



**HAL**  
open science

# Liposomes sur mesure pour un ciblage optimisé des membranes cellulaires sur la base de leurs propriétés physicochimiques

Julien Bompard

► **To cite this version:**

Julien Bompard. Liposomes sur mesure pour un ciblage optimisé des membranes cellulaires sur la base de leurs propriétés physicochimiques. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1289 . tel-03484315

**HAL Id: tel-03484315**

**<https://theses.hal.science/tel-03484315v1>**

Submitted on 17 Dec 2021

**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.



N° d'ordre NNT : 2020LYSE1289

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N° 205**  
**l'Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé**

**Spécialité de doctorat : Biochimie**

Soutenue publiquement le 16/12/2020, par :

**Julien BOMPARD**

---

# **Liposomes sur mesure pour un ciblage optimisé des membranes cellulaires sur la base de leurs propriétés physicochimiques**

---

Devant le jury composé de :

Dufourc, Erick  
Rossi, Claire  
Saulnier, Patrick

Blum, Loïc  
Girard-Egrot, Agnès  
Maniti, Ofelia  
Ausserré, Dominique

Directeur de recherches, CNRS  
Professeure des Universités, UTC  
Professeur des Universités,  
Praticien Hospitalier, UA  
Professeur des Universités, UCBL  
Professeure des Universités, UCBL  
Maître de conférences, UCBL  
Directeur de recherches, CNRS

Rapporteur  
Rapporteuse  
Rapporteur  
Examineur  
Directrice de thèse  
Co-encadrante  
Invité



Université Claude Bernard



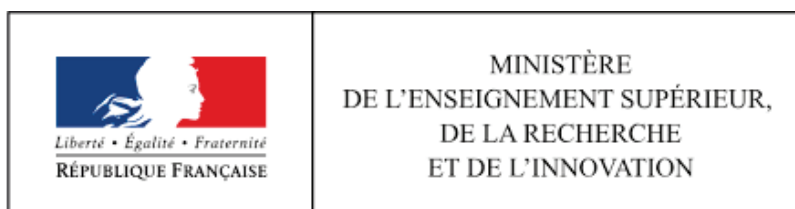
Lyon 1

Ces travaux de thèse ont été réalisés par Julien BOMPARD sous la direction du Pr Agnès GIRARD-EGROT, en co-encadrement avec le Dr Ofelia MANITI

Au sein de l'équipe **G**énie **E**nzymatique, **M**embranes **B**iomimétiques et **A**ssemblages **S**upramoléculaires (GEMBAS) de l'Institut de **C**himie et **B**iochimie **M**oléculaires et **S**upramoléculaires (ICBMS - UMR 5246 - Université Lyon 1 - CNRS - CPE Lyon - INSA Lyon)



Financés par une bourse du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI) et réalisés au sein de l'École Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé (EDISS)



# RÉSUMÉ

Ces travaux de thèse s'intéressent à l'étude des membranes, dans le but de développer un système innovant de vectorisation ciblée, ainsi qu'un système biomimétique « naturel » permettant des études *in situ* de la membrane cellulaire. L'interaction de liposomes couvrant une large gamme de fluidité membranaire a été mesurée avec des modèles cellulaires de cancer de la prostate. Il a été observé que la fluidité membranaire des liposomes gouverne leur interaction avec les cellules, les liposomes ayant une membrane fluide interagissant préférentiellement avec les cellules tumorales ; les liposomes ayant une membrane rigide interagissant préférentiellement avec les cellules contrôles. L'étude du mécanisme d'internalisation des liposomes a révélé que ce dernier est basé sur un processus de fusion membranaire. En parallèle, un modèle de bicouche biomimétique (pep-tBLM), précédemment développé au laboratoire, a été caractérisé par QCM-D et par BALM, une nouvelle méthode de microscopie optique à ultra-haute résolution en temps réel. La BALM nous a permis de visualiser des flux de matières locaux et dynamiques, et ainsi d'obtenir des informations inédites sur le mécanisme de formation des pep-tBLM. Enfin, la BALM a permis de suivre la formation d'une pep-tBLM à partir de lipides naturels extraits. L'ensemble de ces travaux a permis de mieux comprendre la physicochimie de l'interaction membrane-membrane, et constitue un point de départ solide pour le développement de nouvelles stratégies innovantes, à la fois dans la vectorisation appliquée au cancer, mais également dans la conception de modèles biomimétiques reproduisant au mieux l'environnement natif des membranes cellulaires.

## ABSTRACT

This thesis is concerned with the study of membranes, with the aim of developing an innovative targeted vectorization system, as well as a "natural" biomimetic system allowing *in situ* studies of the cell membrane. The interaction of liposomes covering a wide range of membrane fluidity has been measured with cellular models of prostate cancer. It was shown that the membrane fluidity of the liposomes governs their interaction with the cells, the liposomes having a fluid membrane preferentially interacting with the tumor cells; liposomes having a rigid membrane preferentially interacting with the control cells. Investigation of the liposome internalization mechanism has revealed that it is based on a process of membrane fusion. In parallel, a biomimetic bilayer model (pep-tBLM) previously developed in the laboratory has been characterized by QCM-D and by BALM, a new method of ultra-high resolution real-time microscopy. BALM allowed the visualization of local and dynamic molecular fluxes, leading to new mechanistic insights into the pep-tBLM formation process. Finally, BALM made it possible to monitor the formation of a pep-tBLM from liposomes made of natural extracted lipids. All of this work has led to a better understanding of the physicochemistry of the membrane-membrane interaction. It constitutes a solid starting point for the development of new innovative strategies, both in the field of vectorization applied to cancer, but also in the design of biomimetic models that best reproduce the native environment of the cell membrane.

# REMERCIEMENTS

Je remercie le Dr Erick DUFOURC, la Pr Claire ROSSI et le Pr Patrick SAULNIER, d'avoir accepté de prendre le temps de lire et de rapporter cette thèse.

Merci au Pr Loïc BLUM de m'avoir accueilli dans l'équipe GEMBAS pendant tout ce temps et d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Merci également au Pr Olivier PIVA, qui m'a accueilli au sein de l'ICBMS pendant 3 ans et demis.

Merci, Agnès, pour toute ton implication dans ma thèse, pour tes conseils, ton soutien, ta confiance. J'ai été très heureux de travailler à tes côtés, malgré toutes les difficultés qu'on a rencontrées (maudit cancer !). Tu as une manière toute particulière d'insuffler du dynamisme et de la gaieté, tout en sérieux et en professionnalisme. Je te l'ai déjà dit (mais je te le redis) : N'arrête pas d'encadrer, ce serait vraiment dommage ! J'ose espérer que nous pourrons de nouveau travailler ensemble, lorsque je serais (avec un peu de chance) devenu moi-même chercheur !

Merci, Ofelia, pour ton accompagnement, du début du stage à la fin de la thèse. Tu as toujours été à l'écoute, au moindre problème. Merci pour toute la confiance que tu m'as accordé, au niveau des manips et de l'encadrement. J'ai pris beaucoup de plaisir pendant ces trois ans et demis avec toi, et avec tous les gens que tu m'as fait rencontrer ! Tu as été la voix du calme et de la raison pendant ma thèse, toujours là pour me rassurer. Je ne sais pas si j'aurais pu terminer sans, merci encore !

Merci, Dominique, pour tout le temps que tu as pu m'accorder, pour ta patience, ta confiance, ton oreille toujours attentive. Je suis très fier de ce que l'on a pu faire ensemble ! Merci d'avoir fait partie de mon CST et de mon jury !

Merci, René, pour nos discussions enflammées, aussi bien sur la biochimie que les crocodiles égyptiens. J'ai été très honoré de vous compter dans mes deux CST, votre avis m'est précieux !

Merci également au Dr Frédérique Carrière, qui a pu s'investir lors de mon premier CST, et m'a fourni de judicieux conseils.

Merci à toute l'équipe GEMBAS pour m'avoir accompagné lors de mon stage, puis lors de ma thèse.

Merci également à toutes les autres équipes de l'institut, tous les autres laboratoires que j'ai pu visiter et avec qui j'ai pu travailler lors de cette thèse : l'équipe MEM2, le LAGEPP, SyNaBi, l'ILL...

Merci, Agnès D, Bastien, Christophe, Emma, Guillaume et Marjorie,  
Merci, Béa, pour ton enthousiasme communicatif, ta joie et ton entrain. Tu es le rayon de soleil du GEMBAS, toujours prête à nous écouter.

Merci, Leyre, Saïda, Thierry, Ana Maria, Giovana, Michele, Warren et Benoît de vous être impliqués dans ma thèse et de m'avoir permis d'avancer.

Merci, Carole, Pascal, Cécile, Insaf, ainsi que tout le reste du département Génie Biologique de l'IUT Lyon 1, autant les enseignants que les étudiants, pour ces moments passés en votre compagnie.

Merci, Anne et Laurence, pour votre humour, votre gentillesse et vos encouragements.

Merci également à toute l'équipe administrative et aux informaticiens de l'ICBMS !  
Simona, Patrick, Christine, Régine, Marion, Nicolas et Claude, vous répondez toujours présents, en étant toujours d'une efficacité absolument redoutable, le tout dans la bonne humeur !

Merci, Fred, d'avoir toujours été là quand on a besoin de réconfort. Je te l'ai déjà dit (quelque fois, on va dire), mais t'es la meilleure !

Merci, Sybil, pour tout le souci que tu te fais pour nous. Tu as vraiment un cœur d'or, on a rarement vu mieux pour nous remonter le moral !

Merci, CloClo, pour tes calculs toujours exacts, ta gentillesse et ton humour, même si JPP de tes anecdotes où tu manques à chaque fois de Delta Charlie Delta, STVCQJVD. T'es (vraiment) trop mim's! (Et bonne chance wesh, c'est toi la prochaine !)

Merci, Ala, pour ta générosité, ta prévenance, ta gentillesse. Tu es un pilier de stabilité et de calme sur lequel il fait bon de se reposer.

Merci, Laurent, de m'avoir appris plein de nouvelles manières d'apprécier les animaux, la Tchétchénie, les fougères arborescentes et l'ingénierie franco-canadienne de pointe.

Merci à Anna, Jade, Vonnette, Françoise, Brigitte, Marie-Astride et aux autres pour ce je-ne-sais quoi de folie douce qui fait du bien (#Oupsies), et les références toujours douteuses mais (presque) jamais inappropriées.

Merci, Nicolas, pour ton prénom si éblouissant, pour ces thés du réconfort, et pour tes futurs jumeaux ! Merci d'avoir été la muse qui m'habite !

Merci, Sébiba, pour ta spontanéité, ta bonne humeur, ta joie de vivre, ta descente absolument incroyable et tes goûts vidéoludiques qualitatifs.

Merci, TomTom, pour ta patience, ton optimisme, ton entrain et ton sérieux. Ta capacité à rebondir malgré les aléas est un vrai modèle pour moi ! D'ailleurs, qu'est-ce qui est petit et marron ?

Merci, Laëtitia, pour ta gentillesse sans faille, et tous les rires qu'on a pu partager. Et dire que tout à commencer dans cette fameuse formation... A quand les jumeaux ?

Merci, Romain, pour m'avoir piqué honteusement MA paillasse et MES pipettes. Tu as eu beau t'exiler loin de nous, tu restes un des phares dans la nuit de la recherche !

Merci, Layth, pour ton sérieux, ton pragmatisme, ton soutien et ta résilience, même (et surtout !) dans les moments difficiles ! Et merci de nous avoir engraisés à coup de sucreries !

Merci, Meriem, AKA le puit de connaissances. Merci pour tout ce que tu m'as appris, autant en termes de savoir et de savoir-faire que de savoir-être !

Merci, Chloé, pour cet ACE à l'IUT, absolument incroyable ! Merci pour ta gentillesse et ta bienveillance, maman monstre !

Merci, Léa, pour ton énergie DÉBORDANTE ! TOU-JOURS PLUS, comme on dit, mais c'est ça qu'est bien !

Merci, Yani, pour ton calme, ton humour, ta bonté et tes talents d'écrivain. Tu es une vraie pépite de la recherche, ne change rien !



Merci, Freddy et Yacine, pour ces six longs mois de stage passés ensemble. De loin le meilleur moment ever au laboratoire !

Merci, Samira, pour nous avoir initiés à l'après-shampooing à la coco ! J'espère sincèrement que tu réussiras dans ce que tu entreprendras, tu le mérites !

Merci, Xiaoyi, pour ta gentillesse et ta prévenance. J'ai été très heureux de travailler avec toi pendant ces quelques mois (maudit soit le COVID !).

Merci, Fabiana, de m'avoir supporté pendant ces longues semaines. Ta joie de vivre et ton sourire te vont si bien, garde-les à jamais !

Merci, Ariana, pour ton calme et ton sérieux à tout épreuve ! Bonne chance pour la suite, va falloir bien t'accrocher ! (Et merci pour les fusées !)

Merci, Coralie, pour le thermomixeur. A jamais dans nos cœurs.

Merci, Alizée, de m'avoir ouvert les yeux sur le monde de la recherche, et notamment sur les questionnements et les multiples essais qui se cachent derrière chaque choix, ainsi que.

Merci, Dimitri, AKA Mr le délégué, pour ces moments de discussions et d'échanges interdisciplinaires. Bonne chance pour la suite !

Merci, Annalisa, Valentina, Andrea et Alvja, la touche italienne de ma thèse ! Vous avez tous fait preuve d'une incroyable gentillesse et prévenance à mon égard, merci encore !

Merci, Mathieu, pour ces discussions enflammées ! J'espère que ça se passera mieux par la suite pour toi, tu l'as bien mérité !

Merci, Milène, pour ces congrès à l'*international*. Tu es un exemple de comment ne pas se laisser faire !

Merci encore à tous ceux que j'ai pu croiser pendant ma thèse et avec qui j'ai pu passer du temps, autant autour d'un spectro' ou d'une hotte que d'une tasse ou d'un verre ! Merci à Numa, Pierre, Yubo, Florina, Julie, Elahe, Clément, Anaïs, Elise, Laura<sup>2</sup>, Lucas, Meig, Sarah<sup>3</sup>, Marjorie, Yuka, Théo, Alix, Lauren, Mathieu, Romina, Charlotte, Anthony, Hema, Célia, Edwin, Hamza, Aravind, Corentin, Ibrahima, Alexandre, Leslie, Arthur, Usama, Anissa, Loïck, Olivier, Amira, Tina, ainsi qu'à tous ceux que j'oublie.

Merci également à Anaïs, qui m'a supporté pendant ces longues années de licence et de Master. Le binôme de choc toujours à fond !

Merci, enfin, à toute ma famille, pour votre soutien de toujours !

Merci, papa et maman, pour votre confiance, votre soutien et votre amour sans failles, j'ai vraiment touché le gros lot dès mon premier jour ! Je ne sais trop comment vous remercier, mais je sais que vous êtes fiers ! Merci d'avoir fait de moi le petit garçon que je suis resté.

Merci, Corentin, Cassandra et Lisa Lou, pour avoir été là, toujours, quand j'en ai eu besoin. Vous êtes les kheys que je n'échangerais pour rien au monde !

Merci, Corinne, Marie, Mikel et Noé, pour votre gentillesse, votre prévenance, votre soutien de toujours.

Je tiens à remercier, bien sûr, mamie, ma plus grande fan, mon rayon de soleil. Ta gentillesse, ton courage et ton engagement sont autant de valeurs auxquelles j'aspire. Tu es pour moi le meilleur modèle que l'on puisse imaginer, et je suis très, très fier d'être ton petit fils.

Merci, bien sûr à tous les autres, vous êtes trop nombreux pour tous vous citer, mais sachez que je vous aime, du plus profond de mon cœur.

Merci à tous ceux qui ont pris le temps et la peine de s'arrêter pour m'aider sur mon chemin !

« Tout seul, on va plus vite. Ensemble, on va plus loin. »

# Table des matières

<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE .....</b>	<b>20</b>
<b>ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>25</b>
<b>1. Les membranes cellulaires.....</b>	<b>25</b>
1.1. Description.....	25
1.1.1. Généralités et historique.....	25
1.1.2. Aspects structuraux.....	26
1.1.2.1. Lipides.....	26
1.1.2.1.1. Glycérolipides.....	27
1.1.2.1.2. Sphingolipides.....	28
1.1.2.1.3. Stérols.....	29
1.1.2.1.4. Répartition des lipides membranaires.....	29
1.1.2.2. Protéines.....	30
1.1.2.3. Glucides.....	32
1.1.2.4. Asymétrie membranaire.....	33
1.1.3. Aspects fonctionnels.....	35
1.2. Propriétés des membranes biologiques.....	37
1.2.1. Ségrégation.....	37
1.2.2. Fluidité membranaire.....	38
1.2.3. Polymorphisme lipidique.....	44
1.2.4. Propriétés membranaires dans un contexte pathologique.....	45
<b>2. Le cancer.....</b>	<b>46</b>
2.1. Description générale.....	46
2.2. Aspects biologiques du cancer.....	48

2.2.1.	Classification des différents types de cancer .....	48
2.2.2.	Aspects histologiques, cellulaires et biochimiques.....	49
2.2.3.	Aspects membranaires.....	51
2.2.3.1.	Modifications structurales et fonctionnelles.....	51
2.2.3.2.	Modifications des propriétés membranaires.....	53
2.3.	Aspects médicaux.....	54
2.3.1.	Symptômes.....	54
2.3.2.	Causes.....	54
2.3.3.	Prévention et diagnostic .....	56
2.3.4.	Traitements.....	57
2.3.4.1.	Chirurgie .....	58
2.3.4.2.	Radiothérapie .....	59
2.3.4.3.	Hormonothérapie .....	60
2.3.4.4.	Immunothérapie .....	61
2.3.4.5.	Chimiothérapie.....	61
<b>3.</b>	<b>La vectorisation dans un contexte oncologique .....</b>	<b>62</b>
3.1.	Définition et enjeux .....	62
3.1.1.	Définition de la vectorisation.....	62
3.1.2.	Enjeux de l'administration des médicaments.....	64
3.1.3.	Enjeux de la vectorisation dans un contexte de chimiothérapie.....	65
3.2.	Vectorisation ciblée en oncologie .....	68
3.2.1	Nanocristaux.....	68
3.2.2.	Nanoparticules métalliques.....	69
3.2.3.	Nanoparticules polymériques.....	71
3.3.	Liposomes.....	75
3.3.1.	Aspects généraux .....	75
3.3.1.1.	Structure et propriétés.....	75
3.3.1.2.	Méthodes de préparation .....	77
3.3.2.	Enjeux de la vectorisation liposomale dans un contexte oncologique .....	79
<b>4.</b>	<b>Modèles membranaires biomimétiques.....</b>	<b>82</b>
4.1.	Applications des modèles membranaires biomimétiques.....	82
4.2.	Les différents modèles membranaires biomimétiques .....	88

4.2.1.	Modèles de bicouches supportées.....	89
4.2.2.	Bicouches attachées et espacées.....	91
4.3.	Méthodes de caractérisation des bicouches biomimétiques planes.....	92
4.4.	Le modèle de bicouches biomimétiques développé au laboratoire.....	94
4.4.1.	Présentation du modèle.....	94
4.4.2.	Description du peptide pilotis.....	94
4.4.3.	Description du peptide fusogène.....	95
4.4.4.	Enjeux soulevés dans cette thèse.....	96

## **MATÉRIEL ET METHODES.....97**

### **1. Instrumentation et réactifs.....97**

1.1.	Réactifs.....	97
1.1.1.	Lipides.....	97
1.1.2.	Peptides.....	97
1.1.3.	Solvants.....	98
1.1.4.	Produits chimiques.....	98
1.1.5.	Tampons utilisés.....	98
1.2.	Culture cellulaire.....	99
1.2.1.	Cellules.....	99
1.2.2.	Réactifs et milieux de culture.....	99
1.3.	Instrumentation.....	100
1.4.	Matériel.....	100
1.5.	Logiciels.....	100

### **2. Préparation et caractérisation de liposomes.....101**

2.1.	Compositions lipidiques utilisées.....	101
2.2.	Protocole de préparation.....	102
2.2.1.	Séchage.....	102
2.2.2.	Resuspension en milieu aqueux.....	102
2.2.3.	Cycles de congélation/décongélation.....	103
2.2.4.	Extrusion.....	103
2.2.5.	Encapsulation de principes actifs.....	104
2.2.6.	Séparation sur colonne par chromatographie d'exclusion stérique...105	
2.3.	Caractérisation des liposomes.....	106

2.3.1.	Suivi de la taille et de la stabilité.....	106
2.3.2.	Mesure de la charge de surface.....	107
2.3.3.	Caractérisation de la fluidité membranaire .....	108
<b>3.</b>	<b>Essais <i>in cellula</i>.....</b>	<b>110</b>
3.1.	Culture cellulaire.....	110
3.1.1.	Cellules utilisées.....	110
3.1.2.	Protocoles de culture cellulaire .....	114
3.2.	Etude de l'interaction avec des liposomes fluorescents.....	114
3.2.1.	Ensemencement et traitement de plaques .....	114
3.2.2.	Visualisation en microscopie d'épifluorescence .....	115
3.2.3.	Quantification de l'interaction.....	116
3.3.	Etude des effets toxiques des liposomes et des molécules en culture cellulaire.....	116
3.3.1.	Mesure de la viabilité cellulaire .....	116
3.3.2.	Mesure de la cytotoxicité .....	117
3.3.3.	Protocoles de traitement et d'analyse.....	118
3.4.	Isolement de membrane plasmique à partir de culots cellulaires.....	119
3.4.1.	Fractionnement cellulaire .....	119
3.4.2.	Tests d'activité.....	121
3.4.2.1.	Dosage de l'ADN .....	121
3.4.2.2.	Dosage de la Cytochrome C OXydase (COX) .....	121
3.4.2.3.	Dosage de la Cytochrome C NADPH Réductase (CR) .....	122
3.4.2.4.	Dosage de la Lactate Déshydrogénase (LDH) .....	122
3.4.2.5.	Dosage de la Phosphatase Alcaline (PA).....	123
3.4.3.	Extraction lipidique.....	123
3.4.4.	Dosage des lipides.....	124
<b>4.</b>	<b>Formation et caractérisation de bicouches lipidiques biomimétiques .....</b>	<b>124</b>
4.1.	Formation et caractérisation de bicouches biomimétiques modèles.....	124
4.1.1.	Dispositif expérimental .....	124
4.1.2.	Imagerie par Résonance Plasmonique de Surface (SPRi) .....	125
4.1.3.	Microbalance à Cristal de Quartz avec suivi de la Dissipation (QCM-D) .....	12

4.2.	Application de la BALM, nouvelle technique de microscopie, à la caractérisation de la formation de pep-tBLM.....	128
4.2.1.	Dispositif expérimental en BALM .....	128
4.2.2.	Analyse des résultats en BALM .....	130

## **RÉSULTATS ET DISCUSSION ..... 131**

### **1. Etude de l'interaction liposome-membrane sur des modèles cellulaires. 132**

1.1.	Evaluation de l'impact de la composition lipidique sur l'interaction liposome-membrane .....	132
1.1.1.	Optimisation des paramètres expérimentaux.....	133
1.1.1.1.	Préparation et caractérisation des liposomes .....	133
1.1.1.1.1.	Préparation de la gamme de fluidité membranaire.....	133
1.1.1.1.2.	Préparation de liposomes fluorescents.....	135
1.1.1.1.3.	Quantification de la fluidité membranaire.....	136
1.1.1.1.4.	Choix du fluorophore.....	137
1.1.1.1.5.	Mesure de la charge de surface des liposomes.....	138
1.1.1.2.	Mise au point du protocole de mesure de l'interaction liposome-cellule.....	139
1.1.2.	Résumé de l'article « <i>Membrane Fluidity as a New Means to Selectively Target Cancer Cells with Fusogenic Lipid Carriers</i> », Bompard et al. dans <i>Langmuir</i> (2020).....	142
1.1.3.	Publication .....	143
1.1.4.	Etude de la fluidité membranaire des cellules .....	160
1.1.5.	Validation de la stratégie sur d'autres modèles cellulaires.....	161
1.2.	Application à la délivrance de molécules actives .....	164
1.2.1.	Délivrance de docétaxel à des lignées tumorales.....	164
1.2.2.	Essais de vectorisation de nouveaux composés .....	167
1.3.	Conclusions et perspectives.....	172

### **2. Mise en place d'un modèle biomimétique pour l'étude des interactions vecteurs-membranes ..... 179**

2.1.	Caractérisation de tBLM par la QCM-D et la BALM.....	180
2.1.1.	Application de la QCM-D pour la caractérisation de pep-tBLM.....	180
2.1.2.	Application de la BALM pour la caractérisation de tBLM.....	185

2.1.2.1.	Présentation de la BALM.....	185
2.1.2.2.	Résumé de l'article « BALM: Watching the Formation of Tethered Bilayer Lipid Membranes with submicron lateral resolution », Bompard et al. soumis dans Biophysical Journal.....	187
2.1.2.3.	Publication .....	190
2.1.3.	Comparaison entre la BALM, la QCM-D et la SPRi.....	247
2.2.	Mise en place d'un système membranaire biomimétique naturel.....	251
2.2.1.	Contexte et enjeux du caractère biomimétique.....	251
2.2.2.	Préparation de liposomes naturels .....	253
2.2.2.1.	Fractionnement cellulaire .....	253
2.2.2.2.	Dosage de lipides.....	255
2.2.3.	Formation de bicouches biomimétiques.....	256
2.2.3.1.	Suivi par SPRi .....	256
2.2.3.2.	Suivi par BALM.....	257
2.3.	Conclusions et perspectives.....	264

## **CONCLUSION GÉNÉRALE .....272**

## **ANNEXES ..... 278**

### **1. Synthèse du Dioll et application au dosage de lipides ..... 278**

1.1.	Synthèse du Dioll et marquage cellulaire .....	278
1.2.	Application du Dioll au dosage de lipides en phase aqueuse.....	279
1.2.1.	Principe du dosage et résumé de la publication.....	279
1.2.2.	Publication .....	280
1.2.3.	Perspectives .....	297

### **2. Liste des publications utilisées pour la Figure 92 ..... 299**

## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 302**



# LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-FU	5-FluoroUracile
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AFM	Microscopie à Force Atomique
ARA	« <i>Anti Reflecting and made of Absorbing material</i> »
ATP	Adénosine TriPhosphate
BALM	« <i>Backside Absorbing Layer Microscopy</i> »
C	Caroténoïde
CCD	Dispositif à transfert de charges (pour « <i>Charge Coupled Device</i> »)
Chol	Cholestérol
CL	Cardiolipine
COX	Cytochrome C OXydase
CR	Cytochrome C NADPH Réductase
cryo-TEM	Cryo-Microscopie Electronique à Transmission
CTCF	« <i>Corrected Total Cell Fluorescence</i> »
CXCR4	« <i>C-X-C chemokine receptor type 4</i> »
DAPC	1,2-DiArachidoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-PhosphatidylCholine
DHA	« <i>DocosaHexaenoic Acid</i> » ou acide docosahexaénoïque
DLaPC	1,2-DiLauroyl- <i>sn</i> -glycéro-3- PhosphatidylCholine
DLPC	1,2-DiLinoléoyl- <i>sn</i> -glycéro-3- PhosphatidylCholine
DLS	« <i>Dynamic Light Scattering</i> » ou diffusion dynamique de la lumière
DMEM	« <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> »
DMPC	1,2-DiMyristoyl- <i>sn</i> -glycéro-3- PhosphatidylCholine
DMSO	DiMéthylSulfoxyde
DOGS-NTA	« <i>1,2-DiOleoyl-<i>sn</i>-Glycero-3-[(N-(5-amino-1-carboxyoentyl) iminodiacetic acid) Succinyl]</i> »
DOPC	1,2-DiOléoyl- <i>sn</i> -glycéro-3- PhosphatidylCholine
DOPE	1,2-DiOléoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-PhosphatidylEthanolamine
DPPC	1,2-DiPalmitoyl- <i>sn</i> -glycéro-3- PhosphatidylCholine
DPPT	1,2-DiPalmitoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-PhosphoThioéthanol
DSPC	1,2-DiStéaroyl- <i>sn</i> -glycéro-3- PhosphatidylCholine
DTX	Docétaxel
EDTA	ÉthylèneDiamineTétraAcétique

EGFR	« <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> » ou récepteur au facteur de croissance épidermique
EIS	« <i>Electrochemical Impedance Spectroscopy</i> » ou spectroscopie d'impédance électrochimique
EPR	« <i>Enhanced Permeability and Retention</i> »
FRAP	« <i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i> » ou recouvrement de fluorescence après photoblanchiment
FRET	« <i>Förster Resonance Energy Transfer</i> » ou transfert d'énergie par résonance de type Förster
GAG	GlycosAminoGlycane
GM1	Monosialotétrahexosylganglioside
GP	« <i>Generalized Polarization</i> » ou polarisation généralisée
GPI	GlycosylPhosphatidylInositol
GPMV	Vésicules Géantes de la Membrane Plasmique
GUV	Vésicule unilamellaire géante (« <i>Giant Unilamellar Vesicle</i> »)
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HER2	« <i>Human Epithelial Receptor 2</i> »
IT	Intra-tumoral
IV	Intraveineuse
LDH	Lactate DésHydrogénase
LN	Lipides Naturels
LUT	« <i>LookUp Table</i> » ou table de conversion
LUV	« <i>Large Unilamellar Vesicle</i> » ou grande vésicule unilamellaire
MDR	« <i>Multi-Drug Resistant</i> »
MHF	« <i>Micro Hydrodynamic Focussing</i> »
MLV	« <i>MultiLamellar Vesicle</i> » ou vésicule multilamellaire
MMAE	« <i>MonoMethyl Auristatin E</i> »
MspA :	« <i>Mycobacterium Smegmatis Porin A</i> »
MTT	Bromure de 3-(4,5-diMéthylThiazol-2-yl)-2,5-diphényl Tétrazolium
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADP	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NBD-PE	N-(7-Nitro-2-1,3-BenzoxaDiazol-4-yl)-1,2-dioléoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-PhosphatidylEthanolamine
NS5A	Protéine Non-Structurale 5A

P	Porphyrine
P19-4H	Peptide pilotis
PA	Phosphatase Alcaline
PAA	Acide PolyAcrylique
PAH	Peptide fusogène
PBS	« <i>Phosphate Buffered Saline</i> »
PC	PhosphatidylCholine
PE	PhosphatidylEthanolamine
PEG	PolyEthylène Glycol
pep-tBLM	« <i>peptide-tethered Bilayer Lipid Membrane</i> »
PFA	<i>para</i> FormAldéhyde
PI	PhosphatidylInositol
PK	Pharmacocinétique
pNPP	<i>para</i> -NitroPhényl Phosphate
POPC	1-Palmitoyl-2-Oléoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-PhosphatidylCholine
PS	PhosphatidylSérine
Q	Naphtoquinone
QCM-D	« <i>Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring</i> » ou microbalance à cristal de quartz avec suivi de la dissipation
Qs	Diphénylbenzoquinone
Rhod-PE	N-(lissamine Rhodamine B sulfonyl)-1,2-dioléoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-PhosphatidylEthanolamine
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
RPMI	« <i>Roswell Park Memorial Institute</i> »
SANS	« <i>Small-Angle Neutron Scattering</i> » ou diffusion de neutrons aux petits angles
SAXS	« <i>Small-Angle X-ray Scattering</i> » ou diffusion de rayons X aux petits angles
SC	Sous-cutané
SEC	« <i>Steric Exclusion Chromatography</i> » ou chromatographie d'exclusion stérique
SL	Sphingolipide
SLB	« <i>Supported Lipid Bilayer</i> »

SM	SphingoMyéline
SNARE	« <i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor</i> »
SNC	Système Nerveux Central
SPR	« <i>Surface Plasmon Resonance</i> » ou résonance plasmonique de surface
SPRi	Imagerie par SPR
SUV	« <i>Small Unilamellar Vesicle</i> » ou petite vésicule unilamellaire
SVF	Sérum de Veau Fœtal
tBLM	« <i>tethered Bilayer Lipid Membrane</i> »
TIRF	« <i>Total Internal Reflection Fluorescence</i> » ou fluorescence par réflexion totale interne
T <sub>m</sub>	Température de transition de phase
TNF	« <i>Tumor Necrosis Factor</i> » ou facteur de nécrose de tumeurs
TRPS	« <i>Tunable Resistive Pulse Sensing</i> »
VEGF	« <i>Vascular Endothelium Growth Factor</i> » ou facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

# INTRODUCTION GÉNÉRALE

Éléments essentiels des cellules, les membranes cellulaires jouent de nombreux rôles, à la fois structuraux et fonctionnels. D'une part, elles agissent comme des barrières mécaniques, délimitant le milieu intracellulaire du milieu extracellulaire (ou du lumen des organites), en contrôlant les flux de matière de par leur perméabilité sélective. D'autre part, les membranes sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires, tels que la reconnaissance cellule-cellule, la transduction du signal ou encore la sécrétion de vésicules extracellulaires. L'ensemble de ces fonctions dépendent étroitement de la structure et des propriétés membranaires, ces dernières gouvernant la distribution, la diffusion et l'interaction des différents éléments membranaires impliqués dans les processus évoqués.

De fait, de nombreuses pathologies sont associées à des modifications de la composition, de l'organisation et des propriétés des membranes. Ces modifications qui perturbent l'homéostasie membranaire affectent ainsi de nombreux processus cellulaires, ce qui contribue à l'évolution pathologique. Parmi les différentes pathologies affectant les membranes cellulaires, on retrouve notamment le cancer, qui correspond à la prolifération incontrôlée de cellules anormales et représente un enjeu crucial de santé publique. Le développement tumoral se caractérise par une modification profonde du métabolisme cellulaire, qui impacte de fait la composition et les propriétés membranaires. Ces modifications permettent une meilleure adaptation des cellules tumorales à leur environnement, facilitant notamment leur division et leur migration.

Le développement de stratégies thérapeutiques médicamenteuses du cancer s'est heurté à de nombreuses problématiques, la principale étant la grande ressemblance des cellules tumorales avec les cellules saines. De nombreux composés ont un effet toxique sur les cellules tumorales, mais ils nécessitent le plus souvent la mise en place de stratégies de vectorisation pour assurer leur stabilité dans la circulation sanguine et leur conférer une spécificité d'action. En effet, bien que de nombreuses solutions chimiothérapeutiques existent, elles sont limitées

par leurs très lourds effets indésirables, du fait d'une action non spécifique du traitement sur les cellules saines.

Ces considérations font des stratégies de vectorisation ciblée un enjeu majeur, ces dernières permettant la délivrance du médicament uniquement au site tumoral, ce qui réduit les effets secondaires indésirables du traitement et augmente son efficacité thérapeutique. Les cellules tumorales étant très proches des cellules saines, la conception de vecteurs spécifiques de cellules tumorales repose sur l'utilisation de cibles membranaires, le plus souvent des protéines surexprimées dans les cellules tumorales par rapport aux cellules saines.

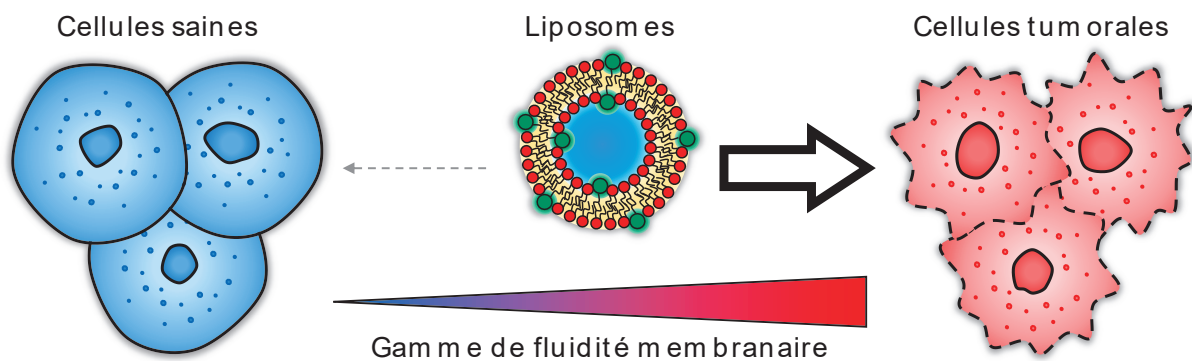
De nombreux systèmes de vectorisation existent, tels que les nanocristaux, les nanoparticules métalliques ou encore les polymersomes, chacun présentant des avantages différents. Parmi ces systèmes, nous nous sommes intéressés aux systèmes liposomaux, répandus du fait de leur facilité de préparation, leur caractère amphiphile qui les rend compatibles à la vectorisation de composés hydrophiles ou hydrophobes ou encore leur innocuité en termes de biocompatibilité et biodégradabilité. Les liposomes se présentent comme des vésicules lipidiques, constituées d'une ou plusieurs bicouches, et sont généralement recouverts d'un revêtement hydrophile qui leur confère leur stabilité dans la circulation sanguine. Les stratégies de vectorisation ciblée à partir de liposomes reposent le plus souvent sur un couplage avec un fragment protéique, un anticorps ou un ligand, spécifiques d'un des éléments surexprimés à la surface des cellules tumorales. En ce sens, les stratégies développées tirent parti des modifications de la composition protéique de la membrane plasmique pour un ciblage spécifique. Certaines stratégies tirent également parti des modifications de la composition glucidique, *via* un couplage des liposomes avec des fragments de lectines. En revanche, les modifications de la composition lipidique et des propriétés physicochimiques de la membrane plasmique sont encore à ce jour très largement sous-exploitées.

Ces travaux de thèse se sont intéressés aux interactions membrane-membrane, et plus particulièrement à l'interaction entre des liposomes et des membranes

plasmiques de lignées de cellules tumorales. Pour ce faire, deux stratégies ont été développées :

- l'étude de l'interaction liposome-membrane sur des modèles *in vitro* de cellules en culture ;
- la mise au point de modèles biomimétiques pour l'étude de l'interaction liposome-membrane par des méthodes biophysiques.

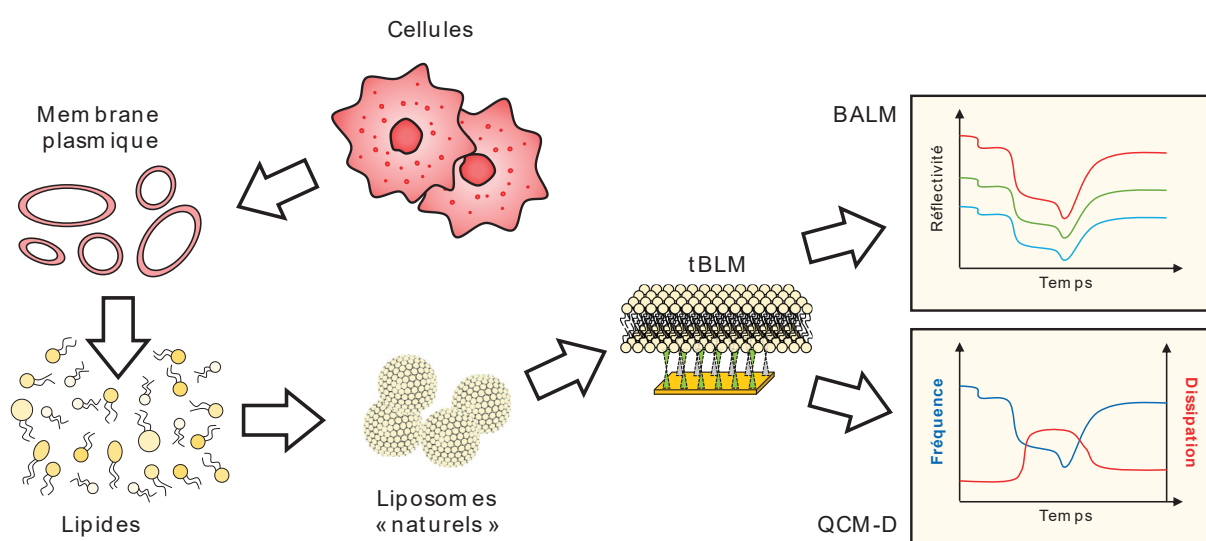
L'étude de l'interaction liposome-membrane avec des cellules en culture s'est basée sur la préparation de liposomes présentant une gamme de fluidité membranaire, et l'analyse de leur interaction avec des lignées cellulaires modèles de cancer de la prostate. Le but recherché était de déterminer une composition lipidique capable de cibler les cellules tumorales, mais pas les cellules saines (**Figure 1**).



**Figure 1.** Représentation schématique de l'étude de l'interaction liposome-membrane sur des cellules en culture réalisée pendant cette thèse.

L'interaction liposome-membrane a également été étudiée à l'aide de modèles de membranes biomimétiques. Ces derniers, développés comme des moyens d'étude des membranes, des protéines et des propriétés membranaires, sont de différentes natures, mais ont en commun l'avantage de permettre l'étude *in situ* des membranes cellulaires. Le système membranaire biomimétique utilisé est constitué de membranes attachées et découplées du support ou tBLM (pour « *tethered Bilayer Lipid Membranes* »). Ce système a été développé lors de travaux antérieurs réalisés au laboratoire, et les tBLM formées caractérisées par SPRi, AFM et FRAP. Dans le cadre de cette thèse, nous avons cherché à caractériser et à améliorer ce système dans le but final d'étudier l'influence des paramètres

membranaires, notamment la fluidité membranaire, sur l'interaction liposome-membrane. Ainsi, nous nous sommes attachés à caractériser d'une part le système par des méthodes non encore utilisées au laboratoire, comme la QCM-D (microbalance à cristal de quartz avec suivi de la dissipation) et la BALM (pour « *Backside Absorbing Layer Microscopy* »), une nouvelle méthode de microscopie optique développée par le Dr Dominique AUSSERRÉ (IMMM - UMR CNRS 6283). D'autre part, nous avons recherché à améliorer le caractère biomimétique des membranes formées, en les reconstituant directement à partir des lipides membranaires extraits des modèles cellulaires utilisés (**Figure 2**).



**Figure 2.** Représentation schématique de la stratégie d'étude de systèmes biomimétiques suivie pendant cette thèse. A partir de cellules en culture, un fractionnement cellulaire et une extraction lipidique permettent de récupérer la fraction lipidique de la membrane plasmique. En utilisant ces lipides naturels extraits pour former des liposomes, un système développé au laboratoire permet de former une membrane biomimétique (tBLM) ensuite caractérisée par une étude en QCM-D et en BALM.

Ce manuscrit s'articule en quatre parties. Tout d'abord, une « **Etude bibliographique** » présentera différentes notions concernant :

- les membranes cellulaires, leurs structures, leurs propriétés et leurs fonctions ;
- le cancer et ses aspects membranaires ;
- les vecteurs de molécules actives et en particulier les liposomes ;



- les systèmes biomimétiques et les outils de caractérisation disponibles.

Ensuite, la deuxième partie de « **Matériel et méthodes** » présentera les aspects techniques et méthodologiques des expérimentations réalisées dans le cadre de cette thèse.

La troisième partie, présentant, interprétant et discutant les résultats expérimentaux obtenus, sera divisée en deux chapitres. Le premier chapitre sera consacré à l'analyse de l'interaction liposome/cellule, et présentera la caractérisation des différents liposomes utilisés, l'étude de la spécificité et du mécanisme de l'interaction pour finir sur les différents essais d'encapsulation et de délivrance ciblée de principes actifs effectués avec les vecteurs liposomaux développés précédemment ; le second chapitre présentera la caractérisation de pep-tBLM par QCM-D, l'application de la BALM au suivi et de l'analyse de la formation de bicouches biomimétiques ainsi que la formation de bicouches biomimétiques à partir de lipides naturels extraits. Enfin, la quatrième et dernière partie viendra conclure et présenter les débouchés et perspectives de ces travaux.

# ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1. Les membranes cellulaires

### 1.1. Description

#### 1.1.1. Généralités et historique

Les membranes cellulaires sont les frontières délimitant et compartimentant les cellules, les unités de base du vivant. Les membranes plasmiques séparent le milieu intracellulaire du milieu extracellulaire, tandis que les membranes intracellulaires permettent, à l'intérieur même de la cellule, de séparer les différents organites du cytoplasme. Ces dernières portent le nom de l'organite qu'elles compartimentent, membrane nucléaire pour le noyau, mitochondriale pour la mitochondrie, etc.

Historiquement, le concept de membranes cellulaires est apparu dans la deuxième moitié du XIXe siècle, proposé pour la première fois en 1855 par Karl von Nägeli et Carl Cramer comme une explication aux phénomènes osmotiques. Ces travaux furent par la suite confirmés par Moritz Traube, qui créa en 1864 les premières membranes semi-perméables artificielles mimant des membranes cellulaires. La nature lipidique des membranes cellulaires sera pour la première fois suggérée par Heinrich Quincke, qui montra que les membranes cellulaires ont un comportement similaire à des films huileux. Cette hypothèse fut validée respectivement en 1899 et en 1900 par Hans Horst Meyer et Charles Ernest Overton, qui démontrèrent indépendamment que la pénétration d'anesthésiques dans les cellules était liée à leur lipophilicité, et donc que les membranes cellulaires étaient composées de lipides.

La détermination de la structure des membranes cellulaires commença en 1925, lorsque Evert Gorter et François Grendel isolèrent les lipides de la membrane

d'érythrocytes et les rapportèrent à la surface de ces érythrocytes [1]. Ils obtinrent une quantité de lipides deux fois plus importante que celle nécessaire à la formation d'une monocouche lipidique : les membranes cellulaires étaient donc organisées en bicouches lipidiques. Cependant, ce modèle de bicouche lipidique était incohérent avec les mesures de perméabilité et de tension de surface réalisées sur des membranes cellulaires. En 1935, James Danielli et Hugh Davson complétèrent ce modèle en y adjoignant des protéines, organisées en couches et recouvrant chaque côté de la bicouche lipidique [2]. L'avènement de la microscopie électronique dans les années 50 a permis de visualiser les membranes cellulaires. Marquées aux métaux lourds, elles apparaissaient sous la forme de deux bandes sombres espacées par une bande plus claire [3]. Les auteurs de ces expériences en ont déduit la confirmation du modèle de Danielli et Davson, mais d'autres au contraire attribuèrent les bandes sombres aux têtes polaires des phospholipides composant la bicouche lipidique membranaire [4,5]. Ce n'est qu'en 1972, avec le modèle de Sanger et Nicolson, que l'organisation structurale des membranes cellulaires fut établie. Leur modèle de mosaïque fluide permet de rendre compte à la fois de l'hétérogénéité structurale des membranes, dans le temps et dans l'espace, mais également leur dynamisme, les différents constituants se mouvant au sein de la membrane, et la membrane elle-même étant capable de se déplacer et de se déformer. Ce modèle, enrichi, complété et révisé pour suivre les avancées dans la compréhension des membranes cellulaires, comme la découverte des phénomènes de ségrégation conduisant à la formation de micro-domaines membranaires, reste aujourd'hui encore la meilleure représentation des membranes cellulaires [6–8].

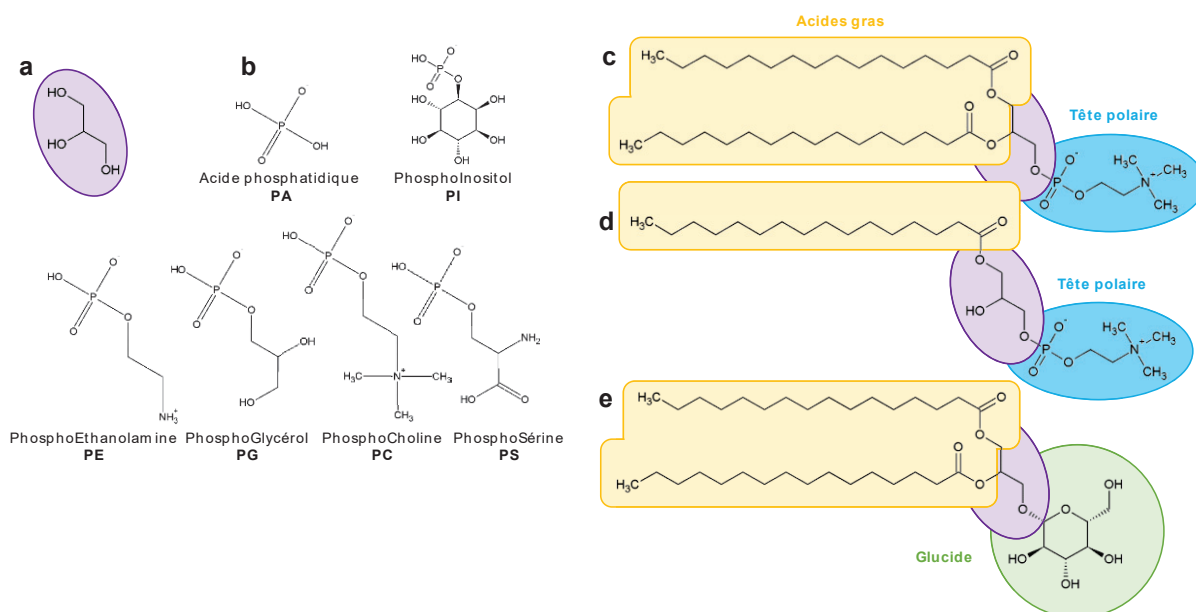
## 1.1.2. Aspects structuraux

### 1.1.2.1. Lipides

Structurellement, les membranes biologiques s'organisent donc en bicouches lipidiques en association avec des protéines. La partie lipidique des membranes est composée principalement de phospholipides, de cholestérol et de glycolipides. Les lipides sont des molécules amphiphiles, composés d'une partie polaire hydrophile et d'une ou plusieurs chaînes aliphatiques hydrophobes. Trois principaux types de lipides existent : les glycérolipides, les sphingolipides et les stérols.

### 1.1.2.1.1. Glycérolipides

Les glycérolipides ont pour structure de base une molécule de glycérol (**Figure 3a**). Chez les mammifères, les principaux glycérolipides sont les glycérophospholipides, où le carbone *sn*-3 du glycérol est estérifié par un phosphate. A l'exception de l'acide phosphatidique, le phosphate des glycérophospholipides est lié à un groupement polaire (**Figure 3b**). Les glycérophospholipides sont de plus estérifiés sur les positions *sn*-1 et *sn*-2 du glycérol par des acides gras, sauf dans le cas de lysophospholipides où une seule chaîne d'acide gras est présente (**Figure 3c**). La dernière catégorie de glycérolipides est constituée de glycéroglycolipides, très peu présents chez les mammifères mais très présents chez les végétaux. Ces lipides présentent en position *sn*-3 du glycérol des glucides liés par une liaison glucidique (**Figure 3d**).



**Figure 3.** Structure de glycérolipides.

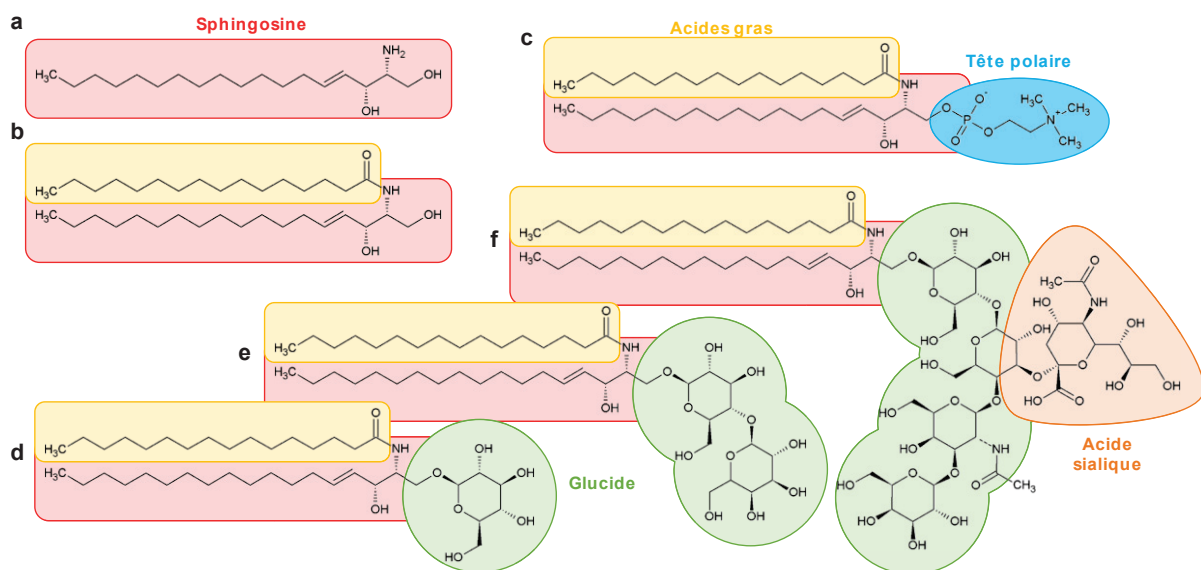
- Glycérol.
- Nature des différentes têtes polaires.
- Exemple de glycérophospholipide (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine ou DPPC).

d. Exemple de lysoglycérophospholipide (1-palmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine ou LysoPC).

e. Exemple de glycéroglycolipide (1,2-di-O-acyl-3-O-( $\alpha$ -D-glucopyranosyl)-*sn*-glycérol ou monoglucosyldiglycérade).

### 1.1.2.1.2. Sphingolipides

A la différence des glycérolipides, les sphingolipides ont pour structure de base une molécule de sphingosine (**Figure 4a**). Cette sphingosine, quand elle est amidifiée par un acide gras, forme un céramide (**Figure 4b**). Ces céramides peuvent ensuite être estérifiés par un groupement phosphate relié à une tête polaire - on parle alors de sphingophospholipides - ou bien reliés à des glucides par des liaisons osidiques, et on parle alors de sphingoglycolipides (**Figure 4c**). Dans ce dernier cas, on peut distinguer les différentes classes en fonction du nombre et de la nature des résidus glucidiques. On distingue ainsi les cérébrosides, qui ne contiennent qu'un résidu, des globosides, qui en contiennent plusieurs, et des gangliosides, qui contiennent des acides sialiques comme l'acide N-acétylneuraminique (**Figure 4d, 4e et 4f**).



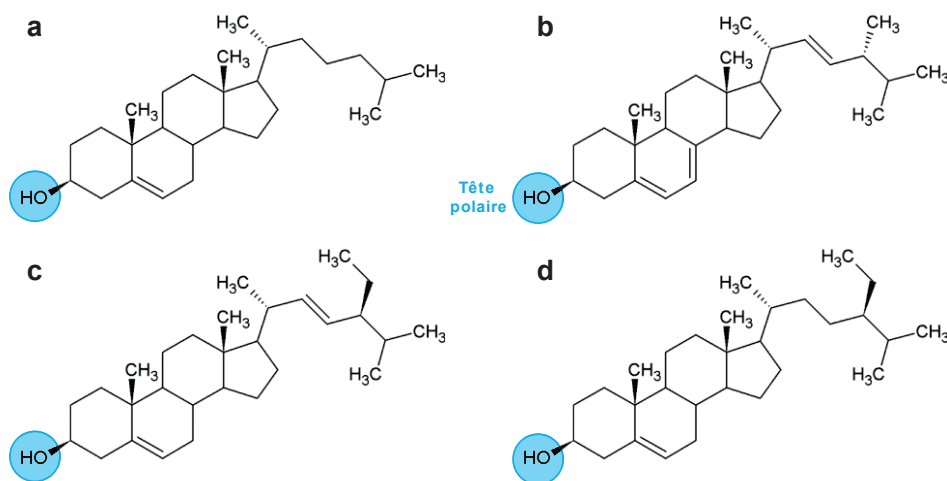
**Figure 4.** Structure de sphingolipides.

- Sphingosine.
- Exemple de céramide (N-palmitoyl-D-érythro-sphingosine).
- Exemple de sphingophospholipide (N-palmitoyl-D-érythro-sphingosyl-phosphatidylcholine ou sphingomyéline).
- Exemple de cérébroside (Glucocérébroside).

- e. Exemple de globoside (Lactosylcéramide).
- f. Exemple de ganglioside (GM1 : monosialotétrahexosylganglioside).

### 1.1.2.1.3. Stérols

Les stérols, parfois classés dans la famille des terpénoïdes plutôt que dans celle des lipides, sont le troisième constituant principal des membranes cellulaires. Chez les animaux, le cholestérol est le stérol majeur, les membranes des autres eucaryotes comportant d'autres stérols : l'ergostérol pour les champignons et les levures, le sitostérol et le stigmastérol pour les plantes (**Figure 5**).



**Figure 5.** Structure de différents stérols.

- a. Cholestérol.
- b. Ergostérol.
- c. Sitostérol.
- d. Stigmastérol.

### 1.1.2.1.4. Répartition des lipides membranaires

Il existe également une forte hétérogénéité dans la composition lipidique des membranes de différents organismes, de différents types cellulaires et au sein même d'une cellule, entre les membranes de différents organites (**Tableau 1**).

Lipide	Membrane plasmique	Appareil de Golgi	Endosomes Lysosomes	Réticulum endoplasmique	Mitochondries
PC	23	36	30	54	37
PE	11	21	11	20	31
PS	8	6	-	-	-
PI	-	12	7	11	6
Chol	34	18	30	8	-
SM	17	6	15	-	-
CL	-	-	-	-	22

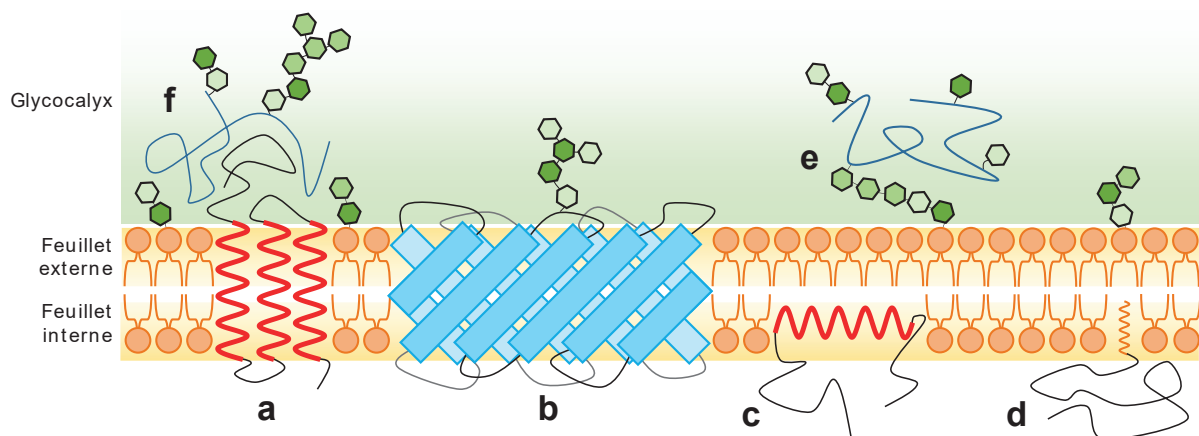
**Tableau 1.** Composition lipidique de différentes membranes cellulaires exprimées en pourcentages molaires (d'après [9]). Chol : Cholestérol ; SM : Sphingomyéline ; CL : Cardiolipine.

Alors que les membranes mitochondriales sont enrichies en cardiolipines, les membranes des gaines de myélines recouvrant les axones des neurones sont quant à elles enrichies d'un sphingolipide particulier qui leur donne leur nom : la sphingomyéline [10,11]. Cette diversité de compositions lipidiques est le plus souvent reliée à une diversité métabolique et génétique, et a des implications fonctionnelles majeures. Comme exemple, on peut citer les chloroplastes, des organites végétaux responsables de la photosynthèse, dans lesquels on retrouve des structures appelées thylakoïdes, avec une membrane principalement constituée de galactolipides [12]. Ces derniers interviennent dans la structuration en empilements (grana) des thylakoïdes et lors du processus de photosynthèse lui-même en régulant l'organisation des protéines membranaires impliquées [13].

### 1.1.2.2. Protéines

Si les lipides sont les constituants les plus nombreux des membranes, ils ne représentent que 40% environ de la masse totale membranaire, les 60% restant étant représentés par des protéines associées à la membrane, que l'on qualifie de protéines membranaires. Ce taux est, à l'instar du taux de lipides dans la membrane, variable d'une cellule et d'un compartiment à l'autre, avec des membranes extrêmement riches (membrane mitochondriale interne) et des membranes extrêmement pauvres en protéines (membrane mitochondriale

externe). Plusieurs types de protéines membranaires peuvent être définis en fonction de leur type d'association avec les membranes (**Figure 6**). Ainsi, les protéines insérées dans une membrane et la traversant de part en part sont appelées protéines transmembranaires. Structuellement, leurs domaines intramembranaires sont caractérisés par une forte présence de résidus d'acides aminés hydrophobes, conformés le plus souvent en une ou plusieurs hélices alpha (**Figure 6a**). Un autre type de structure transmembranaire, plus rare, est le tonneau bêta, composé d'une dizaine à une vingtaine de brins bêta assemblés en forme de cylindre (**Figure 6b**). A la différence des hélices alpha hydrophobes, les brins bêta comportent à la fois des résidus hydrophobes et des résidus hydrophiles, le plus souvent en alternance, de telle sorte que les chaînes latérales orientées vers l'intérieur du tonneau bêta soient des chaînes polaires, les chaînes apolaires étant orientées vers l'extérieur du tonneau bêta, en contact direct avec les chaînes acyles lipidiques de la membrane [14].



**Figure 6.** Structure d'une membrane plasmique (Figure adaptée de [15]).

- a. Protéine membranaire insérée par des **hélices alpha** transmembranaires.
- b. Protéine transmembranaire en **tonneau bêta**.
- c. Protéine insérée dans la membrane par une **hélice alpha** latérale.
- d. Protéine ancrée à la membrane par une **ancre lipidique**.
- e. Protéine ancrée à la membrane par une ancre **GPI**.
- f. Protéine associée à la membrane par des liaisons électrostatiques faibles.

Les protéines transmembranaires font partie des protéines membranaires intrinsèques ou intégrales, qui sont intimement liées aux membranes. Ces protéines intrinsèques regroupent également des protéines s'insérant



partiellement dans un feuillet membranaire par le biais d'hélices alpha parallèles au plan de la membrane ou de boucles hydrophobes (**Figure 6c**), ou encore des protéines liées à des ancrs (**Figure 6d et 6e**). Ces ancrs peuvent être de nature lipidique (acide myrsitique, farnésyl ou géranyl-géranyl) ou glycolipidique, comme avec les ancrs GPI (GlycosylPhosphatidyInositol) [16–18].

La dernière classe de protéines, les protéines extrinsèques ou périphériques, regroupent les protéines qui interagissent faiblement avec la membrane, en établissant des liaisons de faible énergie avec des lipides et des protéines membranaires (**Figure 6f**). Ces liaisons de faible énergie correspondent le plus souvent à des interactions électrostatiques avec les régions polaires des lipides et des protéines membranaires, voire même à des liaisons ioniques quand des protéines associées à des cations interagissent avec le groupement phosphate des têtes polaires des lipides. C'est par exemple le cas du domaine protéique C2, qui est un domaine ubiquitaire qui se complexe avec 2 à 3 ions calcium et qui est impliqué dans l'adressage de nombreuses protéines à la membrane [19].

### 1.1.2.3. Glucides

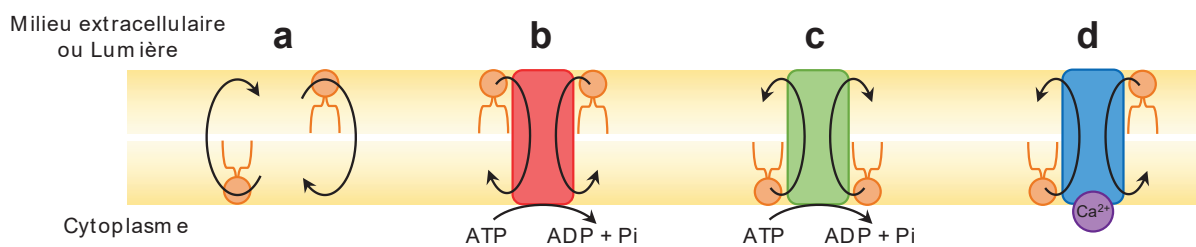
Enfin, au niveau de la membrane plasmique, qui délimite les frontières de la cellule, on retrouve un nombre important de glucides liés de manière covalente aux lipides et aux protéines du feuillet externe, et dirigés vers le milieu extracellulaire (**Figure 6**, en vert). Cet élément structural, appelé glycocalyx, est très hydrophile, et crée ainsi une couche protectrice autour des cellules qui peut dépasser 400 nm d'épaisseur dans certains épithéliums [20]. On retrouve ainsi principalement des glycolipides, des glycoprotéines et des protéoglycanes. Alors que les glycolipides et les glycoprotéines correspondent respectivement à la glycosylation de lipides et de protéines, les protéoglycanes sont constitués d'associations entre une protéine et des glycosaminoglycanes (GAG). La différence principale entre glycoprotéines et protéoglycanes réside dans le nombre et l'organisation des glucides : la fraction glucidique des protéoglycanes est beaucoup plus importante que celle des glycoprotéines, avec des chaînes longues et non-ramifiées à l'inverse des chaînes glucidiques des glycoprotéines qui sont courtes et ramifiées [21,22]. La nature des résidus glucidiques est également sujette à de nombreuses variations entre les

différents types cellulaires, ce qui permet de moduler la structure et les fonctions du glycocalyx [23].

#### 1.1.2.4. Asymétrie membranaire

Les membranes cellulaires sont asymétriques. Elles ne sont pas organisées structurellement et fonctionnellement à l'identique au niveau des deux feuillets membranaires [24,25]. Ainsi, selon leur origine, les feuillets sont préférentiellement enrichis en une ou plusieurs classes de lipides, de protéines ou de glucides.

L'asymétrie de la bicouche lipidique est un paramètre clé dans la structuration des membranes cellulaires, mais ce paramètre conditionne également les fonctions membranaires [26]. En effet, la bicouche lipidique étant un environnement fluide dans lequel les lipides peuvent se déplacer, des mouvements de *flip-flop*, c'est-à-dire le passage d'un feuillet à un autre, existent, bien qu'ils soient rares car thermodynamiquement peu propices (**Figure 7a**) [27].



**Figure 7d.** Mouvements de lipides d'un feuillet à l'autre de la bicouche lipidique (Figure adaptée de [28]).

- a. Mouvements de flip-flop.
- b. Action des flippases.
- c. Action des floppases.
- d. Action des scramblases.

En revanche, des classes particulières d'enzymes membranaires, les flippases, les floppases et les scramblases, ont comme activité la translocation de lipides d'un feuillet à l'autre. Les flippases désignent les enzymes basculant des lipides du feuillet interne au feuillet externe (**Figure 7b**), les floppases les enzymes réalisant l'action inverse (**Figure 7c**) et les scramblases désignent les enzymes n'ayant pas

de spécificité de feuillet et faisant passer des lipides d'un feuillet à l'autre indifféremment (**Figure 7d**) [29–31].

