, il a aussi été montré que les QD peuvent s'associer de façon non covalente au CPP HR<sub>9</sub>, une polyarginine-histidine, et permettre l'entrée des QD par

un mécanisme non dépendant de l'endocytose (Liu et al. 2011). Les CPP permettent donc de faire entrer des QD dans les cellules, par différents mécanismes, ce qui permet d'améliorer les observations en fluorescence.

Cependant, la fluorescence n'est pas la seule méthode d'imagerie utilisée en biologie. En effet, la lumière visible pénètre très mal dans les tissus et il est donc difficile de réaliser des diagnostics à l'aide de cette dernière. À l'heure actuelle, la majorité des diagnostics sont permis par l'imagerie à rayon X ou l'imagerie par résonance magnétique (IRM), cependant ces techniques nécessitent la présence d'agents de contraste pour être efficaces. L'IRM nécessite la présence de particules sensibles aux champs magnétiques dans les cellules à observer. L'ajout du peptide Tat à des nanoparticules, d'oxyde de fer, paramagnétique ( $\varnothing \sim 5$  nm) permet leur incorporation rapide dans des cellules (en l'absence du peptide ces mêmes nanoparticules magnétiques ne pénètrent pas dans les cellules). Il a ainsi été possible non seulement de suivre la migration de cellules souches, injectées dans des souris, à l'aide de l'IRM, mais aussi de les séparer à l'aide d'un tri magnétique (Lewin et al. 2000).

Concernant l'imagerie par rayon X, les nanoparticules de métal sont utilisées fréquemment comme agent de contraste. Il a été montré que l'association d'une polyarginine à des nanoparticules d'or permet d'améliorer leur vectorisation. L'efficacité d'entrée dépend de la taille de la nanoparticule d'or, seules les particules ayant un diamètre inférieur à 16 nm pénètrent dans les cellules. Les particules de 3 nm ou moins se concentrent dans le noyau des cellules, mais les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore compris (Peptides et al. 2011). Récemment, les particules d'or ont été étudiées extensivement pour leur propriété à convertir l'énergie photonique en énergie thermique. Ce transfert d'énergie appelé photothermie est d'un intérêt majeur dans l'ablation thermique locale de tumeur. Une telle opération nécessite d'amener les nanoparticules spécifiquement au niveau des cellules cancéreuses. La vectorisation de nano-étoiles d'or, des particules avec un fort pouvoir photothermique, couplées à Tat s'est montrée très efficace. Après leur internalisation il est possible de thermolyser l'intégralité des cellules ainsi incubées, c'est-à-dire détruire les cellules par photothermie, (Yuan et al. 2012). Une telle efficacité d'internalisation et de réponse à la photothermie est très prometteuse pour la mise au point de l'ablation de tumeur.

Certains CPP ont donc déjà permis des vectorisations efficaces, cependant les effets sont fortement dépendants, du CPP, de sa cargaison et de la cible. C'est pourquoi il est nécessaire d'optimiser leur entrée en particulier pour des traitements sur un organisme entier.

## **2. Optimisations**

### **a) Ciblage**

Afin de passer à un traitement sur un organisme, il est nécessaire de développer des méthodes de ciblage des cellules d'intérêt. En effet, dans le cas de thérapies telles que le traitement d'un cancer il n'est pas souhaitable que l'ensemble de l'organisme soit exposé au médicament, qui souvent possède une activité apoptotique.

L'utilisation de peptide chimérique s'est montrée d'un intérêt majeur dans la vectorisation ciblée. Comme présenté dans le cas de la vectorisation d'ADN ciblé (I.G.1.a)), l'ajout d'un peptide avec une forte affinité vis-à-vis des récepteurs à l'acétylcholine a permis de faire pénétrer spécifiquement des ARN « silenciers » dans le cerveau des rats (Kumar et al. 2007).

L'identification de peptides de ciblage (en anglais Homing Peptide, HP) à l'affinité accrue vis-à-vis de certains types cellulaires a longtemps été étudiée afin de fournir un outil complet dans le diagnostic des cellules pathogènes. Il existe désormais des bibliothèques de peptides permettant de cibler de façon préférentielle un type cellulaire. La fabrication de chimères contenant un CPP et un HP a été extensivement utilisée ces dernières années afin de vectoriser de façon spécifique dans un seul type cellulaire (Svensen et al. 2012).

### **b) Vectorisation accrue**

Dans le cas du traitement d'un organisme entier à l'aide de CPP, il est nécessaire de protéger ces derniers contre la dégradation. De plus, il peut être nécessaire d'augmenter leur efficacité, car les CPP sont dilués dans l'organisme après leur administration.

Les CPP ne possèdent pas de structure définie, si ce n'est qu'une majorité d'entre eux adopte une conformation en hélice  $\alpha$  lorsqu'ils entrent en contact avec les membranes ; cette conformation peut être stabilisée en cyclisant le peptide. De nombreuses équipes se sont donc intéressées aux effets de la cyclisation des CPP qui semble augmenter leur internalisation (Qian et al. 2013) (Liskamp 2014). Par exemple, il a été montré qu'une version cyclisée de la lactoferrine humaine pénètre mieux dans les cellules que la version linéaire (Wallbrecher et al. 2014). De plus, cette cyclisation permet aussi de prévenir la dégradation des CPP augmentant ainsi leur possibilité de circuler dans l'organisme.

Une autre alternative pour prévenir de la dégradation tout en augmentant l'efficacité d'internalisation est l'utilisation d'acides aminés D. De tels acides aminés ne sont pas reconnus

par les systèmes de dégradation cellulaire, et il apparaît que Tat synthétisé avec ces derniers voit son internalisation doubler par rapport à une version L de Tat (Wender et al. 2000). Cependant, l'évaluation de la translocation de ces peptides est difficile puisque la dégradation des peptides liés à la membrane est moins efficace, voire impossible.

### c) Les nanovecteurs

Malgré de nombreuses avancées sur l'étude des CPP, ces derniers présentent des limites quant à la vectorisation sur un organisme entier. Comme nous venons de le voir, il est souvent nécessaire de rajouter une séquence de ciblage, HP par exemple, et de prévenir leur dégradation. De plus, dans le cas du transport d'un médicament potentiellement nocif pour l'organisme celui-ci serait exposé à l'organisme dès son injection.

Désormais, la vectorisation fait donc intervenir les progrès sur les différents vecteurs afin de constituer un seul vecteur tirant avantage de chacune des techniques.

Tout d'abord, les médicaments sont encapsulés en utilisant des liposomes ou des polymères, afin d'empêcher ces médicaments d'être actifs tant qu'ils n'ont pas atteint leur cible. Cette coque de protection est quant à elle décorée à l'aide de CPP afin de permettre le relargage du médicament dans la cellule cible. Cependant afin que les CPP ne soient pas fonctionnels avant d'atteindre leur cible, ils sont souvent inclus dans une seconde enveloppe, composée généralement de polyéthylène glycol (PEG). Le PEG possède la particularité d'être « inoffensif » pour les organismes ne déclenchant ni le système immunitaire ni les systèmes de dégradation. Les chaînes de PEG sont accrochées à la vésicule à l'aide de liaisons sensibles à l'environnement. Par exemple une liaison sensible au pH permettant le détachement des chaînes PEG lors de l'acidification dans les endosomes, ou bien une liaison qui est dégradée par des protéines spécifiquement surexprimées aux abords de la cellule cible. Une fois les chaînes PEG détachées de la vésicule, le CPP devient exposé, permettant l'entrée de la vésicule, puis d'introduire le médicament. Ces chaînes PEG sont généralement elles-mêmes décorées à l'aide de peptides de guidage, tels que des HP, évoqués en I.G.2.a), ou bien des anticorps (Farkhani et al. 2014) (Nicolas et al. 2013).

Il est donc désormais possible de combiner les différentes approches évoquées jusqu'ici afin de réaliser des vecteurs plus efficaces, cependant il reste nécessaire de comprendre le fonctionnement de chacun des éléments de ces vecteurs afin de les utiliser de façon routinière. Enfin, une piste prometteuse reste l'utilisation de matériaux magnétiques pour physiquement guider les vecteurs (Lewin et al. 2000). De plus, l'apparition de colloïdes magnétiques avec un

fort pouvoir hyperthermique permettrait non seulement de guider les vecteurs jusqu'aux cellules souhaitées, mais aussi de pouvoir les chauffer localement si le but est de détruire ces dernières (Fortin et al. 2007).

## **H. Questions soulevées**

Toutes les expériences présentées jusqu'ici montrent que les CPP sont tout à fait appropriés comme vecteur pour des applications thérapeutiques ou biotechnologiques. Cependant, leurs mécanismes d'entrées semblent varier selon les conditions expérimentales, cargaisons, types cellulaires, et les détails des différents mécanismes ne sont que peu compris. Afin que les CPP puissent être utilisés de façon extensive, il est donc nécessaire de connaître les mécanismes d'entrée précisément pour pouvoir certifier que l'utilisation des CPP n'induit pas d'effets délétères. Il est aussi nécessaire de connaître la cinétique d'internalisation pour pouvoir anticiper les temps d'action dans un organisme.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés tout particulièrement au mécanisme de translocation, afin d'apporter des arguments en faveur de son existence, car il est encore fortement controversé. Pour étudier ce problème, nous avons décidé de l'observer à l'aide de trois méthodes, le plan de ce manuscrit est construit autour des méthodes.

Dans une première partie, chapitre II, je présente les résultats obtenus par une technique de mesure de force, le Biomembrane Force Probe. Il s'agit de mesurer, indirectement, l'affinité des CPP pour diverses membranes cibles afin d'identifier les partenaires permettant l'immobilisation des CPP à la surface des cellules, puis leur translocation, ou endocytose.

Dans une seconde partie, chapitre III, nous nous sommes appuyés sur l'observation de CPP marqués en fluorescence dans un système modèle, la bicouche à l'interface de gouttelettes, afin d'identifier les compositions lipidiques favorisant la traversée d'une bicouche par les CPP. Nous avons aussi extrait des informations sur la cinétique de translocation.

La dernière partie, chapitre IV présente les observations préliminaires de CPP fluorescents à l'échelle de la molécule unique sur une bicouche suspendue, faites à l'aide d'un microscope que nous développons au laboratoire.

En utilisant ces trois méthodes nous nous proposons de caractériser les partenaires de la pénétратine lors de son adhésion à la membrane et d'apporter des preuves de l'existence de la translocation, qui est encore controversée.

## II. Détermination de la force d'adhésion entre les CPP et la membrane

---

## A. Les mesures de forces

Afin d'étudier l'entrée de la pénétratine dans les cellules nous nous sommes intéressés à la première étape limitante qui serait son adhésion à leur membrane. Nous avons vu dans l'introduction que les CPP reconnaissent les sucres de surfaces (I.F.2.d)) et la bicouche (I.F.3) Aucune mesure de force n'a été réalisée sur l'adhésion des CPP à la cellule, auparavant cette adhésion a été quantifiée à l'aide de mesure d'affinité (détaillées plus loin dans cette partie II.C.5) ou par des observations en fluorescence. Pour décrire correctement la reconnaissance des membranes il est nécessaire d'identifier précisément les partenaires d'adhésion des CPP, en s'appuyant sur les résultats de différentes approches. Les mesures de force peuvent ouvrir la voie vers la caractérisation du paysage énergétique de la liaison d'un CPP avec ses partenaires, c'est-à-dire l'énergie d'interaction du CPP avec son partenaire en fonction de leur distance à l'échelle de 0,1 nm. Une description énergétique de cette interaction pourrait permettre de mieux comprendre l'énergie nécessaire à la translocation des CPP.

### 1. Mesure de force

Nous nous proposons d'utiliser des techniques de mesure de force de liaison entre deux molécules. À l'heure actuelle il existe essentiellement trois techniques permettant d'obtenir ces informations :

- Le Surface Force Apparatus SFA développé initialement par Israelachvili (Israelachvili & Adams 1978) est un instrument permettant de mesurer les forces d'adhésion entre molécules appartenant à deux surfaces différentes. Le système a une résolution en force de l'ordre de 0,1  $\mu\text{N}$  (Perez et al. 2008). L'expérience consiste à déposer sur un premier demi-cylindre la molécule d'intérêt et sur un second son partenaire. Les deux demi-cylindres sont en vis-à-vis et pivotés de 90° l'un par rapport à l'autre afin de mesurer une interaction équivalente à une interaction sphère-plan. Le demi-cylindre supérieur est fixe tandis que le demi-cylindre inférieur est lié à une lame souple agissant comme un ressort de raideur connue. Cette technique ne s'applique donc que pour des échantillons d'une épaisseur nanométrique déposés sur les demi-cylindres et est donc difficilement applicable à l'étude de cellules (Israelachvili et al. 2010), mais n'exclut pas l'étude de membranes artificielles comportant éventuellement des protéines membranaires (Lee et al. 2015). Or nous souhaitons travailler sur des cellules vivantes, et à l'échelle de la molécule unique, ce qui n'est pas compatible avec le SFA.

- L'AFM quant à lui permet de travailler sur des échantillons avec une résolution spatiale latérale proche du nanomètre, là où le SFA travaille sur une zone de contact micrométrique. Sa résolution permet de mesurer des forces de l'ordre du piconewton. Son principe repose sur la mesure de la déflexion d'un cantilever, portant la molécule d'intérêt à son extrémité, lorsqu'il interagit avec sa cible. La déflexion est mesurée par l'intermédiaire de la déviation d'un faisceau laser se réfléchissant sur le cantilever. La déviation du faisceau traduit la force induite par la liaison. Cette technique a longtemps présentée une importante limitation pour travailler dans un milieu aqueux. En effet, les forces hydrodynamiques s'appliquent aussi sur la pointe et le levier, rendant difficile la détermination de la force due uniquement à l'adhésion de notre molécule d'intérêt. Cette limitation est désormais surmontée par l'utilisation de montages entièrement immergés. Une autre limitation est liée à la difficulté d'accrocher la molécule d'intérêt sur la pointe de l'AFM. Le substrat doit être immobilisé afin d'éviter des erreurs dues au déplacement des objets pendant l'acquisition. Ceci est particulièrement délicat lorsqu'il s'agit d'observer des cellules en culture. Enfin, dans le cas d'études sur cellules il est difficile de s'assurer de la cellule que l'on observe car les cellules sont souvent jointives, voire se recouvrent les unes les autres (Whited & Park 2014).
- Le BFP permet de travailler sur des forces de l'ordre du piconewton et sur des liens entre molécules uniques. Cette technique permet aussi de manipuler des objets de la taille d'une cellule. C'est un système de micromanipulation faisant intervenir d'une part une sonde de force porteuse de la molécule d'intérêt et d'autre part la cible à étudier, dans notre cas une cellule (Figure II-1). Les mesures sont faites par des allers-retours entraînant des contacts-ruptures d'adhésion entre la molécule d'intérêt (portée par la sonde de force) et l'objet-cible. Une déformation de la sonde de force traduit l'existence d'une force qui peut être calculée (Evans et al. 1995). Cet outil permet de travailler à l'échelle de la molécule unique sur des cellules. Il semble donc le plus adapté à l'étude de l'interaction des CPP et je vais le présenter en détail dans les paragraphes qui suivent.

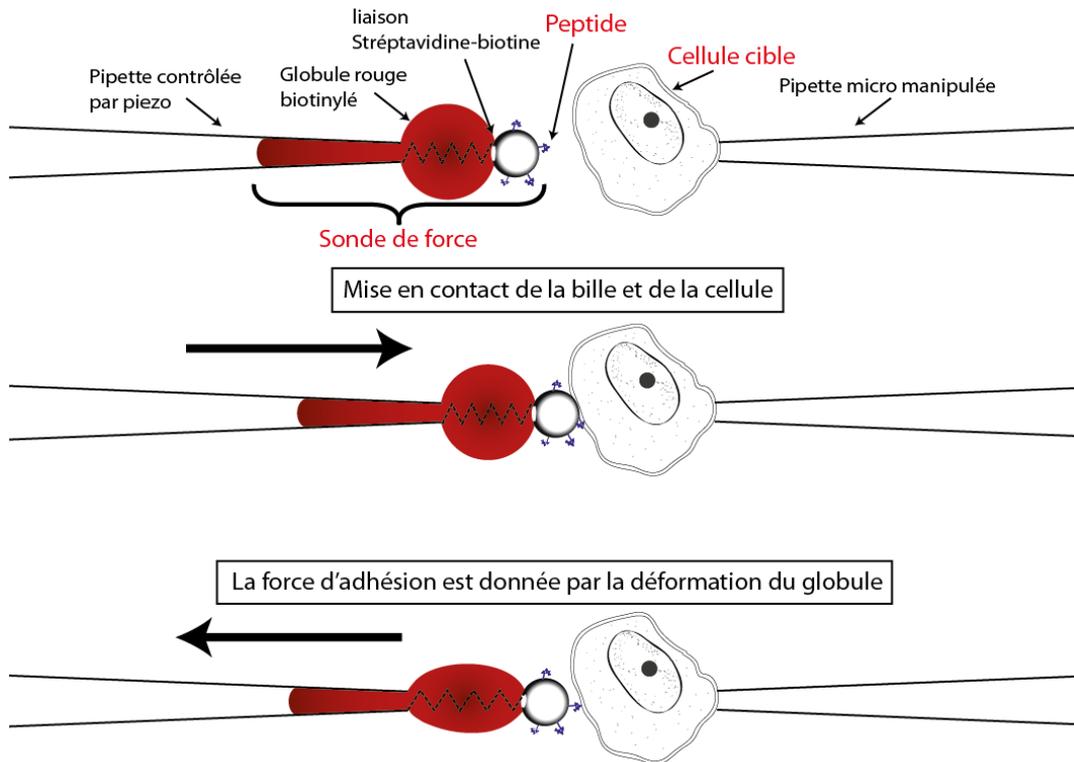


Figure II-1 : Schéma du principe du fonctionnement du BFP. On cherche à mesurer la force d'adhésion entre une molécule d'intérêt (ici un peptide) et une cible (ici une cellule). La force d'adhésion nous est donnée par la déformation du globule rouge qui se comporte comme un ressort.

## 2. Le BFP, un outil de choix pour les échantillons biologiques

Le BFP offre une sensibilité de l'ordre de 1 pN. Il permet aussi de sonder des forces beaucoup plus importantes, proches de 1 nN, qui correspondent aux forces impliquées lors de la rupture d'une liaison covalente. La reconnaissance des CPP par la membrane cellulaire semble être due à des interactions électrostatiques entre les arginines et les GAG, ce qui est dans la gamme de forces mesurables par l'instrument, comme suggéré par la littérature (Evans et al. 1995). Le BFP semble donc être un outil de choix pour notre problématique.

Pour décrire le paysage énergétique des CPP interagissant avec leurs partenaires, le BFP se positionne aussi comme un outil judicieux. Par exemple, les différentes barrières énergétiques de la liaison biotine-avidine ont pu être observées à l'aide de mesure de force en utilisant le BFP. Puis par des simulations en modélisation moléculaire il a été possible de décrire ce paysage énergétique (Merkel et al. 1999).

Actuellement, la plupart des travaux ne portent que sur l'interaction entre des produits purifiés et en dehors de leur environnement naturel, regardant principalement des liens ligands-récepteurs (Boye et al. 2013) (Ju et al. 2015). Mais la littérature présente toutefois quelques études sur cellule, allant de l'interaction de molécules purifiées, des anticorps, sur une cellule

lymphocytaire T afin d'étudier les propriétés mécaniques de cette dernière une fois stimulée par la reconnaissance d'un anticorps (Husson et al. 2011), ou bien sur la caractérisation de changements conformationnels des intégrines (Chen et al. 2012), jusqu'à l'interaction spermatozoïde-ovocyte, dans laquelle le BFP est utilisé pour mesurer les forces exercées entre ces deux types cellulaires (Jégou et al. 2008).

Il semble possible d'étudier l'interaction entre une cellule et une molécule cible. Dans notre cas il s'agit donc d'étudier l'interaction d'un CPP purifié décorant la sonde de force, en se plaçant dans des conditions où l'on peut espérer observer de la molécule unique, afin de déterminer quels composants cellulaires sont susceptibles d'interagir avec les CPP. Ces travaux permettraient de mieux comprendre la phase de reconnaissance de la cellule précédant l'internalisation.

## **B. Matériels & méthodes**

La description du montage est découpée en plusieurs sous-parties. Le contenu sera systématiquement résumé en italique en en-tête, puis, si nécessaire, suivi d'une description détaillée pour guider le nouvel expérimentateur.

### **1. Principe du Biomembrane Force Probe**

La technique repose sur l'utilisation d'une sonde de force, ici un globule rouge (GR), tenu par une micropipette *via* une aspiration contrôlée, utilisé comme un ressort. Sur cette sonde de force une bille décorée de la molécule d'intérêt est greffée. L'adhésion entre la molécule d'intérêt et la bille et entre la bille et le GR, se fait par une interaction entre la streptavidine, dont la bille est recouverte, et la biotine, ajoutée à la molécule d'intérêt ou insérée dans la membrane des GR. La sonde de force est manipulée à l'aide d'une pipette, dite de mesure, reliée à un micromanipulateur couplé à un système piézoélectrique, afin de connaître la position de la base de la sonde avec une résolution proche du nanomètre. La constante de raideur du GR est fixée par l'aspiration appliquée et en étudiant la déformation du GR il est possible de déduire les forces en jeu dans nos expériences. La membrane cible, une cellule ou une vésicule, est positionnée en face de la sonde de force à l'aide d'une seconde pipette, elle aussi fixée à un micromanipulateur (Figure II-1).

### **2. Préparation du Biomembrane Force Probe**

*La chambre utilisée pour les expériences est représentée ci-dessous (Figure II-2). Elle se compose de deux lamelles de verre séparées par un espaceur en acier inoxydable et contient du tampon phosphate salé (PBS), celui-ci peut être changé à convenance. De part et d'autre de la chambre les pipettes servant à la micromanipulation des cellules et de la sonde de force sont installées. Les pipettes sont reliées à des réservoirs d'eau, par continuité hydraulique, afin de contrôler la pression appliquée à leur sortie. Les globules rouges, billes et cellules, sont injectés à différents endroits dans la chambre.*

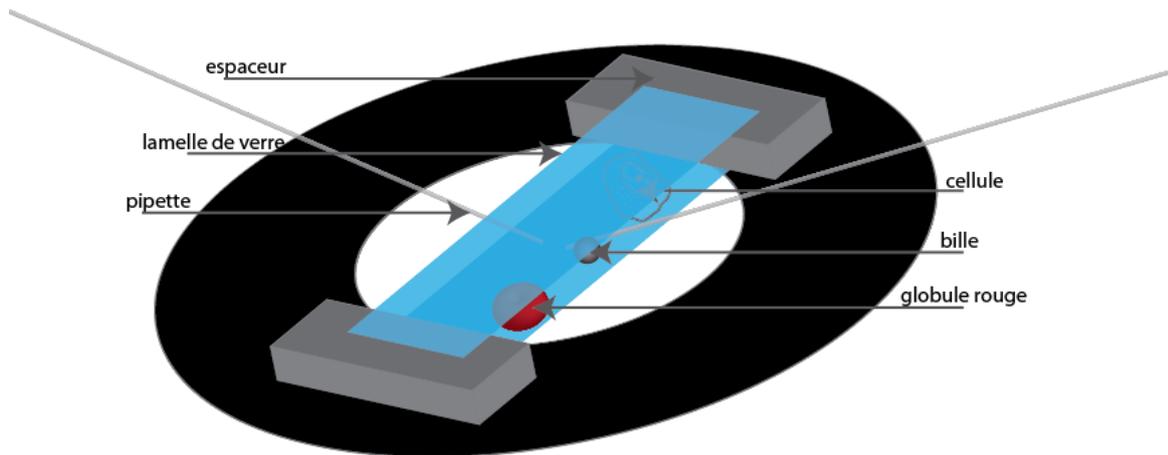


Figure II-2 : schéma de la chambre utilisée dans les expériences de BFP

Les lamelles sont coupées à la main avec une pointe de diamant aux dimensions ( $\sim 5 \text{ mm} \times 30 \text{ mm}$ ) satisfaisant à celles de la chambre, nettoyées à l'éthanol et séchées par un souffle d'air sec. Les lamelles sont fixées au support en acier à l'aide d'un point de graisse à vide sur chacune de leurs extrémités.

Les pipettes de manipulation sont préalablement étirées, à partir d'un capillaire de verre borosilicate de diamètre extérieur 1 mm et diamètre intérieur 0,58 mm, à l'aide d'une étireuse P-2000 de la Sutter Instrument Company® réglée sur les paramètres présentés en Tableau II-1.

Puissance laser	Largeur du scan laser	Température du verre	Latence avant l'étirement	Force de l'étirement
Heat = 350	Fil = 4	Vel = 50	Del = 150	Pul = 200

Tableau II-1 : Tableau présentant les différents réglages disponibles sur l'étireuse. Chaque paramètre est brièvement explicité, et les valeurs que nous avons utilisées pour nos pipettes sont données en seconde ligne. Ces valeurs correspondent au programme#40 de l'appareil.

Les pipettes sont ensuite ouvertes au diamètre souhaité (diamètre intérieur  $\sim 2 \mu\text{m}$ ) et avec un poli satisfaisant à l'aide d'une microforge. La microforge est une forge sous microscope équipée d'un micromanipulateur pour placer le capillaire. La forge est composée d'une bille de verre sur un fil de platine alimenté électriquement qui par effet Joule provoque la fonte du verre. La pipette est plongée dans la bille en fusion, puis lorsque l'alimentation électrique est coupée, la bille se rétracte, à cause de la solidification, ce qui casse la pipette à l'interface verre-air de la bille.

La chambre de manipulation est ensuite placée sous le microscope BFP et remplie à l'aide d'une solution aqueuse contenant 5% en masse d'Albumine de Sérum Bovin (BSA) pendant 30 minutes. Le rôle de la BSA est de limiter l'adhérence des cellules sur le verre. Le même traitement est réalisé sur les pipettes qui sont plongées dans la solution contenue dans la chambre.

Les pipettes sont remplies de solution aqueuse, et sont connectées via des tuyaux souples à des réservoirs dont le niveau d'eau est réglable, afin d'ajuster la pression à leur sortie par continuité hydraulique. Avant chaque expérience les réservoirs sont ajustés au 0 de pression (pas de différence de pression entre le liquide dans la pointe de la pipette et le liquide dans la chambre). Après incubation la BSA contenue dans la chambre est retirée, puis la chambre est nettoyée à l'aide de 3 rinçages au PBS, le milieu utilisé pour l'expérience. Ensuite 1  $\mu\text{L}$  de globules rouges biotinylés (soit quelques centaines de globules) est injecté dans la chambre, ainsi que 1  $\mu\text{L}$  de billes (soit quelques centaines de billes) et 1-4  $\mu\text{L}$  de cellules selon la concentration de celles-ci (soit quelques dizaines de cellules). Chaque élément est injecté à un endroit différent de la chambre pour éviter qu'ils s'associent entre eux (comme schématiquement représenté sur la Figure II-2).

### 3. Expérience de Biomembrane Force Probe

*La première étape de l'expérience consiste à réaliser la sonde de force, composée d'un globule rouge sur lequel est accrochée une bille. Cette sonde est maintenue par la pipette de mesure afin de pouvoir contrôler précisément sa position. En face, la pipette de contention maintient la cellule d'intérêt. L'expérience consiste à réaliser des allers-retours, à l'aide du système piézoélectrique, afin de mettre en contact la bille et la cellule. Lors du contact le globule rouge est déformé, et la diminution de la distance entre le centre de la bille, détecté optiquement avec une précision de  $\sim 10$  nm, et la base de la pipette déterminée par le piezo, permet de déduire la force de compression. De même lors de la séparation, s'il y a eu un évènement d'adhésion le globule rouge est étiré lors du recul de la sonde donnant lieu à un allongement de la distance bille-base de la pipette, qui traduit une force d'adhésion (Figure II-4).*

*Les plans équatoriaux du globule rouge, de la bille et de la cellule doivent être parfaitement coplanaires pour minimiser le bruit de l'expérience.*

Une fois la chambre préparée, la sonde est fabriquée. À l'aide de la pipette de mesure un globule rouge convenant à l'expérience est aspiré en exerçant une dépression de 300 Pa en modifiant la position du réservoir (c'est-à-dire l'abaisser de 3 cm). Nous sélectionnons uniquement des globules rouges d'aspect sain (de forme biconcave, avec un diamètre d'environ 5  $\mu\text{m}$ ). Il est préférable d'avoir une langue (la partie du globule rouge aspirée à l'intérieur de la pipette) de la longueur du diamètre du globule rouge.

Une fois le globule rouge maintenu, une bille est ensuite aspirée, par la pipette de contention, à l'aide d'une dépression légère de l'ordre de la dizaine de Pa.

Pour confectionner la sonde, le globule rouge et la bille doivent avoir leurs plans équatoriaux respectifs à la même altitude et centrés l'un en face de l'autre. Ensuite la pipette tenant le globule rouge est déplacée délicatement vers la bille afin d'exercer une faible pression sur celle-ci. La faible pression est observable par la légère déformation du globule rouge. Après quelques secondes de contact l'aspiration sur la bille est relâchée et la pipette avec le globule rouge est reculée. Normalement la bille reste collée sur le globule rouge, formant ainsi la sonde de force. Une fois la sonde formée, la pipette de contention va être utilisée afin de venir aspirer une cellule. Les cellules sont sélectionnées selon des critères visuels. Il faut que leurs membranes soient bien contrastées, possèdent le moins possible de granules cytoplasmiques, signe d'apoptose, et il faut aussi éviter la présence de protrusion à la surface de la membrane. La présence d'un noyau bien marqué est aussi un signe de "bonne santé" de la cellule.

Afin de préserver l'intégrité de la cellule, celle-ci est aspirée avec la dépression la plus faible possible permettant de la maintenir en place, en évitant les dépressions supérieures à 50 Pa. Il peut arriver que la cellule adhère sur la lamelle, il est préférable de pousser la cellule délicatement avec la pipette afin de la décrocher plutôt que d'augmenter la pression d'aspiration. Une fois la cellule décrochée de la lamelle de faibles dépressions sont suffisantes pour la manipulation.

La cellule et la sonde sont alignées l'une en face de l'autre à une distance de 2 à 8  $\mu\text{m}$  en plaçant dans le plan focal leur plans équatoriaux. Ici encore, un bon alignement diminue le bruit et assure la qualité des mesures. Une fois tous les éléments alignés, il faut paramétrer les acquisitions.

#### **4. Acquisition des données**

*Avant de réaliser les mesures, il faut dans un premier temps saisir les paramètres de l'expérience dans le logiciel. Nous cherchons à travailler sur des gammes de force de l'ordre de la dizaine de piconewtons, ainsi certains paramètres sont systématiquement fixés dans nos expériences. De plus, pour réaliser l'acquisition il est nécessaire de défocaliser légèrement l'image et de fermer le diaphragme pour permettre une meilleure localisation de la bille par le logiciel. La bille apparaît alors comme un disque blanc de quelques  $\mu\text{m}$  très contrasté sur fond sombre. Une fois les paramètres renseignés et l'image obtenue l'acquisition peut être lancée.*

Le logiciel de mesure repose sur une différence de position entre la position de la bille mesurée par la caméra et la position du micromanipulateur piézo-commandé. Cette différence nous donne la compression ou dilatation du globule rouge puisqu'il est le seul élément déformable de la sonde.

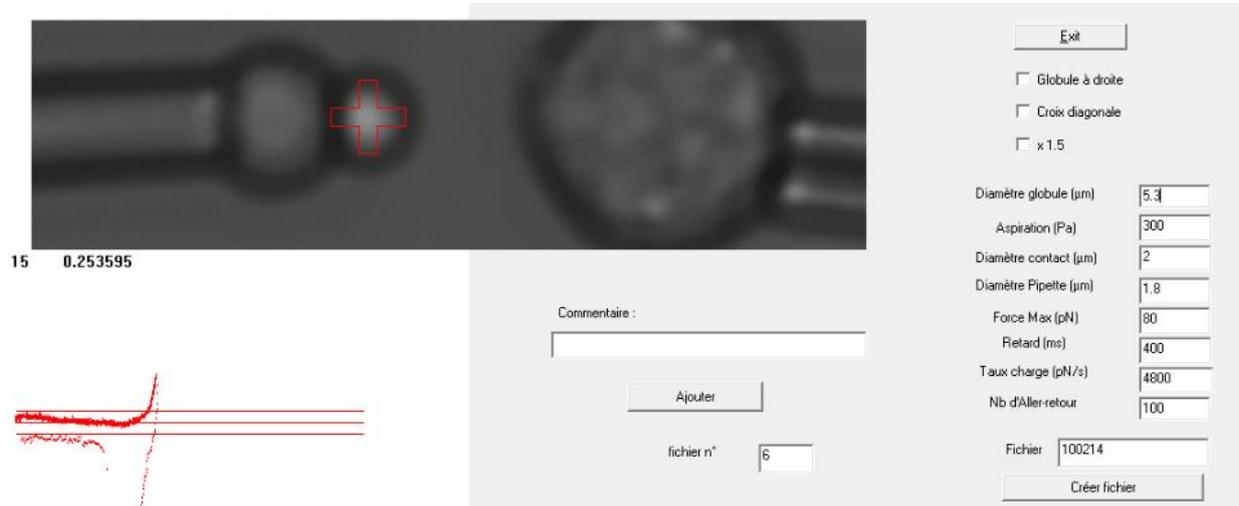


Figure II-3 : fenêtre d'acquisition des expériences de BFP. Les différents paramètres nécessaires à l'estimation de la force sont à renseigner sur la droite. L'expérience est suivie en temps réel grâce à l'affichage caméra et la croix nous renseigne sur la position calculée pour la bille et nous permet de nous assurer que l'estimation de positionnement est bonne. La courbe de force en fonction de la distance est représentée en rouge, avec une ligne à 0 pN et une à +20 pN ainsi qu'à -20 pN.

L'interface du logiciel avec le type d'image à obtenir pour une mesure correcte est illustrée par la Figure II-3. Afin de pouvoir calculer la constante de raideur du globule rouge, et donc de la sonde, un certain nombre de paramètres doivent être renseignés dans le programme. Il faut donner le diamètre du globule rouge une fois aspiré par la pipette, le diamètre de contact correspond à la zone de contact entre le globule rouge et la bille et le diamètre de la pipette. La force maximale lors de la compression de la bille sur la cellule (étape d'approche) est fixée à 80 pN. Cette force semble être suffisante pour amener les molécules d'intérêt au contact de la cellule, d'après des résultats préliminaires obtenus par Frédéric Pincet. Le retard correspond au temps de contact désiré entre la bille et la cellule une fois cette force seuil atteinte, nous le fixons à 400ms. Enfin le taux de charge en piconewtons par seconde caractérise la vitesse de décroissance de la force lors du début de la phase de retrait. Il est fixé à 4800 pN/s (voir discussion II.B.5).

Il faut aussi spécifier le nombre de mesure à réaliser sur une cellule, en général 200 acquisitions par couple sonde-cellule sont réalisées avec une pause au bout de 100 mesures afin de réaligner le système, et d'optimiser le contraste.

Les images (et donc la mesure de force) sont acquises à une fréquence de 300 Hz (fréquence la plus rapide possible, limitée par la vitesse d'acquisition/transfert de notre caméra). Lors de

l'approche la bille est déplacée vers la cellule à une vitesse de 2,4  $\mu\text{m/s}$ . Lors du recul, la vitesse de recul est calculée et imposée par le programme en fonction de la raideur de la sonde (voir discussion II.B.5) de sorte que la force décroît à la vitesse de 4800 pN/s (en faisant l'hypothèse d'une bille immobilisée par un lien à la cellule) : les vitesses de recul typiques sont de l'ordre de 5  $\mu\text{m/s}$ .

Après 200 courbes une nouvelle sonde est fabriquée et une nouvelle cellule choisie.

Sur cellules, les expériences sont arrêtées deux heures après injection pour éviter des artefacts dus à des cellules en « souffrance ». En cas de traitement préalable des cellules, celles-ci ne sont manipulées que pendant 1 heure.

## **5. Echelle de temps et de force, raideur du globule rouge et taux de charge**

Les énergies d'interaction entre molécules biologiques mettent en jeu des énergies par liaison de l'ordre de quelques  $k_B T$  (liaisons hydrogène, interactions électrostatiques entre charges dans l'eau) et des distances d'approche,  $\delta$ , de quelques angströms. L'ordre de grandeur des forces entre deux macromolécules comme un peptide et un polymère de sucres chargés sera donc de la centaine de piconewtons ( $\frac{10k_B T}{\delta}$ ) en considérant que ces molécules établissent quelques liaisons. Il faut, pour comprendre les expériences de BFP, considérer l'aspect dynamique : la liaison rompt en général avant que la force exercée atteigne le ratio de la profondeur du puits énergétique par sa largeur (la distance sur laquelle il s'étend). Ainsi plus on tire « rapidement » (i.e. plus on augmente le taux de charge, notion qui sera expliquée en II.C.5), plus on va mesurer des forces élevées car la liaison aura moins de temps pour se rompre à force égale. En considérant que le paysage énergétique d'une interaction entre macromolécules peut être complexe (plusieurs puits de potentiels) et multidimensionnel (plusieurs chemins dans l'espace pour se séparer), on comprend que l'interprétation des forces mesurées par le BFP est délicate et leur comparaison avec d'autres techniques mesurant des énergies difficile. L'ordre de grandeur de la centaine de piconewtons mesurée en BFP par lien CPP-cellule sera néanmoins bien vérifié dans nos conditions.

Pour mesurer des forces d'une centaine de piconewtons, il faut un ressort d'une raideur de l'ordre de quelques pN/nm. Notre système nous permettant de détecter la bille à quelques nanomètres près et de même pour le positionnement du piezo, notre résolution en force sera ainsi de l'ordre de 10 pN.

La raideur  $k$  de la sonde constituée par un GR de rayon  $R_{GR}$  (2-3  $\mu\text{m}$ ) mesuré sur sa partie sphérique après aspiration par une dépression  $\Delta P$  (300 Pa) dans une pipette de rayon intérieur  $R_p$  (1  $\mu\text{m}$ ) et sur lequel est fixée une bille dont la zone de contact (globule-bille) a pour rayon  $r_{\text{contact}}$  (1  $\mu\text{m}$ ) a été calculée par Evans (Evans et al. 1995) :

$$k \approx \frac{\pi \cdot R_p \cdot \Delta P}{\left(1 - \frac{R_p}{R_{GR}}\right) \left(\ln\left(\frac{2R_{GR}}{R_p}\right) + \ln\left(\frac{2R_{GR}}{r_{\text{contact}}}\right)\right)} \quad (\text{II.1})$$

Avec nos valeurs on trouve bien  $k \sim 1 \text{ pN.nm}^{-1}$ , ce qui nous permet de réaliser nos mesures avec la sensibilité recherchée.

Concernant le taux de charge, nous avons intérêt à l'augmenter suffisamment pour détecter des forces plus élevées qui sortiront mieux du bruit (même si celui-ci augmente aussi un peu avec le taux de charge). Une limite supérieure existe néanmoins : pour connaître notre force de rupture précisément, il ne faut pas que la force varie de plus de  $\sim 20 \text{ pN}$  durant l'acquisition d'une image (3,3 ms à 300 Hz). Aussi nous ne devons pas avoir un taux de charge supérieur à  $6000 \text{ pN.s}^{-1}$  : nous nous sommes placés à  $4800 \text{ pN.s}^{-1}$  ce qui reste satisfaisant et nous a permis d'exploiter des mesures « tests » faites par Frédéric Pincet à ce taux.

## 6. Traitement des données

*Les analyses sont réalisées à l'aide d'un algorithme programmé sous Matlab (détails du programme en annexes : VI.A). Les courbes sont analysées une à une, et pour chaque courbe les chemins aller et retour sont ajustés selon un modèle exponentiel, en pondérant les points à chaque extrémité pour réaliser l'ajustement sans tenir compte du creux généré par une éventuelle force d'adhésion. Ensuite, si les deux courbes ont pu être ajustées, la courbe de retour est mesurée point par point et le plus grand écart entre l'ajustement et les données expérimentales nous donnent la force d'adhésion maximale observée (Figure II-4).*

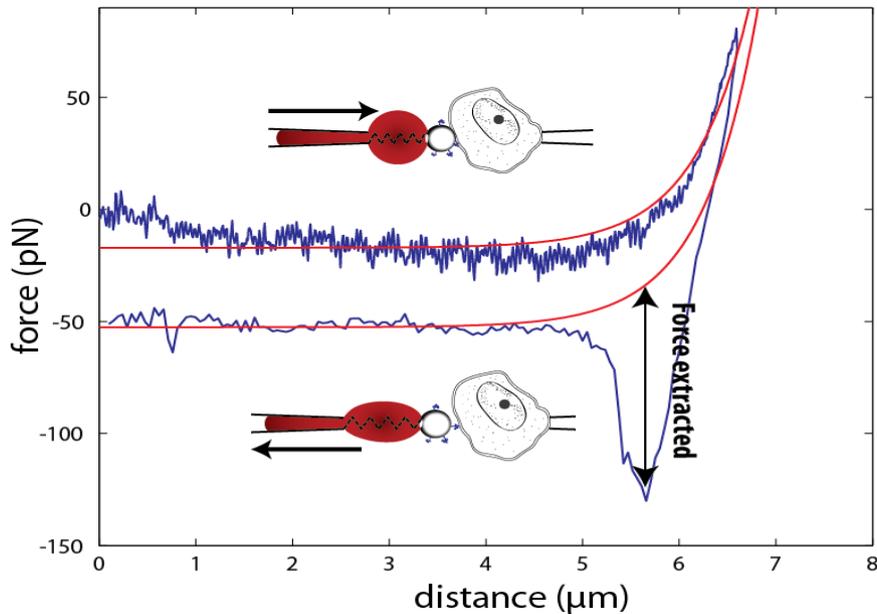


Figure II-4 : Exemple d'acquisition réalisée par l'expérience. Les courbes en bleu représentent les données expérimentales et les ajustements réalisés par le logiciel sont en rouge. Chaque expérience est ajusté selon une exponentielle  $[a*\exp(bx)+b]$  ou  $[a*\exp(bx)+cx+d]$ , si la première équation ne donne pas un bon ajustement. La force d'adhésion mesurée est donnée par la plus grande différence de valeur entre l'expérience et l'ajustement sur la courbe retour.

## 7. Culture cellulaire

Les types cellulaires étudiés ont tous été cultivés au sein du laboratoire par Françoise Illien. Les cellules étaient amenées à 80% de confluence, dans des boîtes de Pétri  $\varnothing$  60 mm, avant d'être utilisées pour les expériences. La culture cellulaire était faite dans un incubateur à 37°C, atmosphère humide et 5% CO<sub>2</sub> en (DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) complété par 10% de sérum de veau fœtal, 100 UI.mL<sup>-1</sup> de pénicilline et de streptomycine, et 1  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> d'amphotéricine.

Les types cellulaires sauvage CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary), déficient en xylose transférase et donc en glycosaminoglycanes, les CHO-pgsA745, et déficient en acides sialiques, les CHO-Lec2, proviennent de l'American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA).

Les cellules étaient transportées de leur lieu de culture au lieu de manipulation (15 minutes), dans une boîte en polystyrène en ayant pris soin de « parafilmer » les boîtes de Pétri afin de conserver la même atmosphère pour les cellules et de limiter les changements de température.

## 8. Préparation des cellules

Afin de pouvoir manipuler les cellules sous le BFP, celles-ci sont lavées au PBS à 37°C 2 fois, puis décollées de la boîte de Pétri à l'aide d'un traitement à l'EDTA (0,8 mM) dans quelques

microlitres de PBS durant 5min dans l'incubateur. Après avoir été décollées les cellules sont diluées dans 1 mL de PBS et transférées dans un tube Eppendorf™ pour être injectées dans la chambre du BFP.

Si les cellules doivent subir un traitement enzymatique, les cellules sont centrifugées pendant 1 minute à 3 krpm (milliers de rotations par minute), soit 500 g, et le surnageant est remplacé par le volume de PBS nécessaire pour les amener à la concentration voulue, après comptage sur lame de Kova. Dans le cas des traitements enzymatiques les cellules étaient amenées à des concentrations variant entre 1 million et 5 millions de cellule par mL selon la concentration d'enzyme désirée. 25  $\mu$ L de cellules sont ensuite transférés dans un nouveau tube Eppendorf™ 1  $\mu$ L d'heparinase III (5 U.mL<sup>-1</sup>) est ajouté et le tout est laissé à incuber 1 heure dans l'incubateur (mêmes conditions que la culture cellulaire). Les cellules sont ensuite centrifugées de nouveau et le surnageant est remplacé par du PBS, puis les cellules sont injectées dans la chambre. La concentration finale correspond à 200 nU par cellule pour une inhibition sur CHO K1 (traitement Heparinase III 5x) et 40 nU par cellule pour une inhibition sur CHO 745 (traitement Heparinase III 1x).

## 9. Préparation des vésicules

Pour réaliser les vésicules, 20  $\mu$ L de lipides en chloroforme (20 g.L<sup>-1</sup>) sont prélevés à l'aide d'une seringue Hamilton, puis séchés dans le fond d'un puits en PTFE en soufflant de l'azote et laissés sous vide 30 minutes au moins. Ensuite le fond du puits est recouvert par un film de la solution qui doit être contenue dans les liposomes, une solution de saccharose 300 mM dont la densité, supérieure à celle du PBS, permettra par la suite la sédimentation des vésicules dans le PBS. La concentration de saccharose a été choisie pour avoir une osmolarité similaire à celle du PBS pour éviter un choc osmotique qui ferait éclater ou dégonfler les vésicules. Le puits est recouvert de parafilm™, pour limiter l'évaporation, et laissé à 37°C durant une nuit. Le lendemain la préparation de vésicules est collectée à l'aide d'une P-1000, l'extrémité du cône a été biseauté et élargie en coupant un centimètre à l'aide de ciseaux. Cela permet d'éviter la détérioration des vésicules par le cisaillement créé lors du pipetage. Les vésicules peuvent être conservées 1 mois à 4°C. La présence de vésicules peut être vérifiée sous microscope à contraste de phase, ou bien en lumière blanche simple s'il y a une différence de contraste entre le contenu de la vésicule et le milieu extérieur.

## **10. Biotinylation des globules rouges**

Les globules rouges issus d'une goutte de sang sont lavés deux fois au PBS puis deux fois avec un tampon CB (carbonate-bicarbonate 0,1 M, pH 8,5, 180 mOsm). Chaque lavage consiste à resuspendre les globules rouges dans le tampon considéré, en faisant des allers-retours en pipetant, puis à centrifuger 1 minute à 500 g. Le surnageant est éliminé et l'opération réitérée avec le nouveau tampon. Les cellules sont ensuite incubées dans une solution de bicarbonate contenant  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$  de PEG-biotine pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation. Une fois l'incubation terminée, les globules biotinylés sont lavés 3 fois au tampon TBS (Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5, 316 mOsm) puis incubés dans ce tampon pendant 30 minutes, de nouveau à température ambiante et sous agitation. Enfin, ils sont lavés 3 fois au PBS. Les globules rouges biotinylés peuvent être conservés pendant 1 mois à 4°C.

La fonctionnalisation des globules rouges peut être testée immédiatement avec des billes streptavidine.

## **11. Préparation des billes**

Les billes greffées avec la streptavidine sont obtenues à partir du protocole pré-établi par Evan Evans et réalisé par Myriam Chalbi. Le protocole comprend 4 étapes, le lavage des billes, leur silanisation, une première fonctionnalisation avec de la biotine et la « streptavidination », dont les détails peuvent être trouvés dans la thèse d'Antoine Jégou (Jégou 2008).