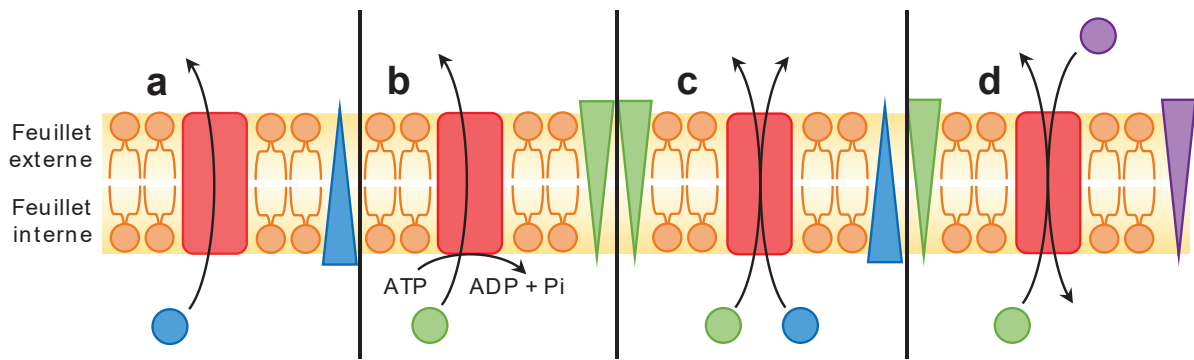
Les flippases et les floppases ne prenant en charge que certaines classes lipidiques, leur action conduit ainsi à une asymétrie de composition lipidique : le feuillet au contact du cytoplasme est enrichi en phosphatidyléthanolamines (PE) et en phosphatidylsérines (PS) alors que le feuillet au contact du milieu extracellulaire ou de la lumière de l'organite est enrichi en phosphatidylcholines (PC) et en sphingolipides (SL). Les scramblases, elles, n'ont pas de spécificité pour une classe particulière de lipides. Elles se distinguent également par leur dépendance aux ions calcium, alors que les flippases et floppases sont ATP-dépendantes [29].

L'asymétrie de la membrane ne concerne cependant pas que les lipides. Les protéines elles aussi sont retrouvées préférentiellement dans un feuillet particulier [24]. Les deux éléments principaux déterminant la localisation d'une protéine membranaire concernent son adressage et son transport d'une part, et son mode d'association aux membranes d'autre part. En effet, une protéine hydrophile par exemple ne peut pas traverser la membrane seule ; elle nécessite des transporteurs ou des systèmes de sécrétion pour qu'elle puisse passer d'un côté à l'autre de la membrane. Les protéines associées à certaines protéines transmembranaires et celles ancrées aux membranes possèdent également une certaine spécificité quant à leur localisation : les protéines transmembranaires ont une orientation bien précise, nécessaire à leurs fonctions, et certaines ancrées, comme les ancrées GPI, ne sont présentes que dans certains feuillets [32]. Tous ces paramètres conditionnent et régulent la localisation membranaire des protéines, en favorisant une répartition hétérogène entre les différentes membranes et les différents feuillets.

Enfin, comme illustré avec l'asymétrie de répartition des ancrées GPI, les glucides sont eux aussi inégalement répartis de part et d'autre des membranes cellulaires. En particulier, les glucides ne sont présents en grande quantité qu'au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique, au niveau du glycocalyx [33,34]. Cela signifie que la glycosylation des protéines et des lipides, ainsi que la formation de protéoglycanes sont des phénomènes spécifiques aux membranes plasmiques et qu'ils ne sont qu'exceptionnellement retrouvés dans d'autres membranes.

### 1.1.3. Aspects fonctionnels

Les membranes cellulaires assurent de nombreux rôles, du fait notamment de leur richesse en protéines. Structurellement, les membranes forment des barrières semi-perméables et isolantes en ne laissant diffuser librement que quelques rares molécules, principalement des molécules suffisamment hydrophobes pour pénétrer la bicouche lipidique. La plupart des molécules traversant la membrane doivent être véhiculées par des transporteurs. Ces derniers sont des protéines transmembranaires réparties dans trois principales familles : les canaux ioniques, les pompes ATP-dépendant et les co-transporteurs. Les canaux ioniques permettent le passage d'ions à travers la membrane (**Figure 8a**). Ce transport ne nécessite pas d'énergie, les ions se déplaçant en fonction de gradients de concentration et de charge. Au contraire, les pompes ATP-dépendantes utilisent l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour permettre le passage des molécules contre leur gradient (**Figure 8b**). L'activité conjuguée des pompes et des canaux ioniques a pour conséquence la formation d'un gradient de concentration d'espèces ioniques aboutissant à une différence de potentiel de part et d'autre de la membrane, le cytoplasme étant chargé plus négativement que le milieu extracellulaire. Cette différence de potentiel a des implications fonctionnelles majeures dans la transmission de l'information nerveuse et la contraction du muscle cardiaque, deux phénomènes reposant sur la dépolarisation de la membrane. Enfin, les co-transporteurs correspondent à des protéines permettant le passage d'une molécule contre son gradient. Ils se différencient des pompes ATP-dépendantes car l'énergie nécessaire à leur fonctionnement ne vient pas de l'hydrolyse de l'ATP mais du passage d'une seconde molécule dans le sens de son gradient. Ainsi, on distingue les symports, où les deux molécules traversent la membrane dans le même sens, et les antiports, où les deux molécules traversent la membrane dans des sens opposés (**Figure 8c** et **8d**). Ces co-transporteurs résultent généralement du couplage d'un canal ionique avec une pompe, le canal fournissant à la pompe l'énergie nécessaire à son activité.



**Figure 8.** Transporteurs membranaires. Les rectangles représentent les transporteurs, les ronds les molécules transportées et les triangles les gradients de concentrations de ces molécules.

- a.** Canal ionique : la molécule bleue passe selon son gradient.
- b.** Pompe ATP-dépendante : la molécule verte passe contre son gradient.
- c.** Symport : la molécule verte passe contre son gradient, la molécule bleue selon son gradient.
- d.** Antiport : la molécule verte passe contre son gradient, la molécule violette selon son gradient.

La perméabilité sélective de la membrane limitant l'internalisation de molécules, on trouve à la surface des membranes cellulaires de nombreux récepteurs capables de détecter des signaux extracellulaires et d'entraîner une réponse cellulaire adaptée. Ces récepteurs sont généralement composés de trois parties : une partie captant le signal extracellulaire, une partie transmembranaire et une partie le plus souvent cytoplasmique transmettant le signal. Même si la majeure partie des récepteurs membranaires reconnaissent un signal moléculaire, il existe néanmoins des récepteurs capables de détecter des variations d'osmolarité, de pression mécanique, de température et même d'intensité lumineuse. Une fois le récepteur activé par un premier messenger, la transduction du signal se fait généralement par la libération de seconds messagers suite à une action enzymatique. Parmi les seconds messagers les plus souvent rencontrés, on retrouve des ions calciums, stockés dans le réticulum endoplasmique et relargués suite à des signaux spécifiques, des seconds messagers lipidiques ou encore le monoxyde d'azote, une molécule capable de traverser les membranes et d'agir soit par fixation sur son récepteur, la guanylate cyclase, soit par nitrosylation des protéines [35–39]. L'activité de nombreux récepteurs membranaires nécessite la présence à proximité d'autres

protéines ou de lipides pour qu'ils puissent exercer leur fonction. C'est notamment le cas des récepteurs de type tyrosine-kinase, qui se dimérisent et se transphosphorylent lors de la liaison de leur substrat, avant de transmettre le signal. La dimérisation n'est ainsi possible que si deux récepteurs sont à grande proximité, chose peu probable si les récepteurs sont répartis dans toute la membrane plasmique [40]. Il existe cependant des régions au sein de la membrane plasmique, enrichies en certains lipides et certaines protéines.

## 1.2. Propriétés des membranes biologiques

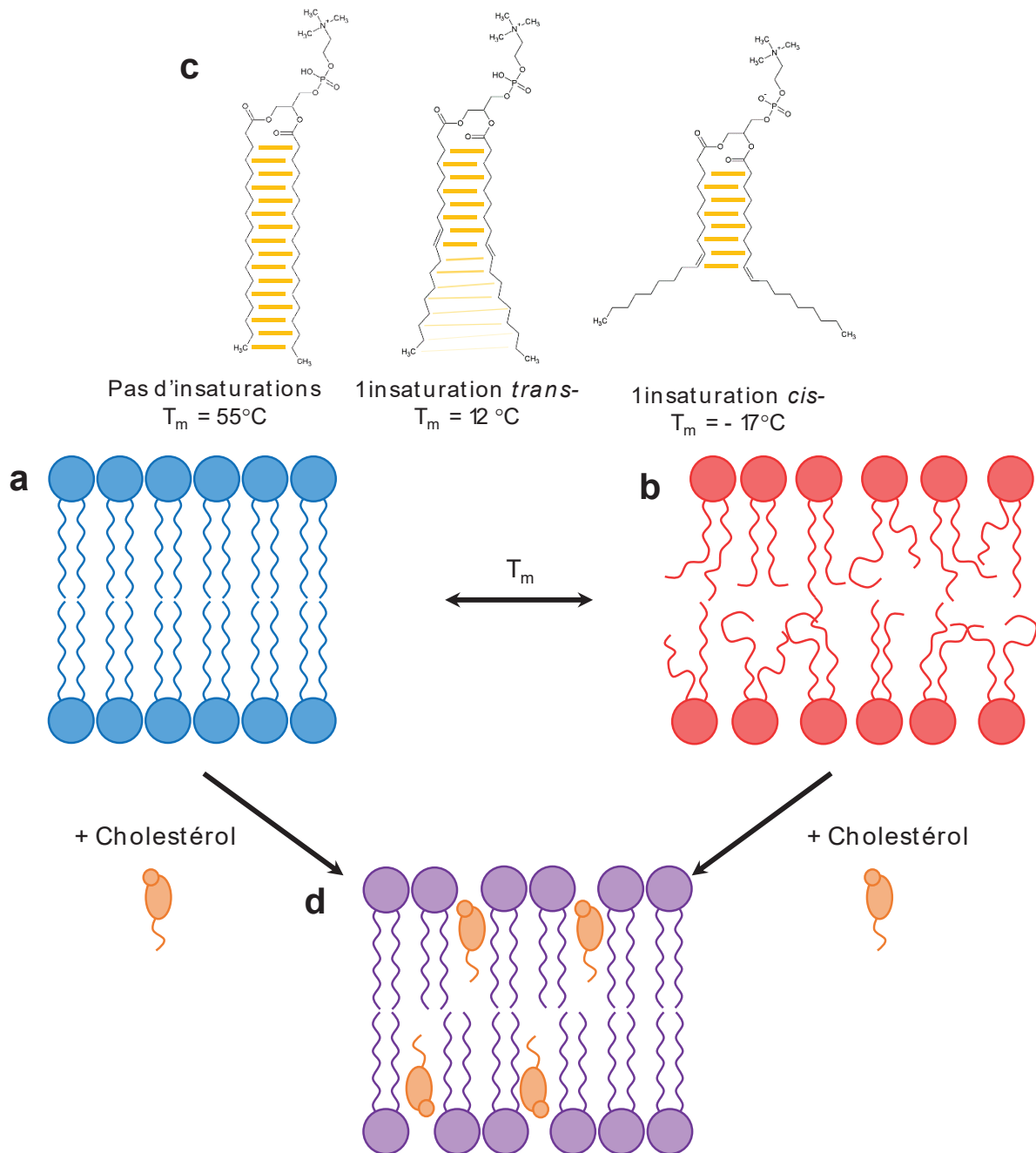
### 1.2.1. Ségrégation

La ségrégation désigne, au sein d'une membrane, sa tendance à former des domaines membranaires de compositions différentes à l'inverse du modèle de mosaïque fluide homogène où les lipides et les protéines seraient équitablement répartis dans toute la membrane [41–43]. Ces domaines sont des structures transitoires, extrêmement dynamiques dans le temps et dans l'espace. Les plus décrits sont les radeaux lipidiques, des domaines aux dimensions nanométriques, enrichis en acide docosahexaénoïque (DHA), en sphingolipides et en cholestérol, avec des implications fonctionnelles dans le trafic de protéines et de récepteurs membranaires ou encore dans la transmission de l'influx nerveux [44–47]. Les domaines membranaires sont le plus souvent fortement associés au cytosquelette, un réseau protéique dynamique, principal responsable de la forme et de la résistance mécanique des cellules [48,49]. Le cytosquelette joue également un rôle important dans la reconnaissance entre la cellule et son environnement cellulaire et l'établissement de contacts et de jonctions entre la matrice extracellulaire et d'autres cellules environnantes. Dans ces processus, des phénomènes de ségrégation lipidiques et protéiques sont à l'œuvre [50–52]. Notamment, l'initiation de contacts entre cellules fait appel à des protéines de la famille des cadhérines. Alors que les cadhérines diffusent librement dans la membrane plasmique, l'établissement de contacts entre cellules crée des clusters, où de nombreuses molécules de cadhérine sont regroupées dans un domaine étroit et établissent des liaisons les unes avec les autres. La formation de ces domaines membranaires nécessite l'intervention du cytosquelette en mobilisant les filaments d'actine pour acheminer et mettre en contact les cadhérines [52]. Ainsi, les domaines

membranaire correspondent le plus souvent à des régions où la mobilité des molécules est altérée, du fait de la modification locale de la composition membranaire ou de la présence d'éléments cytosquelettiques qui participent à limiter la diffusion libre des molécules au sein de la bicouche.

### 1.2.2. Fluidité membranaire

Dans une membrane lipidique, la notion de fluidité membranaire décrit l'état de phase global de la membrane, sa capacité à se déformer et la capacité des lipides à diffuser librement. Elle est intimement liée à la notion de phase des lipides, qui peuvent adopter une phase gel ordonnée ou une phase liquide désordonnée. L'existence de ces deux états rend compte de l'agencement des chaînes acyles des lipides, les unes à côté des autres, qui peuvent former entre elles des liaisons de faible énergie, les liaisons de van der Waals. Ces dernières stabilisent la structure membranaire et favorisent un état rigide de la membrane où les lipides ont des mouvements et une diffusion limités (**Figure 9a**). Plus les chaînes acyles sont longues, plus les forces de van der Waals sont nombreuses, et plus les membranes sont rigides à une température donnée. La température de transition de phase ( $T_m$ ) désigne alors la température à laquelle l'énergie thermique est suffisante pour rompre ces forces de van der Waals et faire basculer la membrane lipidique d'un état ordonné à un état liquide désordonné où les lipides peuvent diffuser librement dans la bicouche (**Figure 9b**). En plus de la longueur des chaînes acyles, leur insaturation joue également un rôle clé dans la détermination de la fluidité membranaire puisque la présence de doubles liaisons crée des courbures dans les chaînes qui limite leur juxtaposition et l'établissement de forces de van der Waals stabilisatrices.



**Figure 9.** Evolution de la fluidité membranaire (Figure adaptée de [53]).

- a.** Phase gel ordonnée.
- b.** Phase liquide désordonnée.
- c.** Impact de l'insaturation sur la température de transition de phase ( $T_m$ ). En jaune, représentation schématique des forces de van der Waals.
- d.** Influence du cholestérol sur la fluidité membranaire.

A ce sujet, il convient de noter que le caractère *cis*- ou *trans*- des doubles liaisons a un fort impact sur l'état de fluidité membranaire, les insaturations *cis*- étant plus



contraignantes d'un point de vue stérique que les insaturations *trans*-, ce qui leur confère un potentiel fluidifiant plus élevé en s'opposant à l'établissement des forces de van der Waals inter-chaînes (**Figure 9c**).

Les membranes cellulaires contiennent du cholestérol, qui joue, en plus de son implication majeure dans le métabolisme, le rôle de modulateur de phase lipidique (**Figure 9d**). En effet, cette molécule s'intercale entre les glycéro- et les sphingolipides, et sert de tampon de la fluidité membranaire [54]. A température élevée, son insertion entre les têtes polaires compacte la membrane, et la rend plus rigide. A l'inverse, à basse température, lorsque les lipides sont très proches les uns des autres, son insertion écarte les chaînes et augmente la fluidité membranaire. En présence de cholestérol, les membranes adoptent ainsi une conformation liquide ordonnée, à mi-chemin entre une phase gel ordonnée et une phase fluide désordonnée [55]. Dans cette phase, les lipides présentent une conformation ordonnée des chaînes, similaire à celle de la phase ordonnée, mais une rotation axiale et une mobilité latérale similaire à celles de la phase désordonnée.

La fluidité membranaire est, par définition, reliée à la notion de température. Quand on évalue la fluidité d'une membrane, on distingue un état rigide à basse température, qui correspond à la phase gel ordonnée, un état fluide à haute température correspondant à la phase liquide désordonnée, et un état de transition autour de la  $T_m$ . Ainsi, quelle que soit sa composition lipidique, une membrane présente ces trois phases. La différence principale correspondra à la  $T_m$ , qui marque la transition entre phase rigide et phase fluide, et qui varie en fonction de la composition. Lorsque l'on compare la fluidité de deux membranes, la membrane la plus fluide sera la membrane ayant la  $T_m$  la plus basse. Dans un contexte de comparaison et d'étude de fluidité de non pas une mais de plusieurs membranes, la notion de fluidité membranaire est alors découplée de la température expérimentale. En prenant en compte la valeur de  $T_m$  plutôt que la température expérimentale, la comparaison se fait ainsi sur un paramètre intrinsèque à chaque membrane plutôt que sur un paramètre expérimental. Dans un contexte d'étude chez l'homme, la température corporelle étant de 37 °C, la fluidité des cellules et les comparaisons entre types cellulaires seront ainsi le plus

souvent évaluées par rapport à cette température fixe plutôt qu'en fonction d'une gamme de températures.

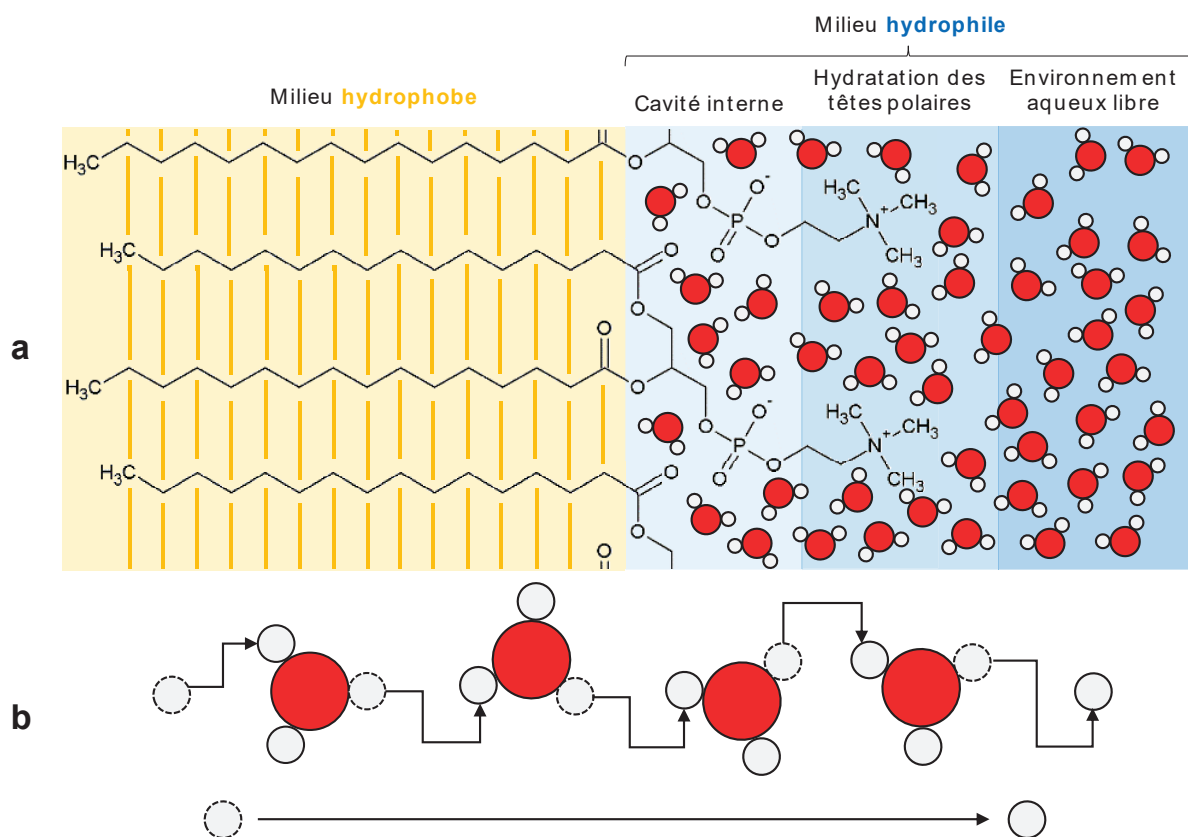
Les membranes cellulaires sont composées de nombreux lipides de différentes natures et intègrent également, comme nous l'avons vu précédemment, de nombreux éléments protéiques et glucidiques. Cela a pour conséquence la coexistence, dans une même membrane, de lipides en phase liquide et de lipides en phase gel à une température donnée. Ces lipides vont alors avoir tendance à former des membranes où les deux phases coexistent, avec des domaines plus rigides et des domaines plus fluides qui participent aux phénomènes de ségrégation lipidique. Cette ségrégation lipidique, en modifiant localement les propriétés membranaires, a pour conséquence de pouvoir également générer la ségrégation des protéines, certaines ayant des affinités particulières pour des domaines différents de fluidité [56]. C'est par exemple le cas de la 5-lipoxygénase, une enzyme qui s'associe à la membrane nucléaire lors de son activation, et dont le recrutement est facilité lorsque la membrane est plus fluide [57].

En outre, lors de l'insertion de protéines dans une membrane, se forme autour d'elles un anneau lipidique. Ces lipides qui entourent les protéines transmembranaires établissent avec elles de fortes interactions, les têtes polaires des lipides interagissant avec les régions hydrophiles extra-membranaires des protéines, et les chaînes acyles avec la région hydrophobe transmembranaire. Ce recrutement lipidique permet de faciliter la diffusion de ces protéines au sein de la bicouche [58]. En revanche, pour les lipides recrutés, leur très forte interaction avec les protéines limite fortement leur diffusion. L'étude des protéines membranaires est rendue difficile par leur caractère amphiphile nécessaire pour leur insertion dans la membrane, mais problématique pour leurs études *in vitro*. De nombreuses solutions existent pour les solubiliser, reposant le plus souvent sur la création d'un environnement amphiphile limitant les contacts entre régions hydrophiles et régions hydrophobes. La principale méthode de solubilisation repose sur l'utilisation de détergents [59,60]. De nombreuses études sur les protéines membranaires ont mis en exergue que les lipides entourant la protéine ont une telle interaction avec elle, qu'une partie d'entre eux est toujours associée à la protéine, même après extraction par des détergents [61,62]. Cela dénote de la force

d'interaction entre les lipides et la protéine qu'ils entourent, bien plus forte que celle entre les lipides de l'anneau et les lipides du reste de la membrane. Cette forte interaction donne aux lipides une importance majeure dans la fonction des protéines transmembranaires, mais se traduit par des contraintes conformationnelles, qui restreignent leur mobilité dans la membrane [58]. Ainsi, les protéines membranaires modulent leur environnement lipidique, et ce faisant, participent à leur tour à l'ajustement de la fluidité membranaire.

La fluidité des membranes cellulaires influence de nombreux paramètres. C'est par exemple le cas de la perméabilité membranaire, les membranes fluides étant généralement plus perméables aux ions et aux petites molécules hydrophiles que les membranes rigides [63]. En effet, les membranes sont des environnements de permittivité très faible, ce qui leur confère un caractère isolant, ce dernier rendant le passage des ions très peu favorable thermodynamiquement. L'influence de la fluidité membranaire sur la perméabilité s'explique par une plus grande hydratation des membranes fluides, liée à la plus grande mobilité des molécules lipidiques et leur espacement plus important. Cela a pour conséquence d'accroître la quantité de molécules d'eau présentes au niveau de la membrane. La présence de molécules d'eau entre les têtes polaires des molécules de lipides favorise le passage d'ions et de molécules hydrophiles d'un côté à l'autre de la membrane. Le coefficient de partage est ainsi le plus souvent corrélé à l'évolution de la fluidité membranaire [64]. En revanche, la perméabilité des membranes aux protons (ions  $H^+$ ) ne suit pas du tout la même tendance. Dans un contexte cellulaire, des protéines membranaires spécifiques prennent en charge le transport des protons d'un côté à l'autre des membranes. Pourtant, des études sur des modèles membranaires composés uniquement de lipides ont montré que la perméabilité observée des membranes aux protons était bien supérieure à la perméabilité attendue. Le mécanisme supposé de perméation des membranes aux petits composés hydrophiles repose sur la formation de petites cavités remplies d'eau au niveau des jonctions entre les têtes polaires et les chaînes acyles (**Figure 10a**). Cependant, ce modèle ne permet pas d'expliquer la diffusion des protons [63,64]. Lors de l'enrichissement d'une membrane phospholipidique en sphingolipides ou en cholestérol, la fluidité membranaire diminue localement. Cette diminution est corrélée à une plus faible perméabilité pour les composés hydrophiles tels que

l'ammoniac, l'urée ou l'acétamide, et s'explique par un agencement lipidique plus compact des molécules de lipides, qui diminue l'espacement entre chaînes et la diffusion des molécules à travers la membrane. En revanche, dans le cas des protons, l'enrichissement en sphingolipides et en cholestérol se traduit par une plus forte perméabilité de la membrane [65]. Deux principaux mécanismes ont été proposés pour expliquer le transport des protons. Le premier est basé sur des liens éphémères de molécules d'eau traversant la membrane et permettant le passage des protons par mécanisme de Grotthuss, par lequel un proton « saute » d'une molécule d'eau à une autre [66]. Par réaction en chaîne, un des protons de la molécule d'eau accepteuse va alors sauter sur une molécule voisine, qui va alors libérer un proton à son tour, etc. (**Figure 10b**) [67].



**Figure 10.** Perméabilité membranaire.

- a. Hydratation de la bicouche lipidique à l'interface avec une phase aqueuse.
- b. Mécanisme de Grotthuss (Figure adaptée de [67]).

Le deuxième mécanisme proposé repose quant à lui sur la formation de réseaux aqueux latéraux, parallèles au plan de la membrane plutôt que perpendiculaires,

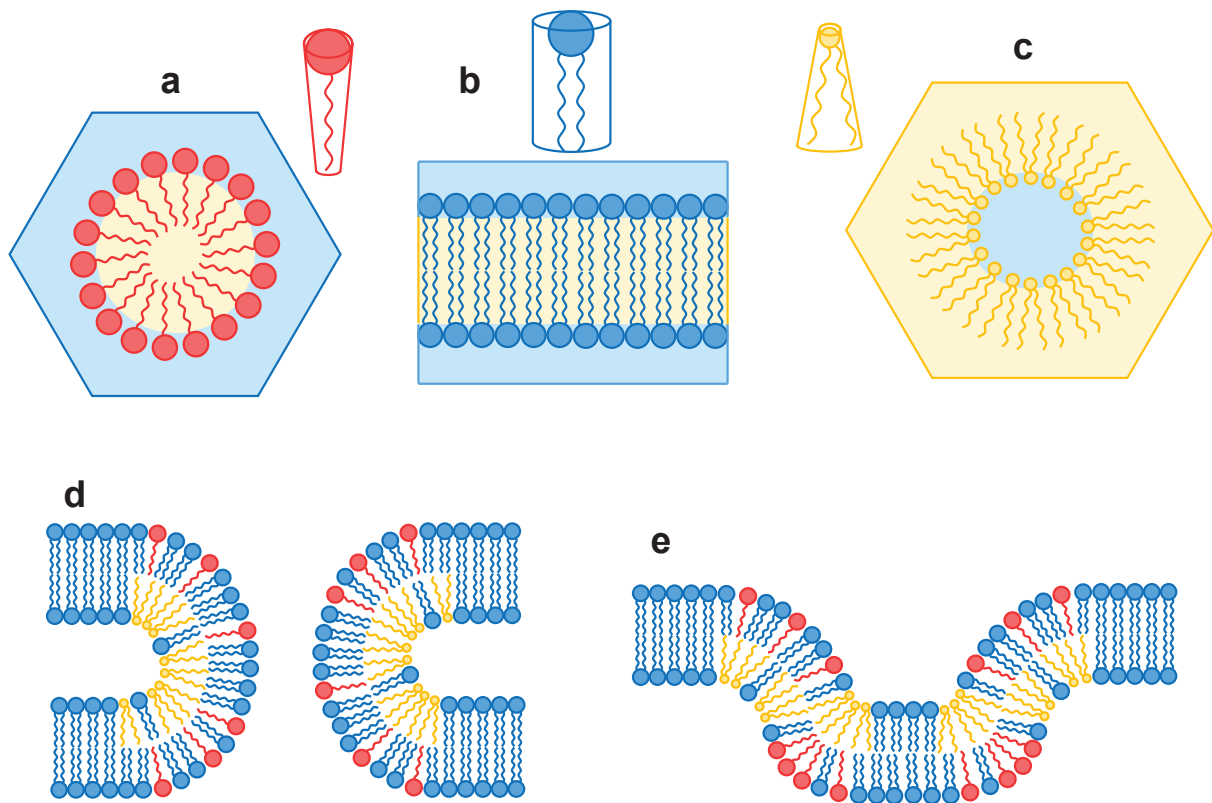
qui permettrait d'amener un proton vers le centre de la bicouche puis de le récupérer de l'autre côté grâce à un mécanisme coopératif [68]. La rigidification membranaire, en diminuant les mouvements des lipides, faciliterait alors la formation de ces structures et leur stabilisation dans le temps, favorisant ainsi le transport des protons.

### 1.2.3. Polymorphisme lipidique

En plus des phénomènes de ségrégation, d'asymétrie et de fluidité précédemment cités, la structuration globale de la membrane dépend également de la phase membranaire. En effet, en plus de l'organisation en phase lamellaire, sous forme de bicouche lipidique (**Figure 11b**), les membranes cellulaires peuvent former des structures transitoires similaires à des phases hexagonales  $H_I$  (intérieur hydrophobe et extérieur hydrophile, **Figure 11a**) ou des phases hexagonales inverses  $H_{II}$  (intérieur hydrophile et extérieur hydrophobe, **Figure 11c**).

L'organisation de la membrane plasmique dépend ainsi du polymorphisme lipidique, où chaque molécule de lipides cherche à former, en fonction de sa géométrie, une structure permettant de minimiser, par effet hydrophobe, l'exposition de parties hydrophobes à un milieu hydrophile, et vice-versa, mais également de maximiser l'établissement de liaisons stabilisatrices. L'empilement des chaînes lipidiques les unes sur les autres (« *lipid packing* ») va alors jouer un rôle déterminant dans la géométrie de la membrane [69]. Ainsi, lorsque la tête polaire occupe le même espace que les chaînes acyles, l'organisation privilégiée est celle de bicouche lamellaire. En revanche, quand l'une des parties est plus imposante que l'autre, les organisations privilégiées vont être les phases hexagonales  $H_I$ , lorsque la tête est plus volumineuse que les chaînes ou les phases hexagonales inverses  $H_{II}$  lorsque la tête est plus petite. Le polymorphisme lipidique permet ainsi d'expliquer la déformation des membranes et l'adoption de rayons de courbure parfois importants sans pour autant se déstructurer, ce qui a son importance dans les processus nécessitant un remodelage membranaire, comme l'établissement de pores de fusion ou la formation d'invaginations lors de l'endocytose (**Figure 11d** et **11e**). La nature des têtes polaires affectant leur taille, les têtes PE étant par exemple plus petites que les PC, elle participe également à la modulation de la phase et de la fluidité membranaire [70]. Ainsi, là où PE adopte une géométrie conique propice

à la formation de phases  $H_{II}$ , PC adopte une géométrie cylindrique favorable à la formation de phases lamellaires.



**Figure 11.** Organisation des membranes cellulaires. En bleu, parties hydrophiles, en jaune, parties hydrophobes.

- a. Phase hexagonale  $H_I$ .
- b. Bicouche lamellaire.
- c. Phase hexagonale inverse  $H_{II}$ .
- d. Pore de fusion.
- e. Invagination membranaire.

#### 1.2.4. Propriétés membranaires dans un contexte pathologique

Les propriétés des membranes, qui découlent largement de leur structure, sont d'une importance capitale au bon fonctionnement de la cellule. De nombreuses pathologies se traduisent par des modifications métaboliques, induites soit directement par la pathologie, soit par la réponse de l'organisme à la pathologie. Par exemple, lors d'une infection, l'agent pathogène peut détourner à son avantage la machinerie cellulaire, modifiant le métabolisme cellulaire dont le métabolisme lipidique, et ainsi avoir des répercussions sur les propriétés membranaires [71]. La

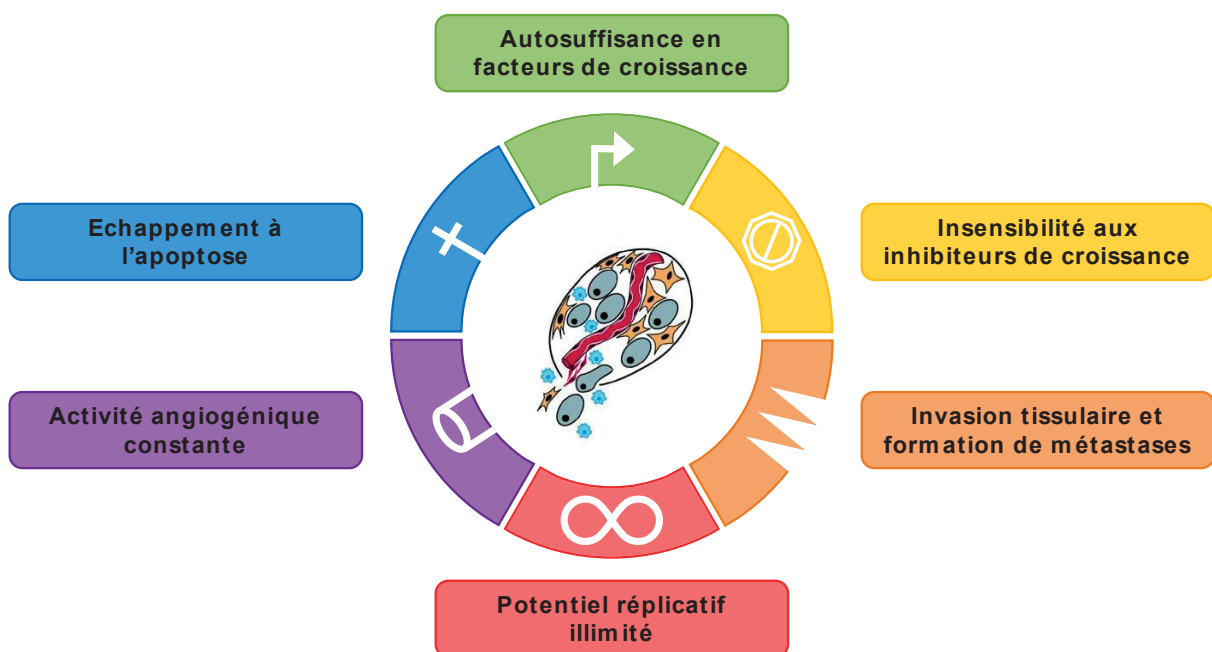
liste des pathologies induisant une modification des propriétés membranaires inclut des maladies comme le cancer, des infections virales, mais également des pathologies cardiaques ou encore des maladies neurodégénératives, telles que la chorée de Huntington ou la schizophrénie [71–75]. Il est intéressant de noter que l'altération d'une des propriétés de la membrane dépend de la pathologie en question, certaines pathologies ayant des effets inverses. En ce qui concerne la fluidité membranaire, nous pouvons noter par exemple que les pathologies cardiaques ou neurodégénératives ont tendance à induire une rigidification de la membrane, par un surplus de production de radicaux libres qui oxydent les doubles liaisons et compactent les lipides. Le cancer s'accompagne plutôt d'une fluidification de la membrane des cellules tumorales, qui permettent une meilleure adaptation à leur environnement modifié par la pathologie [75–78]. L'altération des propriétés membranaires peut ainsi être exploitée soit à des fins diagnostiques, soit à des fins thérapeutiques. En effet, si des pathologies se développent en modifiant les propriétés membranaires, restaurer ces propriétés à leur niveau initial peut permettre de lutter contre la pathologie en question [79,80].

## 2. Le cancer

### 2.1. Description générale

Le cancer est un ensemble de pathologies définies par une prolifération non contrôlée de cellules anormales capables de se répandre dans l'organisme en formant des métastases. Dans un organisme sain, de multiples facteurs permettent le contrôle de l'homéostasie, en influant notamment sur deux processus : la division cellulaire et l'apoptose, la mort cellulaire programmée [81]. L'apoptose désigne un ensemble de processus par lequel une cellule, sous l'action de stimuli internes ou externes, va provoquer sa propre mort. Cela permet à l'organisme d'éliminer les cellules vieilles ou malades et de les remplacer, par division cellulaire, par de nouvelles cellules. En revanche, dans le cas du cancer, ces mécanismes ne sont plus suffisamment contrôlés et certaines cellules échappent à la régulation du cycle cellulaire. Six propriétés fondamentales communes à tous les types de cancer ont été décrites [82] (**Figure 12**) :

1. la croissance et la division cellulaire même en absence de facteurs inducteurs ;
2. l'insensibilité à la présence de facteurs inhibiteurs de la croissance et de la division cellulaire ;
3. un potentiel répliatif illimité ;
4. l'échappement à l'apoptose ;
5. l'activité angiogénique conduisant au développement vasculaire ;
6. l'invasion tissulaire et la formation de métastases.



**Figure 12.** Propriétés fondamentales communes à tous les types de cancer (Figure adaptée de [82]).

La principale caractéristique des cancers est la présence d'une tumeur, une croissance de tissus due à une dérégulation des mécanismes régulant la prolifération cellulaire [83]. Cependant, bien que tous les cancers présentent des tumeurs, toutes les tumeurs ne sont pas cancéreuses. En effet, certaines tumeurs qualifiées de bénignes ne présentent pas de caractère malin, c'est-à-dire de capacité à envahir les tissus sous-jacents et à former des métastases. Néanmoins, bien qu'elles n'aient pas de caractère malin, cela ne signifie pas pour autant que les tumeurs bénignes n'ont pas d'effets indésirables [84,85]. La prolifération incontrôlée de cellules peut notamment aboutir à la formation de masses



cellulaires importantes pouvant causer des compressions nerveuses ou une réduction du flux sanguin irriguant les cellules saines. Dans certains cas extrêmes, exacerbés lorsque la tumeur est confinée dans un espace restreint, cette masse cellulaire tumorale peut conduire à la nécrose et à la mort des cellules saines comprimées [85]. De plus, des tumeurs bénignes de cellules produisant des hormones peuvent conduire à une surproduction hormonale ; c'est notamment le cas dans certains adénomes thyroïdiens qui peuvent conduire à une hyperthyroïdie [86].

D'après les derniers chiffres de l'organisation mondiale pour la santé ou OMS, l'ensemble des cancers représentent près de 16% de la totalité de la mortalité mondiale [87]. Cela fait donc de la lutte contre le cancer un enjeu sociétal majeur, notamment d'un point de vue socio-économique de par sa prévalence, puisque près de 40% de la population se fera diagnostiquer un cancer au cours de la vie. Ces enjeux sont décuplés par le fort impact du cancer sur les familles des malades, lié aux lourds symptômes et aux nombreux effets secondaires indésirables des traitements associés à la prise en charge de ces pathologies [88,89]. Economiquement parlant, la lutte contre le cancer est également prépondérante. A eux seuls, les Etats-Unis dépensent près de 150 milliards de dollars par an pour lutter contre ce fléau [90]. En France, le budget de l'Institut National du Cancer s'élève à 87 milliards d'euros en 2019, avec 41,1 milliards alloués à la prise en charge de patients et 38 milliards d'euros alloués au financement de la recherche contre le cancer [91]. Cela illustre bien la prépondérance du cancer dans les politiques de santé, mais également dans les politiques de recherches.

## **2.2. Aspects biologiques du cancer**

### 2.2.1. Classification des différents types de cancer

L'évolution et les propriétés de chaque cancer étant fortement spécifiques à chaque type cellulaire, le terme de cancer désigne un vaste ensemble de pathologies qui n'ont parfois que peu d'éléments en commun, que ce soit au niveau des symptômes macro- ou microscopiques, des traitements, du diagnostic, du pronostic, etc. Les cancers sont ainsi le plus souvent désignés selon l'organe d'origine de la tumeur. Cependant, comme de nombreux organes et tissus

présentent plusieurs types cellulaires différents, chaque cancer est également désigné par le type cellulaire à l'origine de la tumeur, ce qui a conduit à la formation de trois principales familles : les carcinomes, les sarcomes et les hémopathies malignes [92]. On compte aussi d'autres types de cancers ne rentrant pas dans ses familles, comme par exemple les cancers germinaux issues des cellules à l'origine de la formation des gamètes, c'est-à-dire des cellules ovulaires dans les ovaires ou spermatocytiques dans les testicules, ou encore les blastomes, qui désignent des cancers se formant à partir de cellules souches et qui ont une plus grande prévalence chez les enfants par rapport aux autres types de cancers [93,94].

Les carcinomes désignent les cancers se développant à partir de cellules épithéliales. Ce sont les cancers les plus fréquents. Ils comprennent notamment les adénocarcinomes (carcinomes glandulaires), les carcinomes épidermoïdes issus d'épithélium malpighien ou encore les cancers pulmonaires ou bronchiques, respectivement à larges ou à petites cellules [95]. Les sarcomes regroupent les cancers provenant de cellules mésenchymateuses issues du tissu conjonctif [96]. Parmi les sarcomes, on peut distinguer les sarcomes des tissus osseux, regroupant les différents cancers des os et du cartilage, et les sarcomes des tissus mous, regroupant les cancers issus d'adipocytes, de fibroblastes ou encore de cellules endothéliales. Quant aux hémopathies, elles regroupent les leucémies, les lymphomes et les myélomes multiples, cancers respectivement des cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse, du système lymphatique et des plasmocytes.

### 2.2.2. Aspects histologiques, cellulaires et biochimiques

Le cancer est une maladie qui se développe à partir de cellules de l'organisme qui deviennent malignes en échappant à son contrôle. La principale différence entre une cellule cancéreuse et une cellule saine concerne la régulation du cycle cellulaire, anormale chez la cellule cancéreuse [97]. En effet, pour qu'un cancer puisse se développer, il est nécessaire que des protéines contrôlant le cycle cellulaire soient altérées, inhibées ou non exprimées. Les cellules cancéreuses présentent donc de nombreuses modifications génétiques se traduisant par des

modifications protéiques [98]. Cela impacte l'ensemble des processus cellulaires, du métabolisme à la communication avec l'environnement.

A titre d'exemple, le métabolisme énergétique normal chez l'Homme privilégie un taux bas de glycolyse suivie d'une oxydation du pyruvate par le cycle de Krebs afin de réduire de nombreux cofacteurs qui permettront de faire fonctionner la chaîne respiratoire mitochondriale. Pour les cellules cancéreuses en revanche, la voie privilégiée est un taux très élevé de glycolyse suivie d'une fermentation lactique élevée - c'est l'effet Warburg [99]. Cette voie métabolique est moins efficace que celle utilisée par les cellules saines. En effet, la glycolyse suivie du cycle de Krebs couplé à la chaîne respiratoire mitochondriale produit une trentaine de molécules d'ATP à partir d'une seule molécule de glucose, alors que la glycolyse suivie d'une fermentation lactique du pyruvate ne permet la formation que de deux molécules d'ATP. La préférence des cellules cancéreuses pour ce processus peut être en partie expliquée par la nature aérobie de la chaîne respiratoire mitochondriale. En absence d'oxygène, ce qui est souvent le cas au cœur des masses tumorales, la seule manière de produire de l'énergie à partir de la glycolyse est la fermentation lactique [100].

Les modifications métaboliques affectent également le métabolisme lipidique [101–103]. Pour pouvoir soutenir la forte prolifération cellulaire, il est nécessaire de former une quantité accrue de membranes, ce qui explique l'activation des enzymes responsables de l'anabolisme lipidique. Ainsi, les cellules cancéreuses forment une quantité importante de membranes, avec des compositions lipidiques différentes de celles des cellules saines [104]. Mais, outre leurs rôles structuraux, les lipides jouent également de nombreux rôles fonctionnels qui vont être perturbés par les modifications du métabolisme lipidique. Les lipides sont impliqués dans les processus de modification post-traductionnelle des protéines, notamment les processus d'acylation ou de prénylation, qui consistent en l'addition d'ancres lipidiques à des protéines et conduisent à une modification de la localisation cellulaire et des fonctions de ces dernières [101]. Des études ont montré que la surexpression des enzymes impliquées dans la prénylation conduisait à une stimulation de certaines protéines membranaires aux propriétés oncogéniques [105]. Certains lipides, notamment des dérivés sphingolipidiques phosphorylés,

jouent également un rôle angiogénique, et interviennent dans la restructuration du microenvironnement tumoral [106].

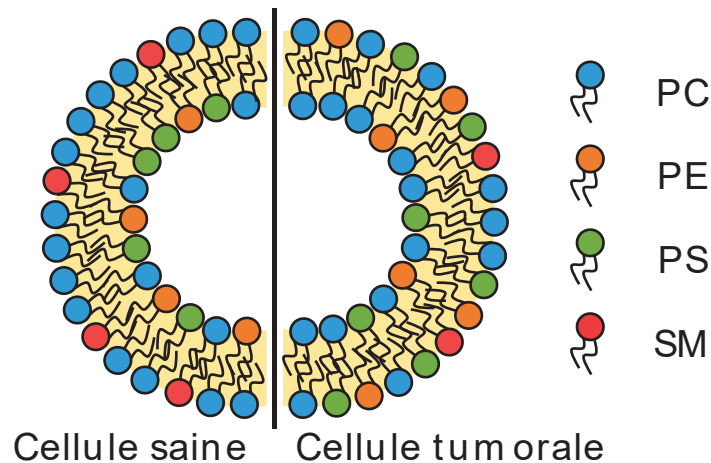
Cette restructuration intervient quand la prolifération de la tumeur atteint un tel niveau qu'apparaissent des déficiences en nutriments et de l'hypoxie. Ces deux paramètres déclenchent la production de facteurs de croissance tel que le VEGF, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*Vascular Endothelium Growth Factor*). Dans un contexte sain, ce facteur de croissance intervient dans le développement embryonnaire lors de la mise en place de la vascularisation primitive et, chez l'adulte, lors de la régénération vasculaire faisant suite à des lésions. Dans un contexte tumoral, le VEGF induit la différenciation et le développement de cellules endothéliales entraînant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, qui vont venir alimenter la tumeur en oxygène et en nutriments essentiels à sa croissance [107]. De plus, la vascularisation accrue au niveau des tumeurs permet également le rejet et l'élimination des nombreux déchets métaboliques produits par les cellules cancéreuses, comme notamment l'acide lactique, aux propriétés néfastes car acidifiantes. En parallèle de l'angiogenèse, les cancers promeuvent également la lymphangiogenèse, la formation de nouveaux vaisseaux lymphatiques [108]. Ces derniers constituent la voie privilégiée d'invasion et de dissémination dans l'organisme par les cellules cancéreuses.

### 2.2.3. Aspects membranaires

#### 2.2.3.1. Modifications structurales et fonctionnelles

Comme présenté précédemment, le métabolisme cellulaire est altéré dans les cellules tumorales. Les membranes des cellules sont ainsi enrichies en certaines classes de lipides et appauvries en d'autres (**Figure 13**). A titre d'exemple, les membranes des cellules cancéreuses sont appauvries en céramides, qui ont des propriétés anti-apoptotiques, ce qui est donc défavorable au développement tumoral [109]. En revanche, des études ont montré que certains cancers présentaient une surreprésentation de gangliosides, des lipides aux propriétés immunosuppressives qui favorisent l'angiogenèse [110]. Au niveau des classes de lipides, la membrane plasmique tumorale est souvent enrichie en PS dans son

feuillet externe, alors que ce lipide est normalement présent dans le feuillet interne au contact du cytoplasme [111,112]. L'impact des modifications de la composition lipidique est tel que des stratégies de traitement basées sur le rétablissement d'une composition lipidique saine ont été proposées [113].



**Figure 13.** Modification de la composition lipidique de la membrane plasmique par le cancer (Figure adaptée de [114]). SM : SphingoMyéline.

Les protéines membranaires sont elles aussi modifiées, certaines sont surexprimées tandis que d'autres sont réprimées. Ces modifications permettent le plus souvent aux cellules tumorales de mieux résister aux différents stress subis et d'augmenter leur capacité à proliférer. Ainsi, de nombreux cancers présentent une surexpression de récepteurs membranaires à facteurs de croissance, comme l'EGFR, le récepteur au facteur de croissance épidermique (*Epidermal Growth Factor Receptor*) [115]. Ces changements concernent également l'organisation du cytosquelette, en association avec la membrane plasmique, notamment dans les processus d'invasion métastatique, où la polymérisation et la dépolymérisation des filaments d'actine sont modifiées [116,117].

Enfin, la fraction glucidique membranaire n'est pas épargnée par ces modifications. Le métabolisme glucidique des cellules tumorales est altéré, notamment au niveau des enzymes responsables de la modification post-traductionnelle des protéines.

De nombreuses études ont montré une augmentation de l'activité des glycosyl-transférases, les enzymes responsables de la glycosylation de protéines et des

lipides, et notamment des sialyl-transférases, qui transfèrent des acides sialiques [118,119]. D'un point de vue fonctionnel, les glycosylations modulent et conditionnent l'interaction de la cellule avec son microenvironnement. Ces modifications vont alors permettre une adaptation des cellules tumorales, le microenvironnement tumoral étant radicalement différent de celui présent chez les sujets sains.

### *2.2.3.2. Modifications des propriétés membranaires*

Les modifications de la composition membranaire lors du développement tumoral impactent ses propriétés. De nombreuses études ont relié l'altération du profil lipidique membranaire à une hausse de la fluidité membranaire des cellules tumorales [77,120–123]. Cette hausse de fluidité s'explique par la tendance des cellules tumorales à augmenter leurs taux d'acides gras insaturés et à diminuer leur taux de cholestérol membranaire. Ces modifications sont en lien direct avec les changements métaboliques induits par le développement tumoral. Le cholestérol est quant à lui consommé plus rapidement lors de la formation des membranes, les cellules tumorales se divisant à un rythme soutenu et sécrétant de nombreuses vésicules enrichies en cholestérol [124–126].

La fluidification membranaire a notamment pour conséquence une augmentation de la déformabilité de la membrane, qui permet aux cellules métastatiques une extravasation facilitée à travers l'endothélium vasculaire et ainsi favorise leur invasion tissulaire [120]. Cependant, la relation entre fluidité membranaire et cancer est plus complexe qu'une simple relation linéaire entre fluidité et agressivité tumorale. En effet, des études ont montré que la résistance des tumeurs à des traitements médicamenteux pouvait être reliée dans certains cas à une réduction de leur fluidité membranaire, diminuant leur perméabilité aux médicaments [127,128].

L'altération du métabolisme lipidique des cellules tumorales, et la modification de la fluidité membranaire qui en résulte, ont une myriade d'implications dans la compréhension et le traitement du cancer. Les principales voies de résistance aux médicaments, parmi lesquelles on retrouve l'activation de pompes d'efflux des médicaments hors de la cellule, la diminution de la perméabilité aux médicaments,

le piégeage de médicaments dans des vésicules intracellulaires ou encore l'activation et l'inactivation de voies anti- et pro-apoptotiques, font toutes intervenir, à différents niveaux, la biosynthèse des lipides et les propriétés des membranes [129–132]. L'impact est tel que certaines stratégies émergentes commencent à mettre à profit ces modifications pour promouvoir et améliorer l'efficacité des médicaments [79,133].

## 2.3. Aspects médicaux

### 2.3.1. Symptômes

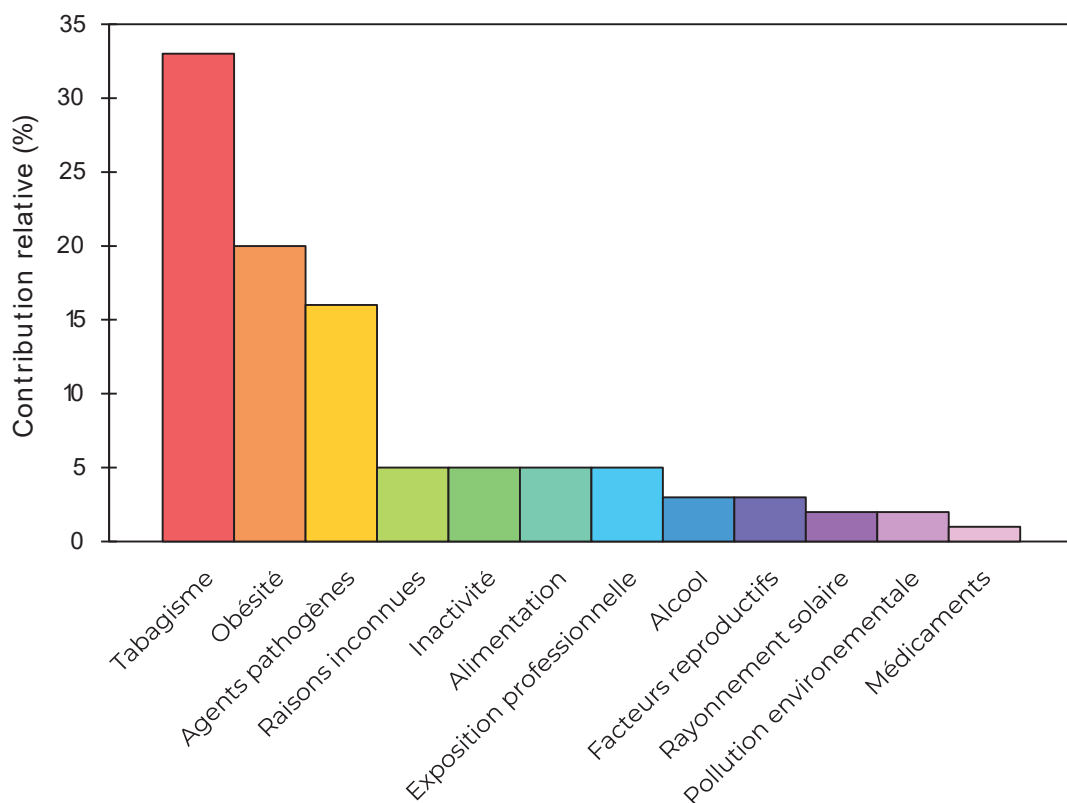
Bien que tous les cancers ne donnent pas les mêmes symptômes, puisque chaque type de cancer touche un organe et un type cellulaire particulier, la majorité d'entre eux provoquent néanmoins des symptômes similaires. Ainsi, là où les symptômes locaux dépendront fortement de l'organe touché (sang dans les urines dans le cas d'un cancer des reins, toux dans le cas d'un cancer des bronches, etc.), les symptômes systémiques sont le plus souvent communs. Parmi eux, on peut noter des fièvres persistantes, de la fatigue chronique, des pertes de poids ou de la cachexie, qui désigne une inflammation systémique ayant pour conséquences des douleurs chroniques et une perte progressive de masse musculaire [134].

De plus, et bien qu'en dehors des symptômes traditionnels, il faut noter que les patients diagnostiqués d'un cancer présentent des risques fortement accrus d'anxiété et de troubles dépressifs, conduisant à un taux de suicide chez les patients souffrant de cancer près de deux fois supérieur par rapport à la population saine [135].

### 2.3.2. Causes

La majeure partie des cancers est due à des perturbations environnementales, la fraction restante étant due à des facteurs génétiques héréditaires [92,136]. Dans ce contexte, le terme d'environnement désigne tous les facteurs qui ne sont pas des facteurs génétiques héréditaires et incluent donc l'exposition à des molécules nocives, mais également des modes de vie et des facteurs comportementaux (**Figure 14**). Les principales causes environnementales sont l'exposition à des

rayonnements ou à des substances chimiques particulières (notamment le tabac, l'alcool et la pollution en règle générale), l'obésité et le manque d'activité physique, et enfin l'infection par certains pathogènes, le plus souvent des virus [137–140]. A l'exception de cas très particuliers, notamment d'un transfert entre une femme enceinte et son bébé ou lors de greffes d'organes, le cancer n'est normalement pas une pathologie transmissible mais une pathologie acquise. Il faut également noter que bien que le stress et les troubles psychologiques ne constituent pas de facteurs de risques, ils aggravent le pronostic des patients souffrant d'un cancer [135].



**Figure 14.** Facteurs de risque pour le développement du cancer (Figure adaptée de [141]).

L'exposition à des molécules chimiques particulières ou à des radiations favorise l'apparition de cancers par leurs effets délétères sur le système immunitaire et par leur action mutagène [139]. La lumière, en particulier, a un effet cancérigène du fait des effets néfastes de l'exposition à des rayonnements ultraviolets sur l'ADN [137]. Ces effets consistent en la formation de dimères de pyrimidines (thymine et cytosine), voire de cassures de brins d'ADN. Bien que l'organisme dispose de



mécanismes performants de réparation de l'ADN capables de détecter et de corriger ces dommages, ces mécanismes ne sont pas infallibles et peuvent quelquefois conduire à la présence de mutations qui peuvent à leur tour être à l'origine de cancers en surexprimant ou en réprimant certains gènes.

Les facteurs liés au mode de vie et à l'alimentation, l'obésité et le manque d'activité physique notamment, sont des facteurs de risques du fait de leur impact négatif sur les systèmes immunitaires et endocrinien [138]. De même, l'excès calorique et l'obésité créent des états pro-inflammatoires et pro-thrombotiques qui favorisent la survenue et le développement de tumeurs [142].

Enfin, près de 20% des cancers sont dus à des maladies infectieuses. Bien que la majeure partie d'entre elles soient dues à des virus, alors qualifiés d'oncovirus, certaines infections sont dues à des bactéries ou à des parasites [140,143,144]. Parmi les principaux pathogènes impliqués, on retrouve des papillomavirus, les virus de l'hépatite, des bactéries comme *Helicobacter pylori*, ou encore certains parasites de la famille des schistosomes, responsables respectivement de cancers du col de l'utérus, hépatiques, colorectaux ou de la vessie.

### 2.3.3. Prévention et diagnostic

La prise en charge des patients atteints d'un cancer étant définie à un niveau national, les paragraphes qui vont suivre vont s'intéresser plus particulièrement à la situation en France. La majeure partie des cancers étant dus à des causes environnementales, une grande partie d'entre eux peuvent être prévenus, ou en tout cas atténués [145,146]. Ainsi, les principales actions préventives mises en place concernent la prévention primaire ayant pour objet de limiter voire d'éliminer l'exposition aux facteurs de risques. Parmi les actions mises en place, on peut citer les campagnes de sensibilisation aux effets néfastes de certains facteurs et de certains comportements, comme le tabac, l'alcool, les rayons UV ou l'obésité [146]. Ces mesures s'accompagnent de mesures plus actives, comme par exemple la vaccination contre des oncovirus tels que des papillomavirus et des virus de l'hépatite, ou encore par l'incitation à faire de l'activité physique et à adopter une alimentation équilibrée, les facteurs nutritionnels pouvant avoir des effets protecteurs vis-à-vis de certains cancers [147,148].

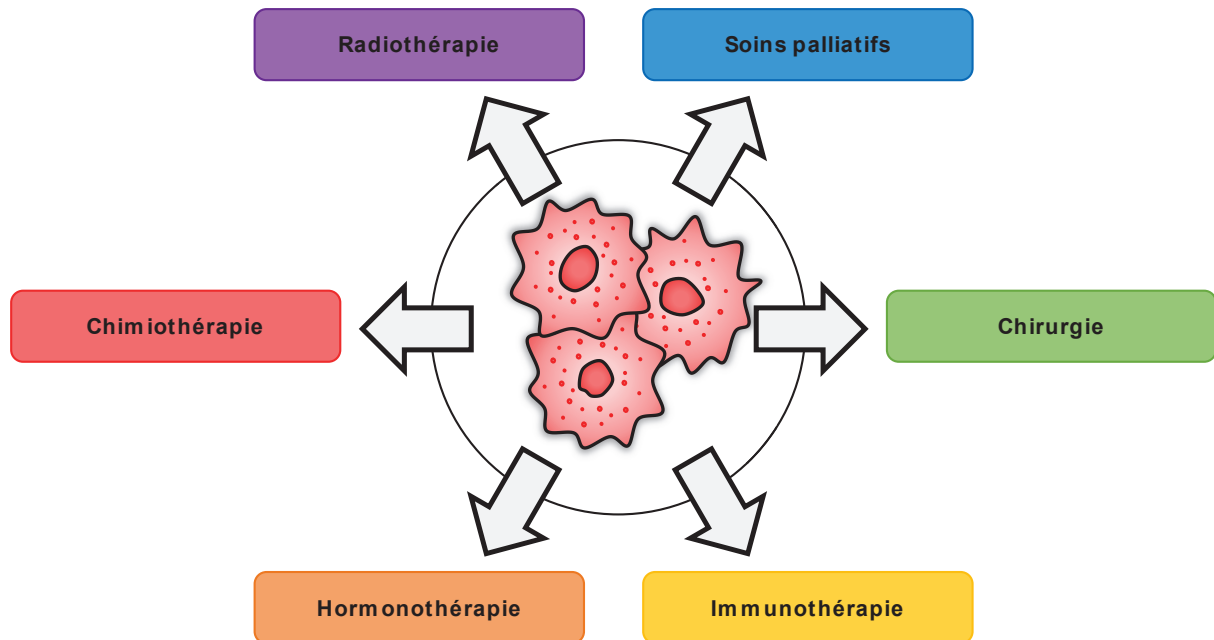
En outre, ces mesures préventives sont couplées à des examens de dépistage précoces pour certaines populations à risques. C'est notamment le cas pour le cancer du sein, qui est souvent induit et favorisé par des prédispositions génétiques héréditaires [149]. Le dépistage préventif par mammographie a ainsi été mis en place pour les femmes ayant des antécédents familiaux connus de cancer du sein, ou bien lors de la découverte de mutations de gènes de prédisposition au cancer du sein. Il est systématiquement proposé aux femmes âgées de 50 à 75 ans. Dans certains cas extrêmes, une mastectomie préventive peut être proposée à des patientes ayant des risques énormes de développer un cancer du sein au cours de leur vie.

Le diagnostic d'une tumeur doit toujours chercher à montrer la malignité de la tumeur. En effet, les traitements usuels des cancers entraînent le plus souvent beaucoup d'effets secondaires indésirables. Traiter toutes les tumeurs, bénignes et cancéreuses, peut dans certains cas faire courir de plus grands risques aux patients qu'une approche observationnelle, avec traitement uniquement lors de la détection d'un cancer [150]. Les principales approches diagnostiques du cancer se font donc, après observation de symptômes, par des analyses par rayons X, par tomodensitométrie ou encore par fibroscopie afin de chercher la présence d'une tumeur [151]. Puis, une biopsie de la tumeur permet de définir le grade et les différentes propriétés cellulaires et génétiques de cette dernière [152].

#### 2.3.4. Traitements

Les principales stratégies de prise en charge thérapeutique des patients atteints de cancer consistent en la destruction de la tumeur dans la majeure partie des cas, et en l'amélioration de la qualité de vie des patients dans le cas de soins palliatifs. Les stratégies utilisées combinent le plus souvent différentes approches, en fonction de la pathologie et du patient, afin de maximiser les chances de survie et de rémission [153]. Dans certains cas, cependant, les soins palliatifs sont la seule option recommandée. Ce sont des cas pour lesquels aucune stratégie thérapeutique n'est efficace, lorsque les bénéfices escomptés sont beaucoup trop faibles par rapport aux inconvénients, ou encore, dans le cas de patients atteints de comorbidités graves avec de mauvais pronostics [154]. Les trois principales

stratégies sont la chirurgie, la radiothérapie et le traitement médicamenteux, où l'on distingue généralement l'hormonothérapie, l'immunothérapie et la chimiothérapie (**Figure 15**).



**Figure 15.** Stratégies de traitement du cancer.

#### 2.3.4.1. *Chirurgie*

Le traitement chirurgical du cancer a pour but principal l'excision de la tumeur et des tissus lésés, mais la chirurgie a également des applications diagnostiques, en permettant de localiser et diagnostiquer un cancer, et permet la restauration structurelle et fonctionnelle du corps du patient [155,156]. Le diagnostic du cancer est le plus souvent réalisé par l'étude de biopsies, des prélèvements d'une petite partie de la tumeur. La chirurgie permet également de mesurer l'invasion métastatique, par l'observation de ganglions lymphatiques proches de la tumeur.

L'excision de la tumeur et des tissus sains environnants est le plus souvent réalisée par bistouri, mais peut également être réalisée par chirurgie au laser ou par cryochirurgie. Dans le premier cas, l'action d'un laser permet la destruction localisée des cellules tumorales [157]. La chirurgie au laser est surtout utilisable dans le cas de tissus mous hydratés, le laser agissant en vaporisant l'eau des cellules. La cryochirurgie concerne l'utilisation de fluides cryogéniques pour la destruction

locale de cellules tumorales par application d'un froid extrême. Auparavant réservée aux traitements de tumeurs directement accessibles, situées à l'extérieur du corps, des applications se sont aujourd'hui développées dans le cas par exemple d'hépatocarcinomes ou de rétinoblastomes [158].

La chirurgie permet de corriger certains problèmes fonctionnels causés par le cancer, comme par exemple une compression due à la présence d'une masse importante ou un blocage dans le tube digestif causé par l'obstruction, partielle ou totale, du tractus digestif par une tumeur. De plus, la présence de métastases osseuses, fréquentes dans de nombreux cancers, a tendance à fragiliser les os qui se brisent alors plus facilement. La chirurgie, par ajout de tiges métalliques servant de renforts et d'étais aux os, permet de réduire le risque de fracture [159]. Enfin, la chirurgie plastique permet de restaurer une apparence corporelle normale après traitement d'un cancer, notamment suite à une chirurgie excisionnelle affectant l'apparence physique [160].

#### *2.3.4.2. Radiothérapie*

La radiothérapie correspond à un traitement par des rayonnements ionisants et agit en abîmant l'ADN des cellules tumorales. La radiothérapie est le plus souvent administrée sous la forme de plusieurs faisceaux qui se croisent au niveau de la tumeur, la dose absorbée maximale étant ainsi localisée au niveau de la tumeur [161]. Par rapport à une approche utilisant un seul faisceau, l'utilisation de faisceaux croisés permet de fortement réduire les effets secondaires indésirables de l'exposition des cellules saines aux rayonnements.

Le mécanisme d'action de la radiothérapie consiste en la dégradation de l'ADN des cellules tumorales par deux principales voies : la voie ionisante directe, due à l'interaction des rayons avec les molécules d'ADN, et la voie ionisante indirecte. L'ionisation indirecte de l'ADN se produit quand le faisceau radiatif génère des radicaux libres, qui vont ensuite créer des dommages dans l'ADN. L'importance de ces deux voies d'ionisations est responsable d'une des limites de la radiothérapie. Dans le cas de tumeurs solides en hypoxie, la concentration en oxygène des cellules est très faible, ce qui limite leur capacité à produire des radicaux libres et crée une résistance à l'irradiation deux à trois fois supérieure pour les cellules en anoxie par

rapport à des cellules en conditions oxygéniques normales. De nombreuses études cherchent ainsi à sensibiliser les tumeurs à l'irradiation, en augmentant l'apport et la diffusion d'oxygène, en créant un stress supplémentaire pour les cellules en anoxie ou encore en enrichissant la tumeur en molécules radiosensibles ayant des effets toxiques lors de leur exposition à des rayonnements [162].