Afin de les décorer avec la pénétratine dans les proportions qui nous intéressent pour l'expérience,  $10^6$  billes sont incubées en présence de  $20 \text{ }\mu\text{M}$  de biotine-bras-pénétratine pendant 5 minutes. Les billes sont ensuite lavées par centrifugation et resuspendues en PBS. L'opération est répétée 3 fois. Les billes peuvent être conservées plusieurs mois à 4°C.

## **12. Synthèse des peptides**

La synthèse de la pénétratine a été réalisée au sein du laboratoire par Manjula Pallerla par stratégie BOC sur support solide (SPPS) (Bechara et al. 2013).

## C. Résultats

### 1. Déterminer la densité de pénétratine pour une approche en molécule unique

Afin de pouvoir travailler en molécule unique, il a fallu déterminer la densité surfacique de pénétratine suffisante pour détecter des événements d'adhésion sur le BFP.

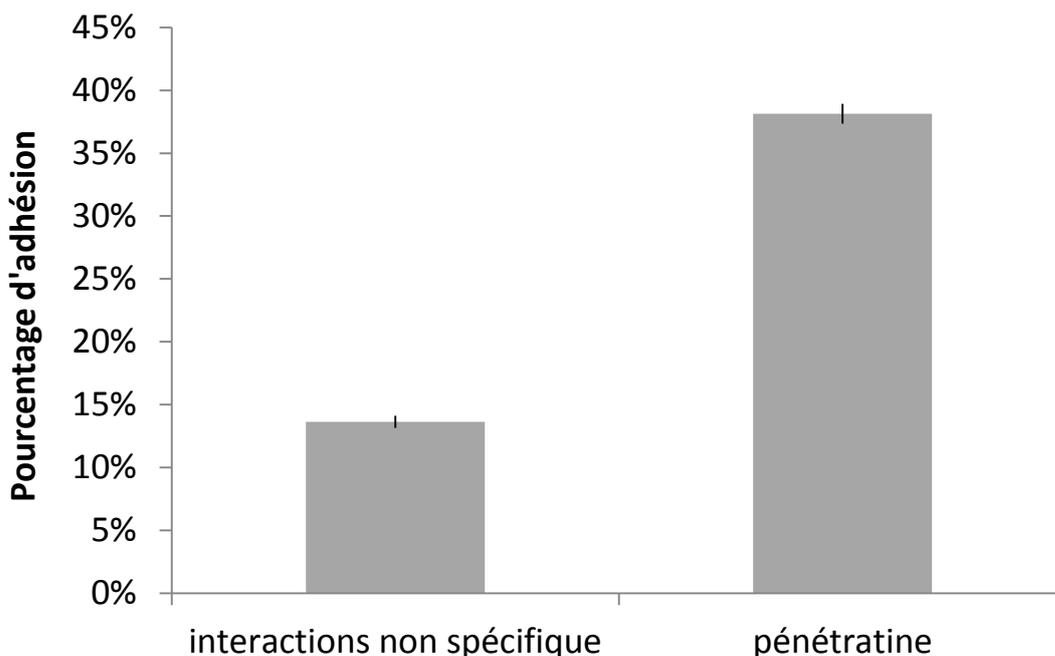


Figure II-5 : fréquence d'interaction des cellules sauvages, CHO K1, interagissant avec une bille décorée, ou non, de pénétratine.

Nous avons dans un premier temps estimé la fréquence d'évènement correspondant à une adhésion non spécifique. Pour ce faire nous avons réalisé les expériences de BFP sur le type cellulaire sauvage CHO K1 avec une bille non décorée de pénétratine. Une telle expérience nous donne une fréquence d'adhésion de la bille sur la cellule de 14% (Figure II-5). En effet, le BFP enregistre deux informations pendant l'expérience, d'une part la fréquence à laquelle une adhésion de notre molécule d'intérêt sur sa cible est observée et d'autre part un histogramme de force qui nous renseigne sur la force à appliquer sur la molécule d'intérêt pour la détacher de son partenaire. Il faut prendre garde à ce que la fréquence à laquelle nous observons une adhésion ne soit pas trop importante car sinon l'on observe majoritairement des évènements multiples, ce qui n'est pas notre intention dans cette étude.

Dans notre cas nous avons cherché à obtenir une fréquence d'adhésion supérieure d'au moins 10% par rapport au non spécifique, tout en restant suffisamment faible pour supposer que les

événements multiples ne soient pas dominants dans nos observations. Ainsi les conditions d'incubation décrites plus haut nous ont permis de décorer la bille de telle sorte que la fréquence d'adhésion soit 38% (Figure II-5).

D'un point de vue statistique si la probabilité d'observer un événement simple est  $p$ , celle d'observer un événement double est  $p^2$ . Dans une situation idéale, l'adhésion non spécifique serait proche de 0%, une fréquence de 10% pour les événements d'adhésion. Soit  $p + p^2 = 0,1$ , (les adhésions triples étant négligeables) ce qui nous donne  $p^2 \sim 0,9\%$ , donc  $p \sim 9,1\%$ , soit un peu plus de 90% des événements observés sont des événements uniques. Dans notre cas si  $p$  est la probabilité d'observer un événement entre la bille décorée de pénétratine et la cellule, nous avons  $p + p^2 = 38\%$  soit  $p = 29\%$ . Ainsi parmi nos 38% d'événements (spécifiques ou non), 9% sont a priori des événements doubles. Ainsi, 75% des événements que nous regardons correspondent donc à des événements uniques. Cependant il reste à définir ce que nous appelons unique. Nous avons cherché à nous placer dans les conditions où nous pouvions observer l'interaction entre un peptide unique et la membrane cellulaire, mais il ne nous est pas possible de confirmer que nous sommes dans cette situation car nous avons un seuil de détection des événements (force  $> 30$  pN, qui sera commenté en II.C.5) et ce que nous appelons « absence d'événement » pourrait correspondre à une adhésion faible de peptides sur la membrane. Nous enregistrons des événements qui correspondent à une adhésion suffisante, entre la bille et la cellule, il se peut que ces événements, détectables au seuil où nous travaillons, ne correspondent qu'à des événements où plusieurs peptides ont reconnu leur cible.

Afin de filtrer les événements non spécifiques dans nos observations, nous avons cherché à distinguer les événements non-spécifiques et spécifiques à partir de l'histogramme de force. A priori la force nécessaire pour briser une liaison non spécifique n'est pas la même que celle nécessaire pour briser la liaison entre notre molécule d'intérêt et son partenaire. Or dans notre cas l'histogramme de force présente la même allure en présence ou non de pénétratine sur la bille ce qui empêche toute distinction entre les deux événements (Figure II-6). Dans la suite de l'étude nous nous concentrerons donc surtout sur le paramètre fréquence d'adhésion.

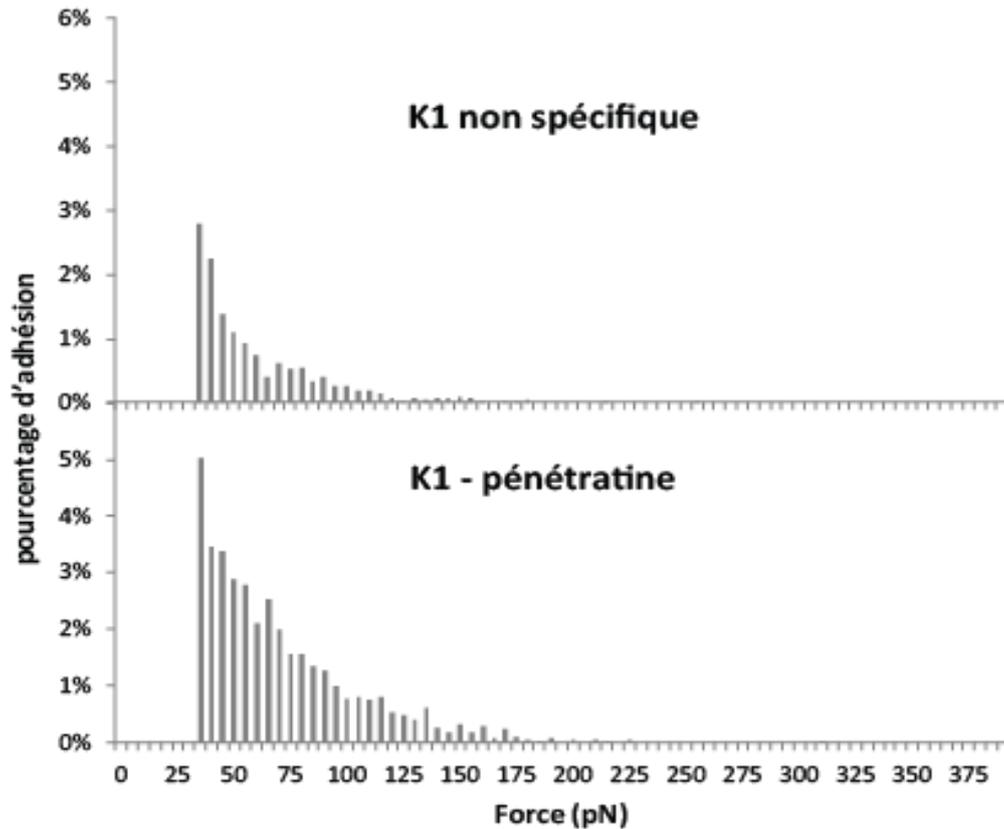


Figure II-6 : Histogramme des forces sur l'ensemble des mesures selon la décoration de la bille. L'interaction est réalisée avec le type cellulaire sauvage : CHO-K1.

## 2. Un partenaire de choix, les glycosaminoglycanes

Les premiers partenaires potentiels de la membrane que nous avons cherché à étudier sont les GAG. En effet, il a été montré que des cellules déficientes en GAG sont moins susceptibles d'internaliser les CPP (Jiao et al. 2009b). Afin de vérifier si cette diminution de l'internalisation est due à un défaut d'adhésion des CPP sur la membrane nous avons conduit des expériences de BFP sur le type cellulaire 745 déficient en GAG. Nous obtenons les mêmes résultats que pour les cellules sauvages (Figure II-7), soit 15% de non spécifique et 35% d'adhésion en présence de pénétratine. Nous ne sommes donc pas arrivés à montrer, à ce stade de l'étude, que les GAG sont partenaires de la pénétratine dans l'étape d'adhésion que nous sondons.

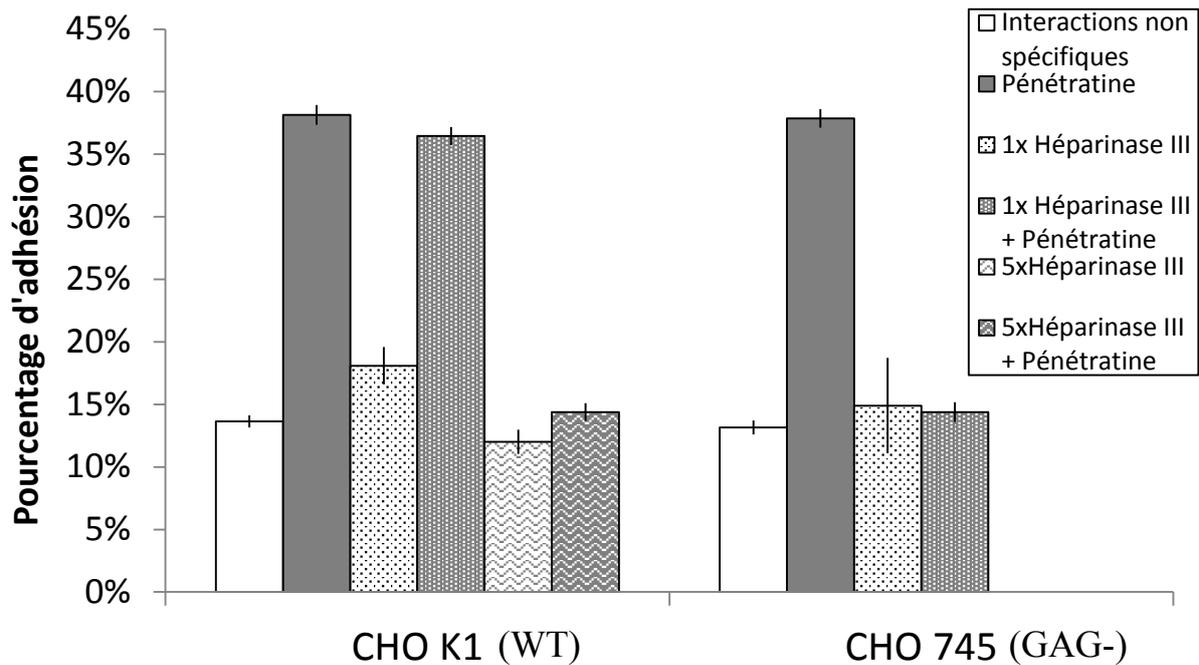


Figure II-7 : Pourcentage d'adhésion en fonction de la décoration, ou non, de la bille et des traitements enzymatiques appliqués sur les cellules. Les fonds blancs correspondent aux interactions non spécifiques, les fonds gris aux interactions avec la pénétratine. Les pleins aux cellules non traitées, les mouchetées au 1x, et les vaguelettes au 5x.

Pour montrer cette implication des GAG, nous avons réalisé des traitements enzymatiques afin de dégrader certains GAG. Nous avons utilisé de l'héparinase III qui dégrade spécifiquement les sulfates d'héparane (HS). Les HS étant des GAG porteurs de groupements sulfates, ils étaient de bon candidats pour une interaction électrostatique avec la pénétratine, qui est cationique. Le traitement conseillé par la littérature (Florian et al. 2003) est d'environ 3 nU/c à 30 nU/c d'héparinase III. Celui-ci est peu précis car le nombre de cellules n'est pas clairement précisé (30 mU sur  $10^5$  à  $10^7$  cellules). De plus des études sur la stœchiométrie entre des variantes de la lactoferrine humaine (un CPP) et les HS (Wallbrecher et al. 2014) ont montré une absence d'effet des traitements à l'héparinase III quant à l'internalisation de ce CPP. Nous avons choisi d'augmenter la concentration en héparinase III à 40 nU/c, cependant un tel traitement ne semble pas influencer non plus sur la fréquence d'adhésion de la bille décorée de pénétratine avec nos cellules, 35% avec ou sans traitement en présence de pénétratine pour les cellules sauvages. Ceci suggérant que les HS ne sont pas partenaires de la pénétratine, tout comme pour la lactoferrine, mais ne nous permet pas de conclure définitivement car il se peut que notre traitement soit trop doux. Un tel traitement n'a pas non plus d'effet sur les interactions non spécifiques. Nous avons aussi réalisé ce traitement sur les cellules déficientes en GAG (745), et avons alors observé une forte diminution de la fréquence d'adhésion, la fréquence d'adhésion avec la pénétratine passe de 38% en absence de traitement à 15% après le traitement.

De plus l'adhésion non spécifique vaut 14% ce qui suggère que le traitement à 40 nU/c est suffisant pour supprimer l'affinité de la pénétratine avec les cellules 745 (Figure II-7). Il semblerait donc que les HS soient bien impliqués dans l'interaction de la pénétratine avec la membrane cellulaire et que le traitement utilisé serait trop doux pour avoir un effet sur des cellules sauvages.

Afin d'évaluer l'efficacité du traitement nous avons réalisé une courbe dose réponse sur les cellules sauvages à différentes concentration d'héparinase III. À une concentration 4 fois supérieure nous arrivons à éliminer totalement l'interaction spécifique de la pénétratine avec les cellules, retrouvant des fréquences de l'ordre de 15% comparable à la fréquence d'interaction non spécifiques. Une diminution progressive de l'adhésion est bien observée, mais seulement à partir d'un traitement enzymatique deux fois plus concentré (Figure II-8). L'interaction non spécifique n'étant pas modifiée entre 1x (40 nU/c) et 5x (200 nU/c) nous avons supposé qu'elle restait constante quelle que soit la concentration d'enzyme utilisée au cours du traitement.

Enfin le traitement enzymatique 1x élimine l'affinité de la pénétratine pour la membrane cellulaire des cellules 745, il semble donc que l'interaction des cellules 745 non traitées avec la pénétratine soit liée au fait que la dégradation des HS due à leur déficience ne soit pas suffisante.

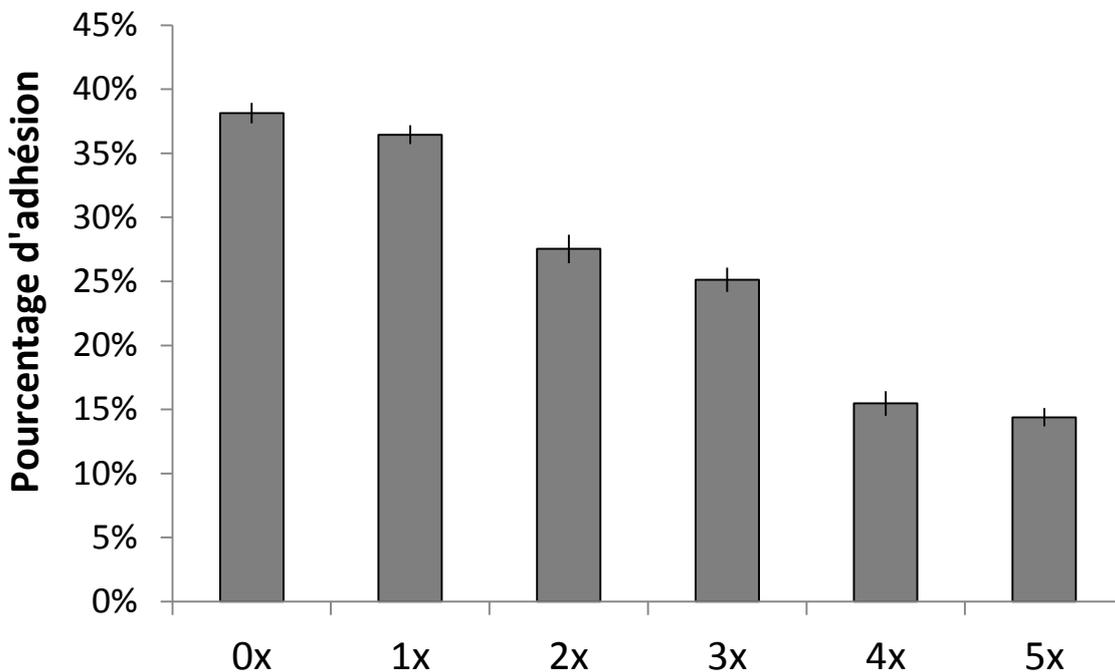


Figure II-8 : courbe dose-réponse des cellules sauvages à des traitements croissants en héparinase III lors du traitement d'hydrolyse des HS.

Nous avons pu montrer que les GAG sont directement impliqués dans l'adhésion de la pénétratine et plus particulièrement les HS. De plus un retour à une adhésion équivalente à celle du non spécifique laisse à penser qu'avec la sensibilité que nous offre le BFP, la seule interaction observable avec la pénétratine est celle des HS. Il se peut qu'il y ait d'autres partenaires mais cet outil ne nous permet pas de les étudier car les forces induites par ces interactions seraient trop faibles.

Afin de mieux comprendre l'adhésion de la pénétratine sur les HS nous avons tenté de reproduire ces interactions en systèmes modèles.

### **3. Interaction avec des membranes modèles**

Étant donné que la pénétratine interagit avec les HS, nous avons supposé que des interactions électrostatiques pouvaient être impliquées dans l'adhésion. Afin d'explorer cette piste nous avons utilisé des vésicules géantes (GV) contenant des lipides chargés négativement, à la place des cellules, dans nos expériences de BFP. Nous avons choisis de faire nos vésicules uniquement à partir de 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-sérine (DOPS), un lipide dont la tête est chargée négativement (Figure II-9). Ces vésicules ne présentent pas d'affinité pour la pénétratine avec 5% d'interaction spécifique contre 3% de non spécifique (Figure II-9). Il semblerait donc que si seule une interaction électrostatique est en jeu dans l'interaction CPP-HS, le BFP n'est pas assez sensible pour l'enregistrer et que ce n'est pas cette interaction qui a été mesurée précédemment avec les cellules. Bien sûr la densité, la position et l'orientation des charges négatives pourraient aussi jouer un rôle et nos vésicules être un modèle inadéquat. Une autre hypothèse est qu'il existe donc une autre force d'adhésion, plus intense, qui pourrait être due à la présence du groupement sulfate des HS.

Afin de tester le rôle du groupement sulfate dans cette interaction nous avons réalisé un second type de GV avec une composition de 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC):3-O-sulfo- $\beta$ -D-C17-galactosylceramide 8:2, un lipide zwitterionique constitutif de la membrane plasmique et un lipide porteur d'un sucre sulfaté afin de mimer les HS. Tout comme pour les GV en DOPS nous n'observons pas d'affinité de la pénétratine, avec 1% d'interaction avec la pénétratine pour 3% en non spécifique (Figure II-9). Ceci suggère que l'affinité pour un seul sucre modèle, saillant à la membrane n'est pas suffisamment forte pour que le BFP puisse la détecter. Nous n'avons malheureusement pas réussi à former des GV contenant une plus forte concentration en lipides sulfatés. Cette difficulté à former des GV contenant plus de lipides sulfatés peut suggérer que nos GV formés à partir d'un mélange lipidique contenant 20% de

lipides sulfatés en contiennent une proportion moindre ce qui pourrait expliquer l'absence d'adhésion.

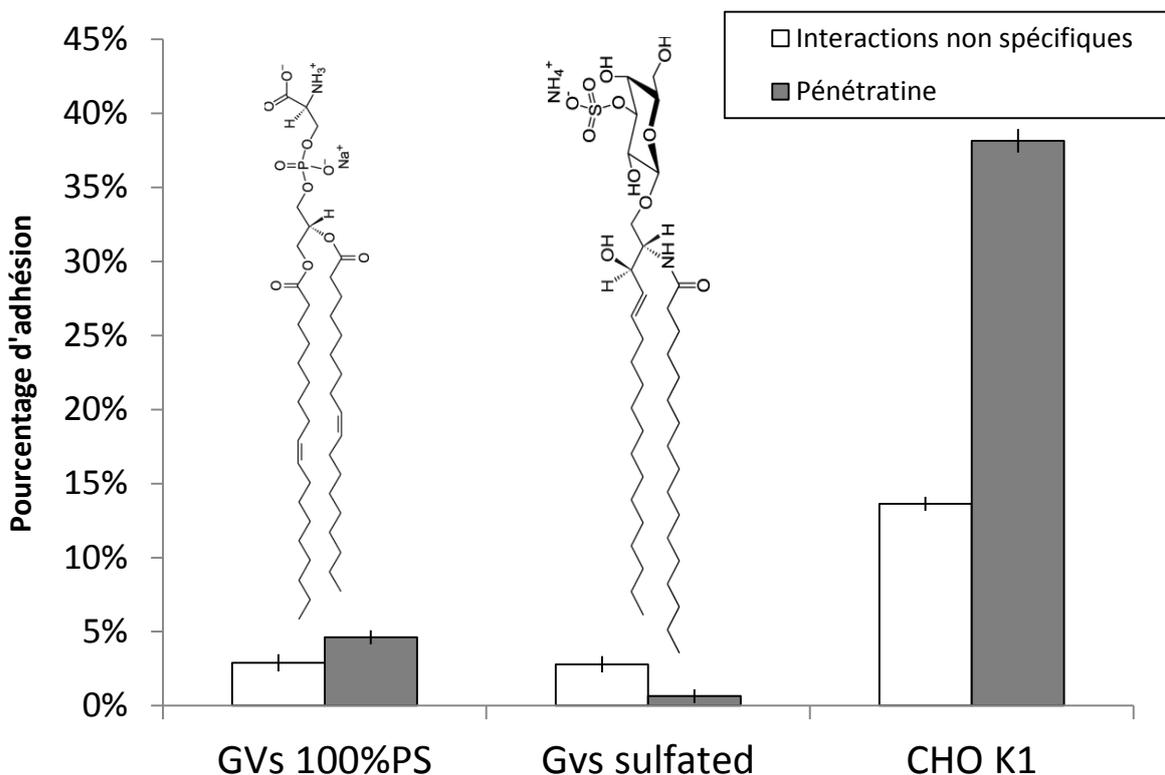


Figure II-9 : Pourcentages d'adhésion mesurés par le BFP : comparaison des systèmes modèles *versus* les cellules sauvages. Les colonnes à fond blanc correspondent aux interactions non spécifiques, et celles à fond gris sont en présence de pénétratine. Les lipides utilisés pour nos systèmes modèles sont représentés au-dessus des conditions correspondantes.

Nous n'avons donc pas pu reproduire ou détecter les interactions électrostatiques si tant est qu'elles soient à l'origine de l'adhésion entre HS et pénétratine dans les expériences avec des GV. Il est possible que la structure tridimensionnelle des sucres de surface renforce les interactions électrostatiques avec les CPP, de sorte qu'elles deviennent détectables pour le BFP.

#### 4. Importance des acides sialiques

Bien que nous ayons mis en évidence un partenaire membranaire, les HS, nous souhaitons nous intéresser à un second composant majoritaire de la membrane plasmique, les acides sialiques (SA). Pour cela nous avons utilisé un type cellulaire dont la synthèse des SA est déficiente, les CHO-Lec2 (Deutscher et al. 1984).

Ces cellules présentent, comme les autres types dérivés de cette lignée cellulaire, environ 15% d'adhésion non spécifique. En revanche, elles présentent 75% d'adhésion avec la pénétratine (Figure II-10). Cela suggère un plus grand nombre de partenaires à la surface de la cellule permettant l'adhésion de la pénétratine. De plus, l'histogramme de force est aussi modifié

(Figure II-11). En effet, nous voyons apparaître une gaussienne centrée autour de 75 pN, alors que sur les histogrammes de forces précédents, nous voyons une décroissance dans le nombre d'évènements pour des forces croissantes avec un maximum d'occurrence à 30 pN (Figure II-6).

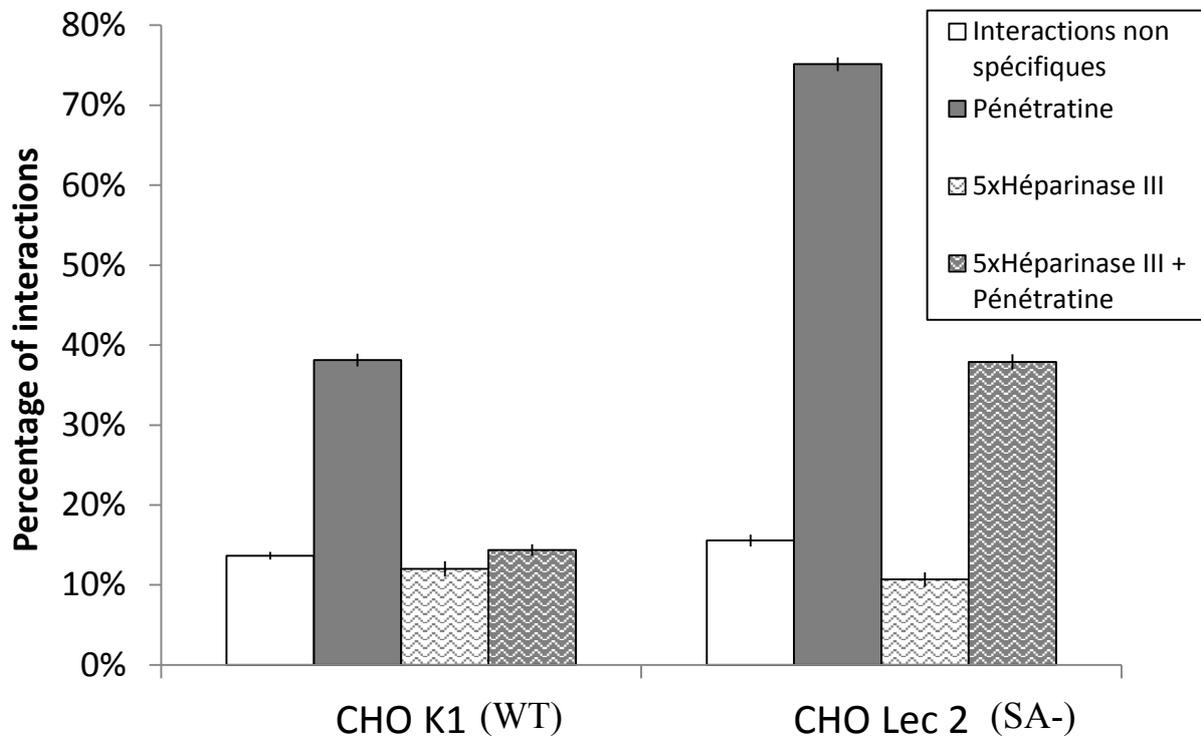


Figure II-10 : Pourcentage d'adhésion en fonction de la décoration, ou non, de la bille et des traitements enzymatiques appliqués sur différents types cellulaires. Les fonds blancs correspondent aux interactions non spécifiques, les fonds gris aux interactions avec la pénétratine, les pleins aux cellules non traitées, et les vaguelettes au traitement "5x".

Afin de déterminer si les acides sialiques agissent comme un inhibiteur de l'adhésion pénétratine – HS en séquestrant les HS, ou bien si les SA masquent d'autres partenaires potentiels pour la pénétratine, nous avons dégradé les HS à la surface des Lec2. Nous avons réalisé un traitement à forte concentration en héparinase III (5x), qui pour les cellules sauvages suffisait à supprimer toutes interactions. Cependant après ce traitement les Lec2 présentent toujours 40% d'interaction avec la pénétratine. Comparé aux 75% de départ nous avons donc supprimé 35% des interactions qui étaient dues à la présence des HS. On peut remarquer que cette valeur est supérieure aux 20% d'interaction pénétratine-HS observés jusqu'à présent (35% d'interaction des CHO avec la pénétratine moins 15% d'interaction des CHO traités à l'héparinase III avec la pénétratine). Les SA ont donc probablement un rôle de séquestration des HS, ou peuvent inhiber en partie les interactions pénétratine–HS. Cependant il reste toujours 25% d'interaction de source inconnue. De plus l'histogramme de force après traitement ressemble de nouveau aux histogrammes non spécifiques (Figure II-11). Nous ne pouvons donc

plus démarquer une force caractéristique de ces événements. Ainsi l'interaction de la pénétratine avec ce nouveau partenaire présente aussi une force proche des 30 pN, tout comme l'interaction Pénétratine-HS, et les interactions non spécifiques. De fait la gaussienne autour de 70 pN qui apparait en absence de traitement est sûrement due à des interactions faisant intervenir simultanément plusieurs événements, soit une interaction pénétratine-HS et pénétratine-« nouveau partenaire », soit des interactions multiples.

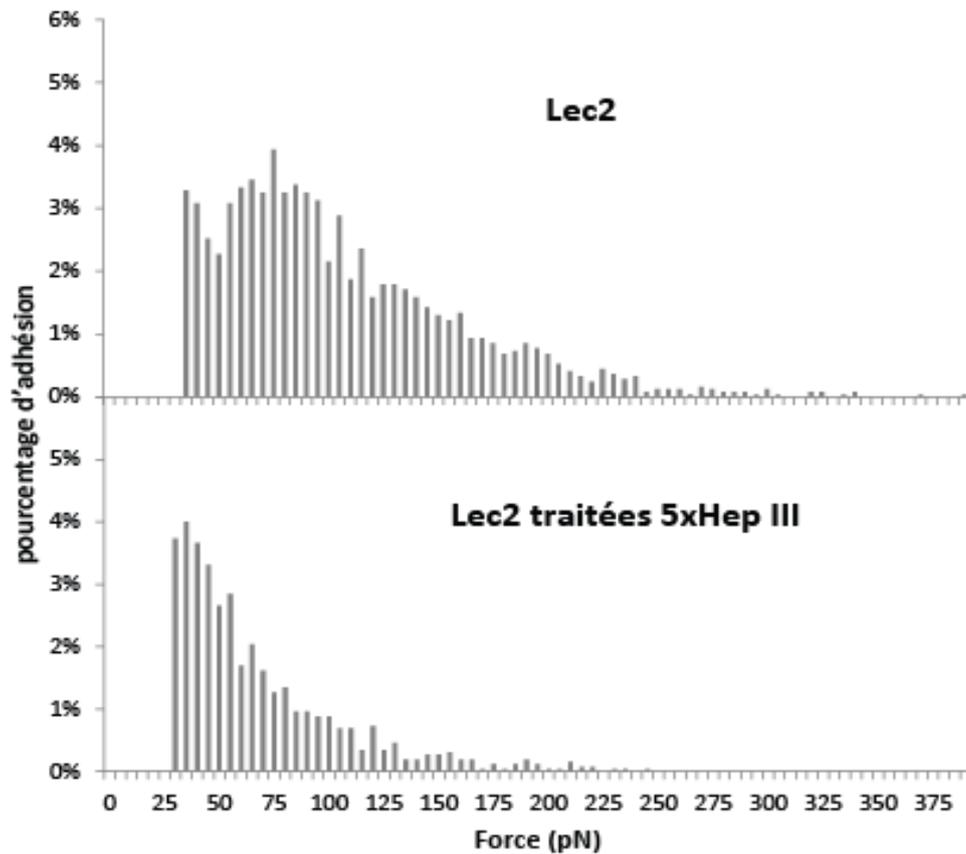


Figure II-11 : Histogramme des forces enregistrées sur les Lec2 en fonction des traitements enzymatiques.

## 5. Quelques modèles énergétiques

Le BFP mesure des forces de séparation dans un régime dynamique. Nous n'obtenons pas directement les énergies de liaison de la pénétratine avec la membrane cible. Afin de pouvoir estimer cette énergie de liaison, nous avons comparé nos données à celles de la littérature.

L'étude de l'interaction des CPP avec divers composants membranaires a été réalisée à l'aide de nombreuses méthodes *in-vitro* et nous avons décidé de nous appuyer sur des données obtenues par résonance de plasmons de surface (PWR) (Alves et al. 2011) et calorimétrie (ITC) (Bechara et al. 2013).

Le PWR repose sur une mesure de la lumière réfléchiée par une surface éclairée en réflexion totale. Lorsqu'un faisceau atteint une interface avec un angle supérieur à l'angle critique, alors

le faisceau est entièrement réfléchi par l'interface (réflexion totale) et une onde de surface, appelée onde évanescente est générée de l'autre côté. Dans le cas du PWR la chambre est montée sur un prisme, permettant au laser d'atteindre l'interface avec une gamme d'angles proche de l'angle critique. L'intérieur de la chambre est constitué d'un film diélectrique et d'une couche de métal permettant la génération de plasmons dont l'excitation (résonance) va provoquer une diminution de la réflectance de l'ensemble diélectrique-métal-échantillon. On mesure la réflectance en fonction de l'angle du faisceau incident et en particulier autour de l'angle de résonance qui est légèrement supérieur à l'angle critique. Lorsque l'échantillon est modifié, par exemple du fait de l'interaction entre un dépôt et une molécule partenaire, l'angle de résonance est aussi modifié, ce qui permet de détecter l'interaction. Il est ainsi possible de réaliser des expériences de titration et de remonter aux constantes d'association et de dissociation d'un couple molécule déposée-molécule libre. Dans le cas des CPP un dépôt de membrane plasmique cellulaire est réalisé sur la chambre, puis les CPP sont ajoutés afin de déterminer l'affinité ( $1/K_d$ ) des CPP en fonction du type cellulaire utilisé pour faire le dépôt de membrane. La constante de dissociation à l'équilibre ( $K_d$ ) est obtenue en mesurant la quantité de ligand nécessaire pour lier la moitié des sites pouvant réagir. Les expériences portant sur l'interaction entre la pénétratine et des fragments de membranes cellulaires ont permis d'obtenir un  $K_d = 10^{-8}$  M pour des cellules sauvages et  $K_d = 30 \cdot 10^{-8}$  M pour les Lec2 (Alves et al. 2011). L'ITC permet la mesure de la quantité de chaleur dégagée lors de l'interaction de deux molécules, ici un CPP et des sucres purifiés tels que ceux trouvés à la surface de la cellule. L'ajout progressif du ligand, ici les sucres, conduit à des dégagements de chaleur de moins en moins importants au fur et à mesure que les sites de liaisons sont saturés. Ainsi il est possible de retracer une courbe de saturation en fonction de la concentration de ligand, et d'en déduire la constante de dissociation. Il a ainsi été mesuré que l'interaction pénétratine – HS présente un  $K_d = 9,3 \cdot 10^{-8}$  M (Bechara et al. 2013).

La partie qui suit vise à comparer les mesures du BFP avec ces mesures de PWR et de calorimétrie. Il est d'une part difficile de trouver une relation directe entre les valeurs thermodynamiques obtenues en calorimétrie et PWR, et les énergies mises en jeu lors de l'adhésion entre deux molécules lors des expériences de BFP. Et d'autre part, les forces mesurées par le BFP ne permettent pas de remonter simplement au paysage énergétique de l'interaction BFP-membrane. Nous appelons dans la suite  $E(x)$  ce paysage énergétique, faisant ainsi une première hypothèse : l'énergie ne dépend que d'une coordonnée spatiale  $x$ , la distance de séparation CPP-partenaire sur la membrane. La seconde hypothèse est que ce paysage

énergétique est dominé par un seul puits d'énergie de profondeur  $E_a$  et de largeur  $\Delta x$  (Figure II-12).

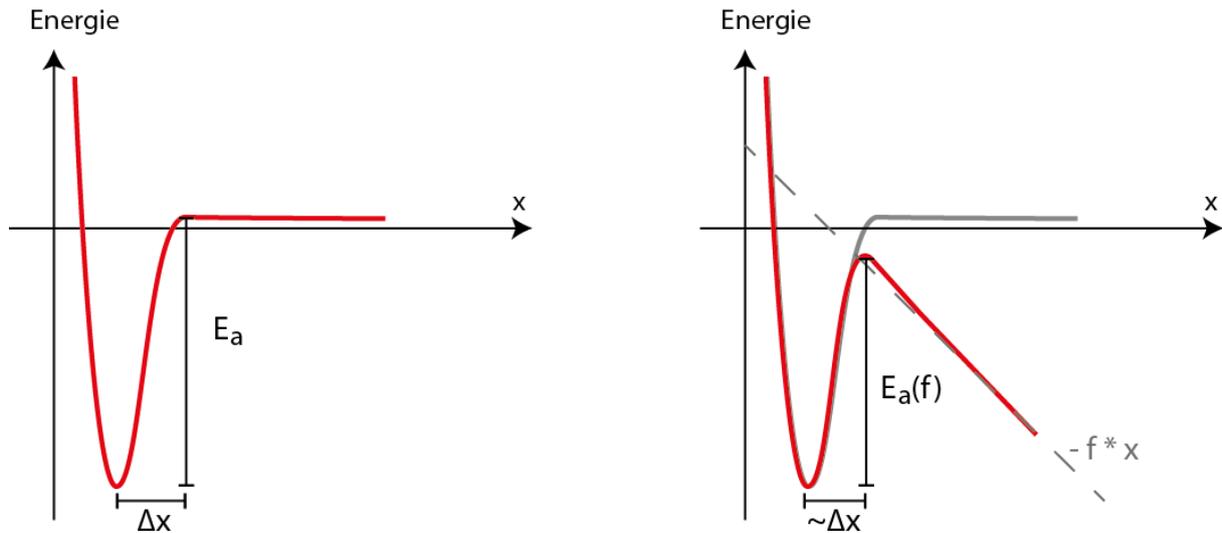


Figure II-12 : Paysage énergétique à un seul puits d'énergie le long de la coordonnée réactionnelle :  $x$ . Le puits est caractérisé par sa profondeur  $E_a$  et sa largeur  $\Delta x$ . À gauche en absence de force, à droite en présence d'une force  $f$  s'exerçant le long de la coordonnée réactionnelle. La profondeur du puits est alors modifiée en  $E_a(f) = E_a - f \cdot x$ , la largeur du puits reste similaire, dans le cas d'un profil avec un unique puits.

Concernant la difficulté de comparer  $E_a$  aux grandeurs thermodynamiques issues de la calorimétrie et du PWR, on pourrait avancer que  $E_a$  correspond à la variation d'enthalpie  $\Delta H^0$  par molécule, puisque à cause de l'immobilisation des CPP sur la bille, une composante entropique disparaît. Cependant l'entropie du solvant est maintenue, malgré la liaison, et est essentielle dans la description du système. C'est pourquoi nous avons choisi de poursuivre nos analogies avec la variation d'enthalpie libre (ou énergie de Gibbs)  $\Delta G^0$ .

Or la constante d'équilibre d'une réaction est directement reliée à la variation d'enthalpie libre :

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_d \quad (\text{II.2})$$

Où  $K_d$  est la constante d'équilibre de la réaction de dissociation d'un CPP de son partenaire (un site de fixation sur un GAG dans les expériences de calorimétrie, un site de fixation sur une membrane dans les expériences de PWR). On obtient ainsi une estimation de  $E_a$  à partir des données calorimétriques et PWR par la formule :

$$E_a \approx \frac{-RT \ln K_d}{N_{\text{Avogadro}}} \quad (\text{II.3})$$

Les valeurs obtenues en PWR suggèrent des valeurs de  $E_a$  allant de  $15 k_B T$  pour les Lec2 à  $18 k_B T$  pour les cellules sauvages. Les données obtenues en ITC donnent  $E_a = 16 k_B T$

Les deux techniques donnent des valeurs cohérentes, et nous permettent de converger vers une énergie de liaison de l'ordre de  $15-18 k_B T$ .

Revenons au lien entre  $E(x)$  et la force mesurée en BFP. En présence d'une force  $f$ , l'énergie  $E_a$  est abaissée et vaut:  $E_a(f) = E_a - f\Delta x$

La probabilité de rupture de la liaison au cours d'un intervalle de temps  $\Delta t$  est donnée par la loi d'Arrhenius :

$$P_{rupture} = \Delta t \nu_0 e^{-\frac{E_a(f)}{k_B T}} \quad (\text{II.4})$$

La fréquence  $\nu_0$ , qui pour la liaison streptavidine-biotine a été estimé entre  $10^9$ - $10^{12}$   $s^{-1}$  (Merkel et al. 1999) (Pincet & Husson 2005), caractérise la fréquence d'exploration du paysage énergétique sous l'effet de l'agitation thermique. Si nous considérons un  $\nu_0 \sim 10^{10}$   $s^{-1}$ , sachant qu'un point de mesure de force lors d'une séparation bille-cellule en BFP dure 3,3 ms, nous obtenons une rupture probable de la liaison lors de ce point de mesure dès que  $E_a(f) < 17$   $k_B T$ . La rupture étant souvent observée pour des forces dépassant 30 pN pendant plusieurs dizaines de ms,  $E_a$  doit être sensiblement supérieure à cette limite de 17  $k_B T$  (sinon la liaison se romprait en quelques ms dès que la force devient une force de traction).

Il nous est aussi possible de borner la largeur du puits d'énergie  $\Delta x$ . On peut supposer que la distance à parcourir le long de la coordonnée réactionnelle est au moins plus petite que la taille de la pénétратine. Les informations structurales donnent une longueur de 2,1 nm pour un diamètre de 1,5 nm si l'on ne considère que le squelette carboné, c'est-à-dire la distance entre les deux carbones les plus extrêmes dans la forme repliée du peptide. (Figure II-13), ce qui implique que la largeur du puits soit inférieure au nanomètre. La comparaison avec l'interaction streptavidine-biotine suggère que cette largeur est supérieure à l'angström. Cette information,  $\Delta x = [10^{-10}$ - $10^{-9}]$  m et la mesure de la force moyenne lors de la rupture,  $f \sim 30$  pN, nous permet de calculer l'abaissement de la barrière énergétique. Ainsi  $\Delta E_a = -f \Delta x$  soit  $\Delta E_a = [0,75 - 7,5]$   $k_B T$ . Ainsi nous pouvons estimer  $E_a$  à partir du BFP dans un intervalle de 17 à 25  $k_B T$  ce qui, compte tenu des approximations effectuées, est en accord raisonnable avec la calorimétrie et le PWR. Une détermination précise de  $E_a$  à partir de nos mesures de force est délicate car elle demanderait une connaissance complète du profil de rupture (rappelons que nous ne détectons pas les forces  $< 30$  pN) et nécessiterait de faire varier le taux de charge ce qui n'a pu être réalisé dans le temps imparti à cette étude. Cependant il est possible de décrire le paysage énergétique d'une liaison à l'aide du BFP comme l'ont montré les études de la liaison streptavidine-biotine (Merkel et al. 1999) (Pincet & Husson 2005).

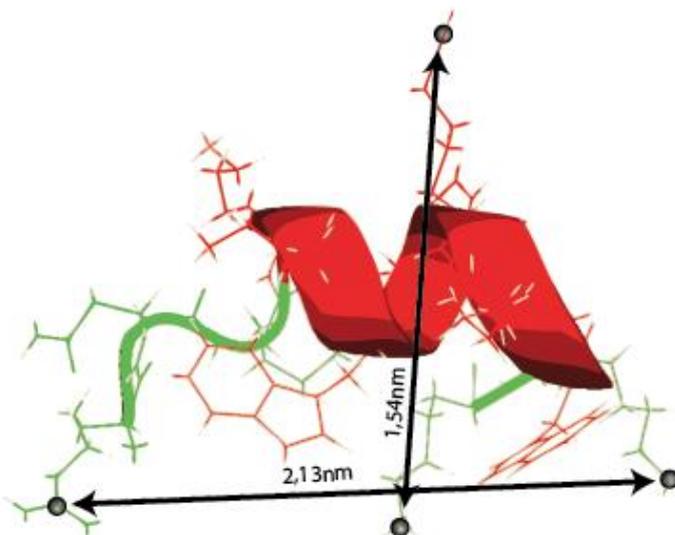


Figure II-13 : structure de la pénétratine en solution obtenue par RMN (Czajlik et al. 2002), et disponible sur PDB à la référence « 1KZ0 ». Les acides aminés adoptant une structure secondaire sont représentés en rouge, et ceux dont la structure n'est pas fixe en vert. Les dimensions de la pénétratine correspondent à la distance des carbones les plus éloignés.

## 6. Densité des différents éléments de la surface de contact

La surface de contact bille-cellule lors des expériences de BFP fait intervenir différents éléments. D'une part notre peptide, dont la densité sur la surface de contact dépend de la densité de couverture sur la bille. Et d'autre part les différents partenaires cellulaires de la pénétratine que nous avons étudiés à l'aide du BFP.

La densité de peptides sur la bille a été estimée en comparant l'intensité de fluorescence d'une bille décorée selon le protocole présenté dans le matériel et méthode et celle d'une pénétratine-fluorescéine. Par ailleurs nous avons utilisé des GUV contenant des lipides fluorescents, C6-NBD, à différentes concentrations. Les GUV contenant 0,1% de C6-NBD montrent sensiblement la même distribution d'intensité, que nos billes marquées à l'aide de peptides fluorescents (Figure II-14). Ainsi nous pouvons considérer qu'elles ont la même densité de molécules fluorescentes à leur surface. Une GUV de 3  $\mu\text{m}$  de diamètre, en considérant qu'une tête de lipide a une surface de  $\sim 1 \text{ nm}^2$ , contient  $28 \cdot 10^6$  lipides, et donc  $2,8 \cdot 10^4$  C6-NBD à sa surface. Soit 1000 molécules fluorescentes par micromètre carré. La surface de contact estimée entre la bille et la cellule est de l'ordre de quelques micromètres carrés, il y a donc quelques milliers de molécules de pénétratine en contact avec la cellule lors de chaque étape de contact entre la bille et la cellule. Une telle valeur soulève aussi la question de molécule unique évoquée plus haut : lors des 400 ms de contact entre la bille et la cellule, la probabilité, pour un CPP, de reconnaître son partenaire est faible, de l'ordre de  $10^{-3}$  par peptide et par seconde.