Une forme particulière de radiothérapie, la curiethérapie, utilise à la place d'une irradiation par un ensemble de faisceaux une source radioactive scellée implantée dans le corps du patient au niveau de la tumeur [163]. La source radioactive utilisée est ici de courte portée, avec des radionucléides tels que  $^{125}\text{I}$  et  $^{131}\text{Cs}$ . L'avantage de cette méthode, par rapport à la radiothérapie classique, concerne son champ d'action réduit, qui atténue l'effet sur les cellules saines aux environs de la tumeur. De plus, la source étant implantée dans le corps, elle va suivre les mouvements de l'organisme et toujours rester au contact de la tumeur, alors que les stratégies d'irradiation classiques ne peuvent que difficilement s'adapter aux mouvements du tractus digestif ou de la vessie, notamment. Le caractère scellé de la source empêche le relargage et la dissémination des radionucléides dans les tissus.

### 2.3.4.3. *Hormonothérapie*

L'hormonothérapie consiste en l'injection de molécules agonistes mimant l'action d'hormones, ou d'antagonistes ayant des effets opposés. L'hormonothérapie est efficace pour le traitement de cellules dépendant du système endocrine, en particulier les cellules dépendant de stéroïdes telles que les cellules du sein, de l'endomètre ou de la prostate [164]. La perturbation hormonale des cellules tumorales inhibe leur croissance et leur prolifération, puisque celles-ci sont dépendantes des signaux hormonaux. Outre le traitement par des agonistes ou antagonistes hormonaux, la castration chirurgicale (des testicules chez l'homme ; des ovaires chez la femme) offre des effets similaires [165]. Cette méthode était utilisée contre le cancer de la prostate et du sein, avant d'être remplacée par la castration chimique par traitement par des analogues de l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires.

De plus, l'hormonothérapie peut avoir un intérêt thérapeutique dans l'atténuation de certains symptômes liés au cancer, en combattant la cachexie ou encore les

syndromes paranéoplasiques [166]. Ces derniers correspondent à la dérégulation de la production de certaines hormones et cytokines, lorsque le cancer affecte des cellules du système endocrine, et se traduisent par de multiples symptômes d'ordre neurologique, endocrine et hématologique.

#### 2.3.4.4. *Immunothérapie*

L'immunothérapie repose sur l'activation du système immunitaire pour combattre la progression de la tumeur. Trois principales voies d'immunothérapies sont aujourd'hui considérées : la voie active, la voie passive et la voie hybride, qui combine voie active et voie passive [167]. L'immunothérapie active consiste à extraire des cellules immunitaires d'un patient, à les modifier et à les réimplanter afin de déclencher ou d'améliorer la lutte contre la progression tumorale. Les trois principaux types de cellules utilisés sont les lymphocytes T cytotoxiques, les lymphocytes NK et les cellules dendritiques. Les modifications effectuées consistent le plus souvent à modifier les protéines membranaires de ces cellules afin qu'elles reconnaissent spécifiquement les cellules tumorales.

Enfin, l'immunothérapie passive repose sur l'injection de cytokines (interleukines et interférons) ou d'anticorps. L'injection de cytokines permet de réguler l'activité du système immunitaire en modulant la croissance, la différenciation et l'activité des différentes cellules immunitaires. Le traitement par des anticorps spécifiques d'antigènes tumoraux permet quant à lui de diriger l'activité du système immunitaire vers la tumeur et aide ainsi à lutter contre son développement.

#### 2.3.4.5. *Chimiothérapie*

La chimiothérapie désigne le traitement par des molécules cytotoxiques ayant pour but de tuer les cellules tumorales ou de bloquer leur prolifération [168]. Dans certains cas, la chimiothérapie n'a pas d'objectif curatif mais cherche à atténuer les symptômes et à améliorer les conditions de vie des patients, on parle alors de chimiothérapie palliative. La chimiothérapie utilise le plus souvent des molécules perturbant le cycle cellulaire en bloquant l'une des étapes nécessaires à la division, le plus souvent la réplication de l'ADN ou la mitose. Malgré leur efficacité, les molécules utilisées sont également toxiques sur les cellules saines puisque leurs

cibles ne sont pas spécifiques des cellules tumorales [169]. Ainsi, lors de la prescription de traitements chimiothérapeutiques, la principale préoccupation médicale concerne la dose à prescrire : une dose trop faible ne sera pas suffisamment efficace pour enrayer la progression tumorale, mais une dose trop forte risquerait de mettre en danger le patient au vu de l'importance des effets secondaires indésirables provoqués par un surdosage.

Les effets secondaires associés à la chimiothérapie affectent principalement les cellules se divisant rapidement, comme les cellules hématopoïétiques, les cellules du tractus digestif, les follicules pileux et les cellules germinales. Les traitements chimiothérapeutiques sont ainsi le plus souvent associés à une immunodépression, des nausées et vomissements, une fatigue extrême pouvant persister après rémission et une alopécie. La recherche de stratégies limitant ces effets secondaires indésirables se fait de deux manières différentes : soit par la recherche de nouvelles molécules au mécanisme d'action spécifique aux cellules tumorales, diminuant ainsi l'effet de la chimiothérapie sur les cellules saines et les effets secondaires observés ; soit par la recherche de vecteurs spécifiques permettant l'adressage des molécules de chimiothérapie directement à la tumeur, réduisant là encore l'effet sur les cellules saines et les effets secondaires indésirables qui en découlent. On distingue ainsi la vectorisation ciblée de la chimiothérapie, qui diffère de par sa spécificité pour un type cellulaire particulier.

## **3. La vectorisation dans un contexte oncologique**

### **3.1. Définition et enjeux**

#### **3.1.1. Définition de la vectorisation**

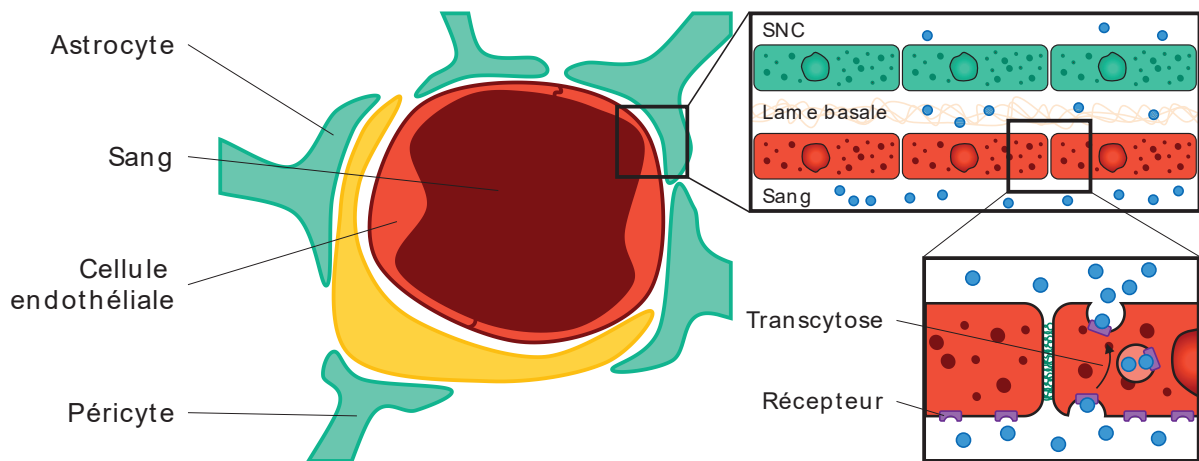
Le but de la vectorisation est d'assurer la stabilité et la délivrance d'un médicament, transporté par un vecteur. Les vecteurs jouent ainsi un double rôle de protecteurs et de transporteurs vis-à-vis des molécules vectorisées. Les médicaments concernés par la vectorisation sont ceux qui possèdent des principes actifs présentant une faible biodisponibilité en ayant du mal à atteindre leur cible, soit parce qu'ils sont dégradés, soit parce qu'ils ne parviennent pas à franchir une barrière biologique. La vectorisation prend également en charge les médicaments

ayant des effets indésirables du fait d'une action non-spécifique, en permettant leur délivrance ciblée.

La dégradation des médicaments peut être le fait de plusieurs raisons, comme la faible stabilité du médicament dans son environnement, par exemple une molécule hydrophobe dans un environnement aqueux, ou encore l'action du système immunitaire qui dégrade les molécules reconnues comme étrangères. Le vecteur, en protégeant le principe actif contre les dégradations, améliore ainsi sa durée de vie, et permet de prolonger l'effet thérapeutique sans augmenter la dose de médicament administrée.

Les barrières séparant un médicament de sa cible sont nombreuses. Elles dépendent du médicament, de la cible et de la voie d'administration. A l'inverse des médicaments dits « topiques », dont les principes actifs exercent une action locale, de nombreux médicaments doivent passer dans le système sanguin pour atteindre leur cible. Ces médicaments peuvent alors rencontrer des obstacles pour accéder ou quitter ce système. Par exemple, pour un médicament pris par voie orale, le passage du tube digestif vers le compartiment vasculaire doit se faire au travers de l'estomac ou de l'intestin. Pour un principe actif qui ne serait pas spontanément absorbé, une vectorisation adaptée peut permettre d'augmenter la perméabilité du tractus gastro-intestinal et ainsi d'améliorer le passage du médicament dans le sang [170–173]. A l'inverse, pour des médicaments ayant pour cible le système nerveux central (SNC), la principale barrière n'est pas l'entrée mais la sortie du compartiment vasculaire : ils doivent franchir la barrière hémato-encéphalique séparant le sang du SNC. Cette barrière assurant la protection du SNC contre les agents infectieux, sa perméabilité est très étroitement régulée (**Figure 16**). Alors que de nombreux médicaments ne peuvent pas la traverser, la vectorisation favorise leur passage, notamment par interaction avec des transporteurs spécifiques [174–176].





**Figure 16.** Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique et d'un processus de transcytose médiée par un récepteur spécifique permettant l'extravasation de vecteurs (Figure adaptée de [177,178]).

### 3.1.2. Enjeux de l'administration des médicaments

Lors de la conception d'un médicament, deux éléments sont essentiels pour obtenir un traitement efficace : il faut non seulement que le candidat-médicament soit actif sur sa cible, mais il faut aussi qu'il puisse arriver jusqu'à sa cible pour exercer son effet. L'étude de l'efficacité du candidat-médicament sur sa cible est généralement la première étape de la conception d'un nouveau médicament : l'analyse de son devenir dans l'organisme et l'optimisation de sa pharmacocinétique et de sa pharmacodynamique est le plus souvent la dernière, avant l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché.

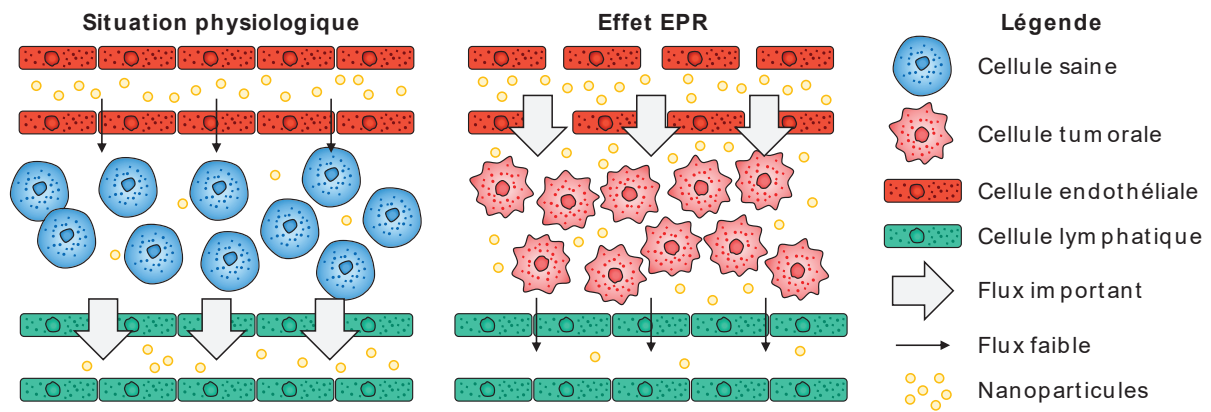
Ces deux facteurs sont cruciaux pour mesurer l'efficacité réelle d'un médicament, en prenant en compte l'ensemble des paramètres physiologiques qui peuvent les moduler à la hausse comme à la baisse. La pharmacocinétique désigne l'étude de l'administration, du métabolisme et de l'élimination du médicament : elle s'intéresse aux effets engendrés par le médicament à chacune de ces étapes [179]. La pharmacodynamique s'occupe quant à elle de l'étude de la relation dose-effet [180]. L'optimisation de ces paramètres permet de mieux contrôler l'action du médicament, et ainsi de réduire ses effets secondaires en maximisant son efficacité thérapeutique.

La formulation d'un médicament nécessite le choix de la voie d'administration, de la forme galénique et de la posologie. La voie d'administration va déterminer les barrières rencontrées par le médicament sur son trajet vers sa cible ; la forme galénique contrôle la forme sous laquelle sont formulés le principe actif et les excipients ; et enfin, la posologie déterminera la dose administrée en fonction de la pharmacocinétique et de la pharmacodynamique du médicament. Il convient donc d'adapter ces paramètres en fonction de la pathologie, de la molécule et de l'objectif recherché

### 3.1.3. Enjeux de la vectorisation dans un contexte de chimiothérapie

L'implication de la vectorisation dans la lutte contre le cancer est prépondérante, notamment dans le cas de la chimiothérapie. Comme décrit précédemment, les traitements qui relèvent de la chimiothérapie sont le plus souvent des molécules instables, ayant du mal à atteindre leurs cibles et dont l'action non-spécifique engendre de nombreux effets secondaires indésirables [181].

La majorité des traitements chimiothérapeutiques est administrée par voie intraveineuse et exerce une action systémique sur tout l'organisme. Les traitements chimiothérapeutiques tirent parti de l'effet EPR (pour « *Enhanced Permeability and Retention* ») pour augmenter la délivrance de médicaments à la tumeur. Initialement décrit en 1986 par Mastumura et Maeda, cet effet se définit par une perméabilité accrue de l'endothélium vasculaire à proximité de la tumeur, qui provoque une accumulation spécifique de particules nanométriques au niveau de la tumeur [182]. En effet, l'endothélium vasculaire au niveau de la tumeur présente une porosité importante permettant l'extravasation vers le microenvironnement tumoral. De plus, le faible drainage lymphatique des tumeurs accroît d'autant plus la rétention de ces particules. La vectorisation utilise ainsi des nanoparticules comme vecteurs afin de tirer parti de l'effet EPR et ainsi de maximiser l'effet thérapeutique de la molécule vectorisée (**Figure 17**).



**Figure 17.** Représentation schématique de l'effet EPR (Figure adaptée de [183]).

L'effet EPR constitue ainsi un mécanisme de ciblage passif des tumeurs, par opposition à un mécanisme actif qui impliquerait l'intervention de ligands spécifiques d'un type cellulaire particulier. A l'heure actuelle, les principales solutions de vectorisation de chimiothérapie, comme Doxil<sup>®</sup>, Abraxam<sup>®</sup>, Daunoxome<sup>®</sup> ou Myocet<sup>®</sup> utilisent toutes l'effet EPR comme unique méthode de ciblage. Cependant, bien que largement étudié depuis plus de 30 ans pour le développement de traitements innovants, le modèle initial de l'effet EPR s'est révélé peu concluant à l'égard de l'élaboration de traitements efficaces en clinique, et ce malgré les succès précédemment mentionnés [183,184]. En effet, de nombreuses différences existent entre les modèles murins et l'homme, et permettent d'expliquer pourquoi tout ce qui est observé en modèle murin ne se retrouve pas par la suite dans des études cliniques menées chez l'homme.

Il existe en particulier une forte hétérogénéité quant à la perméabilité de l'endothélium tumoral et à la présence de fenêtrures d'extravasation nécessaires à la rétention préférentielle des médicaments au niveau de la tumeur. Là où la perméabilité accrue des tumeurs est le plus souvent corrélée à une mauvaise différenciation des vaisseaux sanguins et à un manque de péricytes, de nombreux types de tumeurs présentent au contraire une bonne différenciation des vaisseaux sanguins et un bon recouvrement des vaisseaux par des péricytes [185,186]. De plus, la présence de zones hypoxiques participe aux mécanismes de résistance à certains médicaments et facilite la sélection des cellules malignes aux propriétés métastatiques. L'hypoxie a également des conséquences sur la coagulation et la fibrinolyse sanguine, des facteurs qui influent sur l'effet EPR [107,187]. Enfin,

l'hétérogénéité du microenvironnement tumoral affecte également la diffusion des médicaments par effet EPR, l'environnement immédiat de la tumeur variant énormément d'une tumeur à l'autre. Le remodelage de la matrice extracellulaire a des conséquences importantes sur la distribution et la diffusion des médicaments du vaisseau sanguin vers les cellules tumorales. Dans de nombreux cas, ce phénomène est accompagné d'une augmentation de la pression interstitielle qui limite le passage des médicaments, et diminue ainsi leur efficacité thérapeutique [187–189].

Les stratégies actuelles de vectorisation doivent donc tenir compte de l'hétérogénéité de l'effet EPR lors de la conception de nouveaux médicaments. Outre l'effet EPR, la vectorisation de chimiothérapie permet d'améliorer l'efficacité des molécules vectorisées par trois approches différentes : la réduction de la toxicité des molécules vectorisées, la délivrance locale de chimiothérapie et le développement d'agents théranostiques. La réduction de la toxicité des molécules chimiothérapeutiques par des vecteurs permet en effet d'augmenter la dose de médicament, et ainsi d'accroître l'effet thérapeutique, sans pour autant favoriser les effets secondaires indésirables. Cette approche permet notamment le développement de thérapies combinatoires, qui utilisent plusieurs traitements chimiothérapeutiques simultanément pour maximiser leurs effets [153]. Dans le cas de tumeurs solides, où toutes les cellules tumorales sont contenues dans une zone compacte, des résultats similaires peuvent être obtenus en délivrant la chimiothérapie localement, plutôt que par voie systémique [190]. L'élaboration de méthodes de rétention de médicaments, comme par exemple l'utilisation de gels ou d'échafaudages moléculaires implantés directement sur le site de la tumeur, permet d'obtenir une libération prolongée et contrôlée de l'agent thérapeutique, ce qui permet là aussi d'en contrôler les effets indésirables et ainsi de les minimiser [191–193]. La théranostique consiste, quant à elle, en une combinaison d'une approche diagnostique et thérapeutique, réunies en un seul traitement. Dans un contexte oncologique, la vectorisation permet le développement de plateformes multifonctionnelles, en tirant parti de la fonctionnalisation de nanoparticules et leur couplage avec des agents d'imagerie médicale [194–196].

Enfin, de nouvelles approches, basées sur une vectorisation ciblée d'un type cellulaire particulier, apparaissent comme des solutions au manque inhérent de spécificité des traitements chimiothérapeutiques. Ces méthodes reposent le plus souvent sur un couplage de nanoparticules servant de transporteurs de médicaments avec un ligand capable de reconnaître spécifiquement un élément particulier des cellules tumorales visées. Les stratégies de vectorisation ciblée dépassent le simple cadre de la chimiothérapie et permettent des avancées dans d'autres types de traitement du cancer, comme la radiothérapie ou l'immunothérapie [197–199]. La vectorisation ciblée de nanoparticules permet notamment d'apporter spécifiquement sur le site tumoral des agents radiosensibilisant capables d'améliorer l'efficacité d'un traitement par rayonnement [200].

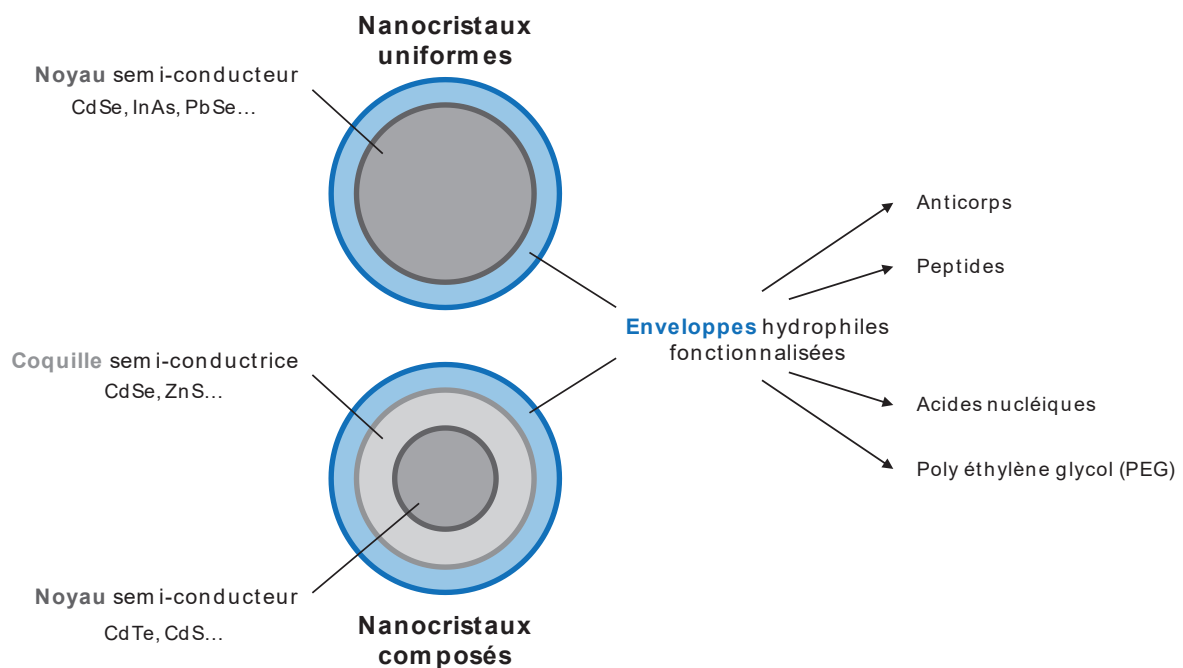
## 3.2. Vectorisation ciblée en oncologie

Différentes classes de vecteurs ont été développées. On retrouve les nanocristaux, les nanoparticules métalliques, les nanoparticules polymériques et les liposomes. Ces différentes classes vont être décrites dans les parties qui suivent, en s'attardant tout particulièrement sur les systèmes de vectorisation liposomale, qui constituent le principal objet d'étude de cette thèse.

### 3.2.1 Nanocristaux

Les nanocristaux sont des assemblages nanométriques de semi-conducteurs, capables de confiner des électrons, ce qui leur confère des propriétés optiques et électriques particulières (**Figure 18**). Ils présentent notamment des niveaux d'énergies électroniques discrets, similaires à ceux naturellement observés dans un atome, qui les rendent fluorescents. Ces niveaux d'énergie, qui conditionnent leurs propriétés, dépendent de leur taille, les nanocristaux les plus gros émettant à des longueurs d'ondes plus élevées. Par rapport à des fluorophores traditionnels, les nanocristaux présentent une stabilité et une brillance bien supérieures. En plus des nanocristaux formés d'un seul alliage uniforme de semi-conducteurs, des nanocristaux peuvent présenter une deuxième couche de semi-conducteurs, ce qui permet leur passivation et l'amélioration de leurs propriétés optiques comme leur rendement quantique [201,202]. L'ensemble de leurs propriétés font des

nanocristaux des candidats de choix pour des approches théranostiques. En effet, ils permettent un suivi en temps réel et sur des périodes de temps étendues. Leur association avec des ligands ou des peptides permet ainsi un ciblage et un suivi de protéines et de cellules spécifiques [203–206]. En outre, certains nanocristaux, et notamment ceux contenant du Cadmium, possèdent des propriétés toxiques quand ils sont excités par un rayonnement ultraviolet, du fait de la toxicité intrinsèque des ions  $\text{Cd}^{2+}$  [207].



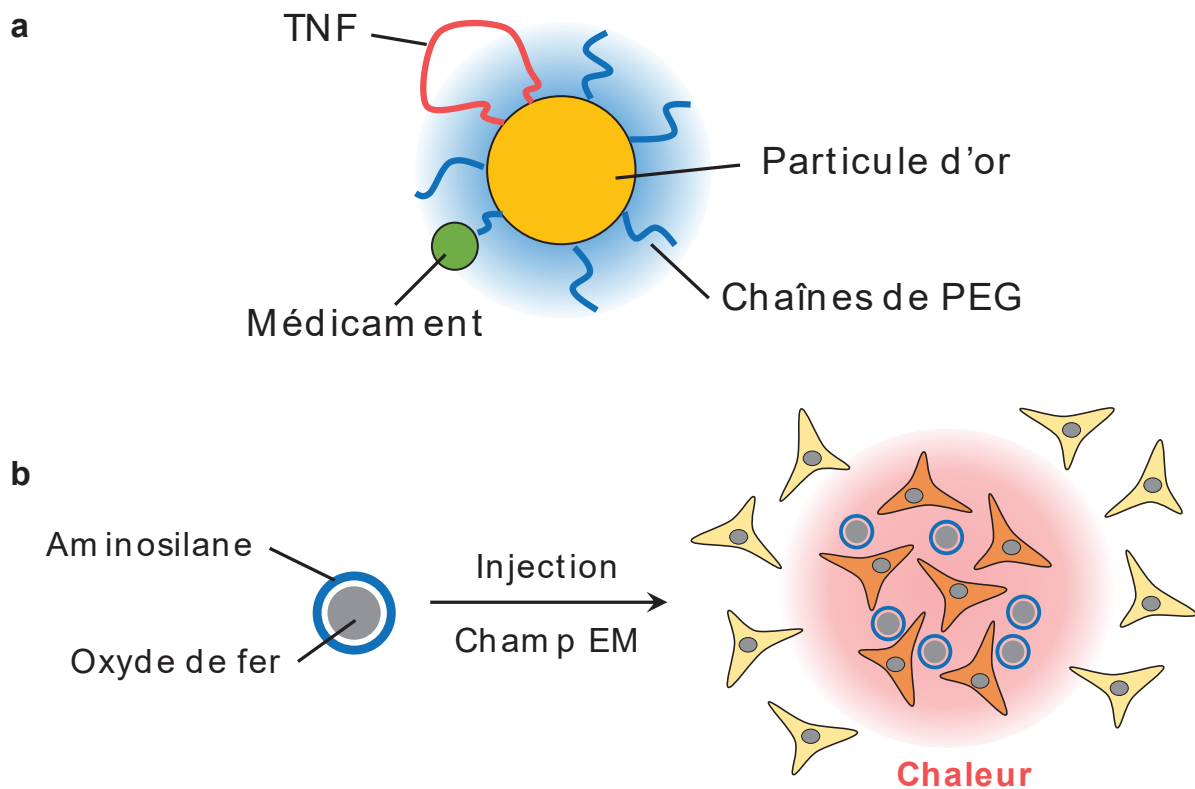
**Figure 18.** Nanocristaux et stratégies de fonctionnalisation (Figure adaptée de [207]).

### 3.2.2. Nanoparticules métalliques

En plus de leurs implications dans la formation des nanocristaux, les métaux ont également été utilisés pour le développement de nanoparticules métalliques impliquées dans le traitement du cancer [208]. De manière similaire aux nanocristaux, les nanoparticules métalliques présentent des propriétés intrinsèques intéressantes pour développer des approches théranostiques. En particulier, ces nanoparticules peuvent servir d'agent de contraste pour une visualisation par imagerie par résonance magnétique ou IRM [209]. Leur nature métallique leur confère une bonne biocompatibilité. Des études ont de plus

montré que certaines particules possèdent des propriétés antibactériennes intéressantes quand les traitements usuels du cancer sont associés à une immunodéficience [210]. Enfin, les nanoparticules disposent d'une large gamme de chimie de surface, permettant leur fonctionnalisation par diverses molécules.

Les deux principales approches pour l'utilisation de nanoparticules métalliques concernent la vectorisation ciblée d'un médicament et le ciblage spécifique de cellules tumorales pour un traitement par les nanoparticules elles-mêmes. La première approche est illustrée par Aurimune® (**Figure 19a**), un système de vectorisation basé sur une particule d'or colloïdal. Cette particule est fonctionnalisée par trois entités : des chaînes de PEG, qui créent un revêtement hydrophile ; une molécule médicamenteuse aux propriétés antitumorales ; un fragment de TNF $\alpha$  (de « *Tumor Necrosis Factor* »), une protéine aux propriétés anti-angiogéniques et immunostimulantes qui permet la maximisation de l'effet thérapeutique du médicament vectorisé. La deuxième approche est quant à elle illustrée par Nanotherm® (**Figure 19b**), une nanoparticule d'oxyde de fer enveloppée d'aminosilane. Cette particule est utilisée dans le traitement de glioblastomes, des cancers cérébraux. Après injection des particules, elles se localisent majoritairement au niveau du site tumoral. L'application d'un champ électromagnétique alternatif va exciter ces particules, qui vont se désexciter en générant de la chaleur et ainsi détruire les cellules tumorales.



**Figure 19.** Exemple de systèmes de vectorisation basés sur des nanoparticules métalliques.

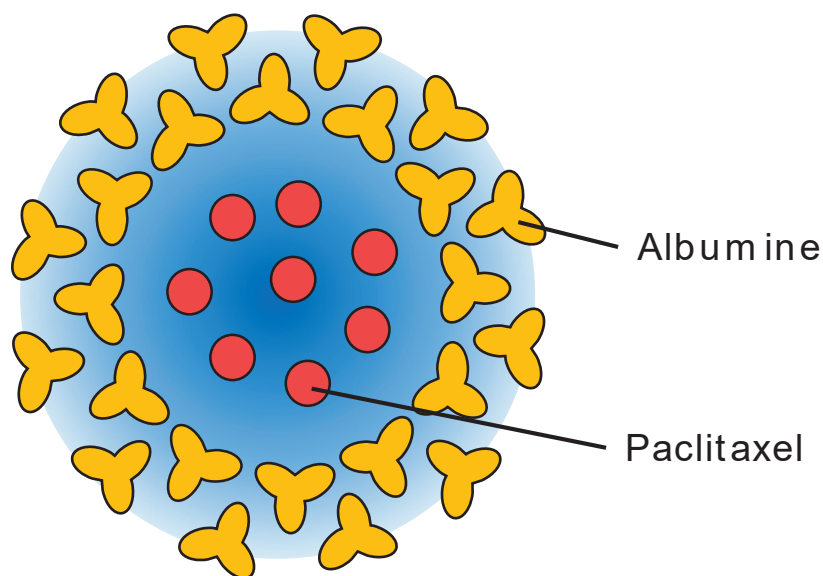
- a.** Structure d'Aurimmune® (Source **Cytime**)
- b.** Mécanisme d'action de Nanotherm® (Source **Magforce**)

### 3.2.3. Nanoparticules polymériques

Les nanoparticules polymériques regroupent les nanoparticules formées d'assemblages de protéines, de lipides, de glucides ou encore de polyélectrolytes [211,212]. Ces particules ont comme point commun une excellente biocompatibilité et biodégradabilité [181]. La principale approche thérapeutique consiste à former des assemblages tridimensionnels permettant l'encapsulation de la molécule active à vectoriser. Ces capsules permettent d'assurer la stabilité du principe actif, et se destinent ainsi aux molécules de grande taille, hydrophobes ou reconnues et éliminées par le système immunitaire. Ces systèmes de vectorisation utilisent souvent des molécules amphiphiles, pour créer des systèmes permettant la stabilisation de composés hydrophobes, hydrophiles et amphiphiles.



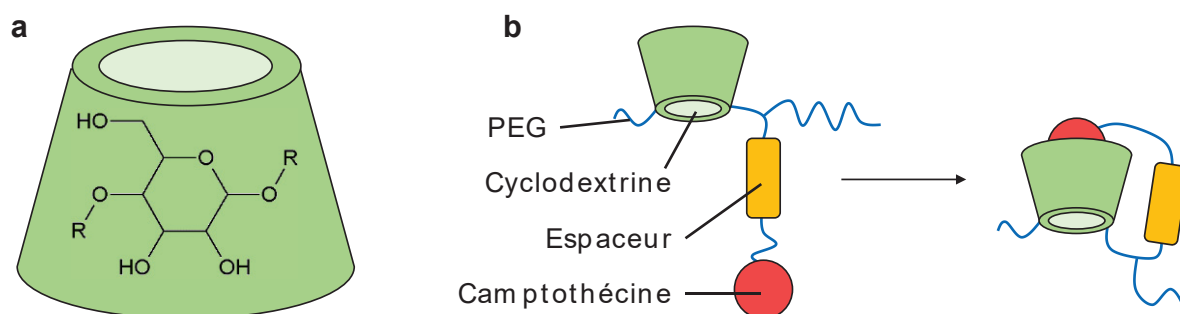
Pour les systèmes protéiques, on retrouve principalement des assemblages d'albumine, de gélatine, d'élastine ou encore de protéines de lait ou de soja [211,213]. Le système protéique le plus fréquent est Abraxane<sup>®</sup>, qui désigne une nanoparticule composée d'un assemblage polymérique d'albumine encapsulant du paclitaxel, une molécule aux effets anti-tumoraux reconnus mais de forte hydrophobicité (**Figure 20**) [214,215]. La coquille d'albumine permet la protection du paclitaxel, avec un relargage lors de la dissociation des unités d'albumine directement au niveau du site tumoral. En jouant sur la nature de la polymérisation, les systèmes protéiques permettent un contrôle précis du relargage du médicament, et améliorent la pharmacocinétique pour maximiser son efficacité thérapeutique.



**Figure 20.** Exemple de nanoparticule protéique (Abraxane<sup>®</sup>).

Les vecteurs à base de glucides sont principalement basés sur des chaînes polysaccharidiques anioniques ou des cyclodextrines, qui sont des assemblages cycliques de 6 à 8 molécules de glucides, qui présentent notamment un environnement intérieur hydrophobe et un environnement extérieur hydrophile. Dans une approche de vectorisation, les cyclodextrines permettent ainsi la stabilisation de composés hydrophobes en minimisant leur interaction avec un environnement aqueux [212,216]. CRLX101 consiste en l'association d'une molécule de camptothécine, un alcaloïde pentacyclique hydrophobe aux propriétés antitumorales, avec un polymère basé sur une cyclodextrine (**Figure 21**) [217]. Dans

le cas de CRLX101, le polymère est formé d'une alternance de sous-unités de cyclodextrines et de PEG, qui permet la stabilisation de la nanoparticule.

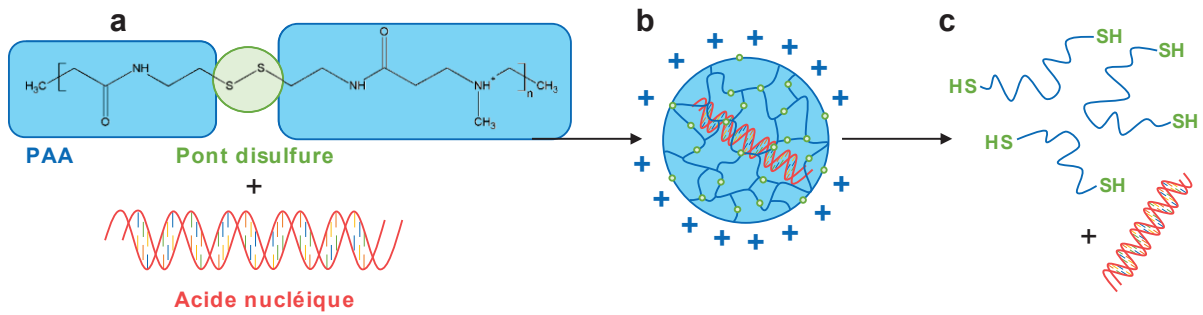


**Figure 21.** Exemple de nanoparticule à base de cyclodextrines (CRLX101).

**a.** Structure et géométrie d'une cyclodextrine.

**b.** Structure et assemblage d'une nanoparticule à base de cyclodextrines (Figure adaptée de [217]).

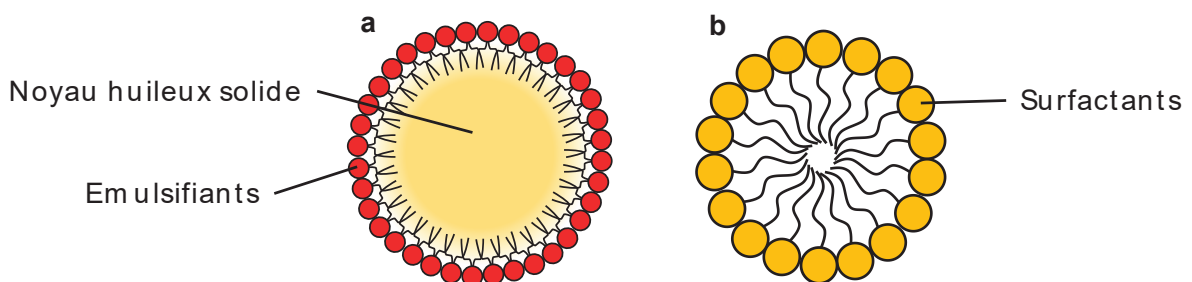
Dans une optique de vectorisation, le principal intérêt des polyélectrolytes est leur charge. Les polyélectrolytes peuvent en effet présenter des charges de natures différentes. On retrouve des polycations, présentant des charges positives, avec des polymères aminés comme des polyéthylènimines ou des polyvinylamines ; des polyanions présentant des charges négatives comme les chaînes polysaccharidiques d'alginate ou de pectines ; des polyampholytes, zwitterioniques, comme l'acrylamide et ses dérivés [218–221]. Les polycations en particulier sont impliqués dans la vectorisation d'acides nucléiques, et notamment d'ARN interférents (**Figure 22**). Ces ARN ont la capacité à s'hybrider sur la séquence d'un ARN messenger spécifique, ce qui empêche sa traduction et conduit à son élimination. Cette méthode permet ainsi d'inhiber spécifiquement l'expression d'un gène. L'utilisation d'ARN interférents dans la conception de médicaments est importante, du fait de leur spécificité d'action, mais doit tenir compte de leurs inconvénients. Les ARN, et les acides nucléiques en général, sont des molécules fortement chargées négativement, reconnues par le système immunitaire, ce qui conduit à leur dégradation. La vectorisation de cette classe de molécules demande ainsi l'utilisation de molécules chargées positivement pour obtenir des nanoparticules électriquement neutres, ce qui, en masquant leurs charges, protège les ARN interférents et permet leur activité [221].



**Figure 22.** Exemple d'une nanoparticule d'acide polyacrylique (PAA) encapsulant un acide nucléique (Adapté de [221]).

- Formation d'un complexe PAA/acide nucléique et stabilisation par des ponts disulfures.
- Nanoparticule fonctionnelle.
- Réduction des ponts disulfures, dissociation de la nanoparticule et libération de l'acide nucléique.

Enfin, plusieurs types d'assemblages de lipides existent, comme des nanoémulsions, les nanocapsules lipidiques solides ou les micelles [222]. Là où les nanoémulsions désignent des nanoparticules basées sur un noyau huileux liquide, les nanoparticules lipidiques solides sont quant à elles basées sur un noyau lipidique solide. Dans les deux cas, ces nanoparticules sont stabilisées à l'interface huile/eau par des émulsifiants (**Figure 23a**). Quant aux micelles, elles sont formées d'un assemblage sphérique de lipides ou d'émulsifiants, voire de polymères mimant la structure et l'organisation des lipides (**Figure 23b**) [223,224].



**Figure 23.** Exemples de nanoparticules lipidiques

- Exemple de nanoémulsion.
- Exemple de micelle.

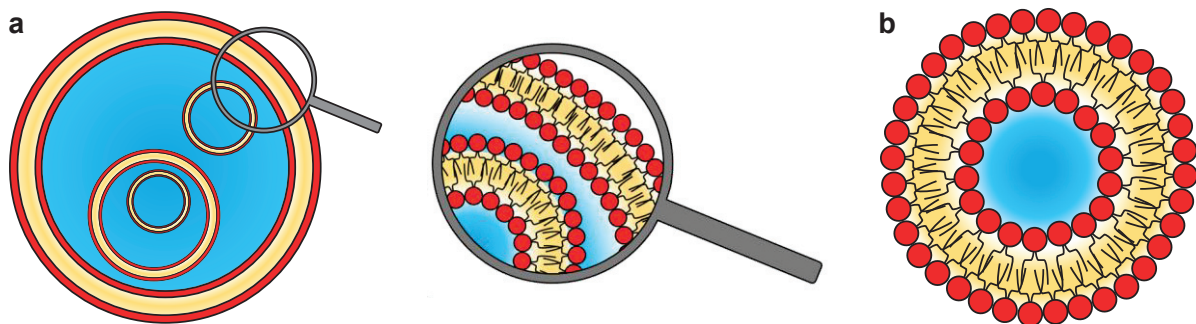
Enfin, une dernière catégorie de vecteurs lipidiques existe : les liposomes, qui constituent le principal outil d'étude de cette thèse et qui vont être décrits en détail dans la partie suivante.

### 3.3. Liposomes

#### 3.3.1. Aspects généraux

##### 3.3.1.1. Structure et propriétés

Les liposomes sont des modèles membranaires très utilisés depuis leur découverte par Alec Bangham en 1964 [225]. Ils sont formés par l'assemblage sphérique de lipides en vésicules. A la différence des micelles, les lipides des liposomes sont organisés en bicouches lipidiques autour d'un noyau aqueux (**Figure 24**). On distingue plusieurs types de liposomes, selon leur taille et leur lamellarité. Les vésicules multilamellaires ou MLV (pour « *MultiLamellar Vesicles* ») sont formées de plusieurs bicouches lipidiques, qui délimitent entre elles des compartiments aqueux supplémentaires (**Figure 24a**). A l'inverse, les vésicules unilamellaires sont uniquement constituées d'une bicouche et d'un compartiment aqueux (**Figure 24b**).



**Figure 24.** Structure générale de liposomes.

- a. Vésicule multilamellaire.
- b. Vésicule unilamellaire.

Ces vésicules unilamellaires sont divisées en trois grandes familles, classées selon leur taille : les petites vésicules ou SUV (pour « *Small Unilamellar Vesicles* ») mesurant de 20 à 100 nm, les grandes vésicules ou LUV (pour « *Large Unilamellar*

*Vesicles* ») mesurant de 100 à 1000 nm et les vésicules géantes ou GUV (pour « *Giant Unilamellar Vesicles* ») mesurant de 1 à 100  $\mu\text{m}$  [226]. Dans une optique de vectorisation, les vésicules les plus intéressantes sont les vésicules unilamellaires, qui permettent un contrôle plus précis de la lamellarité que les MLV. En termes de taille, les SUV et LUV sont généralement préférés aux GUV, ces dernières dépassant le micron sont peu attractives pour une utilisation chez l'homme, leur taille pouvant poser des problèmes lors du passage dans des vaisseaux.

La composition lipidique des liposomes est extrêmement variable et modulable, la principale limite concernant le rayon de courbure des vésicules formées. Les principaux lipides composant les liposomes sont généralement les phospholipides, idéaux de par leur géométrie majoritairement cylindrique. Comme pour les membranes biologiques, les propriétés des membranes liposomales dépendent directement de leur composition. En termes de mouvements des lipides au sein de la membrane, que ce soit des mouvements de translation latérale ou de rotation, le principal facteur est la fluidité membranaire. Les liposomes étant des systèmes membranaires lipidiques purs, la fluidité de leurs membranes dépend de l'agencement des chaînes acyles, et donc de la  $T_m$  des lipides par rapport à la température d'expérimentation. En matière de vectorisation, la fluidité membranaire des liposomes, affectant la mobilité des lipides, est directement reliée à l'encapsulation de molécules et à la perméabilité de la membrane liposomale [227]. Enfin, les liposomes sont le plus souvent préparés à partir de phospholipides chargés, générant une charge à leur surface. Cette charge de surface a des répercussions sur leur pharmacocinétique puisqu'elle affecte leur interaction avec leur environnement, et peut favoriser ou au contraire, limiter leur reconnaissance par le système immunitaire.

L'analyse des propriétés physicochimiques des liposomes est ainsi de première importance. Elle peut être réalisée par de multiples méthodes [226]. Parmi elles, la DLS (pour « *Dynamic Light Scattering* ») et la TRPS (pour « *Tunable Resistive Pulse Sensing* ») se démarquent de par leur relative simplicité et par le fait qu'elles peuvent mesurer la distribution de taille des liposomes, mais aussi leur charge de surface. La microscopie, en particulier la microscopie électronique, permet de visualiser directement la morphologie des liposomes et donc leur taille et leur

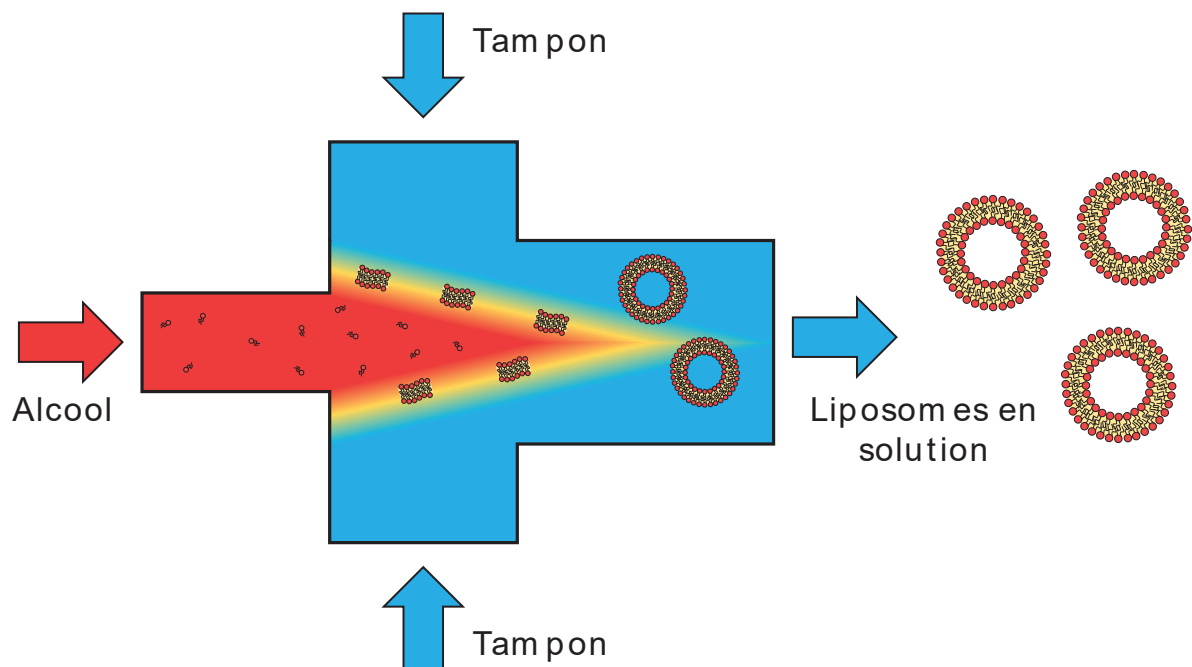
lamellarité [225]. Cette dernière peut également être mesurée par Résonance Magnétique Nucléaire ou RMN ou par diffraction de neutrons aux petits angles ou SAXS. Enfin, la mesure de la fluidité des liposomes peut être réalisée par Microscopie à Force Atomique ou AFM, par Résonance Paramagnétique Electronique ou RPE, ainsi que par des sondes fluorescentes sensibles à l'ordre de la membrane [228].

### *3.3.1.2. Méthodes de préparation*

La formation de liposomes repose le plus souvent sur la dispersion de lipides (traditionnellement sous forme de films secs) dans un environnement aqueux, et à leur auto-assemblage en vésicules. Les méthodes de préparation dépendent du type de liposomes que l'on souhaite préparer. Les GUV étant des vésicules relativement fragiles, leur formation nécessite des méthodes douces et lentes. Les GUV peuvent être formées par hydratation douce d'un film lipidique, par électroformation ou par coalescence de vésicules plus petites (LUV et SUV). A l'inverse, la formation de MLV est généralement réalisée par des méthodes nécessitant l'application de contraintes mécaniques importantes. Les deux méthodes privilégiées sont ainsi l'hydratation d'un film lipidique sous agitation, qui aboutit à la formation de vésicules de taille et de lamellarité hétérogènes, ou le mélange d'une phase aqueuse avec une phase organique contenant des phospholipides, qui conduit à la formation d'émulsions huile dans eau. L'évaporation du solvant organique aboutit alors à la formation de MLV de tailles relativement similaires.

La formation de LUV et de SUV repose le plus souvent sur la réduction de la taille et de la lamellarité de MLV précédemment formées, même si des méthodes de préparation directes existent. Le passage des MLV aux LUV ou aux SUV utilise des méthodes permettant de casser les lamelles, parmi lesquelles on retrouve l'extrusion, la sonication, les cycles de congélation/décongélation et l'homogénéisation à haute pression. Toutes ces techniques permettent d'ouvrir les MLV pour former des vésicules unilamellaires dont la taille va dépendre de la méthode utilisée et des conditions expérimentales. A titre d'exemple, la taille des vésicules extrudées dépend du diamètre des pores de la membrane, alors que celle des vésicules formées par sonication va dépendre de la durée et de l'intensité de la sonication. Parmi les méthodes permettant la formation directe de LUV ou de SUV,

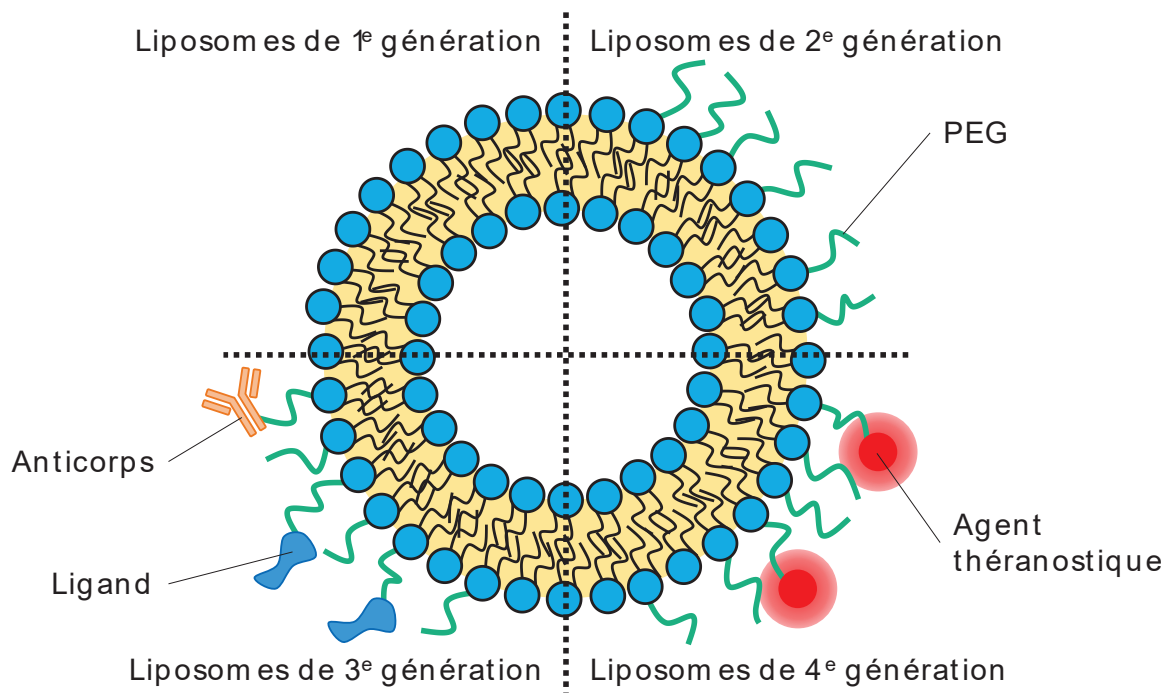
on retrouve l'injection éthanolique, la dialyse ou des méthodes microfluidiques [229]. L'injection éthanolique repose sur l'injection dans une phase aqueuse d'une goutte d'éthanol (ou de solvant organique en général) contenant des lipides en solution, qui vont alors s'auto-assembler en vésicules. La dialyse permet également la formation de vésicules unilamellaires quand elle est appliquée à des lipides solubilisés sous forme de micelles de détergents, en permettant d'extraire les détergents, ce qui entraîne la coalescence des micelles enrichies en lipides et la formation de LUV. Enfin, l'application de la microfluidique à la préparation de liposomes est illustrée par la MHF (pour « *Micro Hydrodynamic Focussing* »), représentée **Figure 25** [230]. Dans cette méthode, un tampon aqueux circule le long des bords d'un canal microfluidique alors qu'une solution alcoolique de lipides circule entre les deux couches aqueuses. La circulation simultanée d'alcool et d'eau crée des régions dépourvues d'alcool où les lipides peuvent s'auto-assembler en bicouches lipidiques, qui finissent par se circulariser en liposomes. L'avantage des méthodes microfluidiques est leur haut niveau de précision, avec un contrôle fin de la taille des liposomes en fonction des rapports entre les débits d'alcool et de tampon aqueux.



**Figure 25.** Formation de liposomes par MHF (Adapté de [230]).

### 3.3.2. Enjeux de la vectorisation liposomale dans un contexte oncologique

Les liposomes représentent l'une des principales solutions de vectorisation de médicaments. De par leur nature lipidique, ils sont non toxiques, biodégradables et biocompatibles (**Figure 26**).



**Figure 26.** Représentation schématique des différentes classes de liposomes (Figure adaptée de [232]).

De plus, ils sont adaptés à la vectorisation de molécules hydrophobes, hydrophiles ou amphiphiles. Par rapport aux autres méthodes de vectorisation, l'avantage des liposomes repose sur leur grande versatilité, aussi bien en termes de fonctionnalisation de surface que de flexibilité de formes galéniques. En effet, les préparations liposomales sont adaptées pour une administration classique de médicaments par voies orales ou intraveineuses, mais permettent également des formulations sous forme d'aérosols, de gels ou de crèmes. Quant à la fonctionnalisation de surface, elle est rendue aisée par l'utilisation de conjugués lipidiques, qui permettent le couplage de lipides, les principaux constituants qui assurent la structuration des liposomes, avec des ligands ou des polymères, qui permettent d'apporter des propriétés fonctionnelles supplémentaires. Les



liposomes constituent également une solution idéale pour la reconstitution de protéines transmembranaires, en ayant une structure similaire à celle des membranes cellulaires, ce qui ouvre la voie à un traitement par enrichissement de la membrane en protéines transmembranaires [231].

Cependant, malgré leurs avantages et le nombre de formulations actuellement approuvées, les liposomes présentent des contraintes qui limitent leur efficacité. En particulier, les liposomes sont rapidement éliminés du système circulatoire par les macrophages, des cellules du système immunitaire. Leur élimination est due à leur reconnaissance par des opsonines, des protéines qui marquent les éléments extérieurs à l'organisme en s'y adsorbant, favorisant ainsi leur phagocytose par les macrophages [233]. Pour limiter l'adsorption des opsonines et allonger la durée de vie des liposomes, la stratégie la plus couramment adoptée est celle de la pégylation, qui consiste en l'enrobage des liposomes par des chaînes de PEG [234]. Cette stratégie a notamment fait ses preuves dans la vectorisation de protéines, en permettant d'améliorer leur solubilité et leur stabilité, et en diminuant leurs propriétés allergéniques. La pégylation de liposomes aboutit à la formation d'un revêtement hydrophile qui limite l'opsonisation des liposomes ; on parle alors de liposomes furtifs de par leur capacité à échapper à la reconnaissance du système immunitaire. Ce sont les liposomes dits de « deuxième génération » (**Figure 26**).

De nombreuses formulations ont été développées avec succès grâce à ces liposomes furtifs, notamment dans le cadre de la lutte contre le cancer, avec par exemple Doxil<sup>®</sup>, Onivide<sup>®</sup> et Lipoplatin<sup>™</sup>. La spécificité de ces liposomes est assurée par l'effet EPR, avec les avantages et les inconvénients précédemment décrits. Dans un contexte de vectorisation de chimiothérapie, les stratégies actuelles reposent sur le ciblage d'un type cellulaire spécifique. Pour les liposomes, la pégylation représente une plateforme idéale pour la fonctionnalisation, en permettant une bonne exposition des ligands spécifiques au bout des chaînes de PEG, ce qui favorise l'établissement des interactions avec les cellules cibles. Ces liposomes fonctionnalisés, qualifiés de liposomes de troisième génération, ont ainsi pour cibles des éléments membranaires surreprésentés dans la membrane des cellules tumorales par rapport à celle des cellules saines (**Figure 26**). Ces cibles sont le plus souvent des protéines surexprimées, reconnues par des ligands ou des

anticorps spécifiques, mais peuvent également être des glucides surreprésentés, alors reconnus par des fragments de lectines [235]. Enfin, des liposomes théranostiques, qualifiés de liposomes de quatrième génération, permettent d'utiliser les liposomes comme plateformes diagnostique et thérapeutique, utilisant les nombreux avantages précédemment décrits (**Figure 26**).

Cependant, plusieurs études récentes ont pointé les limites des stratégies actuelles de vectorisation basées sur des liposomes [236]. En particulier, leur pégylation peut dans certains cas réduire leur durée de vie dans le système circulatoire, modifier leur mode d'interaction avec leur cible, voire même déclencher une réponse immunogène spécifique aux liposomes pégylés [237]. Comme pour l'effet EPR, la pégylation de liposomes s'est révélée soumise aux variations d'une cellule ou d'un organe à l'autre, qui peuvent altérer son efficacité et la rendre inopérante. En particulier, l'enrobage des liposomes d'un revêtement hydrophile limite considérablement la fusion des liposomes avec la membrane de la cellule cible, la présence de chaînes hydrophiles gênant considérablement la formation de pores de fusion, rendant alors la fusion membranaire thermodynamiquement peu favorable. Les liposomes pégylés sont donc le plus souvent internalisés par endocytose, un processus durant lequel une invagination de la membrane plasmique de la cellule cible fait entrer le liposome dans la cellule par la formation d'endosomes. Ce processus est souvent couplé à la fusion avec des lysosomes qui conduit à la dégradation du contenu de l'endosome, qui peut alors nuire à l'intégrité du principe actif et à l'efficacité thérapeutique du traitement. Des stratégies alternatives à la pégylation existent. Elles sont liées à l'avènement de nombreux polymères qui apparaissent comme de potentiels successeurs au PEG. Parmi eux, on retrouve des dérivés très ramifiés de PEG, de polyglycérols ou de polyoxazolines, ou encore, des GAG tels que l'acide hyaluronique ou l'héparine. Un autre axe de recherches concerne l'amélioration de la pégylation. Elle permet de conserver ses avantages tout en réduisant ses défauts. Parmi les solutions proposées, on retrouve l'utilisation de chaînes de PEG clivables ou encore la préparation de liposomes fusogéniques qui échappent à la dégradation par les lysosomes [238]. D'autres stratégies visent à prendre en charge les liposomes eux-mêmes, par des transporteurs, comme des capsules de polyélectrolytes, afin de pallier leur manque de stabilité dans le sang et de prolonger l'action thérapeutique

du principe actif encapsulé. Modifier la charge des liposomes, notamment par des lipides chargés ou des polymères zwitterioniques, apparaît comme un autre moyen de réduire l'adsorption de protéines à leur surface. Enfin, d'autres stratégies sont basées sur l'affranchissement du passage des liposomes dans le système circulaire. C'est notamment le cas des stratégies utilisant des échafaudages polymériques ou des hydrogels implantés localement, qui permettent un relargage continu et régulier des liposomes directement sur le site de la tumeur.

## **4. Modèles membranaires biomimétiques**

Cette thèse s'intéresse aux interactions membranaires entre cellules et vecteurs lipidiques dans le but de développer une solution nouvelle pour un ciblage spécifique. Cependant, l'étude des membranes cellulaires est d'une extrême complexité. En particulier, la dynamique cellulaire rend difficile l'évaluation de la contribution de la membrane plasmique à un phénomène, par rapport à la contribution du reste de la cellule [239]. De plus, l'étude des protéines transmembranaires est également rendue difficile de par leur caractère amphiphile, qui empêche le plus souvent leur solubilisation. En effet, bien que l'étude des protéines solubles se soit fortement développée, celle des protéines transmembranaires est beaucoup plus limitée [240].

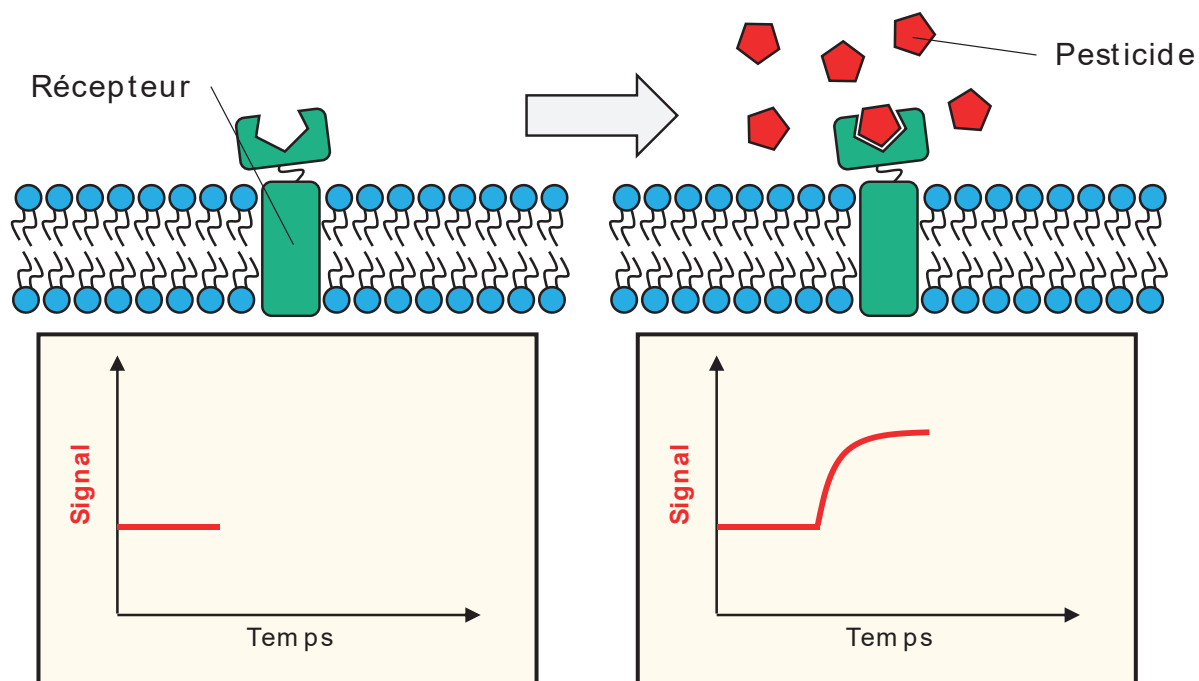
Dans un tel contexte, des membranes artificielles reproduisant les propriétés et la structure des membranes apparaissent comme des solutions de choix pour l'étude des membranes cellulaires, de leurs propriétés, et des protéines transmembranaires qui les composent [239]. De telles membranes, qualifiées de membranes biomimétiques, sont le plus souvent constituées de lipides ou d'émulsifiants, afin de reconstituer au mieux l'environnement des membranes biologiques.

### **4.1. Applications des modèles membranaires biomimétiques**

L'impact et les perspectives du développement de modèles membranaires sont nombreux. En plus de la caractérisation structurale et fonctionnelle des membranes, les modèles membranaires permettent d'utiliser les propriétés des

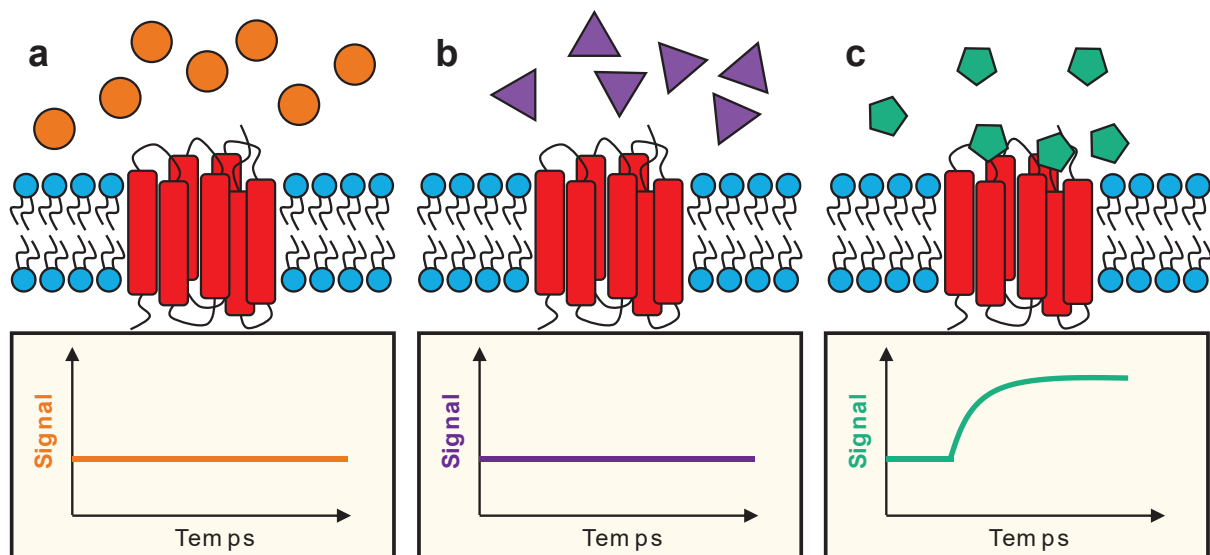
protéines membranaires pour développer de nouvelles applications autrement impossibles sans support [241]. Parmi les applications des membranes biomimétiques, on retrouve la formation de (bio)capteurs, le séquençage d'ADN, l'étude d'interactions avec des membranes et des protéines membranaires, ou encore des approches utilisant des protéines membranaires pour la production d'énergie ou la purification d'eau [241–244].

Les biocapteurs sont des assemblages artificiels incluant des éléments biologiques, dont le but est la détection de certains signaux, le plus souvent des molécules particulières. De tels outils mettent à profit les propriétés des protéines transmembranaires, comme notamment la spécificité des récepteurs membranaires [245,246]. En effet, les récepteurs biologiques possèdent une très forte spécificité et sélectivité, ce qui permet la formation de couches sensibles permettant l'élaboration de biocapteurs très sensibles et spécifiques (**Figure 27**). De tels assemblages ont trouvé des applications dans les domaines du contrôle de la qualité de l'eau, de l'air et de la nourriture, ou encore dans des dispositifs médicaux pour la mesure de variables biologiques ou la détection d'anomalies [247].