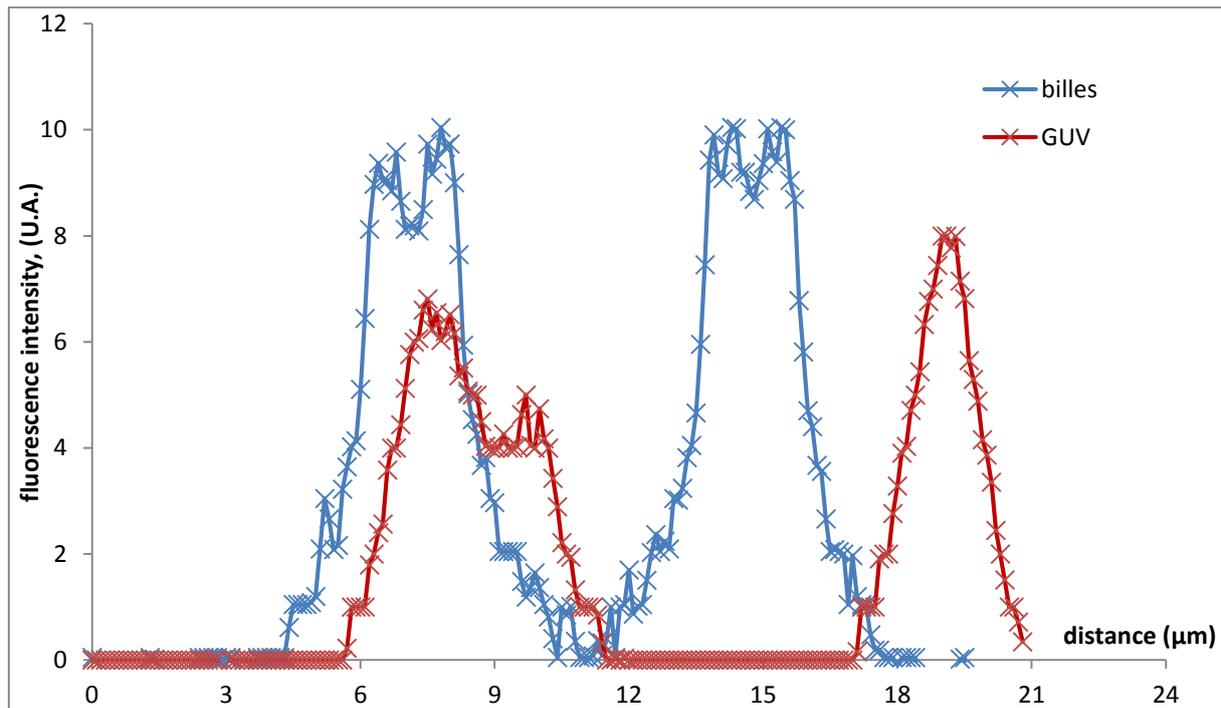


Figure II-14 : profil d'intensité le long de plusieurs billes ou GUV sur des images prises en microscopie à fluorescence. Les points en bleus correspondent aux valeurs mesurées le long du cliché contenant les billes, celles en rouges correspondent aux GUV. Le bruit de fond a été soustrait à chacune des courbes.

Le dénombrement des HS à la surface d'une cellule a été fait à l'aide d'études portant sur la désintégration de souffres réactifs à la surface de cellules (Esko et al. 1985). Il a été mesuré  $1,8 \cdot 10^5$   $^{35}\text{S}$  / $\mu\text{g}$  de protéine, soit  $1,8 \cdot 10^5$   $^{35}\text{S}$  par cellule, en comptant une dizaine de sulfate par HS cela donne une dizaine de HS par cellule détectés par cette étude. Mais il ne s'agit que d'une borne inférieure, évidemment très sous-estimée puisque le capteur ne collecte la désintégration que dans un angle solide réduit. Nous n'avons donc pas réussi à conclure sur la densité de HS en analysant cette étude.

Des études similaires ont été réalisées sur la densité des acides sialiques dans les cellules portant sur un dénombrement par photothermie (Kwak et al. 2012) (expliqué en I.G.1.c). Les résultats suggèrent 375 pmol de SA pour  $10^6$  cellules soit  $10^7$  SA par cellule. Cela en fait donc un composant majoritaire de la membrane cellulaire, seulement un ordre de grandeur en dessous du nombre de lipides. Supprimer un tel composé peut donc avoir de nombreux effets compte tenu de son abondance à la surface de la cellule et de sa conservation, ce qui pourrait expliquer les résultats observés sur les cellules Lec2.

## D. Conclusion

Nous avons utilisé le BFP pour étudier l'adhésion de la pénétratine avec la membrane cellulaire. Nous avons mis en évidence un partenaire pour la pénétratine, les HS, qui sont des GAG porteurs de sulfates (Figure II-15). Cependant nous n'avons pu reproduire ces interactions dans des systèmes modèles tels que des vésicules chargées négativement. Il semblerait donc que si des interactions électrostatiques sont en jeu dans l'adhésion, une simple membrane chargée ne permet pas de produire une force suffisante pour être détectée par le BFP. De plus nous avons montré qu'il existe potentiellement d'autres partenaires à la surface de la cellule comme le suggère les études sur les cellules déficientes en SA. En effet, ce mutant présente deux fois plus d'évènements d'adhésion que les autres types cellulaires, et une dégradation des HS ne suffit pas à supprimer tous les évènements d'adhésion. Enfin toutes les interactions observées présentent des forces de valeurs proches, qu'elles soient spécifiques ou non, et quel que soit le partenaire.

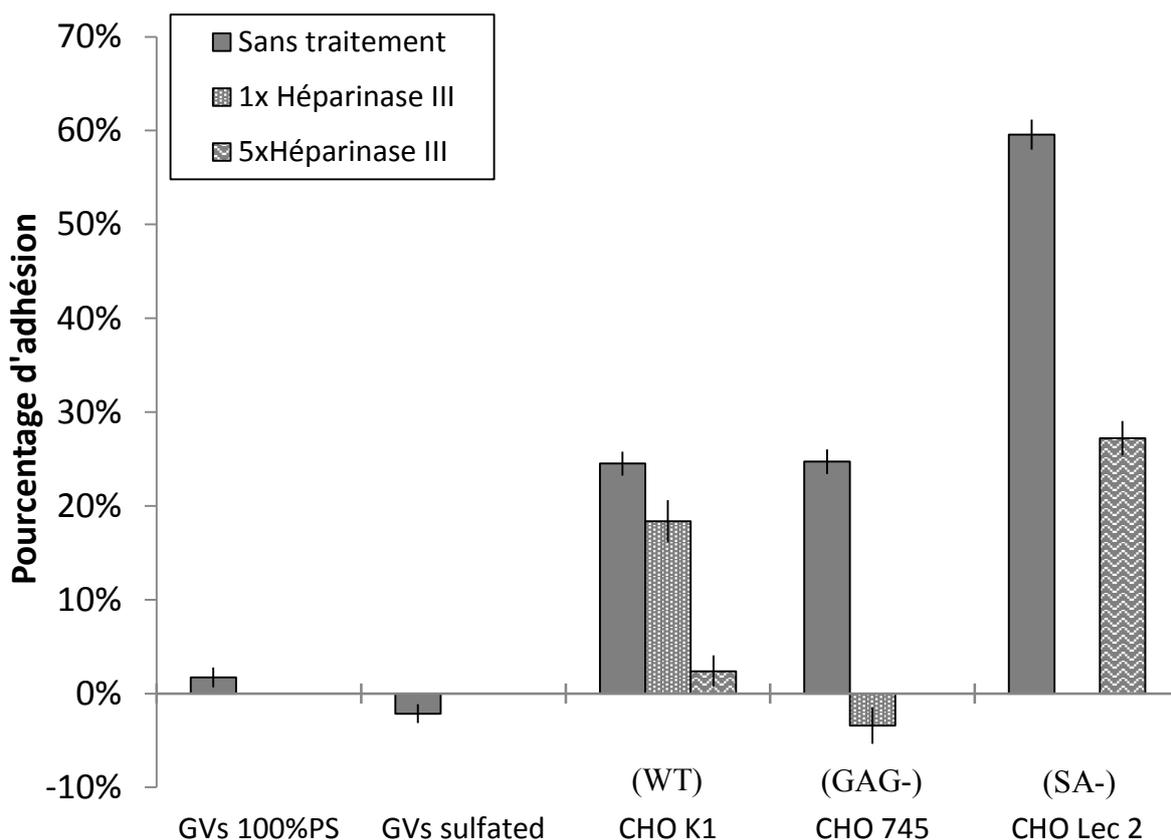


Figure II-15 : Diagramme représentant le pourcentage d'adhésion pour chacune des conditions testées. La fréquence du non spécifique a été soustraite à la fréquence des interactions en présence de pénétratine. Les colonnes pleines représentent les cellules sans traitement, les mouchetées après traitement à l'héparinase III "1x", et les vaguelettes après traitement à l'héparinase III "5x".

Ainsi nous proposons le modèle schématisé sur la Figure II-16 dans lequel sur une membrane de cellule sauvage les sites aspécifiques sont masqués par les SA, et une partie des HS est retenue à proximité des SA. Lorsque les HS sont dégradés, la pénétратine ne dispose plus de sites dont l'adhésion est suffisamment forte pour être détectée à l'aide du BFP. Cependant nous n'excluons pas une potentielle interaction avec la bicouche lipidique, mais cette interaction n'est pas observable avec les gammes de force détectées à l'aide du BFP dans nos expériences. Enfin en absence de SA, de nouveaux HS sont libérés augmentant le nombre d'évènements. Des nouveaux sites spécifiques sont aussi révélés donnant lieu à de nouvelles interactions augmentant fortement le nombre d'évènements enregistrés. Les SA pourraient masquer les sites réactifs présents à la surface de certains sucres, lipides ou protéines, et ainsi limiter les adhésions de molécules extracellulaires à la surface de la cellule.

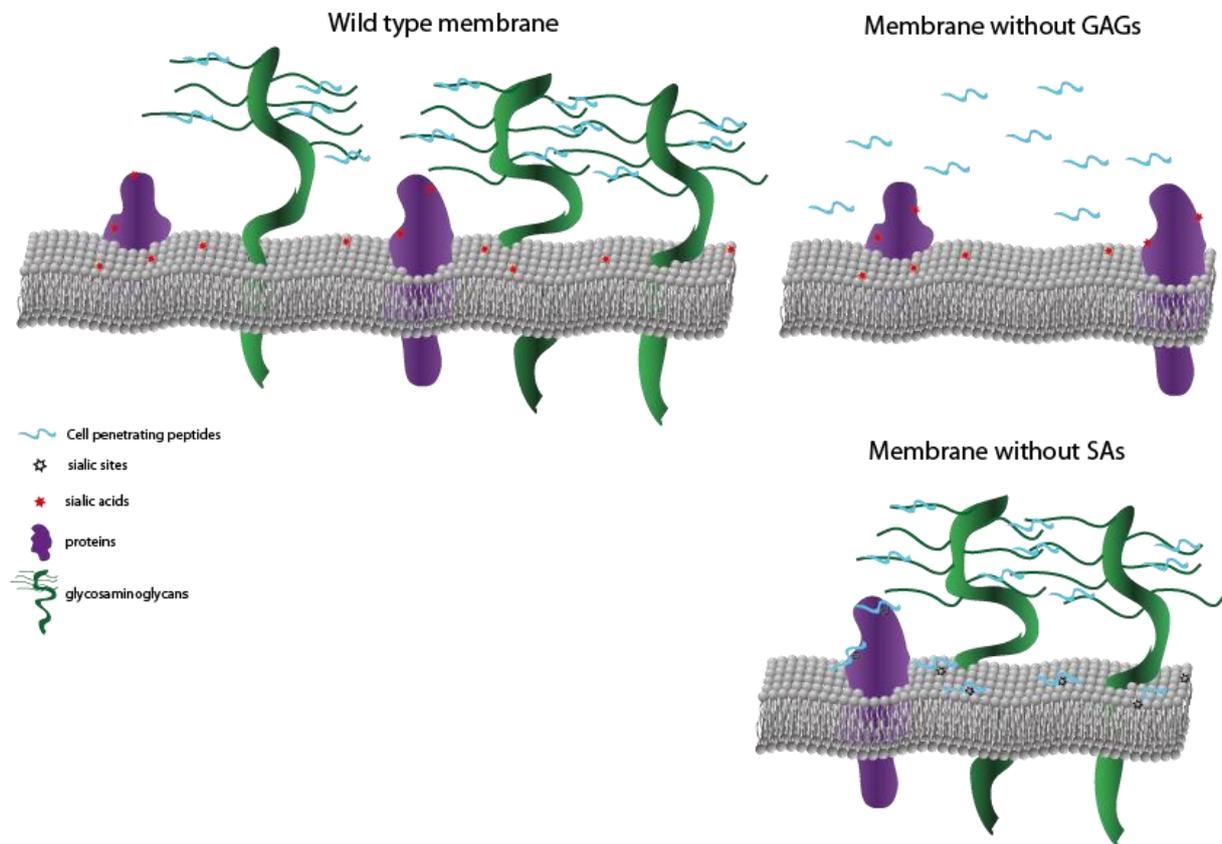


Figure II-16 : Schéma représentant l'interaction des CPP avec des membranes cellulaires dont la composition en GAG varie. Pour une membrane sauvage les CPP sont piégés au contact des HS portés par certains GAG. En revanche, en absence de GAG les CPP n'interagissent pas avec la membrane cellulaire. Pour les membranes déficientes en SA, des sites réactifs semblent être dévoilés permettant aux CPP de réagir avec les HS mais aussi avec d'autres partenaires non encore identifiés.

### III. Étude de la translocation à l'aide de bicouches à l'interface entre gouttelettes

---

## A. Introduction

### 1. Les systèmes modèles pertinents

Les études sur bicouches modèles permettent de contrôler la composition en lipides du système. Elles permettent de s'affranchir de la machinerie cellulaire et de ne regarder que l'interaction entre la molécule d'intérêt et la bicouche lipidique. Je vais présenter quatre modèles de membrane permettant de travailler sur une membrane synthétique de composition contrôlée :

- Les vésicules, déjà évoquées à plusieurs reprises dans ce manuscrit, restent le modèle le plus largement employé. Cependant, un tel modèle présente plusieurs limitations, la fabrication de vésicules ne peut se faire que dans des volumes de l'ordre du millilitre et les expériences où l'on cherche deux phases aqueuses différentes à l'intérieur et à l'extérieur des vésicules ont besoin d'étapes de purification des vésicules, ou bien repose sur des dilutions excessives (Bárány-Wallje et al. 2005). De plus, l'observation en microscopie à fluorescence nécessite que la sonde s'accumule fortement dans les vésicules afin d'être distinguée du bruit de fond, néanmoins la microscopie confocale permet de pallier cette contrainte.
- Les bicouches supportées sont des membranes déposées sur un support, soit un hydrogel, soit directement la lame de verre. Elles présentent l'avantage d'être stables plusieurs heures et il est possible de contrôler parfaitement le compartiment supérieur, en revanche il n'y a pas de second compartiment. De plus, la présence d'un support ralentit, voire bloque la diffusion latérale des lipides (Macháň & Hof 2010). En ce qui concerne l'étude de la translocation, l'absence de second compartiment est un inconvénient majeur, un peptide devant traverser la membrane ayant éventuellement avec l'hydrogel une interaction différente de celle d'avec le milieu aqueux plus proche des conditions cellulaires. La diminution de la fluidité de la bicouche modifie aussi la translocation. La géométrie plane de ce modèle présente cependant un intérêt pour les études en microscopie en molécule unique telle que la microscopie de fluorescence à onde évanescente détaillée dans le chapitre IV.
- Les films noirs (ou BLM pour *Black Lipid Membrane*), consistent en une bicouche suspendue entre deux compartiments. Ce modèle de bicouches suspendues présente

l'avantage d'avoir deux compartiments accessibles à tout moment. Cela permet des acquisitions électriques de type « électrophysiologie » et la génération de gradients modifiables pendant l'expérience (Montal & Mueller 1972).

- Un modèle intermédiaire entre les vésicules et les cellules a aussi été présenté dans le manuscrit : les Vésicules Géantes de Membrane Plasmique (GPMV). Ces vésicules bourgeonnent de la cellule après traitement au formaldéhyde. Elles ont l'avantage de présenter une composition lipidique plus complexe que les systèmes présentés ci-dessus, incluant des protéines transmembranaires et des sucres. Leur composition reste cependant éloignée de celle d'une cellule saine (Baumgart et al. 2007).

Les techniques de bicouches suspendues et supportées sont plus étoffées dans le chapitre sur la conception du microscope de fluorescence à onde évanescente sur bicouche suspendue (IV.A.2).

Dans le cadre de l'étude des CPP, il est important de pouvoir contrôler la composition de la bicouche afin d'étudier l'importance de chacun des composants présents à la surface de la cellule. Bien que ces quatre modèles semblent appropriées, ils présentent tous des défauts quant à l'application aux CPP. Les bicouches supportées ne présentent pas de second compartiment. Les BLM possèdent l'avantage d'être compatibles avec la microscopie optique. Il est même possible d'observer chaque compartiment indépendamment à l'aide d'un microscope confocal, pour détecter le passage de molécules fluorescentes (Bárány-Wallje et al. 2005). Cependant, la formation de telles bicouches n'est pas aisée et leur stabilité assez incertaine, rendant des études cinétiques sur des temps longs (de l'ordre de l'heure) assez fastidieuses. Il demeure que les compartiments peuvent difficilement être réduits en deçà de quelques millilitres ce qui rend l'expérience couteuse en CPP. Les vésicules présentent aussi des limitations bien que déjà utilisées pour étudier les CPP (Walrant et al. 2013) (Islam et al. 2014). Elles nécessitent de grandes quantités de peptides, car une fois de plus il faut travailler sur des volumes proches du millilitre. De plus, les approches où l'on applique des gradients électriques comme avec les BLM sont difficiles à mettre en place. L'observation en molécule unique, comme sur les bicouches supportées, n'est pas non plus possible.

Il est donc nécessaire de développer une approche permettant de travailler sur des volumes plus petits, diminuant ainsi la quantité de CPP consommée par expérience, et pouvant permettre aussi d'appliquer des gradients électriques.

## 2. Histoire et évolution de la bicouche à l'interface entre gouttelettes

La première apparition d'une bicouche à l'interface d'émulsions inverses (*Droplet Interface Bilayer* : DIB) remonte à l'époque de la mise au point des techniques de bicouches suspendues. En effet, la première bicouche plane a été réalisée en 1962 (Mueller et al. 1962) par la méthode de peinture lipidique sur un trou en PTFE. Cependant, la membrane ainsi créée présentait une épaisseur, mesurée à l'aide de rayon X, de 60-90 Å, c'est à dire deux à trois fois plus épaisse que l'épaisseur attendue pour une bicouche, ce qui était sûrement dû à la présence résiduelle d'huile dans le cœur hydrophobe. Afin d'affiner cette membrane, une méthode de formation de bicouche plane en absence de solvant hydrophobe a été développée (Montal & Mueller 1972). Cette nouvelle méthode de formation a permis d'affiner l'épaisseur de la membrane à 22 Å (d'après les mesures de capacitance). La résistance mesurée ( $10^8 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) (Montal & Mueller 1972), dépasse d'au moins 5 ordres de grandeur les valeurs biologiques, mesurées sur des membranes d'axones (de l'ordre de  $10^3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) (Cole & Hodgkin 1939). Cette différence pourrait venir de la technique elle-même ou bien de l'absence d'une majorité des composants membranaires (protéines, sucres, mélange lipidique complexe) dans ces membranes modèles. La première apparition d'une bicouche en émulsion inverse a été réalisée en 1966 par l'équipe de Babakov (Tsofina et al. 1966). Ils ont dissous des lipides extraits de cerveaux dans de l'heptane, puis ont approché deux compartiments aqueux de part et d'autre de ce mélange. Les lipides se placent à l'interface huile-eau de chaque compartiment, formant ainsi une monocouche (Figure III-1). Lorsque les deux compartiments se rejoignent, les deux monocouches entrent en contact et laissent place à une bicouche, DIB, dans laquelle peuvent être incorporées des protéines transmembranaires présentes en solution aqueuse. Ils ont ainsi pu montrer que l'incorporation de protéines dans ces membranes modèles abaissait la résistance de ces bicouches à  $10^4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Afin de diminuer encore cette valeur pour se rapprocher d'une membrane biologique ils ont montré qu'il fallait diminuer la pression latérale exercée sur le mélange huile-lipide. Une telle modification réduit la compaction des lipides en insérant moins de lipides dans la bicouche pour une surface égale.

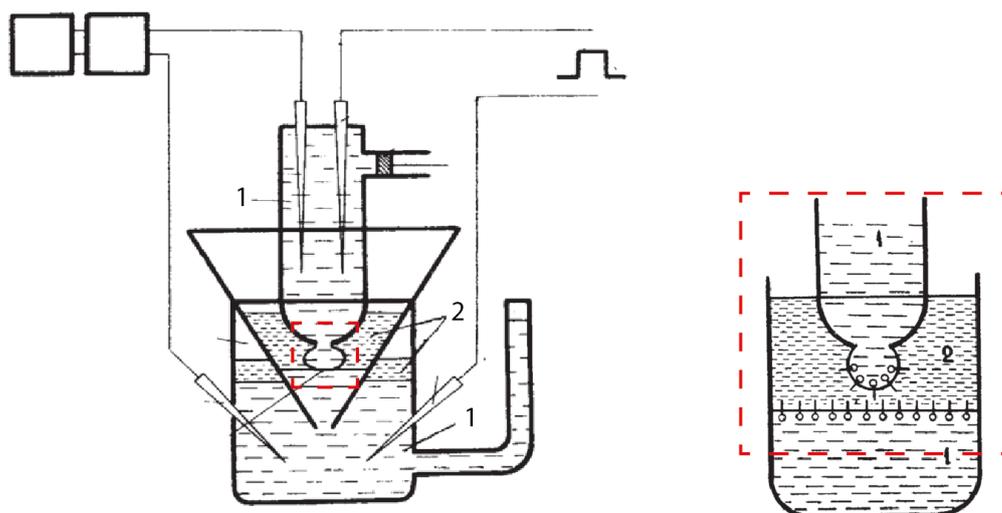


Figure III-1 : À gauche le montage d'origine équipé des électrodes permettant les mesures électriques. Les solutions aqueuses sont représentées par des traits longs (1), et l'huile par des traits courts (2). Sur la partie de droite est représenté un grossissement de la zone où se forme la DIB et les lipides sont schématisés grossièrement. Illustrations tirées de (Tsofina et al. 1966).

L'apparition de bicouche, à l'interface entre gouttelettes, dans des émulsions inverses a aussi fait l'objet de caractérisation physique (Poulin & Bibette 1998). Ainsi une émulsion d'eau salée dans un mélange à 0,2% de L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (Egg-PC) dans 70% d'huile de silicone et 30% d'éther permet la formation de DIB. En considérant la forme de la DIB par rapport à l'aspect des gouttelettes de part et d'autre, la tension de surface de chacune des monocouches peut être calculée ce qui permet de remonter à l'énergie d'adhésion du système. Ainsi il a été montré que cette adhésion est forte, avec une valeur de quelques dixièmes de  $kT$  par lipide appartenant à la DIB. Ceci suggère donc que ces bicouches présentent peu d'huile et que seuls les lipides restent à cette interface, validant un tel modèle pour l'étude des membranes en système modèle.

Cependant, cette méthode n'a pas été relayée par d'autres études par la suite, et n'apparaît à toujours pas actuellement parmi les méthodes usuelles de travail sur membranes modèles. Ainsi en 2006, indépendamment de ces premiers papiers, l'équipe de Takeuchi (Funakoshi et al. 2006) décide de développer une nouvelle technique de formation des bicouches, car les BLM ne sont pas stables au cours du temps et il est difficile d'y incorporer des protéines. Ils procèdent cette fois-ci, avec des lipides d'archéobactéries, 1,2-Diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DphPC) dissous dans du décane. Deux dispositifs sont présentés dans ce papier. Un premier très similaire à celui présenté en Figure III-1, consiste en une croix dont l'une des branches

contient le mélange d'huile-lipide et les branches perpendiculaires sont remplies de solutions aqueuses (Figure III-2).

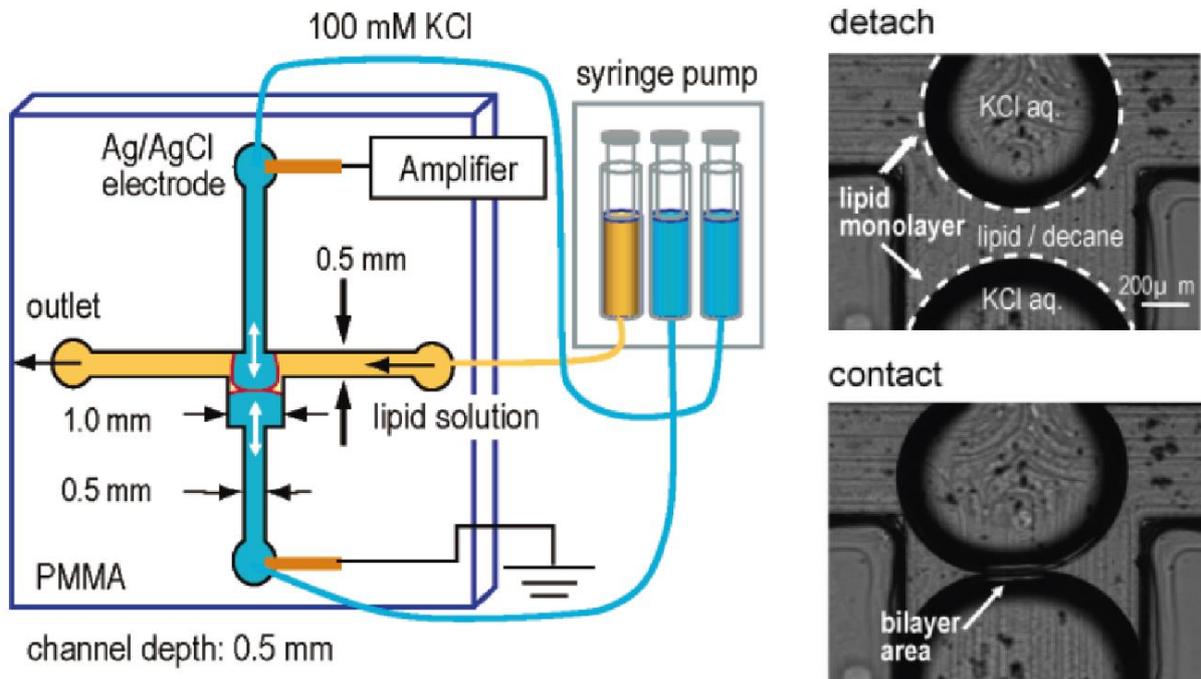


Figure III-2 : À gauche, le schéma du montage permettant la formation d'une bicouche. Le dispositif est moulé en PMMA. Les solutions aqueuses sont représentées en bleu et le mélange huile-lipide en jaune. Les monocouches apparaissent à l'interface de ces deux solutions et sont représentées en rouge. Les photos à droite montrent l'allure des gouttelettes avant ou après contact. Le contact est permis en jouant sur la pression exercée sur chacune des branches à l'aide de seringues. Les illustrations sont tirées de l'article (Funakoshi et al. 2006).

Le second montage, en microfluidique aussi, est une chambre dans laquelle deux compartiments en forme de gouttelette sont moulés (PolyMéthAcrylate de Méthyle : PMMA) et communiquent par un petit espace, où se formera la bicouche. Ainsi la chambre est d'abord remplie du mélange DphPC/décane, puis les gouttelettes sont formées indépendamment de chaque côté (Figure III-3). Une électrode peut ainsi être placée dans chacune des deux gouttelettes, et la chambre peut être placée sur un microscope pour observation.

La présence d'une bicouche, d'épaisseur physiologique, entre les gouttelettes a été assurée par l'ajout de gramicidine  $\alpha$  ( $G\alpha$ ), un canal qui ne s'insère que dans un seul feuillet. L'insertion de  $G\alpha$  dans chacun des feuillets permet la formation de canaux transmembranaires dans les DIB, vérifiée électriquement. De plus, les mesures électriques indiquent une capacitance surfacique comprise entre 0,5 et 0,8  $\mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$  (pour rappel, une bicouche a une capacitance comprise entre 0,3 et 1  $\mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$  (Babakov et al. 1966)).

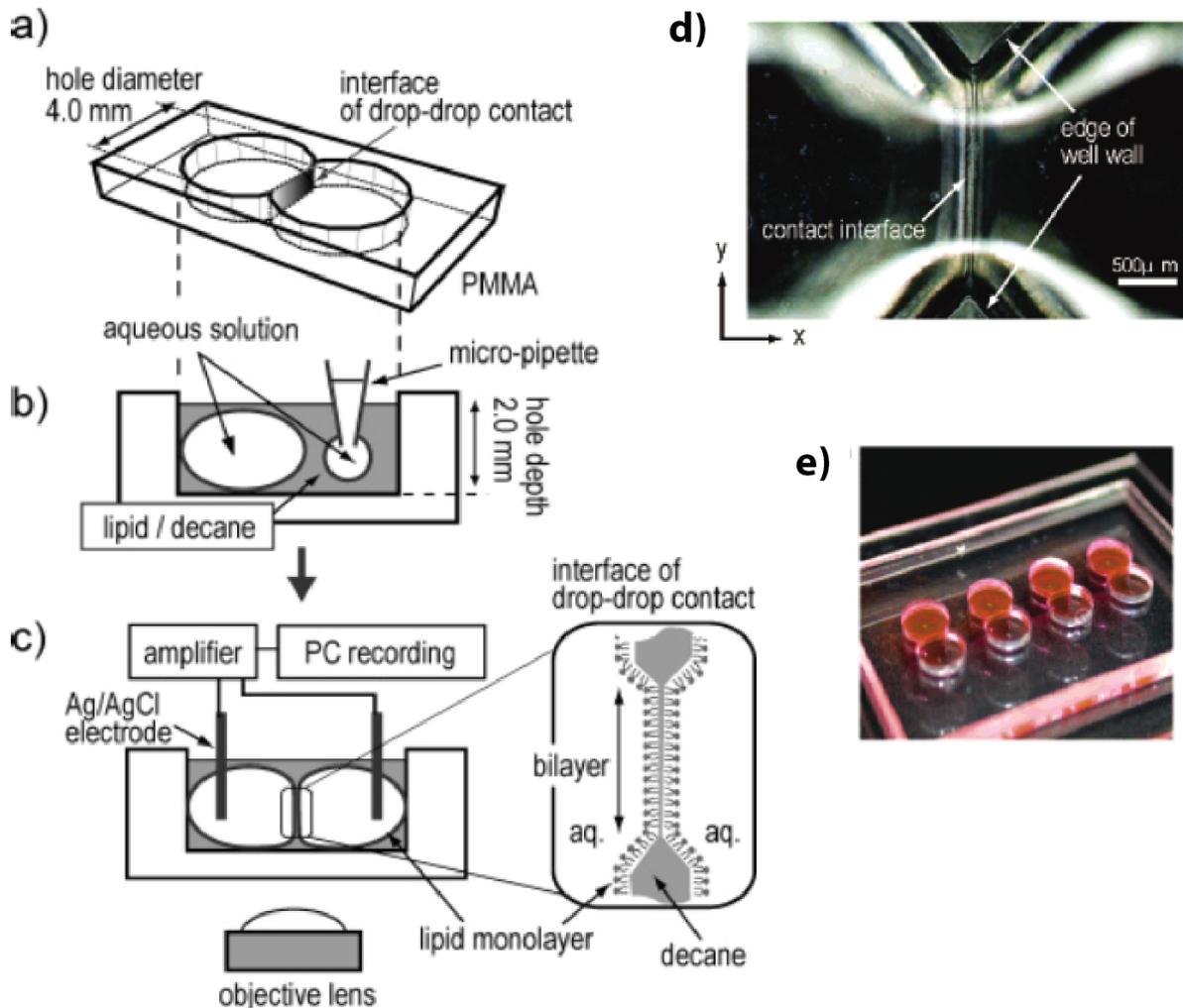


Figure III-3 : a) Schéma de la chambre de microfluidique servant à la formation des gouttelettes. b) Les gouttelettes sont formées l'une après l'autre en faisant des gouttelettes de solution aqueuse dans l'huile. Une fois que la deuxième gouttelette atteint la taille de sa chambre, elle entre en contact avec la première, formant ainsi la bicouche. c) Schéma de l'expérience permettant une acquisition optique et électrique en simultanée, et représentation schématique de la bicouche. d) Image en lumière blanche de la bicouche (interface) et des gouttelettes que l'on peut voir de part et d'autre de celle-ci. e) l'une des deux gouttelettes est remplie à l'aide d'un colorant afin de montrer qu'il n'y a pas de communication entre les deux gouttelettes. Toutes ces illustrations sont extraites de l'article d'origine (Funakoshi et al. 2006).

Afin de vérifier la stabilité de ce système, l'approche en gouttelette a été réutilisée, l'année suivante, par l'équipe de Bayley (Holden et al. 2007) (Hwang et al. 2007) (Bayley et al. 2008). Leur méthode consiste à former les gouttelettes directement sur les électrodes, puis à les plonger dans le mélange d'huile. Les électrodes sont ensuite micro manipulées pour amener les gouttelettes en contact et ainsi former la DIB. Les gouttelettes ainsi formées sont stables sur plusieurs jours, l'huile permettant de prévenir l'évaporation. Les mesures électriques donnent une capacitance surfacique de  $\sim 0,65 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Cet ordre de grandeur reste similaire à ce qui a été mesuré pour des membranes ( $0,3\text{-}1 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$  dans les papiers précédents). De plus l'épaisseur de la membrane a été vérifiée à l'aide d'une toxine transmembranaire, l' $\alpha$ -hémolysine ( $\alpha\text{HL}$ ), dont l'ajout en solution perméabilise la DIB (Figure III-4). La présence d'un inhibiteur dans les

gouttelettes, la  $\gamma$ -cyclodextrine ( $\gamma$ CD), permet d'enregistrer un signal électrique en créneau prouvant que seul l' $\alpha$ HL est responsable du signal électrique.

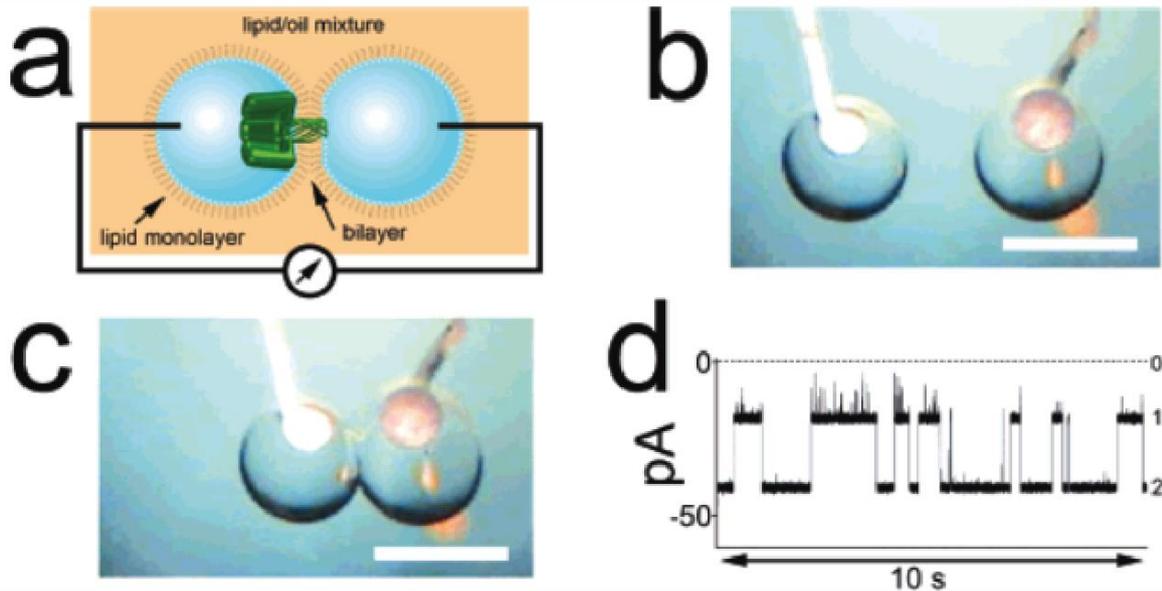


Figure III-4 : a) Schéma montrant l'insertion de l' $\alpha$ HL dans la DIB ainsi que les monocouches entourant chacune des gouttelettes et les électrodes servant aux acquisitions. b-c) Observation en lumière blanche des gouttelettes suspendues à leurs électrodes respectives, avant et après formation de la DIB. d) Enregistrement électrique obtenu une fois que les gouttelettes sont mises en contact. On observe clairement un signal créneaux oscillant entre l'état 1, où le pore est bloqué par la  $\gamma$ CD et l'état 2 où celui-ci est ouvert. La ligne en pointillé indique le courant lorsqu'aucun potentiel n'est appliqué entre les gouttelettes.

La même année, l'équipe de Wallace a mis au point une méthode d'analyse de gel reposant sur le même principe que les DIB (Heron et al. 2007). Une première monocouche était déposée sur un gel de SDS-PAGE, ce dernier recouvert du mélange huile-lipides et une gouttelette est formée dans ce mélange. Après le temps nécessaire à la formation de la monocouche autour de la gouttelette et sur le gel, la gouttelette est amenée au contact du gel, ce qui résulte en la formation d'une bicouche entre le gel et la gouttelette (*Droplet on Hydrated support Bilayer* : DHB). Une électrode est placée dans le gel et la seconde dans la gouttelette afin de pouvoir mesurer les propriétés électriques de cette bicouche (Figure III-5). L' $\alpha$ HL est capable de s'insérer dans cette bicouche, suggérant que son épaisseur est proche de l'épaisseur d'une membrane biologique. Ce modèle permet l'observation d'une bicouche plane, et ainsi la possibilité d'utiliser la microscopie à onde évanescente pour des approches en molécules uniques. De plus, la réversibilité du processus de fabrication des DIB, permise par la possibilité d'écartier l'électrode du gel permet de séparer la gouttelette afin de la réutiliser en formant une nouvelle DIB avec un nouveau gel. Cela peut être utilisé pour scanner de nombreux gels différents avec une même gouttelette en s'appuyant sur des mesures électriques ou sur la fluorescence pour la détection des composants d'intérêts. Il devient ainsi possible de réaliser le

criblage d'inhibiteurs de canaux assez rapidement en s'appuyant sur la mesure électrique (Bayley et al. 2008).

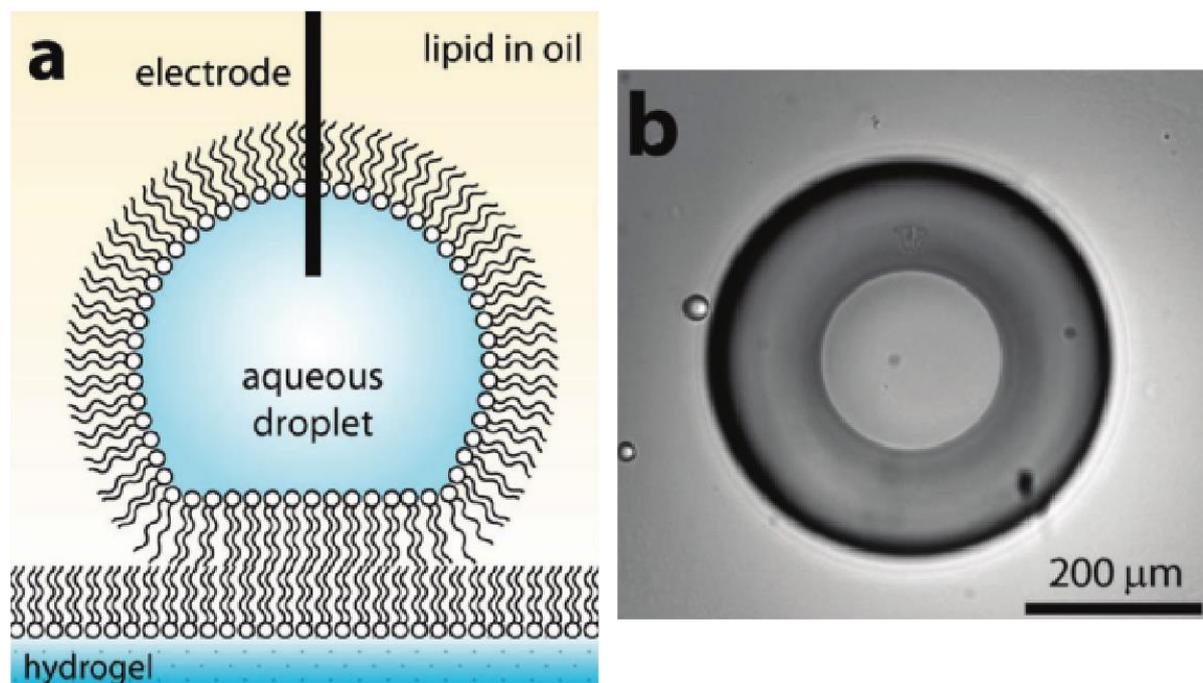


Figure III-5 : a) Schéma conceptuel de la formation d'une DHB. L'hydrogel se recouvre d'une monocouche de lipides, tout comme la gouttelette. Et par micromanipulation de l'électrode, les deux sont mis en contact afin de former la membrane. b) Vu de dessous de la bicouche ainsi formée. On distingue deux contrastes dans la gouttelette, dépourvue de son électrode afin de faciliter l'observation. La partie la plus centrale de la gouttelette, et claire, correspond à la zone où se forme la membrane, ce qui permet de mesurer précisément la zone de contact afin de calculer la capacitance surfacique. Les illustrations sont extraites de la publication d'origine (Heron et al. 2007).

Bien que ces techniques permettent la réalisation simple d'une bicouche permettant l'insertion de protéines et compatible avec les mesures électriques, elles présentent une membrane parfaitement symétrique ce qui n'est pas le cas biologiquement. La même équipe a entrepris de développer une nouvelle méthode de formation des monocouches pour permettre de créer des DIB asymétriques. Plutôt que de dissoudre les lipides dans l'huile ils sont désormais présents dans la goutte accrochée à l'électrode, sous forme de SUV de composition contrôlée (Hwang et al. 2008). Les vésicules rencontrant l'interface gouttelette-huile éclatent permettant aux lipides de former une monocouche à cette interface (Figure III-6). Il est ainsi possible d'utiliser des SUV différentes dans chacune des gouttelettes, la DIB ainsi créée présente alors une asymétrie de ses feuilletts.

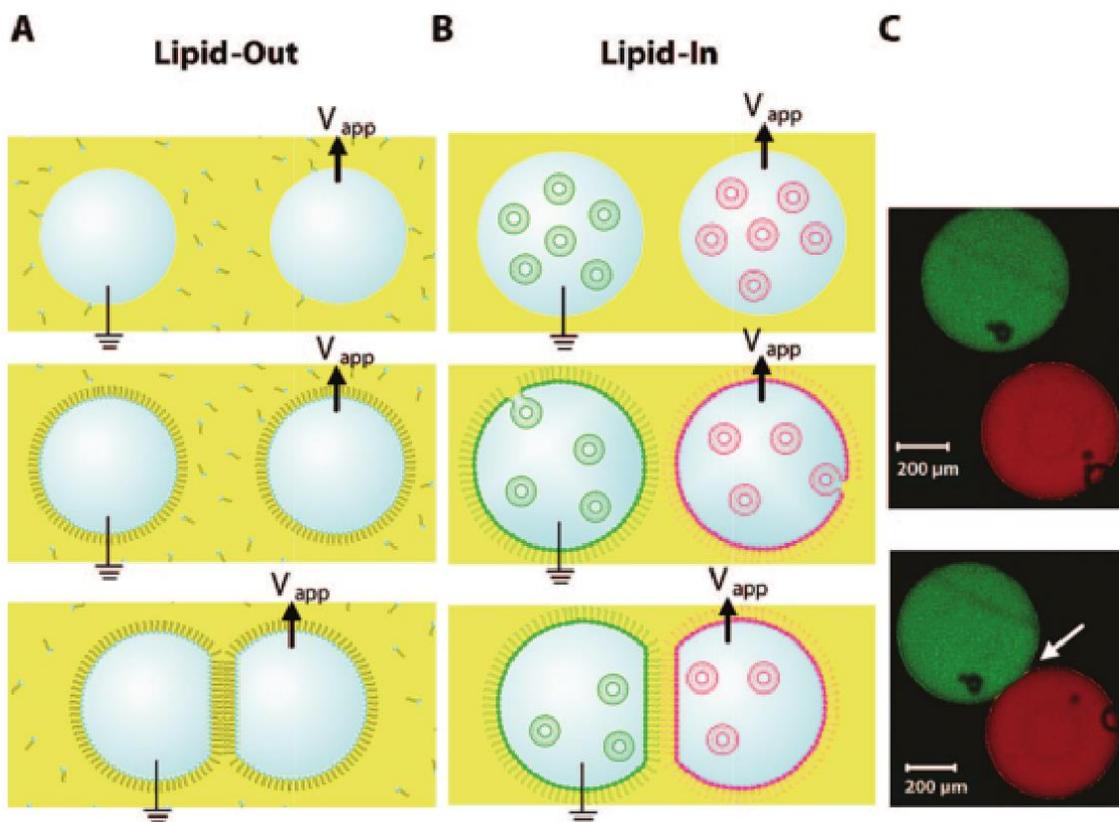


Figure III-6 : A) Schéma de principe de la formation d'une DIB avec les lipides en solution dans l'huile, chacune des gouttelettes est formée sur son électrode et les électrodes sont ensuite rapprochées pour permettre le contact. B) Schéma de principe pour la nouvelle technique de formation de la DIB. Chaque gouttelette contient des SUV de composition lipidique souhaitée, et différente si désiré. Les vésicules entrant en contact avec l'interface gouttelette-huile éclatent permettant à la gouttelette de se recouvrir d'une monocouche de lipide. Les gouttelettes sont toujours sur une électrode, et elles sont amenées en contact pour générer la DIB. C) Image confocale des deux gouttelettes, chacune contenant une composition de SUV dont un des lipides est marqué par une sonde fluorescente. La flèche indique la membrane et l'on remarque que chaque gouttelette conserve sa couleur ce qui signifie qu'il n'y a pas d'échange de lipides entre les deux gouttelettes. La figure est directement extraite de l'article (Hwang et al. 2008).

La stabilité de l'asymétrie entre les deux gouttelettes a été vérifiée par l'utilisation de lipides fluorescents et montre que cette dernière est maintenue pendant plusieurs heures. L'asymétrie a aussi été confirmée à l'aide d'un canal dépendant de l'asymétrie de charge de la membrane, l'Outer Membrane Protein G (OmpG). Il a pu être montré que l'utilisation des DIB permet une insertion préférentielle de la protéine en laissant passer le courant pour une configuration asymétrique.

Enfin dans le domaine de l'étude des propriétés énergétiques des DIB l'équipe de Jérôme Bibette a mis au point une méthode de génération en microfluidique (Thiam et al. 2011) (Thiam et al. 2012). Il s'agit, comme pour les premières études énergétiques de mélanger deux solvants : une huile, le silicone, et un solvant volatil, le chloroforme, pour faciliter la dissolution des lipides dans l'huile. La concentration en lipide est diminuée (0,1% en masse) dans ce mélange, et les gouttelettes générées ont une dizaine de micromètres de diamètre, donc plus

petites que dans les études précédentes. Les gouttelettes sont générées dans un capillaire en verre par un système de "flow focusing", ce qui permet de générer de nombreuses paires à la fois et en raison de leur taille d'observer beaucoup de paires dans un même champ du microscope.

L'utilisation des DIB comme système modèle est donc tout à fait possible. En effet, il apparaît clairement que c'est une membrane possédant les mêmes propriétés qu'une bicouche biologique (capacitance, résistance). Les DIB présentent aussi l'avantage d'être réversibles, ce qui signifie que les gouttelettes peuvent être séparées afin de rompre la membrane à tout moment puis remises en contact pour la reformer. Ceci offre la possibilité de changer un des deux compartiments de part et d'autre de la DIB à tout moment. De plus, il est possible de créer une membrane asymétrique et de composition lipidique variée de cette façon ce qui est valorisable pour reproduire une membrane cellulaire et l'incorporation de quelques protéines transmembranaires, selon une orientation favorisée, a été démontrée. Enfin, il existe de nombreuses méthodes permettant de générer une DIB et elles sont pour la plupart compatibles avec des observations « de type électrophysiologie » et optiques.

### **3. Les applications des DIB**

Comme montré précédemment les DIB sont tout à fait à propos comme modèle membranaire. Bien qu'il ne s'agisse pas encore à l'heure actuelle d'un modèle routinier dans les laboratoires, elles ont pu être utilisées pour résoudre certaines questions biologiques où les autres systèmes n'offraient pas de réponse. La première étude pour laquelle on retrouve l'utilisation de DIB porte sur la toxine de l'anthrax. Certaines toxines sont composées de deux fragments, un premier qui forme un pore dans la membrane, tandis que le second possède une activité catalytique délétère pour les cellules. Ainsi la formation d'un pore par le premier fragment entraîne la translocation du second fragment lorsque le gradient électrique le permet. Les DIB permettent la formation d'une bicouche entre deux compartiments de composition contrôlée, présence ou non de protéines. De plus, il est possible de créer un gradient électrique par cette technique permettant de reproduire le gradient énergétique nécessaire pour promouvoir la translocation de l'unité catalytique de la toxine. Ainsi les DIB ont permis l'étude du passage de l'enzyme "Lethal Factor" au travers des pores induits par l'anthrax (Fischer et al. 2011), montrant que ce système est au moins aussi fiable que les BLM, mais plus simple à mettre en œuvre. De plus, l'évaluation de la translocation d'une enzyme au travers de pores créés par une toxine nécessite de pouvoir dénombrer la quantité de molécules ainsi passées. La réversibilité

de la formation des DIB est mise à profit. La même toxine, en quantité très faible, peut ainsi être utilisée dans une nouvelle DIB pour dénombrer molécule par molécule l'enzyme d'intérêt en prêtant attention à l'allure du courant par rapport à des gouttelettes où le nombre d'enzymes est contrôlé.

Cette exploitation de la réversibilité a aussi été utilisée dans l'étude des CPP (Huang et al. 2011), domaine qui nous intéresse tout particulièrement. L'une des gouttelettes contient Pep1, un CPP capable de se lier de façon non covalente à une enzyme, la peroxydase de raifort (HRP). La HRP sert ainsi de cargaison, mais aussi de rapporteur sur le passage du CPP. En effet, il existe un substrat de l'enzyme "Amplex Red" qui devient fluorescent lorsqu'il est dégradé par la HRP, permettant ainsi de quantifier la translocation de HRP. Ainsi l'expérience exploite la réversibilité du processus de fabrication des DIB. Une première gouttelette contenant les complexes Pep1-HRP (100% DPhPC) est utilisée pour former une DIB asymétrique avec une gouttelette réceptrice (DPhPC:DPhPG 9:1), entre lesquelles un potentiel électrique est appliqué pour promouvoir la translocation de Pep1. Puis les deux gouttelettes sont séparées après 45 min, et la gouttelette réceptrice du complexe est fusionnée avec une gouttelette contenant de l'"Amplex Red". La quantification de la translocation est déduite de la fluorescence émise par la gouttelette au moment de la fusion. Il a ainsi été montré qu'une différence de potentiel transmembranaire de -50 mV est nécessaire à la translocation de Pep1 avec sa cargaison.

Enfin, la dernière utilisation des DIB correspond plutôt à l'utilisation de DHB. Cette technique permet de former une bicouche parallèle au support et donc permettant l'éclairement par onde évanescente, comme les bicouches supportées. Il devient ainsi possible de réaliser des observations en microscopie à fluorescence à l'échelle de la molécule unique (Rojko et al. 2014).

#### **4. Un outil de choix pour les CPP**

Jusqu'à présent, la translocation des CPP a été majoritairement observée, sur système modèle, par passage de fluorescence dans des vésicules, comme décrit dans l'introduction de ce manuscrit (I.F.3). Bien qu'une étude utilisant les DIB ait déjà été réalisée, celle-ci s'intéresse à un CPP particulier, Pep1, et à sa cargaison liée de façon non covalente. De plus, l'influence sur la composition lipidique n'a pas été explorée dans cette étude.

Afin d'étudier la translocation de la pénétratine, nous utilisons une sonde fluorescente. Les avantages que nous offrent les expériences en DIB sont nombreux.

- Les expériences sont faites sur des gouttelettes dont la taille est comprise entre 10 et 100  $\mu\text{m}$  de rayon, soient des volumes par préparation de l'ordre de quelques microlitres au plus pour une expérience contenant quelques milliers de paires. Ceci permet de limiter la consommation en peptide.
- La membrane ainsi créée est perpendiculaire au champ d'observation du microscope permettant aisément de distinguer les deux compartiments et ainsi le passage de la fluorescence de l'un à l'autre. Ceci est moins aisé avec des vésicules par exemple sauf en utilisant la microscopie confocale.
- Les DIB sont stables sur plusieurs jours, et les expériences d'internalisation nécessitent au minimum des dizaines de minutes d'observations ce qui n'est pas toujours assuré pas les BLM.
- Les compositions lipidiques peuvent être ajustées. Certes la grande partie des méthodes jusqu'ici présentées n'utilisent que des lipides d'archées, DphPC, mais les approches en microfluidiques réalisées par l'équipe de Bibette ont pu incorporer des lipides eucaryotes. C'est ce que nous avons aussi fait.
- Il est possible d'induire des différences de potentiel transmembranaire et de mesurer l'intégrité de la membrane. Ce qui peut conférer une force motrice au passage des CPP tout en vérifiant la présence d'un phénomène de poration ce qui nous donnerait une indication sur le mécanisme de traversée des CPP.

Nous souhaitons adapter cette technique à l'étude de la pénétratine en utilisant des mélanges lipidiques complexes et proches de la composition lipidique d'une cellule eucaryote afin de mieux comprendre l'importance que peuvent jouer les différents lipides dans le phénomène de translocation.

## B. Matériel & méthode

Nous souhaitons donc mettre au point une expérience où nous pourrions obtenir des résultats avec une valeur statistique pour seulement quelques microlitres de CPP à concentration physiologique (5  $\mu\text{M}$ ). Ainsi nous avons eu l'idée d'utiliser les DIB générées par la méthode d'émulsions adhésives (Thiam et al. 2011). Nous faisons une émulsion de tampon dans une solution d'huile contenant des lipides. Les gouttelettes de l'émulsion sont recouvertes d'une monocouche de lipide, et lorsque deux gouttelettes entrent en contact une bicouche, DIB, se forme à leur interface. Nous générons deux populations de gouttelettes, l'une contenant des CPP fluorescents et l'autre seulement du tampon que nous mélangeons et nous suivons l'éventuel transfert de fluorescence d'une goutte à l'autre dans une paire mixte (Figure III-7).

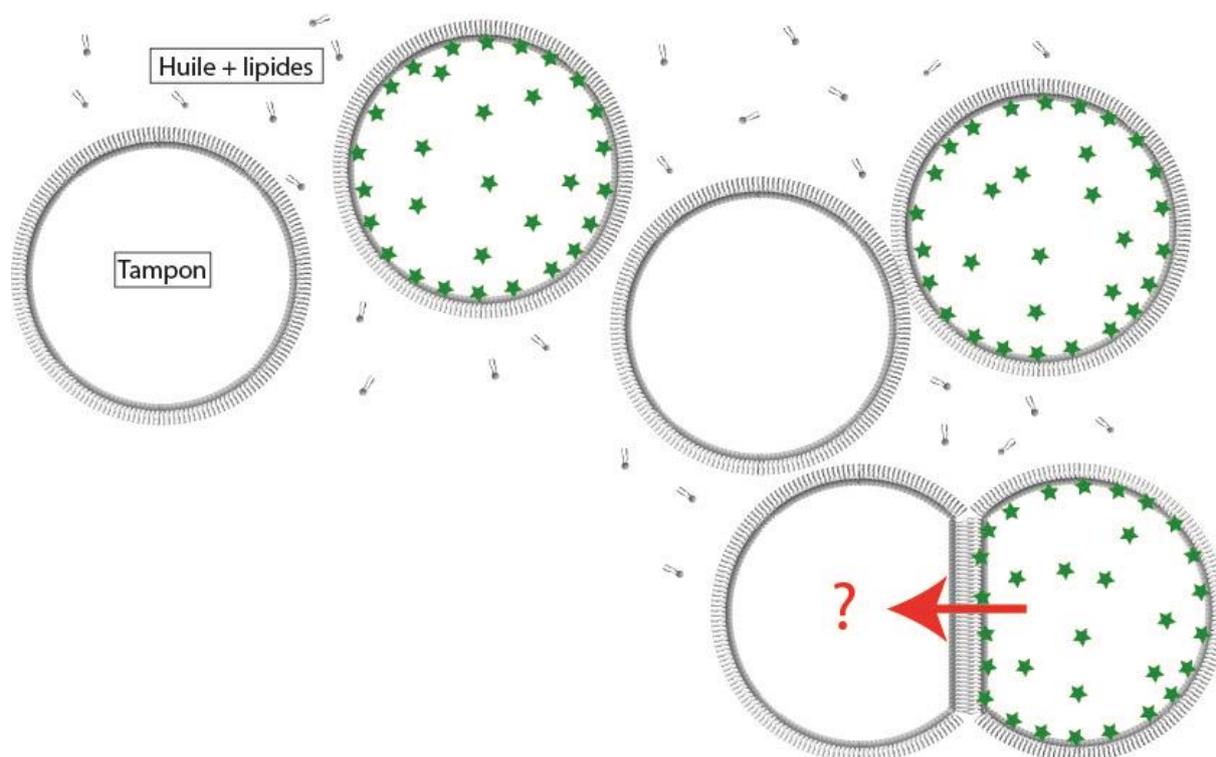


Figure III-7 : Schéma de principe de l'expérience en émulsions adhésives. Les CPP fluorescents sont représentés par des étoiles vertes.

### 1. Préparation du mélange huile-lipide

Le mélange d'huile-lipide utilisé pour l'émulsion est constitué de 0,02% à 0,1% en masse de lipides dans l'huile, et la majorité des expériences sont réalisées à 0,08% pour des raisons de stabilité des gouttelettes. Les huiles utilisées ont été de nature diverse : Triglycérides, huile

siliconée, mais nous travaillons essentiellement avec du Squalène (un terpène  $C_{30}H_{50}$ , Sigma-Aldrich, Ref : 234311). De plus afin de faciliter la solubilisation des lipides dans l'huile, le mélange est supplémenté avec 15% en masse de chloroforme. Ce dernier s'évapore rapidement, en quelques minutes, et n'est donc pas présent pendant les acquisitions.

## **2. Réalisation des émulsions**

L'émulsion est réalisée en ajoutant 10% en volume de solution aqueuse dans le mélange huile-lipide décrit ci-dessus, en prenant garde à ne pas ajouter d'air. La préparation est en général faite sur un volume total de 20  $\mu\text{L}$  dans un tube Eppendorf™. Le tube est ensuite agité à l'aide d'un agitateur pendant une à deux secondes. On vérifie à l'œil que le volume aqueux s'est bien fragmenté en objets non perceptibles visuellement, mais qui troublent le mélange huile-lipide. Le tout est ensuite prélevé pour observation. Si certaines gouttelettes restent trop grandes dans l'émulsion, on les fragmente en faisant des allers-retours à l'aide d'une pipette plutôt que d'utiliser le vortex. Cela permet d'éviter d'avoir des objets trop petits. En effet, les gouttelettes sur lesquelles nous souhaitons travailler doivent avoir un rayon d'une dizaine de micromètres, ce qui nous permet de les observer optiquement.

## **3. Préparation des lames d'observation**

Afin de stabiliser l'émulsion, il faut que les gouttelettes n'aient pas d'affinité pour le support sur lequel le mélange est déposé. En effet, si le support d'observation est hydrophile les gouttelettes fusionnent et forment un film d'eau sur la surface d'observation. De plus, il nous faut un support transparent dans le visible afin de permettre l'observation sur un microscope à épifluorescence. Ainsi nous avons décidé de travailler sur un support de verre, rendu hydrophobe par un film de PolyDiMethylSiloxane (PDMS). Les lames sont lavées à l'éthanol, puis une couche de PDMS non polymérisé est déposée dessus à l'aide d'un cône. Les lames sont ensuite maintenues à la verticale pendant au moins deux heures afin de permettre à la couche de PDMS de s'affiner par gravité. Ensuite, le PDMS est séché en à 40°C durant une nuit.

Les lames ainsi préparées peuvent être réutilisées aussi longtemps que les émulsions sont stables dessus pour observation, typiquement une vingtaine d'expériences.

#### **4. Réalisation de l'expérience**

Deux types d'émulsion sont générés en suivant le protocole ci-dessus. Un premier type est réalisé en utilisant notre solution de peptide, [Pénétratine] = 5  $\mu\text{M}$  (ou [FP488] = 1  $\mu\text{M}$ ) sauf si une autre concentration est précisée dans la suite. Cette première préparation est ensuite déposée sur la lame. La stabilité de l'émulsion est vérifiée pendant une minute en s'assurant que les gouttelettes ne coalescent pas lorsqu'elles entrent en contact. Le deuxième type d'émulsion ne contient que du tampon en absence de peptide. Cette préparation est déposée au-dessus de la première, et par sédimentation des paires de gouttelettes provenant de chacune des deux préparations se forment.

Les gouttelettes contenant la pénétratine sont fluorescentes, car notre peptide est marqué au FluoProbe™ 488 (FP488- Interchim®).

#### **5. Nettoyage des lames**

Après chaque expérience, les lames sont nettoyées à l'aide d'une solution à 10% en Decon®, puis rincées abondamment à l'eau et enfin à l'éthanol. Elles sont ensuite séchées à l'air comprimé. Ce lavage n'endommage pas les lames ce qui permet de les réutiliser.

#### **6. Tampon pour stabiliser les émulsions**

Les émulsions sont réalisées à l'aide d'un tampon phosphate salé : 150 mM NaCl, 40 mM phosphate, pH = 7,4. Afin de stabiliser les émulsions, on ajoute aussi 10 mM  $\text{MgCl}_2$ . Les peptides fluorescents sont dilués dans ce même tampon ce qui assure l'équilibre osmotique de part et d'autre de notre membrane.

#### **7. Montage en épifluorescence**

Les observations ont été réalisées sur un microscope inversé Olympus IX71 à l'aide d'un objectif x20 LUCPLN. Le jeu de filtre utilisé a pour référence XF18-2 (Melles Griot®). Il consiste en un filtre passe bande, en excitation, 455DF70 (455nm +/- 35nm), un miroir dichroïque 515DRLP et un filtre passe haut, en émission, 515ALP. Les acquisitions sont réalisées à l'aide d'une caméra MicroMax (Princeton instrument®).

## 8. Synthèse de la Pénétratine-FP488

La Pénétratine-FP488 a été synthétisée par stratégie BOC sur support solide, au sein du laboratoire, par Mehdi Amoura. Le produit a ensuite été caractérisé en masse, et nous travaillons avec un produit pur. Cependant, des mesures d'absorption par NanoDrop™ 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc.) indiquent que seulement 20% du produit présente les propriétés de fluorescence de FP488.

Toutes nos expériences sont ainsi réalisées à l'aide d'un mélange de peptides fluorescents et non fluorescents.

## 9. Mise au point de mesures électriques

Les mesures électriques sont réalisées à l'aide d'un analyseur digidata1440a et d'un amplificateur axopatch200b (Molecular Devices®). Afin de limiter le bruit électrique, le microscope ainsi que les micromanipulateurs sont placés dans une cage de Faraday composée de plaques en acier de 3 mm d'épaisseur, excepté le côté qui fait face à l'expérimentateur. Cette face peut être isolée du bruit électrique à l'aide d'un grillage. Les électrodes de mesure et de référence sont placées dans les porte-pipettes et connectées à la base de celles-ci par continuité de flux d'eau (Figure III-8).

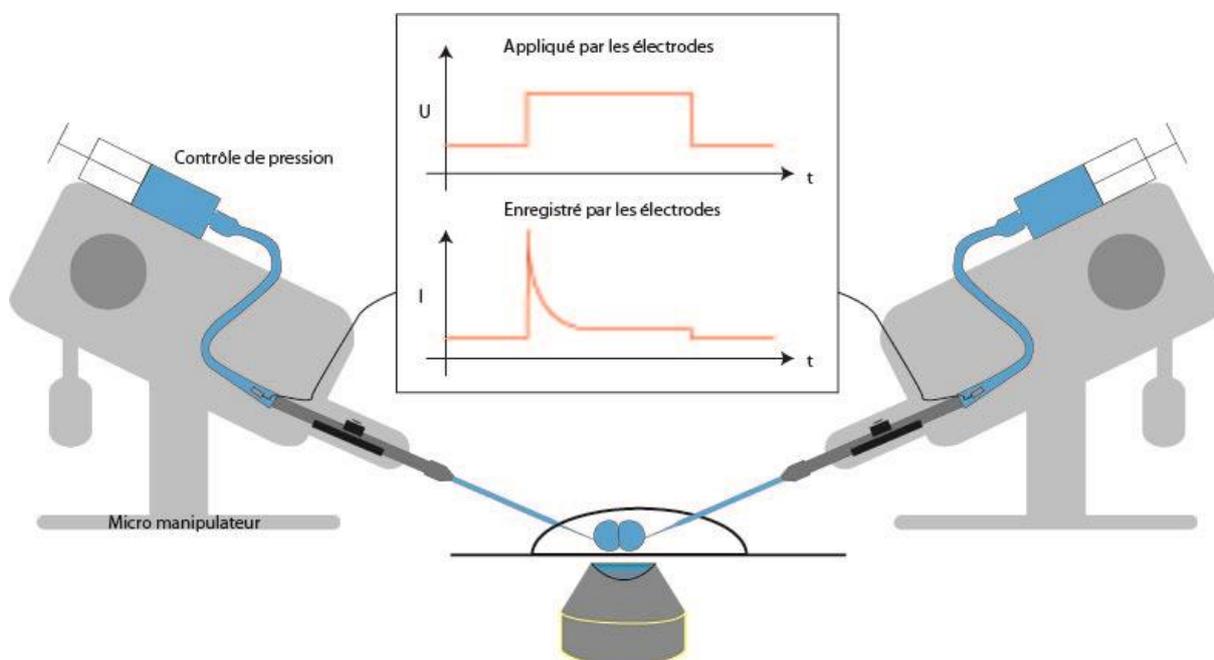


Figure III-8 : Schéma du montage utilisé pour les acquisitions électriques. Chaque électrode est connectée en amont du porte-pipette. Et les gouttelettes sont générées à l'aide des contrôleurs de pression. Une fois les gouttelettes formées, elles sont mises en contact et les acquisitions électrique et microscopique sont déclenchées.

Sur une lame de PDMS, après avoir déposé une vingtaine de microlitres de notre mélange huile-lipides, nous amenons les deux pipettes micromanipulées dans l'huile et en vis-à-vis. Les réservoirs sont ensuite placés en surpression afin de permettre aux pipettes de souffler du milieu aqueux dans le mélange huile-lipides. Une fois que les gouttelettes atteignent la dizaine de micromètres de diamètre, les réservoirs sont replacés au « zéro » de pression afin de stabiliser les gouttelettes. Les gouttelettes sont ensuite micromanipulées afin d'être mises en contact et l'acquisition électrique est déclenchée. À intervalles réguliers pendant l'acquisition des photos de la zone de contact sont prises afin d'estimer la surface de contact entre les deux gouttelettes et de suivre son évolution au cours de l'expérience.

Les acquisitions sont réalisées à l'aide du logiciel clampex<sup>®</sup>, et les analyses sont faites à l'aide de scripts matlab<sup>®</sup> présentés en annexe.

## **C. Travail préliminaire : caractérisation des émulsions**

### **1. Caractérisation du système**

Nous avons voulu déterminer si les bicouches formées en squalène sont exemptes d'huile. Nous avons ainsi mis au point un système de mesure électrique sur ces émulsions. Le but est de vérifier que notre interface entre les deux gouttelettes n'est pas épaissie par un film d'huile. La couche isolante entre les gouttelettes doit être de quelques nanomètres si elle n'est constituée que d'une bicouche lipidique.

La bicouche est considérée comme un condensateur électrique plan, la réponse en intensité du système après application d'une tension nous permet de déduire la capacité  $C$  de la bicouche (Figure III-9). L'épaisseur de la bicouche est déduite de cette mesure :  $C = \frac{\epsilon * S}{e}$  où  $\epsilon$  représente la permittivité électrique et  $S$  la surface du condensateur. Nous avons considéré la permittivité relative d'une bicouche modèle de POPC,  $\epsilon_r = 2,8$  (Valincius et al. 2008) et nous avons supposé que la surface de contact entre les gouttelettes forme un disque, dont nous mesurons l'évolution du diamètre au cours de l'expérience.

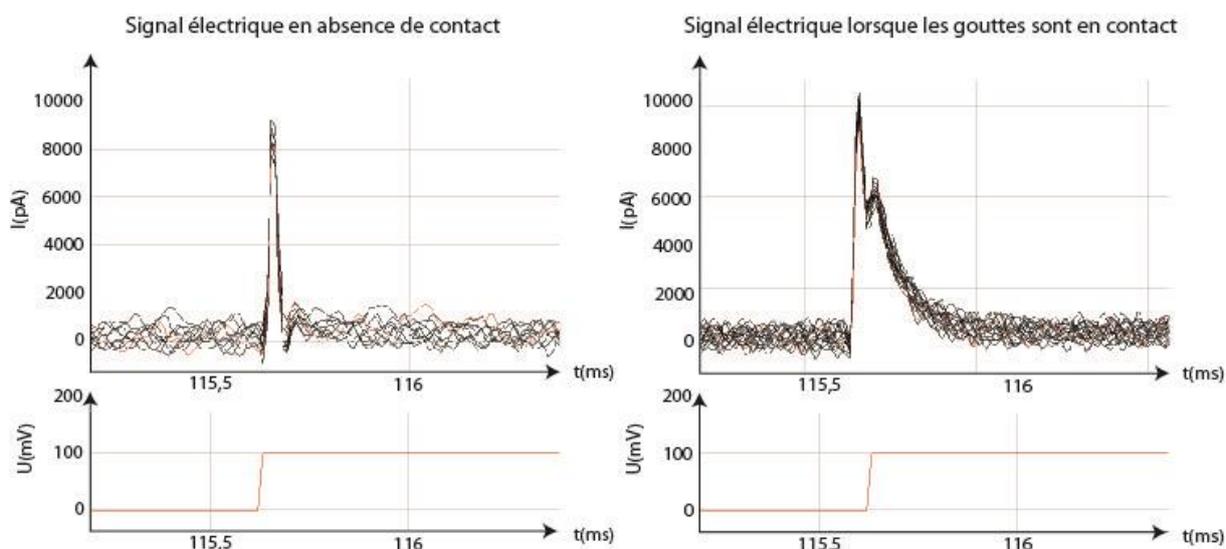


Figure III-9 : Signaux électriques enregistrés en absence de contact (à gauche) et après contact entre les gouttelettes (à droite). Les signaux présentent clairement un bruit électrique de l'ordre de 1000pA, cela ne nous empêche pas d'observer la décroissance exponentielle liée à la présence d'un condensateur (la membrane), lorsque les gouttelettes sont en contact.

Nous avons donc pu estimer la capacitance de plusieurs paires dans un mélange squalène – POPC. Pour des surfaces de contact de petite taille, ces mesures coïncident avec l'épaisseur attendue pour une bicouche en absence d'huile (Figure III-10). Cependant, plus les gouttelettes sont grandes au moment de la formation de la DIB et plus l'épaisseur mesurée pour la bicouche est élevée, dépassant la centaine d'angströms pour des surfaces de contact ayant un diamètre de l'ordre de la centaine de micromètres. Sur ces gouttelettes de grande taille, l'interface est donc sûrement polluée par un film de squalène. Celui-ci pourrait s'expliquer par un drainage plus lent du squalène sur ces gouttelettes de plus grandes tailles.

Nous avons choisi de travailler sur des gouttelettes de quelques dizaines de micromètres de diamètre afin de permettre un drainage rapide de l'huile en dehors de la bicouche. Les expériences sont réalisées quelques minutes après la formation de l'émulsion afin de s'assurer de ce drainage.

Pour comprendre la sensibilité de cette méthode à détecter l'huile dans notre interface, nous pouvons estimer l'erreur sur la mesure de l'épaisseur de la couche isolante de l'interface. La principale source d'incertitude est liée à la mesure de la surface de contact, pour deux raisons, que nous estimons à  $\sim 20\%$ . La première, nous ne pouvons pas synchroniser l'image et l'acquisition électrique, nous supposons donc que l'interface grandit linéairement au cours des mesures électriques faites entre deux images. La seconde, nous n'observons qu'une coupe de l'interface par un plan, il se peut donc que l'approximation d'une interface en disque soit erronée. La valeur de la permittivité relative ( $\epsilon_r$ ) de la couche isolante constituée des chaînes des lipides éventuellement pollués de squalène n'est pas non plus parfaitement documentée et

peut varier de 10% selon la littérature, comme mentionné plus haut. Ainsi l'incertitude relative sur l'épaisseur de la membrane est de l'ordre de 30%. La méthode paraît donc suffisamment sensible pour détecter un épaissement d'une dizaine d'angströms entre les deux monocouches de lipides, dû à la présence de squalène par exemple. Elle ne permet, en revanche, pas d'exclure la présence de molécules de squalène interdigitées dans les chaînes lipidiques (sans augmentation d'épaisseur).

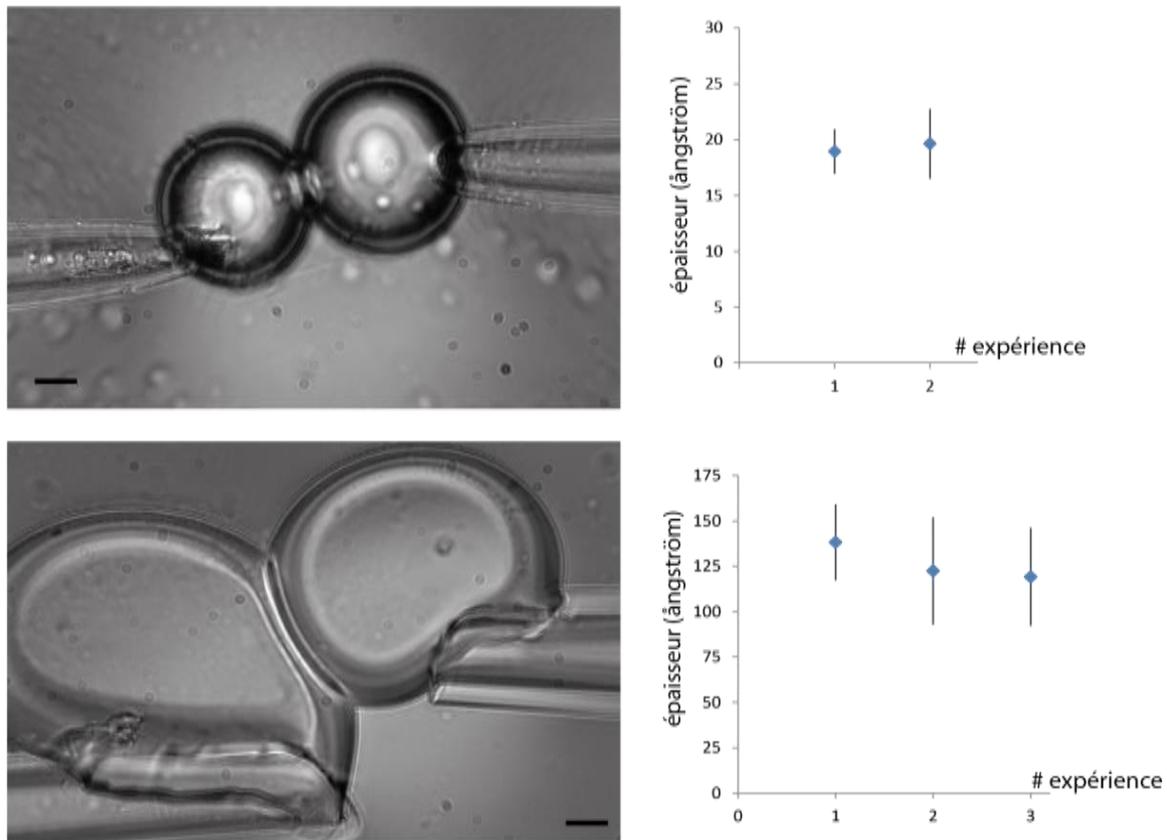


Figure III-10 : À gauche les acquisitions optiques réalisées pendant les mesures électriques afin de déterminer la surface de contact. Chaque pipette souffle une gouttelette de tampon dans le mélange squalène-lipides. Une fois les gouttelettes stabilisées, les deux pipettes sont rapprochées pour mettre les gouttelettes en contact, et des photos sont prises à intervalles réguliers pour estimer la surface de contact. À droite, les épaisseurs mesurées par la méthode d'ajustement du temps caractéristique, sur des paires dont l'allure est similaire au cliché de gauche. La barre d'échelle correspond à 20μm

## 2. Stabilisation des gouttelettes

Dans un premier temps, nous avons cherché l'huile dans laquelle l'interface entre gouttelettes est la plus stable possible, c'est à dire l'huile permettant la formation de paires ne fusionnant pas sur des durées de l'ordre de celles attendues pour la translocation des CPP (quelques dizaines de minutes). Ainsi nous avons commencé par travailler avec des triglycérides, cette huile permettant *a priori* de limiter la coalescence des émulsions (communication personnelle de

Abdou Rachid Thiam). Cependant, il s'agit d'une huile de composition mal définie qui peut donc contenir de nombreux éléments pouvant s'intercaler dans nos membranes et ainsi perturber notre modèle. Nous nous sommes finalement tournés vers des composés de composition connue.

Nous avons travaillé avec 3 huiles différentes dans un premier temps. Une huile de silicone, du décane (assimilé à une huile dans nos expériences car hydrophobe) et du squalène. Les deux premières huiles nécessitaient une concentration en chloroforme proche de 50% pour que les gouttelettes ne coalescent pas. Nous avons donc écarté ces deux candidats, car nous n'étions pas sûrs que le chloroforme s'évapore totalement. Nous avons poursuivi les expériences en nous limitant au squalène qui nous permet de réaliser les émulsions adhésives avec les concentrations explicitées dans le matériel et méthode.

Nous avons aussi tenté d'optimiser la concentration en lipide au sein de l'huile, car il est clair que nous travaillons en excès de lipide, 10 à 100 fois plus que nécessaire pour saturer l'interface de toutes les gouttelettes de milieux aqueux dans l'huile. Comme indiqué dans le matériel et méthode, nous réalisons nos expériences avec 2  $\mu\text{L}$  d'eau dans 20  $\mu\text{L}$  de squalène contenant 0,08%, en masse, de lipides en solution. Les gouttelettes que nous générons ont un diamètre de l'ordre de 50  $\mu\text{m}$ , ce qui nous fait environ  $4 \cdot 10^4$  gouttelettes par préparation, en supposant que leur taille est homogène. En considérant que la surface d'une tête polaire de lipide couvre 1  $\text{nm}^2$ , il faut donc  $3 \cdot 10^{14}$  lipides pour former une monocouche à la surface de chaque gouttelette. Or nous travaillons avec 14-17  $\mu\text{g}$  de lipides par préparation, soit  $\sim 30$  fois trop de lipides.

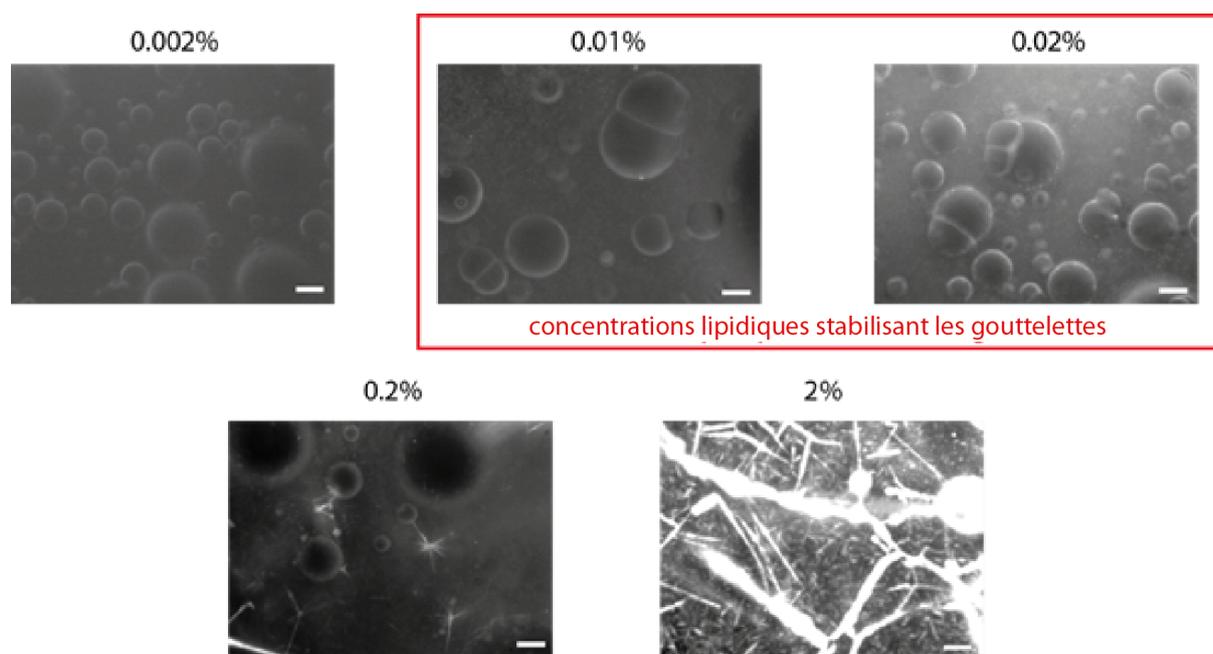


Figure III-11 : Observations en microscopie à fluorescence de gouttelettes réalisées à l'aide de lipides fluorescents. La concentration (w/w) en lipide est indiquée au-dessus de chaque cliché. La barre d'échelle correspond à 40  $\mu\text{m}$

Cependant, cet excès est nécessaire pour stabiliser les gouttelettes. En effet, les gouttelettes arrêtent de coalescer à des concentrations de 0,01% en masse (Figure III-11), soit 4 fois plus de lipides que nécessaire selon le modèle présenté ci-dessus. En fait, la meilleure stabilité a été trouvée pour des valeurs légèrement supérieures, c'est pourquoi nous travaillons à 0,08%. En revanche pour des concentrations en lipides trop importantes, des tubes contenant des lipides se forment entre les gouttelettes.

## **D. Résultats**

La formation de la bicouche présente à l'interface entre deux gouttelettes est désormais contrôlée, et nous avons pu la caractériser. Nous pouvons donc travailler sur des paires de gouttelettes de compositions différentes. Nous générons donc une première émulsion avec une phase aqueuse contenant des CPP fluorescents et une seconde émulsion contenant seulement du tampon (Figure III-7). Ensuite par sédimentation nous attendons la formation de paires « mixtes » et nous suivons l'évolution du système par microscopie à fluorescence.

### **1. Mise en évidence de la translocation à travers une bicouche anionique**

Notre première hypothèse était que la translocation serait favorisée par la présence de lipides anioniques. Ainsi, nous avons réalisé nos premières expériences de translocation en squalène saturé avec un seul lipide, la POPG, qui est chargée négativement.

Les gouttelettes contenant les CPP fluorescents formées dans ce mélange exhibent un signal de fluorescence intense à l'interface eau-huile où se trouve une monocouche de lipides ainsi qu'à l'interface éventuelle avec une gouttelette contenant ou non le CPP fluorescent où se trouve une bicouche lipidique. En observant des paires constituées d'une gouttelette contenant initialement le CPP fluorescent et d'une ne le contenant initialement pas, nous avons pu observer l'apparition de fluorescence dans la gouttelette ne contenant initialement pas de peptide. Cette augmentation de fluorescence se fait de façon uniforme dans toute la gouttelette avec un signal plus intense sur la monocouche lipidique en bord de gouttelette. Seules les gouttelettes non fluorescentes présentant une interface avec une gouttelette fluorescente exhibent cette augmentation de fluorescence. La fluorescence des gouttelettes isolées n'évolue pas. De plus, des observations en microscopie confocale nous ont permis de confirmer que le volume des gouttelettes est fluorescent aussi (Figure III-12).

Il semble donc que la pénétratine présente une affinité pour les monocouches chargées négativement, tout en restant présente en volume. De plus, elle est capable de traverser les DIB constituées de POPG.

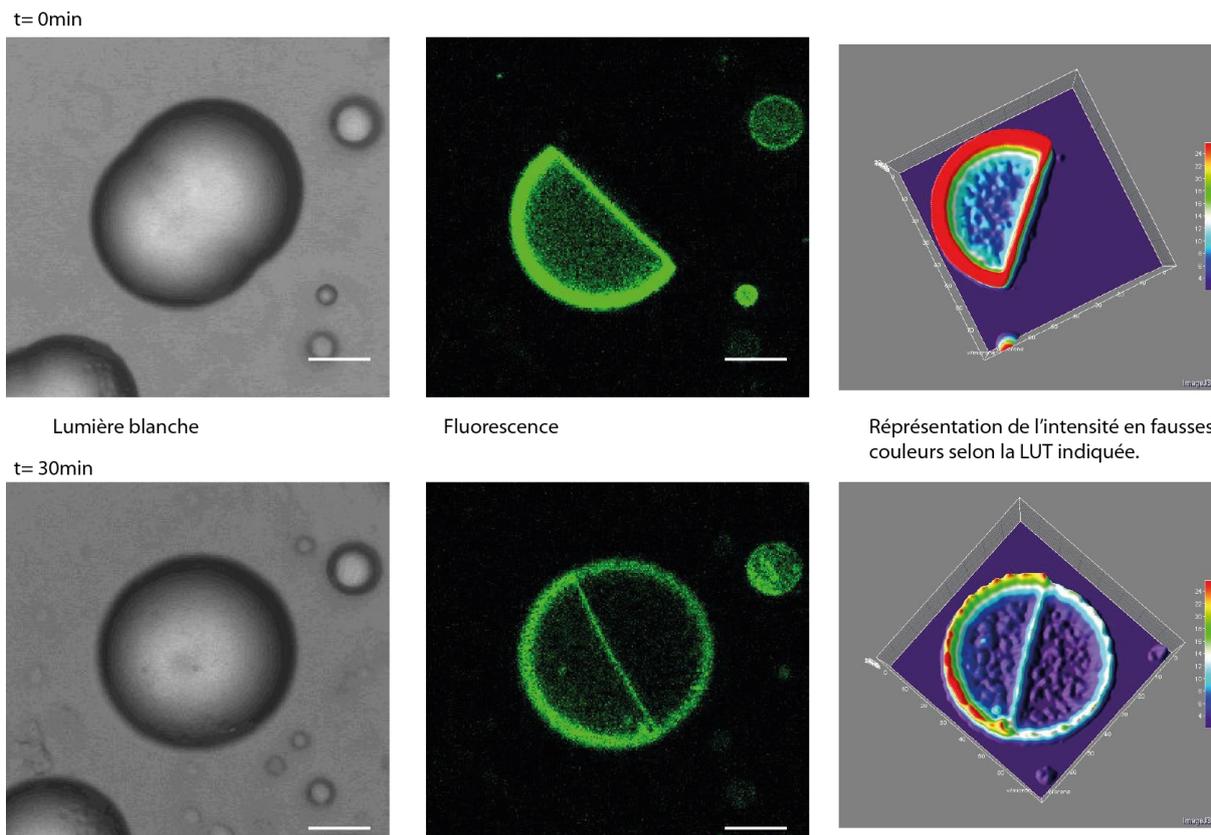


Figure III-12 : Observation de la translocation de la Pénétratine-FP488 à t=0min et t=30min en lumière blanche et en microscopie confocale. Un graphique représentant l'intensité de chaque pixel dans le plan est tracé pour chaque temps, montrant que le peptide s'accumule à la membrane, mais que ce dernier est aussi présent en volume. La barre d'échelle mesure 20  $\mu\text{m}$ .

## 2. Quantification de la translocation

Ayant observé que la pénétratine pouvait traverser la bicouche lipidique dans notre système nous avons décidé de quantifier la translocation. Ne pouvant travailler en microscopie confocale de façon routinière nous avons choisi de réaliser ces expériences en microscopie à épifluorescence (Figure III-13).

Afin de pouvoir quantifier la translocation, il était nécessaire de connaître la quantité de molécules dans chacune des gouttelettes au cours de l'expérience. À cause du photoblanchiment, il ne nous est pas possible de considérer l'intensité de fluorescence comme une mesure directe de la concentration. En revanche, nous pouvons supposer que le rapport des fluorescences ( $F_r(t)$  et  $F_c(t)$ , pour réservoir ou collecteur respectivement) et entre les deux gouttelettes évolue comme le rapport de leur concentration ( $C_r(t)$  et  $C_c(t)$ ).

$$\frac{C_r(t)}{C_c(t)} = \frac{F_r(t)}{F_c(t)} \quad (\text{III.1})$$

Pour quantifier le passage de la pénétratine il nous est nécessaire de travailler en nombre de molécule et non seulement en concentration. Ainsi il nous faut le volume de chaque gouttelette

( $V_r$  ou  $V_c$ ) qui peut être calculé, à partir de leur diamètre ( $D_r$  ou  $D_c$ , respectivement) et du diamètre de l'interface ( $D_i$ ), en considérant qu'il s'agit de sphères tronquées (Figure III-13). Ce volume peut être considéré en première approximation comme constant au cours d'une expérience puisque nous travaillons sur des échelles de temps plus courtes que l'heure, temps au cours duquel l'évaporation est de l'ordre de la dizaine de pourcents.

$$V_r = \pi \left( \frac{D_r^3}{12} + \frac{D_r^2 \sqrt{D_r^2 - D_i^2}}{8} - \frac{\sqrt{D_r^2 - D_i^2}^3}{24} \right) \quad (\text{III.2})$$

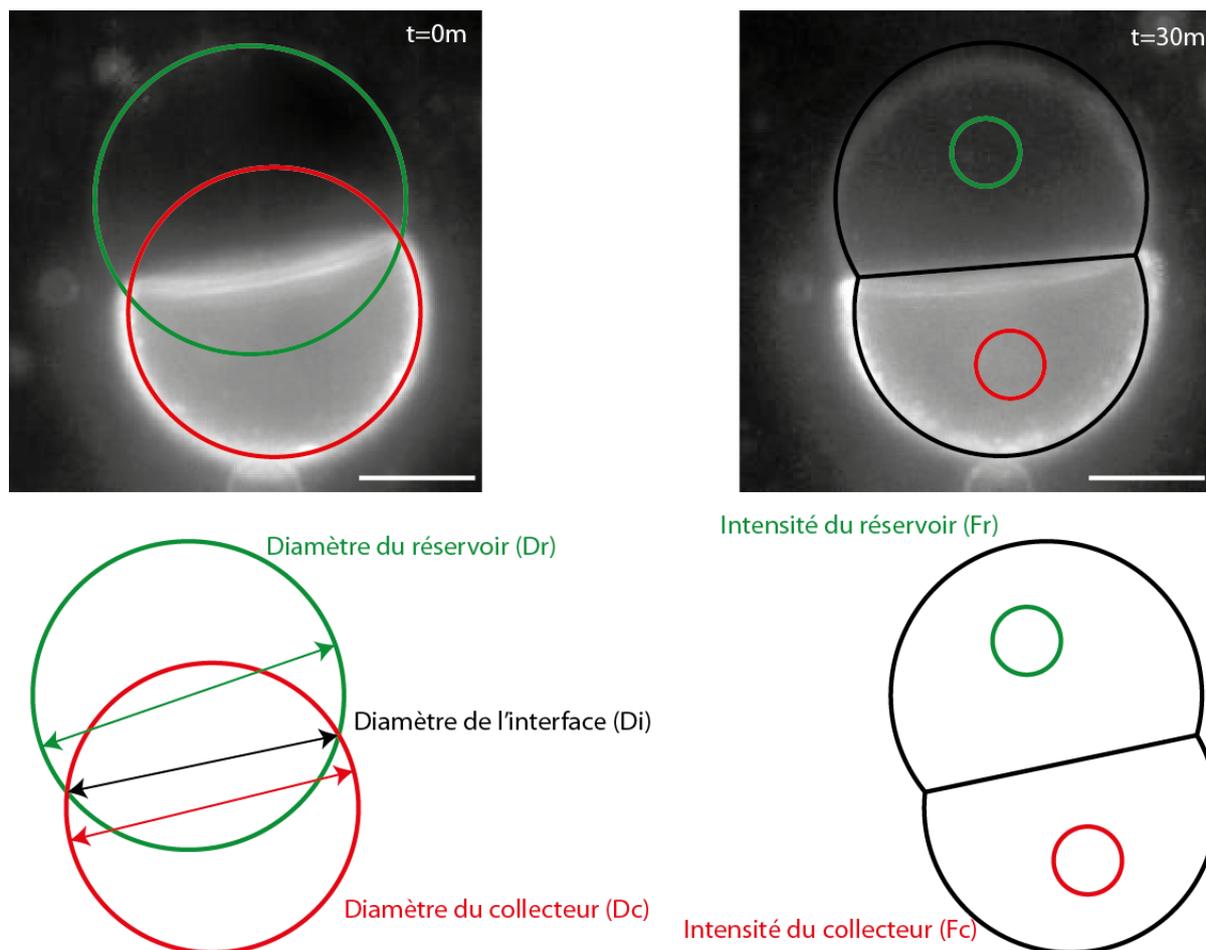


Figure III-13 : Acquisitions réalisées sur des gouttelettes formées en présence de POPG, dont l'une contient de la pénétratine-FP488. Les images présentées ont été prises au début et à la fin de l'expérience. Sur l'image à  $t=0$  sont superposés deux cercles. Le rouge représente le diamètre de la gouttelette « réservoir » et le vert celui de la gouttelette « collecteur ». L'interface entre les deux est représentée par la double flèche sur le schéma du dessous. La quantification de la fluorescence est réalisée comme montrée sur l'image de droite. Un cercle est tracé dans la lumière de chaque gouttelette en prenant garde à ne pas englober la monocouche ou "l'œil de chat" entre les deux gouttelettes. Cette mesure est réalisée pour chaque cliché disponible.