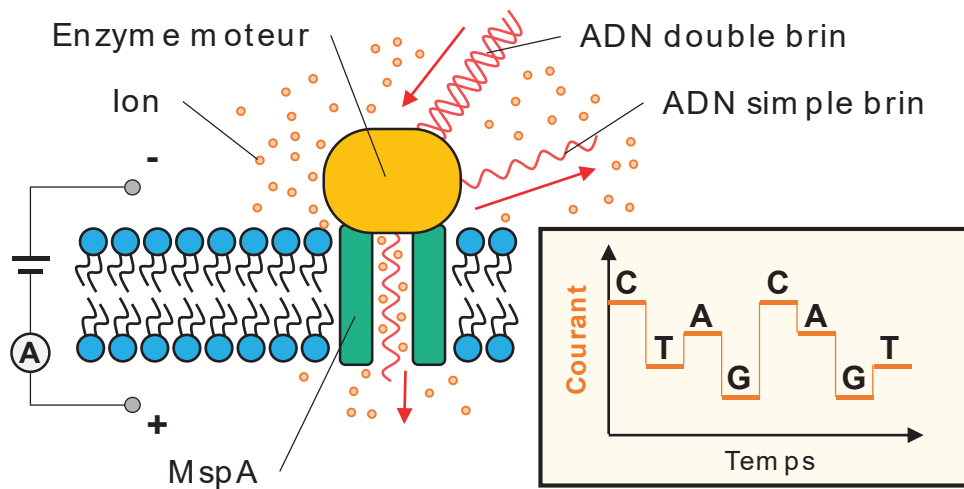
**Figure 27.** Représentation schématique de la couche sensible d'un biocapteur basé sur une membrane biomimétique.

Comme précédemment mentionné, les protéines membranaires constituent des cibles de choix lors du développement de médicaments. L'étude des interactions de ces protéines avec des candidats-médicaments est ainsi de toute première importance pour l'industrie pharmaceutique [248–251]. Les modèles membranaires biomimétiques permettent ainsi l'utilisation de méthodes physiques et physico-chimiques autrement plus difficiles à mettre en œuvre (sinon impossible) avec des modèles cellulaires dû à la complexité de ces derniers (**Figure 28**). Les modèles biomimétiques représentent également de sérieuses alternatives aux essais précliniques sur animaux, de plus en plus contestés du point de vue éthique.



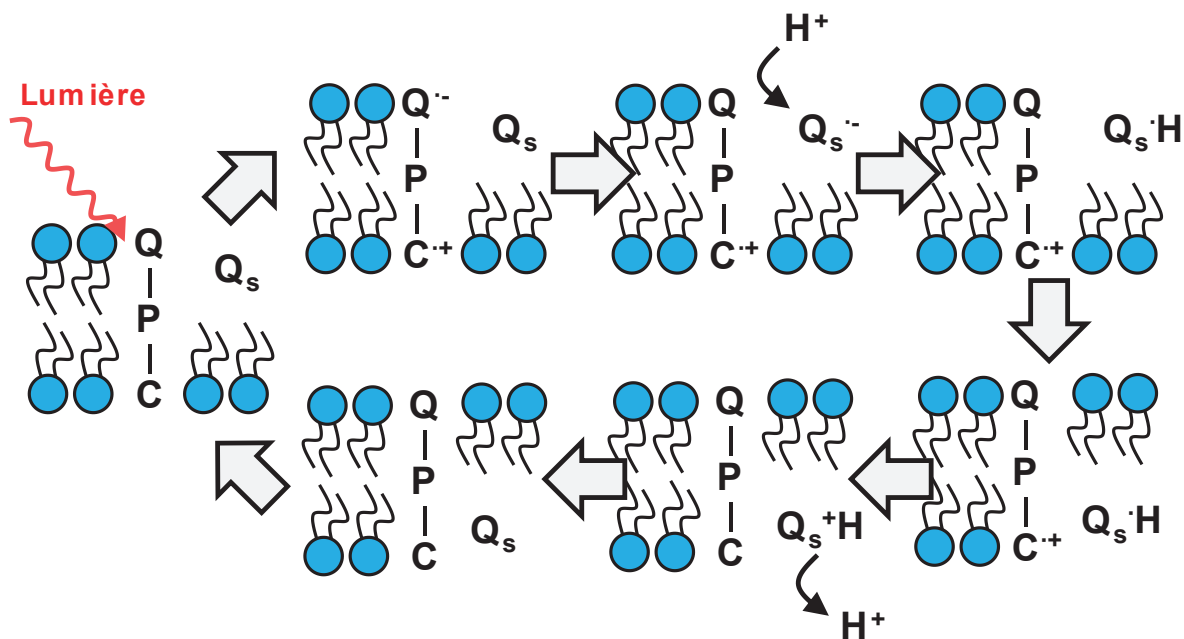
**Figure 28.** Représentation schématique d'une membrane biomimétique comme plateforme de criblage haut-débit. La protéine d'intérêt, qui schématise ici un récepteur couplé à la protéine G, est représentée en rouge ; les différents ligands testés sont représentés en orange, violet et vert. Les ligands orange (**a**) et violets (**b**) n'interagissent pas avec la cible, alors que les verts (**c**) interagissent.

Une autre implication de la reconstitution de protéines membranaires dans des membranes biomimétiques concerne le séquençage d'ADN *via* la formation de nanopores [244,252–256]. Ces systèmes de séquençage reposent sur la mesure du courant électrique qui traverse le nanopore lorsque ce dernier est immergé dans un fluide conducteur (**Figure 29**). La translocation d'un acide nucléique à travers le nanopore va modifier le courant électrique, ce dernier dépendant de la conformation du nanopore. La modification de l'intensité électrique dépendant de la base azotée, suivre l'évolution de l'intensité du courant électrique permet de déduire la séquence du brin transloqué, une fois le système calibré.



**Figure 29.** Représentation schématique d'un nanopore pour une application au séquençage d'acides nucléiques (Figure adaptée de [257]). MspA: « *Mycobacterium smegmatis porin A* ». Une enzyme motrice permet de séparer l'ADN double brin en ADN simple brin, et de contrôler la vitesse de translocation des fragments simple brin à travers MspA.

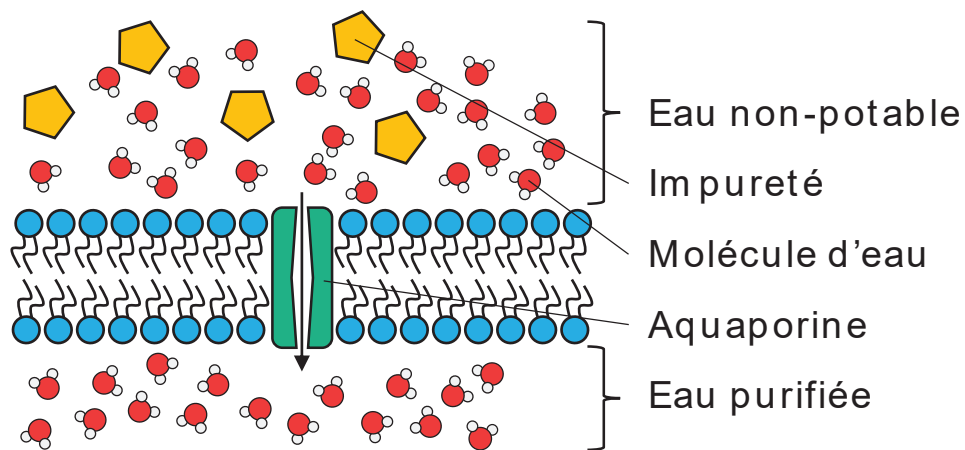
Enfin, deux exemples illustrent l'utilisation d'une machinerie moléculaire mise en place par la nature : la production d'énergie par photosynthèse et la purification d'eau à l'aide d'aquaporines [243,258]. La photosynthèse est un processus biologique naturel, très présent chez les végétaux, qui permet la production d'énergie à partir de lumière. A l'inverse de la combustion d'énergies fossiles qui relâche de nombreux gaz toxiques dans l'atmosphère, la photosynthèse capte du dioxyde de carbone pour former du dioxygène. Cela en fait une alternative idéale aux modes traditionnels de production d'énergie, non seulement non-polluante mais dépolluante [259–261]. Les membranes biomimétiques peuvent ainsi servir à la conception de cellules photovoltaïques artificielles, en permettant de reconstituer des complexes mimant la chaîne photosynthétique qui permettent de former un gradient électrochimique à partir d'un signal lumineux (**Figure 30**). Ces modèles biomimétiques possèdent de nombreux avantages sur les cellules photovoltaïques synthétiques, notamment en termes de rendement (les modèles biomimétiques ayant un rendement maximal théorique de 100%). Cependant, ils ne sont pas exempts de défauts, dont le principal est leur courte durée de vie. Des études sont ainsi en cours afin d'améliorer leur stabilité et de limiter les dommages photo-induits qui déstabilisent et dégradent la membrane [243,262,263].



**Figure 30.** Représentation schématique de la reconstitution d'un système de production d'énergie dans une membrane biomimétique (Figure adaptée de [264]). Q : naphthoquinone ; P : porphyrine ; C : caroténoïde ; Qs : diphenylbenzoquinone.

Les aquaporines sont des protéines transmembranaires qui forment des canaux permettant le passage de l'eau de part et d'autre de la membrane. Des contraintes stériques et électrostatiques permettent de s'assurer que seules les très petites molécules (de l'ordre de 0,2 à 0,3 nm) non chargées puissent emprunter ces pores, ce qui permet d'éviter le passage d'ions ou de plus grosses molécules, et ainsi de conserver la sélectivité de la perméabilité membranaire [242,258]. Une membrane biomimétique incluant des aquaporines forme ainsi une alternative aux membranes de filtration utilisées pour la purification d'eau (**Figure 31**). Le principe de ces membranes est de constituer une réserve d'eau potable à partir d'une eau trouble, en filtrant les impuretés par le biais de membranes de porosité sélective comme précédemment décrit. Là encore, par rapport aux membranes synthétiques, les modèles membranaires biomimétiques se démarquent par leur forte efficacité, bien que limitée par leur faible stabilité [258,265,266].





**Figure 31.** Représentation schématique d'une membrane biomimétique réincorporant des aquaporines (Figure adaptée de [242]).

## 4.2. Les différents modèles membranaires biomimétiques

Parmi les différentes classes de membranes biomimétiques, on retrouve les monocouches, les systèmes vésiculaires, les bicouches qui reposent directement sur un support et enfin, les bicouches attachées et espacées du support ou tBLM (pour « *tethered-Bilayer Lipid Membranes* ») [267–269].

Les monocouches sont historiquement les premiers modèles développés pour l'étude des membranes et des lipides [269–271]. Elles sont formées par l'étalement de lipides une interface air-eau. Le caractère amphiphile des lipides va conduire à l'orientation de leurs têtes polaires vers la phase aqueuse et de leurs queues hydrophobes vers la phase gazeuse [269]. L'utilisation de barrières mobiles permet la formation de la monocouche et l'étude de son interaction avec des molécules solubles injectées en sous-phase selon deux modes d'analyse : à surface constante, en mesurant l'évolution de la pression induite par l'interaction des molécules, ou à pression constante en mesurant l'évolution de la surface. Cependant, bien que ces monocouches soient adaptées à l'étude de l'interaction de protéines membranaires périphériques qui n'ont besoin que d'un seul feuillet pour s'insérer, elles ne sont pas adaptées à la reconstitution de protéines transmembranaires.

Les systèmes vésiculaires, comprenant les liposomes, constituent un modèle simple de membranes cellulaires, en sus de leur importance déjà mentionnée dans la délivrance de médicaments. Etant constitués de lipides, leur étude permet de

mieux comprendre les propriétés physico-chimiques et l'implication fonctionnelle de la fraction lipidique des membranes biologiques [267,268,272]. Leur utilisation permet d'étudier leur interaction avec des protéines ou d'autres classes de molécules membranaires. De plus, les liposomes représentent une solution adaptée pour la reconstitution de protéines transmembranaires. De tels liposomes, alors qualifiés de protéoliposomes, représentent une plateforme idéale pour l'étude de ces protéines, en leur fournissant un environnement membranaire capable de reproduire leur environnement natif permettant de préserver leur intégrité structurale et fonctionnelle [273–275].

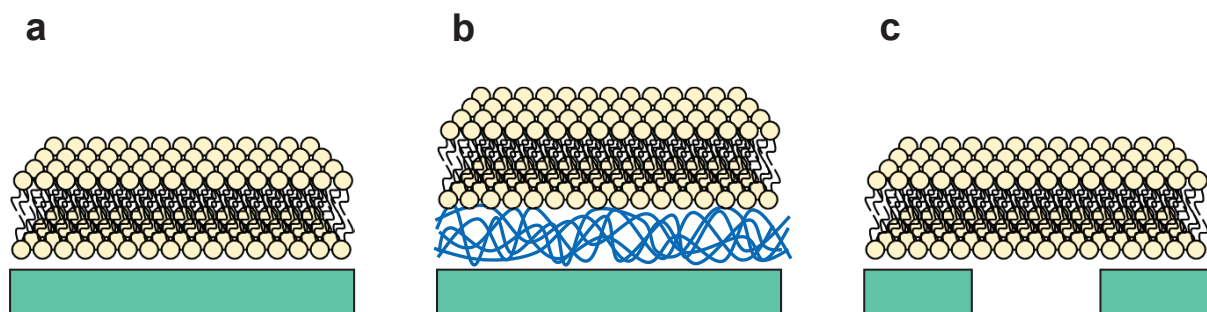
Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés plus en détail aux modèles membranaires biomimétiques plans. Ces derniers possèdent de nombreux avantages, notamment en termes de méthodes de caractérisation disponibles ; ces méthodes étant inaccessibles aux modèles vésiculaires ou en monocouche. De plus, notre étude s'est appuyée sur l'expertise acquise au laboratoire sur ces modèles. Les deux prochaines parties traiteront des deux principales catégories de bicouches biomimétiques planes, constituées de bicouches reposant directement sur un support et de bicouches attachées mais découplées du support (ou tBLM) [275].

#### 4.2.1. Modèles de bicouches supportées

Parmi les modèles de bicouches planes reposant directement sur un support, on retrouve les bicouches supportées ou SLB (pour « *Supported Lipid Bilayer* »), les bicouches suspendues et les bicouches amorties par un polymère [276–278]. Ces modèles, représentés **Figure 32**, ont comme propriétés communes de conserver la diffusion latérale des lipides et de reproduire les propriétés physico-chimiques des membranes.

Les bicouches supportées représentent le modèle le plus simple, où une bicouche lipidique repose sur un support solide [278–282] (**Figure 32a**). Leur formation repose le plus souvent sur l'utilisation de vésicules lipidiques qui fusionnent ou éclatent pour former spontanément une bicouche lipidique lors du réarrangement des lipides et de leur auto-assemblage pour limiter les interactions hydrophobes-hydrophiles [280,281]. Les SLB sont alors séparées du support par une fine pellicule

d'eau de l'ordre de quelques nanomètres, ce qui permet à la bicouche de ne pas être totalement fixée au support et aux lipides de conserver leur mobilité [283,284]. Bien qu'elles permettent la réinsertion de protéines membranaires périphériques, elles ne sont pas adaptées à la reconstitution de protéines membranaires possédant de larges ectodomains, la couche aqueuse entre la bicouche lipidique et le support n'étant pas suffisamment importante. De plus, les déformations et les ondulations dynamiques de la membrane sont en partie limitées par la proximité avec le support.



**Figure 32.** Bicouches biomimétiques planes reposant directement sur un support.

- a. SLB (pour « *Supported Lipid Bilayer* »).
- b. Bicouche amortie par un coussin de polymère.
- c. Bicouche suspendue.

Pour remédier à ces défauts, des systèmes alternatifs ont été développés. C'est notamment le cas des bicouches suspendues, formées au-dessus d'un support percé de pores nanométriques [277,285] (**Figure 32b**). Ces systèmes permettent à la fois de reconstituer des protéines transmembranaires avec de larges ectodomains, mais également d'étudier les fluctuations conformationnelles des protéines reconstituées sans implication des perturbations liées à la présence du support. Cependant, ces modèles sont peu stables dans le temps et ne sont pas adaptés aux méthodes de détection sensibles aux modifications de la surface [286]. Ces modèles sont ainsi davantage destinés à l'imagerie par fluorescence ou à des méthodes de détection électrochimiques, ce qui les rend idéales pour l'étude de canaux ioniques.

En parallèle, des modèles de bicouches amorties reposant sur un coussin de polymère hydrophile ont été développés (**Figure 32c**). Ces coussins sont formés d'un assemblage dynamique qui mime les déformations et la malléabilité du milieu intracellulaire qui soutient les membranes biologiques. Cela permet à de tels systèmes de sonder des processus dynamiques tels que la déformation des membranes ou les réarrangements lipidiques et protéiques des membranes lors d'évènements particuliers [276,287–289]. Ces modèles permettent également la reconstitution de protéines transmembranaires possédant des ectodomains, le polymère de soutien étant déformable autour de ces derniers. En revanche, le contact étroit du support avec le coussin de polymère limite les études d'interaction de surface, ce qui limite les perspectives d'utilisation de ces modèles dans le cadre d'études d'interaction protéine/membrane ou de la protéine membranaire avec son ligand.

La formation de bicouches amorties ou suspendues est réalisée de manière similaire aux SLB, par fusion de liposomes, respectivement au-dessus d'un support recouvert d'un coussin de polymère ou d'un support poreux. Il est à noter que dans le cas de bicouches amorties, la formation du coussin de polymère peut être effectuée soit avant celle de la bicouche, qui est alors formée au-dessus du coussin, soit après, par injection en-dessous de la bicouche et gonflement [289]. Enfin, une autre méthode de formation de bicouches lipidiques consiste à assembler deux monocouches en les déposant l'une sur l'autre par la technique de Langmuir-Blodgett [290].

#### 4.2.2. Bicouches attachées et espacées

Une autre alternative aux modèles précédemment présentés est la formation de bicouches attachées à un support, mais également espacées par un compartiment aqueux (tBLM). Ces modèles sont une solution idéale pour la reconstitution de tous types de protéines transmembranaires, le compartiment aqueux sous la membrane fournissant l'espace nécessaire pour la réinsertion d'ectodomains protéiques [291–294].

La formation de ces membranes repose sur l'utilisation d'espaceurs entre le support et la membrane. De nombreux types existent, comme notamment des

espaceurs polymériques ou peptidiques [291]. L'attachement des espaceurs au support se fait généralement de deux manières : soit par un traitement préalable du support par une chimie de surface qui permet ensuite la fixation de l'espaceur, soit par l'établissement de liaisons spécifiques entre le support et l'espaceur [295]. D'autres systèmes d'espaceurs existent, comme un système avidine-biotine utilisant la très forte affinité entre ces deux molécules en accrochant une membrane comportant des lipides biotinylés à un support greffé de streptavidine, ou encore l'ancrage par des brins d'acides nucléiques complémentaires les uns aux autres [296,297]. Quant au support solide, on retrouve couramment le verre, le mica ou encore l'or, des matériaux pour lesquels il existe une chimie de surface développée, et pour lesquels de nombreuses techniques de caractérisation sont adaptées [295].

Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé un modèle de tBLM particulier, précédemment développé au laboratoire, qui repose sur l'utilisation de pilotis peptidiques, d'où le nom de pep-tBLM. Ce modèle sera plus amplement détaillé dans une prochaine partie, après la présentation des différentes techniques associées aux membranes biomimétiques planes.

### **4.3. Méthodes de caractérisation des bicouches biomimétiques planes**

De nombreuses méthodes d'analyse des membranes biomimétiques planes existent [298–300]. Le choix de la méthode à employer se fait en fonction du type de membrane biomimétique utilisée et de l'objet d'étude, mais le principal intérêt recherché reste généralement une bonne résolution en z, une membrane pouvant recouvrir une large surface mais ne faisant que quelques nanomètres d'épaisseur. On peut généralement résumer l'étude de membranes biomimétiques à deux principaux objectifs : étudier la membrane, ses lipides et leurs propriétés ou étudier des protéines membranaires, leur insertion, leur conformation et leur activité.

Les modèles membranaires biomimétiques permettent l'utilisation de méthodes physiques sondant la membrane. Ces méthodes se démarquent de par leur grande précision et l'absence de marquage, mais ne sont pas disponibles pour des échantillons en solution [298]. Parmi elles, la microscopie à force atomique (AFM)

permet d'imager la surface de la membrane, et ainsi d'évaluer sa qualité (homogénéité et continuité), de suivre des phénomènes de ségrégation lipidique et la formation de domaines, ou encore de mesurer certaines propriétés membranaires, comme par exemple leur viscoélasticité [301]. La microbalance à cristal de quartz avec suivi de la dissipation ou QCM-D (pour « *Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring* ») est une autre technique physique, qui permet de mesurer une variation de masse et d'en évaluer ses propriétés viscoélastiques [302]. Cette méthode permet à la fois d'étudier quantitativement la formation d'une membrane biomimétique sur une surface donnée, mais permet également d'évaluer l'interaction entre une protéine membranaire et une autre molécule en solution [303].

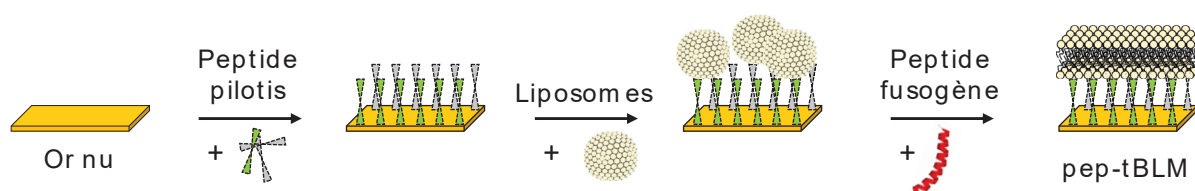
D'autres méthodes nécessitent un support solide, notamment celles basées sur la formation d'un champ électromagnétique évanescent, comme la résonance plasmonique de surface (SPR) ou la microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF). Ces méthodes permettent d'imager et de caractériser de manière très sensible un échantillon contenu dans une très fine tranche [304,305]. Dans le cas de bicouches biomimétiques planes, ces méthodes permettent ainsi l'étude précise des membranes, de leurs propriétés et de leur interaction avec diverses molécules d'intérêt. L'ellipsométrie est également une technique de choix dans l'étude des membranes. Cette méthode, basée sur la réflexion d'une lumière polarisée sur une surface plane, permet une caractérisation détaillée des modèles biomimétiques membranaires plans [306].

Enfin, l'étude topologique précise des membranes peut être réalisée par diffraction de rayons X ou de neutrons. Ces méthodes permettent de résoudre la structure atomique des membranes et de leurs constituants, et sont donc idéales pour étudier la conformation de protéines membranaires [307–310]. Ces méthodes sont adaptées à la fois à des systèmes plans, mais également à des modèles vésiculaires en solution.

## 4.4. Le modèle de bicouches biomimétiques développé au laboratoire

### 4.4.1. Présentation du modèle

Au cours de cette thèse, les bicouches biomimétiques utilisées ont été formées selon une technique développée, brevetée et caractérisée au cours des thèses des Dr Samuel REBAUD et Meriem CHADLI [311–313]. Cette méthode, qui permet la formation de bicouches lipidiques attachées et découplées du support, se distingue par sa capacité à intégrer des protéines transmembranaires volumineuses grâce à son espacement vis-à-vis de son support. Elle repose sur l'utilisation de liposomes, ce qui lui offre une grande flexibilité de compositions lipidiques. Le protocole expérimental de formation de bicouches biomimétiques est schématisé **Figure 33**.



**Figure 33.** Dispositif expérimental de formation de bicouches biomimétiques

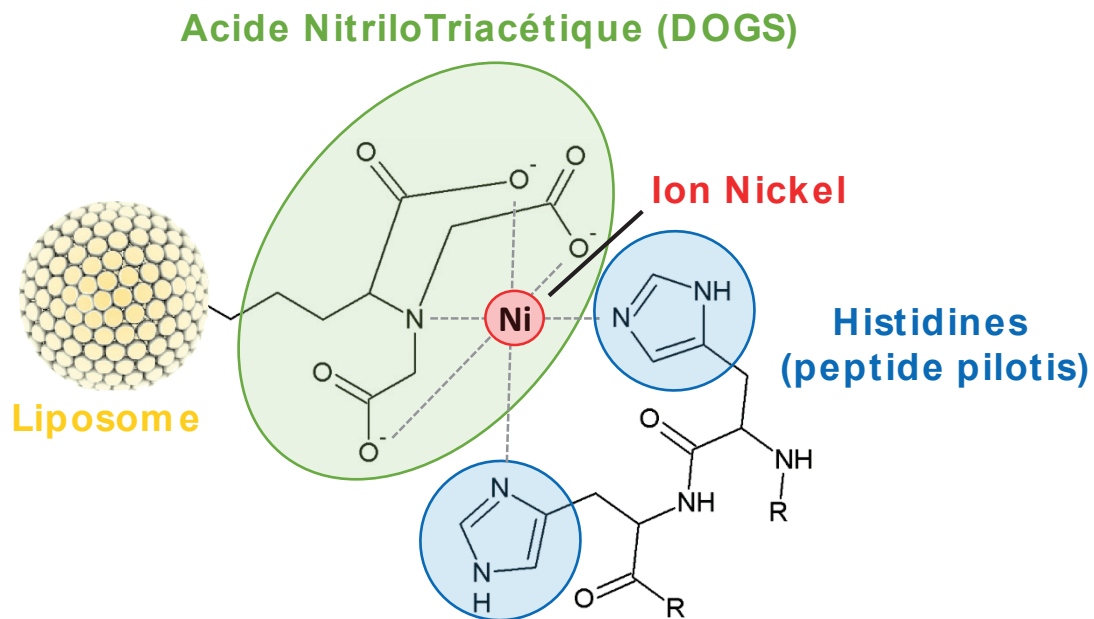
A la surface d'un substrat d'or est ajouté un peptide pilotis (P19-4H), qui s'ancre à la surface. Puis, l'ajout de liposomes enrichis en DOGS-NTA(Ni), un lipide lié à un atome de Nickel, va conduire à l'attachement des liposomes aux peptides pilotis. Enfin, l'ajout d'un peptide fusogène (PAH) va conduire à l'ouverture des liposomes et à la formation d'une bicouche lipidique plane reposant au-dessus des pilotis qui assurent son attachement mais également son découplage au support.

### 4.4.2. Description du peptide pilotis

Le peptide pilotis (P19-4H) s'articule en trois parties :

- Une extrémité N-terminale comportant un résidu Cystéinyle.
- Une hélice alpha intermédiaire (Ser-Arg-Ala-Arg-Lys-Gln-Ala-Ala-Ser-Ile-Lys-Val-Ala-Val-Ser-Ala-Asp-Arg).
- Une extrémité C-terminale composée de quatre résidus Histidinyles.

La fixation du peptide se fait *via* l'atome de soufre du résidu Cystéinyle N-terminal, qui établit une liaison de coordination avec la surface d'or. Puis, l'ajout de liposomes enrichis en DOGS-NTA(Ni), un lipide lié à un atome de Nickel, va conduire à la chélation de cet ion Nickel par les 4 résidus Histidinyles présents à l'extrémité C-terminale du peptide pilotis comme schématisé **Figure 34**. Cette chélation va avoir pour conséquence l'attachement des liposomes aux peptides pilotis.



**Figure 34.** Chélation entre le DOGS-NTA(Ni) et le peptide pilotis (P19-4H), adapté de [311].

#### 4.4.3. Description du peptide fusogène

Le peptide AH, décrit par N.J. CHO et *al.*, provient de l'extrémité N-terminale de la protéine Non-Structurale 5A (NS5A) du virus de l'hépatite C [314]. Sa séquence d'acides aminés (Ser-Gly-Ser-Trp-Leu-Arg-Asp-Val-Trp-Asp-Trp-Ile-Cys-Thr-Asp-Phe-Lys-Thr-Trp-Leu-Gln-Ser-Lys-Leu-Asp-Tyr-Lys-Asp) lui confère une structure tridimensionnelle en hélice amphipathique. De nombreuses études se sont penchées sur l'utilisation de ce peptide pour ses capacités à faire s'ouvrir les membranes vésiculaires, en ayant une implication dans la recherche de molécules antivirales mais également dans la préparation de modèles membranaires biomimétiques. Dans ce contexte, les études ont montré que le peptide fusogène agissait en s'insérant dans les membranes de vésicules, les déstabilisant et



provoquant leur gonflement par arrivée d'eau avant rupture de la membrane et fusion des vésicules [314–316]. Il apparaît que le peptide fusogène, une fois inséré, agirait en formant des pores à travers la membrane, qui constitueraient le point de départ de la rupture membranaire. De plus, il apparaît que la présence d'un rayon de courbure élevé soit un élément crucial pour l'action du peptide fusogène, des études ayant montré qu'il n'agit que faiblement et de manière incomplète sur de grosses vésicules micrométriques et qu'il ressort de la membrane qu'il fait s'ouvrir lorsque cette dernière devient plane.

#### 4.4.4. Enjeux soulevés dans cette thèse

La formation de ces bicouches a déjà été caractérisée par imagerie par résonance plasmonique de surface (SPRi), par FRAP et par AFM. De plus, l'utilisation de protéoliposomes a permis de montrer que ce modèle est adapté à la réinsertion de protéines membranaires complexes, en réalisant une bicouche biomimétique réincorporant la protéine CXCR4 fonctionnelle, un récepteur couplé aux protéines G qui possède sept passages transmembranaires [275,311].

Dans le cadre de cette thèse, ce modèle a été étudié dans le but de caractériser l'interaction liposome-membrane et d'évaluer l'impact des changements de la composition lipidique et des propriétés membranaires sur cette interaction. Pour cela, nous avons cherché d'une part à appliquer des techniques de caractérisation jamais utilisées sur ce système, et d'autre part à recréer un modèle membranaire biomimétique à partir de lipides naturels extraits.

# MATÉRIEL ET METHODES

## 1. Instrumentation et réactifs

### 1.1. Réactifs

#### 1.1.1. Lipides

Tous les lipides proviennent d'Avanti Polar Lipids :

**CHOL** Cholestérol

**DAPC** 1,2-diarachidoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine,  $T_m = 66^\circ\text{C}$

**DLPC** 1,2-dilinoléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine,  $T_m = -57^\circ\text{C}$

**DLaPC** 1,2-dilauroyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine,  $T_m = -2^\circ\text{C}$

**DMPC** 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine,  $T_m = 24^\circ\text{C}$

**DOGS-NTA(Ni)** « 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-[(*N*-(5-amino-1-carboxyoentyl) iminodiacetic acid) succinyl] Nickel salt »

**DOPC** 1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine,  $T_m = -17^\circ\text{C}$

**DOPE** 1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidyléthanolamine,  $T_m = -16^\circ\text{C}$

**DPPC** 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine,  $T_m = 41^\circ\text{C}$

**DSPC** 1,2-distéaroyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine,  $T_m = 55^\circ\text{C}$

**POPC** 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine,  $T_m = -4^\circ\text{C}$

**DPPT** 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphothioéthanol

**NBD-PE** N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)-1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidyléthanolamine,  $\lambda_{\text{max}}$  excitation = 460 nm,  $\lambda_{\text{max}}$  émission = 535 nm

**Rhod-PE** N-(lissamine Rhodamine B sulfonyl)-1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-Phosphatidyléthanolamine,  $\lambda_{\text{max}}$  excitation = 560 nm,  $\lambda_{\text{max}}$  émission = 583 nm

**SM** Mélange de sphingomyélines extraites de cerveaux de porcs

#### 1.1.2. Peptides

**Peptide pilotis** P19-4H

Smartox Biotechnology

Séquence : CSRARKQAASIKVAVSADRHHHH

**Peptide fusogène** PAH

Smartox Biotechnology

Séquence : SGSWLRDVWDWICTVLTDFKTWLQSKLDYKD

### 1.1.3. Solvants

<b>Chloroforme</b>	Sigma-Aldrich
<b>Dichlorométhane</b>	Sigma-Aldrich
<b>DMSO</b> DiMéthylSulfOxyde	Sigma-Aldrich
<b>Ethanol</b>	Sigma-Aldrich
<b>Méthanol</b>	Sigma-Aldrich

### 1.1.4. Produits chimiques

<b>Dithionite de Sodium</b>	Sigma-Aldrich
<b>Glycine</b>	Sigma-Aldrich
<b>HEPES</b> Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique	Sigma-Aldrich
<b>KCl</b> Chlorure de potassium	Prolabo
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b> Phosphate	Prolabo
<b>Lactate</b>	Sigma-Aldrich
<b>MgSO<sub>4</sub></b> Sulfate de Magnésium	Prolabo
<b>NaCl</b> Chlorure de Sodium	Prolabo
<b>NAD<sup>+</sup></b> Nicotinamide Adénine Dinucléotide	Sigma-Aldrich
<b>NADPH, H<sup>+</sup></b> Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate	Roche
<b>PBS</b> <i>Phosphate Buffered Saline</i>	PanReac Applichem
<b>pNPP</b> <i>para</i> -NitroPhényl Phosphate	Sigma-Aldrich
<b>Saccharose</b>	Prolabo
<b>Tris-HCl</b> tris(hydroxyméthyl)aminométhane	Merck
<b>Triton X-114</b>	Prolabo

### 1.1.5. Tampons utilisés

#### **Tampon de travail en SPRI**

Tampon HEPES 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4.

#### **Tampon de préparation des liposomes**

Tampon phosphate salin ou PBS (pour « *Phosphate Buffered saline* ») phosphate 10 mM, KCl 2,7 mM, NaCl 137 mM, pH 7,4.

#### **Tampon de préparation des liposomes en absence de sels**

Tampon HEPES 50 mM, pH 7,4.

### **Tampon de saccharose pour centrifugation isopycnique**

Tampon Tris-HCl 20 mM, NaCl 40 mM, KCl 100 mM, MgSO<sub>4</sub> 5 mM contenant des quantités de saccharose variant de 0,25 M à 1,5 M, pH 7,6.

### **Tampon de mesure de l'activité de la Cytochrome C oxydase**

Tampon phosphate 50 mM, pH 7,8.

### **Tampon de mesure de l'activité de la Cytochrome C NADPH Réductase**

Tampon phosphate 300 mM, pH 7,8.

### **Tampon de mesure de l'activité de la Lactate Déshydrogénase**

Tampon glycine 100 mM, pH 9.

### **Tampon de mesure de l'activité de la Phosphatase Alcaline**

Tampon Tris-HCl 100 mM, pH 8,3.

## **1.2. Culture cellulaire**

### **1.2.1. Cellules**

**Lignées WPMY-1, LNCaP et HCT-116**

ATCC

**Lignées C4-2B et PC-3**

Don du Dr Olivier Cuvillier (IPBS, Toulouse)

**Fibroblastes**

Don du Laboratoire des Substituts Cutanés

### **1.2.2. Réactifs et milieux de culture**

**Amphotéricine B**

Sigma-Aldrich

**« Cytotoxicity Detection Kit »**

Sigma-Aldrich

**Docétaxel**

Sigma-Aldrich

**Milieu de culture « DMEM »** *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

Sigma-Aldrich

**Milieu de culture McCoy's 5A**

Sigma-Aldrich

**Milieu de culture « RPMI »** *Roswell Park Memorial Institute*

Sigma-Aldrich

**Pénicilline/Streptomycine**

Sigma-Aldrich

**SVF** Sérum de Veau Foetal

Sigma-Aldrich

**Trypsine + EDTA**

Sigma-Aldrich

### 1.3. Instrumentation

<b>Appareil de DLS</b> <i>Zetasizer NanoZS</i>	Malvern Instruments
<b>Appareil de QCM-D</b> <i>Q-sense E4</i>	Q-sense
<b>Appareil de SPRi</b> <i>Horiba SPRi Lab+</i>	Horiba
<b>Centrifugeuse</b> <i>Mutlifuge 3 LR</i>	Heraeus
<b>Évaporateur rotatif</b> <i>Rotavapor R-111</i>	BUCHI
<b>Incubateur</b> <i>Forma Series II water jacketed CO2 Incubator</i>	Thermo Scientific
<b>Lecteur de plaques</b> <i>Infinite M200</i>	TECAN
<b>Microscope de BALM</b> <i>Axiovert 40 MAT</i>	Zeiss
<b>Microscope d'épifluorescence</b> <i>Axio Observer Z1</i>	Zeiss
<b>Poste de sécurité microbiologique</b> <i>HF safe 900</i>	Heal Force
<b>Sonicateur</b> <i>Sonopulse GM70</i>	BANDELIN
<b>Spectrofluorimètre pour l'étude du Dioll</b> <i>FP 8500</i>	Jasco
<b>Spectrophotomètre pour le dosage d'ADN</b> <i>NanoPhotometer N60</i>	IMPLEN
<b>Système d'eau ultra-pure</b> <i>Purelab option-Q</i>	Véolia
<b>Système d'extrusion</b> <i>Mini-Extruder</i>	Avanti Polar Lipids
<b>Ultracentrifugeuse</b> <i>OPTIMA™ LE-80K</i>	Beckmann-Coulter

### 1.4. Matériel

<b>Colonnes de dessalage</b> <i>Sephadex G-25 in PD-10 Desalting Columns</i>	GE Healthcare Life Sciences
<b>Lames pour la BALM</b>	Watch Live
<b>Membranes d'extrusion</b> <i>Nucleopore 100/400 nm</i>	Whatman
<b>Plaques multipuits pour culture cellulaire</b> <i>Plaques 12/24/96 puits</i>	Falcon
<b>Plaques multipuits pour mesure au lecteur de plaques</b> <i>Plaques 96 puits</i>	Greiner
<b>Préfiltres d'extrusion</b> <i>Drain discs 10 mm</i>	Whatman
<b>Prisme de SPRi</b> <i>SPRi Biochip</i>	Horiba

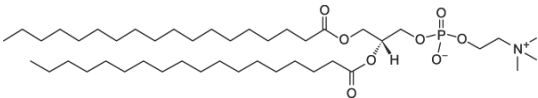
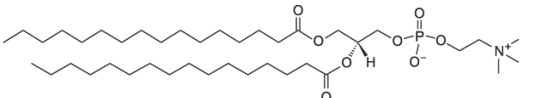
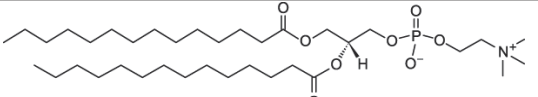
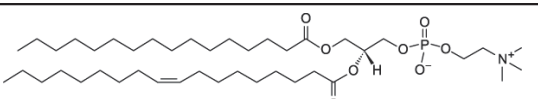
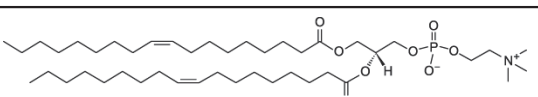
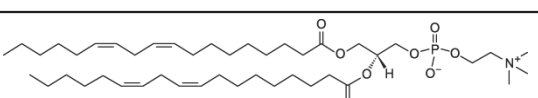
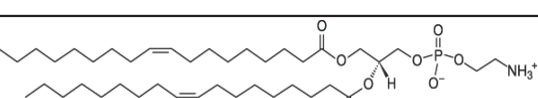
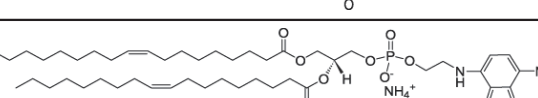
### 1.5. Logiciels

<b>AxioVision</b>	Zeiss
<b>ImageJ</b>	National Institutes of Health

## 2. Préparation et caractérisation de liposomes

### 2.1. Compositions lipidiques utilisées

La composition lipidique est le principal élément qui va déterminer les propriétés physicochimiques d'un liposome, les lipides étant les constituants de base des bicouches lipidiques. Deux principaux types de compositions lipidiques ont été utilisés, des compositions à base de phosphatidylcholine (PC) et de DOPE couvrant une large gamme de fluidité membranaire, ainsi que des compositions enrichies en DOGS-NTA permettant la formation de bicouches lipidiques biomimétiques. Ces dernières sont présentées dans la partie dédiée au dispositif expérimental de formation des bicouches lipidiques biomimétiques (4.1.1., page 118).

Taux	Lipide	Acides gras	Tm (°C)	
78 %	DSPC		18:0 PC	55
	DPPC		16:0 PC	41
	DMPC		14:0 PC	24
	POPC		16:0, 18:1 PC	-4
	DOPC		18:1( $\Delta^9$ ) PC	-17
	DLPC		18:2 ( $\Delta^{9,12}$ ) PC	-57
20 %	DOPE		18:1( $\Delta^9$ ) PE	-16
2 %	NBD-PE		18:1( $\Delta^9$ ) PE	-20

**Tableau 2.** Détail des compositions lipidiques utilisées pour la formation d'une gamme de fluidité membranaire de liposomes.

La formation d'une gamme de fluidité membranaire liposomale a été réalisée en utilisant plusieurs phosphatidylcholines, de longueur et de saturation de chaînes acyles variées. Ces compositions ont été enrichies de DOPE, un lipide fusogénique du fait de sa géométrie conique. Celle-ci participe à la déstabilisation locale de la membrane et à la formation de phases hexagonales inverses favorisant la survenue de phénomènes de fusion membranaire [317,318]. Le détail et la structure des lipides utilisés sont détaillés dans le **Tableau 2**.

## 2.2. Protocole de préparation

### 2.2.1. Séchage

La préparation des liposomes commence par la formation d'un film lipidique. Les lipides en solution dans du chloroforme sont prélevés à l'aide de seringues en verre, et introduits à la concentration choisie dans un ballon en verre. La masse lipidique est généralement comprise entre 1 et 5 mg. Le volume total du ballon est ajusté à au moins 500  $\mu\text{L}$  par ajout de chloroforme, afin de garantir la formation d'un film fin et homogène. Le chloroforme est ensuite évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif pendant 10 minutes, sous vide en chauffant au bain-marie à une température supérieure à la température de transition de phase ( $T_m$ ) des lipides.

### 2.2.2. Resuspension en milieu aqueux

La formation des liposomes est basée sur l'auto-assemblage des phospholipides en vésicules lamellaires lorsqu'ils sont mis en contact avec un milieu aqueux par effet hydrophobe. Cela est dû au caractère amphiphile des phospholipides, ces derniers comportant une tête polaire composée d'un ester de phosphoglycérol portant un groupe variable (choline, éthanolamine, sérine, inositol) et de deux queues hydrophobes constituées de chaînes d'acides gras estérifiés sur le glycérol. Au contact d'une phase aqueuse, les phospholipides vont alors former une bicouche lipidique autour d'un cœur hydrophile.

Après ajout d'un tampon aqueux, les ballons sont chauffés au-dessus de la température de transition de phase des lipides et agités. Le film lipidique va alors

gonfler et l'agitation mécanique du ballon va aboutir à la formation de Vésicules MultiLamellaires (MLV) possédant une ou plusieurs lamelles et des tailles variées.

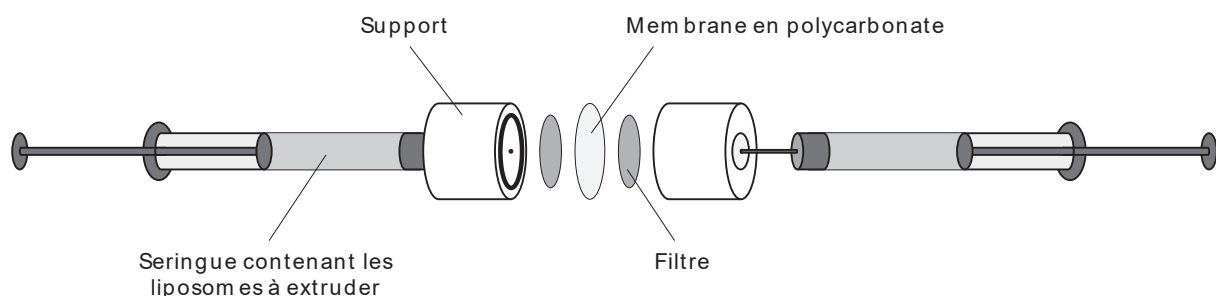
### 2.2.3. Cycles de congélation/décongélation

L'application d'une succession de 6 cycles de congélation/décongélation va, en fragilisant progressivement les différentes bicouches, conduire à la formation de Vésicules UniLamellaires (LUV) de tailles variables. Ces cycles sont réalisés dans de l'azote liquide de la manière suivante :

- 5 minutes dans l'azote liquide pour congeler rapidement les solutions liposomales ;
- 10 minutes dans un bain-marie à 37°C pour décongeler les solutions ;
- 1 minute d'agitation mécanique au vortex afin d'homogénéiser les préparations.

### 2.2.4. Extrusion

Afin de calibrer la taille des liposomes préparés, les préparations sont ensuite extrudées. Pour cela, l'application d'une force mécanique va forcer les liposomes à passer à travers une membrane de porosité fixe située entre deux seringues contiguës. Le chauffage des préparations assure que les lipides composant les liposomes soient dans un état fluide, ce qui facilite la déformation et la réduction de la taille des liposomes à celle des pores de la membrane. Cela permet de préparer des liposomes unilamellaires de taille uniforme, à partir d'une population de tailles variables. Le schéma du dispositif expérimental est représenté sur la **Figure 35**.



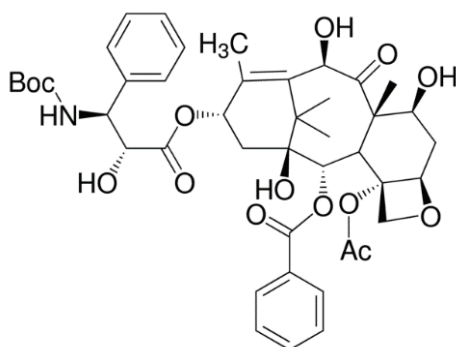
**Figure 35.** Schéma du montage expérimental de l'extrudeur (Adapté d'*Avanti Polar Lipids* [319]).



En plus de la membrane poreuse de polycarbonate, deux filtres, un de chaque côté, permettent de limiter le passage d'impuretés et d'agrégats. Une fois le système assemblé, 5 passages de tampon permettent d'humidifier le système. Puis, chaque préparation est extrudée 21 fois avec une membrane de 400 nm de porosité. Entre chaque extrusion, 5 passages de tampon permettent d'éliminer le surplus de liposomes. Puis, une fois les préparations extrudées à 100 nm, le dispositif est démonté, nettoyé à l'éthanol et à l'eau distillée, puis remonté avec 2 nouveaux préfiltres et une membrane de 100 nm de porosité. Les solutions liposomales sont une nouvelle fois extrudées, puis stockées à 4°C à l'abri de la lumière.

### 2.2.5. Encapsulation de principes actifs

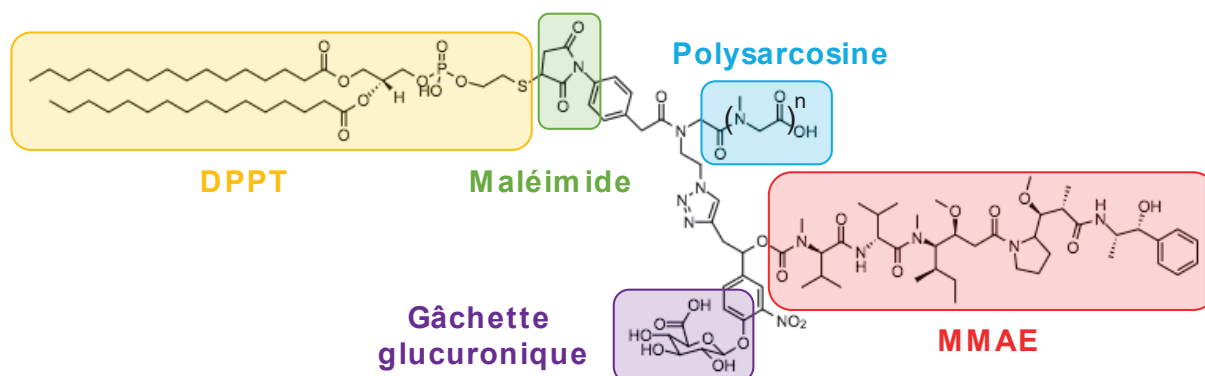
Plusieurs molécules ont été encapsulées dans des liposomes : le DTX (docétaxel), la MMAE (pour « *Monomethyl auristatin E* ») et le 5-FU (pour 5-FluoroUracile). Le DTX (**Figure 36**) est un agent antitumoral qui agit en inhibant la dépolymérisation des microtubules. La préparation de liposomes encapsulant du DTX a été réalisée en ajoutant du DTX préalablement dilué dans du DMSO au tampon de resuspension du film lipidique séché. Une gamme de concentration a été réalisée, correspondant à des concentrations finales sur les cellules comprises entre 1 nM et 1 µM.



**Figure 36.** Structure du DTX.

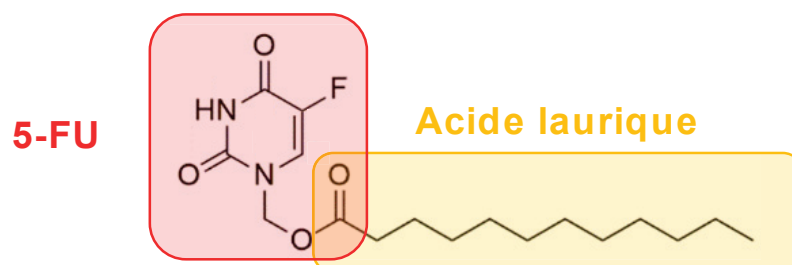
La MMAE a été greffée à une molécule de DPPT (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphothioéthanol) dans le cadre d'une collaboration avec le Pr Benoît JOSEPH (ICBMS - UMR CNRS 5246 - Equipe SMITh) et le Dr Warren VIRICEL (Mablink Bioscience). La MMAE utilisée est également accompagnée d'une polysarcosine, un composé hydrophile qui permet de stabiliser en milieu aqueux la molécule de

MMAE (cette dernière étant relativement hydrophobe), ainsi que d'une « gâchette » constituée d'un acide glucuronique qui permet, *in vivo*, le clivage et la libération de la MMAE. Ici, la MMAE a été couplée avec une molécule de DPPT par le biais d'une fonction maléimide, pour former le composé DPPT-MMAE représenté **Figure 37**.



**Figure 37.** Structure de la DPPT-MMAE.

Le 5-FU utilisé est un dérivé greffé d'une chaîne d'acide gras à 12 carbones (acide laurique), synthétisé par le Dr Giovana LOLLO (LAGEPP - UMR CNRS 5007 - Equipe GePharm) pour former le composé 5-FU-C12 (**Figure 38**). Ce dernier a montré son efficacité dans la délivrance à des cellules de cancer du côlon [320].

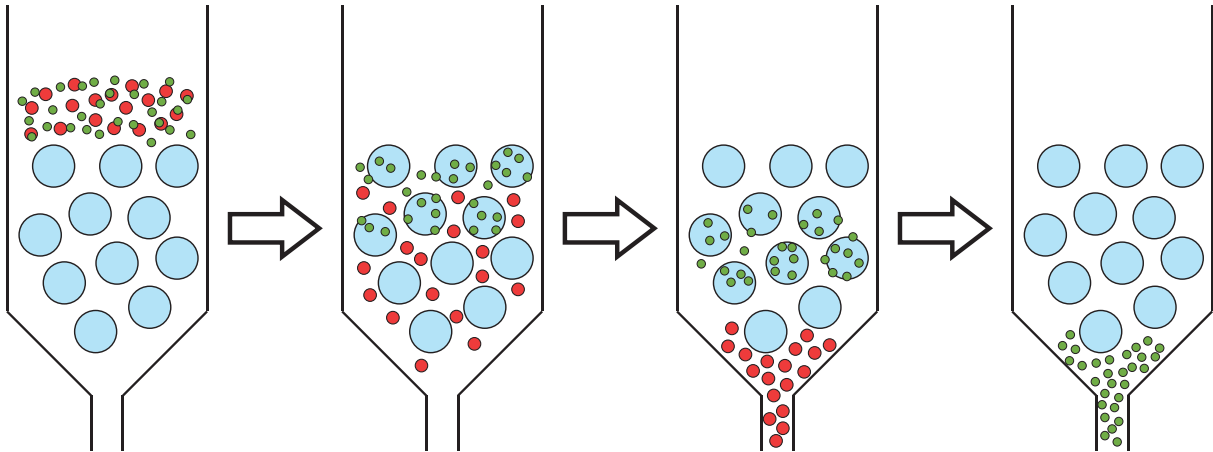


**Figure 38.** Structure du 5-FU-C12.

### 2.2.6. Séparation sur colonne par chromatographie d'exclusion stérique

Lors de la préparation de liposomes encapsulant des molécules, toutes les molécules ne se retrouvent pas encapsulées dans les liposomes ; une partie est toujours en solution dans le tampon. Afin d'éliminer ces molécules libres et ainsi de ne conserver que les molécules encapsulées à l'intérieur des liposomes, une chromatographie d'exclusion stérique SEC (« *Steric Exclusion Chromatography* »)

a été réalisée. Cette méthode utilise des colonnes emplies de gel formant des billes poreuses. Elle permet la séparation de particules en fonction de leur taille. Alors que les grosses particules vont être directement éluées dans le volume mort de la colonne, les petites vont être retardées par les billes poreuses (**Figure 39**).



**Figure 39.** Représentation schématique de la séparation opérée par SEC. Les liposomes sont représentés en rouge, les molécules libres en vert et les billes poreuses par les ronds bleus.

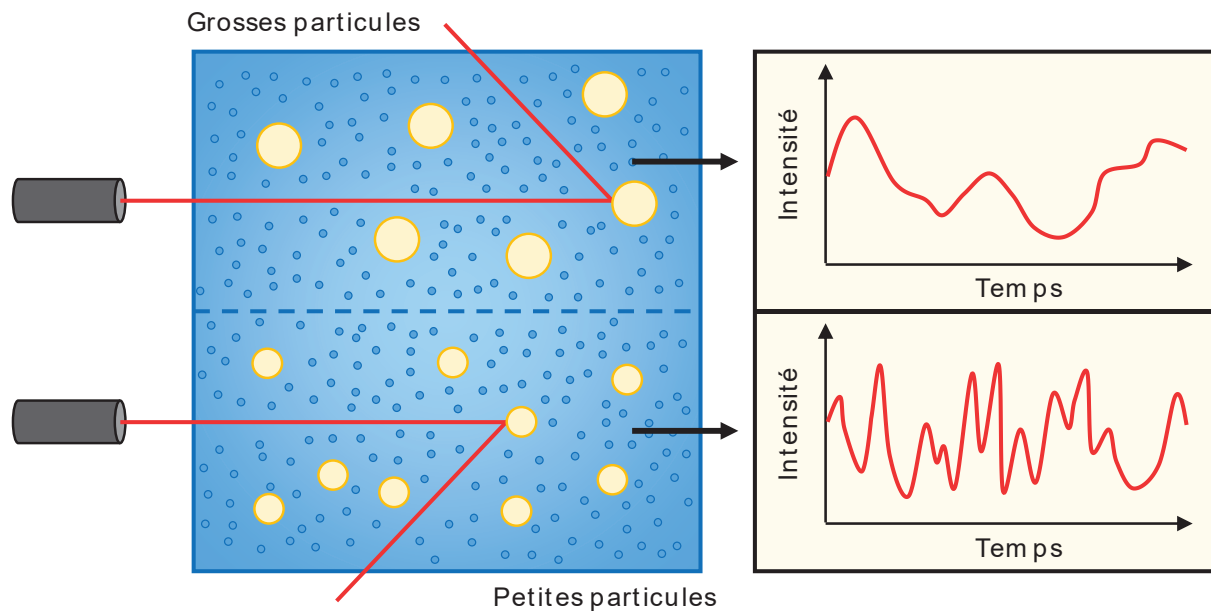
Les colonnes sont équilibrées par le passage de 10 mL de tampon. Puis, l'échantillon à séparer est déposé au sommet de la colonne, et l'on commence à récolter l'éluat. L'échantillon est élué par ajouts successifs de 1 mL de tampon, en changeant de fraction à chaque nouvel ajout. Après utilisation, les colonnes sont régénérées par le passage de 30 mL de tampon frais.

## 2.3. Caractérisation des liposomes

### 2.3.1. Suivi de la taille et de la stabilité

La caractérisation de la taille et de l'indice de polydispersité (PDI pour « *PolyDispersity Index* ») des liposomes préparés a été réalisée par diffusion dynamique de la lumière DLS (« *Dynamic Light Scattering* »), en collaboration avec le Dr Giovana Lollo (LAGEPP - UMR CNRS 5007 - Equipe GePharm). Cette méthode se base sur le mouvement brownien, le mouvement aléatoire inhérent à toute particule immergée dans un liquide, basé sur les chocs entre la particule et les petites molécules du solvant. La DLS utilise un faisceau laser polarisé traversant la

solution contenant les particules à mesurer. La mesure de la diffusion du faisceau par les particules va ainsi permettre de déterminer la taille des particules, l'intensité diffusée par une petite particule variant plus vite que celle diffusée par des particules plus larges (**Figure 40**). Un modèle mathématique permet alors d'obtenir le diamètre hydrodynamique des particules présentes en fonction de la diffusion observée.



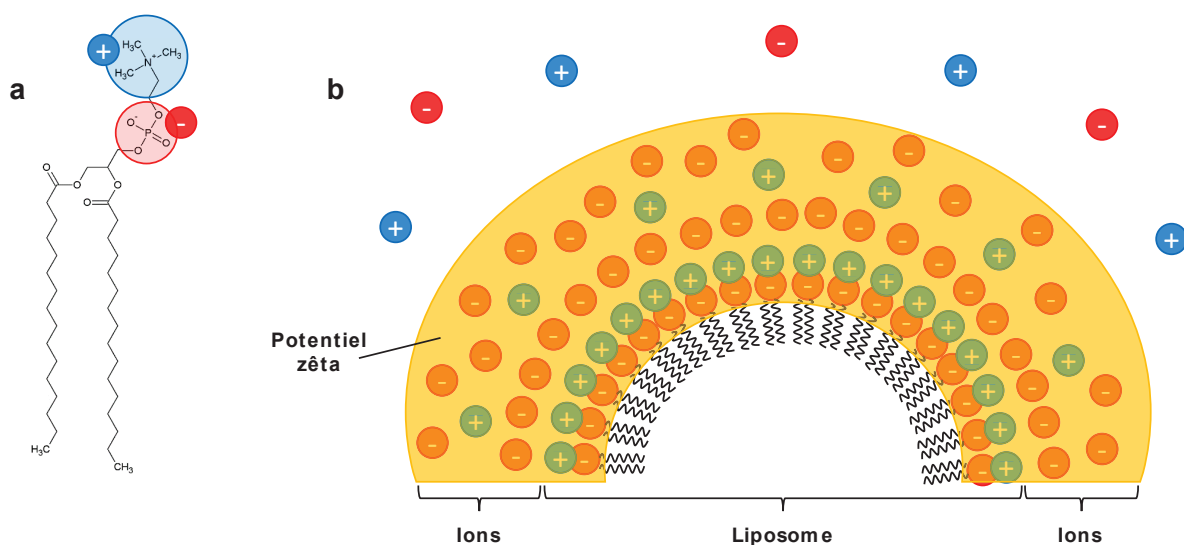
**Figure 40.** Principe de la diffusion dynamique de la lumière (DLS). En haut, pour des grosses particules, l'intensité diffusée varie lentement ; en bas, pour des petites particules, l'intensité diffusée varie rapidement.

L'échantillon à analyser est placé tel quel dans une cuve en plastique et placé dans l'appareil de mesure. La taille et la polydispersité de chaque préparation sont mesurées juste après l'extrusion, puis après une, deux et trois semaines. Ces données permettent ainsi d'estimer la stabilité des préparations, en comparant l'évolution du diamètre moyen et du PDI sur 3 semaines.

### 2.3.2. Mesure de la charge de surface

La détermination de la charge de surface des liposomes a été réalisée en mesurant le potentiel zêta des préparations par DLS. Ce potentiel représente la charge électrique des liposomes en solution lorsqu'ils interagissent avec des ions. Quand

bien même les liposomes soient formés de lipides zwitterioniques, et donc de charge globale neutre, il existe au sein du liposome une séparation de charges. Les ions ammoniums des éthanolamines et des cholines sont ainsi exposés à la surface alors que les charges négatives des phosphates sont enfouies vers l'intérieur des liposomes (**Figure 41a**). Le potentiel zêta désigne ainsi la charge de la couche superficielle associée aux liposomes (**Figure 41b**). Ici, la mesure du potentiel zêta englobe les charges des lipides à la surface du liposome, la première couche de contre-ions négatifs au contact de la tête choline, et la deuxième couche de contre-ions plus équilibrés en termes de charge.



**Figure 41.** Potentiel zêta à la surface d'un liposome.

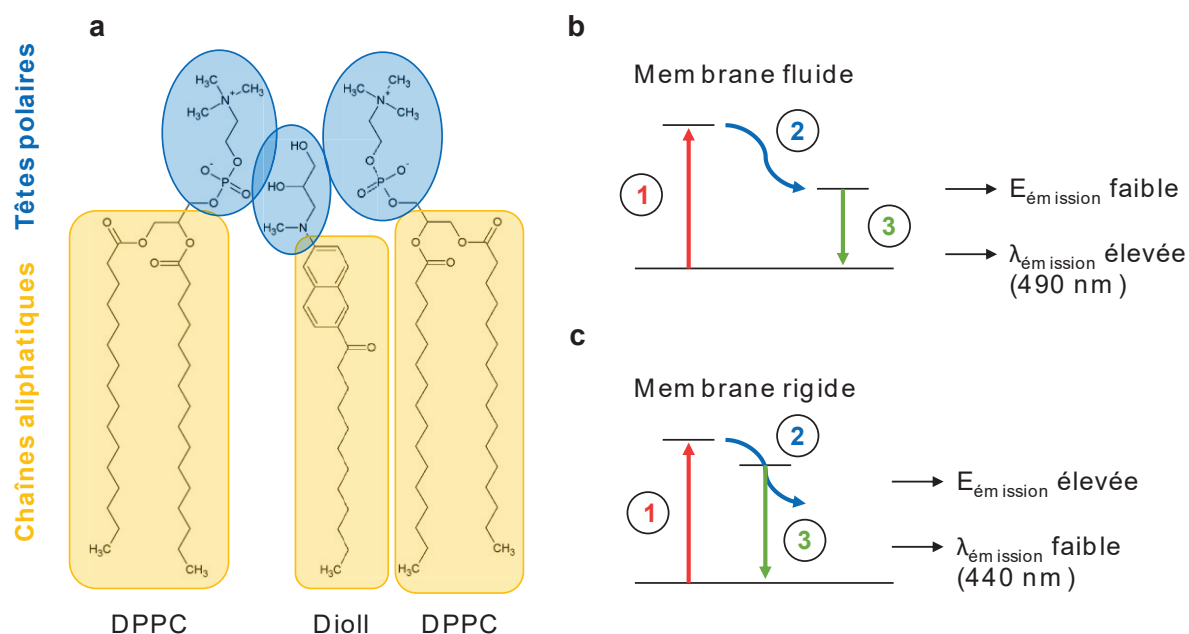
- Charges d'un phospholipide zwitterionique (ici la DPPC).
- Potentiel zêta d'un liposome en solution, qui englobe les charges des lipides à la surface du liposome ainsi que les contre-ions à grande proximité.

### 2.3.3. Caractérisation de la fluidité membranaire

La fluidité membranaire des liposomes préparés a été caractérisée *via* le Dioll, une sonde fluorescente dérivée du Laurdan qui a été synthétisée comme analogue plus polaire [321]. Cette sonde, non fluorescente en solution, a la particularité de s'insérer dans les membranes et de fluorescer une fois insérée (**Figure 42a**). Elle est sensible à l'ordre membranaire, qui influe sur la relaxation vibrationnelle de la molécule. La synthèse a été réalisée par le Dr Thierry GRANJON et le Dr David GUEYRARD (ICBMS

- UMR CNRS 5246 - Equipe LCO2Glyco), et a fait l'objet d'une publication en cours de soumission, détaillée en « **Annexe** » (1.1., page 259).

Après absorption d'un photon exciteur, le fluorophore réémet un photon sous forme de fluorescence. Lors de l'absorption du photon, un électron passe d'un état fondamental à un état excité d'énergie plus élevée. L'émission du photon de fluorescence va désexciter l'électron et le faire revenir à son état fondamental. Entre l'absorption et l'émission de photons, des phénomènes de relaxation vibrationnelle interviennent, correspondant le plus souvent à une dissipation d'énergie dans le milieu par interaction avec les molécules de solvant.



**Figure 42.** Insertion du Dioll dans les membranes lipidiques. **1**: Excitation ; **2**: Relaxation vibrationnelle ; **3**: Retour à l'état fondamental et émission du photon de fluorescence.

- a.** Insertion du Dioll dans une membrane lipidique de DPPC.
- b.** Fluorescence du Dioll inséré dans une membrane fluide.
- c.** Fluorescence du Dioll inséré dans une membrane rigide.

Quand la sonde est insérée dans une membrane fluide, le photon réémis a une énergie plus basse que celle du photon exciteur puisqu'une partie de l'énergie a été dissipée par relaxation vibrationnelle (**Figure 42b**), ce qui se traduit par une longueur d'onde plus élevée de 490 nm (énergie et longueur d'onde étant

inversement proportionnelles). En revanche, quand la sonde est insérée dans une membrane rigide, le manque de mobilité des molécules dans la membrane réduit l'accessibilité de la sonde au solvant, ce qui atténue la relaxation vibrationnelle. Le photon d'émission d'une membrane rigide a donc une énergie plus élevée que celui émis dans le cas d'une membrane fluide (**Figure 42c**), ce qui se traduit par une longueur d'onde plus faible.

Le calcul du paramètre de polarisation généralisée GP (pour « *Generalized polarization* ») permet de comparer numériquement la fluidité de deux membranes, les valeurs de GP étant comprises entre -1 et +1 (**Eq. 1**). Plus la valeur de GP est proche de +1, plus la membrane est rigide ; plus elle est proche de -1, plus la membrane est fluide.

$$GP = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}} \quad (\text{Eq. 1})$$

La mesure expérimentale de la GP des liposomes a été réalisée par une lecture au spectrofluorimètre. Après incubation pendant au moins 15 minutes avec du DiIol (2  $\mu\text{M}$ ), les solutions de liposomes (0,1 g/L) sont placées dans une enceinte thermostatée, et des spectres sont pris entre 5°C et 45°C, à intervalles de 1°C. La mesure de la GP des cellules est réalisée de manière similaire, en incubant pendant 15 minutes du DiIol (2  $\mu\text{M}$ ) avec une suspension de cellules à 1 million de cellules par mL. La mesure a été réalisée à 37°C uniquement.

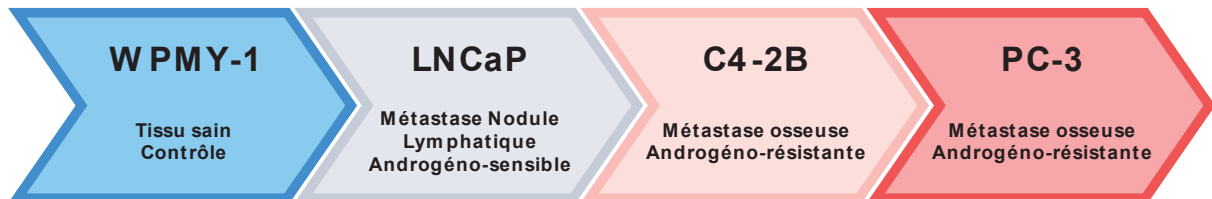
### 3. Essais *in cellula*

#### 3.1. Culture cellulaire

##### 3.1.1. Cellules utilisées

L'étude de l'interaction liposome-cellule a été réalisée sur plusieurs modèles cellulaires humains, provenant de différents organes et tissus, avec de multiples types cellulaires aux propriétés variées. Cette hétérogénéité a ainsi permis l'étude de l'interaction liposome-cellule sous de nombreux aspects.