Connaissant le nombre initial de molécules fluorescentes dans chacune des gouttelettes à partir des concentrations initiales ( $C_c(t=0) = 0$  M et  $C_r(t=0) = 5$   $\mu$ M dans les expériences en présence de pénétratine ou  $C_r(t=0) = 1$   $\mu$ M pour les expériences avec FP488 seule) et le volume des

gouttelettes et considérant que le nombre total de molécules fluorescentes dans les deux gouttelettes est constant au cours de l'expérience, nous pouvons écrire cette conservation :

$$C_r(t = 0)V_r = C_c(t)V_c + C_r(t)V_r \quad (\text{III.3})$$

En utilisant le rapport des fluorescences, il nous est ainsi possible de mesurer l'évolution de la concentration au cours du temps dans chacune des gouttelettes.

$$C_c(t) = \frac{C_r(t = 0)V_r}{V_c + \frac{V_r F_r(t)}{F_c(t)}} \quad (\text{III.4})$$

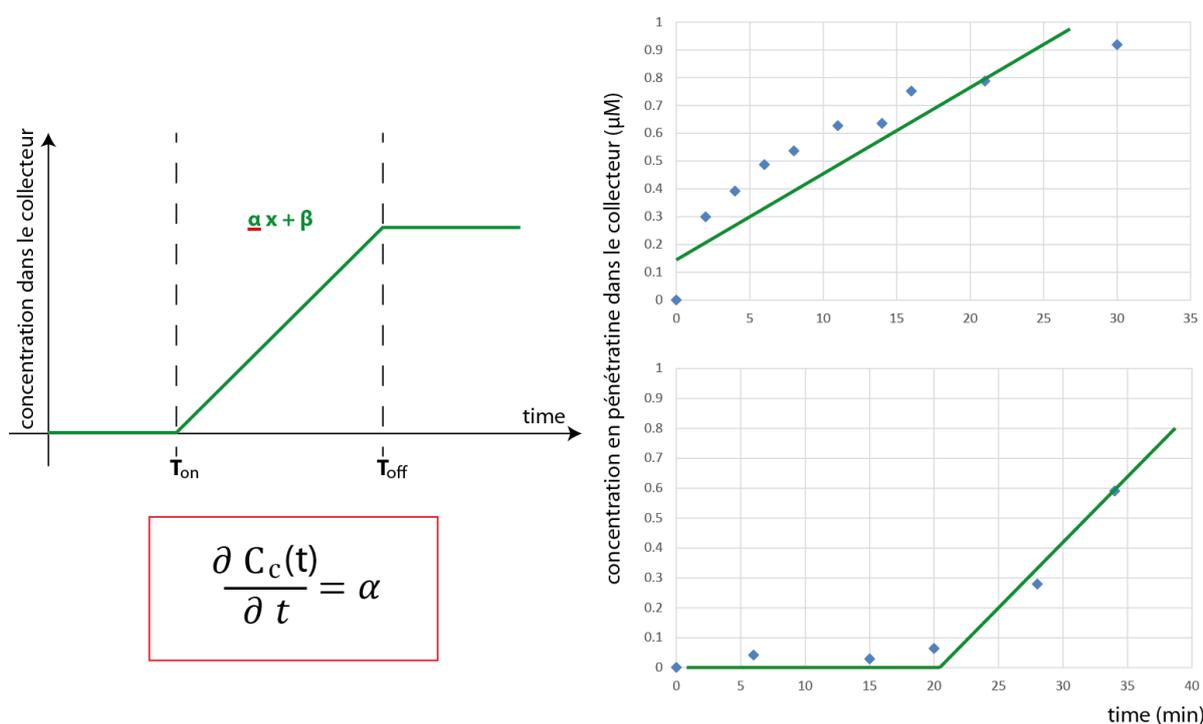


Figure III-14 : Allure des courbes d'évolution de la concentration en pénétратine dans la gouttelette « collecteur » au cours du temps. Deux exemples de courbes issues de nos données sont présentés sur la partie droite de la figure, où il apparaît que l'évolution de la fluorescence durant la phase de translocation peut être approximativement ajustée par une régression linéaire. L'augmentation de fluorescence ne commence pas toujours au début de l'expérience, et elle sature parfois pendant l'expérience, d'où l'apparition des temps  $T_{on}$  et  $T_{off}$  qui délimitent la période pendant laquelle la translocation a lieu.

Sur nos observations les courbes possèdent des allures différentes, mais quelques caractères communs reviennent, et une courbe générale est ainsi représentée en Figure III-14. Nous observons deux phases de plateau séparées par une phase où  $C_c$  croît, qui correspond à la phase de translocation. La durée du premier plateau est assimilée au temps nécessaire à l'établissement de la translocation. Il pourrait être dû au drainage de l'huile hors de la membrane mais les mesures électriques semblent indiquer que ce phénomène ne prend pas plus d'une minute. Il peut aussi s'agir du temps nécessaire à la formation d'une structure de perméation permettant la translocation, cette interprétation est développée en III.D.4. Le second plateau

correspond à l'arrêt de la translocation (une hypothèse serait la fermeture des structures de perméation dans la membrane permettant la translocation). Les profils de courbes sont commentés plus en détail dans la partie III.D.4

### 3. L'influence de la composition lipidique

Il nous est donc possible d'évaluer la translocation de la pénétratine en mesurant l'augmentation de sa concentration, au cours du temps, dans la gouttelette « collecteur ». Nous nous sommes intéressés à l'influence de la composition lipidique sur la translocation en faisant varier la concentration en lipides anioniques. Dans un premier temps, nous avons uniquement évalué quelles compositions permettaient un passage du peptide, détectable en moins de 30 min. Pour chaque composition, nous avons évalué le passage de la pénétratine-FP488 et vérifié si celui-ci était significativement différent de celui du fluorophore FP488 seul (Figure III-18) pour s'assurer que c'est bien le CPP qui entraîne sa sonde fluorescente.

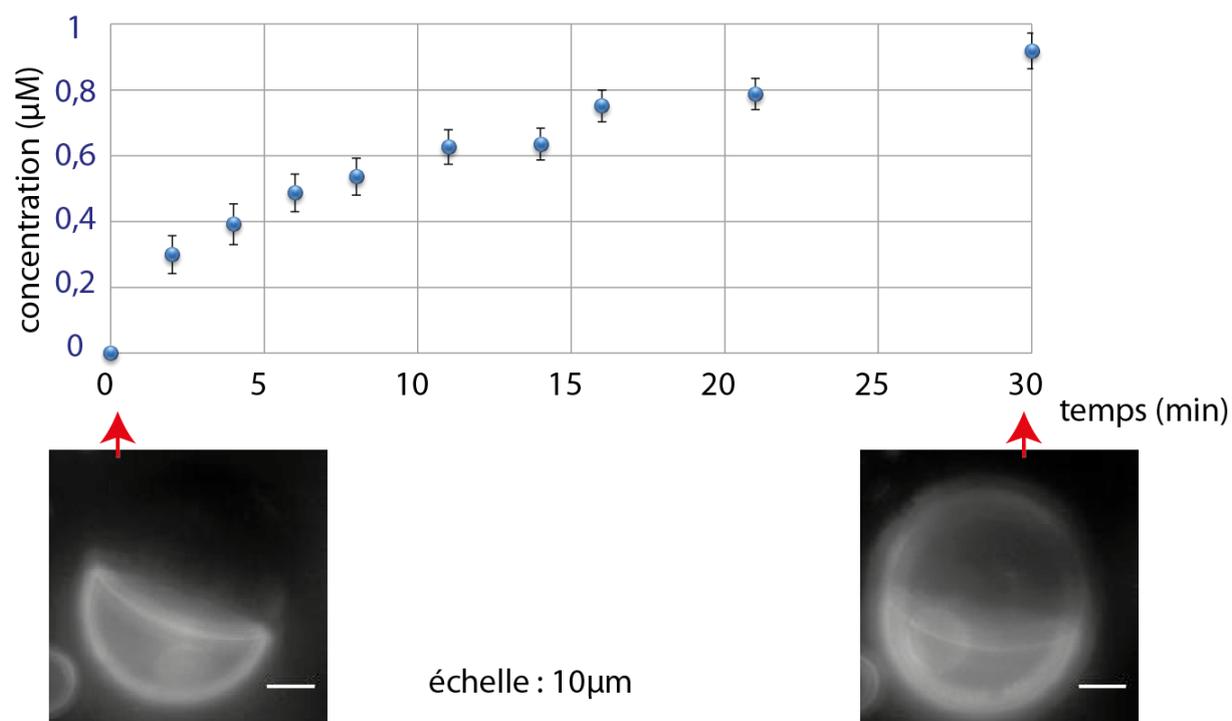


Figure III-15 : Exemple des données majoritairement recueillies pour les paires formées dans 100% de POPG. Le graphique représente l'évolution de la concentration en pénétratine-FP488 en fonction du temps, dans la gouttelette « collecteur ». Les images de la paire à l'instant initial et à la fin de l'expérience en observation sous microscope à épifluorescence sont présentées sous le graphique.

Nous avons pu confirmer que la translocation de FP488, au travers de DIB composée exclusivement de POPG, n'est possible que si le fluorophore est conjugué à la pénétratine. Dans 80% des expériences nous observons une augmentation de la fluorescence dans la gouttelette « collecteur » (Figure III-15) (et 0% pour le fluorophore seul). L'observation du passage de la

fluorescence au travers de la DIB peut-être attribué à la pénétratine avec une certitude de 99%, comme le suggère le test exact de Fisher réalisé sur ces données (valeur de « p » < 0,01) (<http://www.biostathandbook.com/fishers.html>). Notons cependant que dans 20% des expériences aucune translocation n'était observée.

La translocation de la pénétratine a aussi été observée dans des expériences sur DIB contenant 40% de POPG et 60% de POPC (Figure III-16), avec une occurrence à peine plus faible : 75% et toujours aucune translocation du fluorophore seul. L'effet de la pénétratine sur la translocation du fluorophore peut donc être affirmé avec un degré de confiance de 95%.

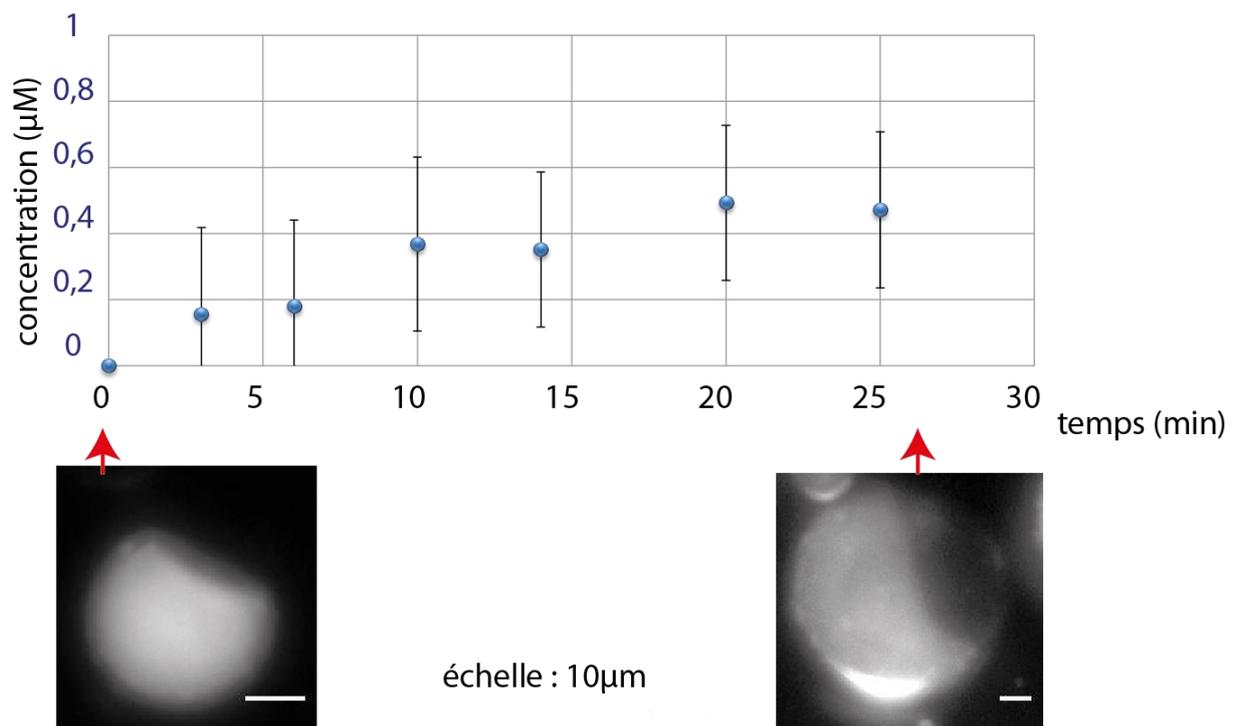


Figure III-16 : Exemple des données majoritairement recueillies pour les paires formées en POPC:POPG 3:2. Le graphique représente l'évolution de la concentration en pénétratine-FP488 en fonction du temps, dans la gouttelette « collecteur ». Les images de la paire à l'instant initial et à la fin de l'expérience en observation sous microscope à épifluorescence sont présentées sous le graphique.

Les observations pour une composition de la DIB 20% de POPG et 80% de POPC, sont totalement différentes, la DIB n'est que rarement perméable à la pénétratine fluorescente (33% des expériences ici) et surtout perméable avec une probabilité équivalente au fluorophore seul. Pour la majorité des acquisitions (Figure III-17), les données indiquent une oscillation des valeurs de la concentration autour de 0  $\mu\text{M}$  pour la goutte "collecteur". Ces fluctuations seraient donc du bruit, qui pourrait être attribué à la présence d'autres objets fluorescents dans la préparation. Les barres d'erreurs ne prennent pas en compte ces fluctuations. Pour les autres acquisitions, où un passage a été observé, l'égalité des probabilités de ce passage pour le fluorophore seul et le peptide fluorescent permet de penser qu'il n'y a pas d'effet spécifique de

la pénétratine sur l'entrée du fluorophore dans ces conditions. Ce passage pourrait être lié à des instabilités de la bicouche (ou défauts) indépendamment de la présence de la pénétratine.

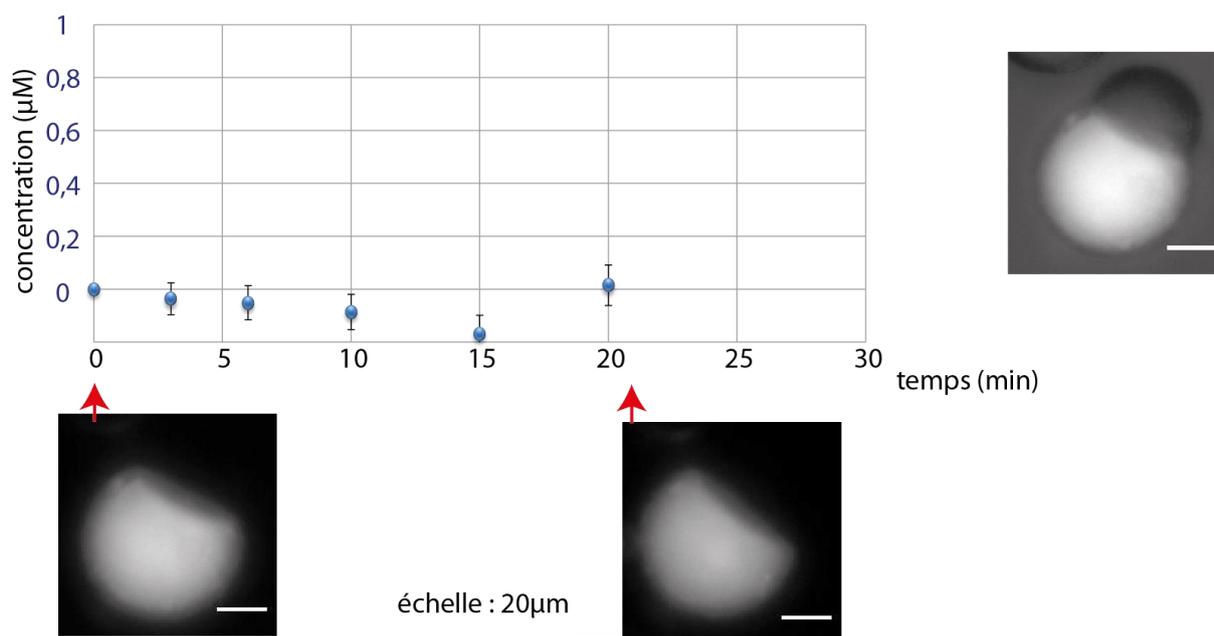


Figure III-17 : Exemple des données majoritairement recueillies pour les paires formées en POPC:POPG 4:1. Le graphique représente l'évolution de la concentration en pénétratine-FP488 en fonction du temps, dans la gouttelette « collecteur ». Les images de la paire à l'instant initial et à la fin de l'expérience en observation sous microscope à épifluorescence sont présentées sous le graphique. En encart est montrée une image prise en lumière blanche superposée à l'épifluorescence, à l'instant initial, pour montrer la deuxième gouttelette de la paire.

Les DIB composées seulement du lipide neutre POPC ne sont pas imperméables au fluorophore. Ainsi nous avons systématiquement observé le passage de fluorescence d'une gouttelette à l'autre, en absence de pénétratine. Ceci confirme la nécessité d'une proportion de POPG pour stabiliser la DIB. Nous n'avons pas réalisé d'observation du passage de la pénétratine dans cette condition.

Ainsi, il semble que la translocation de la pénétratine soit possible sur la durée de nos expériences (30 min) tant que la DIB contient au moins 40% de POPG. En revanche pour des concentrations inférieures à 20% il semble que les DIB soient moins stables comme le montre l'apparition de la translocation du fluorophore seul. Cette observation est appuyée par le passage systématique du fluorophore seul dans les membranes dépourvues de POPG.

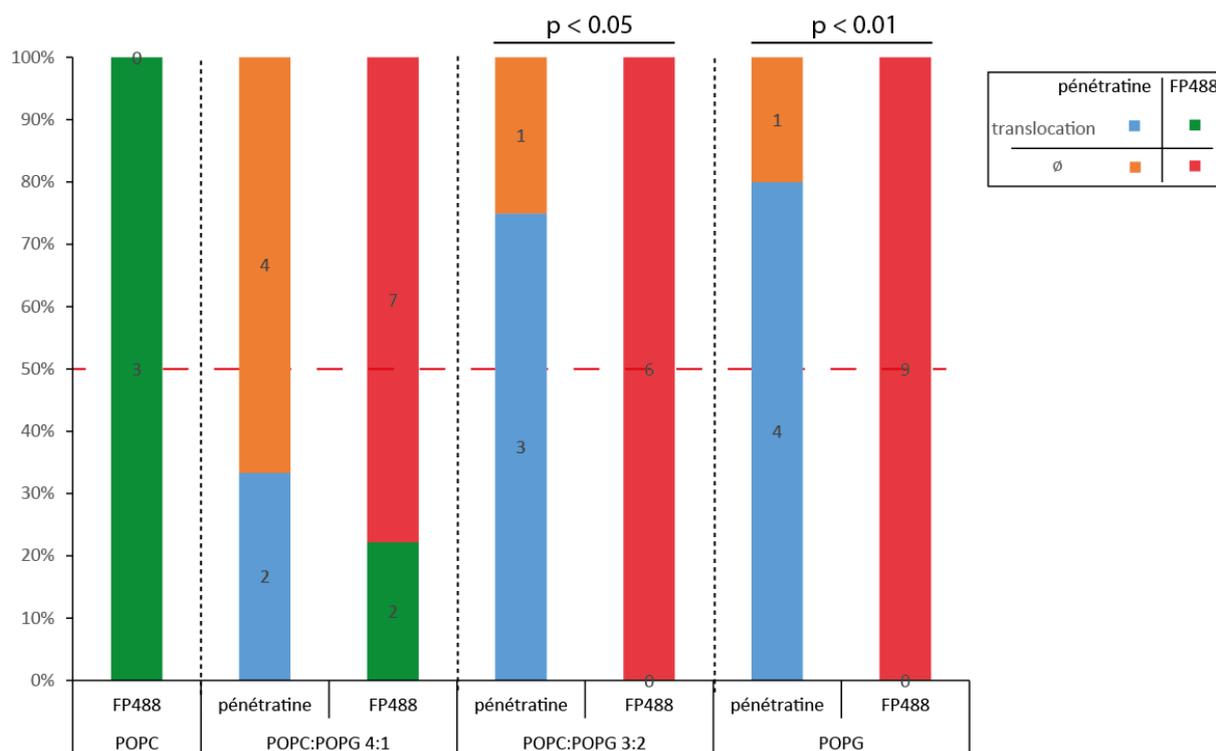


Figure III-18 : Histogramme présentant, pour quatre compositions lipidiques, les proportions de passage (bleu, ou vert) ou non (orange ou rouge) pour la pénétratine-FP488 ou FP488 seul, respectivement. Il s'agit du nombre de fois où un passage a été observé, ou non, dans chacune des conditions, et non du pourcentage de fluorescence détecté lors du passage. Le nombre d'observations pour chaque condition est inscrit dans la colonne correspondante. Les conditions où le comportement du fluorophore est statistiquement différent de celui de la pénétratine sont indiquées par la valeur de « p » obtenue en réalisant un test exact de Fisher.

#### 4. Déstabilisation de la membrane

L'allure de l'évolution de la concentration au cours du temps montre plusieurs choses (Figure III-14). Premièrement, il existe parfois un délai entre le début de l'expérience et l'observation du passage de la molécule. Deuxièmement le passage cesse avant que les concentrations ne s'équilibrent entre les gouttelettes en contact. Il y a donc des périodes pendant lesquelles la pénétratine est capable de traverser et d'autres non. Une explication serait que la translocation ne soit possible que lorsqu'une structure de perméation apparaît dans la membrane et qu'elle dure jusqu'à la disparition de cette structure perméante. Ainsi à partir du temps que le phénomène de passage met à apparaître (ou non) il nous est possible d'en déduire une probabilité par minute de première apparition d'une structure de perméation dans la membrane permettant la translocation. Nous avons fait l'hypothèse que l'apparition de ces structures perméantes (uniques ou quelques unités) suit un processus de Poisson et nous avons cherché un estimateur de la probabilité d'apparition par minute. À partir de nos résultats expérimentaux nous avons calculé pour chaque condition expérimentale (peptide ou fluorophore seul, type de lipides) l'estimateur  $\frac{N_{trans}}{\Sigma T_{on}}$  où  $N_{trans}$  correspond au nombre d'expériences (pour chaque

condition, plusieurs expériences sont réalisées) pour lesquelles nous avons observé un passage et où  $T_{on}$  est le temps où le passage débute quand il y a passage et la durée de l'expérience (30 minutes) sinon (la somme porte sur les expériences dans une condition donnée). Cet estimateur a la dimension d'une probabilité par unité de temps, cependant compte tenu que nos observations sont réalisées sur des temps courts il n'est pas évident que  $\frac{N_{trans}}{\Sigma T_{on}}$  corresponde à la probabilité d'ouverture par unité de temps à cause de la valeur par défaut  $T_{ON} = 30$  min. Afin de vérifier que l'estimateur mesuré est valide, nous avons décidé de simuler la distribution des estimateurs  $\frac{N_{trans}}{\Sigma T_{on}}$  pour chaque probabilité d'ouverture d'une structure de perméation par unité de temps (voir annexe VI.B). La distribution statistique obtenue par ce programme nous a permis de vérifier que la valeur la plus probable de  $\frac{N_{trans}}{\Sigma T_{on}}$  correspond précisément à la probabilité de formation de la structure perméante par minute. Nous pouvons donc utiliser  $\frac{N_{trans}}{\Sigma T_{on}}$  déterminé expérimentalement comme estimation exacte de la probabilité de formation de la structure perméante par minute, malgré la « coupure » réalisée à 30 min.

De nos expériences, il apparaît que la probabilité de formation d'une structure de perméation dans les bicouches en présence de pénétatine augmente avec la concentration en POPG dans la DIB, et présente une valeur maximale d'apparition de 13% par minute dans les membranes composées exclusivement de POPG (Figure III-19).

Nous avons aussi remarqué que la probabilité d'apparition de ces structures en présence de FP488 seul est proche de 50% par minute dans les membranes composées de POPC. Cette probabilité est inférieure à 0,6% dans les bicouches contenant de la POPG.

Pour interpréter complètement ces données, il convient de préciser l'intervalle de confiance sur ces probabilités par minute de formation de structures perméantes. Avec les distributions statistiques de l'estimateur  $\frac{N_{trans}}{\Sigma T_{on}}$  obtenues grâce au programme présenté en annexe pour différentes probabilités de formation par minute de la structure perméante, il est possible de déterminer la valeur maximale (respectivement minimale) de la probabilité de formation par minute pour laquelle la valeur de l'estimateur  $\frac{N_{trans}}{\Sigma T_{on}}$  mesurée a une probabilité d'au moins 20% (degré de confiance = 80 %) d'être aussi haute (respectivement aussi faible). Ces deux valeurs ont été utilisées pour les barres d'erreurs présentées dans le graphique.

En revanche, il ne nous est pas possible d'étudier la structure de perméation, nous devons donc considérer tous les mécanismes évoqués dans l'introduction (I.F.3.d)) comme pouvant participer à l'établissement de la translocation.

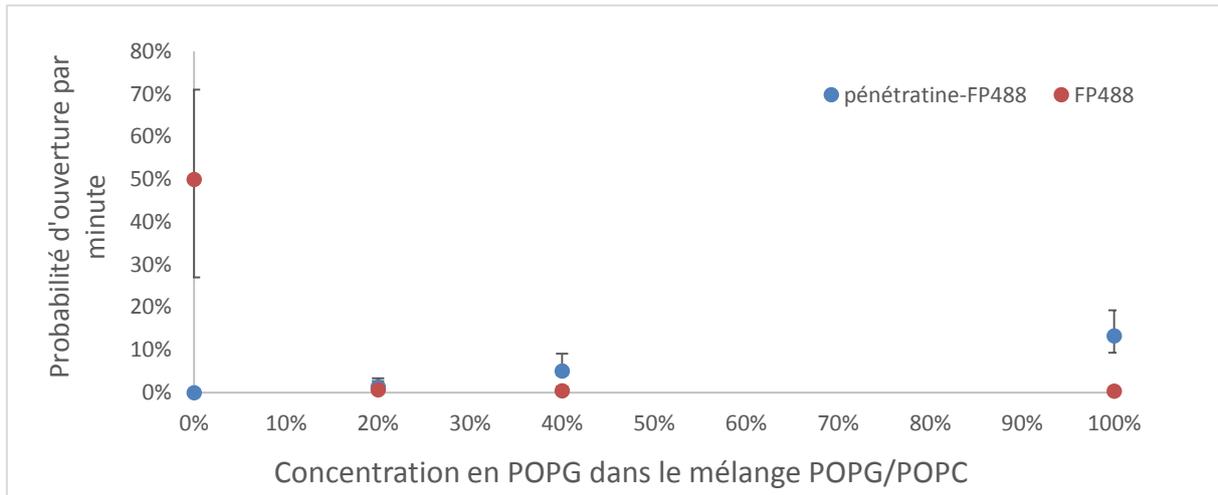


Figure III-19 : Graphique représentant la probabilité d'ouverture d'un défaut par défaut dans des DIB de compositions différentes. Pour chaque composition cette probabilité est donnée pour la pénétratine-FP488 et FP-488 seul.

## 5. Détermination du coefficient de perméabilité

Nous avons aussi cherché à évaluer l'efficacité de la translocation de la pénétratine après la formation des défauts. Pour pouvoir quantifier le passage d'une molécule au travers d'une membrane, il est commun de considérer le coefficient de perméabilité  $P$ , caractérisant la facilité avec laquelle une molécule traverse la membrane en supposant que ce passage est proportionnel à la surface de la membrane et à la concentration de peptides. Ces hypothèses s'accordent mal avec l'hypothèse précédente d'une structure perméante et correspondent plutôt à des peptides traversant indépendamment. Le développement qui suit doit donc être considéré comme une interprétation alternative et une estimation « en ordre de grandeur » de la capacité de la structure perméante permettant une comparaison avec le passage d'autres molécules que les CPP. Le coefficient de perméabilité est calculé à partir du flux de molécules au travers de la membrane ( $\Phi_N$ ), de la surface de celle-ci ( $S_I$ ), et des concentrations de part et d'autre de la membrane ( $C_r(t)$  et  $C_c(t)$ ) selon la relation suivante :

$$\Phi_N = P \times S_I \times [C_r(t) - C_c(t)] \quad (\text{III.5})$$

Le flux est relié à la variation du nombre de molécules dans la gouttelette « collecteur » après un intervalle de temps donné, et puisque le volume est constant au cours de l'expérience, le flux est obtenu par la variation de concentration dans la gouttelette « collecteur » et ce volume. D'où

$$\Phi_N = \frac{\partial N}{\partial t} = V_c \frac{\partial C_c(t)}{\partial t} = \alpha V_c \quad (\text{III.6})$$

$\alpha$  est déterminé à partir d'un ajustement linéaire de la courbe de concentration de la gouttelette « collecteur » en fonction du temps sur les premières minutes du passage (Figure III-14).

Nous calculons le coefficient de perméabilité sur les premières minutes du passage, temps au cours duquel la différence de concentrations entre les gouttelettes n'évolue au plus que de 10%, nous pouvons donc approximer cette différence de concentrations par la différence des concentrations initiales, c'est-à-dire la concentration initiale de la gouttelette « réservoir ». Ainsi :

$$P = \frac{4\alpha V_c}{\pi D_I^2 C_r(t=0)} \quad (\text{III.7})$$

Les valeurs obtenues pour les coefficients de perméabilité dans chacune des conditions où nous observons de la translocation sont représentées dans le graphique Figure III-20. Nous avons pu extraire un coefficient de perméabilité pour la pénétratine-FP488 dans les membranes contenant des lipides anioniques ( $10^{-9} < P < 10^{-8}$  m/s).

Pour interpréter ces valeurs nous les avons comparées à des valeurs connues de perméabilité ionique : le coefficient de perméabilité de la pénétratine sur la bicouche 100% POPG est plusieurs ordres de grandeur au-dessus de celui des ions  $\text{Na}^+$  ( $P \sim 10^{-16}$ ) et  $\text{Cl}^-$  ( $P \sim 10^{-12}$ ) au travers de vésicules de 100% POPC ou de 100% POPS (Paula et al. 1998) (Hauser et al. 1972). Pour rappel, le coefficient de perméabilité de l'eau sur ces modèles est de  $10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$  (Mansy 2010).

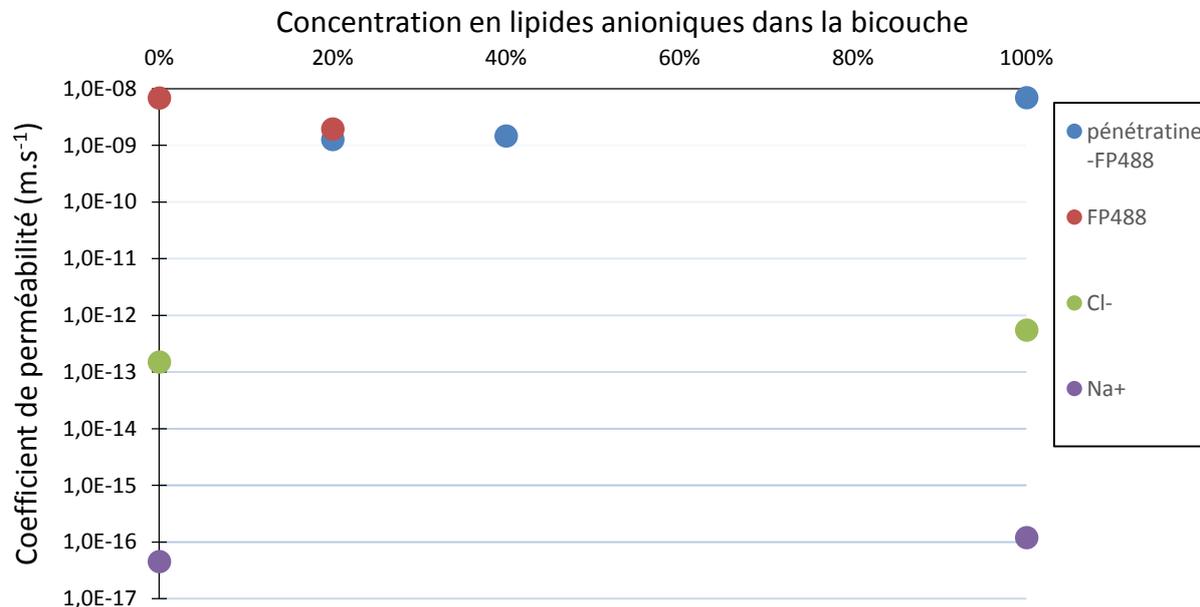


Figure III-20 : Graphique représentant les coefficients de perméabilité mesurés pour la pénétratine-FP488 et FP488 seul en fonction de la proportion de POPG dans la membrane des DIB. Ces valeurs sont mises en perspective avec les coefficients de perméabilité des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  mesurés dans des GUV de compositions similaires (POPC ou POPS) (Hauser et al. 1972).

## E. Conclusion

Les expériences en DIB présentent donc un système modèle approprié pour l'observation de la translocation des CPP, et nous avons pu observer le passage de la pénétratine au travers de bicouches contenant au moins 40% de POPG que nous interprétons comme de la translocation. Nous avons montré que l'efficacité de la translocation est corrélée à la concentration en lipides anioniques (POPG) dans la bicouche. À mesure que cette quantité diminue, la translocation aussi, et en-deçà de 20% de POPG, le fluorophore FP488 seul traverse la bicouche avec la même efficacité que lorsqu'il est lié à la pénétratine. Enfin, en l'absence de lipides anioniques, la sonde est capable de traverser la bicouche pendant les 30 minutes d'observation, suggérant que les bicouches uniquement composées de POPC sont peu stables.

Cette observation n'est pas liée à une modification du coefficient de perméabilité qui reste à peu près le même pour la pénétratine dans toutes les conditions lipidiques, aussi bien pour la pénétratine que pour la sonde seule ( $10^{-9} \text{ m.s}^{-1} < P < 10^{-8} \text{ m.s}^{-1}$ ). Cette valeur est intermédiaire entre celle des ions et celle de l'eau.

En revanche, la probabilité de formation d'un défaut dans la membrane, pour la pénétratine, augmente avec la concentration en POPG jusqu'à 13% par minute en 100% POPG, tandis qu'elle est constante et inférieure à 1% pour le fluorophore seul au-dessus de 40% POPG. La bicouche composée uniquement de POPC montre pour le fluorophore seul une probabilité élevée de formation de défaut, soulignant sûrement un défaut de stabilité de nos membranes pour cette composition.

Nous avons donc mis en évidence que le passage de la pénétratine est d'autant plus favorisé que la membrane contient des lipides anioniques, et ce que ce passage est permis par l'apparition de rares défauts (unique ou quelques unités) dans la membrane. La probabilité d'apparition de défauts dans la membrane augmente avec la concentration en lipides anioniques et le passage de la pénétratine, une fois les défauts apparus, se fait avec un coefficient de perméabilité  $P$  de l'ordre de  $10^{-9}$  à  $10^{-8} \text{ m.s}^{-1}$ .

## **F. Perspectives**

L'étude développée ci-dessus en reste à un stade qui nécessite encore quelques expériences pour avoir une meilleure valeur statistique. Bien que la preuve de concept sur l'étude des CPP soit satisfaisante, nous apportons des réponses ne concernant qu'un seul CPP : la pénétratine. De plus, nous n'avons travaillé qu'avec des membranes dont le cœur hydrophobe est composé uniquement des chaînes palmitoyl-oéloyl. Pour généraliser les résultats présentés ci-dessus il peut être intéressant de complexifier nos membranes en termes d'asymétrie et de composition.

### **1. Membranes asymétriques**

Un point fort de l'utilisation des émulsions adhésives est la possibilité de changer la composition lipidique aisément entre chaque expérience. Le coût par expérience reste abordable permettant de travailler sur des mélanges différents. Enfin, chaque gouttelette se couvre d'une monocouche de lipides dépendante du mélange huile-lipide au moment de la formation de l'émulsion.

Ainsi il est possible de réaliser deux populations de gouttelettes, chacune avec sa composition lipidique propre. Afin de distinguer les deux types de gouttelettes, une composition lipidique sera marquée par la présence d'un fluorophore soluble, et on cherche les paires asymétriques en fluorescence dont la bicouche séparatrice sera aussi asymétrique en matière de composition lipidique. Nous pourrions aussi envisager une approche alternative à la formation de DIB à l'aide de gouttelettes contenant des vésicules (Hwang et al. 2008). Cependant, dans le cadre de l'étude des CPP, il se peut que les SUV présentent dans les gouttelettes interagissent avec les CPP rendant l'expérience plus difficile à interpréter.

Cependant, il reste à prouver la stabilité d'une telle asymétrie.

Cette stabilité n'a pas encore été étudiée, mais elle doit pouvoir être mesurée. Il n'est pas possible d'utiliser des lipides fluorescents pour étudier l'asymétrie, car les lipides sont en excès dans le mélange d'huile ce qui induit un bruit de fond trop important pour une observation satisfaisante de la membrane.

Une autre méthode reposant sur l'utilisation de l'annexine V marquée par un fluorophore est envisageable. L'annexine V est une protéine membranaire périphérique qui, en présence de calcium, se lie aux têtes PS de la membrane (Mukhopadhyay & Cho 1996). Ainsi afin d'observer l'asymétrie de nos gouttelettes nous pouvons travailler sur une asymétrie simple, avec une population formée en POPS, et la seconde en POPC.

L'annexine V sera uniquement ajoutée dans les gouttelettes en POPC, elle ne se lie donc pas à la membrane. Si l'annexine reste en volume après la mise en contact avec une gouttelette DOPS, cela suggère que la POPS n'est pas passée, en revanche, si l'annexine se fixe sur la membrane cela suggère la présence de POPS à la membrane et donc un échange de lipides. Cette information nous permettra de connaître la durée de maintien de l'asymétrie. Si ce temps est supérieur à trente minutes, temps caractéristique de la translocation que nous avons observée, il sera possible de travailler sur la translocation des CPP à l'aide de bicouches asymétriques. De plus d'autres utilisations de membranes modèles asymétriques seront alors possible.

## **2. Automatisation par microfluidique**

Les émulsions inverses sont produites dans des tubes puis les deux populations sont mélangées lors du dépôt sur la lame. On est donc dépendant du "facteur chance" pour que des paires de diamètres similaires se forment. Cependant, la formation d'émulsions de manière automatisée est une technique maîtrisée (Thiam et al. 2012). L'architecture nécessaire à la formation de ces émulsions afin de contrôler le diamètre des gouttelettes et limiter l'évaporation, et donc une modification de la composition des solutions, est parfaitement connue. Il est donc possible de générer de manière systématique des gouttelettes couvertes d'une monocouche de lipides à l'aide d'un système de « flow focusing ». En utilisant deux systèmes de ce type, chacun contenant sa solution à injecter, il est donc possible de générer de façon systématique des gouttelettes contenant du tampon, d'une part, et d'autre part des gouttelettes contenant notre CPP fluorescent (Figure III-21). On génère ainsi alternativement une gouttelette de chaque type que l'on guide pour qu'elles se rencontrent.

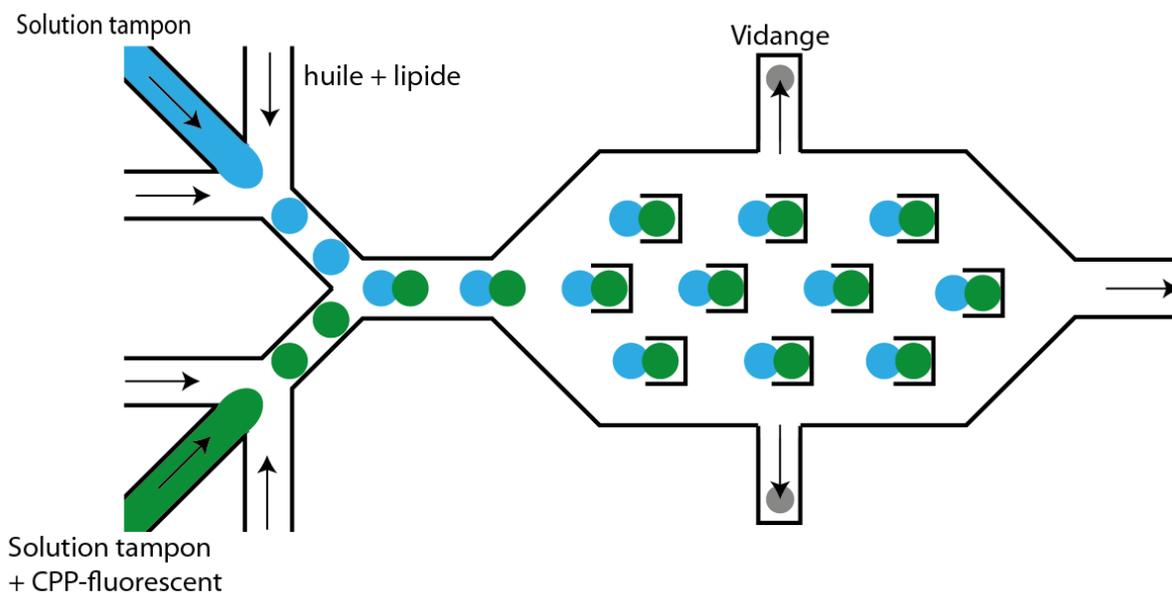


Figure III-21 : Schéma de la chambre microfluidique permettant une génération systématique des paires. Chacune des gouttelettes de la paire est formée indépendamment, ce qui pourrait permettre de créer l'asymétrie lipidique. Puis elles sont mises en contact, et sont bloquées dans les chambres par des motifs en forme d'agrafe imprimés sur la puce. Les vidanges peuvent servir de guidage pour les paires.

Les paires ainsi formées sont ensuite guidées vers une chambre d'observation quadrillée afin de pouvoir repérer les paires individuellement. Cette génération rapide des paires permet de s'assurer que toutes les paires sont constituées de gouttelettes de taille similaire. Il est ainsi possible de générer plusieurs paires dans le champ d'observation du microscope, permettant une augmentation de la signification statistique des résultats par expérience.

L'automatisation en chambre quadrillée repose cependant sur des guidages microfluidiques avancés. Une première technique moins coûteuse serait d'envoyer une grande quantité de gouttelettes de tampon avec quelques gouttelettes fluorescentes et d'observer la dilution de fluorescence sur le damier de gouttelettes ainsi formé (Figure III-22).

Cette technique offre une forte valeur statistique à chaque expérience, mais la géométrie des membranes n'est pas conventionnelle et la fuite de fluorescence se fait au travers de plusieurs bicouches ce qui est plus difficile à interpréter.

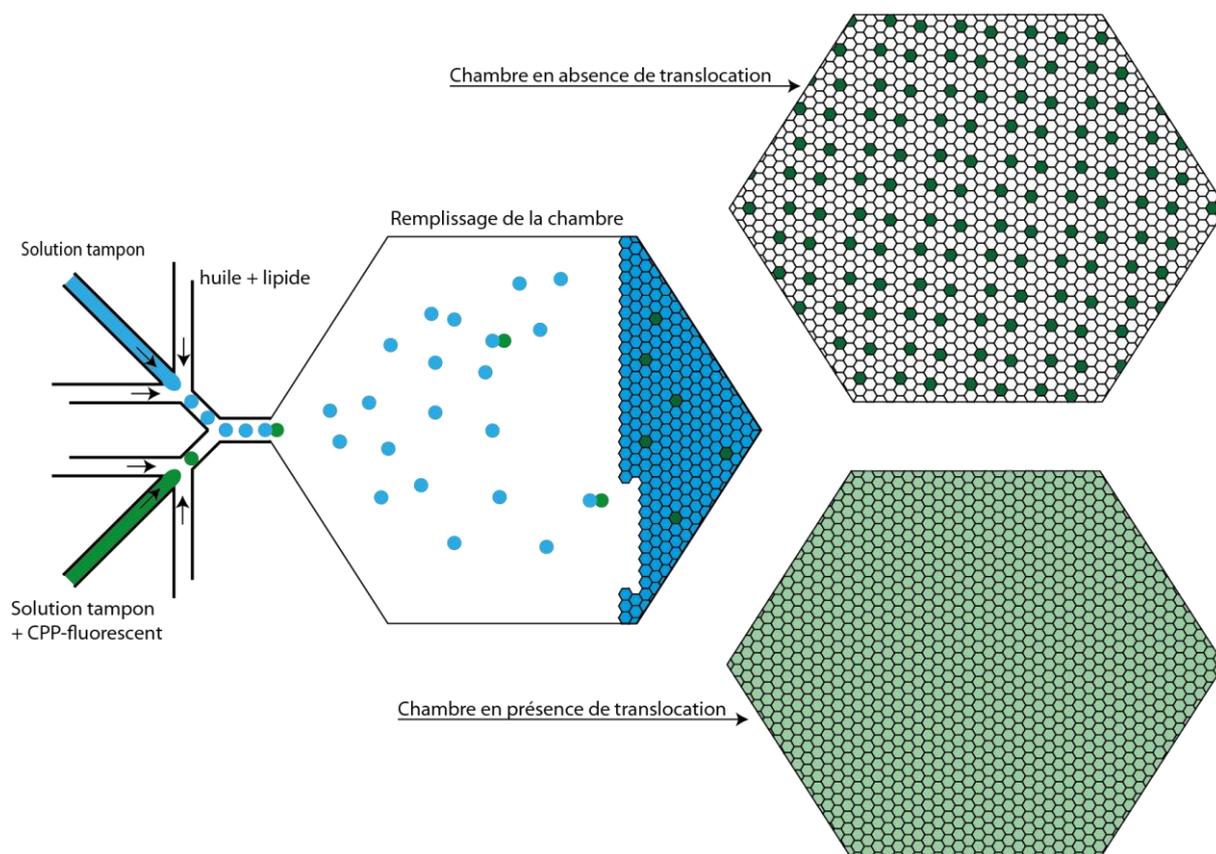


Figure III-22 : Chambre à damier pour une approche microfluidique en absence de système de guidage. Seul le « flow focusing » est nécessaire à la génération des gouttelettes. Les gouttelettes contenant des CPP sont générées moins souvent que les gouttelettes de solution tampon. Ensuite soit la chambre reste inhomogène (en haut à droite) ce qui signifie que le CPP ne traverse pas. Soit, elle devient homogène en fluorescence (en bas à droite) auquel cas le CPP a pu traverser les DIB.

A l'aide des bicouches à l'interface entre gouttelette nous avons pu mettre en évidence la translocation de la pénétatine au travers de bicouche POPC/POPG, la présence d'au moins 40% de POPG dans cette bicouche étant nécessaire. Cependant, ces résultats ne couvrent qu'une seule composition lipidique et la bicouche est symétrique. Il serait donc intéressant de poursuivre ces études pour des compositions plus variées en s'aidant des perspectives présentées afin de complexifier les membranes et d'augmenter la valeur statistique des expériences. Il sera aussi intéressant d'étendre cette approche à d'autres CPP.

## IV. Mise au point d'un microscope pour l'observation de la translocation à l'échelle de la molécule unique

---

## **A. La molécule unique sur bicouche**

Afin d'étudier la translocation des CPP nous voulions mettre au point une expérience faisant intervenir une membrane modèle sur laquelle nous pourrions réaliser des observations en molécule unique. L'observation en molécule unique permettrait d'obtenir des informations sur la cinétique et les étapes de translocation d'un peptide, ainsi que la stoechiométrie des assemblages peptides-lipides permettant la translocation. Cependant les méthodes de microscopies usuelles, telles que la microscopie à épifluorescence ou la microscopie confocale ne permettent pas d'imager des molécules uniques.

Pour imager des molécules uniques, de nombreuses méthodes ont été développées ces dernières années dont certaines (le STED, le PALM et le STORM) se sont vues accorder le prix Nobel de chimie l'an dernier. Afin d'observer des molécules uniques, il est nécessaire de pouvoir exciter un nombre de fluorophores suffisamment faible pour qu'ils ne soient pas confondus avec leurs voisins. Pour des longueurs d'onde visibles, nous sommes capables de discerner un fluorophore unique si aucune autre molécule n'émet de lumière à moins de 400 nm (qui correspond à peu près à la limite de diffraction de la lumière). Il existe deux méthodes usuelles permettant de n'observer qu'un seul fluorophore sur de telles distances.

La première méthode repose sur l'activation stochastique de fluorophores, comme en microscopie PALM (Hess Girirajan T, Mason M 2006) ou STORM (Rust et al. 2006), où une déconvolution des images permet de positionner les fluorophores à la dizaine de nanomètres. Cependant, les techniques reposant sur cette méthode s'appliquent essentiellement à l'observation d'échantillons fixés, car leur résolution temporelle est faible.

La deuxième méthode consiste à illuminer un faible volume de l'échantillon, comme en microscopie STED (Hell et al. 2004), confocale (Shotton 1989) ou TIRF (Axelrod 1981). Si l'échantillon est suffisamment dilué ces techniques permettent d'observer des molécules uniques dans les volumes excités. En revanche, excepté la microscopie TIRF, ces techniques ne permettent pas d'observer la dynamique d'un échantillon lorsque celle-ci est plus rapide que la seconde car elles reposent sur l'observation successive de microvolumes.

Ainsi parmi ces techniques seules la microscopie TIRF semble adaptée à l'observation des CPP, et nous allons détailler cette technique dans la suite.

### **1. TIRF**

La microscopie de fluorescence à onde évanescente (en anglais, Total Internal Reflection Fluorescence : TIRF) consiste à éclairer un échantillon à l'aide d'un champ évanescent

(Axelrod 1984). Pour avoir les conditions de la réflexion totale il faut que l'onde se propage d'un milieu d'indice optique élevé  $n_1$  à un milieu d'indice optique plus faible  $n_2$ . Dans le cas où l'angle d'incidence du faisceau  $\theta$  est supérieur à l'angle critique ( $\theta_c = \sin^{-1}[n_2/n_1]$ ), le faisceau est alors totalement réfléchi par l'interface et une onde évanescente est générée dans le milieu d'indice faible.

L'onde évanescente est une onde de surface (qui se propage parallèlement à l'interface) dont l'intensité décroît exponentiellement avec la distance à l'interface selon l'expression :

$$I(z) = I_0 e^{-z/\delta} \quad (\text{IV.1})$$

Où  $\delta$  est la profondeur de pénétration :

$$\delta = \lambda / 4\pi \sqrt{(n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2)} \quad (\text{IV.2})$$

Avec  $\theta$  l'angle d'incidence et  $\lambda$  la longueur d'onde.

Donnons quelques ordres de grandeur dans les conditions usuelles de la microscopie TIRF : pour une interface verre/eau, c'est à dire  $n_1 = 1,50$  et  $n_2 = 1,33$  nous trouvons  $\theta_c = 62,5^\circ$  ; pour  $\lambda = 488 \text{ nm}$  et  $\theta = 65^\circ$  nous obtenons  $\delta = 140 \text{ nm}$ . Rappelons qu'à cette distance, l'intensité lumineuse est divisée par  $e$  (2,72).

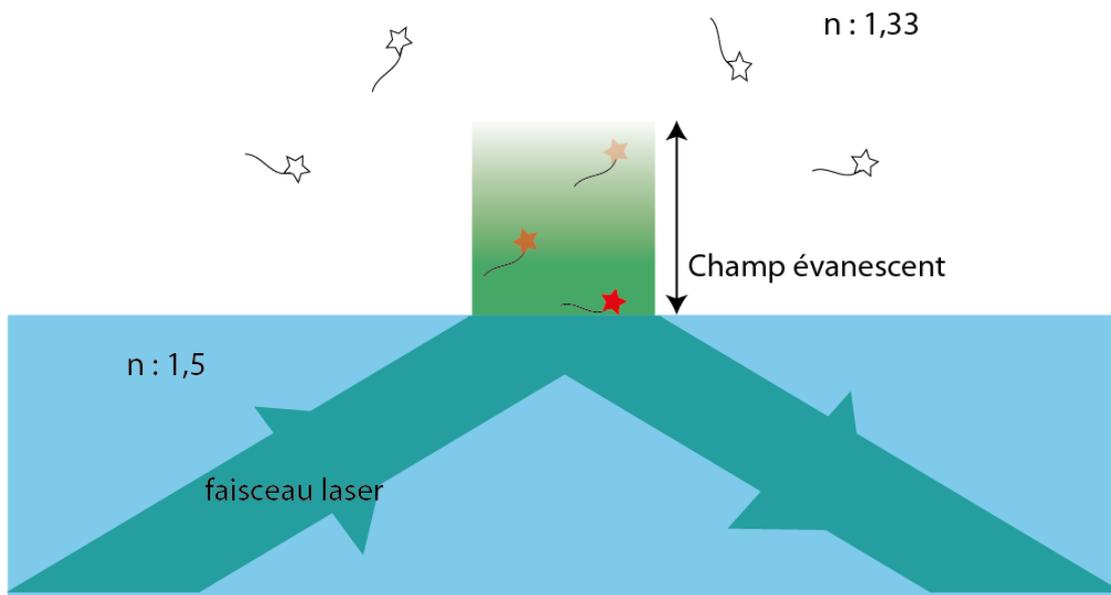


Figure IV-1 : Schéma de la réflexion totale interne à l'interface entre le verre et l'eau. Les molécules fluorescentes sont représentées par une étoile, seules les molécules situées dans le champ de l'onde évanescente sont excitées. De plus l'intensité dépend de la distance à l'interface comme illustré par le dégradé de orange.

En pratique, l'onde évanescente est formée à l'interface entre la lamelle et l'échantillon, qui se trouve dans un milieu aqueux. Il est ainsi possible de n'éclairer l'échantillon que selon une "tranche" d'une épaisseur d'environ 300 nm (Figure IV-1), donc avec une meilleure résolution verticale que celle obtenue en microscopie confocale. En revanche, dans le cas du TIRF,

l'altitude de cette "tranche" ne peut être choisie, nous sommes limités à la partie en contact avec l'interface. Cependant il est possible d'acquérir les observations sur tout le champ ce qui permet d'observer la dynamique des objets à la résolution temporelle permise par le matériel d'acquisition (qui peut atteindre 1 ms par image avec les caméras les plus sensibles et les fluorophores usuels).

Enfin la décroissance de l'intensité lumineuse d'excitation (voir l'équation IV.1) permet d'avoir une indication sur la position verticale du fluorophore (à la dizaine de nanomètres, en position relative).

La microscopie TIRF permet donc d'imager le déplacement de molécules uniques avec une précision de localisation de l'ordre de la dizaine de nanomètres, et une résolution temporelle de l'ordre de la dizaine de millisecondes. Cependant, cette méthode ne permet d'observer que les objets se situant à moins de 300 nm de l'interface, il est donc nécessaire de pouvoir positionner la membrane dans l'onde évanescente pour suivre la translocation avec cette technique.

## **2. Limitation des membranes modèles actuelles**

Outre l'imagerie nécessaire à la molécule unique il faut aussi choisir un système modèle adapté à la translocation des CPP. Les études en vésicules ne permettent pas l'observation à l'échelle de la molécule unique comme nous avons pu le voir dans l'introduction de ce manuscrit (I.F.3.b)). Les approches en gouttelettes ne nous permettent pas non plus d'observer les CPP un à un, comme nous venons de le voir (III). Seules les expériences en bicouches supportées ou suspendues semblent adaptées pour une observation en molécule unique sur système modèle car elles présentent une membrane plane susceptible d'être positionnée à l'interface entre deux milieux d'indices optiques différents.

Les bicouches supportées ont déjà été utilisées comme modèle pour l'étude des CPP. Ainsi il a été observé par PWR sur ces membranes modèles, que la pénétratine ne s'insère pas suffisamment dans le cœur hydrophobe de la bicouche pour perturber l'organisation lipidique, suggérant que la translocation ne se produit pas sur de tels systèmes (Salamon et al. 2003). L'observation en molécule unique à l'aide de la microscopie à onde évanescente a révélé que pep-1 interagit avec les membranes lorsque les concentrations en NaCl dans le tampon sont inférieures à 0,15 mM (Sharonov & Hochstrasser 2007), cependant la translocation n'a pas été observée.

Ces techniques ne permettent que d'observer l'association des CPP avec la membrane et non leur translocation. Comme nous l'avons déjà vu le modèle de la bicouche supportée est éloigné d'une membrane biologique car l'un des deux feuilletts est déposé sur le verre et donc présente

des propriétés altérées par rapport à un feuillet libre. De plus, il n'existe qu'un côté accessible pour la bicouche supporté. Un tel modèle reste néanmoins intéressant par rapport aux modèles vésiculaires car il permet l'imagerie à l'échelle de la molécule unique grâce à des techniques de microscopie telle que le TIRF. Cependant les films noirs semblent aussi propices à l'utilisation du TIRF.

### **3. La molécule unique sur film noir ?**

Nous avons ainsi tenté de combiner une approche en molécule unique sur un film noir (BLM) (expliqué en détail en IV.C.4). Le film noir est une bicouche suspendue, stabilisée par l'utilisation de lipides ramifiés, et d'huile. Cette technique est couramment utilisée dans les études électrophysiologiques sur membrane modèle. Ces bicouches dépendent de la géométrie de la chambre mais sont stables dans le temps et peuvent être observées au microscope. Ainsi les réglages réalisés pour observer un film noir seront toujours les mêmes pour une chambre donnée. De plus la BLM permet de délimiter deux compartiments facilitant ainsi la création de gradients électrochimiques pouvant jouer le rôle de force motrice dans la translocation des CPP. Les films noirs horizontaux peuvent être formés, ce qui permet d'observer la bicouche directement par épifluorescence. Nous avons opté pour un compartiment supérieur de faible volume, dans lequel nous pouvons injecter nos CPP et un compartiment inférieur vers lequel nous cherchons à voir le passage. Il est possible de s'intéresser à l'augmentation de fluorescence dans le compartiment inférieur, mais cela ne présente pas de nouveauté quant aux informations déjà apportées par les études sur vésicules. Cependant cette géométrie horizontale nous rapproche de la configuration nécessaire pour une imagerie en microscopie TIRF, nous permettant ainsi de pouvoir travailler à l'échelle de la molécule unique sur BLM.

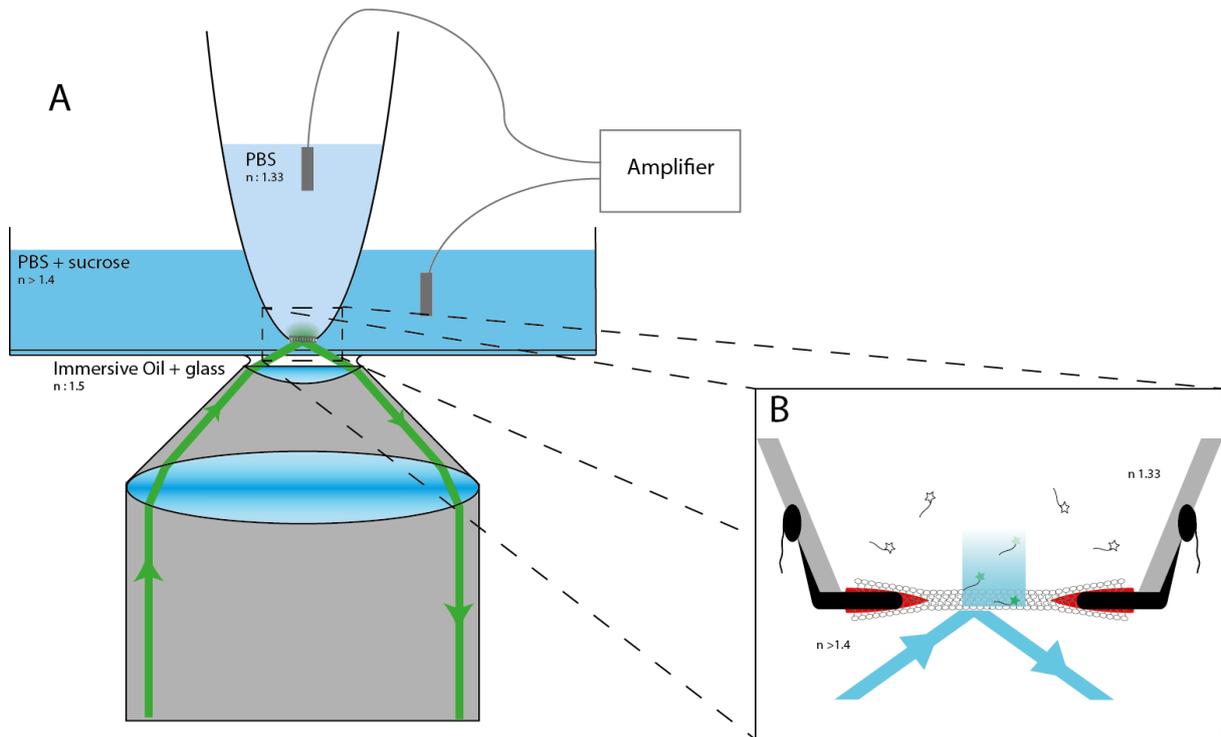


Figure IV-2 : A) Schéma de principe du microscope TIRF sur BLM. Une première chambre contenant un milieu avec une densité optique supérieure à l'eau est disposée sur le microscope équipé d'un objectif TIRF. Une seconde chambre, percée d'un trou pour accueillir la bicouche, et contenant du tampon est suspendue dans la première chambre. L'évanescence se forme sur la bicouche comme montrée sur le schéma en B), et des peptides peuvent être injectés dans le compartiment supérieur. Le montage est équipé d'un système de mesures électriques type électrophysiologie.

Ainsi nous avons souhaité réaliser un microscope à onde évanescente sur bicouche suspendue, dont le schéma est présenté Figure IV-2. Son principe repose sur l'utilisation de deux milieux fluides d'indices optiques différents de part et d'autre d'une bicouche suspendue éclairée par un faisceau correctement incliné.

## **B. Matériels**

### **1. Microscopie**

Toutes les observations sont réalisées en utilisant un microscope inversé Olympus® IX71. Le laser est un Genesis 488-1000 S Coherent® (1W - 488 nm). Le jeu de filtre utilisé consiste en un filtre passe bande, en excitation, 455DF70 (455nm +/- 35nm), un miroir dichroïque 515DRLP et un filtre passe haut, en émission, 515ALP (Melles Griot® XF18-2). Les acquisitions sont réalisées à l'aide d'une caméra Princeton instrument® de modèle MicroMax. La fibre optique sur le montage provient de Thorlabs® (P3-405B-FC-1 SM Patch Cable, 400 – 532 nm, FC/APC) et les collimateurs en sortie de fibre aussi (CFC-5X-A Adjustable FC/PC or APC Collimator, 350-700 nm, EFL 4.6mm). Nous avons utilisé trois objectifs provenant de Olympus®: un objectif TIRF x63 APO N (NA = 1,49), un objectif x20 LUCPlan FlN (NA = 0,45) et un objectif x10 CPlan n (NA = 0,25). Les différentes pièces usinées pour l'amélioration du montage ont été réalisées par l'atelier de mécanique du Laboratoire de Physique Statistique (UMR8550) de l'ENS physique dirigé par José Quintas ou avec l'aide de Jean Chevalet du laboratoire PHENIX de l'UPMC.

### **2. Peptides et consommables**

La synthèse de la pénétratine-FP488 a été réalisée au sein du laboratoire par Mehdi Amoura, et celle de RL<sub>9</sub>-Alexa488 et RW<sub>9</sub>-Alexa488 par Manjula Pallerla par stratégie BOC sur support solide (SPPS). Les billes de fluorescence proviennent d'un kit de microsphères fluorescentes TetraSpeck™ (T-7284) de life technologies®.

Toutes les images présentées ont été réalisées à l'aide de RW<sub>9</sub>-Alexa488 sauf mention contraire.

### **3. Conditions d'acquisition**

Les acquisitions sont réalisées avec une puissance laser de 50mW et le temps d'exposition par image est de 200ms.

## C. Conception initiale

### 1. Obtention de la différence d'indice optique

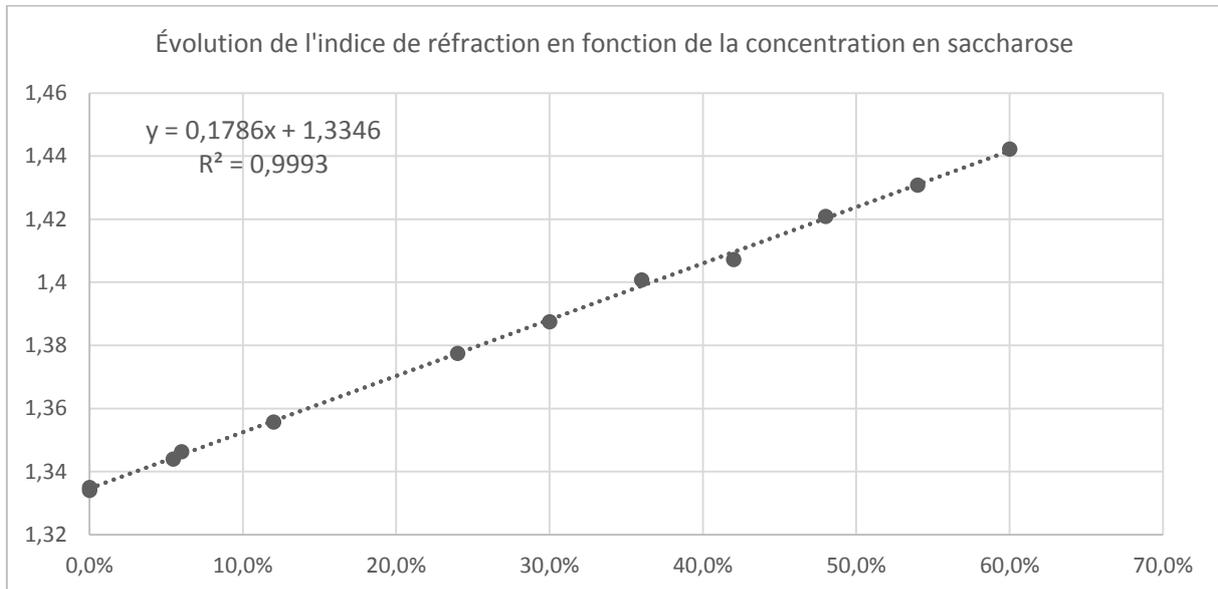


Figure IV-3 : Mesure en réfractométrie de l'indice de réfraction d'une solution de PBS en fonction de sa concentration massique en saccharose (% g.mL<sup>-1</sup>).

Afin de réaliser une onde évanescente il est nécessaire de créer une différence d'indices de réfraction telle que le compartiment inférieur ait un indice plus important que le supérieur. L'idée que nous avons eue est donc de former un film noir entre un compartiment contenant une solution tampon saturée en saccharose et un compartiment supérieur, contenant la même solution tampon, dans lequel les CPP peuvent être injectés. La solution tampon permet de maintenir les bicouches et les peptides dans un environnement biologique. De cette façon nous pouvons obtenir un indice de réfraction dans le compartiment inférieur qui est proche de celui du verre ( $n = 1,44$ ) et l'indice de l'eau dans le compartiment supérieur ( $n = 1,33$ ) (Figure IV-3) soit un angle critique  $\theta_c = 67,5^\circ$ . Nous avons ainsi décidé de travailler avec une solution de PBS contenant 60% g.mL<sup>-1</sup> de saccharose.

## 2. Une microscopie à l'aide d'un objectif TIRF

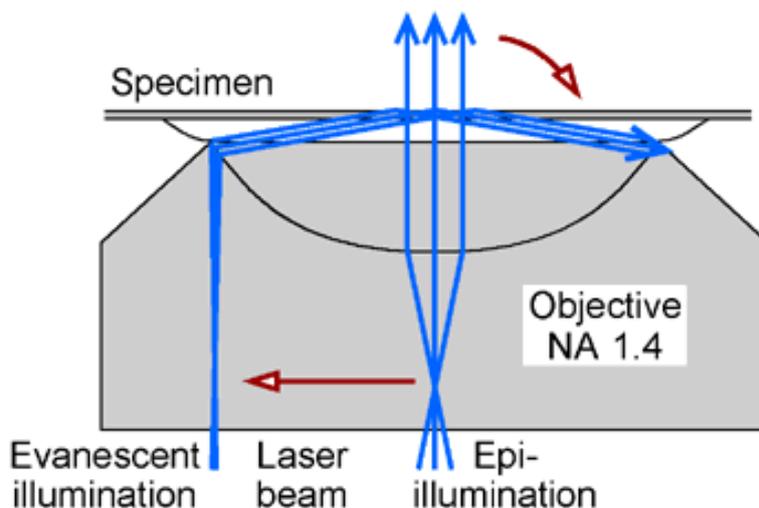


Figure IV-4 : Schéma des axes optiques empruntés par les rayons lumineux en fonction de leur point d'entrée en arrière de l'objectif. Plus les rayons sont excentrés en entrée à l'arrière de l'objectif et plus ils sont inclinés à sa sortie. Schéma provenant de <http://web.rcai.riken.jp/en/labo/molecular/research.html>.

Grâce à cette différence d'indice nous pouvons donc créer une onde évanescente au-dessus de l'interface entre les deux milieux. Nous avons deux possibilités d'observation pour pouvoir satisfaire à l'observation en molécule unique. La première solution testée est un système TIRF où l'excitation de la fluorescence se fait par l'objectif, destiné aussi à l'observation (TIRF en épifluorescence). Dans cette configuration le point d'entrée du faisceau laser à l'arrière de l'objectif détermine l'inclinaison du laser en sortie de celui-ci (Figure IV-4). Cette inclinaison  $\alpha$  est limitée par l'ouverture numérique ( $NA$ ) de l'objectif. ( $NA = n \times \sin \alpha$ ). Pour avoir une inclinaison supérieure à l'angle critique de  $67,5^\circ$ , il faut donc une ouverture numérique supérieure à 1,33, ce qui correspond à une ouverture numérique importante pour un objectif (et un coût tout aussi élevé).

Ainsi en déplaçant le point d'entrée du faisceau laser à l'arrière de notre objectif ( $NA = 1,49$ ), il est théoriquement possible de faire varier son inclinaison en sortie, c'est à dire au niveau de l'interface entre  $0^\circ$ , pour un faisceau centré à l'arrière, et  $83^\circ$ , pour un faisceau à l'extrême bord. Ces objectifs présentent un grossissement important (x60-x100), mais possèdent des distances de travail très courtes (0,2 mm), cependant avec une lamelle de verre très fine (#0 c'est à dire 0,085-0,13 mm d'épaisseur) il est théoriquement possible de travailler sur une bicouche séparée de la lamelle par une faible épaisseur de solution. Nous avons ainsi décidé de nous atteler à la réalisation d'un tel montage.

### 3. Alignement du TIRF

La première étape du montage consistait à mettre au point un microscope TIRF à l'aide d'un objectif TIRF APO N x63 Olympus®. Afin de guider le faisceau laser à l'arrière du microscope nous avons opté pour un système de 3 miroirs nous donnant accès à suffisamment de réglages pour ajuster au mieux l'alignement du faisceau laser à l'arrière du microscope, et donc de l'objectif (Figure IV-5).

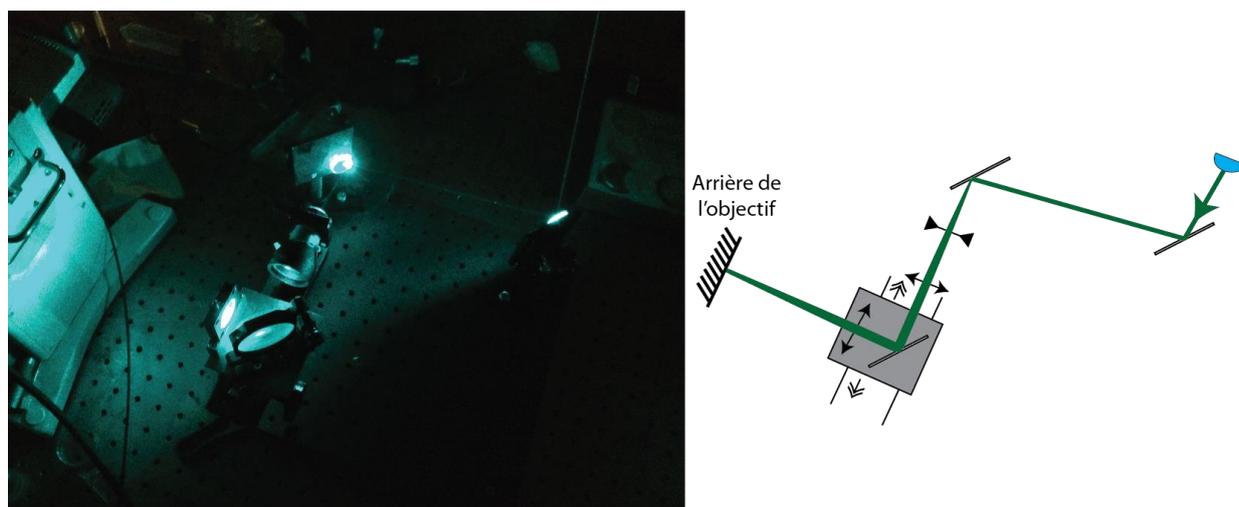


Figure IV-5 : Photo et schéma du montage servant à guider le laser en arrière du microscope

Sur le trajet entre le deuxième et le troisième miroir nous avons disposé un élargisseur de faisceau. Le faisceau laser est ensuite focalisé sur la face arrière de l'objectif par une lentille convergente de longueur focale 70 mm située après le troisième miroir. Le troisième miroir et cette dernière lentille sont fixés sur une platine à déplacement horizontal afin de pouvoir décaler le point d'entrée du faisceau laser à l'arrière de l'objectif et ainsi incliner ce dernier en sortie d'objectif. Le montage est aligné en vérifiant un retour parfait à l'aide d'un miroir annexe placé sur la platine, et donc supposé dans le plan perpendiculaire à l'axe optique du microscope.

Afin de vérifier l'alignement de notre montage nous avons réalisé des observations de billes de différents diamètres, et de solutions saturées en fluorophores. Les images obtenues par microscopie TIRF montrent une nette amélioration du rapport signal sur bruit, par rapport à celle obtenues en microscopie à épifluorescence classique, permettant la résolution d'objet unique.

L'imagerie TIRF sur lamelle est donc possible avec notre montage (Figure IV-6).

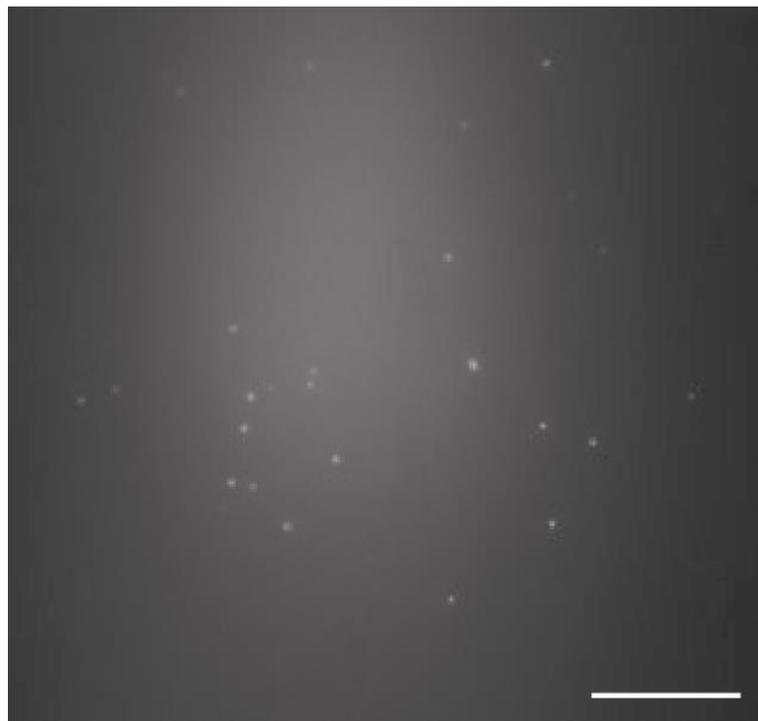


Figure IV-6 : Image en TIRF de microsphères TetraSpeck™ de diamètre 0,5 µm en solution. La barre d'échelle correspond à 10 µm.

#### 4. Conception du film noir

La formation des films noirs nécessite une architecture spécifique de la chambre. Il est nécessaire d'avoir deux compartiments communiquant par un trou dont le diamètre est celui désiré pour suspendre la membrane. Ce diamètre ne doit pas dépasser la centaine de micromètres sinon la stabilisation de la bicouche devient très difficile. De plus les bords du trou doivent avoir une épaisseur d'environ 25 µm (Montal & Mueller 1972). Afin d'obtenir une telle épaisseur il faut soit étirer un film percé, soit former un trou dans un matériau dont les bords peuvent être biseautés (Wonderlin et al. 1990). Enfin il faut que le matériau sur les bords du trou, et donc délimitant les deux compartiments, soit hydrophobe afin de pouvoir servir de support au cœur hydrophobe de la membrane (et à l'huile résiduelle qui entoure certainement la membrane sur les bords du trou).

Pour réaliser nos bicouches nous avons opté pour une technique de "peinture" lipidique (Pawlak et al. 1991), (Han et al. 2007). En pratique nous réalisons le mélange dans un tube en verre, dans lequel sont déposés les lipides : diphytanoyl phosphatidylcholine (DPhPC) et/ou diphytanoyl phosphatidylserine (DPhPS). Les lipides étant solubilisés dans le chloroforme, ce dernier est évaporé en soufflant de l'azote et laissé sous vide au moins 30 minutes. Les lipides sont ensuite resolubilisés dans du squalène, ou du décane. Ce mélange est alors injecté en excès au niveau du trou afin de saturer la surface du compartiment avant immersion dans le milieu de

manipulation. Le trou est par la suite peint par la technique de "peinture lipidique" qui consiste à faire des allers-retours à l'aide d'une bulle d'air soufflée par le cône qui contenait au préalable quelques microlitres du mélange lipide-huile. Toutes ces étapes sont contrôlées visuellement avec l'objectif x20 afin de bien apprécier les mouvements du cône et de travailler à une distance suffisante du fond de la chambre pour que le cône puisse s'insérer entre la lamelle et le support du film noir.

La transition entre le mélange huile-lipide bouchant le trou et l'apparition en son centre d'une bicouche est visible sous microscope. Cette formation peut aussi être suivie à l'aide de mesure de conductance de la bicouche, détaillée dans le chapitre sur les émulsions adhésives.

### 5. Réalisation du compartiment supérieur pour le film noir

Afin de satisfaire à la formation du film noir il a fallu opter pour un matériau hydrophobe. De ce fait nous avons décidé d'utiliser un tube Eppendorf™ (en polyéthylène) dans un premier temps. Cela pouvait donner lieu à une chambre peu couteuse.

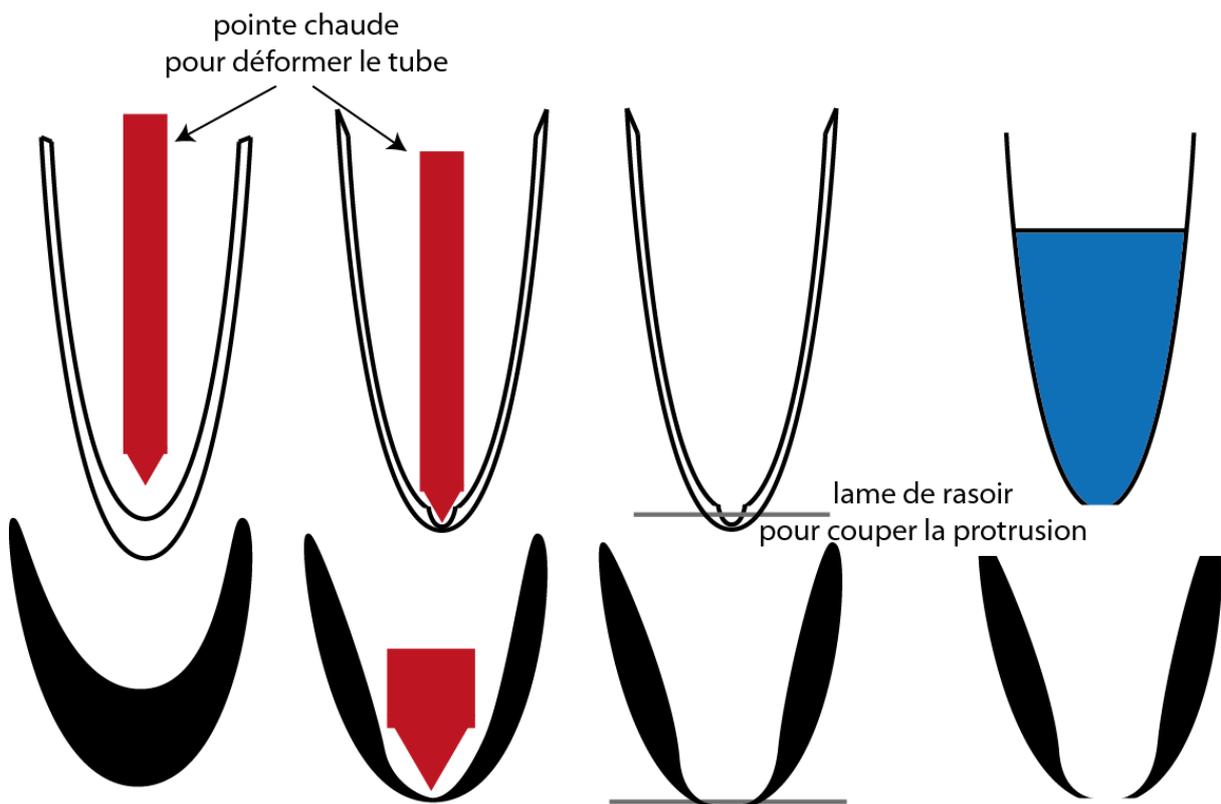


Figure IV-7 : Schéma montrant les différentes étapes de modification des tubes Eppendorf™ afin d'en faire des supports pour films noirs. Les différentes étapes sont représentées de gauche à droite. La partie supérieure présente le tube dans sa globalité et la partie inférieure un agrandissement de la zone servant à accueillir la bicouche.

Afin d'obtenir un trou biseauté sur les bords, nous avons mis au point avec l'aide de Jean Chevalet du laboratoire PHENIX à l'UPMC un procédé de modification du tube, inspiré de

Wonderlin et al. (Wonderlin et al. 1990). Celui-ci est dans un premier temps poinçonné à l'aide d'une pointe chauffée puis coupé à l'aide d'une lame de rasoir montée sur un tour (façon "trancheuse") jusqu'à obtenir une ouverture. Ainsi, le fond du tube présente un trou dont le diamètre peut varier de 50 à 1000  $\mu\text{m}$  avec les bords biseautés (Figure IV-7). Nous conservons les tubes Eppendorf™ dont le trou ainsi formé avait des bords réguliers et une centaine de micromètres de diamètre (Figure IV-11).

## 6. Mise en place dans la chambre

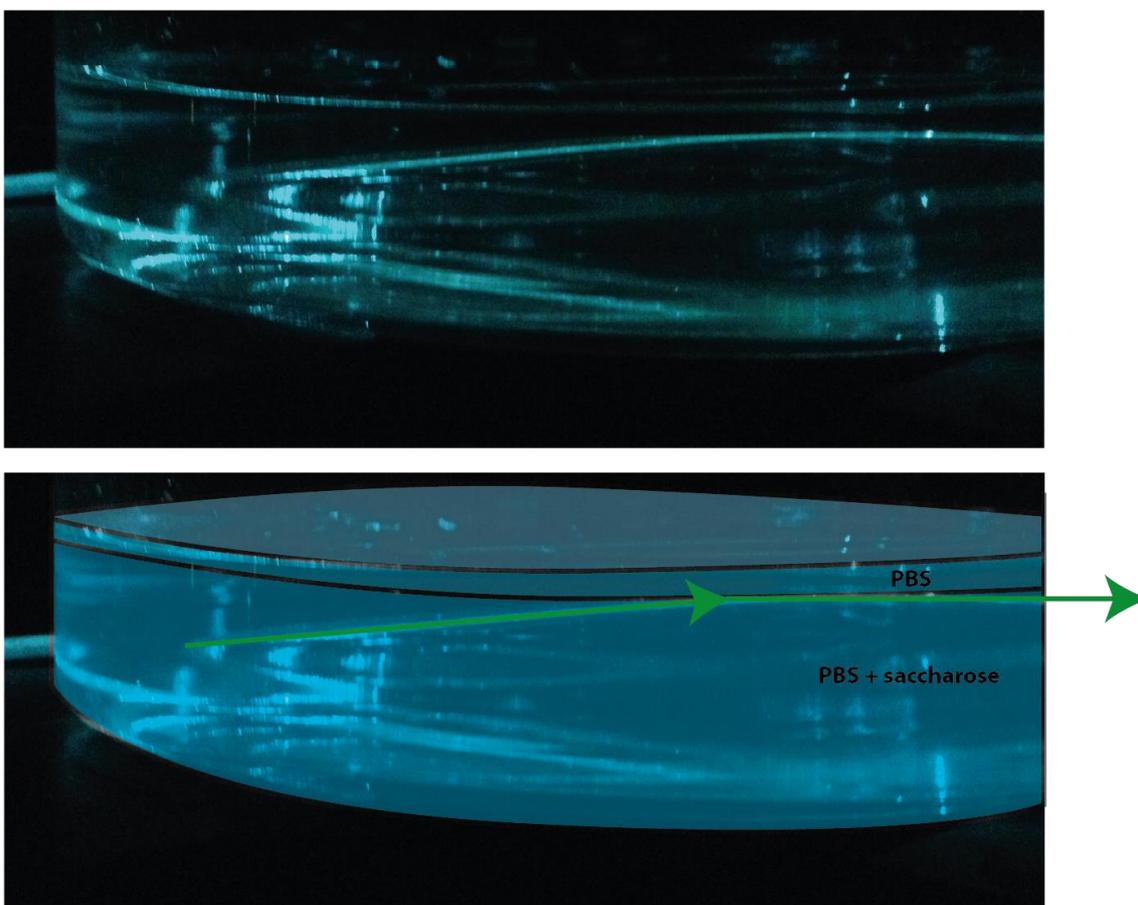


Figure IV-8 : la photo du haut montre la propagation du faisceau laser lorsqu'il pénètre avec une inclinaison supérieure à l'angle critique dans une boîte de Pétri contenant du PBS saturé en saccharose dans la partie inférieure et du PBS dans la partie supérieure. Le faisceau laser subit une réflexion totale montrant que les deux phases conservent leurs propriétés optiques respectives. Sur l'image du bas un schéma représentant les différentes phases et la propagation du faisceau laser est superposé.

La chambre inférieure consistait en une boîte de Pétri modifiée : fond partiellement remplacé par une lamelle de verre (Mat Tek™,  $\varnothing$  35 mm). Afin d'avoir la distance de travail la plus faible possible, le verre utilisé était d'épaisseur #0 (85-113  $\mu\text{m}$ ). Cette chambre était ensuite remplie d'une solution de PBS (Phosphate-buffered saline) saturée en saccharose (60 % massique), afin de permettre la différence d'indice nécessaire à la réflexion totale. Le tube Eppendorf est quant à lui rempli d'une solution de PBS et la communication entre les deux compartiments est

réalisée par une légère surpression du compartiment supérieur, en appuyant sur le dessus du compartiment afin de faire couler le PBS par le trou percé au fond du tube.

Le tube est maintenu au-dessus de la boîte de Pétri à l'aide d'une pièce façonnée pour l'accueillir et le bloquer. Cette pièce est montée sur une platine mécanique "trois axes", afin de pouvoir centrer le tube sur l'axe optique de l'objectif et aussi modifier sa hauteur dans la chambre.

Une fois la chambre en place, le film noir est formé comme décrit précédemment. Après vérification de la présence d'une membrane, le compartiment supérieur est lentement descendu de façon à ce que le film soit dans le plan focal de l'objectif. Cette étape doit être réalisée doucement afin de ne pas exercer de forces brutales sur la membrane suspendue.

### 7. Imagerie en molécule unique

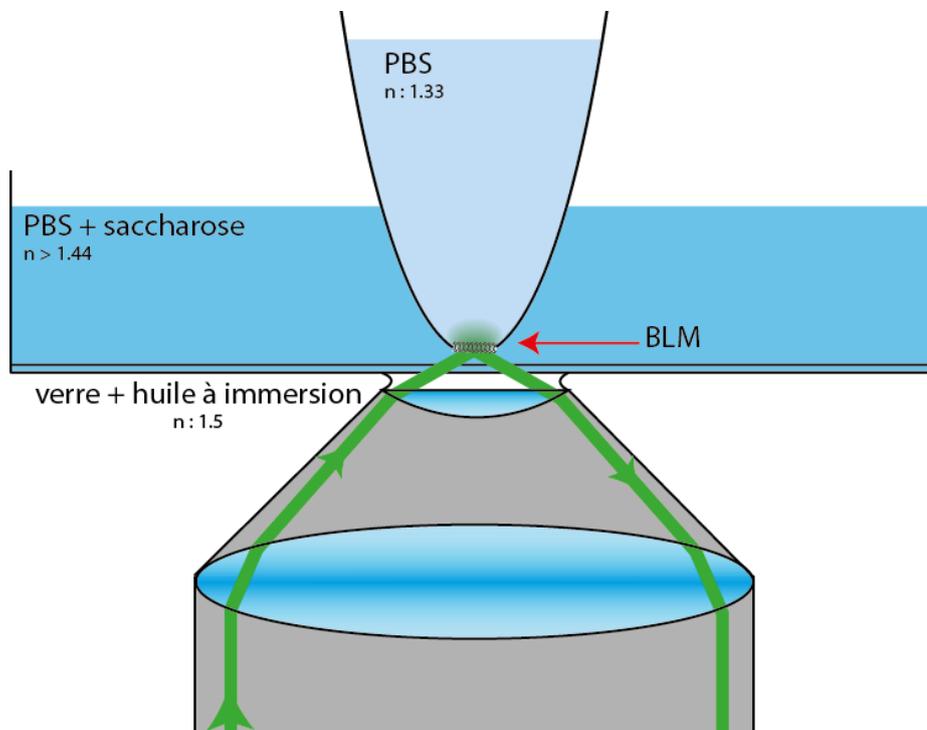


Figure IV-9 : Schéma du microscope à évanescente par épifluorescence sur bicouche suspendue

L'allure du montage est présentée en Figure IV-9.

Nous passons en illumination "TIRF" en déplaçant comme expliqué plus haut le faisceau laser pour modifier son point d'entrée sur la face arrière de l'objectif. Il existe différentes signatures de la présence de l'onde évanescente : i) la présence d'un cône d'illumination orienté dans le sens de propagation du faisceau associé à la diminution du bruit sur l'image, ii) la présence d'un faisceau réfléchi le long de l'axe optique à l'arrière du microscope d'intensité similaire au faisceau incident.

Ensuite le peptide est ajouté dans le compartiment supérieur à des concentrations comprises entre 1 et 10 nanomolaires. Les images obtenues avec des temps d'exposition de 200 ms par image nous permettent d'observer des peptides à l'échelle de la molécule unique (Figure IV-10). Cependant l'intensité de fluorescence d'un peptide fluorescent reste faible par rapport au bruit. Le rapport signal sur bruit (SNR) est au mieux de 1,1 pour les molécules d'intérêts, tandis que l'écart type du bruit divisé par le bruit moyen est de 0,02, soit 20% du signal observé. Il est donc nécessaire d'améliorer le système pour réaliser de l'imagerie en molécule unique.

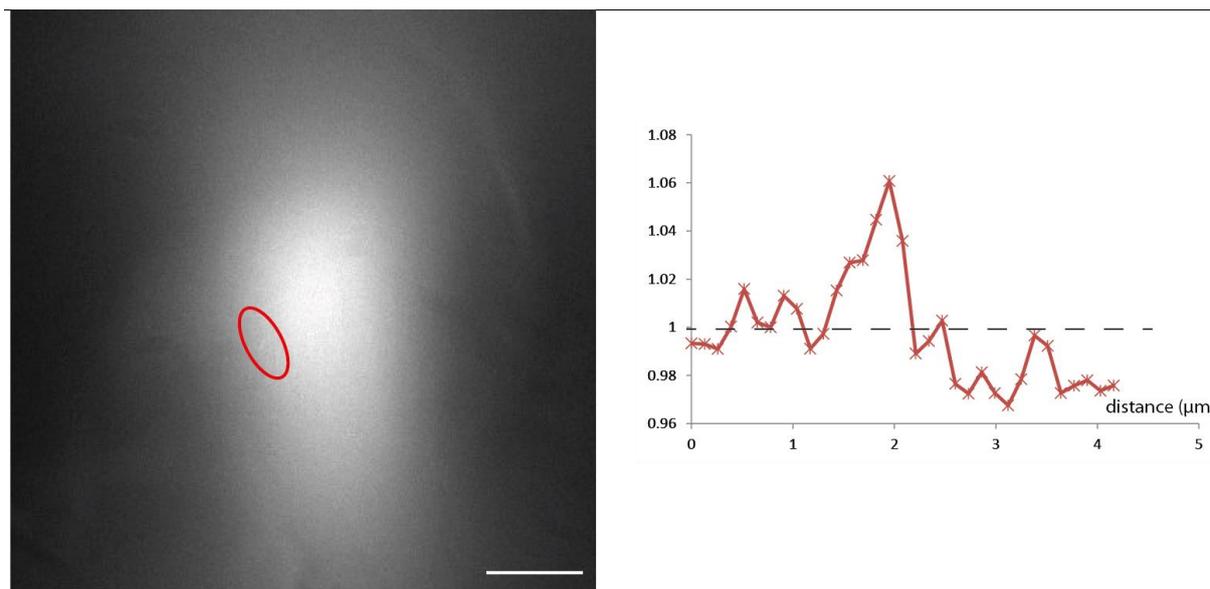


Figure IV-10 : Observation en molécule unique à l'aide du TIRF en épifluorescence. L'ellipse rouge est centrée sur une molécule unique. La barre d'échelle correspond à 10 µm. La courbe à droite représente l'évolution du rapport signal sur bruit le long du grand axe de l'ellipse. Le pic à 2 µm correspond à la présence d'une molécule fluorescente.

## **D. Évolutions**

Le système décrit ci-dessus nous a permis d'observer quelques molécules uniques aux abords de la membrane. Cependant, il présentait de nombreuses limitations et des améliorations sont possibles. La partie qui va suivre décrit étape par étape les modifications apportées à l'expérience afin de l'optimiser. L'optimisation prend en compte la facilité de réalisation de l'expérience, sa reproductibilité, et le SNR.

### **1. Consolidation de la chambre supérieure**

Bien que le montage décrit précédemment nous permette de réaliser une acquisition suffisamment sensible pour la molécule unique, nous étions limités par la diffusion de la lumière d'excitation à l'intérieur du compartiment supérieur. En effet, si l'utilisation d'un tube Eppendorf<sup>TM</sup> rendait l'expérience facilement réalisable, la largeur du faisceau laser en illumination TIRF étant supérieure au diamètre du trou servant à accueillir la membrane ( $\sim 100 \mu\text{m}$ ), il y avait une importante diffusion de la lumière d'excitation dans les parois du tube générant de la fluorescence parasite, contribuant fortement au bruit.