Parmi les modèles utilisés, quatre lignées cellulaires, les lignées WPMY-1, LNCaP, C4-2B et PC-3, ont permis d'élaborer un modèle de cancer de la prostate à différents stades d'évolution, avec une lignée contrôle et trois lignées métastatiques d'agressivité variée (**Figure 43**). La culture et l'étude de ces modèles ont été réalisées en collaboration avec le Dr Leyre BRIZUELA (ICBMS - UMR CNRS 5246 - Equipe MEM<sup>2</sup>).



**Figure 43.** Classification des lignées de cancer de la prostate utilisées.

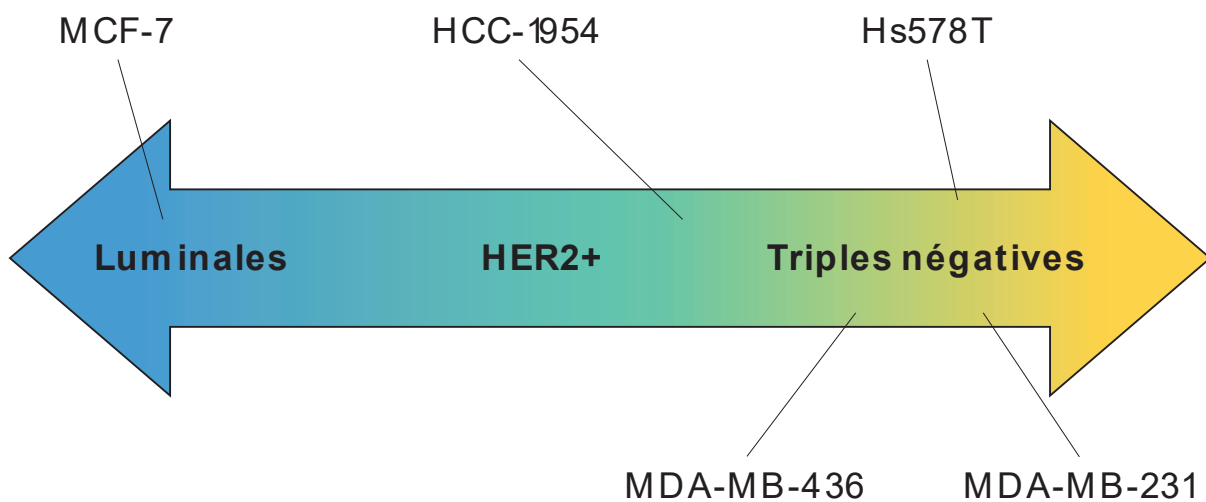
La lignée WPMY-1 a été obtenue à partir de (myo)fibroblastes et de cellules épithéliales issus du stroma de la prostate saine d'un homme de 54 ans ; elle sert de contrôle mimant le tissu prostatique sain. La lignée LNCaP correspond à une métastase issue d'un cancer de la prostate d'un homme de 50 ans, localisée dans un ganglion lymphatique supraclaviculaire. A partir de cette lignée, la lignée C4-2B a été créée par inoculation chez une souris de cellules LNCaP et de fibroblastes issus d'un ostéosarcome, suivie d'une castration des souris pour induire une indépendance aux hormones. Les cellules créées forment des métastases osseuses. La lignée PC-3 a, quant à elle, été obtenue à partir d'une métastase osseuse d'un adénocarcinome prostatique de grade IV provenant d'un homme âgé de 62 ans.

La lignée HCT-116 correspond à des cellules issues d'un adénocarcinome du côlon et a servi à valider les résultats observés sur les cellules modèles de prostate sur d'autres types cellulaires.

Les fibroblastes utilisés proviennent d'échantillons de peau humaine, récupérés sur des donneurs anonymes au Laboratoire des Substituts Cutanés (UMR CNRS 5035). Les fibroblastes cultivés correspondent à ceux obtenus après dissociation et purification à partir des échantillons prélevés [322]. Ces cellules nous servent de contrôles sains.



Des essais ont également été réalisés sur des cellules issues de lignées modèles de cancer du sein. Ces dernières ont été cultivées par Sébastien IBANEZ dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Arnaud VIGNERON (CRCL - UMR INSERM 1052 CNRS 5286 - Equipe EMT et plasticité de la cellule cancéreuse). Cinq lignées cellulaires différentes ont été utilisées (MCF-7, MBA-MB-231, MBA-MB-436, Hs578T et HCC-1954), chacune correspondant à un certain type de cancer du sein, comme illustré **Figure 44** [323].



**Figure 44.** Distribution des lignées cellulaires de cancer du sein utilisées (Figure adaptée de [323]). HER2 : « *Human Epithelial Receptor 2* ». Le bleu représente des tumeurs peu invasives de bon pronostic ; le jaune représente des tumeurs agressives de mauvais pronostic.

Les cellules de tumeurs lumineales, comme les MCF-7, représentent des modèles de tumeurs avec de bons pronostics de survie, avec des cellules ayant encore un bon état de différenciation et présentant des jonctions serrées étanches. Les lignées triple négatives, en revanche, présentent un état beaucoup plus indifférencié, plus proches d'un phénotype mésenchymateux que de leur état de base épithélial. Elles correspondent à des modèles de tumeurs de mauvais pronostics. On retrouve les cellules MDA-MB-231, les cellules MDA-MB-231 et les cellules Hs578T. Les cellules HER2+, comme les HCC-1954, correspondent à un état intermédiaire entre les cellules lumineales et les cellules triples négatives, avec des cellules encore épithéliales mais des liaisons serrées disjointes. Une sixième lignée, HCC-1954m, a

été utilisée. Elle correspond à des cellules HCC-1954 ayant transité vers un état mésenchymateux depuis leur état épithélial.

### 3.1.2. Protocoles de culture cellulaire

Les cellules sont cultivées dans des flasques de 75 à 150 cm<sup>2</sup>. Les cellules WPMY-1, LNCaP, C4-2B et PC-3, ainsi que les fibroblastes, ont été cultivés dans du DMEM complétementé avec 10% (v/v) de sérum de veau foetal (SVF). Les cellules HCT-116 ont été cultivées dans du milieu de culture McCoy's complétementé avec 10% (v/v) de SVF. Les cellules ont été cultivées dans un incubateur humidifié à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>.

Pour chaque lignée, deux repiquages par semaine ont été réalisés. A cet égard, le tapis cellulaire au fond des flasques de culture est lavé, décollé, et les cellules sont réensemencées dans de nouvelles flasques à des densités variables en fonction de la lignée utilisée.

## 3.2. Etude de l'interaction avec des liposomes fluorescents

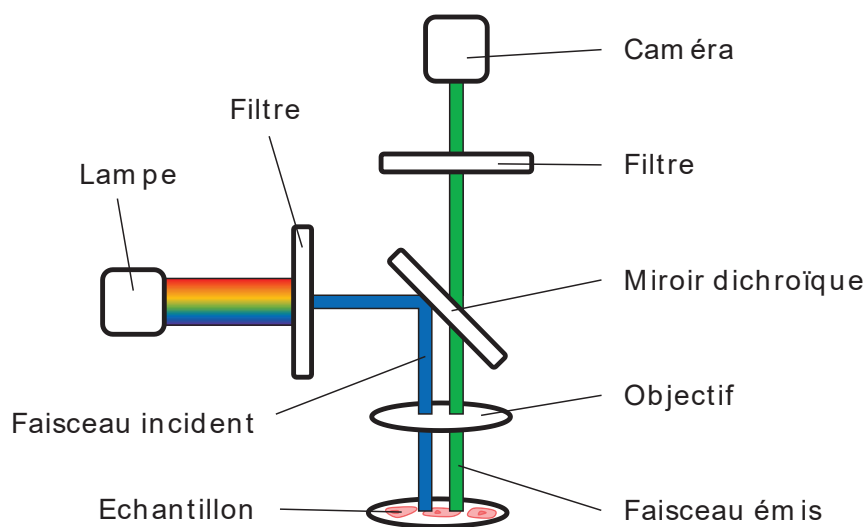
### 3.2.1. Ensemencement et traitement de plaques

Lors de l'étude de l'interaction de liposomes fluorescents avec la membrane de cellules, des plaques 96 puits ont été préparées. Après passage, des cellules ont été ensemencées dans des plaques à des densités différentes en fonction de chaque lignée, optimisées pour avoir des tapis cellulaires uniformes à 80% de confluence, c'est-à-dire recouvrant 80% de la surface du puits.

Après une nuit dans l'incubateur, pour permettre aux cellules d'adhérer au fond des puits, les plaques sont traitées par ajout d'une solution de liposomes fluorescents à une concentration finale de 0,25 g/L de lipide. Les plaques sont maintenues pendant 2h30 à 37°C dans l'incubateur afin de maintenir la viabilité des cellules et de leur permettre d'interagir avec les liposomes. Après lavage avec du PBS, les cellules sont fixées par du formaldéhyde à 3,7%, un agent pontant qui permet d'immobiliser les cellules sur la plaque.

### 3.2.2. Visualisation en microscopie d'épifluorescence

Les cellules sont observées en microscopie d'épifluorescence. Dans cette méthode de microscopie, l'échantillon est éclairé par une lumière à une longueur d'onde précise afin d'exciter les fluorophores présents (**Figure 45**). La lumière de fluorescence émise est alors enregistrée, ce qui permet de suivre en temps réel la distribution du marquage fluorescent au sein de l'échantillon. La microscopie d'épifluorescence utilise des filtres et un miroir dichroïque pour sélectionner et dévier les faisceaux désirés. Un premier filtre permet de sélectionner uniquement une plage de longueurs d'ondes correspondant à la longueur d'onde où l'excitation du fluorophore est maximale. Le deuxième filtre permet quant à lui de ne sélectionner que la plage de longueur d'onde correspondant à la longueur d'onde d'émission maximale du fluorophore. Entre les deux, le miroir dichroïque adopte un comportement dépendant de la longueur d'onde de la lumière, en réfléchissant vers l'échantillon le faisceau excitateur et en laissant passer les photons de fluorescence. Le signal est alors enregistré par une caméra CCD (pour « *Charge Coupled Device* ») et suivi sur ordinateur. Les plaques sont placées dans un support adapté et visualisées à l'aide du logiciel AxioVision.



**Figure 45.** Principe de la microscopie d'épifluorescence. Ici, le faisceau incident (en bleu) éclaire l'échantillon ; le faisceau de fluorescence émis (en vert) est enregistré par une caméra.

### 3.2.3. Quantification de l'interaction

L'interaction des liposomes fluorescents avec les cellules est quantifiée en calculant la fluorescence cellulaire totale corrigée ou CTCF (pour « *Corrected Total Cell Fluorescence* »). Pour déterminer ce paramètre, des clichés des cellules en fond clair et en fluorescence sont ouverts dans un logiciel de traitement d'image. Sur une image en fond clair, le pourtour de quelques cellules est dessiné, puis reporté sur l'image de fluorescence correspondant à la même zone. Sur cette image, le logiciel permet de calculer l'intensité des pixels de chaque cellule délimitée. L'intensité du bruit de fond est évaluée de manière similaire, en délimitant des zones ne contenant aucune cellule. L'intensité moyenne est calculée à partir de l'intensité totale et de la surface occupée par chaque cellule (**Eq. 2**).

$$Intensité\ moyenne = \frac{Intensité\ totale_{Cellule}}{Surface_{Cellule}} \quad (\text{Eq. 2})$$

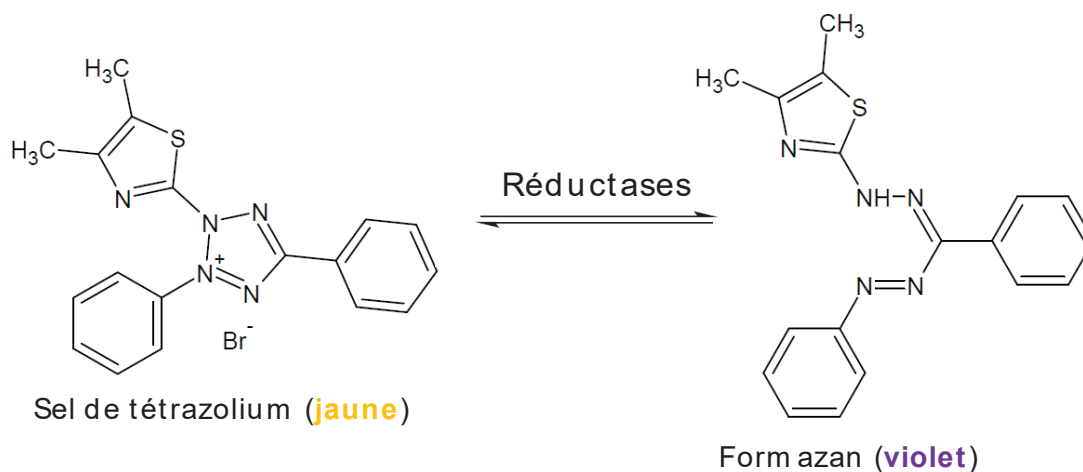
Pour chaque cliché, l'intensité moyenne est ensuite ramenée à l'intensité du bruit de fond pour obtenir l'intensité corrigée (**Eq. 3**).

$$CTCF = \frac{Intensité\ moyenne_{Cellules}}{Intensité\ moyenne_{Bruit\ de\ fond}} \quad (\text{Eq. 3})$$

## 3.3. Etude des effets toxiques des liposomes et des molécules en culture cellulaire

### 3.3.1. Mesure de la viabilité cellulaire

Après incubation avec les liposomes ou les molécules dont on souhaite évaluer les effets toxiques, rinçage et ajout de milieu de culture frais, les cellules sont incubées avec du sel de tétrazolium MTT à une concentration finale de 0,125 mg/mL pendant 3 heures. Ce composé va permettre de mesurer l'activité métabolique réductrice, car il contient du tétrazolium, molécule soluble réduite par les enzymes utilisant le NADH + H<sup>+</sup> comme cofacteur en un cristal de couleur violette (cristal de formazan) comme schématisé sur la **Figure 46**.



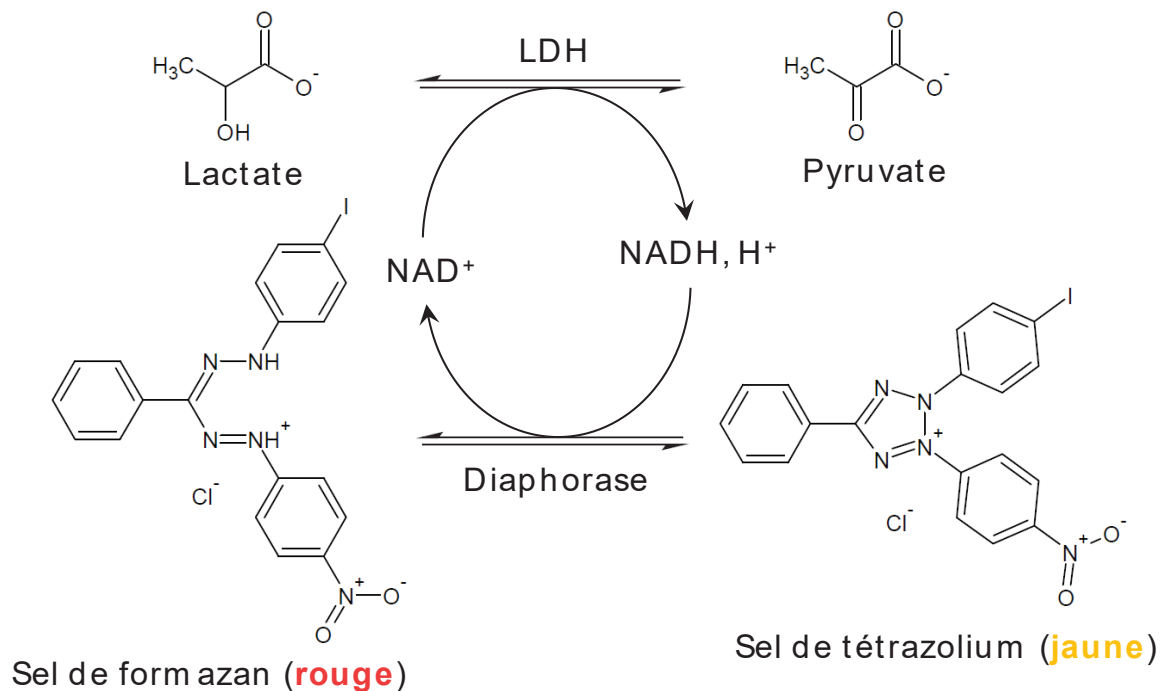
**Figure 46.** Réaction impliquée dans le test MTT.

Les cristaux formés étant insolubles dans un milieu aqueux, ils sont dissouts dans du DMSO et l'absorbance de chaque puits est lue à 570 nm. Ceci permet de déterminer la viabilité métabolique des cellules, la formation des cristaux étant proportionnelle à l'activité enzymatique présente.

### 3.3.2. Mesure de la cytotoxicité

Le test de cytotoxicité repose sur la mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH), une enzyme cytoplasmique. Lors de la mort cellulaire, l'intégrité de la membrane plasmique est rompue et toutes les molécules présentes dans le cytoplasme sont relarguées dans le milieu de culture. Ainsi, la mesure de l'activité de la LDH dans le milieu dans lequel sont cultivées les cellules va permettre de mettre en évidence des évènements de morts cellulaires. Après incubation avec les facteurs dont on souhaite évaluer la toxicité, le milieu de culture où baignent les cellules est prélevé et l'activité de la LDH est mesurée à l'aide d'un kit de dosage « *Cytotoxicity Detection Kit* ». Le principe de ce dosage est présenté

**Figure 47.**



**Figure 47.** Principe du dosage de la LDH à l'aide du kit « *Cytotoxicity Detection Kit* » (Source : Sigma-Aldrich).

L'activité de la LDH est mesurée grâce à une réaction couplée. Le  $\text{NAD}^+$  est réduit par la LDH présente dans l'échantillon lors de l'oxydation du lactate. Il est ensuite ré-oxdé par l'enzyme présente dans le kit, la diaphorase. Cette oxydation est couplée à la réduction d'un sel de tétrazolium présent dans le kit en un sel de formazan, qui absorbe à une longueur d'onde de 490 nm.

Ce test est effectué dans des plaques 96 puits, où 50  $\mu\text{L}$  de prélèvement sont mis à incuber pendant 30 minutes avec 50  $\mu\text{L}$  du mélange du kit. Ce mélange est réalisé avec 1,125 mL d'une solution de coloration contenant le sel de tétrazolium et le lactate, et 25  $\mu\text{L}$  d'une solution de catalyse contenant la diaphorase et le  $\text{NAD}^+$ .

### 3.3.3. Protocoles de traitement et d'analyse

L'analyse de la viabilité cellulaire et de la cytotoxicité est effectuée sur des cellulesensemencées dans des plaques en culture. Les cellules sont traitées (ou non) avec des solutions de liposomes pour une concentration finale de 0,25 g/L de lipides. Après 2h30 d'incubation, les plaques sont rincées avec du tampon frais, afin d'éliminer les liposomes n'ayant pas interagi avec les cellules. Du milieu de culture frais est alors ajouté, et les cellules sont remises dans l'incubateur pendant trois

jours, afin de laisser au principe actif le temps d'agir. Après trois jours, les plaques sont traitées comme précédemment décrit.

Les résultats de viabilité cellulaire et de cytotoxicité sont exprimés en pourcentages, par rapport aux valeurs mesurées sur des contrôles non-traités (correspondant au 100 % de viabilité cellulaire et au 0% de cytotoxicité) et sur des contrôles traités par du triton X-100 (correspondant au 0 % de viabilité cellulaire et au 100% de cytotoxicité), ce dernier entraînant la lyse des cellules.

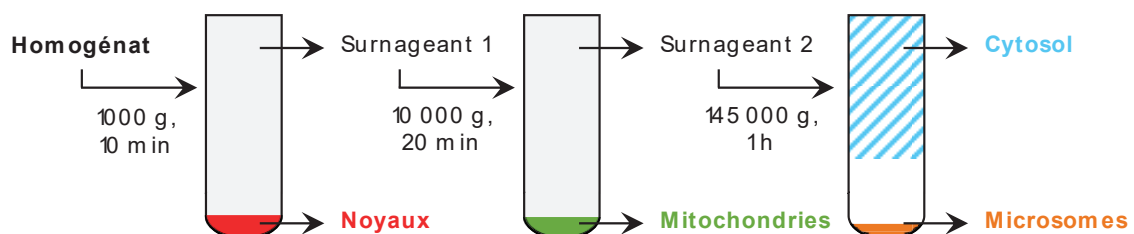
### 3.4. Isolement de membrane plasmique à partir de culots cellulaires

#### 3.4.1. Fractionnement cellulaire

Dans le but de recréer une membrane biomimétique modèle à partir de lipides extraits, un fractionnement cellulaire a été réalisé afin d'isoler une fraction contenant la membrane plasmique.

200 millions de cellules sous forme de culots secs sont repris dans 20 mL de tampon PBS à pH 7,4 en présence d'1% de Triton X-100, afin de solubiliser les membranes cellulaires. Ensuite, les cellules sont soumises à 3 cycles de congélation / décongélation dans de l'azote liquide pour finir de lyser les cellules. Les échantillons sont enfin agités par traitement aux ultrasons, pour les homogénéiser.

Après lyse, les différents organites ont été séparés selon un protocole adapté de la littérature (Van Blitterswijk *et al.*, 1975) et détaillé **Figures 48** et **49**, en collaboration avec le Dr Saïda MEBAREK (ICBMS - UMR CNRS 5246 - Equipe MEM<sup>2</sup>).

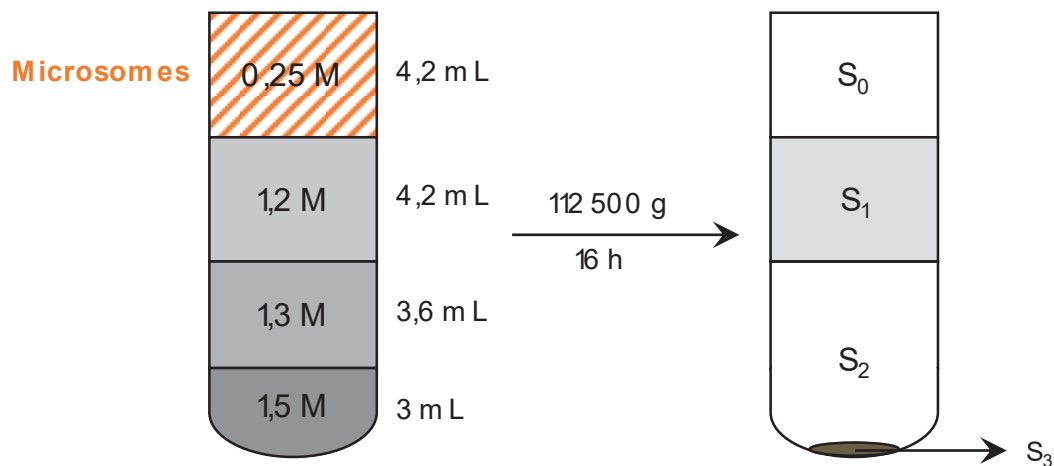


**Figure 48.** Centrifugations différentielles permettant l'isolement de la fraction microsomale.



Une première centrifugation à 1000 g pendant 10 minutes permet de faire sédimenter les noyaux et les débris cellulaires. Le surnageant est ensuite récupéré et remis à centrifuger à 20 000 g pendant 20 minutes, afin de faire sédimenter les mitochondries. Le surnageant est une nouvelle fois récupéré avant d'être mis à centrifuger à 145 000 g pendant une heure, ce qui permet de séparer la fraction cytosolique (surnageant) de la fraction microsomale (culot) composée de multiples vésicules issues de l'éclatement de la membrane plasmique, de l'appareil de golgi et du réticulum endoplasmique. Afin de séparer ces vésicules, la fraction microsomale est déposée sur un gradient discontinu de saccharose afin d'isoler la fraction membranaire.

A cet égard, le culot contenant les microsomes a été resuspendu dans une solution de saccharose à 0,25 M et déposé au-dessus d'un gradient de saccharose pour lequel les concentrations en saccharose varient de 1,2 à 1,5 M (**Figure 49**). Après ultracentrifugation pendant 16 heures à 112 500 g, un anneau blanchâtre (fraction S1) et un culot (fraction S3) sont obtenus, ce qui permet de définir quatre fractions, de S<sub>0</sub> à S<sub>3</sub>.



**Figure 49.** Centrifugation isopycnique permettant d'isoler la fraction contenant les vésicules issues du morcèlement de la membrane plasmique.

### 3.4.2. Tests d'activité

Chaque fraction a été analysée par le dosage d'un composant caractéristique ou par un test d'activité d'une enzyme spécifique pour identifier les organites présents. Les marqueurs utilisés sont détaillés dans le **Tableau 3**. De plus, un dosage des protéines a été réalisé pour quantifier la quantité de protéines présentes dans chaque fraction.

Organite	Marqueur
Noyau	ADN
Mitochondrie	Cytochrome C oxydase (COX)
Réticulum endoplasmique	Cytochrome C NADPH réductase (CR)
Membrane plasmique	Phosphatase alcaline (PA)
Cytosol	Lactate déshydrogénase (LDH)

**Tableau 3.** Organites cellulaires et marqueurs spécifiques choisis.

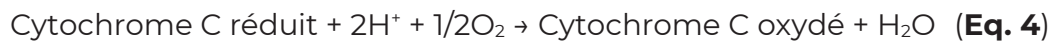
#### 3.4.2.1. Dosage de l'ADN

Les propriétés spectrophotométriques de l'ADN permettent son dosage, en mesurant l'absorbance des échantillons à 260 nm à l'aide d'un nanophotomètre. Cet appareil permet la mesure des rapports d'absorbance  $Abs_{260}/Abs_{280}$  et  $Abs_{260}/Abs_{230}$ , qui sont des indicateurs de la pureté de l'échantillon. Cependant, comme nous ne travaillons pas avec de l'ADN purifié, ces valeurs sont à considérer avec prudence : les échantillons pourront être contaminés par des protéines, des lipides, des sucres, et tous les autres constituants cellulaires qui influenceront cette mesure.

#### 3.4.2.2. Dosage de la Cytochrome C Oxydase (COX)

Le principe du dosage de la COX, marqueur de la mitochondrie, repose sur l'absorbance à 550 nm du cytochrome C réduit. La COX va oxyder le cytochrome C, ce qui va diminuer la concentration en cytochrome C réduit (**Eq. 4**) et donc l'absorbance à 550 nm. On peut ainsi suivre l'activité de l'enzyme en mesurant la

variation de la concentration en cytochrome C réduit au cours du temps, ce qui entraîne une modification de l'absorbance à 550 nm.



Le cytochrome C se présentant sous forme oxydée, il est préalablement réduit dans le cadre du dosage de la COX par ajout d'1 mg/mL de dithionite de sodium, un agent réducteur. Une mesure de la cinétique enzymatique est effectuée pendant 5 minutes dans des plaques 96 puits pour un volume final de 100 µL, contenant la fraction à analyser (10% v/v) et du cytochrome C à 62,5 µM dans du tampon phosphate 50 mM, pH 7,8.

### 3.4.2.3. *Dosage de la Cytochrome C NADPH Réductase (CR)*

La CR est une enzyme catalysant, à l'inverse de la COX, la réduction du cytochrome C. Elle va réduire le cytochrome C oxydé en cytochrome C réduit, qui absorbe à 550 nm (**Eq. 5**).



Une mesure de la cinétique enzymatique est effectuée pendant 5 minutes dans des plaques 96 puits pour un volume final de 100 µL, contenant la fraction à analyser (10% v/v), du cytochrome C à 62,5 µM et du NADPH,H<sup>+</sup> à 4,5 mM dans du tampon phosphate 300 mM pH 7,8.

### 3.4.2.4. *Dosage de la Lactate Déshydrogénase (LDH)*

Le dosage du marqueur du cytosol, la LDH, consiste à mesurer la réduction du cofacteur associée à l'activité catalytique de l'enzyme, qui oxyde le L-lactate en pyruvate (**Eq. 6**). En effet, le NADH,H<sup>+</sup> absorbe à 340 nm, à la différence du NAD<sup>+</sup>.

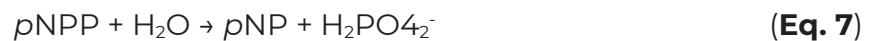


Une mesure de la cinétique de l'enzyme est effectuée pendant 5 minutes dans des plaques 96 puits pour un volume final de 100 µL, contenant la fraction à analyser

(10% v/v), du L-lactate à 127 mM et du NAD<sup>+</sup> à 5 mM dans du tampon glycine 100 mM, pH 9.

#### 3.4.2.5. Dosage de la Phosphatase Alcaline (PA)

Contrairement aux autres marqueurs enzymatiques, le dosage de la PA n'a pas été réalisé par une mesure de cinétique enzymatique pendant quelques minutes, mais par une accumulation de produit pendant une période de six heures, la quantité d'enzyme récupérée lors du fractionnement étant très faible. La PA catalyse la déphosphorylation du *para*-nitrophénylphosphate (pNPP), composé soluble incolore, en *para*-nitrophénol, un composé formant un précipité jaune absorbant à 405 nm (**Eq. 7**).



Le dosage a ainsi été réalisé dans des plaques 96 puits pour un volume final de 100 µL, contenant la fraction à analyser (10% v/v) et du pNPP à 50 µM dans du tampon Tris-HCl 100 mM, pH 8,3.

#### 3.4.3. Extraction lipidique

A partir des fractions contenant de la membrane plasmique, les lipides ont été extraits par la méthode de Bligh & Dyer [324]. Cette méthode d'extraction utilise un mélange de chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) et de méthanol (MeOH) pour séparer une phase organique, contenant les lipides, d'une phase aqueuse contenant les autres molécules polaires.

Dans un tube en verre, 1 mL d'échantillon et 3,75 mL d'un mélange CHCl<sub>3</sub>/ MeOH 1:2 (v/v) sont ajoutés. Après agitation au vortex et ajout d'1,25 mL de CHCl<sub>3</sub>, le mélange est une nouvelle fois agité au vortex. Enfin, après ajout d'1,25 mL d'eau distillée et agitation, le mélange est centrifugé à 1000 g pendant 5 minutes. Le système se sépare alors en deux phases, avec la phase aqueuse au-dessus de la phase organique. La phase organique est prélevée à travers la phase aqueuse à l'aide d'une pipette Pasteur et conservée à -20°C après ajout d'isopropanol pour conserver les lipides.

#### 3.4.4. Dosage des lipides

Le dosage des lipides par le Dioll fait l'objet d'une publication actuellement en cours de soumission et présentée en détail en « **Annexe** » (1.2., page 260). Ce dosage repose sur la mesure du spectre d'émission du Dioll injecté dans la suspension de liposomes à doser, par comparaison avec les spectres obtenus avec une gamme étalon de concentrations lipidiques connues. Le Dioll est incubé à 2  $\mu\text{M}$  dans la solution lipidique à doser et dans la gamme étalon, constituée de vésicules de POPC de concentration connue. Son spectre d'émission est alors mesuré entre 400 et 600 nm ( $\lambda_{\text{excitation}} = 380 \text{ nm}$ ). A partir des valeurs obtenues, l'aire sous la courbe de chaque spectre est calculée et reportée sur un graphe. Après détermination de l'équation de la courbe étalon, la concentration en lipides de la solution à doser peut alors être calculée.

## 4. Formation et caractérisation de bicouches lipidiques biomimétiques

### 4.1. Formation et caractérisation de bicouches biomimétiques modèles

#### 4.1.1. Dispositif expérimental

Les bicouches biomimétiques ont été formées en suivant le protocole précédemment développé au laboratoire [311,312]. Un prisme recouvert d'une fine couche d'or est rincé à l'eau, puis à l'éthanol, puis à l'eau avant d'être séché et placé dans un appareil de SPRi. Un cylindre creux en téflon permet de délimiter une cuve de 500  $\mu\text{L}$  à la surface du prisme. Après ajout de tampon et calibration de l'appareil, l'enregistrement en temps réel du pourcentage de réflectivité est réalisé sur 16 emplacements différents, chaque zone mesurant 500  $\mu\text{m}$  de diamètre. Après stabilisation du signal, le peptide pilotis P19-4H a été ajouté à une concentration finale de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , puis des liposomes à 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  et enfin, le peptide fusogène PAH à 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Chaque injection a été suivie d'un temps d'attente jusqu'à la stabilisation du signal avant de rincer 16 fois par ajout de 100  $\mu\text{L}$  de tampon frais, puis prélèvement de 100  $\mu\text{L}$  dans la cuve pour garder le volume constant au cours de l'expérience.

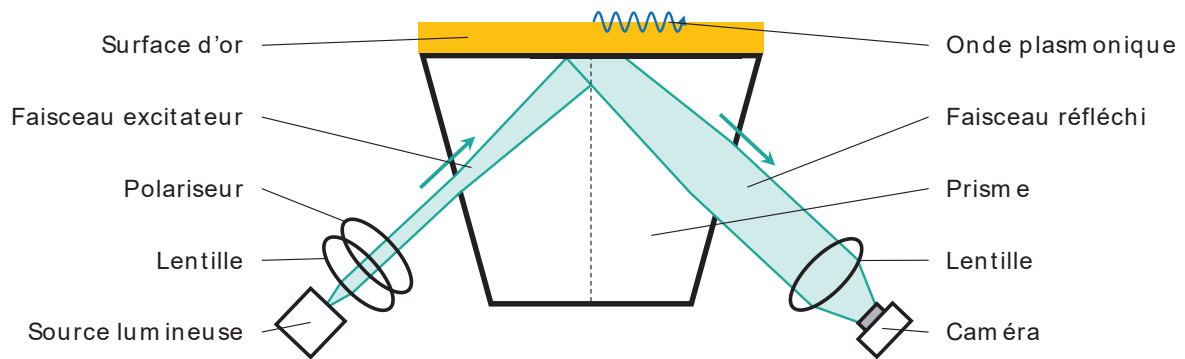
Les liposomes utilisés sont détaillés dans le **Tableau 4**. Le mélange POPC/DOGS-NTA(Ni) est une composition simple, résultant en la formation d'une bicouche homogène, utile pour calibrer et vérifier la fonctionnalité de l'expérience. Le mélange complexe POPC/SM/DOPE/CHOL/DOGS-NTA(Ni), en revanche, mime la composition de la membrane [325–327]. Cette composition permet de créer une membrane plus hétérogène, la sphingomyéline et le cholestérol favorisant la création de domaines plus rigides dans une membrane plutôt fluide. Enfin, la troisième composition a été formée en ajoutant du DOGS-NTA(Ni) à un mélange de lipides préalablement extraits de la membrane plasmique, comme décrit précédemment, afin de permettre l'accrochage des liposomes au pilotis. Cette composition a pour objectif la formation d'une bicouche modèle de la fraction lipidique de la membrane plasmique, les lipides utilisés étant les lipides composant naturellement la membrane de la cellule.

Composition lipidique	Pourcentage molaire
POPC/DOGS-NTA(Ni)	98:2
POPC/SM/DOPE/CHOL/DOGS-NTA(Ni)	42:35:10:11:2
Lipides naturels/DOGS-NTA(Ni)	98:2

**Tableau 4.** Compositions lipidiques des liposomes utilisés pour former les bicouches biomimétiques.

#### 4.1.2. Imagerie par Résonance Plasmonique de Surface (SPRi)

Le suivi de la formation des bicouches biomimétiques a été réalisé par SPRi, une méthode sans marquage qui permet de suivre la fixation et la désorption de matière sur une surface, en suivant des variations de réflectivité. Cette méthode repose sur l'utilisation d'une surface métallique, généralement d'or, positionnée au-dessus d'un prisme (**Figure 50**).



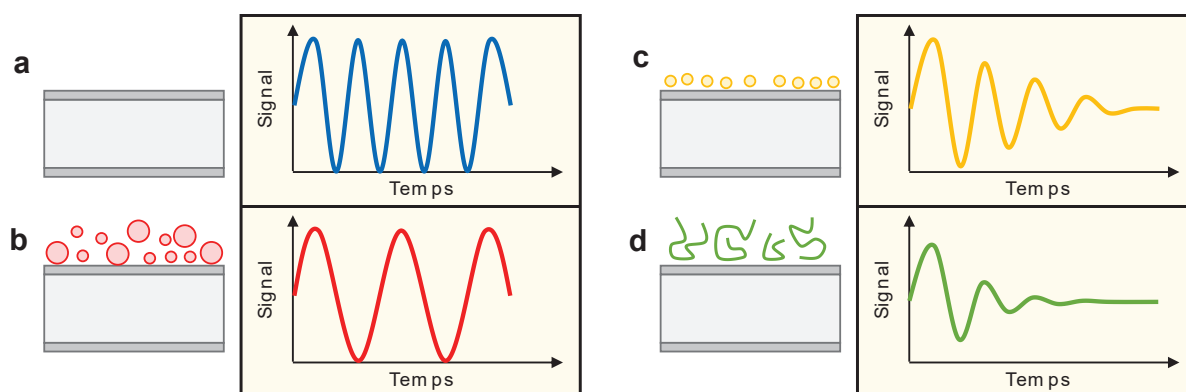
**Figure 50.** Trajet optique en Imagerie par Résonance Plasmonique de Surface. A partir d'une source lumineuse, un faisceau polarisé est réfléchi par une surface d'or et le faisceau réfléchi est enregistré par une caméra. Au niveau de la surface d'or, le faisceau génère une onde plasmonique de surface qui permet de faire le lien entre le changement d'indice de réfraction induit par l'adsorption de molécules d'une part, et l'angle de réflexion du faisceau d'autre part.

Au travers de ce prisme, une source de lumière polarisée va venir exciter, au niveau de la surface métallique, des plasmons de surface. Ces plasmons sont des ondes électromagnétiques de surface, créées, suite à une excitation, à l'interface d'un milieu de permittivité diélectrique négative avec le milieu extérieur. La permittivité d'un matériau dépendant de la fréquence du champ électrique appliqué à ce matériau. Pour des métaux comme l'or, la permittivité devient négative pour des fréquences dans le spectre de la lumière visible et de l'infra-rouge. Dans ces conditions, l'excitation des plasmons de surface a pour conséquence la réflexion du faisceau excitateur et l'oscillation des électrons libres du métal. Les électrons étant des particules chargées, leur oscillation va créer un champ électromagnétique qui va se propager à la surface du métal.

L'adsorption de molécules sur la surface va faire varier l'indice de réfraction, au niveau local, l'indice de réfraction des molécules biologiques étant plus élevé que celui de l'eau [328–330]. Cette modification de l'indice de réfraction va avoir pour conséquence une modification de la résonance de l'onde plasmonique de surface, qui va se traduire par la variation de l'angle de réflexion du faisceau excitateur. En SPRi, la mesure est réalisée à angle fixe. Le signal observé est alors exprimé en réflectivité par rapport à la position initiale, l'adsorption de matière à la surface du prisme conduisant à une augmentation de la réflectivité.

### 4.1.3. Microbalance à Cristal de Quartz avec suivi de la Dissipation (QCM-D)

La QCM-D est une méthode permettant de quantifier une variation de masse adsorbée à la surface d'un cristal de quartz en résonance en mesurant la fréquence de résonance du cristal. Elle utilise les propriétés piézoélectriques du quartz, qui associent une déformation mécanique à une polarisation électrique. Ainsi, lorsqu'on applique un champ électrique alternatif à un cristal de quartz, il oscille et entre en résonance. L'ajout de matière va alors perturber la résonance du cristal et ainsi modifier la fréquence d'oscillation : plus il y a de masse adsorbée, plus la fréquence est réduite (**Figures 51a** et **51b**). La mesure du facteur de dissipation permet de quantifier l'amortissement des oscillations du cristal par le matériau adsorbé, qui est directement relié aux propriétés viscoélastiques de ce dernier, les matériaux « mous » dissipant plus efficacement que les matériaux « durs » (**Figures 51c** et **51d**).



**Figure 51.** Microbalance à Cristal de Quartz avec suivi de la Dissipation.

- a. Fréquence d'oscillation pour un cristal nu.
- b. Fréquence d'oscillation pour un cristal avec du matériel adsorbé.
- c. Dissipation de l'oscillation d'un cristal recouvert d'un matériau « dur ».
- d. Dissipation de l'oscillation d'un cristal recouvert d'un matériau « mou ».

L'expérimentation en QCM-D a été réalisée en collaboration avec le Pr Donald MARTIN, le Dr Marco MACCARINI et Sebastian KOHLER (TIMC - UMR CNRS 5525 - Equipe SyNaBi). Le système expérimental utilisé est proche de celui utilisé en SPRi, la différence étant que l'appareil de QCM-D fonctionne uniquement en flux. Le protocole de SPRi a donc été adapté, au niveau des volumes injectés, afin de



conserver les mêmes concentrations. L'injection de solution s'est effectuée en mettant très brièvement en route le flux, afin d'amener les solutions d'intérêt au niveau de la chambre réactionnelle. Le flux a ensuite été coupé, afin de laisser les solutions d'intérêt au niveau de la chambre réactionnelle. Une fois le signal stabilisé, le système a été rincé par un flux de tampon propre pendant 10 minutes.

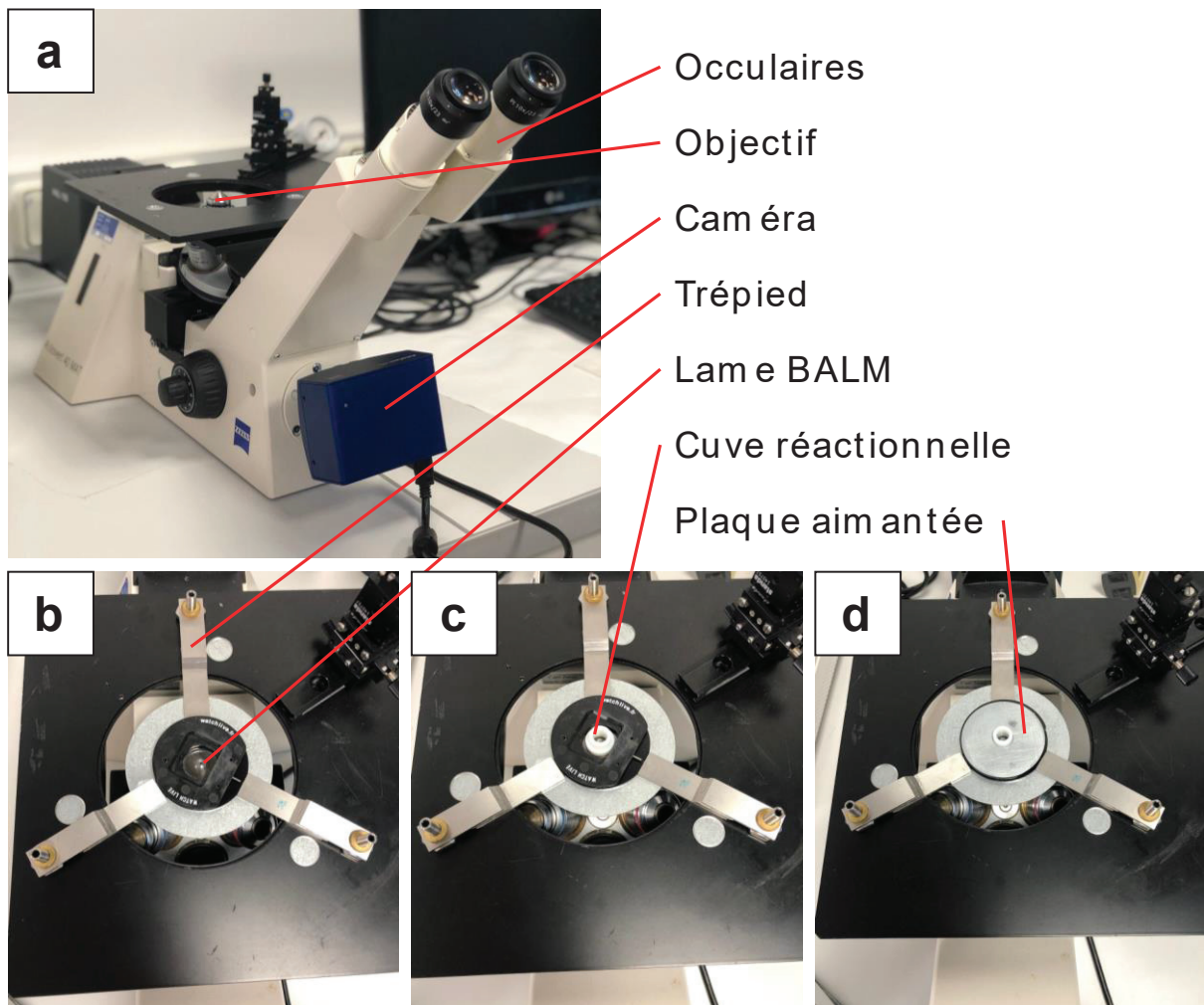
La différence de fréquence induite par l'adsorption/désorption de matière est traduite en variations de densité surfacique grâce à l'équation de Sauerbrey [331,332]. Cette dernière permet de traduire une variation de fréquence en une différence de masse à partir d'un coefficient dépendant des propriétés intrinsèques du cristal de quartz, telles que la densité du cristal ou sa surface. Dans le cas du dispositif expérimental utilisé, ce coefficient vaut 17,7 ng/cm<sup>2</sup> (**Eq. 8**).

$$\Delta m = -17,7 \times \Delta f \quad (\text{Eq. 8})$$

## 4.2. Application de la BALM, nouvelle technique de microscopie, à la caractérisation de la formation de pep-tBLM

### 4.2.1. Dispositif expérimental en BALM

La BALM est une méthode de microscopie en temps réel à ultra-haute résolution développée par le Dr Dominique AUSSERRÉ (IMMM - UMR CNRS 6283). Après lavage d'une lame de BALM dans de l'éthanol absolu, cette dernière est séchée et placée dans le dispositif expérimental présenté **Figure 52**.



**Figure 52.** Dispositif expérimental utilisé en BALM.

- a. Vue du microscope inversé utilisé en BALM.
- b. Positionnement de la lame BALM dans un trépied au-dessus du microscope.
- c. Positionnement du cylindre creux délimitant la cuve réactionnelle utilisée.
- d. Verrouillage du système par une paque aimantée maintenant tous les éléments en place et assurant l'étanchéité du système.

Après ajustement de la mise au point, la surface est observée à l'aide du logiciel AxioVision. 400  $\mu$ L de tampon sont ajoutés dans la chambre réactionnelle, de manière à reproduire les conditions expérimentales de la SPRI. La balance des blancs (intensités relatives des trois canaux rouge, vert et bleu) et le temps d'exposition sont ajustés de manière à ce que les signaux de chaque canal soient suffisamment forts mais jamais à saturation pendant toute l'expérimentation. Les pep-tBLM sont formées en suivant le même protocole qu'en SPRI, autant en termes

d'injection de solutions que de rinçages. Le suivi de la formation des pep-tBLM est réalisé à l'aide d'images obtenues par une caméra CCD haute-résolution.

#### 4.2.2. Analyse des résultats en BALM

Les images de BALM sont traitées à l'aide du logiciel ImageJ. Les images initiales sont des images RGB, c'est-à-dire des images composites formées de 3 images différentes, correspondant aux trois canaux rouge, vert et bleu. Pour l'analyse, les images initiales ont ainsi été séparées en trois. L'analyse des résultats de BALM s'est effectuée sur les images issues du canal rouge, ces dernières présentant les plus amples variations de réflectivité. Les images ont été colorées par application d'une table de conversion ou LUT (pour « *LookUp Table* »), qui recolore l'image en fonction de l'intensité de chaque pixel. Le suivi de l'évolution de la surface tout au long de l'expérimentation a été réalisé en définissant une zone sur la première image de la cinétique et en suivant l'évolution de cette même zone sur le reste des images. L'obtention de profils de réflectivité suit un protocole similaire, où l'évolution de la réflectivité a été mesurée le long d'une même ligne de 10 pixels de large au cours de la cinétique.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Comme nous l'avons montré en « **Etude bibliographique** », l'étude de l'interaction membrane-membrane est de toute première importance dans la conceptualisation de nouvelles solutions de vectorisation. En effet, bien que les liposomes constituent un véhicule de choix pour l'administration de médicaments, notamment en chimiothérapie, les solutions de vectorisation ciblée restent limitées. Ces stratégies tentent de répondre aux attentes actuelles, notamment en matière de spécificité, plus particulièrement dans les cas où des solutions passives principalement basées sur l'effet EPR ont échoué.

Actuellement, la stratégie de vectorisation ciblée largement mise en avant pour l'adressage de vecteurs lipidiques à un type cellulaire donné repose sur leur couplage avec un agent de reconnaissance spécifique d'un élément membranaire de la cible. Parmi ces agents couplant, on retrouve des anticorps, des ligands ou encore des fragments d'intégrines, spécifiques d'un récepteur membranaire surexprimé ou d'un sucre surreprésenté. En revanche, ces stratégies ne se servent pas du tout de la nature lipidique des liposomes, qui joue alors uniquement un rôle structural.

Le but de cette thèse a été d'étudier la possibilité d'utiliser la fraction lipidique des liposomes comme élément de spécificité. En particulier, nous nous sommes intéressés à l'effet de la composition lipidique sur l'interaction liposome-membrane et plus particulièrement, à l'influence de la fluidité membranaire. Ce choix a été motivé par des résultats de la littérature montrant que le développement tumoral est associé à des différences significatives de fluidité membranaire, comme évoqué en « **Etude bibliographique** » (2.2.3., page 46) [75,77,78]. De telles différences, capables de distinguer les cellules tumorales des cellules non-tumorales, laissent présager des différences de comportement en présence de vecteurs lipidiques tels que les liposomes. En effet, des différences de composition lipidique et de fluidité membranaires affectent profondément l'organisation de la membrane des cellules cancéreuses, ce qui peut se traduire à son tour par une modification des mécanismes impliqués dans l'interaction avec des liposomes [333].

Au cours de cette thèse, nous nous sommes tout particulièrement intéressés à l'interaction membrane-membrane dans deux contextes distincts : celui du ciblage de cellules tumorales en culture et celui des membranes biomimétiques. L'organisation de cette partie « **Résultats et discussion** » reflète ces deux axes. Dans le premier chapitre, nous nous intéresserons à l'influence de la composition lipidique et de la fluidité membranaire des liposomes sur leur interaction avec ces modèles de cancer de la prostate, qui a fait l'objet d'une publication parue dans le journal *Langmuir* (2020, 36(19):5134-5144). Puis, nous verrons les efforts mis en œuvre pour valider les résultats obtenus sur d'autres modèles cellulaires, avant de présenter l'application de ces résultats à des problématiques concrètes de vectorisation de molécules actives. Dans le deuxième chapitre sera présentée l'application d'une technique de microscopie récente, la BALM (pour « *Backside Absorbing Layer Microscopy* »), à la caractérisation de membranes biomimétiques formées par une méthode développée et brevetée au laboratoire. Ces travaux ont permis la soumission d'un second article actuellement en révision dans *Biophysical Journal*. Enfin, nous présenterons les travaux de mise en place d'un système membranaire biomimétique à base de lipides naturels.

## 1. Etude de l'interaction liposome-membrane sur des modèles cellulaires

### 1.1. Evaluation de l'impact de la composition lipidique sur l'interaction liposome-membrane

La stratégie suivie repose sur la préparation d'une gamme de fluidité membranaire de liposomes, à partir d'une gamme de composition lipidique. Pour ce faire, nous avons fait varier la longueur et la saturation des chaînes acyles de molécules de PC. Les liposomes ainsi préparés ont été mis en contact avec des cellules provenant de différentes lignées cellulaires modèles de cancer de la prostate, allant d'une lignée contrôle (WPMY-1) à une lignée métastatique très agressive (PC-3) en passant par deux lignées d'agressivité intermédiaire (LNCaP et C4-2B). Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr Leyre BRIZUELA (ICBMS - UMR CNRS 5246 - Equipe MEM<sup>2</sup>). L'interaction des liposomes avec les cellules a été suivie en microscopie d'épifluorescence, après marquage des liposomes soit par des lipides fluorescents, soit par une sonde fluorescente hydrosoluble. Les résultats obtenus, qui ont permis

la publication d'un article dans le journal *Langmuir*, ont nécessité une optimisation préalable des conditions expérimentales, que nous allons présenter dans cette première partie.

### 1.1.1. Optimisation des paramètres expérimentaux

Le protocole proposé d'interaction des liposomes avec les cellules a été le suivant :

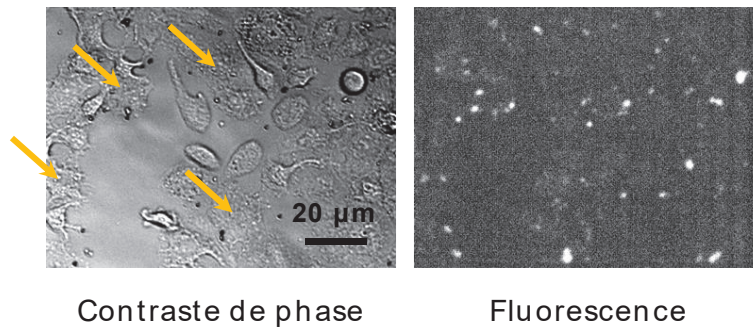
- Préparation de liposomes marqués par un fluorophore ;
- Ensemencement de plaques 96-puits par des cellules, de manière à former un tapis à 80 % de confluence après une nuit d'incubation (pour permettre aux cellules de bien adhérer au support) ;
- Incubation des liposomes (à 0,25 g//L) sur les plaques pendant 2h30 ;
- Observation des plaques au microscope.

Sur cette base, les travaux d'optimisation des conditions expérimentales ont été réalisés selon deux grands axes. Le premier concerne les liposomes eux-mêmes, notamment les aspects ayant trait à leur préparation et à leur caractérisation ; le second concerne le protocole d'étude de l'interaction liposome-cellule.

#### 1.1.1.1. Préparation et caractérisation des liposomes

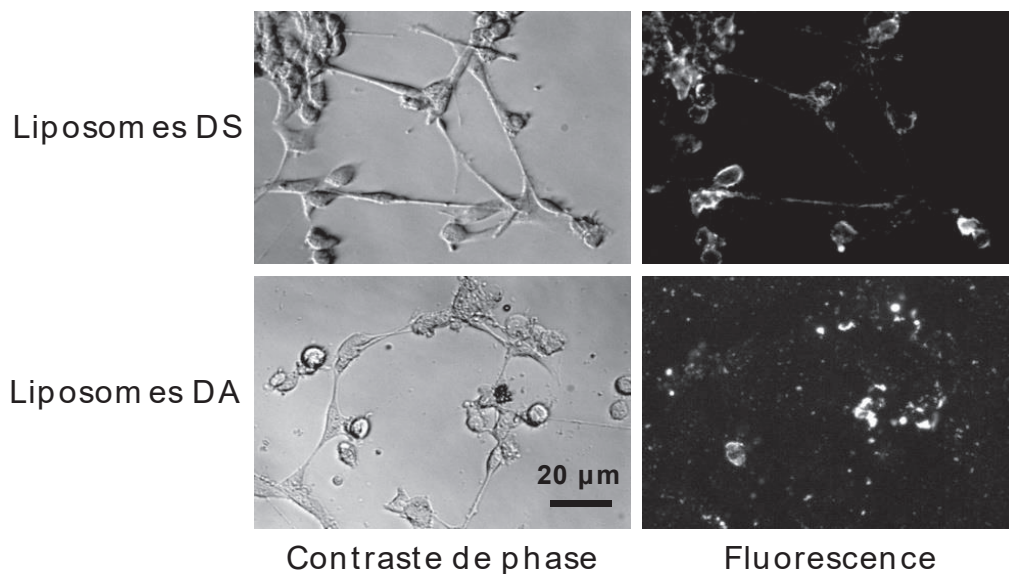
##### 1.1.1.1.1. Préparation de la gamme de fluidité membranaire

Notre étude portant sur l'influence de la composition lipidique et de la fluidité membranaire sur l'interaction liposome-cellule, nous avons réalisé une gamme de fluidité membranaire de liposomes. Comme précédemment mentionné en « **Matériel et méthodes** » (2.1., page 96), la formation de cette gamme est basée sur l'utilisation de PC de chaînes acyles variées, en termes de longueur et de saturation. Au total, six compositions ont été retenues, celles à base de DiLinoléoyl (DL), de DiOléoyl (DO), de PalmitoylOléoyl (PO), de DiMyristoyl (DM), de DiPalmitoyl (DP) et de DiStéaroyl (DS). Deux autres compositions, constituées de DiLauroyl (DLa) et de DiArachidonyl (DA) ont été testées, mais n'ont pas donné de résultats concluants ; l'incubation des liposomes DLa a conduit à la lyse des cellules (**Figure 53**), due à une action détergente des molécules de DLa du fait de leurs courtes chaînes acyles.



**Figure 53.** Toxicité des liposomes DLa marqués à la NBD-PE sur des cellules PC-3, selon le protocole expérimental détaillé en « **Matériel et méthodes** » (3.2.1., page 108). Les flèches jaunes pointent les cellules ayant éclaté.

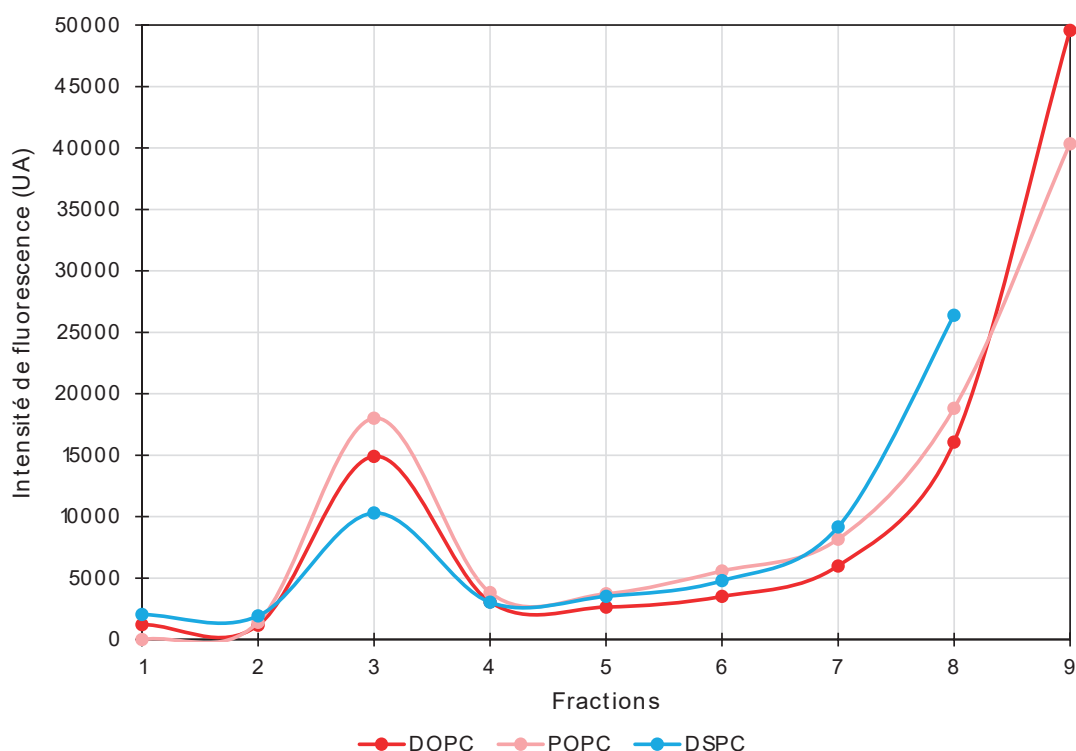
Pour les liposomes DA en revanche, le problème vient de la trop grande longueur des chaînes de DAPC, qui entraîne une forte agrégation des liposomes lors de l'incubation avec les cellules (**Figure 54**). Le signal obtenu étant similaire à celui des liposomes DS, seuls ces derniers ont été retenus.



**Figure 54.** Comparaison de l'interaction des liposomes DS et DA marqués à la NBD-PE avec des cellules WPMY-1, selon le protocole expérimental détaillé en « **Matériel et méthodes** » (3.2.1., page 108).

### 1.1.1.2. Préparation de liposomes fluorescents

Lors de la caractérisation de l'interaction liposome-cellule, deux types de liposomes ont été préparés. Les premiers sont marqués par un lipide fluorescent (obtenu par conjugaison d'un fluorophore, le NBD, sur la tête polaire d'une molécule de DOPE) ; les seconds encapsulent un fluorophore hydrophile, la calcéïne. La préparation de liposomes marqués par un lipide fluorescent est très simple, le lipide fluorescent étant simplement ajouté au reste des lipides avant le séchage des ballons. Lors de la resuspension ultérieure du film lipidique, le lipide fluorescent est ainsi directement intégré au sein des bicouches liposomales. En revanche, la calcéïne est introduite dans le tampon aqueux lors de la resuspension du film, ce qui conduit à l'encapsulation d'une partie de la calcéïne dans les liposomes. Après formation et extrusion des liposomes, la calcéïne libre est alors séparée par passage sur colonne de chromatographie d'exclusion stérique (**Figure 55**).



**Figure 55.** Suivi de la séparation de la calcéïne libre et encapsulée selon le protocole expérimental détaillé en « **Matériel et méthodes** » (2.2.6., page 100). Mesures réalisées au spectrophotomètre, sur un échantillon de 100  $\mu$ L de chaque fraction récoltée lors de la chromatographie d'exclusion sur une colonne PD-10.  $\lambda_{\text{max}}$  excitation = 485 nm,  $\lambda_{\text{max}}$  émission = 521 nm.

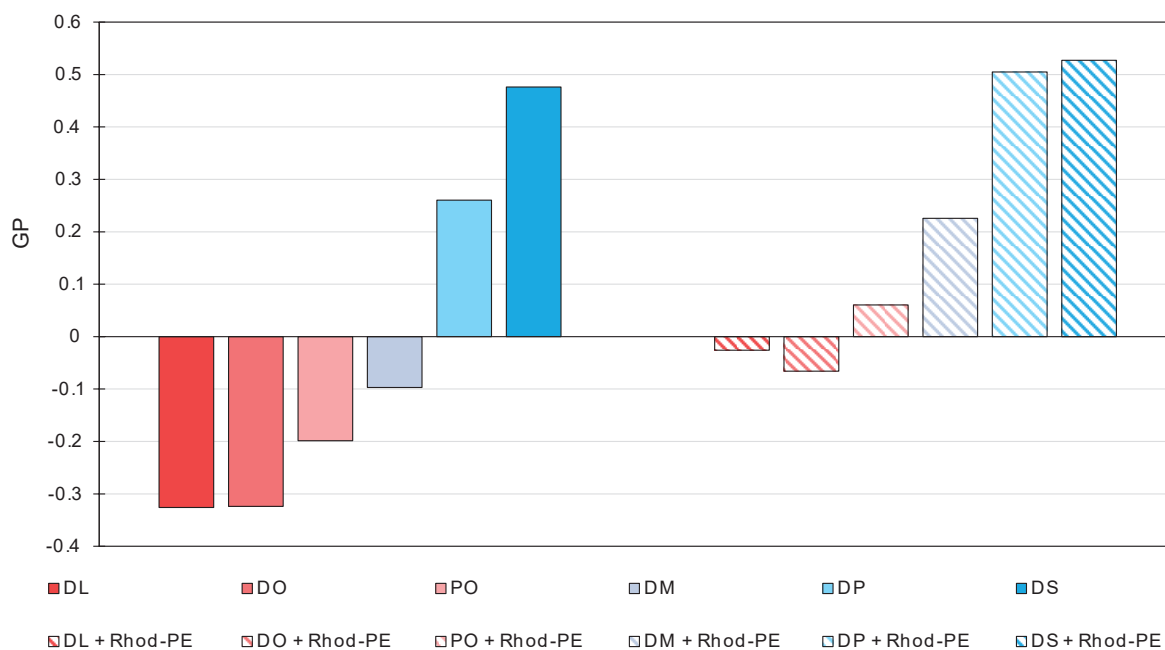


Un contrôle des fractions récupérées a mis en évidence que les colonnes permettaient une séparation efficace des liposomes encapsulant de la calcéine, qui sortent au niveau de la 3<sup>e</sup> fraction récupérée. La calcéine libre commence à apparaître beaucoup plus tard, puisqu'elle est éluée à partir de la 5<sup>e</sup> fraction.

### 1.1.1.3. Quantification de la fluidité membranaire

Une fois la gamme de composition lipidique préparée, la formation d'une gamme de fluidité membranaire a été vérifiée par une mesure avec le Dioll, un dérivé du Laurdan synthétisé par le Dr Thierry GRANJON et le Dr David GUEYRARD (ICBMS - UMR CNRS 5246 - Equipe LCO2Glyco). Cette sonde est sensible à la polarité de son milieu, et permet donc de quantifier la GP (pour « *Generalized Polarization* ») d'une membrane, qui permet de comparer des fluidités membranaires. Des essais ont été réalisés avec une gamme de composition lipidique incluant les lipides fluorescents. Pouvoir faire la mesure de la fluidité membranaire sur les liposomes marqués est un avantage : la mesure étant ainsi directement réalisée sur les liposomes utilisés par la suite pour l'incubation avec les cellules. Cependant, pour que ce soit réalisable, il est nécessaire d'éviter les phénomènes de transfert d'énergie par résonance de type Förster ou FRET (pour « *Förster Resonance Energy Transfer* »). En effet, dans le cas de l'utilisation concomitante de deux fluorophores différents, il se peut que les photons d'émission de l'un des fluorophores soient captés par le deuxième fluorophore. Dans le cas présent, le Dioll présente un  $\lambda_{\max}$  d'émission variant de 440 à 490 nm. Les deux lipides fluorescents à notre disposition étaient la NBD-PE et la Rhodamine-PE, ayant des  $\lambda_{\max}$  excitation de 460 nm (NBD-PE) et de 560 nm (Rhodamine-PE), et des  $\lambda_{\max}$  émission de 535 nm (NBD-PE) et de 583 nm (Rhodamine-PE). Ici, le  $\lambda_{\max}$  excitation de la NBD-PE est inclus dans la plage de longueur d'onde d'émission du Dioll, ce qui conduirait forcément à un FRET entre les deux fluorophores. En revanche, le  $\lambda_{\max}$  excitation de la Rhodamine-PE est suffisamment éloigné du  $\lambda_{\max}$  d'émission du Dioll (respectivement 560 et 490 nm) pour laisser présager d'une absence de FRET. Cette hypothèse a été vérifiée par la mesure de la fluidité membranaire de deux gammes de compositions liposomales, l'une contenant de la Rhodamine-PE et l'autre n'en contenant pas. Les résultats obtenus, représentés sur la **Figure 56**, montrent clairement la présence d'un phénomène de FRET, particulièrement plus intense pour les compositions liposomales fluides. Ce FRET nous a contraint à mesurer la fluidité de liposomes en

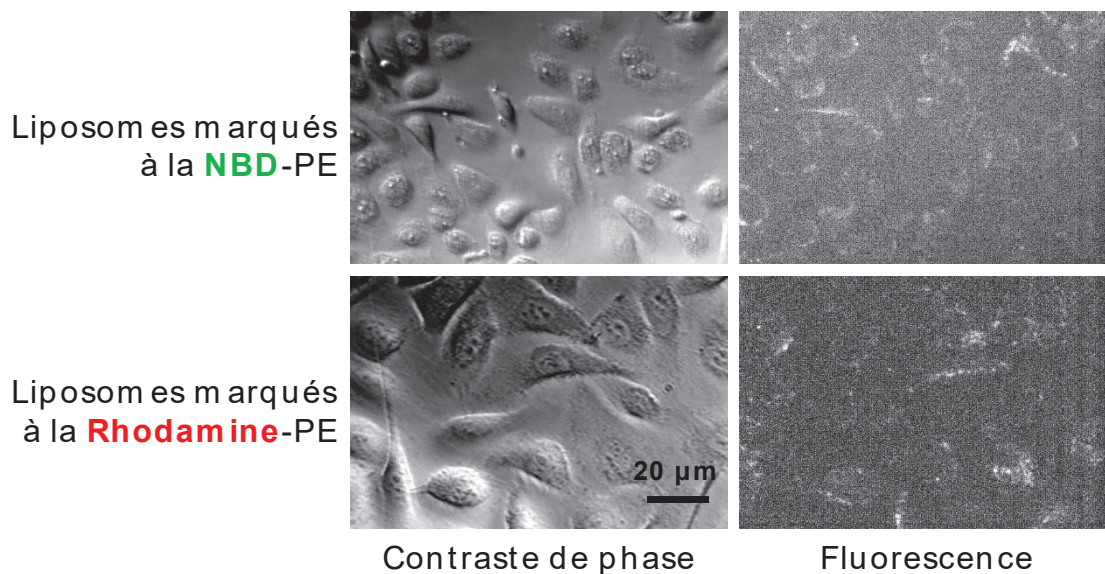
absence de marqueur fluorescent. Cependant, le marqueur fluorescent ne représentant que 2% de la quantité totale de lipides et étant le même dans toutes les préparations, nous avons considéré que la différence de fluidité observée sur des liposomes non-marqués reflète réellement la différence de fluidité existant entre les liposomes marqués par un lipide fluorescent.



**Figure 56.** Vérification de la présence de FRET entre la Rhodamine-PE et le Dioll.  $\lambda_{\text{max}}$  excitation = 485 nm,  $\lambda_{\text{max}}$  émission entre 400 et 600 nm pour les différentes compositions lipidiques utilisées.

#### 1.1.1.4. Choix du fluorophore

Une fois la gamme préparée et sa fluidité membranaire vérifiée, nous avons cherché à déterminer le meilleur fluorophore pour le marquage des liposomes, parmi la NBD-PE et la Rhod-PE. L'étude de la redistribution du fluorophore et de l'intensité du marquage obtenu par le marquage de cellules avec les liposomes marqués à la NBD-PE et à la Rhodamine-PE a montré que l'intensité obtenue est similaire pour les deux fluorophores (**Figure 57**). La NBD-PE étant compatible avec des marqueurs membranaires usuels (pour des applications de microscopie confocale avec double marquage), elle a été retenue pour le marquage des liposomes.

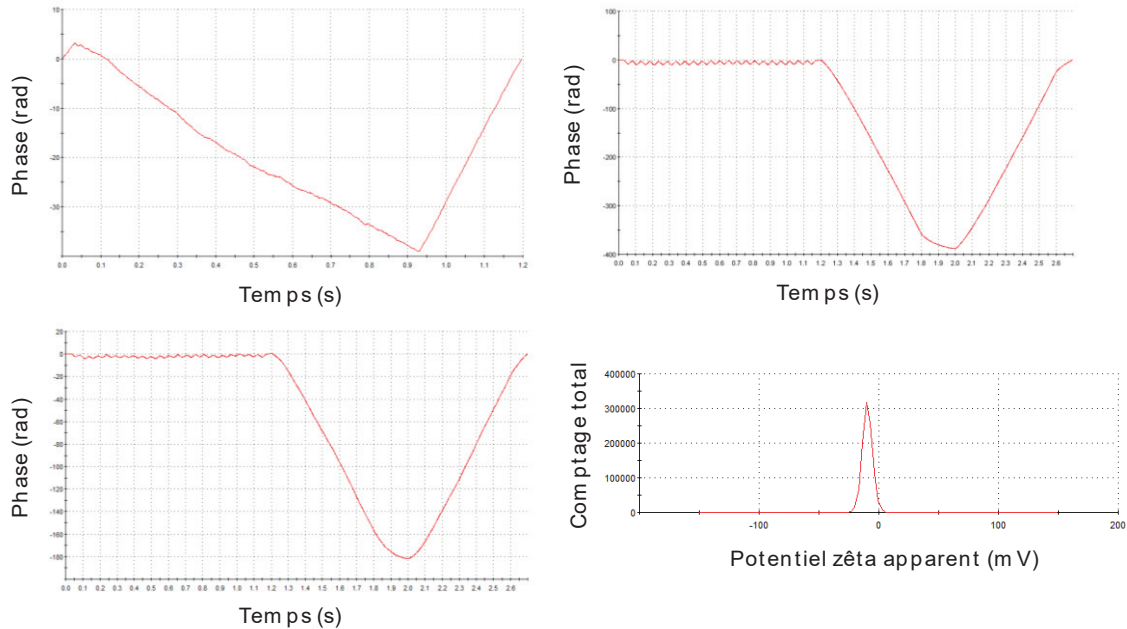


**Figure 57.** Comparaison du signal obtenu en fonction du marqueur fluorescent. Interaction de liposomes DMPC avec les cellules PC-3 comportant 2% de lipide fluorescent (rapport molaire), selon le protocole expérimental détaillé en « **Matériel et méthodes** » (3.2.1., page 108).

#### 1.1.1.5. *Mesure de la charge de surface des liposomes*

Enfin, la caractérisation des liposomes a été complétée en termes de taille, de polydispersité et de charge de surface par une analyse en DLS, dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Giovana LOLLO (LAGEPP - UMR CNRS 5007 - Equipe GePharm). La charge de surface mesurée correspond ici à la mesure du potentiel zêta, qui représente la différence de charge entre la surface d'une particule, et tous les contre-ions à grande proximité, avec un point de neutralité. La mesure de la charge de surface des liposomes a été rendue compliquée par le tampon utilisé pour resuspendre les lipides. En effet, ce tampon étant chargé en sels, ces derniers perturbent la mesure de la charge. Pour pouvoir réaliser cette mesure, il a été nécessaire de préparer une nouvelle gamme de composition, resuspendue cette fois dans un tampon HEPES non salin, pH 7,4. La différence de mesure obtenue est visualisable en consultant les diagrammes de phase présentés sur la **Figure 58**. Les diagrammes de phase **58a**, **58b** et **58c** correspondent respectivement au diagramme obtenu avec du tampon salin, au diagramme obtenu avec du tampon non-salin et au diagramme théoriquement attendu dans le cadre d'une mesure de bonne qualité. Ici, le diagramme de phase correspondant au tampon non-salin est

très proche de celui attendu, alors que celui correspondant au tampon salin s'en éloigne considérablement. La figure **58d** montre, quant à elle, la mesure de la charge de surface des liposomes pour une moyenne de -10 mV.



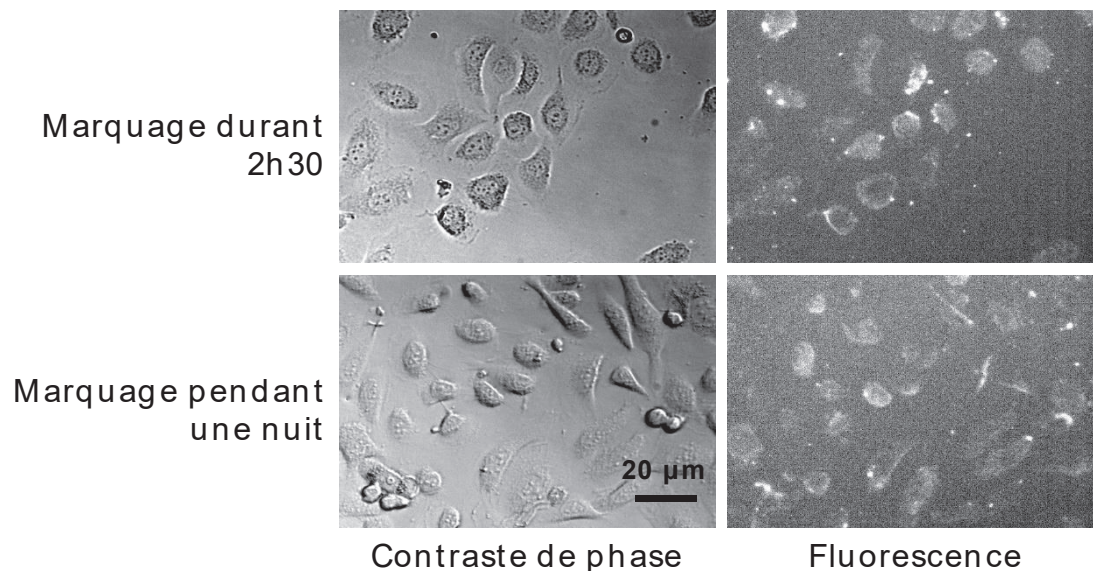
**Figure 58.** Influence du tampon sur la mesure du potentiel zêta.

- a. Diagramme de phase de liposomes PO resuspendus dans du PBS.
- b. Diagramme de phase de liposomes PO resuspendus dans du tampon HEPES.
- c. Diagramme de phase classique d'une mesure correcte (Source : Malvern Instruments).
- d. Mesure du potentiel zêta pour des liposomes PO resuspendus dans du tampon HEPES. Le pic observé montre un potentiel zêta de -10 mV.

### 1.1.1.2. *Mise au point du protocole de mesure de l'interaction liposome-cellule*

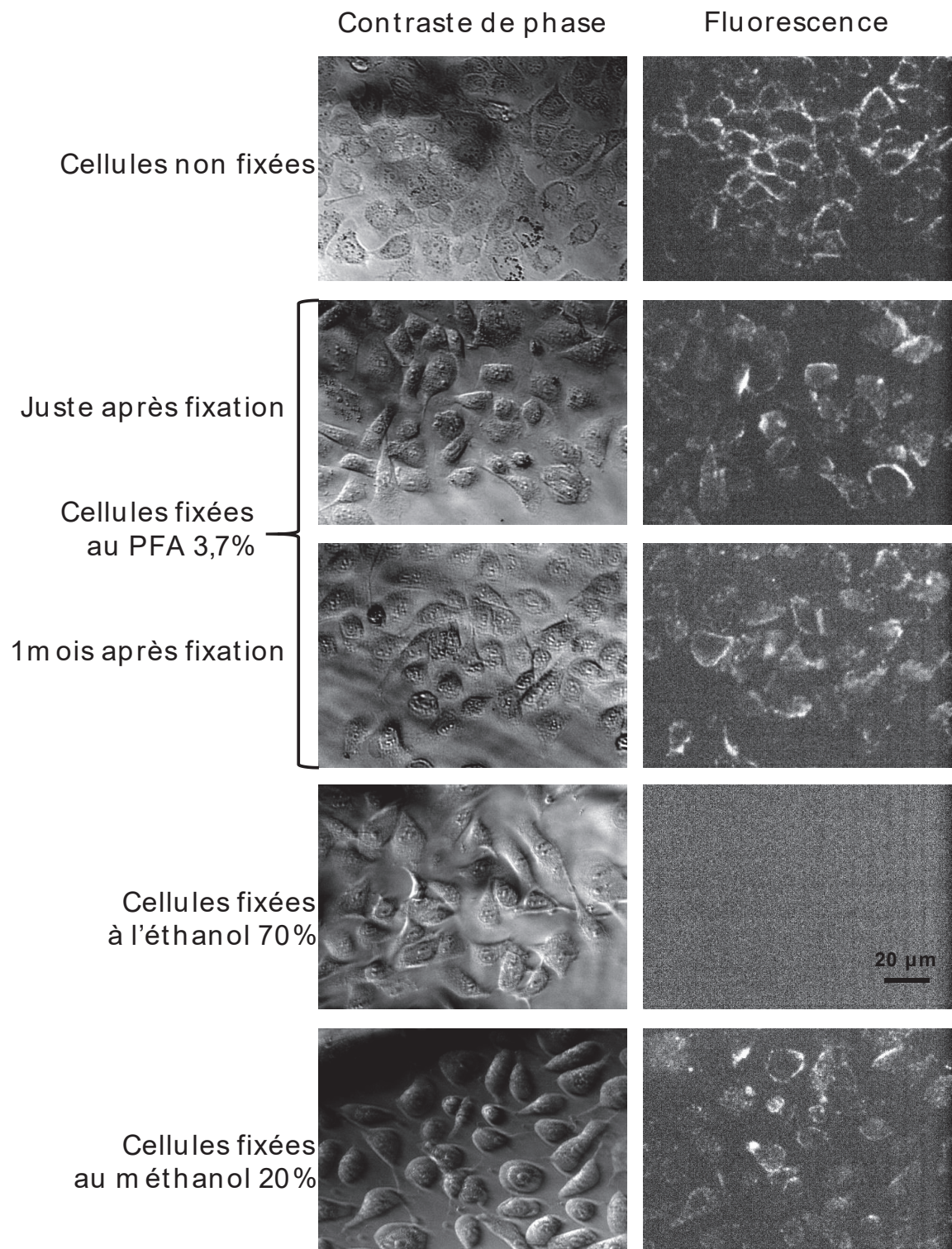
Les conditions initiales quant aux concentrations de liposomes ont été définies sur la base de travaux précédemment réalisés au laboratoire, qui avaient montré qu'une concentration excessive de liposomes ( $> 1$  g/L) laissait apparaître un signal non-spécifique, alors qu'une concentration trop basse ( $< 0,1$  g/L) se traduisait par un bruit de fond trop important. Ainsi, la concentration de 0,25 g/L a été retenue.

L'étude de l'influence de la durée d'incubation des liposomes avec les cellules a montré que le signal était similaire après 2h30 ou une nuit entière (**Figure 59**). Pour des raisons pratiques, la durée de 2h30 a été conservée.



**Figure 59.** Influence de la durée d'incubation sur le signal visualisé en microscopie d'épifluorescence. Interaction de liposomes PO marqués à la NBD-PE avec des cellules PC-3 pendant 2h30 ou toute une nuit, selon le protocole expérimental détaillé en « **Matériel et méthodes** » (3.2.1., page 108).

L'observation des plaques au microscope s'est heurtée à un problème majeur : la mort des cellules au cours de l'observation. En effet, en dehors de l'incubateur, les cellules rentrent assez rapidement en apoptose. Lors d'une observation longue, les cellules observées en début et en fin d'expérience ne sont plus dans le même état, ce qui fait varier le signal observé. Réaliser les observations en faisant baigner les cellules dans du milieu de culture frais aide à retarder l'échéance, mais ne résout pas le problème et perturbe l'acquisition du signal, le milieu de culture générant un bruit de fond supérieur à celui du tampon. La fixation des cellules par des agents pontant a été envisagée pour d'une part pallier ce problème, et d'autre part permettre d'observer de nouveau les plaques même quelques jours/mois après la première expérimentation. Les résultats de la **Figure 60** montrent les résultats obtenus pour 3 agents pontant testés, le *para*-formaldéhyde (PFA), l'éthanol et le méthanol. Ici, le PFA en particulier s'est révélé très efficace, avec un signal similaire aux plaques non-traitées et constant pendant au moins un mois de conservation.



**Figure 60.** Influence de la fixation sur le signal visualisé en microscopie d'épifluorescence. Interaction de liposomes PO marqués à la NBD-PE avec des cellules PC-3 selon le protocole expérimental détaillé en « **Matériel et méthodes** » (3.2.1., page 108).

Une fois ces optimisations réalisées, nous nous sommes attachés à l'étude de l'influence de la fluidité membranaire des liposomes sur leur interaction avec les cellules modèles de cancer de la prostate. Les résultats obtenus et leur interprétation seront résumés dans le paragraphe suivant, qui sera suivi de la publication elle-même.

### 1.1.2. Résumé de l'article « *Membrane Fluidity as a New Means to Selectively Target Cancer Cells with Fusogenic Lipid Carriers* », Bompard et al. dans *Langmuir* (2020)

Afin d'évaluer l'influence de la composition lipidique des vecteurs lipidiques sur leur interaction avec les membranes cellulaires, nous avons étudié l'interaction de liposomes couvrant une large gamme de fluidité membranaire avec quatre lignées modèles du cancer de la prostate.

Brièvement, six compositions liposomales ont été préparées, en faisant varier la taille et la saturation des chaînes de molécules de PC. Les liposomes préparés ont été caractérisés en termes de taille et de polydispersité par DLS et cryo-TEM, et en termes de fluidité membranaire à l'aide du marquage à la sonde Dioll. 4 lignées prostatiques ont été étudiées, allant d'une lignée contrôle issue de tissu contrôle (WPMY-1) à une lignée métastatique très agressive (par ordre d'agressivité : LNCaP, C4-2B et PC-3).

Les profils d'interaction des différentes préparations liposomales montrent que l'interaction liposome-membrane est influencée à la fois par la composition lipidique des liposomes utilisés, mais également par les caractéristiques du type cellulaire étudié. En effet, les liposomes ayant une membrane rigide ciblent préférentiellement les cellules contrôles, alors que les liposomes ayant une membrane plus fluide ont davantage de préférence d'interaction pour les cellules tumorales.

Des analyses de cytotoxicité et de viabilité cellulaire ont mis en évidence l'innocuité des liposomes préparés, un facteur important dans un contexte de vectorisation à visée thérapeutique.

Enfin, l'analyse du type de signal obtenu avec des liposomes marqués par un lipide fluorescent ou par un fluorophore soluble, par comparaison avec les signaux attendus pour différents mécanismes envisagés d'internalisation des liposomes, a permis de révéler que le principal mécanisme d'interaction entre liposomes et membranes est un processus de fusion membranaire, plutôt que des mécanismes d'endocytose ou d'adhésion à la surface de la membrane plasmique.

Ces résultats montrent bien que la composition lipidique des liposomes a un impact direct sur l'interaction liposome-membrane. L'hypothèse soulevée est que le paramètre modifié par les variations de composition lipidique, responsable de cette différence d'interaction, est la fluidité membranaire des liposomes. En effet, seules la longueur et la saturation des chaînes varient dans la gamme de composition lipidique ; la nature de la partie polaire ne variant pas. Cette hypothèse est étayée par trois publications indépendantes, qui montrent toutes une influence de la composition lipidique sur l'interaction membrane-membrane [334–336]. Une telle approche semble ainsi constituer une alternative solide aux stratégies habituelles de vectorisation ciblées, en proposant une solution à bas coût et facilement modulable, basée sur la composition lipidique plutôt que sur un greffage protéique coûteux. Enfin, cette approche se distingue également par le fait qu'elle promeuve une internalisation par fusion membranaire plutôt que par endocytose.

### 1.1.3. Publication



# Membrane Fluidity as a New Means to Selectively Target Cancer Cells with Fusogenic Lipid Carriers

Julien Bompard, Annalisa Rosso, Leyre Brizuela, Saïda Mebarek, Loïc J. Blum, Ana-Maria Trunfio-Sfarghiu, Giovanna Lollo, Thierry Granjon, Agnès Girard-Egrot, and Ofelia Maniti\*



Cite This: *Langmuir* 2020, 36, 5134–5144



Read Online

ACCESS |



Metrics & More

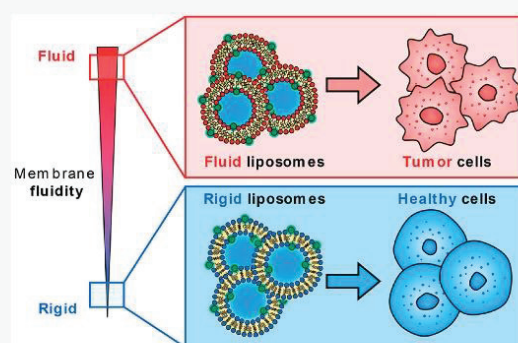


Article Recommendations



Supporting Information

**ABSTRACT:** Lipid-based carriers such as liposomes represent one of the most advanced classes of drug delivery systems. Their clinical success relies on their composition, similar to that of the cell membrane. Their cellular specificity often relies on a ligand–receptor interaction. Although differences in the physicochemical properties of the cell membrane between tumor and nontumor cells have been reported, they are not systematically used for drug delivery purposes. In this report, a new approach was developed to ensure selective targeting based on physical compatibility between the target and the carrier membranes. By modulating the liposome composition and thus its membrane fluidity, we achieved selective targeting on four cancer cell lines of varying aggressiveness. Furthermore, using membrane-embedded and inner core-encapsulated fluorophores, we assessed the mechanism of this interaction to be based on the fusion of the liposome with the cell membranes. Membrane fluidity is therefore a major parameter to be considered when designing lipid drug carriers as a promising, lower cost alternative to current targeting strategies based on covalent grafting.



## INTRODUCTION

The lack of specificity of cancer chemotherapy drugs is a major clinical concern in the development of effective treatments.<sup>1</sup> In the search for new drug delivery strategies, innovative solutions based on nanocarriers occupy an important place.<sup>2–5</sup> The main advantages of drug nanocarriers rely on their ability to accumulate in tumors, avoiding indiscriminate biodistribution, and to release the drug in an adjustable manner.<sup>6</sup> By improving drug distribution and bioavailability, this results in a better-tolerated therapy allowing the administration of higher doses, with reduced frequency.<sup>7</sup> Among the various types of nanoparticles, liposomes have been already used as drug carriers, and several formulations are currently marketed or in clinical trials.<sup>8–10</sup>

The clinical interest of liposomes relies on their composition: they are nanosized vesicles made of lipid bilayers surrounding a hydrophilic aqueous core.<sup>11,12</sup> In addition to being nontoxic, biocompatible, and biodegradable, their amphiphilic properties allow them to encapsulate both hydrophilic and hydrophobic drugs.

Like most submicrometer-sized drug carriers, liposomes attain the tumor site through a passive targeting mechanism based on the enhanced permeability and retention (EPR) effect, as the high vascularization of tumors increases the particle uptake when compared with healthy cells.<sup>13</sup> Yet, recent studies have shown that at least in the case of gold nanoparticles extravasation across endothelial cells is possi-

ble.<sup>14</sup> The passive targeting mechanism is in many cases high enough to reduce the side effects of chemotherapy treatments but suffers from a lack of selectivity toward capillary leakage. Passive targeting is dependent on many factors that may vary with different cancer types, such as a poor vascularization or a high interstitial pressure for solid tumors.<sup>15,16</sup>

To improve liposome attachment and interaction with target cells, active targeting strategies have been explored. So far, whatever the active or passive targeting strategy, nanoparticles reach the tumor site through passive accumulation (e.g., via the EPR effect). Most current strategies use the modification in membrane protein composition by grafting liposomes with ligands specific to an overexpressed membrane protein.<sup>17–19</sup> Some strategies alternatively use liposomes grafted with lectins to target a change in the carbohydrate composition of the membrane.<sup>20</sup> Cancer development also induces profound modifications of the membrane lipid composition, which invariably led to alterations of membrane physicochemical properties.<sup>21–28</sup> Additionally, changes in the membrane fluidity of the tumor cells have been reported and are thought to be

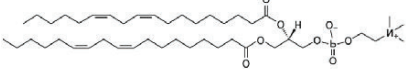
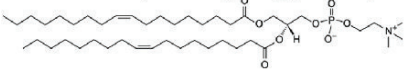
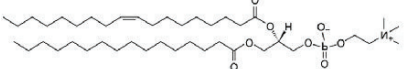
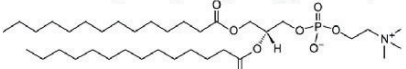
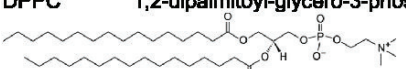
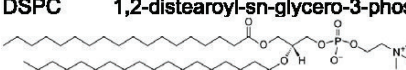
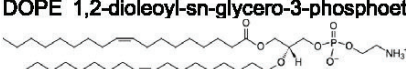
Received: January 30, 2020

Revised: April 24, 2020

Published: April 27, 2020



**Table 1. Lipids Used for Liposome Preparations, with the Lipid Names, Fatty Acid Compositions, Structure, and Phase Transition Temperatures ( $T_m$ )**

	Liposome preparation	Acyl chain composition	Lipid name and structure	$T_m$
Main lipid (80 %)	DL	18:2 (Cis) PC	DLPC 1,2-dilinoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	-57°C
				
	DO	18:1 ( $\Delta^9$ -Cis) PC	DOPC 1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	-17°C
				
	PO	16:0-18:1 PC	POPC 1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine	-4°C
				
Fusogenic lipid (20 %)	All preparations	DM	DMPC 1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	24°C
				
		DP	DPPC 1,2-dipalmitoyl-glycero-3-phosphocholine	41°C
				
		DS	DSPC 1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	55°C
				
		DOPE 1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine	-16°C	
				

associated with cancer progression, the tumor membranes becoming increasingly fluid.<sup>29–32</sup>

Such membrane physicochemical modifications have not been used for a drug delivery purpose. One reason is that most of the current active targeting strategies using liposomes rely on the functionalization of PEGylated liposomes with small molecules. Hence, the membrane fusion pathway remains largely unexplored in drug delivery applications, as the presence of a hydrophilic shell will inhibit membrane–membrane interactions and promote endocytosis mechanisms instead.<sup>33,34</sup> Alternative strategies to PEGylation exist, allowing for longer-lasting drug carriers relying on the modulation of liposome properties such as size, surface hydrophilicity, and surface charge via lipid composition.<sup>35,36</sup> Surface charge in particular is a key parameter when considering liposome blood stability, as the liposome binding by serum proteins relies on electrostatic interactions.<sup>37</sup> Moreover, it has been demonstrated on two animal models, rodent and zebra fish, that plasma protein association to liposomes also depended on lipid chain composition, with liposomes in a gel-like state being more easily covered with plasma proteins than their fluid counterparts.<sup>38,39</sup> This results in increased circulation times for fluid state liposomes. All these considerations open the possibility of obtaining long-lasting non-PEGylated liposomes with a strong propensity to fuse with the target membrane.

Differences in membrane fluidity were exploited for the delivery of hybrid liposomes (constituted of 90% DMPC and 10% polyoxyethylene dodecyl ethers), and the growth inhibitory effects were correlated to the membrane fluidity of cancer cells.<sup>40</sup> Additionally, hybrid liposomes discriminated between human hepatocellular carcinoma cells, with more fluid membranes, and normal hepatocytes, with the more rigid membranes, which could provide perspective of targeting the cell membrane by using differences in biophysical characteristics between tumor and normal cells.<sup>41</sup>

On the basis of the above-mentioned literature, in this work we decided to explore a novel concept based on liposome membrane fluidity to promote selective targeting. To validate our hypothesis, three prostatic tumor cell lines of increasing aggressiveness were used. Differences in liposome uptake were recorded in comparison to nontumor cells and between the metastatic lines. Such differences were related to the liposome membrane fluidity. The mechanism of this interaction was also investigated by following the internalization pathways of two fluorophores: calcein encapsulated in the liposome hydrophilic compartment and a fluorescent lipid embedded in the liposome membrane. The results revealed pronounced liposome fusion with target membranes.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Materials and Cells.** Lipids and polycarbonate membranes were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium, penicillin/streptomycin, phosphate buffered saline (PBS) composed of 10 mM phosphate, 137 mM NaCl, and 2.7 mM KCl, pH 7.4, dimethyl sulfoxide (DMSO), calcein, paraformaldehyde (PFA), and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

**Liposome Preparation.** Liposomes were prepared by using the thin film hydration method. Briefly, lipids dissolved in chloroform with a total lipid mass of 5 mg were mixed in a round flask. The solvent was dried under vacuum at 50 °C on a rotatory evaporator. The lipid film obtained was hydrated by 1 mL of sterile PBS while stirring and heated above the lipid melting point. This resulted in the formation of multilamellar vesicles (MLVs) with various sizes and number of layers. Six freeze–thaw cycles in liquid nitrogen were then applied to the prepared liposomes to burst the MLVs into large unilamellar vesicles (LUVs). The LUVs' size was defined by extrusion through a porous membrane with a mini-extruder (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL). Liposomes were heated above their phase-transition temperature ( $T_m$ ) and extruded through a 400 nm and then a 100 nm pore diameter polycarbonate membrane by using a mini-extruder apparatus (Avanti Polar Lipids). The final liposome solution was stored at 4 °C for 4 weeks, without further extrusion.

Liposomes with different lipid compositions were prepared (Table 1). A constant percentage (20%) of fusogenic lipid DOPE was used to promote the fusogenicity of the prepared liposomes. The remaining 80% of the lipid composition was made of phosphatidylcholines (PCs) with various acyl chain lengths and degrees of saturation and thus different phase transition temperatures. Six different PCs were used: DSPC, DPPC, DMPC, POPC, DOPC, and DLPC. This led to the creation of a range of liposome membrane compositions.

Fluorescent liposomes were prepared either with nitrobenzoxadiazole-grafted DOPE (NBD-PE) embedded in the liposome membrane or calcein internalized in the liposome hydrophilic core. NBD-PE was added at a 2% molar ratio to the flask prior to drying. Mass NBD-PE percentages ranged from 2.4% for DS, DO, PO, and DL liposomes to 2.5% for DP and 2.7% for DM liposomes. When hydrating the lipid film, the NBD-PE molecules were then directly incorporated in the membrane of the forming vesicles. Calcein-loaded liposomes were prepared by using calcein dissolved in PBS at a 500  $\mu$ M concentration. One milliliter of this buffer was used in lieu and place of the regular PBS when hydrating the lipid films. This resulted in the encapsulation of calcein in liposomes. Free calcein was eliminated from calcein-loaded liposomes through exclusion chromatography on PD-10 desalting columns (GE Healthcare, Chicago, IL).

**Liposome Characterization.** The membrane fluidity of liposomes was assessed by using an in-house Laurdan-derivative probe sensitive to the membrane polarity (Dioll, Patent pending EPO19306175.1).<sup>42</sup> Liposomes at a concentration of 0.1 g/L were incubated with the probe at 2  $\mu$ M for 15 min, and then the fluorescence emission spectrum was recorded on a FP-8500 spectrofluorometer (JASCO Applied Science, Halifax, Canada), with emission and excitation slits set at 2.5 nm. Spectra were recorded from 400 to 600 nm at 37 °C, with an excitation  $\lambda_{max}$  set at 390 nm. The generalized polarization (GP) parameter was calculated as indicated in eq 1, where  $I_{440}$  is the fluorescence emission intensity at 440 nm (gel phase) and  $I_{490}$  is the fluorescence emission intensity at 490 nm (liquid crystalline phase).<sup>43</sup> Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments.

$$GP = (I_{440} - I_{490}) / (I_{440} + I_{490}) \quad (1)$$

The liposome distribution and surface charge were analyzed by using a Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK). Particle size and polydispersity index (PDI) were determined by dynamic light scattering (DLS) at a concentration of 1 mg/mL liposomes in PBS. Analyses were

performed at 25 °C with an angle of detection of 173 °C. The  $\zeta$ -potential values were measured by the electrophoresis technique. For  $\zeta$ -potential measurements, liposomes were prepared in a low ionic salt buffer (HEPES, 20 mM, pH 7.4). The stability of the particles was investigated by following the size and PDI of the preparations 1, 2, 3, and 4 weeks after preparation. Liposome size results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation of three independent liposome preparations. Liposome PDI results were expressed as the mean PDI of the preparations and were measured concurrently with liposome size on three independent liposomes preparations.

Liposome morphology was analyzed by cryogenic transmission electron microscopy (Cryo-TEM) at the "Centre Technologique des Microstructures" (CT $\mu$ ) facility of the University of Lyon. Diluted samples of liposomes were dropped onto 300 mesh holey carbon films (Quantifoil R2/1) and quench-frozen in liquid ethane by using a cryo-plunge workstation (made at Laboratoire de Physique des Solides-LPS, Orsay, France). The specimens were then mounted on a precooled Gatan 626 sample holder, transferred into the microscope (Phillips CM120), and observed at an accelerating voltage of 120 kV.

**Cell Culture.** Four human cell lines were used as *in vitro* models: WPMY-1, LNCaP, C4-2B, and PC-3. The WPMY-1 cell line was originally obtained from healthy prostate tissue surrounding a tumor.<sup>44</sup> LNCaP is a hormone-sensitive cell line obtained from a lymph node metastasis derived from a prostate tumor.<sup>45</sup> The C4-2B cell line was obtained as a subline of LNCaP xenografts in castrated mice, resulting in the formation of a hormonal independent bone metastasis.<sup>46</sup> The PC-3 cell line was isolated from a vertebral metastasis stemming from a prostate tumor and entirely composed of carcinoma cells.<sup>47</sup> WPMY-1 and LNCaP cell lines were purchased from ATCC (Manassas, VA). PC-3 and C4-2B cell lines were a kind gift from Dr. Olivier Cuvillier (Institute of Pharmacology and Structural Biology, Toulouse, France).

WPMY-1 cells were cultured in DMEM supplemented with 5% (v/v) FBS, 100 U/mL penicillin, and 100  $\mu$ g/mL streptomycin. The LNCaP, C4-2B, and PC-3 cells were cultured in RPMI medium supplemented with 10% (v/v) FBS, 100 U/mL penicillin, and 100  $\mu$ g/mL streptomycin. All cells were cultured in a humidified incubator at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. After standard trypsinization, cells were seeded to the adapted density for cell viability and cytotoxicity assays and for liposome–cell interaction characterization.

**Cell Viability Assay.** The number of adherent viable cells was assessed by using the MTT assay, which is based on the reaction of a colorless tetrazolium salt with cellular reductases to form purple formazan crystals.<sup>48</sup> Cells ( $6 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> for WPMY-1 and LNCaP,  $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> for C4-2B and PC-3) seeded in 12-well plates were treated with liposomes for 2 h 30 min, washed with PBS, and cultured in fresh medium for an additional 72 h. Afterward, MTT was added at a final concentration of 0.125 g/L. The plate was further incubated for 3 h at 37 °C, after which the culture medium was removed, and the formed formazan crystals were dissolved in 1 mL of DMSO. After 20 min incubation, the absorbance of the plate was measured at 570 nm. Absorbance measurements were conducted on an Infinite-M200 Pro plate reader (TECAN, Männedorf, Switzerland). Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments.

**Cytotoxicity Assay.** Cell death was assessed by using the lactate dehydrogenase (LDH) assay that relies on the detection of a cytosolic enzyme, the LDH, in the culture medium as an indicator of membrane disruption upon cell death. Cells ( $6 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> for WPMY-1 and LNCaP,  $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> for C4-2B and PC-3) seeded in 12-well plates were treated with liposomes for 2 h 30min, washed with PBS, and cultured in fresh medium for an additional 72 h. LDH was detected in 50  $\mu$ L of culture medium by using an LDH cytotoxicity assay kit (Sigma-Aldrich), as described by the manufacturer. Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments.

**Liposome–Cell Interaction Characterization.** WPMY-1, LNCaP, C4-2B, and PC-3 cells were plated overnight in 96-well plates with a cell density of  $6 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> for WPMY-1 and LNCaP and  $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> for C4-2B and PC-3. The amount of

cell per well was chosen to ensure 80% surface coverage prior to liposome addition. NBD-PE or calcein fluorescent liposomes were added at a final concentration of 0.25 g/L, and the plate was further incubated for 2 h 30 min at 37 °C. The plates were rinsed three times with PBS, fixed with PFA 3.7% in PBS for 10 min, and then rinsed three more times with PBS. Finally, the plates were visualized by using an AxioObserverZ.1 (Zeiss, Oberkochen, Germany) epifluorescence microscope.

The fluorescence signal was quantified by calculating a corrected total cell fluorescence (CTCF) parameter by using ImageJ software. The cell surface was delimited, and the intensity of pixels contained in the cell was summed. The resulting total cell fluorescence was divided by the area occupied by the cells to obtain a mean cell light density. CTCF was obtained after equalization of the mean cell light density against the mean density of background readings in the same field of view, following eq 2.

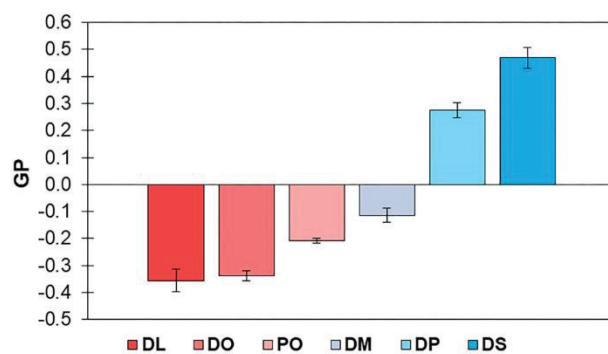
$$\text{CTCF} = \text{mean cell density} - \text{mean background density} \quad (2)$$

For each cell line/liposome composition couple, the CTCF was calculated on a total of 30 cells, spread over six independent cell culture wells. To allow further comparison between cell lines, results were expressed as a percentage of targeting, with the strongest interaction corresponding to 100% targeting. Data followed a normal distribution. The Student's *t* test was used to analyze the data. Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation and were considered significant when  $p < 0.05$  (\*) and highly significant when  $p < 0.01$  (\*\*).

## RESULTS

**Design of Liposomes of Controlled Membrane Fluidity.** To target cancer cell membranes, liposomes covering a wide range of membrane fluidity were prepared as detailed in Table 1. For all liposome preparations, 20 mol % of fusogenic lipid DOPE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine) was used to favor membrane fusion mechanisms between liposomes and plasma membranes. The membrane order degree (membrane fluidity) was dictated by the remaining 80%, which were constituted of phosphatidylcholines presenting various acyl chain lengths and degrees of unsaturation. DSPC, DPPC, and DMPC are phospholipids with saturated chains (18, 16, and 14 carbons, respectively). These preparations were denoted as DS, DP, and DM. POPC is a phospholipid with a saturated 16-carbon and an unsaturated 18-carbon chain (PO preparation); DOPC and DLPC possess two unsaturated 18-carbon chains with one and two double bonds, respectively (DO and DL preparations).

To ensure that the membrane composition range translated in a membrane fluidity range at 37 °C, the degree of membrane ordering (fluidity) was quantified by using an in-house Laurdan derived sensitive to membrane polarity, inserted in the liposome membrane (Dioll, patent pending EPO19306175.1). This probe spontaneously inserts in the bilayer, and its fluorescence emission is sensitive to the viscosity of its environment (e.g., Dioll inserted in DMPC liposomes shifted its maximum emission fluorescence (Figure S1) from 440 nm at low temperature (gel state) to 490 nm (liquid crystalline state)). A generalized polarization (GP) parameter can be calculated from the spectra as described in the Experimental Section (eq 1). GP evolution as a function of temperature presents an inflection point around 24 °C, which is in line with  $T_m$  values characteristic from DMPC (Figure S1). In our case, we used the fluorescence spectra of Dioll (Figure S2) and the resulting GP parameter to quantify the fluidity state of the six liposome preparations used (Figure 1) at 37 °C.



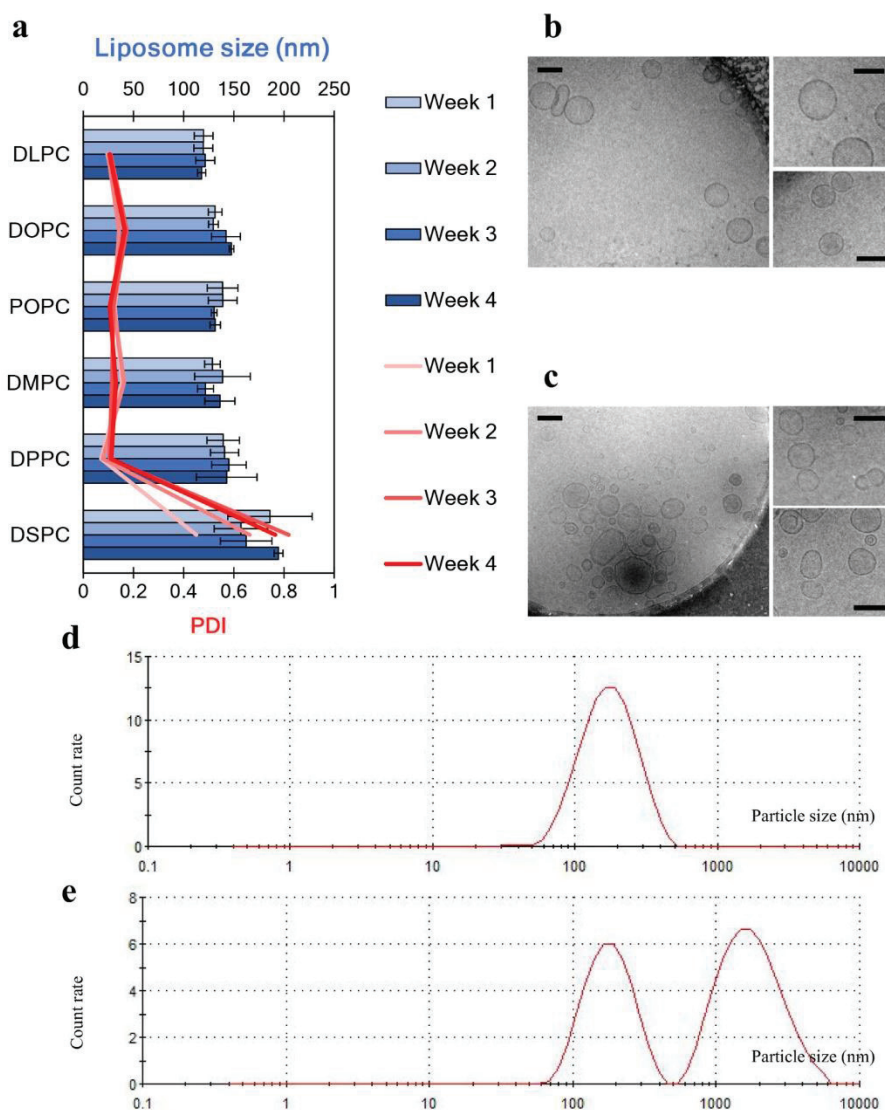
**Figure 1.** Lipid composition dictates liposome fluidity. GP values are calculated for each liposome composition as mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments at 37 °C.

At 37 °C, membranes of DL and DO liposomes made of phospholipids with long and unsaturated acyl chains were in a fluid state as indicated by the negative GP values of  $-0.36 \pm 0.04$  and  $-0.34 \pm 0.02$ , respectively. Membranes of PO and DM liposomes reached a more rigid but still fluid state, as revealed by the higher but still negative GP values of  $-0.21 \pm 0.03$  and  $-0.11 \pm 0.03$ , respectively. Membranes of DP and DS liposomes were at a more rigid state as shown by GP positive values of  $0.27 \pm 0.03$  and  $0.47 \pm 0.04$ , respectively. As expected, the fluidity state of the liposomal membrane depends on the lipid chain length and the acyl chain degree of unsaturation and was quantitatively evaluated by the GP value (Figure 1).

To check the quality of the preparation in view of *in cellulo* use, the size and polydispersity of liposomes were measured (Figure 2a). Except DS, all liposome preparations showed an average size between 120 and 160 nm, constant for 4 weeks at least, with a rather low polydispersity index (PDI) and a typical size distribution histogram showing a single peak. For the very rigid DS preparation, two populations are present on the size distribution histogram: a population with an average diameter of 160 nm, which is consistent with that evidenced for PO liposomes (Figure 2d), and another population with a larger size, higher than 1  $\mu\text{m}$  (Figure 2e). This results in a high PDI value (0.4). Yet, even for this more disperse preparation, the population of nanoparticles with a diameter lower than 200 nm was systematically present in the preparation for 4 weeks. These findings were confirmed by Cryo-TEM analysis (Figure 2b,c) which show typical unilamellar vesicles of 100–200 nm. No micrometer-sized vesicles were observed. We can attribute the peak situated at 1  $\mu\text{m}$  on the size histogram of DS liposomes to vesicle aggregation in this rigid preparation.

The  $\zeta$ -potential measurements showed a slightly negative surface potential around  $-10$  mV, which can be attributed to the presence of the heads of PC groups which are oriented through the external water phase. This has been demonstrated also for other PC-based nanosystems.<sup>49–51</sup> This value is lower than that obtained for liposomal carriers containing positively charged components (DOTAP).<sup>52</sup> Even though the liposomes were made of zwitterionic lipids such as PC and PE, the global surface charge was not neutral: the charge delocalization at the lipid headgroup creates weak charge repulsion forces between liposomes, preventing them from coalescing or fusing into larger vesicles over the course of 4 weeks.

Calcein was loaded in the six liposome preparations, and calcein fluorescence intensity was plotted as a function of the



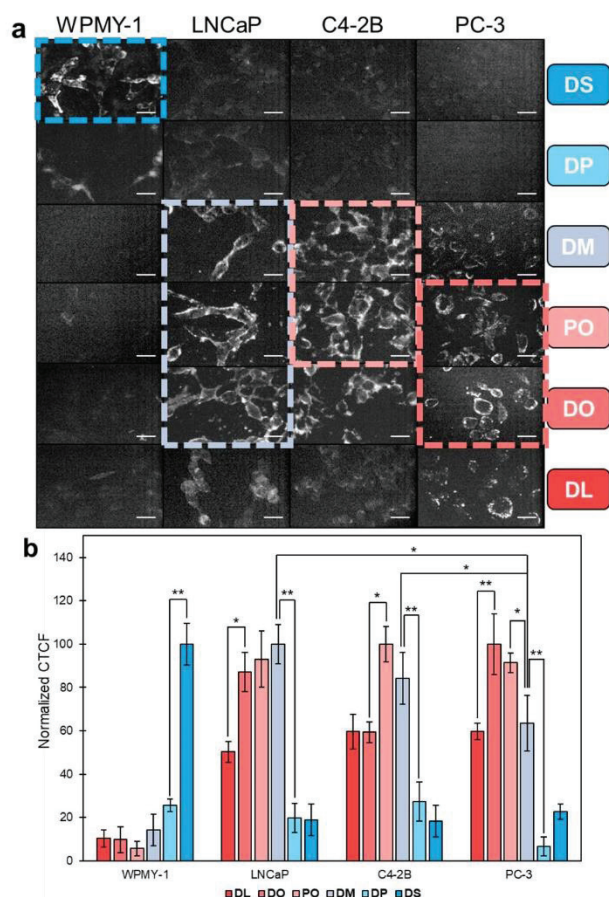
**Figure 2.** Monodisperse liposomes show a good stability over 4 weeks. (a) Liposome average size in blue and polydispersity index (PDI) in red. Plot of representative means ( $\pm$ SD) of three independent experiments per liposome preparation over the course of 4 weeks. Isolated PO (b) and DS (c) liposomes visualized by Cryo-TEM. Scale bars: 200 nm. Size distribution plots of PO (d) and DS (e) liposomes.

liposome preparation after removal of excess molecules by size exclusion chromatography (Figure S3). All liposome preparations encapsulated the fluorophore, but fluid liposomes such as DL and DO preparations were the most efficient.

**Liposome Fluidity and Active Cell Targeting.** The selective interaction of liposomes modulated by their membrane fluidity was tested on four cell lines chosen as models of human prostate cancer: WPMY-1, a nontumor control; LNCaP, lymph node hormone-sensitive low-aggressiveness metastasis; C4-2B, hormone-independent bone metastasis of intermediate aggressiveness; and PC-3, highly aggressive bone metastasis.

To monitor the liposome–cell interactions, nitrobenzoxadiazole-grafted DOPE (NBD-PE), a fluorescent lipid, was embedded in the liposomal lipid bilayer at a 2% molar ratio. The liposome preparations were incubated with adherent cells, and the internalization was followed by epifluorescence microscopy (Figure 3a). Liposome stability in the cell culture

medium was checked with calcein-leakage experiments (Figure S4), and all the preparations used were found to be stable over several hours in cell culture medium supplemented with FBS. The extent of the interaction was quantified by calculating the corrected total cell fluorescence (Figure 3b). The interaction pattern was different for each cell line. For the control WPMY-1 cells, an efficient targeting was achieved with the most rigid DS liposomes. Of note, DA liposomes (composed of 78% DAPC (C20:0), 20% DOPE and 2% NBD-PE) also strongly interacted with WPMY-1, but not with PC-3 cells, which confirmed that control cells preferentially interact with rigid liposomes. The fluorescence intensity quantified on fluorescence images of WPMY-1 cells incubated with DA liposomes was lower than that obtained for DS liposomes (Figure S5), which indicated that an optimal composition for WPMY-1 targeting was DS. LNCaP cells were targeted by DM, PO, DO, and, more marginally, DL liposomes. C4-2B cells interacted with PO and DM and showed a weaker signal with DO and



**Figure 3.** Lipid composition dictates cell uptake of liposomes. (a) Epifluorescence microscopy images of the interaction of WPMY-1, LNCaP, C4-2B, and PC-3 cells with six liposome preparations detailed in Table 1 after 2 h 30 min incubation. Scale bars: 20  $\mu\text{m}$ . (b) Fluorescence intensity quantification using the CTCF method. Plot of means ( $\pm$ SD) of 30 individual cell measurements spread over six independent assays. Results expressed as a percentage of targeting, with the strongest interaction corresponding to 100% targeting. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  (Student's  $t$  test).

DL. PC-3 cells strongly interacted with DO and PO preparations and more modestly with DM and DL; none of the metastatic cell lines showed an interaction with the rigid DP and DS liposomes. Hence, the difference in the signal obtained shows the influence of the liposomal lipid composition on the targeting pattern: liposomes primarily made of fluid-state lipids target the tumor cells, while liposomes made of rigid-state lipids target the control cells.

Among fluid liposomes, if we look more precisely to behavior DM liposomes discriminate PC-3 cells from C4-2B cells ( $p = 0.045$ ) and LNCaP cells ( $p = 0.014$ ).

**Cell Viability and Cytotoxicity of Liposomes.** To check the biocompatibility of the liposome in a 2D cell culture model, we performed cytotoxicity and cell viability assays on the four cell lines immediately after 2 h 30 min treatment with liposomes to check for immediate toxicity or 72 h post-liposome treatment to exclude toxicity effects through activation of metabolic pathways. Figure 4a shows the cell viability evaluated by the MTT metabolic test after 72 h incubation, which was very little affected by liposome

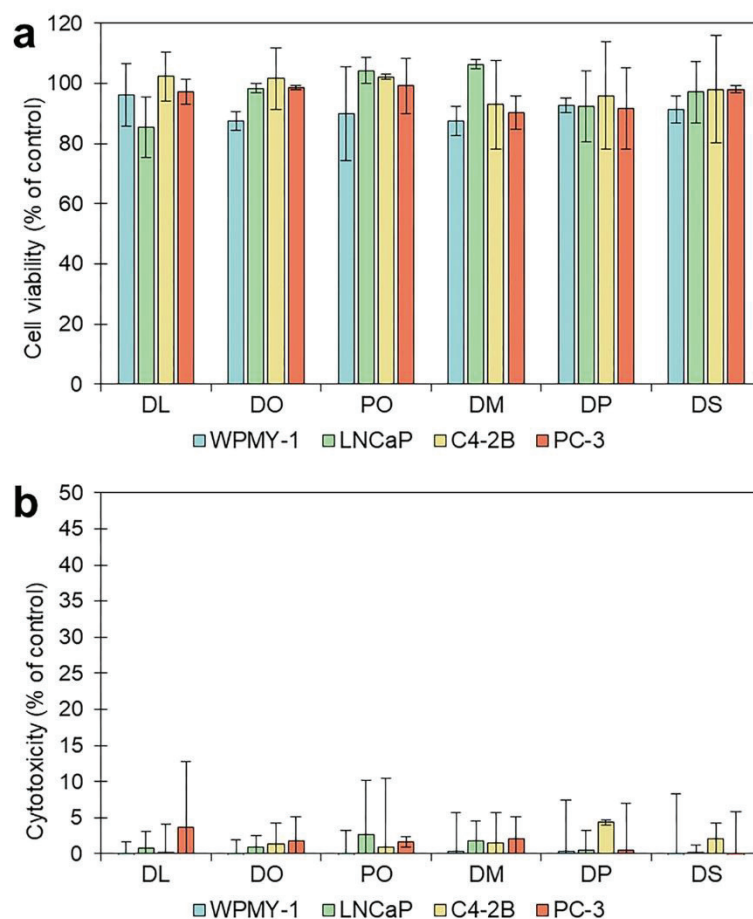
incubation. A similar conclusion was drawn from LDH cytotoxicity test: no LDH leakage was observed after incubation with liposomes (Figure 4b). No toxic effects were observed after 2 h 30 min incubation with liposomes (Figure S6). Therefore, the prepared liposomes make excellent drug carriers, as they have no toxic effect on cells.

**Liposome–Cell Interaction Mechanism.** The mechanism of the liposome–membrane interaction was investigated by using two fluorophores: NBD-PE, a fluorescent lipid integrated into the liposomal membrane (Figure 5a), and calcein, a fluorescent probe encapsulated in liposomes (Figure 5b). Based on the targeting patterns presented in Figure 3, two liposome compositions were tested: POPC/DOPE 80:20 (PO), as it interacts with the three cancer cell lines, and DSPC/DOPE 80:20 (DS), as it interacts with the control cell line.

The results revealed a strong difference in the fluorescence distribution inside the cell depending on the encapsulated fluorophore. Liposomes incorporating NBD-PE led to a fluorescent signal localized at the cell membrane (Figure 5a). Yet, at the microscope resolution, it is difficult to see whether the fluorophore is distributed inside the plasma membrane or in the membrane of liposomes attached to the cells. We can, however, exclude an endocytosis pattern in which liposomes and fluorophore would be distributed in the inner compartments of the cell (endocytic vesicles, endosomes, etc.). The NBD-PE distribution pattern was therefore indicative of either liposome adhesion to the cell membrane or liposome fusion with the membrane and consequent distribution of the fluorophore in the plasma membrane (Figure 5a). To discriminate between these two possibilities, we used calcein-loaded liposomes. In this case, calcein is a hydrophilic fluorophore which is expected to be encapsulated in the inner compartment of the liposomes. Indeed, this fluorophore is readily released upon liposome-burst experiments.<sup>54</sup> After incubation with calcein-containing liposomes, the fluorophore was mainly distributed in the cytoplasm (Figure 5b). Therefore, calcein-containing liposomes either are internalized through endocytosis pathways or release their internal content in the cytoplasm upon membrane fusion processes. Yet, in the case of vesicle internalization the two fluorophores are expected to colocalize. This is not the case, as the two fluorophores show different distributions inside the cell: NBD-PE, which is of hydrophobic nature, remains at the cell membrane, whereas calcein, which is hydrophilic, is distributed in the cytoplasm. Therefore, among the main mechanisms proposed—endocytosis, membrane fusion, or liposome adhesion to the cell membrane—the results supported a membrane fusion process leading to the distribution of the fluorescent lipid in the cell membrane and the release of calcein in the cytosol.

## DISCUSSION

The process of tumor development modifies in a major way all cellular physiological pathways.<sup>55</sup> This leads to many adaptations that enable tumor cells to survive, proliferate, and invade surrounding tissues. Among these, changes in membrane lipid composition resulting in membrane fluidity modifications have been widely reported.<sup>21,27–29</sup> In this study, we used membrane fluidity modulations as a new way to selectively target tumor cells with liposomal carriers. We prepared liposomes using PCs with various acyl chains to obtain a membrane fluidity scale ranging from rigid to fluid, as



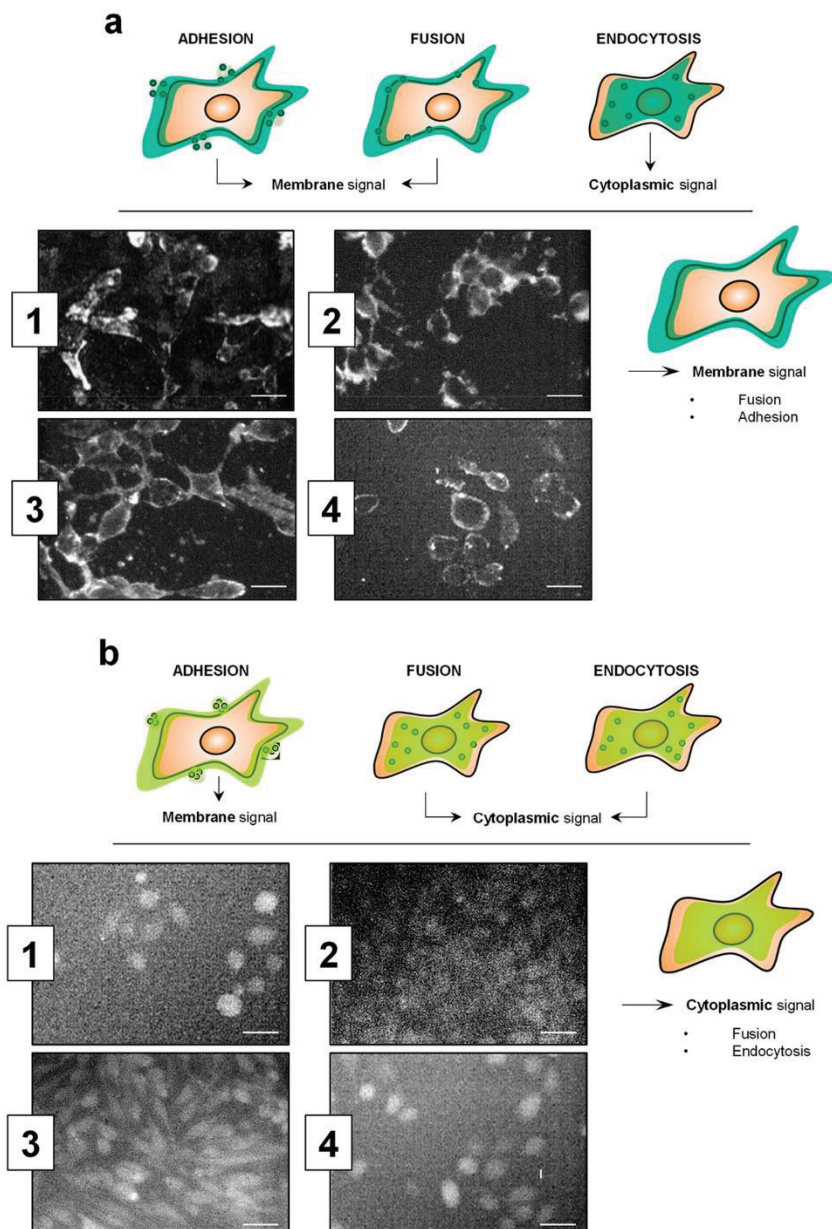
**Figure 4.** Liposomes do not affect cell viability and show no cytotoxic effect. (a) Cell viability quantification, assessed on plated cells with the MTT assay 3 days after liposome treatment. Results expressed as a percentage of cell viability relative to an untreated control corresponding to 100% viability. (b) Cytotoxicity quantification, assessed on the same cells than (a) with the LDH assay. Results expressed as a percentage of cell death relative to an untreated control corresponding to 0% toxicity and a control treated with 10% Triton X-100 corresponding to 100% toxicity.

reported by a polarity-sensitive probe (Figure 1). Except for the DS preparation, which was very rigid and in which the  $T_m$  difference between DSPC and the much lower melting DOPE may induce significant demixing, the liposome preparations used were monodisperse and stable for several weeks (Figure 2). By tracking the fluorescent lipid NBD-PE incorporated in the liposome membrane, we investigated the interaction of these liposomes with a nontumoral (control) and three different tumor cell lines and show that prepared liposomes achieve specific targeting of tumor or control cells solely on the basis of their lipid composition (Figure 5). The intrinsic membrane fluidity of the liposomes seems therefore to be determinant for liposome–cell interaction specificity. Yet, as discussed above, DS liposome preparation shows a high dispersity in terms of size and may contain a large proportion of larger particles; therefore, a size effect cannot be excluded. A through study of the influence of the size of liposomes should be considered in the future to better understand the fusion mechanism and the cell specificity.

Moreover, the interaction of fluid-state liposomes with tumor cells showed a different signal between the low-aggressive LNCaP and C4-2B cells, on one hand, and the highly aggressive PC-3 cells on the other hand. While DM liposomes interact strongly with LNCaP and C4-2B cells, they

interact less efficiently with PC-3 cells. This suggests that the fluidity of the liposomal membrane is, along with liposome size, surface charge, and hydrophilicity, one of the physicochemical parameters that affect liposome uptake by promoting liposome–cell interactions and the subsequent liposome fusion with the plasma membrane. It is interesting to notice that fluid liposomes were the most selective not only in terms of uptake but also in terms of amount of fluorophore encapsulated (Figure S3).

To explore the mechanism of liposome–cell membrane interaction, we used liposomes embedding NBD-PE in the lipid bilayer or encapsulating calcein in the hydrophilic core to follow the internalization profile. The NBD-PE fluorescence profile was restricted to the cell membrane whereas calcein showed a cytoplasm diffuse pattern. Considering three possible mechanisms of interaction—adhesion of liposomes to the cell, fusion of the liposome with the cell plasma membrane, and internalization through endocytosis—the profile obtained with both NBD-PE- and calcein-loaded liposomes (Figure 5) matched the expected signal for a liposome–cell membrane fusion. This points out that the internalization is mainly based on fusion phenomena. This fusion mechanism, which appears controlled by the match of the membrane fluidity between the cell and the liposomes membranes, is probably favored by the



**Figure 5.** Two fluorophore interaction pattern highlights a fusion mechanism. (a) Predicted and experimental interaction patterns for liposomes incorporating NBD-PE in the liposomal membrane. Epifluorescence images of WPMY-1 (1), LNCaP (2), C4-2B (3), and PC-3 (4) cells, incubated with liposomes containing 2% of NBD-PE. (b) Predicted and experimental interaction patterns for liposomes encapsulating calcein. Epifluorescence images of WPMY-1 (1), LNCaP (2), C4-2B (3), and PC-3 (4) cells, incubated with liposomes encapsulating 500  $\mu\text{M}$  calcein. Images shown are representative of three independent measurements on each cell line. In both cases, cells were incubated with the liposome composition that exhibited maximal interaction, i.e., DS for WPMY-1 cells and PO for LNCaP, C4-2B, and PC-3 cells. Scale bars: 20  $\mu\text{m}$ .

presence of DOPE, a fusogenic lipid in the liposome membrane, as its conical geometry promotes the formation of inverted hexagonal intermediate structures that lead to the formation of fusion pores.<sup>56</sup> For drug delivery purposes, such a mechanism is very promising, since fusion leads to the release of the entrapped drug directly in the cytosol of the targeted cells. Indeed, liposomes adhering to the cell surface exhibit poor drug release, and endocytic pathways lead to the early and late stages of endosomes that fuse with lysosomes, often leading to a lower activity of the encapsulated drug. Additionally, cytotoxicity and cell viability assays revealed no

toxic effect of liposomes on all cell lines tested (Figure 4). This highlights the drug delivery potential of these liposomes, as they specifically target tumor cells while remaining nontoxic to the control cells. It must be stressed here that instead of relying on the difference in membrane carbohydrate or protein composition usually used in current targeting strategies, these liposomes achieve specific targeting based on membrane fluidity differences.

Membrane fluidity is one of the key parameters for membrane fusion, since it determines the mobility of lipids, proteins, and water molecules that cooperate in the



reorganization and the assembly required and induced by the membrane fusion.<sup>57</sup> As it is directly dependent on the membrane lipid composition, any modification of the lipid metabolism results in a membrane fluidity change. Many studies found a link between membrane lipid composition, membrane physicochemical state, and pathologies, especially in the case of cancers where higher unsaturation of acyl chains is associated with an elevated membrane fluidity and metastasis aggressiveness.<sup>21,58</sup> A previous study of PC-3 and WPMY-1 cells, the two extremes in the range of aggressiveness of the cell lines used, revealed that the membrane of the highly aggressive and metastatic PC-3 cells is less viscous and more prone to deformation than that of the control WPMY-1 cells.<sup>52</sup> In this study, we found that the liposome–cell interaction is sensitive to the membrane lipid composition, with fluid-state liposomes targeting the flexible and metastatic cells, whereas rigid-state liposomes target the stiffer control cells. In addition, we determined that the interaction mechanism is mainly based on a membrane fusion process, which supports the idea that targeting relies on a difference in the physicochemical properties of the membrane and, in particular, on differences in membrane fluidity.

The role of lipid composition in liposome design has been widely studied. However, until now, it was generally recognized as a parameter affecting the global liposome stability and the drug encapsulation efficiency.<sup>59</sup> A recent study shows that tailoring the lipid composition of nanoparticles modulates their cellular uptake in triple negative breast cells (4 T1).<sup>60</sup> In addition to the lipid headgroup, acyl chain length and unsaturation also largely influence cellular uptake in triple negative 4 T1 breast cancer cells, with an increased uptake for liposomes constituted of C18:1 acyl chains. Moreover, membrane fluidity of the liposomes seems to play an important part in determining the liposome uptake as a major effect of cholesterol, a modulator of membrane fluidity of the liposomes, is observed. In our case, POPC and DOPC liposomes, which contain C18:1 chains, largely and selectively interact with prostate tumor cell lines. Yet, intrinsic differences between breast and prostate cancer cell lines seem to exist in terms of membrane composition and/or metabolic pathways and determine liposome uptake. No uptake was measured for long and saturated chains as C18:0 and C16:0 in prostate cancer cell lines, and cell viability was affected by C12:0-containing liposomes (not shown), but not by C14:0 (DM) liposomes (Figure 4) as it was the case for breast cancer cells. Two other previous studies also found that the lipid composition of a nanoparticle could affect its interaction with cells.<sup>61,62</sup>

In the present report, we show that targeting can be achieved by modulating the liposome physical state. Yet, the use of liposomes as drug carriers cannot be discussed without considering factors related to circulation *in vivo*, such as blood protein binding, interaction with circulatory cells, or cholesterol transfer. Tailoring lipid composition by modulating particle global charge may yield hydrophilic vesicles, and thus limit plasma protein binding, while maintaining fluidity state. Studies of association of plasma proteins with liposomes have also shown that liposome membrane properties such as its fluidity state, above or below lipid melting points, determines particle circulation properties, as plasma protein binding depends on the fluidity state of the membrane.<sup>38,39</sup> Altogether, fine-tuning of the lipid composition of carriers is a promising strategy to promote specific drug delivery. These findings shed

new light on liposome membrane composition, which in turn modulates membrane fluidity, by highlighting its role as a key targeting parameter.

## CONCLUSION

Selective drug delivery strategies is a Holy Grail in cancer therapy. Here, we report for the first time a valid alternative targeting based on liposome membrane fluidity. Using this approach, we can easily tune liposomes to promote liposome fusion with the target membrane. This strategy has been proved successful in selective targeting of four prostatic cell lines. Unlike conventional approaches, it does not rely on proteins or carbohydrates functionalization and constitutes a cost-effective alternative to promote membrane fusion and consequently avoid endocytosis and lysosomal degradation. Altogether, the carrier's ability to target a particular cell type according to its membrane fluidity and its fusion with the target membrane are assets that should make it possible to reduce the doses of active ingredients injected into the body to limit the unwanted side effects of chemotherapy.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.langmuir.0c00262>.