Afin de diminuer cette composante en bruit, il fallait donc remplacer le tube en plastique par un matériel opaque pour notre longueur d'onde de travail afin de préserver le compartiment supérieur de toute lumière. Nous avons décidé de réaliser un compartiment en inox. Cependant il n'est pas possible de façonner l'inox afin que le fond du compartiment soit percé sur  $100 \mu\text{m}$  de diamètre et biseauté sur ses bords, ses propriétés de mouillage du mélange huile-lipide ne sont a priori pas non plus favorables à la formation de BLM. Ainsi il nous fallait un second matériau pour accueillir la bicouche suspendue. Une autre méthode courante dans la réalisation des films noirs est de peindre sur un ruban de Polytétrafluoroéthylène (PTFE), qui offre un matériau hydrophobe et fin permettant la formation de la bicouche. Le ruban est préalablement percé à l'aide d'une aiguille (Montal & Mueller 1972) puis étiré pour ajuster le diamètre du trou. Nous avons utilisé du ruban de PTFE de  $0,1 \text{ mm}$  d'épaisseur que nous fixions sur l'une des extrémités du cylindre en inox, à l'aide d'une goulotte destinée à accueillir un joint torique (Figure IV-11).

Le maintien du compartiment supérieur était assuré par une plaque en laiton percée au diamètre des tubes Eppendorfs et le bourrelet supérieur du tube Eppendorf permettait son maintien en position. Cette plaque ne permettant pas d'accueillir notre cylindre en inox, nous avons ajouté un pas de vis sur le cylindre à l'extrémité opposée au film noir. Nous avons réalisé une seconde plaque en laiton présentant le même pas de vis, ainsi qu'un contre-écrou afin de pouvoir bloquer

le cylindre et contrôler son mouvement dans la chambre uniquement grâce à notre platine "3 axes".

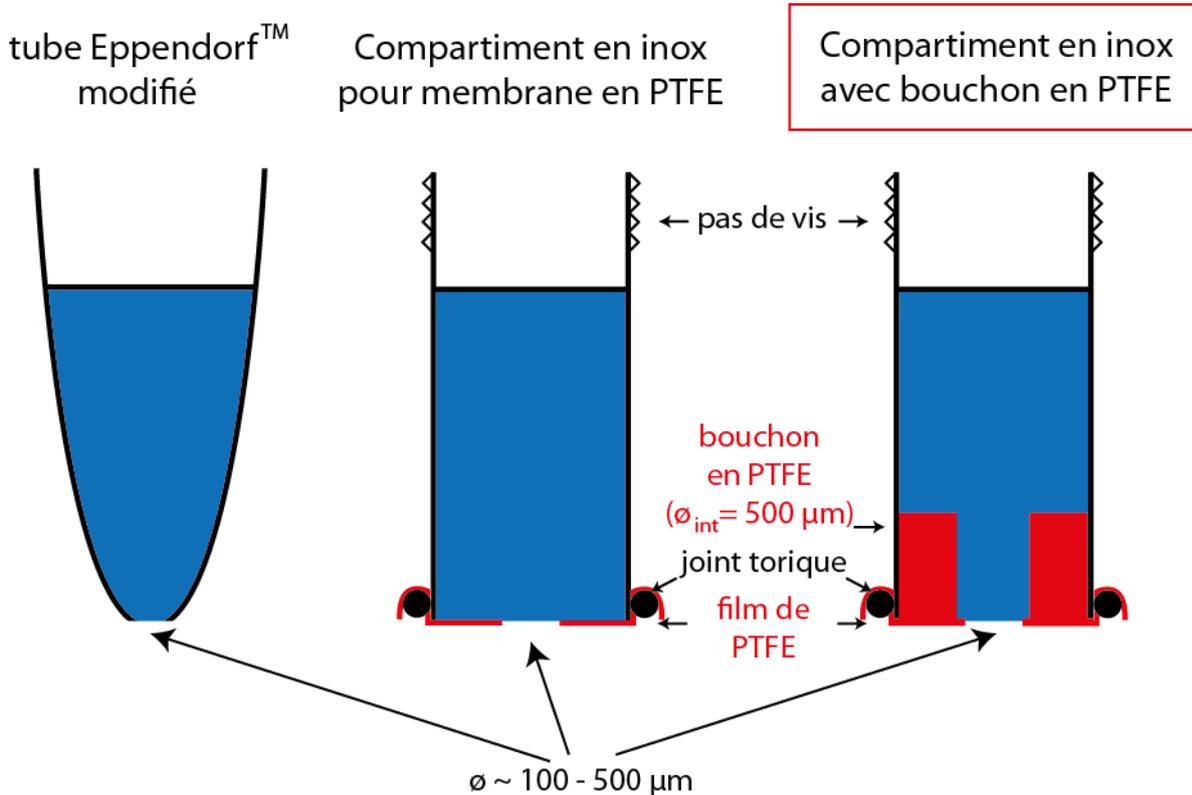


Figure IV-11 : Schémas représentant les différents compartiments supérieurs utilisés au cours des évolutions du montage. Le compartiment actuellement utilisé est encadré en rouge.

Comme supposé l'utilisation du PTFE nous permet toujours de former des membranes et l'inox ne diffuse plus le faisceau laser (mais le film fin de PTFE au bord du trou laisse toujours passer une lumière gênante). Cependant nous éprouvions des difficultés à réaliser la mise au point sur la bicouche. En effet, ce nouveau système présente un compartiment supérieur rigide et ne pouvant plus quitter son logement. Le tube Eppendorf pouvait se dégager de la pièce en laiton car il était seulement soutenu mais pas vissé. L'utilisation du cylindre en inox impose donc que la membrane soit le point le plus bas du compartiment supérieur, sinon l'inox entre en contact avec la lamelle du compartiment inférieur avant que la membrane ne soit dans le plan focal de l'objectif.

Afin de pouvoir incliner le cylindre en inox pour que la membrane soit toujours le point le plus bas, et qu'elle soit parallèle à la lamelle, nous avons équipé la platine mécanique "3 axes" d'une plaque trait-point-plan. Nous avons pu ainsi observer du peptide à l'échelle de la molécule unique, cependant la mise au point restait fastidieuse.

La difficulté à réaliser la mise au point sur la membrane réside essentiellement dans la distance de travail des objectifs TIRF qui ne peuvent imaginer que sur  $200 \mu\text{m}$ , lamelle incluse. Il est donc

très difficile d'aligner sur une hauteur si faible la lamelle, le milieu inférieur et la membrane. Ceci suggère que les observations réalisées sur le tube Eppendorf étaient essentiellement faites après que le tube Eppendorf<sup>TM</sup> a touché la lamelle. Il se peut donc que nous ayons observé fréquemment un amas de lipides et d'huile formé entre la lamelle et l'ouverture accueillant la membrane.

Nous avons donc décidé de nous affranchir de la distance de travail liée à l'objectif TIRF.

## 2. Modification du chemin optique

Le nouveau chemin optique pour la formation d'un champ d'évanescence ne passe plus par l'objectif. Nous nous affranchissons ainsi de l'importante contrainte sur l'ouverture numérique qui nous imposait une distance de travail très faible et nous pouvons utiliser, pour l'observation, un objectif à grande distance de travail, en nous assurant cependant que la luminosité reste du même ordre de grandeur.

La luminosité est reliée aux caractéristiques de l'objectif par la relation suivante :

$$\text{Luminosité} \propto \left( \frac{NA^2}{M} \right)^2 \quad (\text{IV.3})$$

Où NA est l'ouverture numérique de l'objectif et M son grossissement.

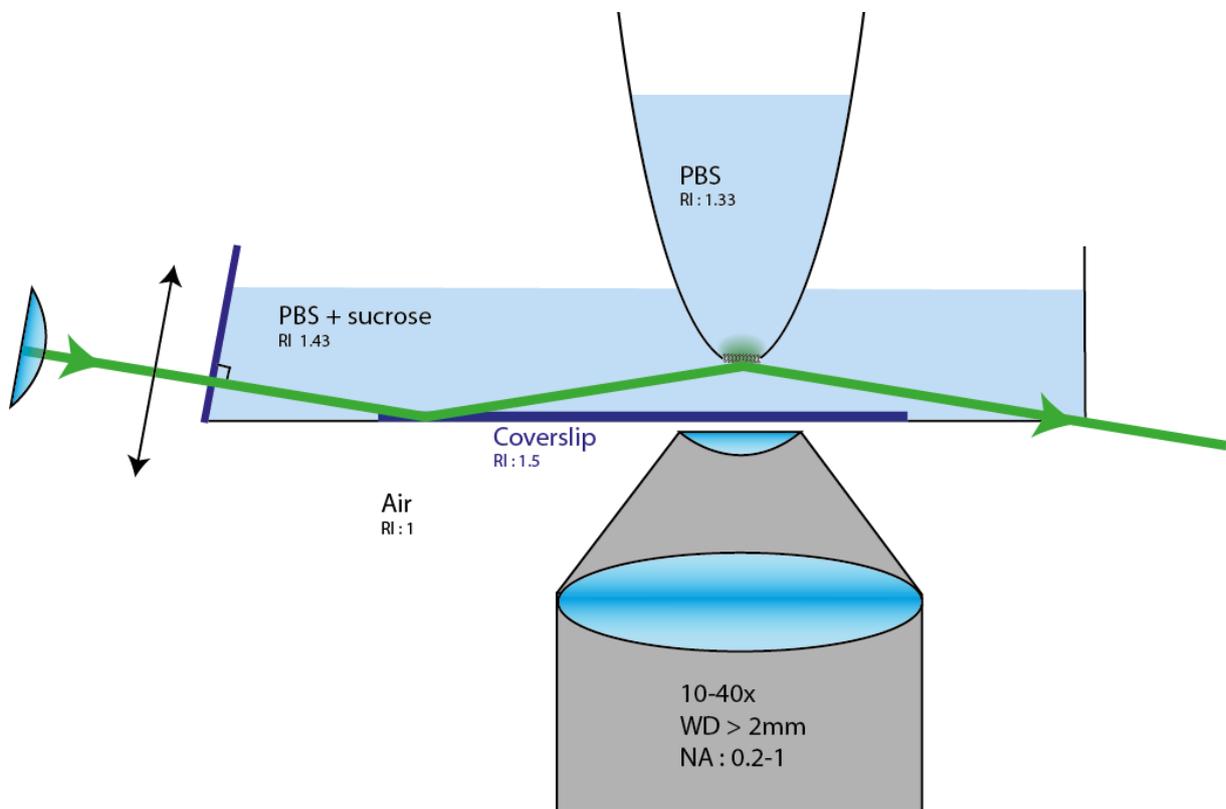


Figure IV-12 : schéma du trajet du faisceau du laser afin de réaliser une réflexion totale sur la membrane.

L'objectif x10 (NA = 0,25) que nous possédons présente une distance de travail supérieure au millimètre, nous pouvons donc former le film noir loin de la lamelle du compartiment inférieur puis réaliser nos observations sans avoir besoin de l'abaisser. Sa luminosité n'est que 3 fois plus faible que celle de l'objectif "TIRF" utilisé dans la configuration précédente. Enfin, avec un objectif 10x nous conservons une résolution latérale de 800 nm par pixel, ce qui nous permet de positionner nos molécules correctement sur la bicouche. La résolution spatiale dans ce plan n'est d'ailleurs pas d'un intérêt majeur pour observer la translocation. Nous perdons *a priori* beaucoup en résolution verticale, mais dans le cas d'une excitation de la fluorescence par onde évanescente, c'est la profondeur de pénétration qui fixe cette résolution, ce n'est donc pas limitant ici.

Le montage étant réalisé sur un microscope inversé il ne nous était pas possible de modifier le chemin optique avec un prisme comme il est commun de le faire pour la microscopie TIRF (Axelrod 2001), c'est-à-dire en utilisant un prisme sous la lamelle afin de pouvoir atteindre l'angle critique au niveau de l'interface souhaitée ; de plus cela aurait requis une géométrie complètement différente des compartiments

Nous avons ainsi décidé d'amener le faisceau laser par le côté du compartiment inférieur. L'objectif x10 n'étant pas un objectif à immersion, il existe une couche d'air sous la boîte de Pétri, et donc la possibilité d'avoir une réflexion totale dans la boîte (Figure IV-12). Enfin après cette réflexion le faisceau laser subit une seconde réflexion au niveau de la membrane, générant l'onde évanescente (Figure IV-12).

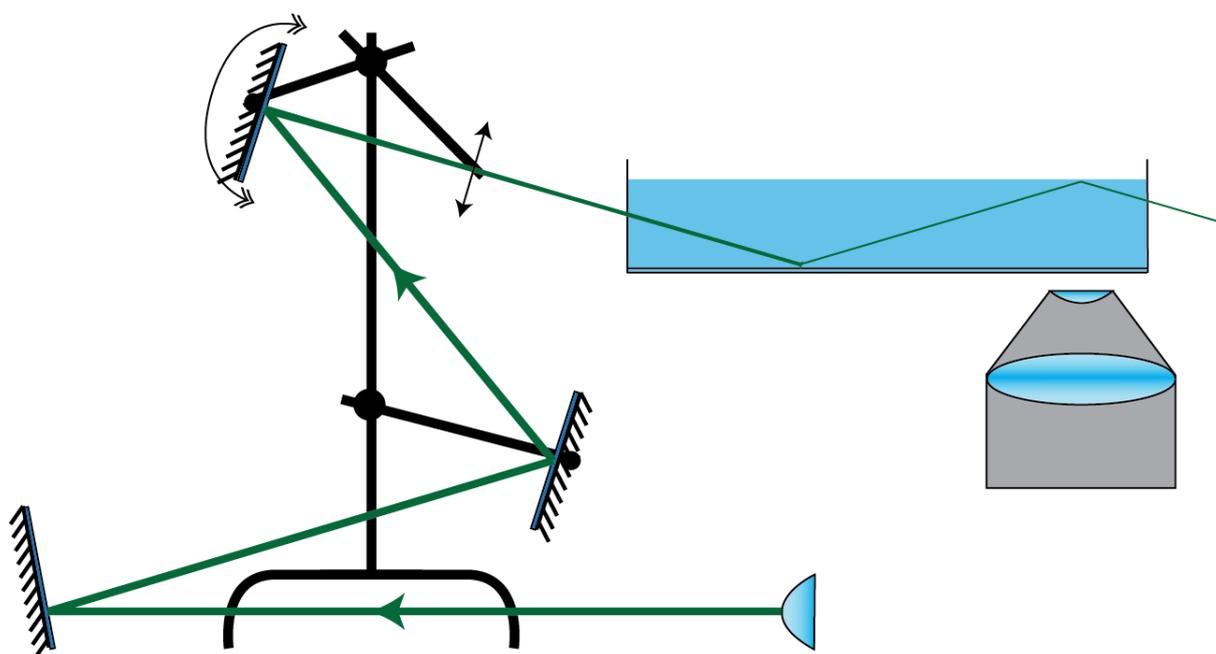


Figure IV-13 : Schéma du montage permettant de guider le faisceau laser pour réaliser l'illumination TIRF

Le faisceau laser est donc incliné vers le fond de la chambre, à l'aide d'un jeu de 3 miroirs permettant un réglage précis. Le dernier miroir est maintenu sur une potence et son inclinaison ainsi que sa position sont ajustées afin de générer l'onde évanescente sur la membrane (Figure IV-13). L'espace entre la membrane et la lamelle permet d'observer les réflexions totales par la propagation du faisceau laser le long de la chambre. La position du laser est aussi suivie à l'aide du microscope en observant la réflexion de ce dernier sur le film de PTFE sans filtre, mais à l'aide d'un filtre de densité neutre pour atténuer son intensité.

Ce système nous a permis de réaliser des observations de molécule unique, avec un meilleur signal sur bruit que les observations réalisées à l'aide de l'objectif TIRF (1,2 contre 1,1 précédemment) (Figure IV-14). Cependant le bruit reste élevé, essentiellement car le faisceau laser éclaire une zone plus large que la membrane. Le ruban de PTFE ayant été étiré, il se peut que celui-ci soit partiellement transparent à la lumière, ce qui expliquerait la présence de fluorescence parasite excitée par la lumière diffusée au travers du PTFE. Une seconde source de lumière parasite pourrait être générée lors de l'entrée du laser dans la boîte de pétri qui se fait par une réfraction au travers d'un plastique courbé, ce qui pourrait disperser le faisceau dans le compartiment inférieur.

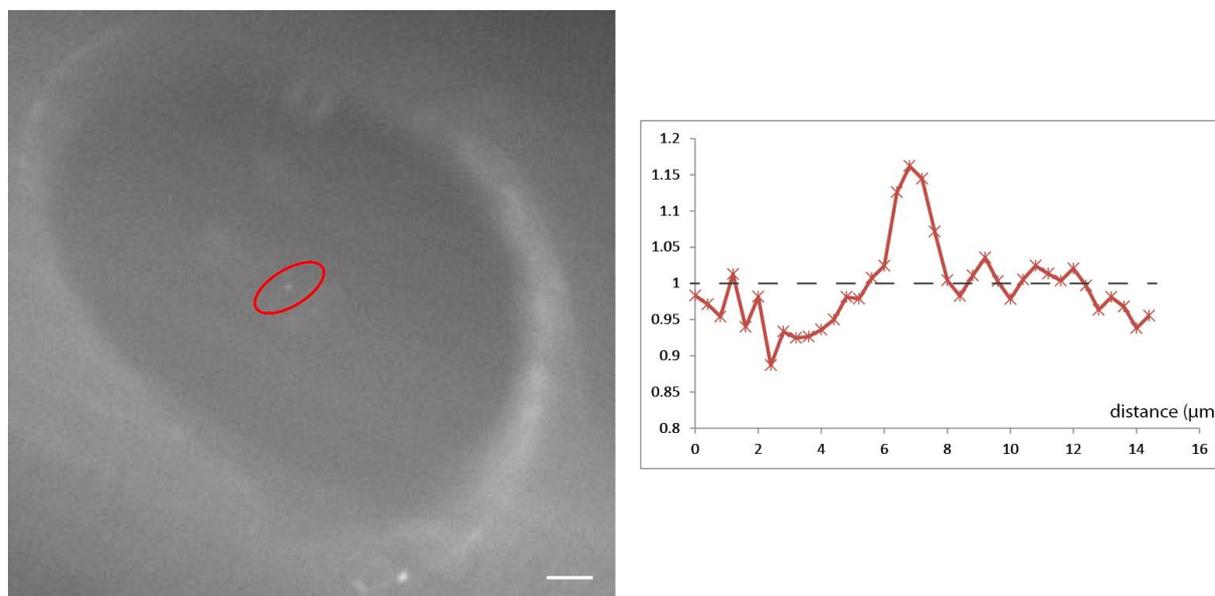


Figure IV-14 : Observation en molécule unique à l'aide du TIRF par éclairage latéral. L'ellipse rouge est centrée sur une molécule unique. La barre d'échelle correspond à 10 μm. La courbe à droite représente l'évolution du rapport signal sur bruit le long du grand axe de l'ellipse. Le pic à 7 μm correspond à la présence d'une molécule fluorescente.

### 3. Support de membrane

Parmi les sources de bruit restant nous nous heurtions à l'épaisseur du PTFE qui était transparent au laser dans nos conditions. Le faisceau ayant un diamètre supérieur au millimètre alors que notre membrane possède un diamètre proche de 100 μm. Ainsi nous avons décidé de

fabriquer un bouchon d'un millimètre d'épaisseur composé en PTFE. Ce bouchon est percé en son centre d'un diamètre de 500  $\mu\text{m}$ . Ensuite le ruban devant accueillir la membrane est percé comme précédemment et est aligné sur le bouchon de PTFE. Ainsi nous réduisons la lumière transmise par le laser sur le diamètre percé dans le bouchon. Cette première réduction du bruit nous a permis une amélioration du contraste sur nos images.

#### 4. Compartiment inférieur

Enfin l'autre source de bruit sur notre montage est la déviation du rayon au travers du bord courbé de la boîte de pétri. Afin de supprimer la diffusion de lumière à ce niveau, nous avons décidé de façonner une chambre en inox dont l'un des côtés présente une vitre inclinée à  $70^\circ$  ce qui correspond à l'angle nécessaire pour la réflexion totale sur le film noir. Il fallait aussi aménager le fond de la chambre pour pouvoir y placer une lamelle de verre (Figure IV-15). Afin de pouvoir utiliser l'objectif TIRF, si souhaité, la lamelle est centrée dans la chambre et un débord de 100  $\mu\text{m}$  d'épaisseur la recouvre sur ses bords. La lamelle est ensuite bloquée dans son logement à l'aide d'une bague en inox fileté aux dimensions de la lamelle. Un joint fin de PDMS peut être ajouté pour assurer l'étanchéité, si besoin.

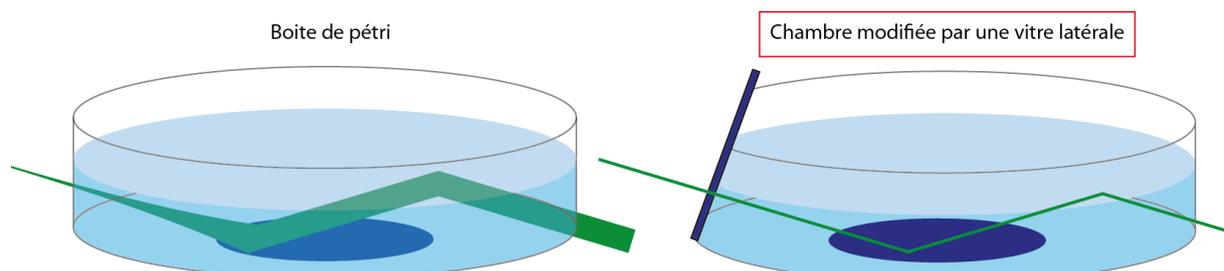


Figure IV-15 : Schémas représentant les deux compartiments ayant été utilisés pour les expériences de TIRF. Le compartiment de gauche est en plastique, tandis que le compartiment de droite (celui sur le montage actuel) est conçu en inox. Les parties en bleu foncé représentent les lames de verre. Il y en a une dans le fond pour permettre l'observation et une latérale pour l'entrée du laser dans le compartiment.

À l'aide de ce système le faisceau se propage désormais de façon rectiligne dans le compartiment inférieur. Cependant le faisceau n'éclaire toujours pas la membrane seulement mais aussi le PTFE car son diamètre est trop grand : une autre amélioration possible consisterait à réduire le diamètre du faisceau incident pour limiter le bruit. Les images acquises ainsi restent utilisables pour une approche en molécule unique, comme le montrent les quelques acquisitions réalisées où l'on peut distinguer des peptides uniques sur la membrane avec un SNR de 1,4 qui semble satisfaisant pour distinguer aisément des molécules uniques (Figure IV-16).

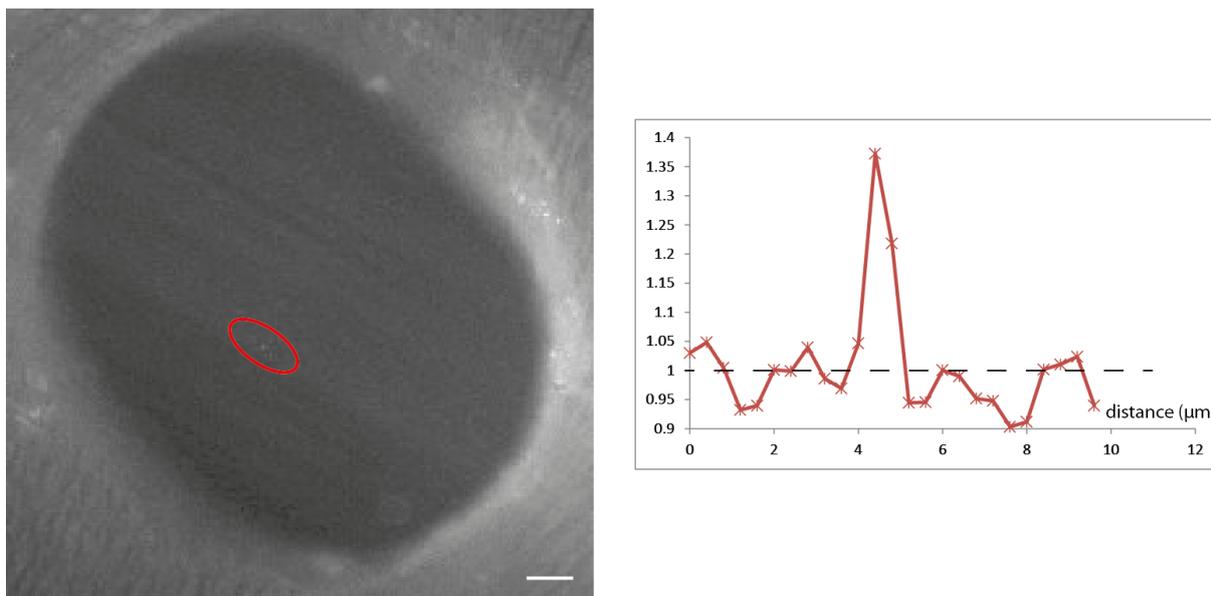


Figure IV-16 : Observation en molécule unique à l'aide du TIRF par éclairage latéral, et après modification du compartiment inférieur. L'ellipse rouge est centrée sur une molécule unique. La barre d'échelle correspond à 10  $\mu\text{m}$ . La courbe à droite représente l'évolution du rapport signal sur bruit le long du grand axe de l'ellipse. Le pic à 4  $\mu\text{m}$  correspond à la présence d'une molécule fluorescente.

## 5. Fibre optique

Un autre élément pouvant être amélioré concerne aussi bien le réglage de l'angle que le diamètre du faisceau sur la membrane. Afin d'obtenir une réflexion sur la membrane et non sur le film de PTFE nous avons décidé d'utiliser une fibre optique monomode pour guider le laser. Ainsi l'optique est dépourvue de figures d'interférences, et le diamètre du faisceau est réduit à la sortie de la fibre à l'aide de collimateurs. Nous avons ainsi pu diminuer la taille du faisceau à  $\sim 0,4$  mm. Le montage actuel devrait nous permettre une observation en molécule unique sur bicouche suspendue avec un bruit minimisé, bien qu'aucune expérience n'ait encore été réalisée depuis l'ajout de la fibre optique.

Il demeure que notre système d'acquisition (sensibilité de la caméra et analyse des images) n'est pas encore optimal pour de l'observation en molécule unique. De plus par manque de temps je me suis arrêté à la conception et caractérisation du montage mais je n'ai pas pu réaliser d'étude de translocation à l'aide de ce montage. En revanche des idées d'approches ont été développées afin d'observer ce phénomène et seront décrites dans la partie suivante. Certaines de ces idées ont pu être mises en œuvre mais n'ont pas été reproduites suffisamment de fois pour permettre de conclure.

## E. Perspectives pour l'étude de la translocation

En l'état la technique que nous avons développée nous permet de suivre des molécules uniques et donc d'obtenir des informations quant à leur diffusion. À partir du coefficient de diffusion il est possible de faire la distinction entre un peptide libre et un peptide lié à la membrane, pouvant nous renseigner sur les étapes d'adhésion à la bicouche.

Cependant, pour pouvoir observer la translocation il ne suffit pas d'utiliser l'onde évanescente comme une technique d'imagerie aux abords de la membrane. En effet, l'information qui nous intéresse est la traversée de la membrane et pas seulement l'adhésion.

### 1. Utilisation du champ évanescent

L'onde évanescente génère un champ d'intensité décroissant exponentiellement avec la distance à l'interface (Figure IV-17) (Axelrod 1984). De plus, théoriquement, ce champ possède une intensité plus importante à sa base que l'intensité du laser réfléchi. Cependant cette condition n'est vraie que pour une réflexion avec un angle proche de l'angle critique à quelques degrés.

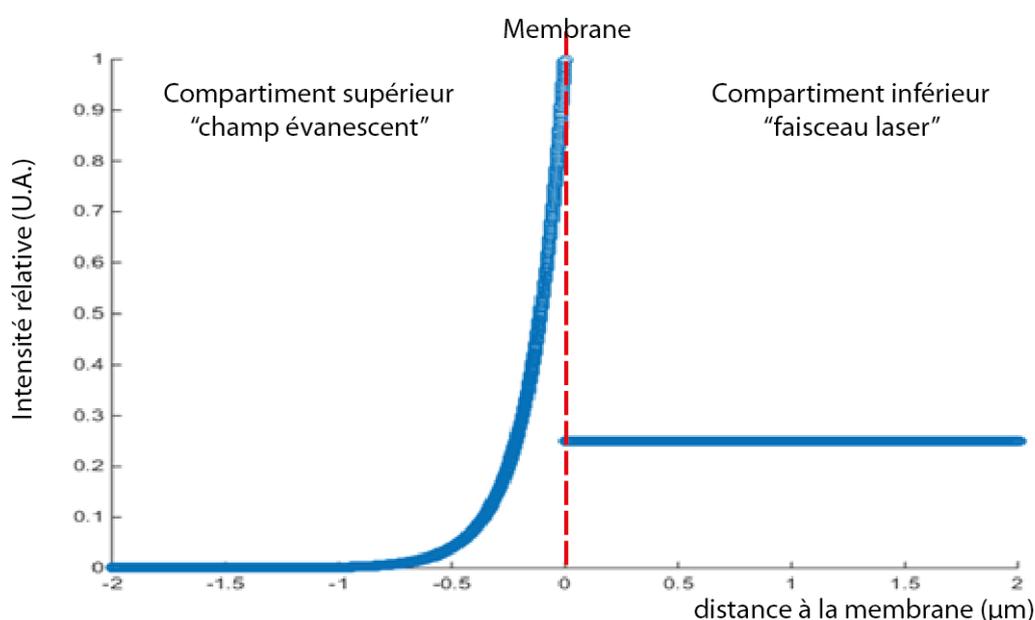


Figure IV-17 : profil théorique de l'intensité le long de l'axe Z pour un angle de 70° à l'interface (PBS + sucrose) - PBS. La membrane se situe au zéro d'altitude. L'intensité est relative par rapport à sa valeur maximale.

Ainsi, nous pouvons espérer distinguer un peptide, d'un côté ou de l'autre de la membrane, en observant l'évolution du profil d'intensité du peptide qui n'est pas le même selon qu'il est dans le faisceau ou dans le champ évanescent. De fait, un peptide diffusant au-dessus de notre bicouche se déplace dans le champ évanescent et son intensité évolue exponentiellement avec

la distance à la bicouche. Tout peptide se situant de ce côté de la membrane voit son intensité augmenter progressivement à mesure qu'il se rapproche de la membrane. Un peptide traversant la membrane, quant à lui, voit son intensité varier brusquement : réduction d'environ 70% lors du passage du champ évanescent au faisceau incident, puis, son intensité de fluorescence reste constante. Il serait donc théoriquement possible de déduire de l'évolution temporelle de son intensité de fluorescence de quel côté de la bicouche se situe un CPP. Cela reste cependant très putatif car les profils d'illumination expérimentaux ne sont jamais les théoriques (à cause de la distribution des angles d'incidences dans le faisceau incident qui n'est pas parfaitement parallèle et de la géométrie de l'interface jamais parfaitement plane)

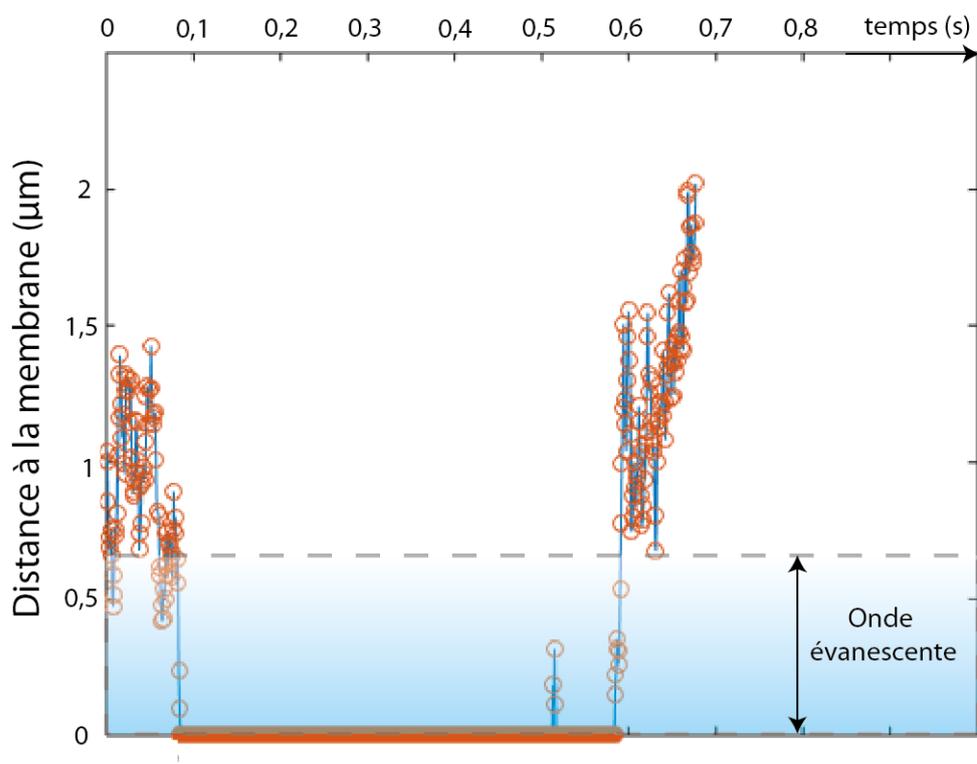


Figure IV-18 : Simulation de la diffusion d'une molécule selon un mouvement Brownien le long de l'axe Z au cours du temps. Aux abords de la membrane le peptide peut soit coller à cette dernière, soit traverser, soit revenir en arrière, l'adhésion à la membrane étant l'état favorisé dans notre simulation. Il apparaît qu'un peptide du côté supérieur ne pourra être vu comme progressant le long de l'onde évanescente seulement pour un échantillonnage plus court que 10 ms. L'onde évanescente est représentée par le dégradé bleu.

De plus, une telle approche requiert une fréquence d'acquisition suffisamment rapide pour qu'une molécule ne traverse pas tout le champ évanescent en une image. La hauteur caractéristique de notre champ évanescent est de 600 nm (Figure IV-17) et la diffusion d'un peptide, de  $\sigma \sim 1$  nm d'après la relation de Stokes-Einstein, est de l'ordre de  $10 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  dans l'eau. Il est donc aisé de simuler le temps que met une molécule à traverser le champ évanescent en supposant une diffusion brownienne (détaillé dans l'annexe VI.C). Il faut donc au minimum

une image toutes les 10 ms afin de pouvoir observer au moins deux intensités différentes, pour une même molécule, dans le champ évanescent avant le contact avec la membrane (Figure IV-18). Notre caméra actuelle ne nous permettant qu'une acquisition avec des temps d'exposition de 200 ms, il nous est impossible de réaliser ce type d'observation.

Une dernière information que l'on peut espérer obtenir à partir de l'utilisation de l'onde évanescente est le coefficient de diffusion de notre peptide. En effet, il nous est possible de repérer un peptide en  $x$ ,  $y$  et  $z$  à chaque instant de donc de définir son déplacement quadratique moyen, paramètre qui est directement lié à la diffusion d'une molécule. Ainsi nous pouvons essayer de déterminer s'il existe 2 états de diffusion, un en solution et un lié à la membrane pour en déduire le temps de résidence moyen dans la bicouche avant translocation. Il est aussi possible de corrélérer ce temps moyen avec la traversée ou non de la bicouche.

## **2. Expérience d'extinction**

Une deuxième façon d'utiliser ce montage pour observer la translocation est d'utiliser un extincteur de fluorescence dans l'un des deux compartiments afin de déterminer de quel côté se trouve notre peptide. L'utilisation d'extincteur se liant au fluorophore (comme des anticorps) est problématique car le peptide peut être capable de traverser la bicouche avec la cargaison qui lui est attaché. Il se peut donc que les extincteurs de fluorescence traversent la bicouche à l'aide du peptide, maintenant l'extinction du signal quel que soit le compartiment dans lequel se trouve le peptide.

Il faut donc réaliser ces expériences avec un agent d'extinction présent dans le second compartiment. Ainsi nous pouvons suivre le peptide lors de son approche de la bicouche, et une fois celle-ci traversée nous perdons le signal de fluorescence de façon soudaine. Comme évoqué précédemment si nous voyons une diminution de l'intensité due à la décroissance en intensité du champ évanescent cela suggère que le peptide ne traverse pas, mais qu'il est arrêté par la bicouche. Cependant dans le cas où le peptide traverse de l'autre côté, alors celui-ci se retrouve associé à l'extincteur de fluorescence, ce qui induit son extinction brusque.

Une alternative est d'utiliser des molécules éteignant la fluorescence sans se lier au fluorophore, comme le bleu trypan. Par contre ces molécules sont généralement capables de diffuser lentement au travers des bicouches, ce qui impose aux expériences d'être réalisée sur des échelles de temps courts.

### **3. Transfert d'énergie par résonance de Forster**

Une dernière adaptation du montage consisterait en l'utilisation des techniques de transfert d'énergie par résonance de Forster (FRET, déjà introduit en I.F.3.b))

Cette technique peut être utilisée afin de palier le risque de traversée des extincteurs. Il est possible de marquer l'un des deux compartiments avec un fluorophore permettant d'observer du FRET en présence du peptide fluorescent.

Un tel montage reste cependant coûteux car il est préférable en FRET de pouvoir suivre les deux fluorophores afin de pouvoir travailler simultanément en diminution locale de fluorescence pour le donneur, et en augmentation sur l'accepteur. Il faut donc posséder un montage sur lequel les longueurs d'onde d'excitation de chacun des fluorophores sont disponibles ainsi que les filtres associés.

### **4. TIRF avec émulsion**

Une dernière perspective pour ce microscope serait de le combiner aux approches en gouttelettes développées au chapitre précédent (III). Dans cette configuration le compartiment inférieur contient toujours une solution de PBS saturée en saccharose, par contre le compartiment supérieur est rempli d'une solution de squalène saturée en lipides.

Sur une des électrodes de l'amplificateur électrique, préalablement couverte d'agarose, ayant permis les mesures de capacitances réalisées dans le chapitre précédent, est déposée une goutte de tampon contenant le CPP à la concentration voulue. L'électrode est ensuite amenée au fond de la chambre supérieur (Figure IV-19).

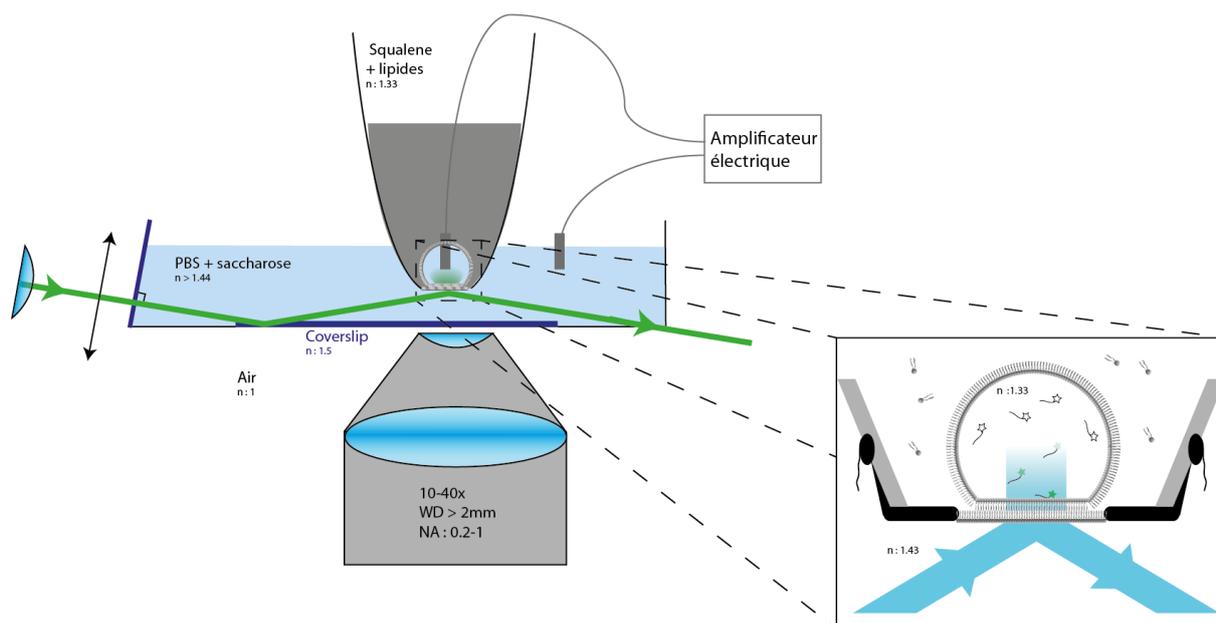


Figure IV-19 : Schéma de principe du microscope à évanescente sur bicouche suspendue à l'interface d'une émulsion inverse. Le détail de la bicouche est présenté dans l'encart.

Du fait de la présence des lipides dans l'huile, une monocouche se forme à chaque interface huile-eau, et lorsque la goutte atteint l'interface entre les deux compartiments, une bicouche se crée entre la goutte et le compartiment inférieur. La formation de la bicouche peut être suivie à la fois électriquement et optiquement.

Toutes les mesures proposées au cours de ce chapitre peuvent ainsi être réalisées sur ce système. Cependant cette expérience n'a pas encore été entreprise au moment de l'écriture.

Pour conclure, nous avons développé un microscope permettant d'observer des molécules uniques sur une bicouche suspendue en utilisant une illumination TIRF. Ce système nous a permis d'observer des CPP uniques aux abords d'un film noir avec un signal sur bruit convenable pour les distinguer (SNR ~ 1,4). Cependant, nous n'avons pas encore tenté d'observer la translocation à l'aide de ce microscope notamment car notre caméra n'est pas assez rapide pour l'observation en molécules uniques.

## V. Conclusion

---

Au cours de cette thèse, nous avons pu identifier un type de GAG, les HS, comme partenaire d'interaction de la pénétratine avec la membrane cellulaire, à l'aide de mesure de force. Nous avons aussi mis en évidence que les acides sialiques modifient le nombre de partenaires à la surface de la cellule en masquant des sites normalement non disponibles qui ne sont pas majoritairement des HS.

Nous avons pu mettre en évidence le phénomène de translocation de la pénétratine lié à un fluorophore à l'aide des bicouches à l'interface entre gouttelettes. Le mécanisme de translocation consiste en la formation de rares structures de perméation (unique ou quelques unités) dans la membrane, que nous n'avons pas tenté de caractériser. Nous avons vu que l'apparition de ces structures est facilitée par la présence de POPG dans la bicouche. Dans les bicouches contenant uniquement de la POPG, elles ont une probabilité d'apparition de  $0,13 \text{ min}^{-1}$  (sur des bicouches de  $\sim 10^3 \mu\text{m}^2$ ). Cette probabilité décroît progressivement jusqu'à être inférieure à  $0,02 \text{ min}^{-1}$  dans les bicouches ne contenant que 20% de POPG. Nous avons pu déterminer le coefficient de perméabilité après apparition de ces structures de perméation :  $P \sim 10^{-8} \text{ m.s}^{-1}$ . Nous avons montré que dans nos conditions les bicouches contenant uniquement de la POPC semblent instables puisqu'elles laissent passer le fluorophore seul.

Enfin, nous avons développé un montage expérimental de bicouche suspendue horizontale sur un microscope à réflexion totale permettant l'observation de CPP à l'échelle de la molécule unique sur la bicouche suspendue. Cet instrument n'a pas encore été utilisé pour observer le phénomène de translocation, car nous sommes limités par le matériel d'acquisition, mais l'instrument semble prometteur pour l'étude des CPP.

Nous espérons pouvoir continuer l'étude. Un objectif est d'établir le lien entre l'étape d'adhésion et la translocation des CPP. L'étape d'adhésion avec les HS a pu être caractérisée à l'aide du BFP. Par contre l'affinité des CPP pour les lipides chargés négativement n'a pas pu être détectée à l'aide de cet instrument. En revanche, cette affinité a été observée sur les expériences en bicouche à l'interface entre gouttelettes, où la pénétratine est localisée à la membrane lorsque la monocouche est composée exclusivement de POPG. Ces expériences en gouttelettes nécessitent par ailleurs d'être continuées afin de déterminer si la POPG joue un rôle spécifique favorisant la translocation, ou si d'autres lipides chargés négativement peuvent

jouer ce rôle. Il peut aussi être intéressant d'étudier des compositions lipidiques plus complexes ainsi que l'influence de l'asymétrie à l'aide des expériences que nous avons suggéré en perspective de ces études. Le phénomène de translocation s'accompagne de la formation de structures de perméation que nous n'avons pas pu caractériser à l'aide de l'approche en gouttelettes. La mise au point d'un microscope permettant l'observation de CPP à l'échelle de la molécule unique sur des bicouches suspendues pourrait nous permettre d'accéder à la cinétique des différentes étapes et déterminer la stœchiométrie des CPP impliqués dans le phénomène de translocation. Cependant, ce microscope nécessite encore quelques améliorations avant de pouvoir observer la translocation et d'étudier plus en détail ce mécanisme à l'échelle de la molécule unique.

## VI. Annexes

---

## A. Programme d'analyse du BFP (partie II.B.6)

Le but de ce programme est d'analyser les données numériques issues des expériences de BFP (force en fonction de la distance lors des allers-retours répétés de la sonde vers la cellule). Le programme détermine pour chaque aller-retour s'il y a eu adhésion et trouve la force d'adhésion.

L'algorithme fonctionne selon trois modes de démarrage :

- *auto* : il faut être à l'intérieur du dossier d'acquisition et l'algorithme va parcourir chaque fichier texte afin d'analyser les données en question, puis retourner un histogramme de force ainsi que la fréquence d'évènement et le nombre de courbes analysés.
- *BFP* : Il faut cette fois se trouver à la racine du dossier et l'algorithme va réaliser la fonction *auto* dans chaque dossier dont le nom comporte uniquement 6 caractères, en général la date du jour de l'acquisition. Il va ensuite concaténer les données de chaque dossier afin d'extraire les mêmes informations que le script *auto* mais sur l'ensemble des dossiers.
- *AggregateBFP* : réalise seulement la fonction de concaténation sur les dossiers de 6 caractères afin de regrouper des données analysées préalablement par le script *auto*.

NB : Matlab est sensible aux majuscules et minuscules et nécessite de n'avoir que des fichiers dont l'analyse est possible sinon la séquence s'arrête. Il est donc important de taper correctement le nom des fonctions et de n'avoir que des dossiers de 6 caractères, si l'on souhaite l'analyse et de proscrire les noms à 6 caractères pour les dossiers qui doivent être ignorés. De plus les dossiers ne doivent contenir des fichiers textes ne contenant que des données BFP, il est conseillé de conserver le méta-texte à la racine contenant les dossiers pour éviter toute erreur.