Phase transition of DMPC liposomes reported with Dioll fluorescence; Dioll fluorescence spectra in DS, DP, DM, PO, DO, and DL liposomes; calcein load in liposome preparations; liposome stability in cell culture medium; DA liposome interaction with WPMY-1 and PC-3 cells; liposomes do not affect cell viability and show no cytotoxic effect (PDF)

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

**Ofelia Maniti** – Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, ICBMS UMR 5246, CNRS, Univ Lyon, Université Lyon 1, Lyon, France; [orcid.org/0000-0001-9371-9580](https://orcid.org/0000-0001-9371-9580); Email: [ofelia.maniti@univ-lyon1.fr](mailto:ofelia.maniti@univ-lyon1.fr)

### Authors

**Julien Bompard** – Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, ICBMS UMR 5246, CNRS, Univ Lyon, Université Lyon 1, Lyon, France; [orcid.org/0000-0001-8057-9144](https://orcid.org/0000-0001-8057-9144)

**Annalisa Rosso** – Laboratoire d'Automatique, de Génie des Procédés et de Génie Pharmaceutique LAGEPP UMR 5007, CNRS, Univ Lyon, Université Lyon 1, Lyon, France

**Leyre Brizuela** – Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, ICBMS UMR 5246, CNRS, Univ Lyon, Université Lyon 1, Lyon, France

**Saïda Mebarek** – Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, ICBMS UMR 5246, CNRS, Univ Lyon, Université Lyon 1, Lyon, France

**Loïc J. Blum** – Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, ICBMS UMR 5246, CNRS, Univ Lyon, Université Lyon 1, Lyon, France

**Ana-Maria Trunfio-Sfarghiu** – Laboratoire de Mécanique des Contacts et Structures, LaMCoS UMR 5259, CNRS, Univ Lyon, Université Lyon 1, Lyon, France

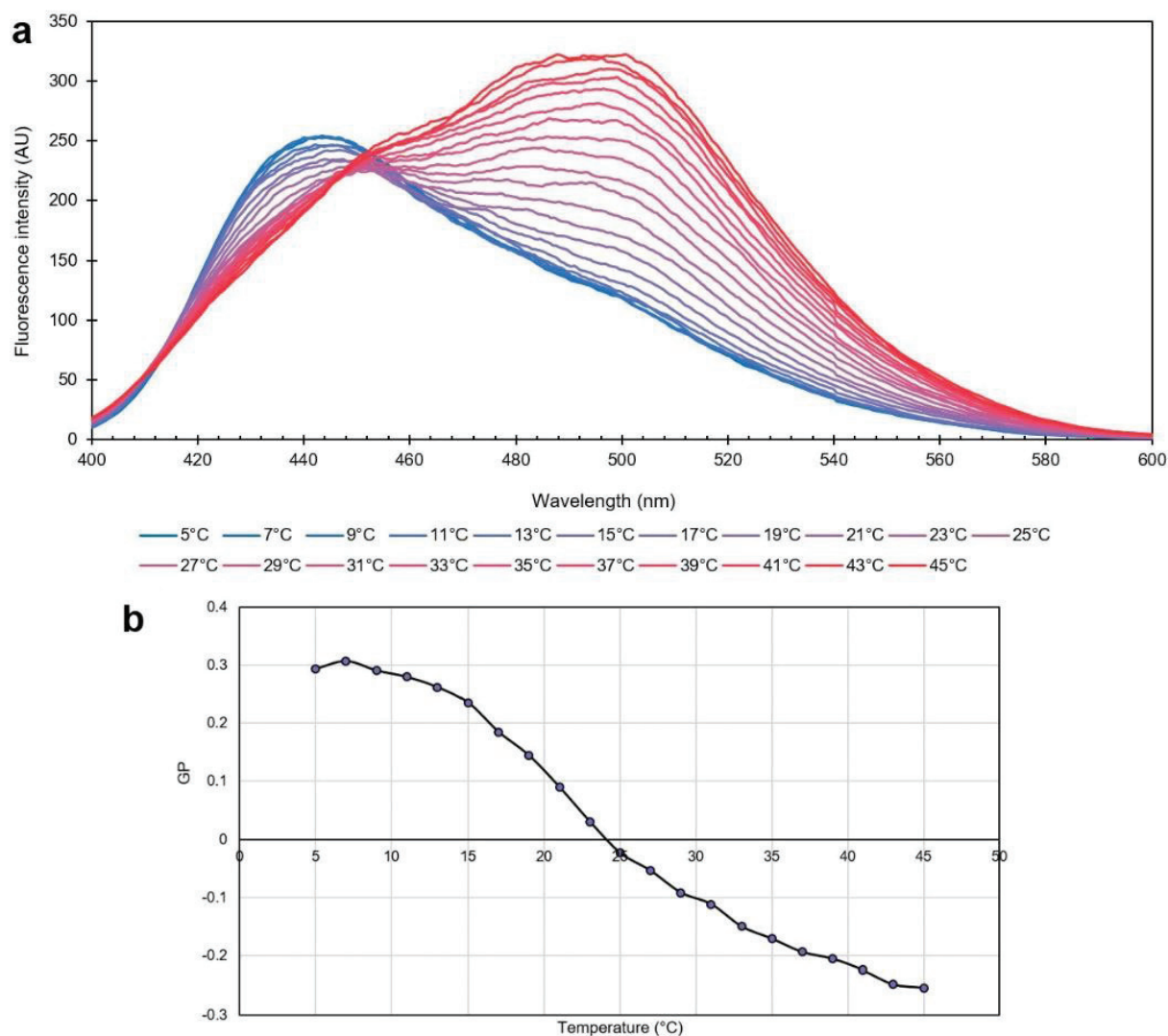
**Giovanna Lollo** – Laboratoire d'Automatique, de Génie des Procédés et de Génie Pharmaceutique LAGEPP UMR 5007,





## SUPPORTING INFORMATION

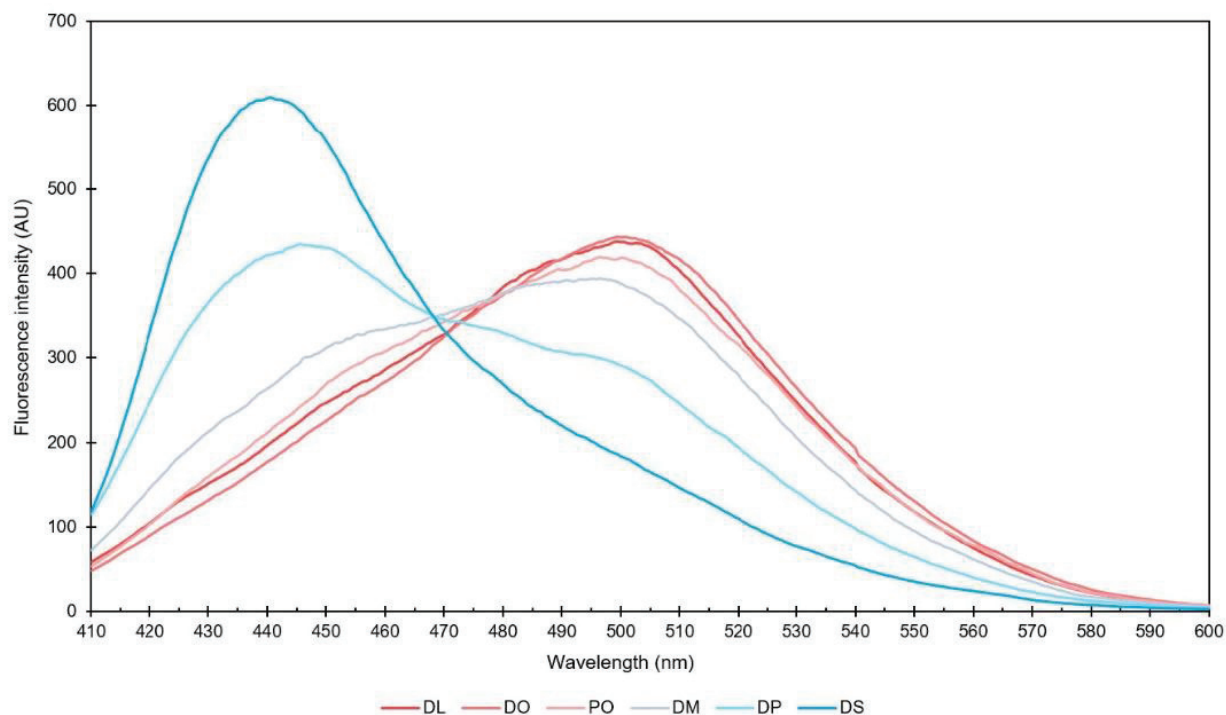
### Membrane Fluidity as a New Mean to Selectively Target Cancer Cells with Fusogenic Lipid Carriers



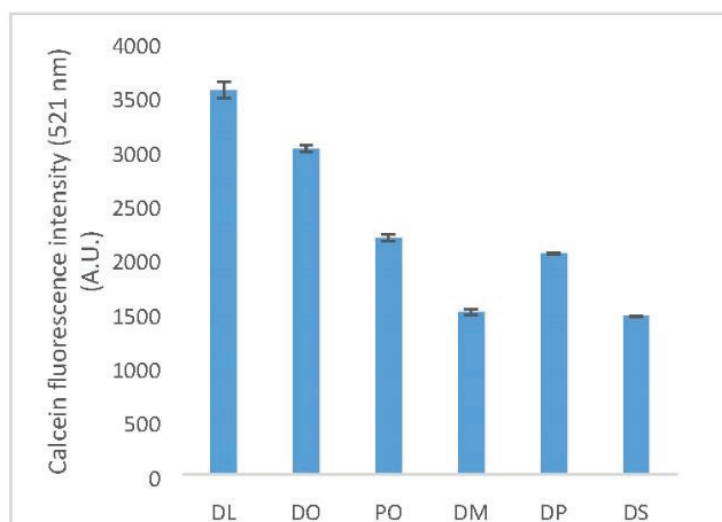
**Figure S1. DiI1 accurately reports the membrane fluidity state of liposome membranes.**

a) Fluorescence spectra of DMPC liposomes incubated with DiI1 for 15 min, from 5°C to 45°C.

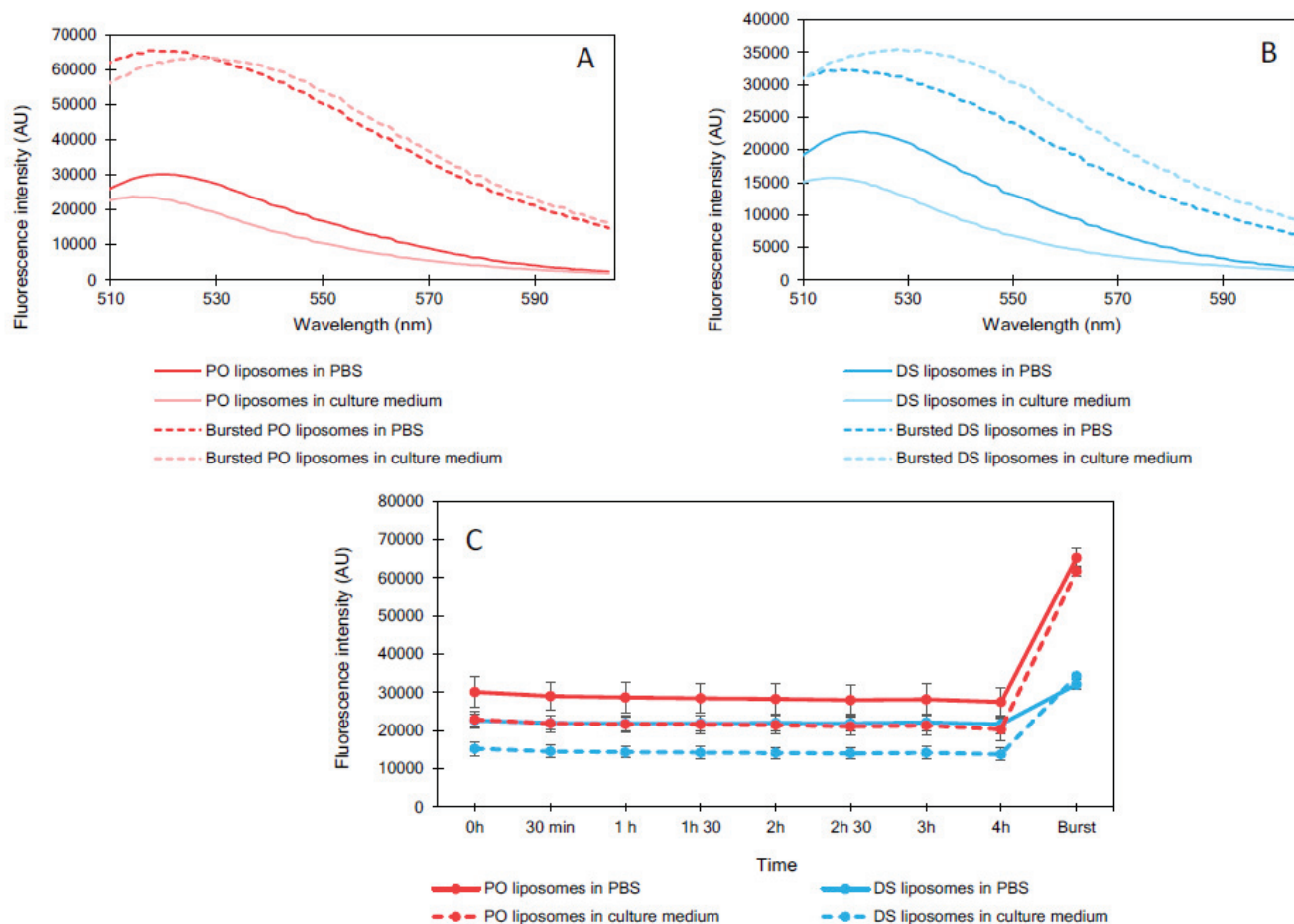
b) GP measurements, showing an inflexion at 24°C, the usual phase-transition temperature of DMPC.



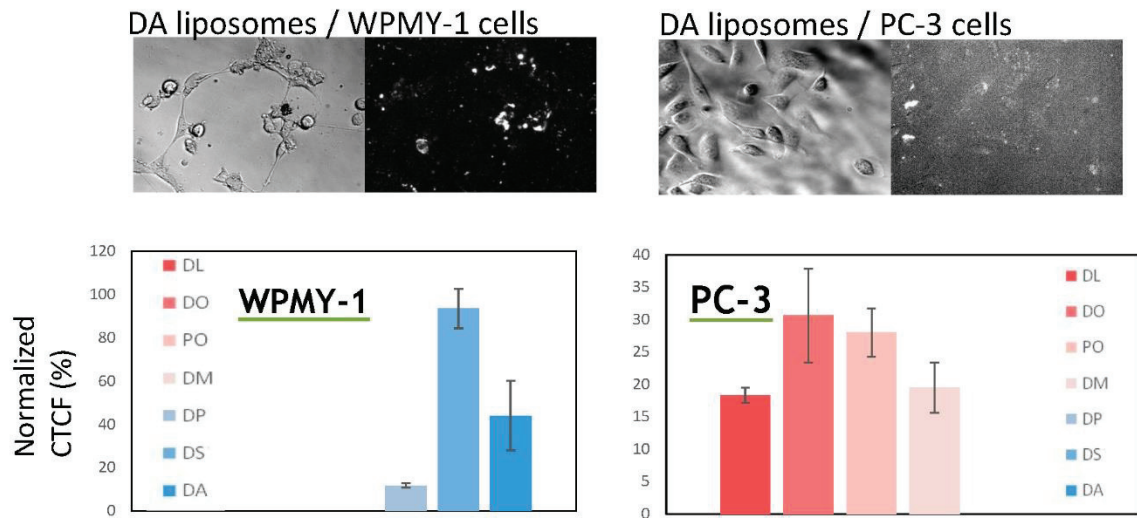
**Figure S2. DiIol fluorescence spectra** in liposomes with varying phase-transition temperatures reports differences in membrane fluidity states of liposomes made of 80% PC and 20% DOPE.



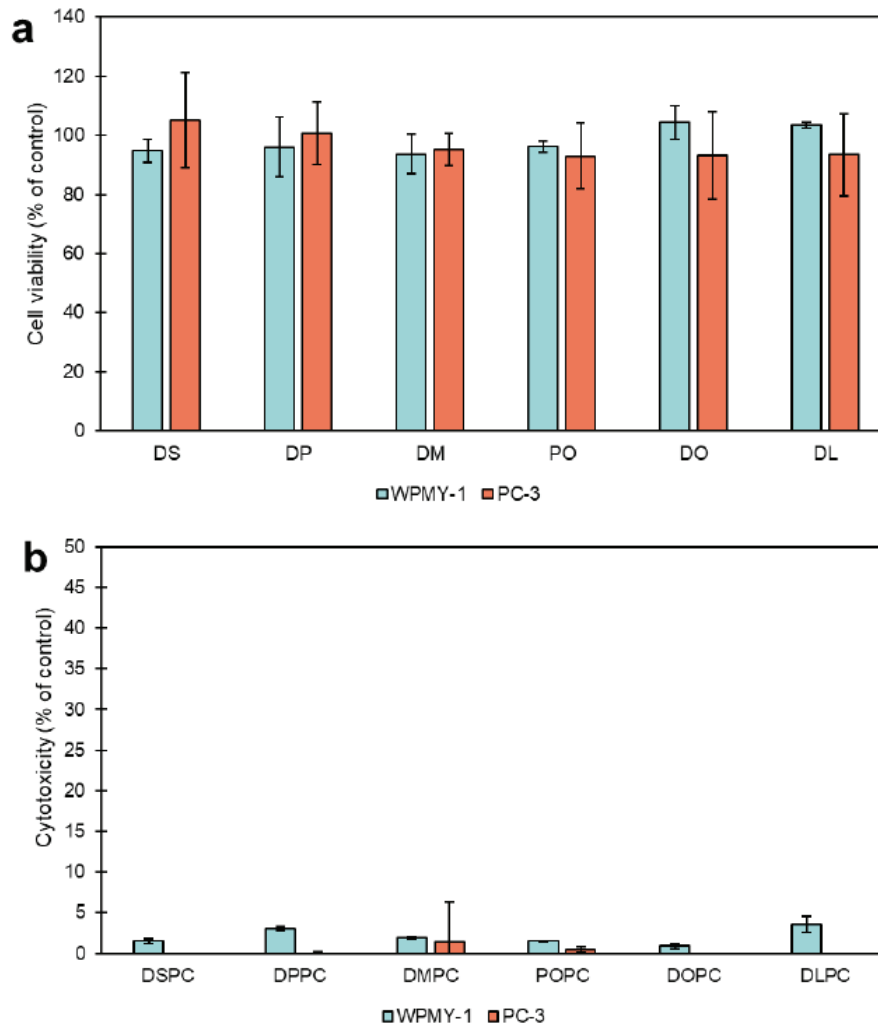
**Figure S3. Calcein load in liposomes.** Calcein fluorescence intensity at 521 nm (488 nm excitation) as a function of liposome preparation for a liposome concentration of 100  $\mu\text{g/ml}$ . Calcein was loaded in the liposomes at a concentration of 5  $\mu\text{M}$ . Free calcein was removed with size exclusion chromatography.



**Figure S4: Liposome stability in cell culture medium.** PO (A) and DS (B) liposomes were loaded with 60 mM calcein and diluted either in PBS or in FBS-containing DMEM medium. Fluorescence spectra were recorded after excitation at 488 nm before (full lines) and after (dotted lines) liposome burst with 10  $\mu$ l HCl 1M. The fluorescence intensity increased after liposome burst indicated release from quenching. C. Evolution of calcein fluorescence (measured at maximum emission wavelength, 521 nm) with time in PBS (full lines) or in FBS 10 % cell culture medium. Fluorescence was low and constant for several hours, both in PBS and in cell culture medium, but drastically increased after liposome burst indicating that FBS-containing media did not affect liposome integrity.



**Figure S5: DA liposomes (composed of 78 % of DAPC (C20:0), 20 % DOPE and 2 % NBD-PE) interact with WPMY-1 but not PC-3 cells.** Top: fluorescence microscopy images of WPMY-1 (left) or PC-3 cells incubated with DA liposomes. Bottom: Fluorescence intensity (CTCF) quantified on fluorescence images and normalized over the maximum fluorescence intensity value. Left: WPMY-1, right: PC-3 cells incubated with DL, DO, PO, DM, DP, DS and DA liposomes.

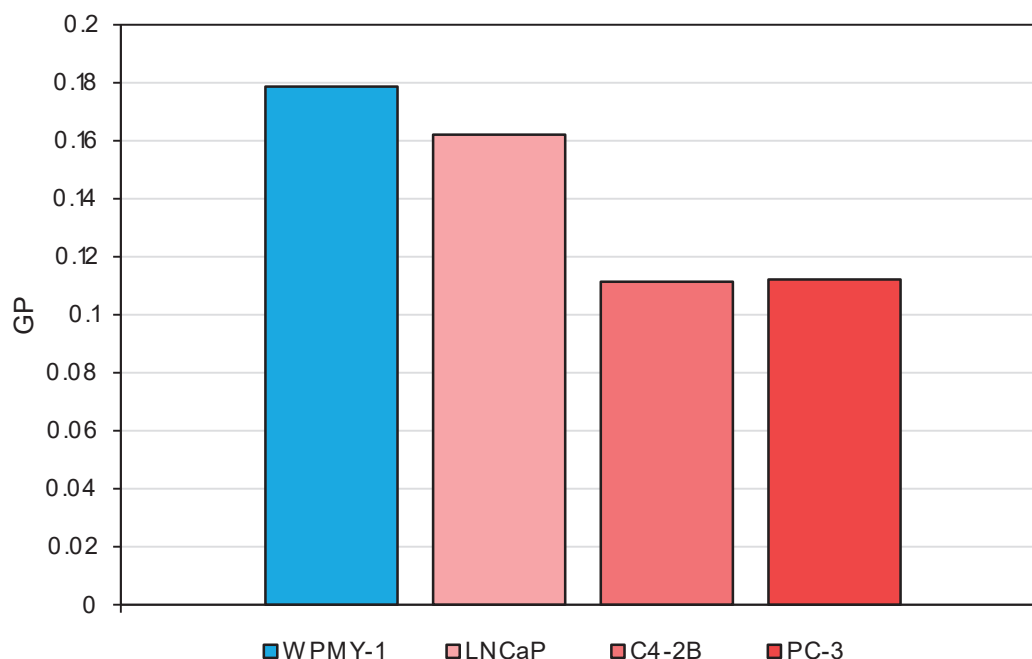


**Figure S6. Liposomes do not affect cell viability and show no cytotoxic effect.** a) Cell viability quantification, assessed on plated cells with the MTT assay 2h30 after liposome treatment. Results expressed as a percentage of cell viability relative to an untreated control corresponding to 100% viability. b) Cytotoxicity quantification, assessed on the same cells than (a) with the LDH assay. Results expressed as a percentage of cell death relative to an untreated control corresponding to 0% toxicity and a control treated with 10% Triton X-100 corresponding to 100% toxicity.



#### 1.1.4. Etude de la fluidité membranaire des cellules

Comme précédemment décrit en « **Etude bibliographique** », de nombreuses études ont montré une modification de la composition et des propriétés des membranes lors du développement tumoral. Les résultats que nous avons obtenus montrant un lien entre la composition de liposomes et leur interaction cellulaire, nous nous sommes intéressés à la fluidité membranaire des cellules utilisées. Des travaux précédents portant sur deux des lignées prostatiques utilisées (WPMY-1 et PC-3) avaient été réalisés dans le cadre de la thèse de Jihen ZOUAOUI [337]. Ces travaux avaient montré, par le biais de méthodes rhéologiques, que la membrane des cellules tumorales PC-3 était plus souple et plus déformable que celle des cellules contrôles WPMY-1. Ces résultats vont dans le sens de la littérature générale, avec la membrane des cellules tumorales plus fluide que celle des cellules non-tumorales. La mesure de fluidité membranaire des cellules utilisées dans le cadre de cette thèse a été réalisée à l'aide du Dioll (**Figure 61**).



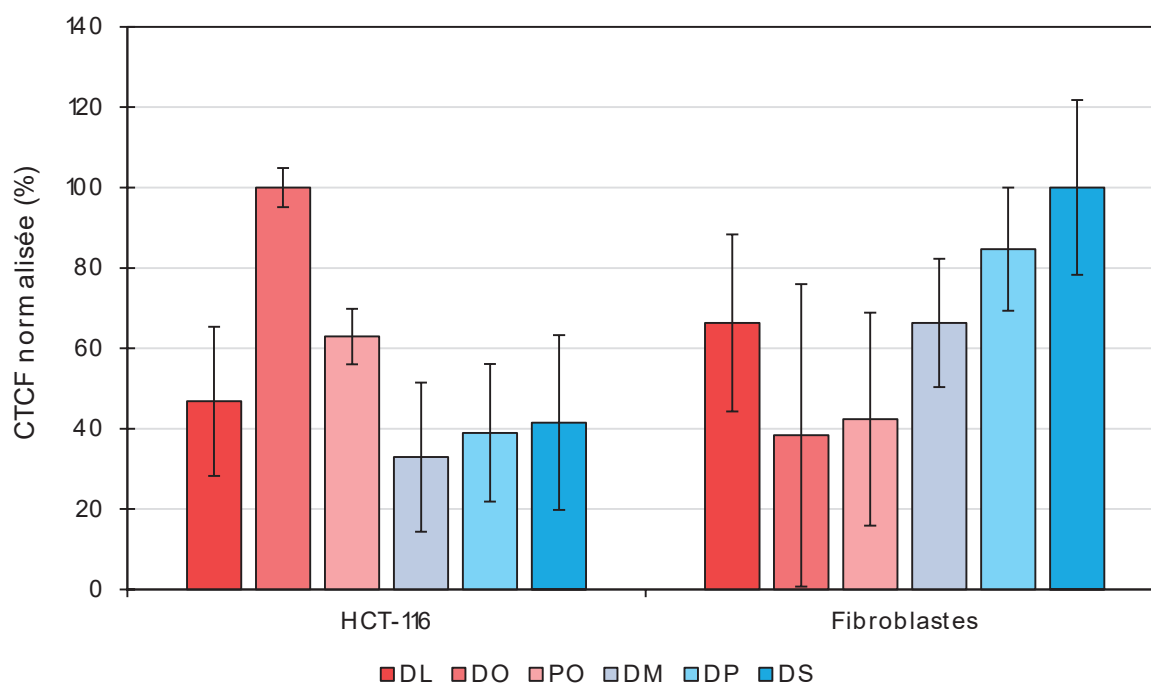
**Figure 61.** Fluidité membranaire des cellules prostatiques modèles, mesurée par le Dioll incubé pendant 15 minutes à 37°C.

Ces résultats montrent une graduation de la fluidité membranaire, avec une membrane des cellules tumorales plus fluide que celle des cellules contrôles.

Cependant, la mesure de la fluidité avec le Dioll sur les cellules comportait de nombreuses imprécisions et a nécessité de nombreuses optimisations. L'analyse de la fluidité membranaire sur cellules n'étant pas le sujet principal de cette thèse, la détermination des causes de cette variabilité et la mise au point d'un protocole stable de mesure de la fluidité membranaire a fait l'objet de la thèse d'un autre doctorant dans le cadre de la collaboration avec le Dr Thierry GRANJON, qui a néanmoins pu confirmer la tendance observée.

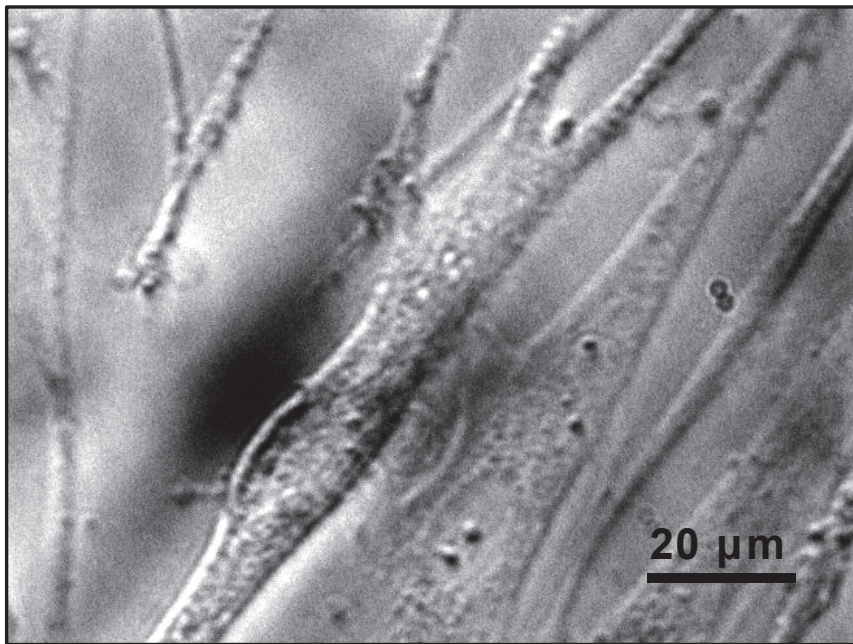
### 1.1.5. Validation de la stratégie sur d'autres modèles cellulaires

Dans le but de confirmer l'influence de la composition lipidique sur l'interaction liposome-cellule, des essais ont été réalisés sur d'autres modèles cellulaires. A la place, d'autres lignées en culture ont été testées, la lignée HCT-116, modèle d'un cancer du côlon et une lignée de fibroblastes contrôle. Les résultats préliminaires sont présentés **Figure 62**.



**Figure 62.** Interaction de la gamme de fluidité membranaire avec des cellules HCT-116 et des fibroblastes. Les résultats sont exprimés en pourcentage de CTCF pour chaque type cellulaire, 100% correspondant à la CTCF la plus élevée obtenue pour le type cellulaire étudié.

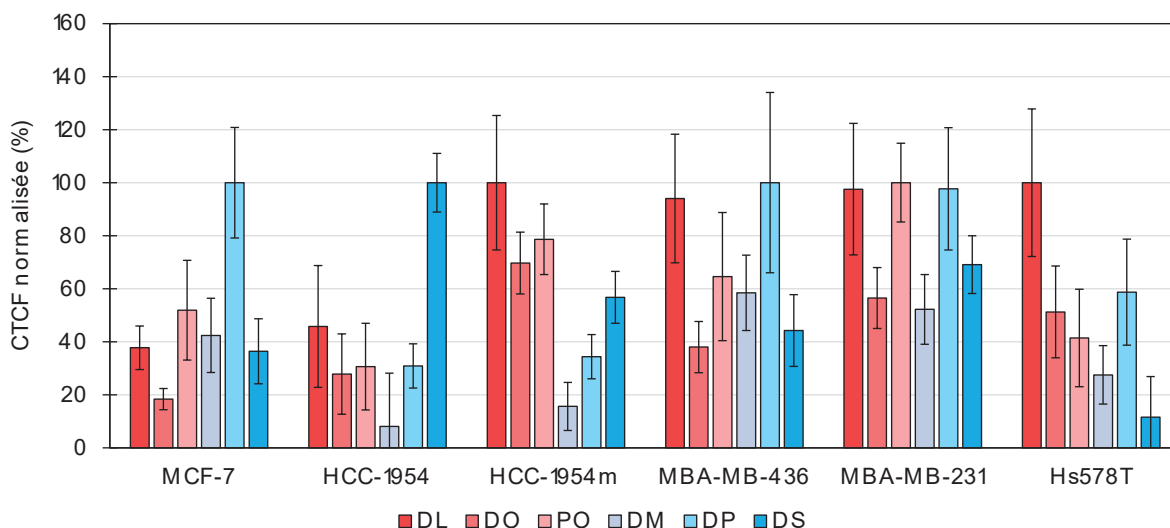
Ces résultats montrent une tendance similaire à celle observée sur les cellules de cancer de la prostate ; les cellules cancéreuses interagissent préférentiellement avec les liposomes de fluidité membranaire élevée ; les cellules saines interagissent préférentiellement avec les liposomes de fluidité membranaire plus basse. Ces résultats, qui restent à confirmer, montrent néanmoins une grande variabilité pour les fibroblastes. Cette variabilité peut être attribuée à la forme très allongée de ces cellules, qui complique la détermination de valeurs précises de CTCF (**Figure 63**).



**Figure 63.** Cliché microscopique de fibroblastes.

En parallèle, d'autres lignées, modèles de cancer du sein, ont été testées, en collaboration avec le Dr Arnaud VIGNERON (CRCL - UMR INSERM 1052 CNRS 5286 - Equipe EMT et plasticité de la cellule cancéreuse). Les résultats, là aussi préliminaires, sont présentés sur la **Figure 64**.

Ici encore, les résultats (préliminaires) montrent une très grande variabilité, soulignant la nécessité de l'optimisation du protocole de suivi de l'interaction liposome-cellule. Cependant, certaines tendances observées sont très intéressantes. Notamment, les cellules MCF-7, qui correspondent à des cellules épithéliales encore différenciées, interagissent préférentiellement avec les liposomes rigides (DP). A l'inverse, les cellules Hs578T, modèles de cancer du sein très agressif, interagissent préférentiellement avec les liposomes fluides.



**Figure 64.** Interaction de la gamme de fluidité membranaire avec des lignées cellulaires modèles du cancer du sein. Les résultats sont exprimés en pourcentage de CTCF pour chaque type cellulaire, 100% correspondant à la CTCF la plus élevée obtenue pour le type cellulaire étudié.

Ce résultat est cohérent lorsque l'on prend en compte la fluidité des cellules concernées, les cellules épithéliales ayant une fluidité membranaire plus faible que les cellules plus indifférenciées. De plus, la comparaison de l'interaction des cellules HCC-1954 et HCC-1954m avec les liposomes montre que la transition épithélio-mésenchymateuse subie par les cellules change radicalement leur profil d'interaction avec la gamme de fluidité membranaire de liposomes ; les cellules HCC-1954 interagissent préférentiellement avec les liposomes de fluidité membranaire basse, là où les cellules HCC-1954m interagissent avec les liposomes de fluidité membranaire plus élevée.

L'ensemble de ces résultats sur le cancer du côlon et du sein représente un premier pas vers la confirmation du mécanisme décrit pour le cancer de la prostate. Il reste encore à confirmer les résultats obtenus, ce qui n'a pas pu être effectué dans le cadre de cette thèse par manque de temps. Il serait également très intéressant d'utiliser des lignées contrôles plus appropriées, en prenant à chaque fois des cellules saines de l'organe étudié plutôt que les fibroblastes que nous avons utilisés ; ceci afin de pouvoir vraiment comparer l'interaction des liposomes avec des cellules saines et des cellules tumorale d'un même type de modèle cellulaire.

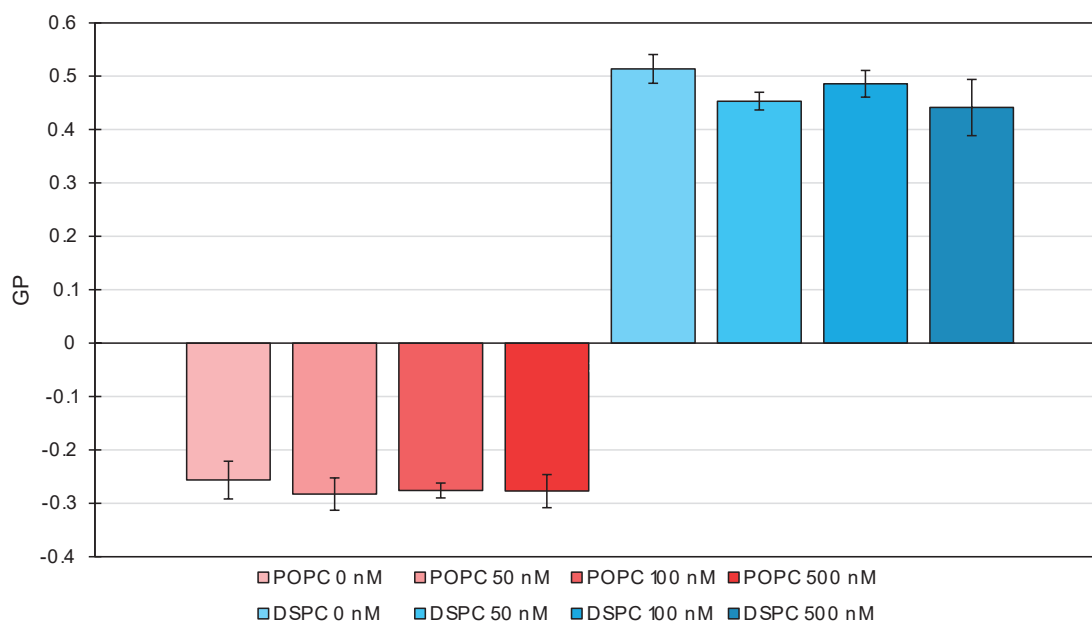
## 1.2. Application à la délivrance de molécules actives

Dans la partie précédente, nous avons montré comment la composition lipidique d'un liposome affectait son interaction avec des cellules, grâce à une étude reposant sur le suivi de la distribution cellulaire de fluorophores initialement contenus dans des liposomes. Des essais de vectorisation de molécules d'intérêt chimiothérapeutique ont été réalisés, dans le but de faire la preuve de concept de l'utilisation des propriétés de la membrane plasmique comme moyen permettant la délivrance spécifique de médicaments.

### 1.2.1. Délivrance de docétaxel à des lignées tumorales

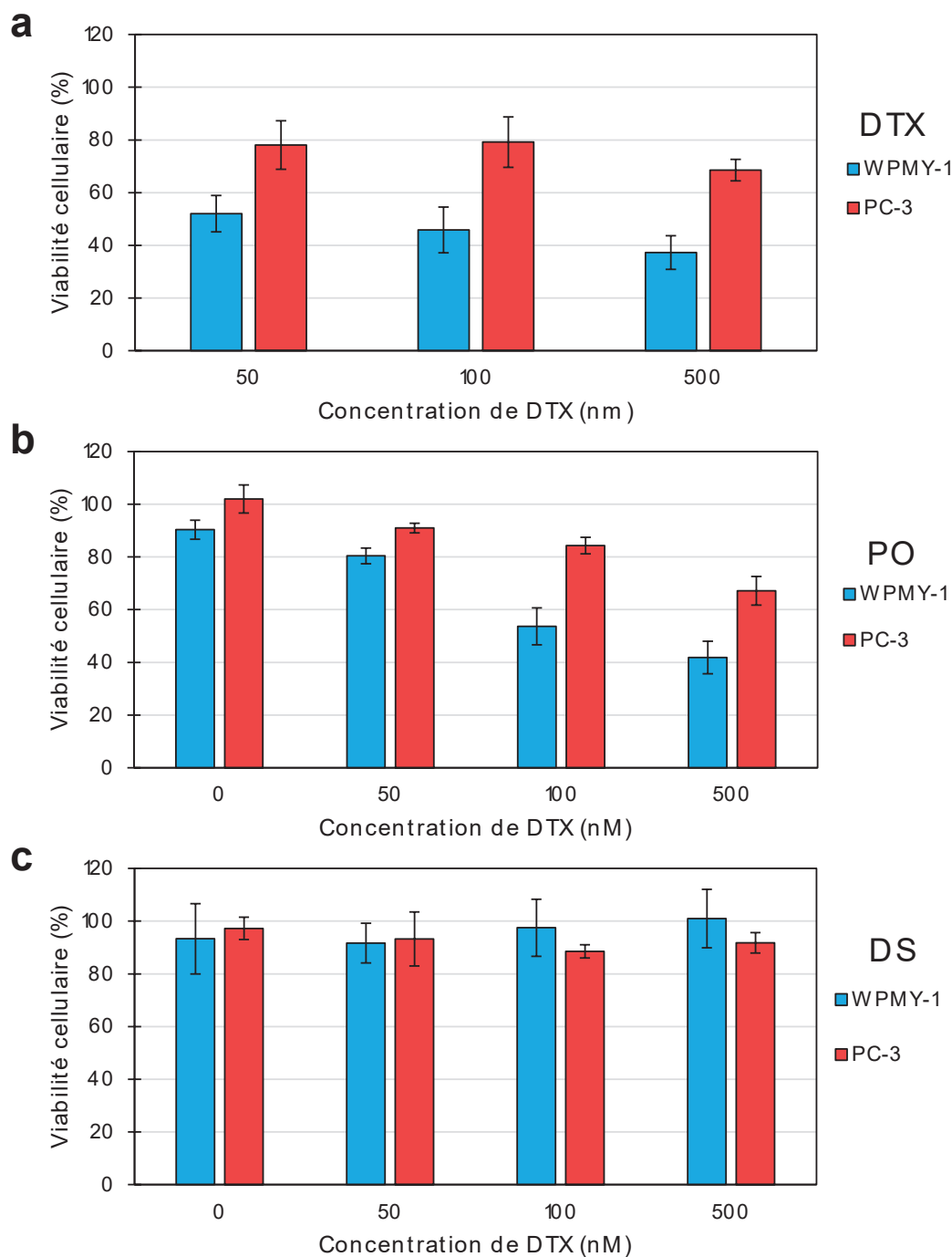
La molécule initialement retenue pour réaliser des essais de vectorisation sur les lignées tumorales est le Docétaxel (DTX), un dérivé hémisynthétique du taxol extrait des feuilles de l'if. Les taxanes, tels que le paclitaxel et le DTX, agissent comme des inhibiteurs de la dépolymérisation de la tubuline. Lors de la division cellulaire, la mitose, les microtubules se polymérisent pour former le fuseau mitotique. En bloquant leur dépolymérisation, les taxanes vont alors entraîner la mort des cellules en division. Le DTX a été choisi sur la base d'études précédentes internes au laboratoire qui avaient montré que le docétaxel était efficace sur les lignées prostatiques utilisées.

Avant toute chose, la fluidité des liposomes encapsulant du DTX a été mesurée grâce au Dioll (**Figure 65**). Une très légère augmentation de la fluidité membranaire a été observée, mais cette différence n'est pas significative. Les liposomes encapsulant du DTX ont donc une fluidité membranaire semblable à celle des liposomes vides, peu importe la concentration en DTX entre 0 et 500 nM.



**Figure 65.** Mesure de la fluidité membranaire de liposomes vides ou encapsulant du DTX à différentes concentrations, à 37°C.

Les résultats de l'incubation de cellules avec des liposomes encapsulant du DTX sont présentés **Figure 66**. Les cellules ont été incubées soit avec du DTX libre (Figure XA), soit avec du docétaxel encapsulé dans des liposomes (Figure XB et XC). De manière similaire aux essais réalisés avec des liposomes chargés en calcéine, les deux compositions lipidiques retenues sont PO (ciblage des cellules tumorales) et DS (ciblage des cellules contrôles). On peut voir que la viabilité cellulaire des cellules traitées par du DTX libre chute bien plus vite pour les cellules WPMY-1 que pour les cellules PC-3, la différence de viabilité entre les deux lignées étant de l'ordre de 30% (**Figure 66a**). Cette différence s'explique par une sensibilité accrue des cellules WPMY-1 au DTX qui les affecte plus que les cellules PC-3 (à concentration équivalente). Cette donnée complique l'analyse des résultats pour le DTX encapsulé, puisqu'une différence de viabilité observée pourrait être due à cette susceptibilité accrue plutôt qu'à une préférence d'interaction avec les liposomes. L'analyse des figures **66b** et **66c** révèle des résultats non-conformes aux résultats attendus. En effet, au vu de la relation précédemment montrée entre composition lipidique des liposomes et interaction avec les cellules prostatiques, on pouvait s'attendre à une interaction spécifique des liposomes PO avec les cellules PC-3, et des liposomes DS avec les cellules WPMY-1, interaction étant traduite dans ce cas par la mort des cellules affectées.



**Figure 66.** Etude de la viabilité cellulaire de cellules traitées par du DTX. La viabilité cellulaire est mesurée trois jours après incubation et est exprimée en pourcentage, entre une viabilité de 100% correspondant à un contrôle non-traité et une viabilité de 0% correspondant à un contrôle où les cellules ont été lysées par du Triton X-100.

- Cellules traitées par du DTX libre.
- Cellules traitées par des liposomes PO encapsulant du DTX.
- Cellules traitées par des liposomes DS encapsulant du DTX.

Cependant, on voit qu'ici les liposomes PO ont interagi à la fois avec les cellules PC-3 et les cellules WPMY-1 (**Figure 66b**), et que les liposomes DS n'ont pas interagi avec les cellules (**Figure 66c**). En prenant en compte la sensibilité accrue des cellules WPMY-1 par rapport aux cellules PC-3, la différence de toxicité induite par le traitement avec des liposomes PO encapsulant du DTX entre WPMY-1 et PC-3 tend à se réduire, même si l'amplitude précise est difficile à estimer.

Deux hypothèses ont été émises afin d'expliquer cette situation. La première concerne un défaut dans l'encapsulation à proprement parler du DTX dans les liposomes. En effet, le DTX est ajouté dans les liposomes au moment de la formation du film lipidique et étant donné sa forte hydrophobicité, il est supposé que tout le DTX présent soit bien incorporé dans les liposomes lors de la resuspension en milieu aqueux. Cependant, si tout le DTX n'est pas réintégré, et si le taux d'encapsulation dépend de la composition lipidique des liposomes, cela pourrait se traduire par une concentration effective en DTX plus faible que celle annoncée, ce qui pourrait expliquer l'absence de perturbation de la viabilité cellulaire des cellules traitées par des liposomes DS. La deuxième hypothèse concerne le devenir du DTX une fois encapsulé. Le DTX est une molécule très peu soluble dans l'eau (0,274 mg/L) et sa dissolution requiert de le dissoudre dans du DMSO, puis de diluer avec du tampon aqueux. En revanche, aux concentrations finales utilisées, le DTX dépasse son seuil de solubilité. Des mécanismes de partage de phase, où le DTX serait en équilibre entre une concentration intra-liposomale et une concentration extra-liposomale pourrait expliquer les mesures de viabilité cellulaire obtenues.

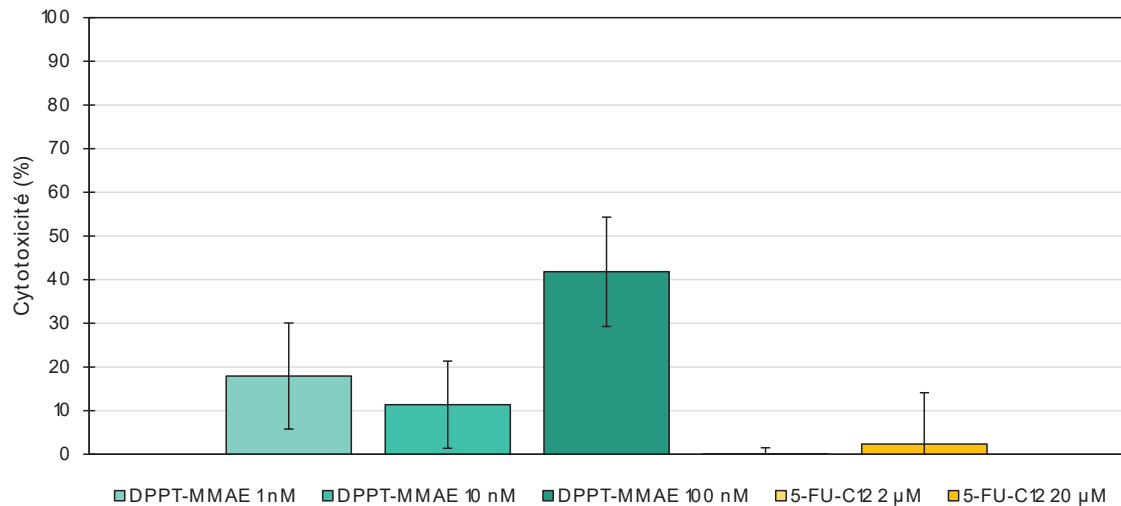
### 1.2.2. Essais de vectorisation de nouveaux composés

Pour s'affranchir des contraintes dues à l'encapsulation du DTX, des essais ont été réalisés avec d'autres molécules actives. Deux ont particulièrement retenu notre attention : la MonoMéthyl Auristatine E (MMAE) et le 5-FluoroUracile (5-FU). La MMAE est un composé utilisé en chimiothérapie dont l'action est basée sur le blocage de la polymérisation de la tubuline. Cette molécule est extrêmement toxique et ne peut être utilisée telle quelle. C'est pourquoi elle est souvent couplée à des anticorps monoclonaux pour former des conjugués médicament-anticorps ou ADC (pour « *Antibody-Drug Conjugate* »). Ici, la MMAE a été conjuguée à un



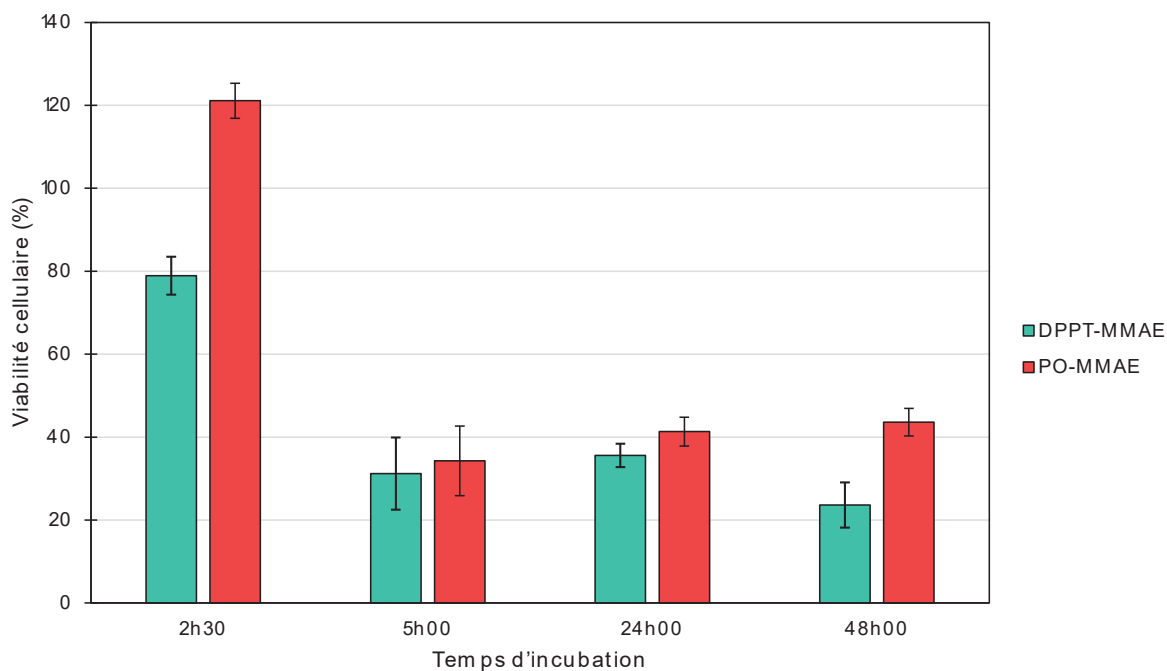
lipide, le DPPT afin d'assurer son ancrage dans les liposomes (DPPT-MMAE) dans le cadre d'une collaboration avec le Pr Benoît JOSEPH (ICBMS - UMR CNRS 5246 - Equipe SMITH) et le Dr Warren VIRICEL (Mablink Bioscience). Quant au 5-FU, il s'agit d'un dérivé d'une base azotée agissant comme inhibiteur de la Thymidylate synthase, la principale enzyme responsable de la synthèse de la thymidine. Comme la MMAE, le 5-FU utilisé a été conjugué à une chaîne lipidique afin d'assurer son insertion dans les liposomes (5-FU-C12) dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Giovana LOLLO (LAGEPP - UMR CNRS 5007 - Equipe GePharm). L'utilisation des ancres lipidiques est l'une des principales solutions pour limiter un relargage non-spécifique des molécules actives. Le 5-FU-C12 étant un composé principalement utilisé dans le cadre du cancer du côlon, il a été testé sur la lignée HCT-116 (cancer du côlon) et sur les fibroblastes (jouant le rôle de contrôle). La DPPT-MMAE, en revanche, est un agent chimiothérapeutique à spectre large. Son activité a donc été étudiée à la fois sur les lignées de cancers prostatiques mais également sur la lignée HCT-116 et sur les fibroblastes.

Les premiers essais de mesure de l'effet toxique du 5-FU-C12 libre sur les cellules HCT-116 se sont avérés surprenant, le 5-FU n'ayant presque pas d'effet toxique (**Figure 67**). En effet, même à 20  $\mu\text{M}$ , une concentration proche de l'IC50 (la concentration à laquelle la moitié des cellules meurent), les cellules HCT-116 ne montrent que très peu de sensibilité. En revanche, le traitement par de la DPPT-MMAE sur ces mêmes cellules laisse apparaître un effet toxique. Par la suite, nous nous sommes concentrés sur la DPPT-MMAE.



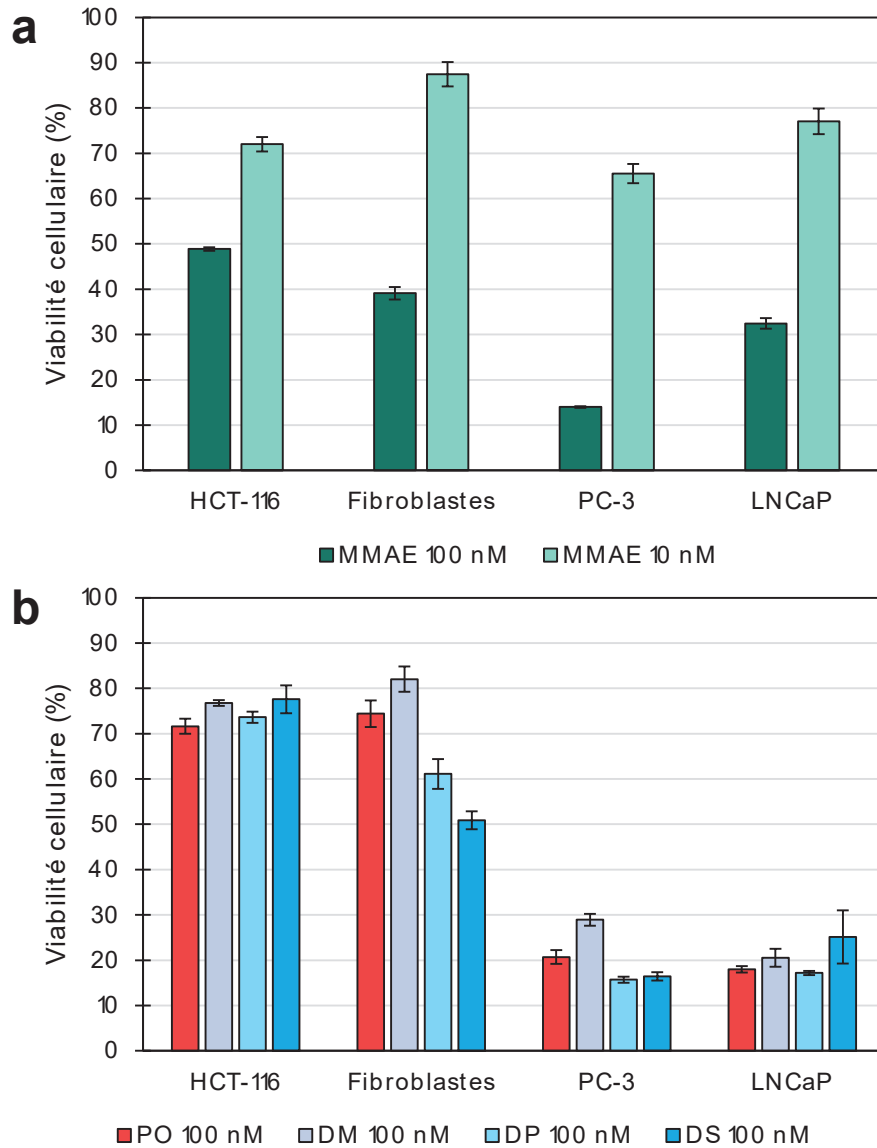
**Figure 67.** Cytotoxicité de cellules HCT-116 traitées avec de la DPPT-MMAE ou du 5-FU-C12 libres. La cytotoxicité est mesurée trois jours après incubation et est exprimée en pourcentage, entre une toxicité de 0%, correspondant à un contrôle non-traité, et une toxicité de 100%, correspondant à un contrôle où les cellules ont été lysées par du Triton X-100.

Lors des premiers essais de mesure de l'activité de DPPT-MMAE sur des lignées de cancer de la prostate, il est apparu que l'effet toxique du dérivé de la MMAE était bien plus faible que celui attendu. Nous avons donc testé des temps d'incubation plus longs des liposomes avec les cellules. Les résultats observés sur la **Figure 68** montrent que la durée d'incubation a un effet majeur sur la toxicité induite : la toxicité observée augmente lors du passage à des temps d'incubation supérieurs ou égaux à 5h. En revanche, on n'observe pas de différence significative de toxicité entre 5h et 24h d'incubation.



**Figure 68.** Impact du temps d'incubation sur la viabilité cellulaire de cellules PC-3 traitées avec de la DPPT-MMAE à 100 nM libre ou encapsulée (PO-MMAE). La viabilité cellulaire est mesurée trois jours après incubation et est exprimée en pourcentage, entre une viabilité de 100%, correspondant à un contrôle non-traité, et une viabilité de 0%, correspondant à un contrôle où les cellules ont été lysées par du Triton X-100.

Une fois les conditions d'étude de la toxicité de la DPPT-MMAE déterminées, les premiers résultats obtenus de viabilité cellulaire sont présentés sur la **Figure 69**. Les quatre lignées cellulaires testées sont sensibles à la MMAE (**Figure 69a**), mais à des degrés divers. Une gradation de la toxicité en fonction de la composition des liposomes délivrant la DPPT-MMAE est observable pour les fibroblastes uniquement (**Figure 69b**). Pour ces cellules, la toxicité induite par le traitement par des liposomes de compositions différentes est en lien avec la fluidité membranaire des liposomes, les liposomes rigides (DP et surtout DS) étant plus toxiques que les liposomes de membrane plus fluide (DM et PO). Ces résultats attendus pour les cellules contrôles, n'ont cependant pas pu être répétés et restent donc à confirmer.



**Figure 69.** Viabilité cellulaire de cellules traitées avec de la DPPT-MMAE. La viabilité cellulaire est mesurée trois jours après incubation et est exprimée en pourcentage, entre une viabilité de 100%, correspondant à un contrôle non-traité, et une viabilité de 0%, correspondant à un contrôle où les cellules ont été lysées par du Triton X-100.

**a.** Effet de la DPPT-MMAE libre.

**b.** Effet de la DPPT-MMAE encapsulée dans des liposomes de composition lipidique variée.

### 1.3. Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons présenté les résultats obtenus lors de l'étude de l'impact de la composition lipidique de liposomes sur leur interaction avec des membranes cellulaires. La principale découverte, qui a fait l'objet d'une publication dans *Langmuir* (2020), concerne la relation entre la composition lipidique d'un liposome et sa propension à interagir avec un certain type cellulaire : les liposomes aux membranes les plus fluides interagissant préférentiellement avec les cellules tumorales, alors que les liposomes de membrane plus rigide interagissent avec les cellules contrôles. Cette relation, qui accompagne un mécanisme d'internalisation des liposomes basé sur la fusion membranaire, vient étayer l'importance des propriétés physicochimiques de la membrane liposomale comme élément majeur de la formulation de médicaments vectorisés par de tels vecteurs. Ici, la gamme de composition lipidique utilisée laisse entrevoir l'implication de la fluidité membranaire comme paramètre pouvant régir le ciblage des liposomes, une hypothèse confortée par des travaux réalisés indépendamment par d'autres groupes, qui ont également mis en évidence une relation entre la fluidité membranaire d'un vecteur et son interaction avec des cellules [335,336]. L'hypothèse d'une préférence cellulaire pour un certain type de lipides comme explication des différences d'interaction observées est peu probable. En effet, la fraction lipidique variable ne se distingue qu'au seul niveau des chaînes acyles, les têtes polaires étant toutes des PC. L'enfouissement des chaînes acyles au cœur de la bicouche liposomale empêche ainsi la cellule de détecter et d'internaliser un type particulier de lipides.

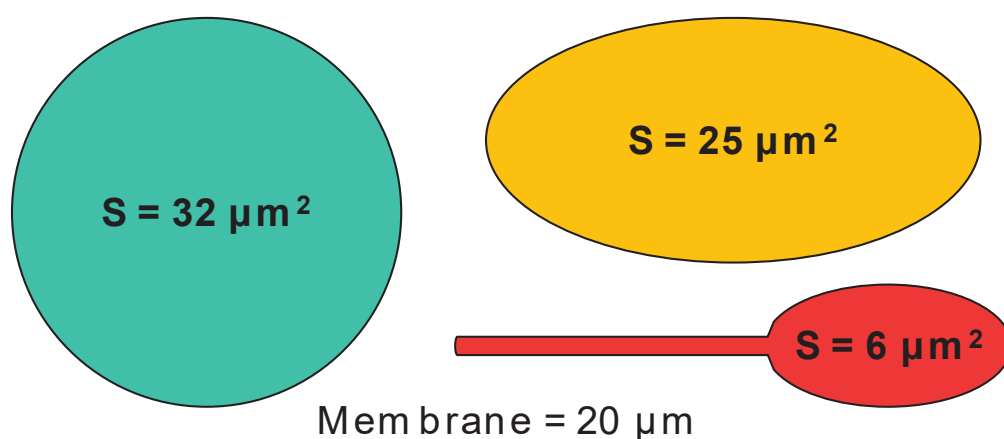
La gamme de composition lipidique préparée a permis l'obtention d'une gamme de fluidité membranaire, mesurée par le Dioll. En parallèle, cette même sonde a été utilisée pour quantifier la fluidité membranaire des cellules utilisées. En effet, la littérature scientifique et des résultats précédemment obtenus par des méthodes rhéologiques indiquent que la fluidité membranaire des cellules tumorales est plus élevée que celle des cellules non-tumorales [75,77,338]. A la lumière de ces informations, un lien très fort se dégage entre la fluidité membranaire des liposomes et la fluidité membranaire des cellules, les liposomes de fluidité membranaire élevée interagissant avec des cellules tumorales (ayant une membrane plus fluide), alors que les liposomes plus rigides interagissent avec des

cellules contrôles (ayant une membrane plus rigide). Cependant, la mesure par le Dioll de la fluidité membranaire des cellules utilisées n'a pas donné de résultats reproductibles, le protocole de mesure n'ayant pas été optimisé dans le cadre de cette thèse. En revanche, bien que la mesure ne soit pas reproductible, la tendance observée a pu être confirmée par des travaux complémentaires réalisés par nos collaborateurs. Un élément mérite d'être mentionné en ce qui concerne la mesure de la fluidité membranaire par le Dioll, et la considération de la fluidité membranaire d'une cellule en général. En effet, la seule membrane qui nous intéresse ici est la membrane plasmique. Comme le Dioll marque également les endomembranes, et comme la composition et les propriétés des membranes d'une même cellule varient grandement d'un organite à l'autre, la mesure de la fluidité membranaire par le Dioll correspond à la fluidité moyenne au niveau de la cellule, mais pas forcément à la fluidité de la membrane plasmique. Ainsi, la membrane plasmique est le plus souvent bien plus riche en cholestérol et en sphingolipides que les membranes d'organites, un facteur à même de modifier sa fluidité membranaire [339]. L'étude de la fluidité de la membrane plasmique doit alors, pour se prémunir de tels biais, s'assurer de ne mesurer que la fluidité de la membrane plasmique propre, sans les contributions du reste des membranes cellulaires. L'application d'un tel protocole pourrait ainsi permettre de faire ressortir la fluidité de la membrane plasmique, pour une comparaison directe avec celle des liposomes préparés.

Les expériences réalisées sur des lignées cellulaires modèles de cancer de la prostate ont été reproduites sur d'autres lignées cellulaires. La première solution envisagée a été de compléter les modèles de cancer de la prostate par des lignées intermédiaires, notamment par la lignée 22Rv1, une lignée de cancer *in-situ* (pas encore métastatique). L'idée ici était de vérifier la graduation de la relation fluidité-interaction, cette lignée étant à mi-chemin entre la lignée contrôle et les lignées métastatiques. La seconde a consisté à tester des modèles de cancer du sein et du côlon. Malheureusement, en raison d'un manque de temps, notamment dû à la crise sanitaire du COVID-19 qui a gelé des expérimentations en cours, ces expérimentations n'ont pas pu être achevées. Cependant, les résultats préliminaires obtenus sur les lignées de cancer du sein, de cancer du côlon et sur des fibroblastes sont néanmoins encourageants, une tendance se dégageant là-

aussi quant à la relation entre la composition lipidique des liposomes et l'interaction avec les cellules. Poursuivre et terminer cette étude permettrait ainsi de vérifier l'universalité du mécanisme décrit. De plus, les modifications de la fluidité membranaire n'interviennent pas seulement dans le cas du développement tumoral. D'autres exemples sont à noter comme par exemple les pathologies cardiovasculaires ou encore les maladies neurodégénératives telles que la chorée de Huntington ou la maladie d'Alzheimer [72,340,341]. Dans de telles pathologies, l'implication de la fluidité membranaire est encore mal comprise, puisqu'on ne sait toujours pas si les modifications de fluidité membranaire décrites sont les causes ou les conséquences du développement pathologique. Néanmoins, ces différences existent et il serait intéressant de vérifier si les observations réalisées sur des cellules tumorales sont valables sur de tels modèles.

La quantification de l'interaction liposome-cellule par calcul de la CTCF (« *Corrected Total Cell Fluorescence* ») a certes permis d'établir une correspondance solide entre des clichés de microscopie et une mesure précise de l'intensité d'interaction, mais elle peut présenter certains biais regrettables. Le premier concerne la méthode même de sélection des cellules. Dans le cas d'un marquage hétérogène entre différentes cellules, il est critique d'effectuer une sélection des cellules *a priori* sur les images en champ clair, puis, dans un second temps, de reporter les zones délimitées sur l'image de fluorescence correspondante. La mesure d'un grand nombre de cellules sur plusieurs clichés, à différentes positions du puits de culture, permettrait de renforcer l'analyse obtenue en lissant les hétérogénéités de culture. Dans le cas contraire, il est très facile de fausser les résultats, en ne sélectionnant par exemple que les cellules fluorescentes. Le deuxième biais de la mesure par CTCF concerne son utilisation pour des comparaisons entre types cellulaires différents. La mesure par CTCF repose sur le calcul d'une densité moyenne, obtenue en divisant l'intensité totale observée sur une cellule par la surface de cette dernière. Cette mesure dépend donc grandement de la géométrie de la cellule. Or, deux cellules de formes différentes vont avoir des rapports Surface/Périmètre variables, comme illustré sur la **Figure 70**.



**Figure 70.** Exemple schématique de l'impact de la géométrie d'une cellule à périmètre constant sur sa surface. En vert, cellule ronde ; en jaune, cellule ellipsoïdale ; en rouge, cellule ellipsoïdale avec un prolongement membranaire.