La partie qui suit explicite chaque fonction du programme afin de donner une meilleure compréhension de celui-ci et des données extraites au cours de l'analyse. Certaines fonctions n'étant plus à l'heure actuelle dans la boucle sont aussi présentées et peuvent être appelées à tout moment en les faisant apparaître dans la boucle principale ou en reprenant une version antérieure qui présente encore ces fonctions.

```
clear
graphique=input('0:pas de graphique 1:graphique force 2:tous graphiques');
force=input('What is the force threshold?');
master=dir;
sizemaster=length(master);
cellname=[];
```

```

for folderindex=1:sizemaster
    if length(master(folderindex).name)==6 %length of title of subfolder to
scan
        fold=master(folderindex);
        cd (fold.name);
        auto
        cd ../
    end
end
AggregateBFP

```

- *BFP* : Script demandant les paramètres souhaités, pour l'analyse, à savoir le seuil de force minimale pour considérer un évènement ainsi que l'affichage ou non des graphiques pendant l'exécution des calculs. Le script consiste en une simple boucle dans le dossier racine afin de lancer le script *auto* dans chaque dossier dont le nom comporte 6 caractères. A la fin de la boucle, les données sont prises en charge par *AggregateBFP*.

```

if exist('force')==0 | exist('graphique')==0
    clear
    graphique=input('0:pas de graphique 1:graphique force 2:tous
graphiques')
    force=input('What is the force threshold?')
end
B=dir;
S=[];
f=0;
e=0;
E=[];
annul=0;
valid=0;
crit=0;
numberfiles=length(B);
Event=[];
cellname=[];
Forcedifferentiel=[];
hf = waitbar (0,['Analysing file : ',num2str(cellname)]);
for fileindex=3:numberfiles
    if B(fileindex).name(end-3:end)=='.txt'
        cellname=B(fileindex).name;
        quickreplace
        waitbar((fileindex-2)/numberfiles,hf,['Analysing file :
',num2str(cellname)]);
        data=importdata(cellname, '\t', 12);
        if size(data)>0
            if size(data.data,1)>1000
                A=import(data);
                f=f+1;
                a=1;
                filename(f,:)={cellname};
                if size(data)>0
                    if size(A,2)>=40
                        while 2*a<=size(A,2);
                            [D,C]=order(a,A);
                            ['curve ' num2str(a)]
                            if length(D)>40 & length(C)>160 &
C(length(C),1)<8.5 & min(D)>-500 & max(D)<120
                                [Df,Cf,estim]=Fit(D,C);

```

```

if estim<25
    [minima,bruit]=Ecart (Df,D,Cf,C);
    if bruit < force/3
        if minima>=(force) & abs(minima)<500
            if graphique~=0
                display('Force')
                bruit
                minima
            [crit]=affichage (D,Df,C,Cf,estim)
            end
            if graphique==0 | crit==1
                e=e+1;
                E(e,3)=abs(minima);
                E(e,4)=bruit;
                E(e,2)=a;
                E(e,1)=f;
                valid=valid+1
            end
            elseif minima<=1000
                if graphique==2
                    display('Normal')
                    minima
                [crit]=affichage (D,Df,C,Cf,estim)
                end
                valid=valid+1

            else
                display('too strong')
                if graphique==2
                    [crit]=affichage (D,0,C,0,estim)
                end
                annul=annul+1
            end
            else
                display('too much noise')
                if graphique==2
                    [crit]=affichage (D,Df,C,Cf,estim)
                end
                annul=annul+1
            end
            end
            else
                display('no fit available')
                if graphique==2
                    Df=0;
                    Cf=0;
                    [crit]=affichage (D,Df,C,Cf,estim)
                end
                annul=annul+1
            end
            end
            else
                display('wrong size')
                if graphique==2
                    if size(D)>0
                        %[crit]=affichage (D,0,C,0,0)
                    else
                        %[crit]=affichage ([0,0],0,C,0)
                    end
                end
                annul=annul+1
            end
            end
            a=a+1;

```



une nouvelle ligne du tableau [E]. De plus le compteur « valid », qui comptabilise le nombre de courbes analysées, est augmenté de 1. Dans le cas où la force extraite par *écart* n'est pas supérieure au seuil, alors seule l'augmentation de « valid » a lieu. Si les conditions pour exécuter *écart* ne sont pas satisfaites alors la valeur de « anul », variable comptabilisant le nombre de mesures écartées des statistiques, est augmentée de 1 et la boucle reprend sur la paire de [A] suivante. Enfin si les affichages de graphiques ont été demandés les raisons pour lesquelles les courbes sont sélectionnées ou écartées sont affichées dans la fenêtre de commande grâce à la fonction *affichage*. Une fois l'analyse du dossier terminée, toutes les données concernant le seuil, les valeurs de [E], le nombre de courbes validées ou annulées, ainsi que le nom du dossier et l'histogramme de force calculé par la fonction *forcegraph* sont transférés dans le tableau [Event] qui va être exporté en espace de travail matlab et en csv.

```
str = fileread(cellname);           %# read contents of file into
string
str = strrep(str, '-1.#IND00', '0');   %# Replace wordA with wordB

fid = fopen([cellname], 'w');
fwrite(fid, str, '*char');           %# write characters (bytes)
fclose(fid);
```

- *quickreplace* : Supprime une valeur non lisible par matlab, « -1.#IND00 » qui apparaît sporadiquement lors de l'acquisition, par un 0.

```
function A=import(filename)
A=[];
n=3;
m=0;
k=3;
while n<length(filename.data)
    while filename.data(n,8)==1 & n<length(filename.data)
        A((n-k+1),m+1)=filename.data(n,2); %position piezo
        A((n-k+1),m+2)=filename.data(n,6); %force exerc?e
        n=n+1;
    end
    n=n+2;
    m=m+2;
    k=n;
end
```

- Extrait la position du piezo (colonne impaire) et la force correspondante (colonne paire) dans les différentes colonnes du tableau [A] pour un fichier texte « filename ». La distinction entre deux mesures se fait par l'apparition d'un 0 en 8<sup>e</sup> colonne du fichier texte, induit par le logiciel d'acquisition.

```

function [D,C]=order(a,A)
C=[];
D=[];
t=2*a;
n=1;
k=0;
while A(n,t-1)<A((n+1),t-1)
    C(n,1)=A(n,(t-1));
    C(n,2)=A(n,t);
    n=n+1;
end
n=n-1;
k=n;
if n>=20
    if A(n-1,t)>=60
        while A(n,t)~=0 & n<length(A)
            D(n-k+1,1)=A(n,(t-1));
            D(n-k+1,2)=A(n,t);
            n=n+1;
        end
    end
end
end

```

- Sépare, le couple de colonnes  $[2*a-1 ; 2*a]$  du tableau  $[A]$  en deux tableaux  $[C]$  et  $[D]$  dans lesquels sont contenus les valeurs  $[2*a-1 ; 2*a]$  correspondant à l'aller et au retour de la sonde, respectivement. Le début de  $[A]$  est copié dans  $[C]$  tant que les valeurs en colonne  $2*a-1$  sont croissantes, c'est-à-dire que le piezo avance.  $[D]$  le reste des données, qui correspond au recul du piezo, est copié dans  $D$ .

```

function [Df,Cf,estim]=Fit(D,C)
gof1.rsquare=0;
gof2.rsquare=1; Cf=0;
k=0;
estim=0;
yminD=D((length(D)-floor(20*length(D)/100)),2)-20;
yminC=C(floor(20*length(C)/100),2)-10;
expcoef=fittype(@ (a,b,c,x) a*exp(b*x)+c);
options=fitoptions(expcoef);
options.MaxIter=1000000;
options.Lower=[0.001 0.1 -60];
options.Upper=[10 100 20];
options.Start=[0.1 1 -60];
options.robust='bisquare';
options3=options;
options3.exclude=excludedata(C(:,1),C(:,2),'range',[yminC 100]);
options.exclude=excludedata(D(:,1),D(:,2),'range',[yminD 100]);
expcoef2=fittype(@ (a,b,c,d,x) a*exp(b*x)+c*x+d);
options2=fitoptions(expcoef2);
options2.MaxIter=1000000;
options2.Lower=[0.001 0.1 -15 -60];
options2.Upper=[10 100 15 20];
options2.Start=[0.1 1 0 -60];
options2.robust='bisquare';
options4=options2;
options4.exclude=excludedata(C(:,1),C(:,2),'range',[yminC 100]);
options2.exclude=excludedata(D(:,1),D(:,2),'range',[yminD 100]);
while (gof1.rsquare<0.9 | gof2.rsquare<0.8) & estim<10

```

```

[Df,gof1]=fit(D(:,1),D(:,2),expcoef,options)
[Cf,gof2]=fit(C(:,1),C(:,2),expcoef,options3);
estim=estim+3;
end
while (estim>=10 & estim<=20) & (gof1.rsquare<0.9 | gof2.rsquare<0.7)
[Df,gof1]=fit(D(:,1),D(:,2),expcoef2,options2);
[Cf,gof2]=fit(C(:,1),C(:,2),expcoef2,options4);
estim=estim+3;
end
while (estim>20 & estim<=25) & (gof1.rsquare<0.8 | gof2.rsquare<0.7)
[Df,gof1]=fit(D(:,1),D(:,2),expcoef2,options2);
[Cf,gof2]=fit(C(:,1),C(:,2),expcoef2,options4);
estim=estim+3;
end

```

- Ajuste les tableaux C et D à l'aide du plateau de valeur et de la montée de force en ignorant les valeurs plus basses de 20pN par rapport au plateau. L'ajustement est réalisé par un modèle simple :  $a * \exp(b * x) + c$  et si le coefficient de détermination de l'ajustement est inférieur à 0.9 sur la courbe retour alors on ajuste avec :  $a * \exp(b * x) + cx + d$ . Si le coefficient de détermination n'est toujours pas suffisant la boucle s'arrête et les conditions sur le script *auto* annulent la mesure.

```

function [minima,bruit]=Ecart(Df,D,Cf,C)
ld=0;
lc=0;
kd=0;
kc=0;
countc=0;
countd=0;
for n=20:(size(C,1)-40);
sc=Cf(C(n,1))-C(n,2);
kc=kc+abs(sc);
countc=countc+1;
if abs(sc)>abs(lc) & n<1500
lc=sc;
end
end
for n=5:size(D,1)-20;
sd=Df(D(n,1))-D(n,2);
cd=D(n,2)-Df(D(n,1));
if cd>abs(lc) & n<250 %less than 8µm
lc=cd; %recherche du max sur la courbe C ?
end
if D(n,1)>=D(1,1)/2 %analyse only the force part
if sd>ld & n<250
ld=sd; % Obtention du minima
end
end
if D(n,1)<=D(1,1)/2 %Bruit sur les derniers 1/2 pr éviter de considérer
le pic de force
kd=kd+abs(sd);
countd=countd+1;
end
end
kc=(kc/countc);
kd=(kd/countd);

```

```
bruit=(kc+kd)/2; % bruit sur les 2 courbes
minima=ld;
```

- Les ajustements aller et retour sont comparés sur leurs plateaux avec les tableaux de valeur afin de déterminer le bruit. La somme des valeurs absolues des écarts est normalisée par rapport au nombre total de points afin de définir le bruit sur la mesure. Sur l'aller [C] on considère toutes les valeurs sauf la montée de force au moment du contact. Pour le retour [D] seule la deuxième moitié des données est prise en compte pour déterminer le plateau. Sur l'autre moitié de [D] on cherche le point avec la différence maximale par rapport à  $D_f$ , ce qui nous donne « minima ». « bruit » est quant à lui extrait des fluctuations comme évoquées ci-dessus.

```
function [F,graph]=forcegraph(E)
cla;
F=[];
m=1;
pas=5;
for t=1:(floor(max(E(:,3))/pas+1))
    F(t,1)=t*pas;
    F(t,2)=0;
end
for n=1:size(E,1)
    t=1;
    while E(n,3)>=(t*pas)
        t=t+1;
    end
    F(t,2)=F(t,2)+1;
    m=m+1;
end
graph=bar(F(:,1),(100*F(:,2)/m),'r','EdgeColor',[0 0 0]);
```

- La fonction analyse les forces contenues dans le tableau [E] afin de réaliser un tableau [F] contenant le nombre d'occurrences à une valeur donnée avec un pas de 5 pN. Le tableau [F] est ensuite représenté sous la forme d'un histogramme.

```
function [crit]=affichage(D,Df,C,Cf,estim)
crit=0;
cla
plot(D(:,1),D(:,2),'b')
axis([0,10,-300,120])
set(gca,'XTick',0:2:10)
set(gca,'YTick',-300:50:150)
hold all
plot(C(:,1),C(:,2),'r')
if estim<25
    plot(Cf,'r')
    plot(Df,'b')
end

crit=input('entrer 1 pour conserver, 0 pour supprimer');
```

- Cette fonction n'est appelée que si l'affichage graphique est demandé. Elle sert à afficher les points des tableaux [C] et [D], en rouge et bleu respectivement. Les dimensions et échelles du graphique sont fixées afin de pouvoir comparer les graphiques entre eux. De même s'il existe un ajustement des tableaux, Cf et Df sont représentés avec les couleurs correspondant à leur tableau de données.

```

titre=input('series title ? NB : do not forget apostrophe')
Final=[];
force=0;
master=dir;
sizemaster=length(master);
n=1;
for folderindex=1:sizemaster
    if length(master(folderindex).name)==6
        fold=master(folderindex)
        cd (fold.name);
        folder=dir;
        numberfiles=length(folder);
        for fileindex=3:numberfiles
            if folder(fileindex).name(end-3:end)=='.mat'
                cellname=folder(fileindex);
                load(cellname.name);
                cellname.name;
                Event.F;
                if force==0
                    force=Event.force;
                end
                if force==Event.force
                    if size(Final)>0
                        for k=1:size(Event.E,1)
                            Final.Total(n,:)=Event.E(k,:);
                            n=n+1;
                        end
                        Final.valid=Final.valid+Event.valid;
                        Final.V=Final.V+Event.V*Event.valid;
                        t=Event.F(1,1);
                        if t==Final.F(1,1)
                            if size(Final.F,1)>=size(Event.F,1)
                                for k=1:size(Event.F,1)
                                    Final.F(k,2)=Final.F(k,2)+Event.F(k,2);
                                end
                            else
                                T=Event.F;
                                for k=1:size(Final.F,1)
                                    T(k,2)=Final.F(k,2)+T(k,2);
                                end
                                Final.F=T;
                            end
                        else
                            display('increment error in forcegraph')
                        end
                    else
                        Final.valid=Event.valid;
                        Final.V=Event.V*Event.valid;
                        Final.F=Event.F;
                        for k=1:size(Event.E,1)

```

```

                                Final.Total(n,:)=Event.E(k,:);
                                n=n+1;
                                end
                            end
                        else
                            display('Non homogeneous Force threshold')
                        end
                    end
                end
            end
        cd ../;
    end
end
Final.V=Final.V/Final.valid;
Final.F;
g=sum(Final.F,1);
Final.V(2)=Final.valid;
Final.V(3)=sqrt(Final.V(1)/100*(1-Final.V(1)/100)/Final.valid)*100;
graph=bar(Final.F(:,1), (100*Final.F(:,2))/g(1,2)), 'r', 'EdgeColor', [0 0 0])
xlabel('force (pN)', 'FontSize', 12);
ylabel('Frequency (%)', 'FontSize', 12);
title(titre, 'FontSize', 14);
text(150,12,...
    [num2str(Final.V(2)) ' curves'],...
    'FontSize', 12);
text(150,11,...
    [' ' num2str(Final.V(1)) '% of interaction'],...
    'FontSize', 12)
text(150,10,...
    [' +/- ' num2str(Final.V(3)) '%'],...
    'FontSize', 12)
axis([0,300,0,15])
save('Global.mat', 'Final');
csvwrite('Stats.csv', Final.V)
csvwrite('Graph.csv', Final.F)
csvwrite('final.csv', Final.Total)
saveas(graph, 'finalgraph.pdf')
Final

```

- Script permettant de fusionner les données extraites des analyses de plusieurs dossiers différents. Pour ce faire, le script va rechercher les données analysées dans chaque dossier de 6 caractères : si les paramètres de seuil de force et de pas sont similaires entre les sous-dossiers, les différents tableaux [Event.E] sont mis bout à bout dans un tableau [final.E]. De même, les évènements validés dans chaque dossier sont sommés afin de comptabiliser toutes les courbes. Enfin les histogrammes [F] de chaque dossier sont sommés et représentés de nouveau sous la forme d'un histogramme avec le nombre de courbes validées, l'écart type, et le pourcentage d'interaction. Toutes ces variables sont ensuite sauvegardées en fichier matlab et en csv ou pdf en fonction de l'information qu'ils contiennent.

D'autres fonctions ont aussi été développées sur des versions antérieures du script auto afin de déterminer le temps de contact entre la bille et la cellule, pour en déduire la constante d'affinité

de l'interaction observée. Cependant les valeurs obtenues après analyse suggèrent qu'une telle approche n'est pas possible et les fonctions ne sont désormais plus implémentées dans le script.

## B. Simulation de la distribution des estimateurs (partie III.D.4)

La probabilité de première ouverture d'une structure de perméation par unité de temps n'est *a priori* pas accessible directement par l'expérience à cause de la « coupure » à 30 minutes. Nous avons donc simulé la distribution statistique du paramètre  $\sum n / \sum t$  pour chaque probabilité par unité de temps de formation de structure perméante (la somme porte sur toutes les expériences réalisées dans une condition donnée, n vaut 1 quand une structure de perméation est formée sur la durée de l'expérience et 0 sinon, t est égal au temps d'apparition de la structure perméante et à la durée de l'expérience par défaut). C'est ce paramètre,  $\sum n / \sum t$ , qui est effectivement mesuré dans chaque condition lors des expériences. Un ensemble de distributions statistiques (correspondant aux différentes valeurs testées de la probabilité par minute de formation d'une structure perméante stockée dans la variable *proba*) est déterminé pour chaque condition expérimentale (qui fixe le nombre d'expériences : *run*). Pour chaque probabilité d'ouverture d'une structure de perméation par minute (*proba* allant de 0 à 0,7 min<sup>-1</sup>) le programme effectue un nombre *run* de tirages aléatoires (*p*) et détermine les temps (*t*) permettant l'obtention de *p* selon une loi exponentielle  $p = e^{-t/\tau}$ , où  $\tau = 1/\text{proba}$  : si *t* est inférieur à la durée de l'expérience sa valeur est gardée et *n* = 1 pour cette expérience sinon *t* est fixé à la durée de l'expérience (30min) et *n* = 0 pour cette expérience (même principe de calcul que pour les données expérimentales). Ces tirages sont réalisés 1000 fois par *proba* permettant pour chaque *proba* d'obtenir une distribution statistique de  $\sum n / \sum t$ . La distribution statistique est stockée dans le tableau *Discret* (les valeurs de  $\sum n / \sum t$  sont regroupées en classes de largeur 0,01 min<sup>-1</sup>). Il ressort de l'analyse de ces distributions statistiques que la valeur la plus probable de  $\sum n / \sum t$  est précisément *proba* et le  $\sum n / \sum t$  déterminé expérimentalement sera donc utilisé comme estimateur exact de la probabilité par minute de formation d'une structure perméante. Les distributions statistiques sont également utilisées pour déterminer à partir de quelle valeur de *proba* stockée dans *Statmax* le paramètre  $\sum n / \sum t$  à plus de *Stat* % de chances d'être supérieur au paramètre  $\sum n / \sum t$  effectivement mesuré (*Valtest*) : la valeur *Statmax* ainsi obtenue représente alors une borne supérieure de la probabilité de formation d'une structure

perméante avec un degré de confiance *Stat*. Il en va de même pour *Statmin* qui estime la borne inférieure de cette probabilité.

Finalement, il n'y a pas d'effet significatif de la coupure et l'estimateur  $\frac{\sum n}{\sum t}$  mesuré peut être assimilé à la probabilité cherchée.

Cette simulation nous permet aussi d'estimer la confiance que nous pouvons avoir dans notre estimateur qui coïncide avec la probabilité de première apparition d'une structure de perméation, prenant en compte le nombre limité d'expériences faites dans chaque condition.

```

run = 3; %Nombre d'expérience à simuler INPUT
verif = zeros(100,71);
valtest = 0; % Pourcentage mesuré à tester INPUT
index=0;
Discret=zeros(2e4,71); % Tableau discrétisé contenant pour chaque proba la
distribution de sigma N/ sigma T
Stat = 0.8; % Certitude de la mesure INPUT
for proba = 0:0.01:0.7
    index=index+1;
    for series = 1:1000
        tau = 1/proba;
        T = [];
        for k = 1:run
            p=rand;
            t = -tau*log(p); % Détermination du temps avt apparition
            T(k,1)=p;
            T(k,2)= t;
            if t < 30 %Estimation de l'apparition dans les 30min d'exp
                T(k,3)=1;
            else
                T(k,2)=30;
                T(k,3)=0;
            end
        end
        verif(series,index) = sum(T(:,3))/sum(T(:,2)); % Calcul de sigma N
/ sigma T
        Discret(floor(100*verif(series,index))+1,index)=
Discret(floor(100*verif(series,index))+1,index)+1;
    end
end
Discret=Discret/1000; % Passage en proba
i=1;
if valtest > 0.01
    while sum (Discret(1:floor(100*valtest)-1,i)) > Stat
        i=i+1;
    end
    Statmin = i/100 %Détermination de la valeur minimale à stat près
end
i=1;
while sum (Discret(floor(100*valtest)+1:2e4,i)) < Stat
    i=i+1;
end
statmax=i/100 %Détermination de la valeur maximale à stat près

```

## C. Simulations de déplacement 1D (partie IV.E.1)

Afin d'étudier le déplacement d'une molécule dans le champ évanescent, nous avons décidé de simuler le déplacement d'une particule à la perpendiculaire du plan formé par la membrane. Nous avons considéré que la diffusion se faisait selon un mouvement brownien. Nous avons étudié une molécule avec un coefficient de diffusion de  $D = 10 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  que nous avons placé à  $1 \mu\text{m}$  de la membrane. Tous les  $\Delta t = 1 \text{ ms}$  la position de la particule est recalculée par un lancer aléatoire, et la particule prend la position correspondant à la valeur aléatoire obtenue par une loi normale centrée sur la position initiale, de variance  $\sqrt{2D\Delta t}$ . Si la particule se retrouve à  $2 \text{ nm}$  de la membrane alors elle est immobilisée jusqu'à ce que le lancer lui permette de traverser ou de se détacher, sinon elle reste collée à la membrane. La simulation est arrêtée lorsque la particule se retrouve à plus de  $2 \mu\text{m}$  de la membrane, et le trajet de la molécule au cours du temps est affiché à l'écran. Il est aussi possible d'observer l'intensité théorique au cours du temps.

```
%toutes les distances sont en µm
%sur les graphs et les paramètres sont en m
cla
theta = 70;
d = 488*10^-9/(4*pi*sqrt( ((1.44*sin(pi*theta/180))^2)-(1.33)^2));
I0=1;
%Diffusion d'une molécule le long de z
mu= - 1*10^-6;
D=10^-11;
deltat=10^-3; % temps en seconde
index=1;
Traj=[];
Traj(index,1)=(index-1)*deltat;
Traj(index,2)=mu;
while abs(mu) < 2*10^-6
    index=index+1;
    gaussdistrib = makedist('normal','mu',mu,'sigma',sqrt(2*D*deltat));
    x=(mu-(10^-3*deltat)):10^-9:(mu+(10^-3*deltat));
    fdensity = cdf (gaussdistrib,x);
    plot(x,fdensity)
    if abs(Traj(index-1,2)) ~= 2e-09 %Mouvement si non sur la membrane
        newx=rand;
        k=1;
        while fdensity(k)<newx
            k=k+1;
        end
        mu=mu-10^-6+k*10^-9;
        %Vérification du contact à la membrane

        if Traj(index-1,2)<0 & mu>0
            mu=-2*10^-9;
        end
        if Traj(index-1,2)>0 & mu<0
            mu=2*10^-9;
        end
    end
```

```

else %Mouvement à la membrane
    prob=rand; % Encore le rapport à deltat manquant !
    if prob < 2*deltat
        newx=rand;
        k=1;
        while fdensity(k)<newx
            k=k+1;
        end
        mu=abs(mu-10^-6+k*10^-9)*mu/abs(mu);
    elseif prob > 1-deltat
        %newx=rand;
        %k=1;
        %while fdensity(k)<newx
        %    k=k+1;
        %end
        %mu=abs(mu-10^-6+k*10^-9);
        mu=-mu;
    end
end
Traj(index,1)=(index-1)*deltat;
Traj(index,2)=mu;
Traj(index,4)=Traj(index-1,2)-Traj(index,2);
scan=0;
while fdensity(k)<newx
    scan=scan+1;
end
if mu<= 2
    Traj(index,3)=I0*exp(mu/d);
elseif mu > 2e-8 & mu<5
    Traj(index,3)=I0/4;
else
    Traj(index,3)=0;
end
end
%plot(Traj(:,1),Traj(:,3))

cla
plot(Traj(:,1),Traj(:,2))
hold all
scatter(Traj(:,1),Traj(:,2))
plot(0)

```

## Références bibliographiques

- Alves, I.D. et al., 2011. Relationships between membrane binding, affinity and cell internalization efficacy of a cell-penetrating peptide: Penetratin as a case study. *PLoS ONE*, 6(9), p.e24096. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3167814&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 19, 2014].
- Åmand, H.L. et al., 2012. Cell surface binding and uptake of arginine- and lysine-rich penetratin peptides in absence and presence of proteoglycans. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(11), pp.2669–2678. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22705501> [Accessed March 24, 2014].
- Axelrod, D., 1981. Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *Journal of Cell Biology*, 89(1), pp.141–145. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2111781&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Axelrod, D., 1984. Total internal reflection fluorescence. *Annual review of biophysics*, (17), pp.247–268. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.bb.13.060184.001335>.
- Axelrod, D., 2001. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology [Review]. *Traffic*, 2(11), pp.764–774.
- Babakov, a V, Ermishkin, L.N. & Liberman, E. a, 1966. Influence of electric field on the capacity of phospholipid membranes. *Nature*, 210(5039), pp.953–955.
- Baoum, A., Ovcharenko, D. & Berkland, C., 2012. Calcium condensed cell penetrating peptide complexes offer highly efficient, low toxicity gene silencing. *International Journal of Pharmaceutics*, 427(1), pp.134–142. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.08.012>.
- Bárány-Wallje, E. et al., 2005. A critical reassessment of penetratin translocation across lipid membranes. *Biophysical journal*, 89(4), pp.2513–2521.
- Bárány-Wallje, E. et al., 2007. Differential membrane perturbation caused by the cell penetrating peptide Tp10 depending on attached cargo. *FEBS Letters*, 581(13), pp.2389–2393.
- Baumgart, T. et al., 2007. Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(9), pp.3165–3170.
- Bayley, H. et al., 2008. Droplet interface bilayers RID B-8725-2008. *Molecular Biosystems*, 4(12), pp.1191–1208. Available at: [http://apps.webofknowledge.com/full\\_record.do?product=UA&search\\_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=U1pModa9Ec9cbGhk489&page=9&doc=83](http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=U1pModa9Ec9cbGhk489&page=9&doc=83) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19396383>.

- Bechara, C. et al., 2013. Tryptophan within basic peptide sequences triggers glycosaminoglycan- dependent endocytosis. *FASEB Journal*, 27(2), pp.738–749. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23070606> [Accessed March 19, 2014].
- Bechara, C. & Sagan, S., 2013. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Letters*, 587(12), pp.1693–1702. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23669356> [Accessed March 19, 2014].
- Bolhassani, A., 2011. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1816(2), pp.232–246. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2011.07.006>.
- Boye, K. et al., 2013. Two barriers or not? Dynamic force spectroscopy on the integrin  $\alpha 7\beta 1$  invasin complex. *Biophysical Journal*, 105(12), pp.2771–2780.
- Burlina, F. et al., 2006. A direct approach to quantification of the cellular uptake of cell-penetrating peptides using MALDI- TOF mass spectrometry. *Nature protocols*, 1(1). Available at: <http://www.nature.com/nprot/journal/v1/n1/abs/nprot.2006.30.html>.
- Capecchi, M.R., 1980. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell*, 22(2 Pt 2), pp.479–488.
- Caron, N.J. et al., 2001. Intracellular delivery of a Tat-eGFP fusion protein into muscle cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 3(3), pp.310–318.
- Celis, J.E., 1984. Microinjection of somatic cells with micropipettes: comparison with other transfer techniques. *Biochemical Journal*, 223(2), pp.281–291.
- Cemazar, M. et al., 2008. Electrochemotherapy in veterinary oncology. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(4), pp.826–831.
- Chen, C. & Okayama, H., 1987. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Molecular and cellular biology*, 7(8), pp.2745–2752.
- Chen, W. et al., 2012. Observing force-regulated conformational changes and ligand dissociation from a single integrin on cells. *Journal of Cell Biology*, 199(3), pp.497–512.
- Christianson, H.C. & Belting, M., 2014. Heparan sulfate proteoglycan as a cell-surface endocytosis receptor. *Matrix Biology*, 35, pp.51–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24145152> [Accessed October 30, 2013].
- Cole, K.S. & Hodgkin, a L., 1939. Membrane and Protoplasm Resistance in the Squid Giant Axon. *The Journal of general physiology*, 22(5), pp.671–687.
- Console, S. et al., 2003. Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) “protein transduction domains” promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *Journal of Biological Chemistry*, 278(37), pp.35109–35114.

- Copolovici, D.M. et al., 2014. Cell-Penetrating Peptides: Design, Synthesis, and Applications. *ACS Nano*, 8(3), pp.1972–1994. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nn4057269>.
- Czajlik, A. et al., 2002. Investigation of penetratin peptides. Part 1. The environment dependent conformational properties of penetratin and two of its derivatives. *Journal of Peptide Science*, 8(4), pp.151–171.
- Delaroche, D. et al., 2007. Tracking a new cell-penetrating (W/R) nonapeptide, through an enzyme-stable mass spectrometry reporter tag. *Analytical Chemistry*, 79(5), pp.1932–1938.
- Derossi, D. et al., 1994. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269(14), pp.10444–10450.
- Derossi, D., Chassaing, G. & Prochiantz, a, 1998. Trojan peptides: the penetrating system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol*, 8(2), pp.84–88.
- Deshayes, S. et al., 2010. Structural polymorphism of non-covalent peptide-based delivery systems: Highway to cellular uptake. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1798(12), pp.2304–2314. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.06.005>.
- Deutscher, S.L. et al., 1984. Translocation across Golgi vesicle membranes: a CHO glycosylation mutant deficient in CMP-sialic acid transport. *Cell*, 39(2 Pt 1), pp.295–299.
- Dietz, G.P.H. & Bähr, M., 2004. Delivery of bioactive molecules into the cell: The Trojan horse approach. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 27(2), pp.85–131.
- Drin, G. et al., 2001. Physico-chemical requirements for cellular uptake of pAntp peptide: Role of lipid-binding affinity. *European Journal of Biochemistry*, 268(5), pp.1304–1314.
- Drin, G. et al., 2003. Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 278(33), pp.31192–31201.
- Esko, J.D., Stewart, T.E. & Taylor, W.H., 1985. Animal cell mutants defective in glycosaminoglycan biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(10), pp.3197–3201. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=397742&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Evans, E., Ritchie, K. & Merkel, R., 1995. Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces. *Biophysical journal*, 68(6), pp.2580–2587. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1282168&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 3, 2014].

- Farkhani, S.M. et al., 2014. Cell penetrating peptides: Efficient vectors for delivery of nanoparticles, nanocarriers, therapeutic and diagnostic molecules. *Peptides*, 57, pp.78–94. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2014.04.015>.
- Fasoli, A. et al., 2014. Mechanistic Insight into CM18-Tat11 Peptide Membrane-Perturbing Action by Whole-Cell Patch-Clamp Recording. *Molecules*, 19(7), pp.9228–9239. Available at: <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/7/9228/>.
- Fawell, S. et al., 1994. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(2), pp.664–668.
- Fischer, a. et al., 2011. Ultrasensitive detection of protein translocated through toxin pores in droplet-interface bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(40), pp.16577–16581.
- Florian, J. a et al., 2003. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circulation research*, 93(10), pp.e136–e142. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14563712> [Accessed September 4, 2014].
- Fonseca, S.B., Pereira, M.P. & Kelley, S.O., 2009. Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(11), pp.953–964. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2009.06.001>.
- Fortin, J.P. et al., 2007. Size-sorted anionic iron oxide nanomagnets as colloidal mediators for magnetic hyperthermia. *Journal of the American Chemical Society*, 129(9), pp.2628–2635.
- Fraleigh, R. et al., 1980. Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells. *Journal of Biological Chemistry*, 255(21), pp.10431–10435.
- Frankel, A.D. & Pabo, C.O., 1988. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 55(6), pp.1189–1193.
- Funakoshi, K., Suzuki, H. & Takeuchi, S., 2006. Lipid bilayer formation by contacting monolayers in a microfluidic device for membrane protein analysis. *Analytical Chemistry*, 78(24), pp.8169–8174. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17165804>.
- Furusawa, M. et al., 1974. Injection of foreign substances into single cells by cell fusion. *Nature*, 249(5456), pp.449–450. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/249449a0>.
- Futaki, S. et al., 2001. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *Journal of Biological Chemistry*, 276(8), pp.5836–5840.
- Futaki, S. et al., 2001. Stearylated arginine-rich peptides: A new class of transfection systems. *Bioconjugate Chemistry*, 12(6), pp.1005–1011.

- Graham, F.L. & van der Eb, a J., 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, 52(2), pp.456–467.
- Hamer, D.H. et al., 1979. SV40 recombinants carrying rabbit beta-globin gene coding sequences. *Cell*, 17(3), pp.725–735.
- Han, X. et al., 2007. Nanopore arrays for stable and functional free-standing lipid bilayers. *Advanced Materials*, 19(24), pp.4466–4470. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/adma.200700468> [Accessed April 14, 2014].
- Hauser, H., Phillips, M.C. & Stubbs, M., 1972. Ion permeability of phospholipid bilayers. *Nature*, 239(5371), pp.342–344.
- Hell, S.W., Dyba, M. & Jakobs, S., 2004. Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy. *Current Opinion in Neurobiology*, 14(5), pp.599–609.
- Herce, H.D. et al., 2009. Arginine-rich peptides destabilize the plasma membrane, consistent with a pore formation translocation mechanism of cell-penetrating peptides. *Biophysical Journal*, 97(7), pp.1917–1925. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2756373&tool=pmcentrez&endertype=abstract> [Accessed March 25, 2014].
- Herce, H.D. & Garcia, A.E., 2007. Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(52), pp.20805–20810. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2409222&tool=pmcentrez&endertype=abstract>.
- Heron, A.J. et al., 2007. Direct detection of membrane channels from gels using water-in-oil droplet bilayers. *Journal of the American Chemical Society*, 129(51), pp.16042–16047.
- Hess Girirajan T, Mason M, S., 2006. Ultra-High Resoluion Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy. *Biophys. J.*, 91(11), pp.4258–4272.
- Hoekstra, D. et al., 1989. Mechanism of fusion of Sendai virus role of hydrophobic interactions and mobility constraints of viral membrane proteins. Effects of polyethylene glycol. *Journal of Biological Chemistry*, 264(12), pp.6786–6792.
- Holden, M. a., Needham, D. & Bayley, H., 2007. Functional bionetworks from nanoliter water droplets. *Journal of the American Chemical Society*, 129(27), pp.8650–8655.
- Huang, J. et al., 2011. Direct quantitation of peptide-mediated protein transport across a droplet-interface bilayer. *Journal of the American Chemical Society*, 133(40), pp.15818–15821.
- Husson, J. et al., 2011. Force generation upon T cell receptor engagement. *PLoS ONE*, 6(5).
- Hwang, W.L. et al., 2008. Asymmetric droplet interface bilayers. *Journal of the American Chemical Society*, 130(18), pp.5878–5879.

- Hwang, W.L. et al., 2007. Electrical behavior of droplet interface bilayer networks: Experimental analysis and modeling. *Journal of the American Chemical Society*, 129(38), pp.11854–11864.
- Islam, M.Z. et al., 2014. Entry of cell-penetrating peptide transportan 10 into a single vesicle by translocating across lipid membrane and its induced pores. *Biochemistry*, 53(2), pp.386–396. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24397335>.
- Israelachvili, J. et al., 2010. Recent advances in the surface forces apparatus (SFA) technique. *Reports on Progress in Physics*, 73(3), p.036601.
- Israelachvili, J.N. & Adams, G.E., 1978. Measurement of forces between two mica surfaces in aqueous electrolyte solutions in the range 0?100 nm. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1*, 74, p.975.
- Jares-Erijman, E. a & Jovin, T.M., 2003. FRET imaging. *Nature biotechnology*, 21(11), pp.1387–1395.
- Jégou, A. et al., 2008. Mapping mouse gamete interaction forces reveal several oocyte membrane regions with different mechanical and adhesive properties. *Langmuir*, 24(4), pp.1451–1458.
- Jégou, A., 2008. Thèse de Doctorat de l'Université Paris VII : Etude de l'Adhésion Gamétique par Mesure de Force ; Modulation des propriétés d'adhésion par organisation des protéines membranaires.
- Jiao, C.Y. et al., 2009a. Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. *Journal of Biological Chemistry*, 284(49), pp.33957–33965.
- Jiao, C.Y. et al., 2009b. Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. *Journal of Biological Chemistry*, 284(49), pp.33957–33965. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2797166&tool=pmcentrez&endertype=abstract> [Accessed March 19, 2014].
- Joliot, a et al., 1991. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(5), pp.1864–1868.
- Ju, L., Qian, J. & Zhu, C., 2015. Transport Regulation of Two-Dimensional Receptor-Ligand Association. *Biophysical Journal*, 108(7), pp.1773–1784. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349515001897>.
- Klein, T.M. et al., 1988. Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(12), pp.4305–4309.
- Krämer, S.D. & Wunderli-Allenspach, H., 2003. No entry for TAT(44-57) into liposomes and intact MDCK cells: Novel approach to study membrane permeation of cell-penetrating peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1609(2), pp.161–169.

- Kumar, P. et al., 2007. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature*, 448(7149), pp.39–43.
- Kwak, B.S. et al., 2012. Quantitative analysis of sialic acid on erythrocyte membranes using a photothermal biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 35(1), pp.484–488. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22465447> [Accessed September 4, 2014].
- Kwon, B., Waring, A.J. & Hong, M., 2013. A 2h Solid-state nmr study of lipid clustering by cationic antimicrobial and Cell-penetrating peptides in model bacterial membranes. *Biophysical Journal*, 105(10), pp.2333–2342. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349513009338> [Accessed November 21, 2013].
- Langel, Ü. et al., 1996. A galanin-mastoparan chimeric peptide activates the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and reverses its inhibition by ouabain. *Regulatory Peptides*, 62(1), pp.47–52.
- Lee, D.W. et al., 2015. Real-time intermembrane force measurements and imaging of lipid domain morphology during hemifusion. *Nature Communications*, 6(May), p.7238. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncomms8238>.
- Lewin, M. et al., 2000. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nature biotechnology*, 18(4), pp.410–414.
- Liskamp, R.M.J., 2014. Peptides: Bicycling into cells. *Nature Chemistry*, 6(10), pp.855–857. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nchem.2073>.
- Liu, B.R. et al., 2011. Intracellular delivery of quantum dots mediated by a histidine- and arginine-rich HR9 cell-penetrating peptide through the direct membrane translocation mechanism. *Biomaterials*, 32(13), pp.3520–3537. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.041>.
- Macháň, R. & Hof, M., 2010. Lipid diffusion in planar membranes investigated by fluorescence correlation spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1798(7), pp.1377–1391.
- Mansy, S.S., 2010. Membrane transport in primitive cells. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(8), pp.1–14.
- McCutchan, J.H. & Pagano, J.S., 1968. Enhancement of the infectivity of simian virus 40 deoxyribonucleic acid with diethylaminoethyl-dextran. *Journal of the National Cancer Institute*, 41(2), pp.351–357.
- McNeil, P.L. et al., 1984. A method for incorporating macromolecules into living cells. *J. Cell Biol.*, 98(April), pp.1556–1564.
- Merkel, R. et al., 1999. Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature*, 397(6714), pp.50–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9892352>.

- Montal, M. & Mueller, P., 1972. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(12), pp.3561–3566. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=389821&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Mueller, P. et al., 1962. Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature*, 194, pp.979–980.
- Mukhopadhyay, S. & Cho, W., 1996. Interactions of annexin V with phospholipid monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1279(1), pp.58–62.
- Neumann, E. et al., 1982. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO journal*, 1(7), pp.841–845.
- Neumann, E. & Rosenheck, K., 1972. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *The Journal of Membrane Biology*, 10(1), pp.279–290.
- Nicolas, J. et al., 2013. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Chemical Society reviews*, 42(3), pp.1147–235. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23238558>.
- Okada, C.Y. & Rechsteiner, M., 1982. Introduction of macromolecules into cultured mammalian cells by osmotic lysis of pinocytotic vesicles. *Cell*, 29(1), pp.33–41. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867482900873>.
- Pae, J. et al., 2014. Translocation of cell-penetrating peptides across the plasma membrane is controlled by cholesterol and microenvironment created by membranous proteins. *Journal of Controlled Release*, 192, pp.103–113. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25016968> [Accessed August 10, 2014].
- Paula, S., Volkov, a G. & Deamer, D.W., 1998. Permeation of halide anions through phospholipid bilayers occurs by the solubility-diffusion mechanism. *Biophysical journal*, 74(1), pp.319–327.
- Pawlak, M., Stankowski, S. & Schwarz, G., 1991. Melittin induced voltage-dependent conductance in DOPC lipid bilayers. *Biochimica et biophysica acta*, 1062(1), pp.94–102.
- Peptides, B.C. et al., 2011. Cellular Uptake and Fate of PEGylated Gold Nanoparticles Is Dependent on Particle Size. *ACS Nano*, 5(8), pp.6434–6448. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nn201624c>.
- Perez, E. et al., 2008. The Surface Force Apparatus to Reveal the Energetics of Biomolecules Assembly. Application to DNA Bases Pairing and SNARE Fusion Proteins Folding. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 1(4), pp.240–246.
- Persson, D. et al., 2004. Vesicle size-dependent translocation of penetratin analogs across lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1665(1-2), pp.142–155.

- Pincet, F. & Husson, J., 2005. The solution to the streptavidin-biotin paradox: the influence of history on the strength of single molecular bonds. *Biophysical journal*, 89(6), pp.4374–4381. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1367001&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 13, 2013].
- Pooga, M. et al., 1998. Cell penetration by transportan. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 12(1), pp.67–77.
- Poulin, P. & Bibette, J., 1998. Adhesion of Water Droplets in Organic Solvent. *Langmuir*, 14(22), pp.6341–6343. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la9801413>.
- Qian, Z. et al., 2013. Efficient Delivery of Cyclic Peptides into Mammalian Cells with Short Sequence Motifs. *ACS Chemical Biology*, 8(2), pp.423–431. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cb3005275>.
- Richard, J.P. et al., 2003. Cell-penetrating peptides: A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1), pp.585–590. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M209548200>.
- Rojko, N. et al., 2014. Imaging the lipid-phase-dependent pore formation of equinatoxin II in droplet interface bilayers. *Biophysical journal*, 106(8), pp.1630–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24739162>.
- Rust, M.J., Bates, M. & Zhuang, X., 2006. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature methods*, 3(10), pp.793–795.
- Säälik, P. et al., 2011. Penetration without cells: Membrane translocation of cell-penetrating peptides in the model giant plasma membrane vesicles. *Journal of Controlled Release*, 153(2), pp.117–125. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.03.011>.
- Salamon, Z., Lindblom, G. & Tollin, G., 2003. Plasmon-waveguide resonance and impedance spectroscopy studies of the interaction between penetratin and supported lipid bilayer membranes. *Biophysical journal*, 84(3), pp.1796–1807.
- Scheve, C.S. et al., 2013. Steric Pressure between Proteins Opposes Membrane Phase Separation. *Biophysical Journal*, 104, p.43a. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349512015226>.
- Sharonov, a & Hochstrasser, R.M., 2007. Single-Molecule Imaging of the Association of CPP Cell-Penetrating Peptide Pep-1 to Model Membranes. *Biochemistry*, 46 (27), pp.7963–7972. Available at: [http://pubs3.acs.org/acs/journals/doi/lookup?in\\_doi=10.1021/bi700505h](http://pubs3.acs.org/acs/journals/doi/lookup?in_doi=10.1021/bi700505h).
- Shotton, D.M., 1989. Confocal scanning optical microscopy and its applications for biological specimens. *Journal of Cell Science*, 94, pp.175–206.
- Soomets, U. et al., 2000. Deletion analogues of transportan. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1467(1), pp.165–176.

- Suzuki, T. et al., 2002. Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 277(4), pp.2437–2443.
- Svensen, N., Walton, J.G. a & Bradley, M., 2012. Peptides for cell-selective drug delivery. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(4), pp.186–192. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2012.02.002>.
- Swiecicki, J.M. et al., 2014. The efficacies of cell-penetrating peptides in accumulating in large unilamellar vesicles depend on their ability to form inverted micelles. *ChemBioChem*, 15(6), pp.884–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24677480> [Accessed June 2, 2014].
- Terrone, D. et al., 2003. Penetratin and Related Cell-Penetrating Cationic Peptides Can Translocate Across Lipid Bilayers in the Presence of a Transbilayer Potential. *Biochemistry*, 42(47), pp.13787–13799.
- Thiam, A.R., Bremond, N. & Bibette, J., 2011. Adhesive emulsion bilayers under an electric field: From unzipping to fusion. *Physical Review Letters*, 107(6), p.068301. Available at: <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.107.068301> [Accessed August 21, 2014].
- Thiam, A.R., Bremond, N. & Bibette, J., 2012. From stability to permeability of adhesive emulsion bilayers. *Langmuir*, 28(15), pp.6291–6298. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22439743>.
- Thorén, P.E.G. et al., 2000. The Antennapedia peptide penetratin translocates across lipid bilayers - The first direct observation. *FEBS Letters*, 482(3), pp.265–268.
- Tsofina, L.M., Liberman, E. a & Babakov, a. V., 1966. Production of Bimolecular Protein-Lipid Membranes in Aqueous Solution. *Nature*, 212(5063), pp.681–683.
- Vaheri, A. & Pagano, J.S., 1965. Infectious poliovirus RNA: a sensitive method of assay. *Virology*, 27(3), pp.434–436.
- Valincius, G. et al., 2008. Soluble amyloid beta-oligomers affect dielectric membrane properties by bilayer insertion and domain formation: implications for cell toxicity. *Biophysical journal*, 95(10), pp.4845–4861.
- Vives, E., Brodin, P. & Lebleu, B., 1997. A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus. *Journal of Biological Chemistry*, 272(25), pp.16010–16017. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.272.25.16010>.
- Wadia, J.S., Stan, R. V & Dowdy, S.F., 2004. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nature medicine*, 10(3), pp.310–315.
- Wallbrecher, R. et al., 2014. The stoichiometry of peptide-heparan sulfate binding as a determinant of uptake efficiency of cell-penetrating peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(14), pp.2717–2729. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24270856> [Accessed November 26, 2013].

- Walrant, A. et al., 2013. Direct translocation of cell-penetrating peptides in liposomes: A combined mass spectrometry quantification and fluorescence detection study. *Analytical Biochemistry*, 438(1), pp.1–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23524021> [Accessed April 12, 2014].
- Wender, P. a et al., 2000. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(24), pp.13003–13008.
- Whited, A.M. & Park, P.S.-H., 2014. Atomic force microscopy: a multifaceted tool to study membrane proteins and their interactions with ligands. *Biochimica et biophysica acta*, 1838(1 Pt A), pp.56–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23603221>.
- Williams, E.J. et al., 1997. Selective inhibition of growth factor-stimulated mitogenesis by a cell-permeable Grb2-binding peptide. *The Journal of biological chemistry*, 272(35), pp.22349–22354.
- Wonderlin, W.F., Finkel, a & French, R.J., 1990. Optimizing planar lipid bilayer single-channel recordings for high resolution with rapid voltage steps. *Biophysical journal*, 58(2), pp.289–297. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1280971&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 14, 2014].
- Xue, F.L. et al., 2007. Enhancement of intracellular delivery of CdTe quantum dots (QDs) to living cells by tat conjugation. *Journal of Fluorescence*, 17(2), pp.149–154.
- Yuan, H., Fales, A.M. & Vo-Dinh, T., 2012. TAT peptide-functionalized gold nanostars: Enhanced intracellular delivery and efficient NIR photothermal therapy using ultralow irradiance. *Journal of the American Chemical Society*, 134(28), pp.11358–11361.
- Ziegler, A.E. & Seelig, J., 2011. Contributions of glycosaminoglycan binding and clustering to the biological uptake of the nonamphipathic cell-penetrating peptide WR 9. *Biochemistry*, 50(21), pp.4650–4664.