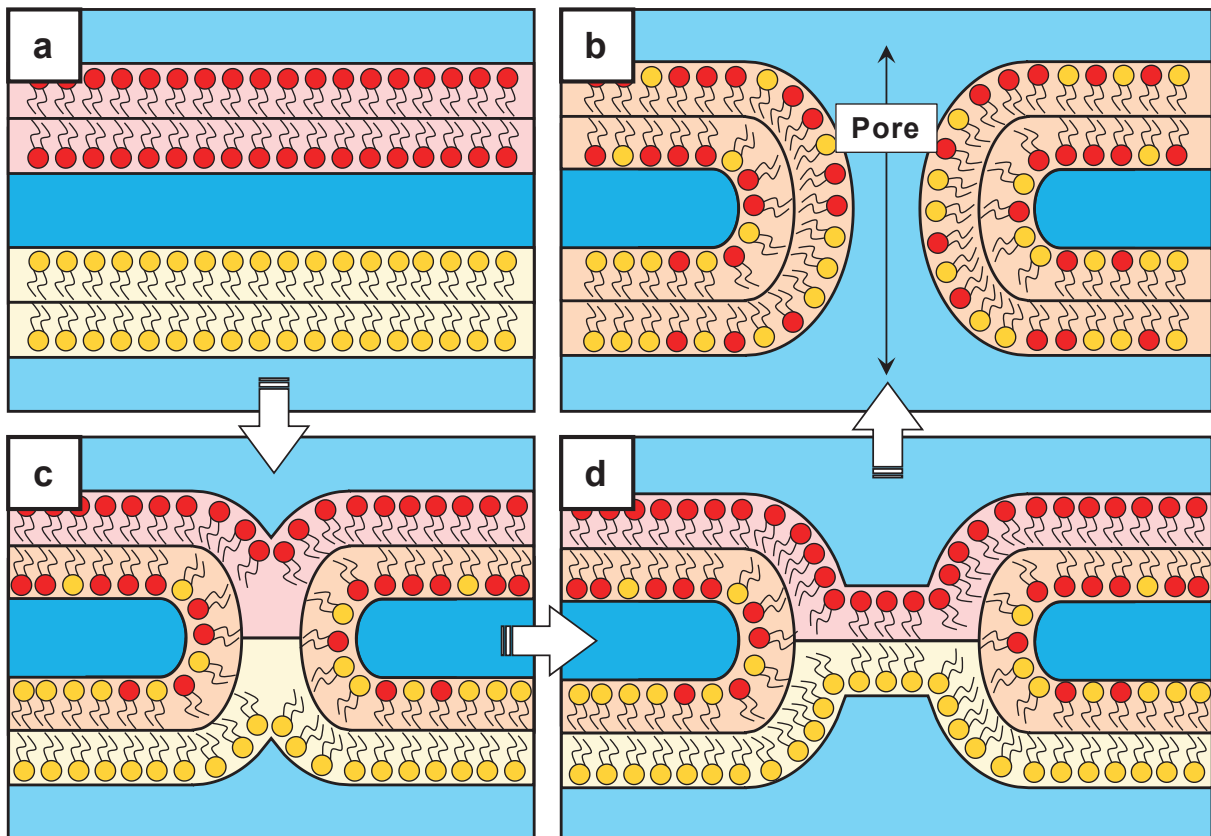
Or, le signal de fluorescence observé est localisé très préférentiellement au niveau de la membrane plasmique de la cellule (associable à son périmètre dans le cas de visualisation de tels clichés microscopiques). La mesure de la CTCF doit donc être utilisée uniquement pour comparer entre elles des conditions où les cellules ont des géométries similaires. Il est donc tout à fait juste de comparer les résultats obtenus pour une même lignée cellulaire avec des liposomes différents, mais il est nécessaire d'être plus prudent quand on compare deux résultats obtenus avec les mêmes liposomes pour des lignées différentes. Cette problématique se pose notamment dans le cas d'expérimentations de co-culture, où plusieurs types cellulaires sont cultivés dans un seul milieu. De tels protocoles permettraient d'étudier le comportement des liposomes en présence de cellules tumorales et de cellules contrôles, et constituerait une approche solide pour des essais précliniques. En effet, la co-culture permettrait d'évaluer la spécificité « réelle » de l'interaction liposome-cellule gouvernée par la fluidité membranaire, qui constitue le principal intérêt actuel du développement de vecteurs de médicaments chimiothérapeutiques.

Les essais de vectorisation de molécules actives constituent là aussi un premier pas vers une application de la fluidité membranaire comme paramètre de ciblage applicable à des problématiques thérapeutiques concrètes. Cependant, les différents résultats obtenus sont peu concluants et ne reproduisent pas la très nette distinction observée entre l'interaction de liposomes ayant une membrane



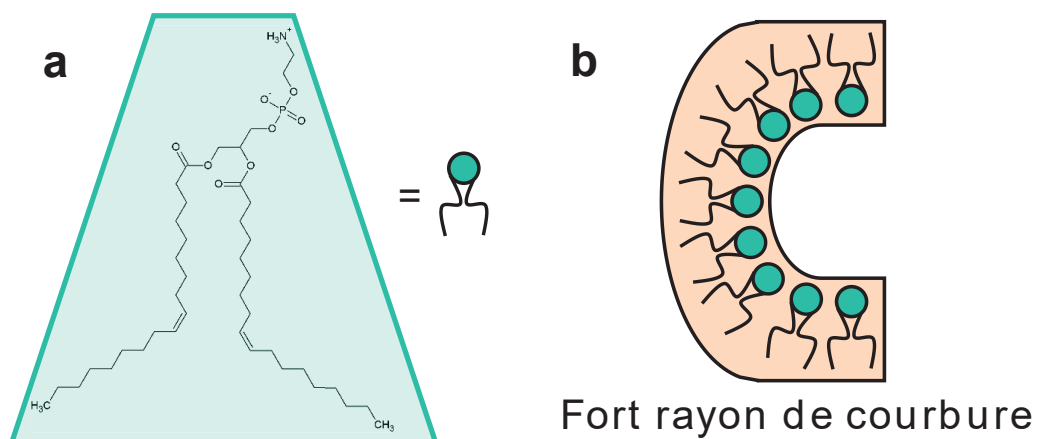
rigide et l'interaction de liposomes aux membranes plus fluides. De nombreux problèmes techniques ont retardé ces expérimentations, qui ont finalement été stoppées de manière précoce par la crise sanitaire du COVID-19. Néanmoins, de nombreuses observations et mises au point ont été réalisées, et devraient grandement guider la poursuite de ces travaux. Notamment, la mise en place de méthodes de quantification de la quantité encapsulée de molécules actives apparaît comme une étape cruciale à réaliser avant tout autre chose. De même, il est important de bien quantifier la réponse des différentes cellules utilisées à un traitement par la molécule d'intérêt libre avant même de tenter son encapsulation. Une fois les liposomes préparés, il convient alors de vérifier si la gamme de fluidité membranaire formée est toujours similaire à celle obtenue avec des liposomes vides. Enfin, comme précédemment mentionné, des essais de co-culture permettraient de mettre en évidence la spécificité de l'interaction liposome-cellule, dans une approche la plus proche possible de l'utilisation thérapeutique.

L'importance de la fluidité membranaire dans l'interaction liposome-cellule est décuplée par le fait que le mécanisme d'internalisation des liposomes repose sur un processus de fusion membranaire. Un tel processus est déjà suffisamment compliqué quand deux bicouches lipidiques pures sont impliquées, mais il prend une toute autre dimension quand les membranes plasmiques sont considérées, ces dernières étant formées d'un mélange complexe de lipides, de protéines et de glucides. En effet, entre le rapprochement de deux membranes et la formation d'un pore de fusion les reliant (**Figure 71a** et **71b**), de nombreuses barrières existent. La principale barrière est constituée des contraintes thermodynamiques, qui limitent la fusion spontanée de deux membranes dans des conditions standard [342]. Deux bicouches lipidiques vont ainsi avoir du mal à se « coller » l'une à l'autre à cause de forces de répulsion. Cependant, cette répulsion n'empêche pas la formation de structures transitoires appelées « *stalk* » (**Figure 71c**). Ces structures peuvent permettre des échanges rapides de matériel d'une bicouche à l'autre, mais les deux espaces hydrophiles de part et d'autre des membranes ne rentrent jamais en contact. La fusion des deux membranes est alors le plus souvent obtenue par élargissement du « *stalk* », pour former d'abord des structures d'hémi-fusion (**Figure 71d**), puis enfin, un pore connectant les compartiments aqueux de part et d'autre des membranes en fusion [343].



**Figure 71.** Mécanisme de fusion membranaire.

- a. Représentation schématique de deux bicouches avant fusion.
- b. Représentation schématique d'un pore de fusion.
- c. Représentation schématique d'un « *stalk* ».
- d. Représentation schématique d'une structure d'hémi-fusion.



**Figure 72.** DOPE dans un contexte de fusion membranaire.

- a. Représentation schématique de la DOPE.
- b. Représentation schématique de l'insertion de DOPE dans une membrane ayant un fort rayon de courbure.

La formation du pore de fusion est favorisée par la présence de lipides compatibles avec des rayons de courbures négatifs [318,342]. C'est notamment le cas du lipide fusogénique que nous avons utilisé, la DOPE, qui de par sa géométrie conique stabilise les structures intermédiaires et favorise thermodynamiquement la formation des pores (**Figure 72**).

Dans un tel processus, la fluidité membranaire intervient en modifiant la diffusion des lipides de la membrane, modifiant ainsi la cinétique de formation des *stalk* et leur élargissement progressif. L'étude de l'implication de la fluidité de deux membranes sur leur fusion serait extrêmement intéressante de ce point de vue, et permettrait de mieux comprendre pourquoi deux membranes fluides et deux membranes rigides interagissent mieux ensemble qu'une membrane fluide avec une membrane rigide. Il est à noter que, dans un contexte physiologique normal, de nombreux processus existent pour une fusion plus rapide et plus contrôlée. Le principal exemple est représenté par la famille de protéines SNARE (pour « *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor* »). Ces protéines sont le principal agent fusogène chez les eucaryotes. Elles sont notamment impliquées dans le trafic vésiculaire intracellulaire et la transmission du potentiel d'action à travers les synapses [344,345]. Chaque protéine SNARE a une structure hélicoïdale et possède un motif SNARE extrêmement conservé. L'assemblage de quatre hélices en un complexe *trans*-SNARE permet d'ancrer deux membranes ensemble. L'enroulement des hélices à la manière d'engrenages va alors permettre de rapprocher les deux membranes et ainsi de favoriser la formation des pores de fusion. Ce genre de mécanisme n'est, dans le cas de cette thèse, pas présent, les liposomes étant des bicouches lipidiques dépourvues de protéines. A ce niveau, des études structurales ayant pour but de caractériser la fusion d'une membrane lipidique avec une membrane cellulaire permettraient de mieux comprendre le mécanisme de cette fusion, ce qui pourrait à son tour permettre de nouvelles avancées dans la formulation de nouveaux vecteurs lipidiques. En ce sens, les expérimentations présentées dans le prochain chapitre représentent une étape préliminaire à de telles études mécanistiques sur des modèles biomimétiques artificiels.

## 2. Mise en place d'un modèle biomimétique pour l'étude des interactions vecteurs-membranes

Les différents modèles membranaires présentés en « **Etude bibliographique** » permettent l'analyse *in situ* du comportement des membranes, en les isolant du reste de la cellule. En parallèle de l'étude de l'interaction liposome-membrane sur des cellules en culture, nous nous sommes intéressés au cours de cette thèse, à la caractérisation de cette interaction par des méthodes biophysiques sur des modèles biomimétiques.

Le modèle membranaire choisi, basé sur la formation d'une pep-tBLM, avait précédemment été développé et caractérisé au laboratoire lors des thèses de Samuel REBAUD et Meriem CHADLI [311,312]. La formation de ce modèle repose sur un processus en trois étapes, précédemment décrit en « **Étude Bibliographique** » (4.4., page 89), à savoir la fixation de peptides pilotis sur une surface d'or, l'ancrage de liposomes sur ces peptides puis la fusion des liposomes en bicouche plane sous l'effet d'un peptide fusogène. Le modèle a été caractérisé à deux niveaux : lors de sa formation par SPRi et après chaque étape, par AFM et FRAP. Cette caractérisation a montré une arrivée de matière assortie d'une augmentation de la granulosité lors du dépôt des peptides pilotis puis des liposomes, avant un départ de matière et un aplanissement de la surface lors de la fusion. De plus, bien qu'aucun recouvrement de fluorescence n'intervienne avant l'injection du peptide fusogène, la bicouche finale présente un recouvrement rapide, montrant la formation d'une bicouche fluide et continue sur toute la surface sondée. Enfin, ce modèle a été utilisé avec succès pour la reconstitution d'un récepteur couplé à la protéine G, le CXCR4, une protéine à sept passages transmembranaires, dont l'activité a été validée par essais de fixation de ligands [275].

Dans le but d'étudier au mieux l'interaction de nos liposomes avec ce modèle biomimétique, deux stratégies ont été mises en place. La première repose sur l'utilisation de méthodes alternatives à celles déjà décrites pour mieux décrire le système développé. Pour ce faire, diverses techniques ont été testées. Nous avons retenu la microbalance à cristal de quartz avec suivi de la dissipation ou QCM-D et la microscopie avec une couche arrière absorbante ou BALM (pour « *Backside*

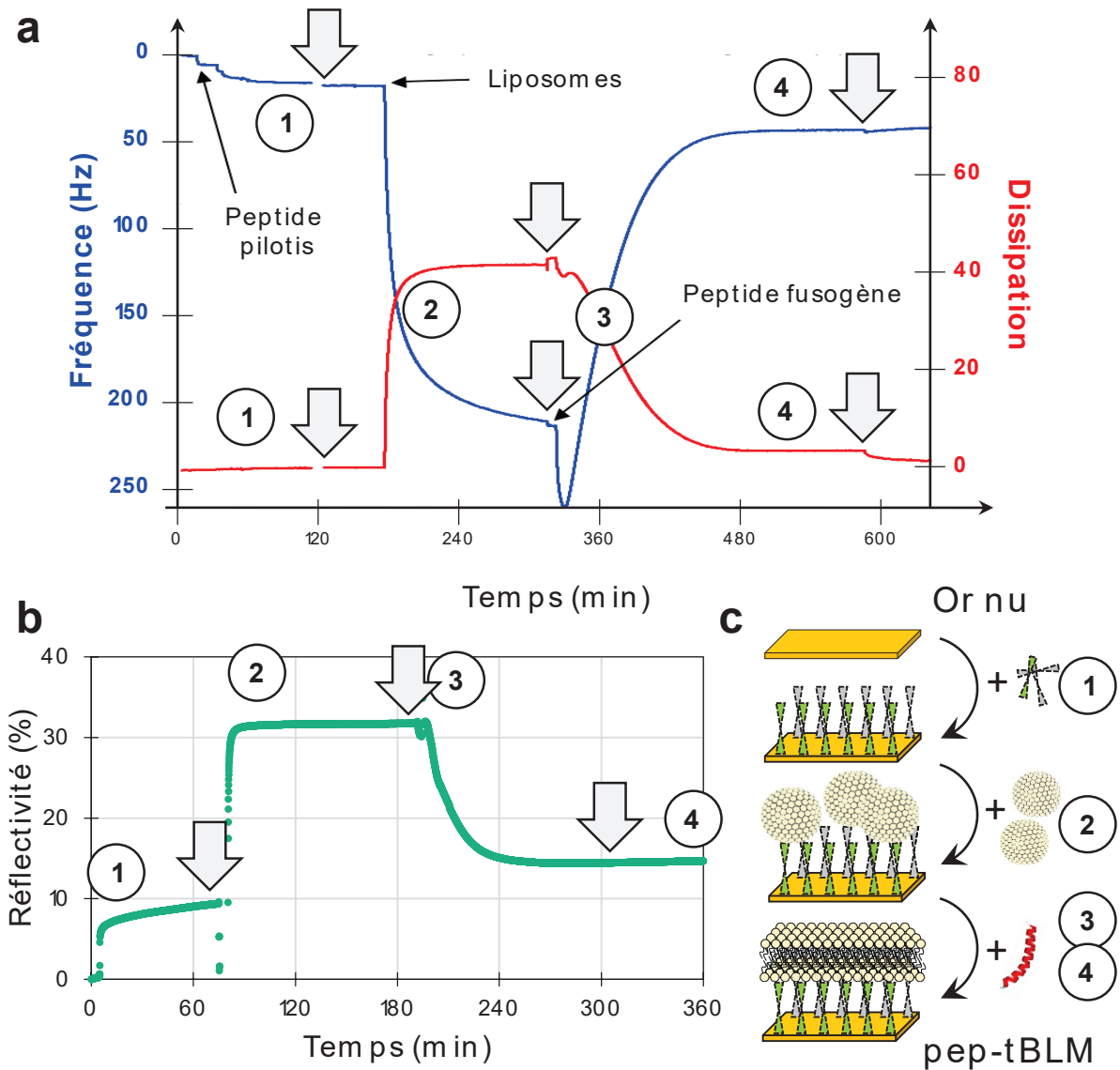
*Absorbing Layer Microscopy*»), ces deux méthodes permettant d'obtenir des informations complémentaires à celles déjà obtenues. La diffraction de neutrons aux petits angles ou SANS et la spectroscopie d'impédance électrochimique ou EIS ont également été testées, mais n'ont pas donné de résultats exploitables faute d'optimisation suffisante des conditions expérimentales par manque de temps. La deuxième stratégie utilisée repose sur la composition de la membrane biomimétique et la formation d'une bicouche à partir d'extraits naturels de la membrane plasmique.

## 2.1. Caractérisation de tBLM par la QCM-D et la BALM

### 2.1.1. Application de la QCM-D pour la caractérisation de pep-tBLM

La QCM-D est une technique en temps réel, permettant la mesure de l'adsorption de masse sur une surface. La QCM-D se distingue par sa capacité à déterminer une épaisseur acoustique et d'en déduire la masse adsorbée à la surface. En comparaison, la SPRi, qui est la technique de référence de suivi de la formation des bicouches biomimétiques développées au laboratoire, détermine une épaisseur optique. Cette différence rend la QCM-D sensible au solvant (quand celui-ci est piégé dans la couche formée), alors que la SPRi ne l'est pas. Comparer les signaux SPRi et QCM-D permet ainsi l'estimation de l'impact du tampon dans l'épaisseur de la couche. De plus, alors que les méthodes basées sur la SPR nécessitent des analyses multiparamétriques pour le calcul de la masse adsorbée, ce calcul est direct dans le cas de la QCM-D.

La mise en place de cette technique à l'étude de notre système a été réalisée avec une composition simple, constituée uniquement de POPC dopée de 2% (mol/mol) du lipide chélatant DOGS-NTA(Ni). Ces expérimentations ont été réalisées en collaboration avec le Pr Donald MARTIN, le Dr Marco MACCARINI et Sebastian KOHLER (TIMC - UMR CNRS 5525 - Equipe SyNaBi). Les profils-types obtenus montrent une très bonne corrélation du signal QCM-D (**Figure 73a**) avec le signal de SPRi (**Figure 73b**), et permet de retrouver chaque étape de la cinétique de formation (**Figure 73c**). L'analyse du signal QCM-D apporte cependant des informations complémentaires, notamment lorsque sont comparés les signaux en termes de fréquence et de dissipation.



**Figure 73.** Formation d'une pep-tBLM modèle, à partir de liposomes POPC, suivie par QCM-D et SPRi. **1** : Phase d'adsorption des pilotis ; **2** : Phase d'accrochage des liposomes ; **3** : Fusion des liposomes ; **4** : Etat final correspondant à la pep-tBLM. Les différentes phases de rinçage sont représentées par des flèches.

**a.** Profil type obtenu par QCM-D.

**b.** Profil type obtenu par SPRi.

**c.** Représentation schématique des différentes étapes du processus de formation de la bicouche attachée.

Pendant la phase d'adsorption des pilotis notamment, la fréquence diminue, ce qui est significatif d'une augmentation de la masse adsorbée, mais la dissipation ne varie pas. Cela révèle l'arrivée d'une masse rigide à la surface du cristal, qui ne modifie pas la viscosité de la surface. Cette observation est cohérente avec le mécanisme décrit précédemment, où les peptides pilotis apparaissent comme des hélices réparties sur la surface. L'injection de liposomes se traduit par une très importante chute de la fréquence couplée à une forte augmentation de la dissipation. Cela est parfaitement cohérent avec la fixation des liposomes à la surface, ces derniers étant de gros objets viscoélastiques qui dissipent efficacement l'énergie. Enfin, lors de l'ajout du peptide fusogène, on observe tout d'abord une chute de la fréquence avant une remontée à un niveau proche (mais inférieur) de celui atteint pour les peptides pilotis. Ce comportement phénoménologique est retrouvé sur le suivi par SPRi, et valide le mode d'action décrit pour le peptide fusogène. En effet, ce dernier agirait en s'insérant et en déstabilisant dans les membranes des liposomes, ce qui aurait pour conséquence le gonflement des liposomes avant leur éclatement ou leur fusion [346]. La diminution initiale du signal, correspondant à l'arrivée de matière, indiquerait alors au gonflement des liposomes induit par le peptide fusogène ; l'augmentation consécutive correspondant à une désorption, indiquerait alors un départ progressif de matière lors de l'ouverture des liposomes. Ce comportement a déjà été décrit et caractérisé pour des bicouches supportées [314,315]. Ici, le même mécanisme est observé lors de la fusion de liposomes reposant non pas sur le support directement mais sur une couche de peptides pilotis. Il est à noter que la cinétique d'adsorption et de fusion des liposomes est inhabituellement longue (près de 2h en QCM-D contre 1h en SPRi), ce qui est probablement la conséquence du manque d'homogénéisation dans le système, la configuration du dispositif expérimental rendant difficile la diffusion des différents éléments injectés.

Différentes concentrations de peptides, pilotis et fusogène, ont été testées. Les résultats des densités surfaciques obtenues à chaque point caractéristique de la cinétique sont présentés dans le **Tableau 5**.

Condition	Concentration (µg/mL)		Densité (ng/cm <sup>2</sup> )				
	Pilotis	Fusogène	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	Membrane
1	10	200	284	3 473	4 305	818	534 (±60)
2	5	200	150	2 854	3 560	654	504 (±63)
3	5	128	126	4 041	4 957	525	399 (±63)
4	0,5	128	30	2 284	2 821	224	194 (±67)

**Tableau 5.** Densités surfaciques mesurées par QCM-D à chaque étape caractéristique de la formation de la pep-tBLM (Cf. **Figure 73c**) en fonction des concentrations en peptides pilotis et fusogène. La colonne « Membrane » correspond à la différence entre la fin de la phase fusogène (**4**) et la fin de la phase pilotis (**1**).

Ces résultats préliminaires nous permettent de faire certaines observations. Notamment, le calcul de la densité surfacique correspondant uniquement à la bicouche est possible, en soustrayant à la densité surfacique de la fin de la phase fusogène celle de la fin de la phase pilotis. En effet, à la fin de la phase fusogène, la masse adsorbée correspond à la bicouche + pilotis. Soustraire la densité des pilotis permet donc de ne garder que la densité de la bicouche. Ces résultats permettent de juger la qualité de la membrane finale, en les comparant à la densité finale théorique attendue. Pour une bicouche composée de POPC uniquement, le calcul de la densité massique surfacique ne nécessite en effet que deux variables, à savoir la masse d'une molécule de POPC et la surface qu'occupe chaque molécule dans une bicouche plane. La masse d'une molécule de POPC est aisée à calculer, à partir du nombre d'Avogadro et de la masse molaire de POPC (**Eq. 9**). La surface moléculaire moyenne de POPC a été déterminée à partir de la littérature scientifique, sur des études en monocouches. La surface moyenne occupée par une molécule de POPC a ainsi été estimée à 0,63 nm<sup>2</sup> [347,348]. Le calcul de la densité surfacique moyenne (**Eq. 10**) donne ainsi 200 ng/cm<sup>2</sup> pour une monocouche, soit 401 ng/cm<sup>2</sup> pour une bicouche.

$$m_{\text{moléculaire POPC}} = \frac{M_{\text{POPC}}}{N_A} \quad \text{Eq. 9}$$

$$d_{\text{surfactive bicouche}} = 2 \times d_{\text{surfactive monocouche}} = 2 \times \frac{m_{\text{moléculaire POPC}}}{S_{\text{moléculaire POPC}}} \quad \text{Eq. 10}$$



La comparaison de cette valeur de densité théorique à la valeur obtenue expérimentalement pour chaque condition permet de mettre en évidence la formation de bicouches complètes (1<sup>e</sup>, 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> conditions), et des bicouches incomplètes (4<sup>e</sup> condition). L'appréciation de la qualité de la membrane est cependant fortement affectée par la variabilité des résultats. Néanmoins, l'étude de l'impact de la variation de la concentration en peptide pilotis entre les différentes conditions sur les densités surfaciques obtenues est très intéressante. Il apparaît que diminuer la concentration de peptide pilotis se traduit par une réduction de la quantité de peptide adsorbé, ce qui est parfaitement cohérent. En revanche, la quantité de peptide adsorbé à la surface ne semble pas avoir d'impact significatif sur la quantité de liposomes adsorbés par la suite sauf pour les conditions où le peptide pilotis est très dilué (0,5 µg/mL). En combinant cette analyse avec la qualité des membranes formées, il se dégage que le peptide pilotis est, pour des concentrations de 5 à 10 µg/mL, présent en excès, et qu'il n'est pas l'élément limitant pour la formation de membranes. En revanche, des concentrations trop basses de peptide pilotis s'accompagnent d'une légère diminution de la quantité de liposomes qui va s'y attacher, et d'une forte chute de la quantité de membranes présentes à la fin de l'expérience. L'analyse de l'action du peptide fusogène nous apporte elle aussi des informations intéressantes. La comparaison de l'évolution de la densité surfacique entre la fin de l'étape de fixation des liposomes (**2**) et le pic obtenu peu après injection du peptide fusogène (**3**) montre une évolution relative de +23,6 (±1) % pour toutes les conditions. Ce résultat montre que le peptide fusogène, aux deux concentrations testées, est en excès, puisque dans les deux conditions testées la même quantité s'insère. En revanche, il semble qu'il n'y a aucune relation entre la densité à la fin de l'étape de fusion (**4**) et la quantité de liposomes précédemment adsorbés (**2**). De même, aucune relation n'est observée entre le début (**3**) et la fin (**4**) de la phase fusogène.

L'ensemble de ces observations nous permettent de proposer un mécanisme. Dans celui-ci, le peptide pilotis, lors de son injection, se répartit sur toute la surface en fonction de sa concentration, les concentrations élevées se traduisant par une distance entre peptides plus courte. La fixation subséquente des liposomes n'est sensible à la quantité de peptide pilotis que lorsque cette dernière passe sous un

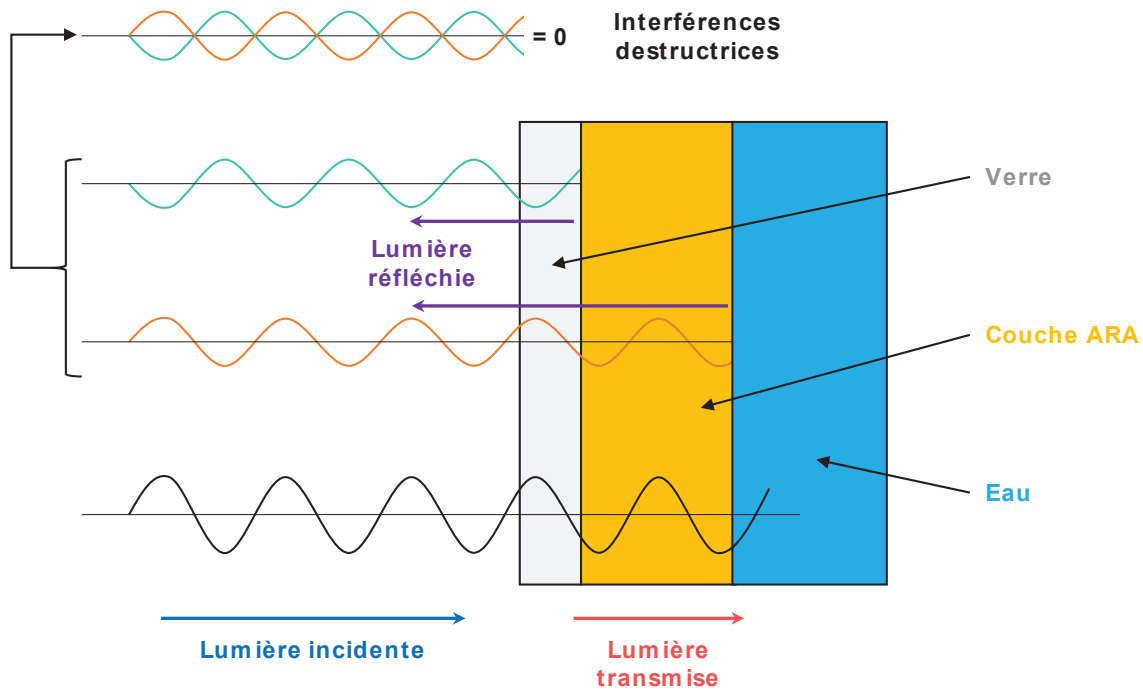
seuil critique, compris entre 5 et 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de pilotis injecté. Enfin, le peptide fusogène fait s'ouvrir les liposomes en s'insérant dans leurs membranes pour former des bicouches. Il s'avère que la qualité de la bicouche finale va alors dépendre de la quantité de pilotis initialement présente. Avec un bon recouvrement, on assiste à la formation de bicouches jointives, qui forment une pep-tBLM homogène et continue à la surface, comme l'a montré le FRAP précédemment [349]. En revanche, cette étude montre que si la densité de peptide pilotis n'est pas suffisante, la formation de la bicouche sera incomplète. Il est probable qu'il se forme des patchs de membrane, isolés les uns des autres.

Même si ces analyses devraient être répétées, les résultats de QCM-D ont permis de montrer que la qualité finale de la bicouche est directement liée à la qualité de la couche de peptide pilotis. L'ensemble des techniques utilisées jusqu'ici pour suivre la formation de la pep-tBLM (SPRi, QCM-D) sont des méthodes en temps réel. Ces méthodes permettent un suivi global du processus de formation, mais sont limitées par leur résolution. En effet, l'analyse des résultats obtenus par SPRi et par QCM-D implique de considérer que tout le système présente une surface homogène, ce qui n'est pas forcément le cas. Obtenir des informations sur les mécanismes locaux implique l'utilisation de méthodes résolutive, comme l'AFM ou le FRAP, mais ces méthodes ne permettent pas de suivi en temps réel. Pour combiner l'approche résolutive avec l'approche en temps réel, nous avons utilisé la BALM (pour « *Backside Absorbing Layer Microscopy* ») pour caractériser notre système de pep-tBLM.

## 2.1.2. Application de la BALM pour la caractérisation de tBLM

### 2.1.2.1. Présentation de la BALM

La BALM est une méthode de microscopie optique en temps réel à ultra-haute résolution, développée par le Dr Dominique AUSSERRÉ (IMMM - UMR CNRS 6283). Elle est basée sur l'utilisation de couches anti-réfléchissantes faites de matériaux absorbants, appelées ARA (pour « *Anti Reflecting and made of Absorbing material* »). L'intérêt de ces couches est de générer des interférences destructrices qui permettent d'obtenir l'extinction du signal de fond (**Figure 74**), et par conséquent une meilleure résolution des objets observés.

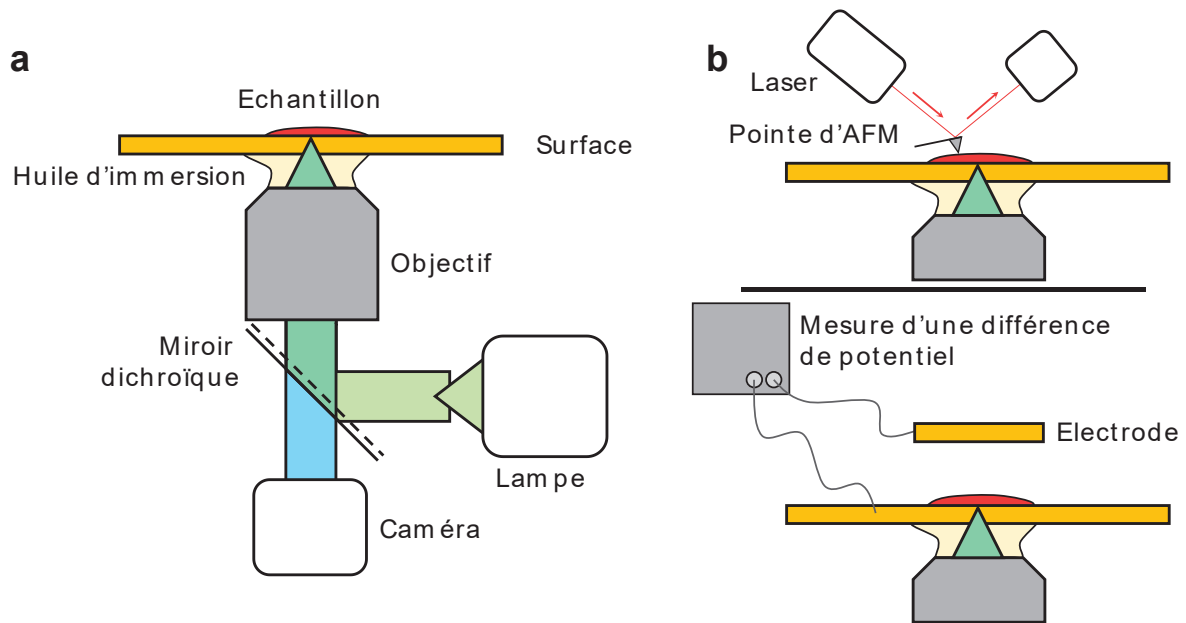


**Figure 74.** Fonctionnement des couches ARA.

Le contraste ( $C$ ) étant défini par l'**Eq. 11**, l'extinction du signal de fond ( $I_{\text{support}} \ll I_{\text{objet}}$ ) est l'une des deux solutions qui permettent de le maximiser, l'autre étant d'éclairer l'objet étudié ( $I_{\text{objet}} \gg I_{\text{support}}$ ).

$$C = \frac{I_{\text{objet}} - I_{\text{support}}}{I_{\text{objet}} + I_{\text{support}}} \quad \text{Eq. 11}$$

La BALM se présente ainsi comme une méthode de microscopie inversée, où la lumière émise est collectée dans le même objectif. La BALM occupe le demi-espace en dessous de l'échantillon (**Figure 75a**) et laisse ainsi accessible le demi-espace supérieur pour manipuler l'échantillon ou encore installer une méthode d'analyse complémentaire, comme par exemple un dispositif d'AFM ou de suivi électrochimique (**Figure 75b**).



**Figure 75.** Dispositif expérimental de la BALM.

- a.** Représentation schématique du montage expérimental de la BALM.
- b.** Représentation schématique des possibilités de couplage de la BALM avec l'AFM et de l'électrochimie.

Par rapport aux techniques conventionnelles, la BALM se distingue de par les informations qu'elle fournit. En effet, elle permet de suivre un événement dynamique par la prise de nombreuses images, qui permettent de sonder l'homogénéité de la surface étudiée.

Précédemment, la BALM a montré son avantage sur des applications liées à la physicochimie de surface [350]. Dans le cadre de cette thèse, la BALM a été appliquée au suivi de la formation de pep-tBLM formées par la méthode en trois étapes développée au laboratoire. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication soumise dans *Biophysical Journal*.

*2.1.2.2. Résumé de l'article « BALM: Watching the Formation of Tethered Bilayer Lipid Membranes with submicron lateral resolution », Bompard et al. soumis dans Biophysical Journal*

La formation de pep-tBLM a été caractérisée par la BALM et par la SPRi, la méthode standard pour le système utilisé. La réflectivité globale mesurée par la BALM a été

comparée à l'analyse SPRi, et, en parallèle, les images obtenues par la BALM ont été analysées afin d'en extraire des informations sur des mécanismes locaux.

Pour se faire, nous avons utilisé deux compositions liposomales :

- la composition dite « POPC », où les liposomes sont constitués de POPC uniquement, avec 2% (rapport molaire) de DOGS-NTA(Ni) pour permettre l'accrochage des liposomes aux peptides pilotis ;
- la composition dite « Biomimétique », où les liposomes sont constitués d'un mélange de PC, PE, cholestérol et SM (42/10/11/35) mimant la composition de la membrane plasmique, là encore dopé avec 2% (rapport molaire) de DOGS-NTA(Ni).

Après contrôle de la taille des liposomes, la formation d'une pep-tBLM de bonne qualité a été vérifiée par l'analyse en SPRi, qui a confirmé la présence d'une bicouche à la fin du procédé comme précédemment décrit [349]. Le suivi de la formation des pep-tBLM par la BALM a permis d'obtenir un grand nombre d'images réparties tout le long de la cinétique.

L'analyse des résultats obtenus par BALM s'est scindée en deux grands volets :

- une analyse globale du signal de réflectivité moyennée sur toute la surface de l'image, ce qui reproduit le champ d'étude de la SPRi ;
- une analyse locale sur de petites zones des images, ce qui complète les informations spatiales apportées par l'AFM ou le FRAP.

La comparaison des courbes de réflectivité globale obtenues par la BALM et la SPRi montre une très bonne corrélation entre les deux techniques. Ces deux méthodes, permettent de suivre la formation des pep-tBLM à chaque étape caractéristique de la cinétique : fixation du peptide pilotis, accrochage des liposomes et fusion sous l'action du peptide fusogène. De plus, après avoir établi le lien entre le signal mesuré et l'épaisseur de la couche observée, une analyse quantitative montre des résultats similaires pour la BALM et la SPRi. Ces résultats sont de plus cohérents avec l'estimation de l'épaisseur finale de la bicouche, qui montre la formation d'une bicouche sur toute la surface.

Le suivi d'une même zone sur les images tout le long de la cinétique de formation a permis de visualiser l'adsorption et la désorption de matière mesurées par le suivi

de la réflectivité globale. Cependant, à l'inverse de l'analyse globale, cette analyse locale a permis de mettre en évidence l'existence de motifs sur la surface, qui apparaissent dès l'étape d'adsorption des peptides pilotis, et qui persistent jusqu'à la fin de la formation de la pep-tBLM. La visualisation de ces motifs, mise en avant par une représentation du relief de la surface, montre l'intérêt des mesures locales par rapport aux mesures globales, ces dernières considérant de manière générale la surface comme homogène alors qu'elle ne l'est pas. L'analyse plus poussée sur une zone très réduite a permis de comparer l'évolution de l'épaisseur entre plusieurs instants notables de la cinétique. En plus de la corrélation observée avec ce qui avait déjà été décrit, cette analyse a permis de mettre en évidence de nouvelles informations sur les mécanismes de la formation d'agrégats de peptide pilotis, l'attachement préférentiel des liposomes aux régions riches en pilotis, ou encore l'insertion préférentielle du peptide fusogène dans les liposomes aplatis présents dans les régions pauvres en pilotis. Enfin, l'observation des arrivées et des départs de matière pendant un laps de temps d'une minute a permis de mettre en évidence la présence de flux de matière. Ces flux, locaux et dynamiques, ont permis d'expliquer certains des mécanismes décrits, comme notamment l'agrégation des peptides pilotis qui serait due à une migration des régions pauvres vers les régions riches en peptides pilotis adsorbés.

L'ensemble de ces résultats a permis de préciser le mécanisme de formation des pep-tBLM par la méthode développée au laboratoire : lors de l'injection du peptide pilotis se forment des agrégats, qui croissent par recrutement depuis les régions pauvres en pilotis vers les régions riches. Après rinçage et injection des liposomes, ces derniers vont alors se fixer préférentiellement dans les régions riches en pilotis, formant des agrégats de liposomes collés les uns aux autres. En revanche, dans les régions pauvres en pilotis, un nombre plus réduit de liposomes se fixent, ce qui conduit à leur étalement pour couvrir une plus grande surface. Cette déformation des liposomes dans les régions pauvres en pilotis va conduire à l'insertion préférentielle du peptide fusogène dans les régions pauvres en pilotis lors de son injection, cette insertion étant dépendante de la présence d'un fort rayon de courbure [315]. Enfin, la fusion entraîne un départ progressif de la matière lipidique, avant la formation d'une bicouche relativement homogène, où persistent quelques poches vésiculaires fluctuantes.

Ces travaux, sous le contrôle de la SPRi comme méthode de référence, montrent tous les avantages de l'application de la BALM à l'étude de systèmes biologiques complexes puisqu'elle combine à la fois une analyse très sensible et ultra-résolutive en temps réel.

### 2.1.2.3. *Publication*

## **BALM: Watching the Formation of Tethered Bilayer Lipid Membranes with submicron lateral resolution**

J. BOMPARD, O. MANITI, R. ABOUKHACHFE, D. AUSSERRE\*, A. GIRARD-EGROT\*

\*: Co-corresponding authors

## **RUNNING TITLE**

BALM for live characterization of tBLM

## **ABSTRACT**

Tethered Bilayer Lipid Membranes (tBLMs) are artificial membranes largely used for the *in-situ* study of biological membranes and membrane-associated proteins. Up to now, the formation of these membranes was essentially monitored by surface averaging techniques like SPR and QCM-D which cannot provide both local and real-time information in a single approach. Here, we report an original application of Backside Absorbing Layer Microscopy (BALM), a novel white-light wide-field optical microscopy, to study tBLMs. Thanks to the combination of sensitivity and resolution, BALM not only allowed the real-time quantitative monitoring of the tBLM formation, but it also enabled the high-resolution visualization of the local fluxes and matter exchanges taking place at each step of the process. Quantitative BALM measurements of the final layer thickness, reproduced in parallel with SPR, were consistent with the achievement of a continuous lipid bilayer. This finding was confirmed with BALM imaging, which additionally revealed the heterogeneity of the bilayer during its formation. While

established real-time techniques, like SPR or QCM-D, view the surface as homogeneous, BALM showed the presence of surface patterns; appearing in the first step of the tBLM formation process and governing every thereafter matter adsorption and desorption. Finally, matter fluxes persisting even after rinsing at the end of the tBLM formation demonstrated the lasting presence of dispersed vesicular pockets with laterally-fluctuating positions over the final single and continuous lipid bilayer. These new mechanistic insights on the tBLM formation process demonstrate the great potential of BALM in the study of complex biological systems.

## STATEMENT OF SIGNIFICANCE

Biomimetic membranes must be characterized as much as possible at the microscopic scale by *in-situ* and real-time techniques; in order to derive information on dynamic molecular aspects. Backside Absorbing Layer Microscopy (BALM), a recent microscopy technique, allows the *in-situ* and real-time characterization of advanced lipid membrane models like tBLMs that have a significant biological relevance. This new microscopy enabled the monitoring of matter adsorption and desorption during the tBLM formation process. It is consistent with the previously described mechanism, but it also brought new mechanistic insights through the visualization of local and dynamic molecular fluxes. This demonstrates the potential of BALM as a powerful tool to probe membrane biological processes.

## INTRODUCTION

As the interphase between the cell and its environment, biological membranes not only serve as physical boundaries, but they also host a plethora of membrane proteins. These proteins assume many cell functions such as cell-cell communication, nutrient import, or signal transduction and, as such, they are the target of more than 60% of medicinal drugs [1–3]. Investigating membranes and membrane proteins is therefore of critical importance. However, due to the complexity of the cell, *in situ* investigation of biological membranes remains a great



challenge. Biomimetic membrane platforms in which a synthetic membrane is supported by a solid surface are hence used either for membrane properties measurements or the *in vitro* reconstitution and study of membrane proteins. Various biomimetic membranes have been developed, such as solid-supported membranes [9,10], polymer-cushioned membranes [11–13], hybrid lipid bilayers [14–16], suspended lipid bilayers [17–19], and tethered bilayer lipid membranes or tBLMs [20–28].

tBLMs are a natural progression from the planar supported lipid bilayers (SLBs). As first reported by McConnell *et al.* [10], SLBs are classically obtained by spreading small unilamellar vesicles on hydrophilic solid supports [29–32], which results in a lipid bilayer separated from the solid substrate by an ultrathin film of water (1–2 nm) [33]. This thin aqueous layer confers to SLBs the fluidity required for lateral diffusion in 2D space [29], but restricts the incorporation of transmembrane proteins possessing extra-membrane domains like ectodomains [13,34–37], which are essential to their function. In tBLMs, the inner membrane leaflet is separated from the support through a spacer unit, which lifts the membrane off the surface while anchoring it [33], thus reducing the influence of the surface and unfavorable frictions to the support. For this reason, tBLMs became the preferred solution for membrane protein reconstitution [6,28,34,35,37–45]. They have been also used as screening platforms for biological [4,5,43,46] and biosensing applications [4–8,47,48].

The different types of tBLMs mainly differ in the chemical structure of the tethers [5,21,22,25,34,36,37,49] and their tethering density, both factors significantly influencing the structural characteristics of the bilayer as well as the possibility to reincorporate functional transmembrane proteins [33,50]. Tethering molecules could be anchor lipids [7,51,52], polymers [6,28,36,42,53], peptides [34,54] or proteins [55–61]. Telechelics, anchor lipids coupled with polyethylene glycol (PEG), were the first to be used for tethering a lipid membrane [22]; however, for this important class of anchor lipids, neutron scattering [62] and PM-IRRAS studies [63] have revealed a poorly hydrated spacer segment, in spite of the water solubility of polyethylene glycol (PEG), due to the high tether density in the proximal leaflet.

Peptides have also been explored as tethering moieties to create peptide-tethered lipid bilayer membranes (pep-tBLMs). They are prepared from synthetic or native thiopeptides, or thiolipopeptides [34]. They are functionalized at their *N*-terminus

by a sulfur group such as a cysteine or a lipoic acid so that they self-assemble from solution on gold - a surface of choice for biosensing applications-, whereas their C-terminus extremity is chemically activated afterward for coupling to the amino polar headgroup of various phosphatidylethanolamines (PE) in solution. These latter constitute the bilayer proximal leaflet [5,54,64–66]. The distal leaflet is formed in a second step by the fusion of liposomes possibly including proteins of interest onto the hydrophobic proximal layer [37]. Polar peptides used as tethers are suited for membrane protein reincorporation by providing a biocompatible space in which ectodomains can fold with a native-like functional conformation. Their length, their secondary structure, and their hydrophilic properties can be easily tuned by changing their amino acid sequences to get a higher hydration level. This enables a flexible adjustment of both membrane–substrate separation and viscosity of the tethering units [36]. Thus, numerous large integral membrane proteins have been successfully reincorporated in pep-tBLMs, e.g. cytochrome c [54], cytochrome  $b_0$  ubiquinol oxidases [67],  $H^+$ -ATPases [64,68], acetylcholine receptor dimer [66], integrins [69] or hERG potassium channels [47]. However, a proper reinsertion of a transmembrane protein in the lipid bilayer is not a guarantee of a functional folding and few reported on the functionality of the incorporated proteins [7,41,67]. Indeed, in the above-mentioned process, the two leaflets of the lipid membrane were formed independently, leading to protein misfolding. Recently, a new approach has been proposed to form the bilayer of the pep-tBLM in a single shot [39,70]. Preformed liposomes, including or not membrane proteins, were attached by a metal-chelate interaction to a natural thiopeptide spacer previously grafted on a gold substrate by a cysteine residue at its N-terminal extremity, before triggering the liposome fusion by a fusogenic agent to form pep-tBLMs [39]. A benefit of using peptides as tethers for entire vesicles is that the lipid composition of the vesicle membrane can be modified as desired [39]. The attachment by chelation confers a great stability to the bilayer, when compared to the other pep-tBLMs described in the literature for which the attachment is ensured by hydrophobic interactions. These pep-tBLMs exhibit a smooth surface with a mean approximate height of 5 nm, the thickness expected for a pure phospholipid bilayer, and a diffusion coefficient of  $2 - 2.5 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ , consistent with those recently determined in complex membrane compositions [71]. By adapting the lipid composition, a C-X-C motif chemokine receptor 4 protein

(CXCR4), a seven-transmembrane protein belonging to the large superfamily of G-protein-coupled receptors (GPCRs), was successfully reincorporated and its functionality checked by ligand binding assays after the pep-tBLM formation [39,48].

The characterization and the use of tBLMs as well as SLBs require highly sensitive surface techniques. The most frequently used are the label-free Surface Plasmon Resonance (SPR) [5,20,34,65,72] and Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring (QCM-D) [6,42]. However, those yield a global measurement, averaged over a large area, making it impossible to detect any material redistribution along the surface or to probe local mechanisms. Only imaging techniques allow to overcome these severe limitations. Among them, with a nanometer resolution in all directions, High-Speed Atomic Force Microscopy (HS-AFM) is unrivaled. A spectacular demonstration was given for instance with the dynamic study of the pore forming protein lysenin in a complex SLB membrane environment [73]. However, although progressively spreading, this technique remains very delicate to use, reserved to sharp specialists. For the study of tBLMs, the difficulty is even expected to be higher due to the fluctuating character of the tethered membrane. Besides, resolution is not everything and AFM suffers from a very limited field of view. In this context, with a simpler implementation, a lower resolution but an arbitrarily large field of view, enhanced contrast optical microscopies provide an interesting compromise. Among them, the most recent are Surface Enhanced Ellipsometric Contrast (SEEC) [74] and Backside Absorbing Layer Microscopy (BALM) [72, 73]. As for the SPR, both techniques lie on the use of a special supporting plate providing background extinction in reflected light, hence high contrast of objects deposited on the plate. In the first one, this surface preserves the polarization state of the incident light for a given incidence and for all azimuth angles, so that extinction can be obtained between cross polarizers under a microscope. In the second one, which does not require a polarized light, the special surface is actually a window and extinction is insured in the backplane of the window by a novel type of antireflecting layer, named ARA (Anti-Reflecting and made of Absorbing materials) [75]. The natural implementation of the SEEC is the upright polarization microscope, with observation of the sample from the top. The natural and only possible implementation of the BALM is the inverted geometry,

with observation of the sample from the bottom. Both techniques may reach comparable sensitivities when used in their natural implementation. Although SEEC can also be used in the inverted geometry, it is generally less sensitive than BALM in this configuration by a factor 10 to 100 [76] and it is more difficult to implement because of demanding constraints on the incidence angle [77] and because of the possible impact of the window on the polarization state of the light. Yet, SEEC has already been successfully implemented in the inverted geometry [78] and used to study biomimetic membranes [77]. However, its use was limited to enhancing surfaces covered with silica but never with gold (which would require to work within a  $65 \pm 5$  deg. incidence), thus it could not be directly compared with SPR.

Here, we report the first application of Backside Absorbing Layer Microscopy (BALM) on a biological system to probe the forming process of a pep-tBLM that was previously characterized by SPRi, AFM and FRAP [39,48]. BALM is a white-light wide-field optical microscopy. It combines SPR-like sensitivity with a 200 nm resolution [79]. On top of working *in situ* and in real-time, BALM is also remarkable for its simplicity and its flexibility, since the top surface of the ARA coating can be of almost any nature and observed in any ambient medium. The performance of the technique was already demonstrated by imaging 2D flakes of various materials, by following *in situ* and in real-time their evolution upon small molecules adsorption [79] or by detecting operando the electrochemical reduction of individual sub-10 nm nanoparticles [80]. Recently, a universal relationship has been established between the BALM reflectivity and the physical thickness of a layer sample, ruled by three measurable quantities [81]. This relationship can be used without any knowledge of the microscope settings or the ARA coating in order to obtain a thickness map of the sample, whatever its (constant) complex refractive index, in a typical thickness range going from 0 to 30 nm. The thickness unit can be further determined with the help of a single reference measurement. The BALM reflectivity can also be averaged over the entire image, resulting in a global measurement similar to that of SPR or QCM-D. Here, we took advantage of these features to probe the transient structures arising during pep-tBLMs formation. Except for the FRAP experiments which directly probe layer continuity, previous techniques could not provide any information on these transients. With BALM imaging, we were able on one hand to produce quantitative real-time

measurements of averaged deposited quantities, which can be directly compared with the SPR, and on the other hand to image at the submicron level the local material fluxes involved in each step of the process.

## MATERIALS and METHODS

### Reagents

HEPES and NaCl were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), DOPE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine), SM (sphingomyelin (brain, porcine)), CHOL (cholesterol) and DOGS-NTA(Ni) (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-[(N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid)succinyl] Nickel salt) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Ultrapure water (18.2 M $\Omega$ .cm) was produced by PURELAB Option-Q (ELGA Lab Water, Veolia Water STI, Antony, France). Tether P19-4H (sequence: CSRARKQAASIKVAVSADRHHHH) and fusogenic AH (sequence: SGSWLRD VWDWICTVL TDFKTWLQSKLDYKD) peptides were synthesized by Smartox Biotechnologies (Saint-Egrève, France). All the reagents were of the best analytical grade available.

### Preparation of liposomes

Large Unilamellar Vesicles (LUVs) were prepared by thin film hydration with the compositions listed in Table 1. Briefly, lipids dissolved in chloroform were mixed in a round flask. The solvent was dried under vacuum at 50°C on a rotatory evaporator. The dry film was hydrated by 1 mL of HEPES 20 mM, NaCl 100 mM pH 7.4 buffer while stirring and heating at 70°C, resulting in the formation of MultiLamellar Vesicles (MLVs) with various sizes and layer numbers. Six freeze-thaw cycles in liquid nitrogen were then applied to the prepared liposomes in order to burst the MLVs into Large Unilamellar Vesicles (LUVs) as previously shown [82]. The LUVs size was defined by extrusion through a 400 nm, then a 100 nm pore diameter polycarbonate membrane using a MiniExtruder apparatus (Avanti Polar Lipids), 21 times each. Dynamic light scattering (DLS) measurements of the size and

polydispersity index (PDI) of the prepared liposomes were performed on a Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK).

**Table 1: Lipid compositions, mean size, and polydispersity indexes of the prepared liposomes.**

Lipid composition	Molar percentages	Mean size (nm)	PDI
POPC/DOGS-NTA(Ni)	98:2	116.2 ( $\pm$ 0.4)	0.10
POPC/SM/DOPE/CHOL/DOGS-NTA(Ni)	42:35:10:11:2	123.5 ( $\pm$ 1.2)	0.12

## pep-tBLM formation process

pep-tBLMs were formed in 3 steps. The first step corresponds to the grafting, to a gold surface, of a tether P19-4H peptide derived from the natural  $\alpha$ -laminin thiopeptide P19 and widely used to form pep-tBLMs [5,41,47,69]. The grafting was insured by a natural cysteine residue at the peptide *N*-terminal extremity. The peptide used present four histidine residues in their C-terminal extremity, which allow the anchoring of liposomes doped with 2% molar ratio of a chelating lipid called DOGS-NTA [39]. In the presence of nickel, P19-4H and DOGS-NTA were able to bind. The liposome fusion was triggered by an  $\alpha$ -helical (AH) peptide derived from the *N*-terminal extremity of the hepatitis C virus NS5A, as previously described [39].

## Surface Plasmon Resonance imaging (SPRi)

The pep-tBLM formation was monitored through a Horiba SPRi+ biosensor (Horiba Jobin Yvon SAS, Longjumeau, France). Glass prisms recovered by a thin 45 nm gold film and cleaned beforehand with a single ethanol cleaning were used to form the biomimetic membrane through the 3-step method previously described [39]. Briefly, a polytetrafluoroethylene (PTFE) holed cylinder was used to define a 400  $\mu$ L reaction chamber, filled with HEPES 20 mM, NaCl 100 mM pH 7.4 buffer. The PTFE cylinder was maintained against the gold-coated SPRi prism surface by means of a piston that holds the two against each other. A joint embedded in the PTFE

cylinder's base assured the sealing of the reaction chamber. After stabilization of the signal, tether P19-4H peptides were added at a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  final concentration, then liposomes at 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and finally fusogenic AH peptides at 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Each injection was followed by a waiting time until the signal stabilization before rinsing. Rinsing was done by adding and then removing, 100  $\mu\text{L}$  of fresh buffer to keep the reaction volume constant during the experiment. Repeating this operation 16 times ensured the removal of 99% of the excess sample material. The reflectivity changes were measured as a function of time. For each experiment, the typical curve shown was the average of curves obtained from the measurements of 16 different and independent 500  $\mu\text{m}$  diameter zones defined on the SPRi prism.

### **Backside Absorbing Layer Microscopy (BALM)**

BALM gold surfaces for immersed samples were obtained from Watch Live (Lyon, France) and placed on an Axiovert 25 inverted microscope equipped with an AxioCam HRc camera and a x50/1.0 objective lens (Zeiss, Le Pecq, France). The same protocol as for the SPRi experiments was applied to the BALM gold substrates. Prior to BALM experiments, bare surfaces were cleaned in ethanol, the buffer was added on the support to adjust the focus, light intensity, aperture stop, and camera settings. The typical exposition was 300 ms for a 16 bits/12 Megapixels color image format.

### **Image analysis**

Image analysis was performed using ImageJ. RGB images were split in three different images, each representing a different channel (either red, green or blue). BALM analysis was performed on the red channel signal, as it presents the largest variations. Images were colored using the inverted "phase" LookUp Table (LUT), which colors the low, medium and high intensities in red, white and blue, respectively. Plot was extended over a 1.2  $\mu\text{m}$  line and were averaged over a 10-pixel width. Differential images were obtained in 32 bits format by subtracting two images one minute apart in the kinetics. From there, the FluxIn and FluxOut images were obtained by thresholding the positive and negative intensities,

respectively. Composite images were formed by merging the past image and either the FluxIn or the FluxOut image in a same hyperstack.

## RESULTS AND DISCUSSION

The formation of a pep-tBLM composed of 42% POPC, 35% sphingomyelin (SM), 10% DOPE, 11% cholesterol (given in mol%) was followed by SPRi and BALM in two parallel experiments. This composition closely resembles that of the plasma membrane [83–86]. The reflectivity signals obtained with SPRi and BALM are shown in Figure 1A. For the sake of comfortable comparison, the sign of the BALM reflectivity has been inverted. Indeed, we are in the case of a negative contrast, as will be explained further on. For clarity, we will name in the following the inverted signals Antired, Antigreen and Antiblue, and reserve the use of red, green and blue for the direct reflectivity.

The SPRi reflectivity was averaged over a cumulative area of 3.14 mm<sup>2</sup>. Since BALM is a white light technique, the BALM reflectivity was split into three curves corresponding to the three color channels. It was averaged over the microscope image field, which makes a 0.013 mm<sup>2</sup> area. The acquisition frequency was also ten times faster with the SPR camera than with the BALM. By combining the two contributions, we expected a 50 factor on the signal/noise ratio in favor of the SPR, which is not confirmed in this experiment, showing a BALM sensitivity at least comparable to that of SPR.



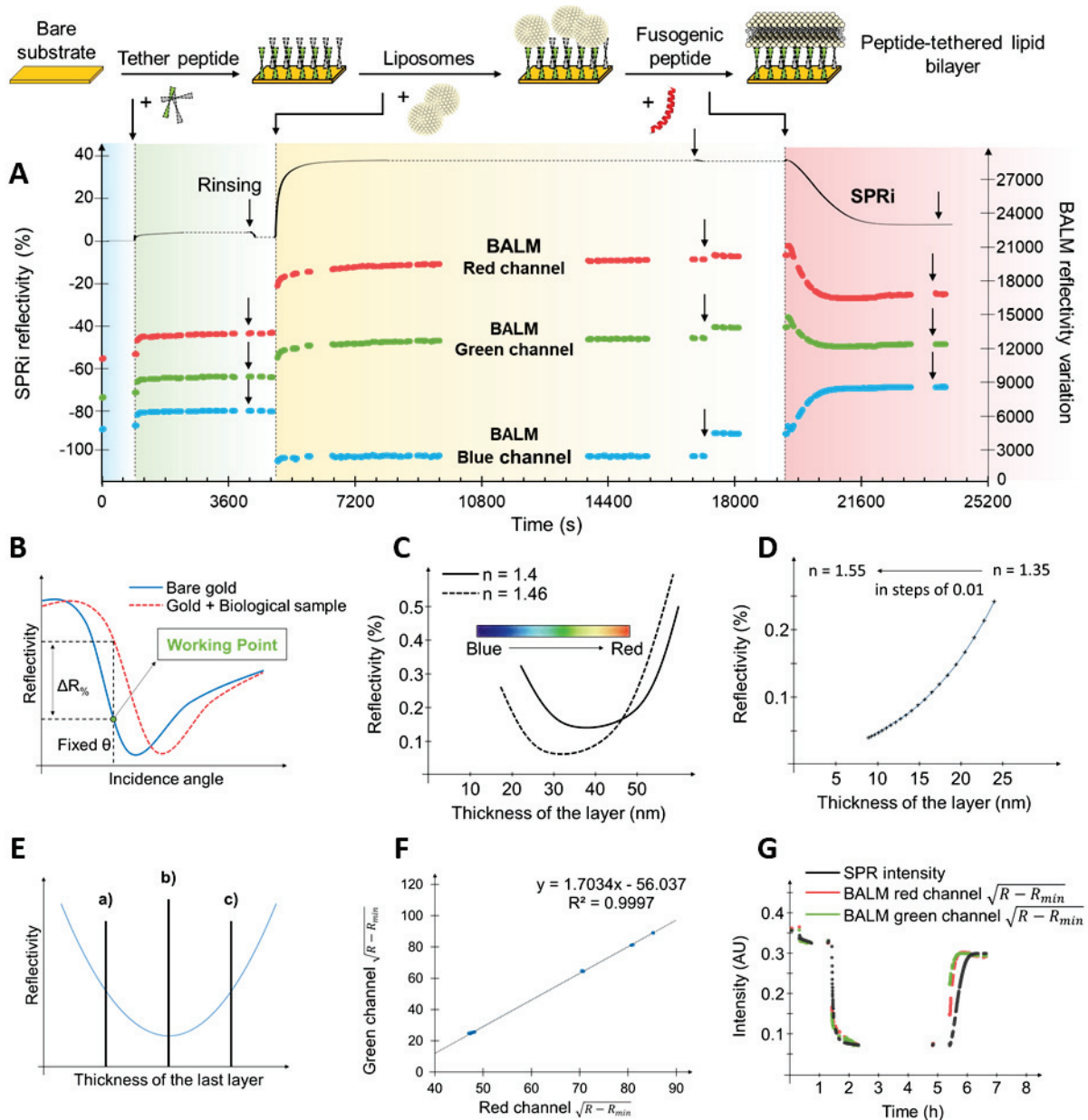


Figure 1: Comparison of SPRi and BALM reflectivities during the biomimetic pep-tBLM formation.

A. Evolution of the SPRi (black) and BALM reflectivities after inversion of the BALM curves (the colors correspond to the BALM channel). The SPRi reflectivity was counted from the SPR working point. The SPR reflectivity is given as the relative increase with respect to the reflectivity of the working point and the BALM reflectivity is given as the absolute intensity of the reflected image. For easier comparison, the origin of the vertical axis was independently adjusted for each curve.

B. SPR reflectivity as a function of incidence angle for the bare substrate (plain blue) or in the presence of a biological layer (dotted red). The presence of the probed layer generates a shift of the curve to the right, which results in a reflectivity change at a fixed incidence angle;

C. Numerical calculation of the  $(e_{min}, R_{min})$  trajectory in the  $(e, R)$  plane for a 3 nm gold thickness, and a 30-degrees aperture angle, parametrized by the wavelength. The latter was taken pure (single wavelength) and continuously increasing from 400 nm on the left to 650 nm on the right.

D. Same as C, but with a single wavelength of 480 nm and parametrized by the refractive index of the solution which was continuously increasing from 1.35 on the right to 1.55 on the left.

E. Schematic relationship between the BALM reflectivity and the probed layer thickness  $e$  counted from the substrate. The black line figures the relative positioning of the BALM parabola (multi-parameter dependent) and the thickness origin (bare substrate), which determines a situation of a) negative contrast, b) zero contrast or c) positive contrast.

F. Comparison of  $\sqrt{R - R_{min}}$  for the red and green BALM channels, demonstrating a linear relationship.  $R_{min}$  was adjusted stage by stage using all in-stage measurements. Only the saturation levels (after rinsing) are kept in the figure.

G. Comparison of the SPRi signal with  $\sqrt{R - R_{min}}$  for the BALM Red and Green channels after redistributing in  $y$  the SPRi intensities  $x$  via the affine transformation  $y = ax + b$  with  $a = -1.35$  and  $b = 80$  for optimal fit with the BALM curve. Note that  $a$  close to 1 demonstrates comparable sensitivity to layer thickness.

According to the cartoon in Figure 1, each step of the kinetics can be distinguished from either the SPRi or the BALM curve. After a first small variation induced by the tether peptide grafting, a large signal variation follows the liposome injection, indicative of liposome anchoring. After a brief further bump right after the fusogenic peptide injection, indicative of liposome swelling, an opposite variation is observed, indicative of a matter loss as expected with liposome fusion. The correspondence between the reflectivities measured by the two techniques is very good, demonstrating the possibility of monitoring, at least qualitatively, the adsorption/desorption phenomena using the BALM technique. Another system consisting of a pure POPC membrane was also investigated. The corresponding

results are reported in Supplement 1. They confirm the qualitative SPR-BALM agreement. In order to progress towards quantitative comparison, a reminder of how the two measurements were obtained is necessary.

## SPR Reflectivity vs layer thickness

SPR essentially probes a refractive index, namely the effective refractive index  $\langle n \rangle$  of a volume slice with a depth  $\Lambda$ , which is of the order of 100 nm. Figure 1B shows a characteristic SPR reflectivity curve, with the angle of incidence in abscissa. Note that with BALM, the same curve on a similar angular range would be completely flat. Since imaging requires superposition of incidence angles, the low dependence of the BALM reflectivity on the incidence angle is actually the cornerstone of the BALM capability to combine sensitivity and imaging. In the most popular mode, SPR is used at a fixed incidence angle, which defines the working point. A great asset of SPR is the ease to make the exploited signal linear with the probed adsorbed quantity. When a layer with a thickness  $e \ll \Lambda$  is added on the surface,  $\langle n \rangle$  is perturbed by the local variation of  $n$ . The angular response shown in Figure 1B translates to the right according to the angular sensitivity to the average refractive index  $\Delta\theta/\Delta\langle n \rangle$ . The resulting change in reflectivity at the fixed working angle is also proportional to the local slope  $\Delta R/\Delta\theta$  of the reflectivity curve. The overall SPRi sensitivity  $S = \Delta R/\Delta\langle n \rangle$  is the product of the two quantities. It is estimated by a calibration procedure at the start of the experiment. The variation of  $\Delta R$  with  $e$  is always monotonic with a choice of the working point on the left side of the minimum, as postulated in Figure 1B. It would go through a minimum with a choice on the right side. The (expected) linearity of  $\Delta R$  with  $e$ , not only requires the linearity of  $\Delta R$  with  $\theta$ , but also the linearity of the lateral shift with  $e$ , or alternatively compensating non-linearities. To link  $\Delta R$  and  $e$ , one should also connect  $\Delta\langle n \rangle$  and  $e$ . Here comes a strong hypothesis, that the refractive index increment  $\partial n/\partial c$  specific to the probed material is a constant. As a consequence,  $\Delta\langle n \rangle = n(c) - n_0$ , with  $n_0$  the refractive index of the solvent, is locally proportional to the concentration  $c$ . Replacing  $c$  (g/mL) by  $\rho\phi$ , with  $\rho$  the (constant) density and  $\phi$  the volume fraction of the probed material,  $\Delta n$  appears proportional to  $\phi$ . The “strong” hypothesis is qualified strong because to apply it to the thin layer problem, it should cover the full range from  $\phi = 0$  to  $\phi = 1$ . Then, we have  $\Delta\langle n \rangle = (n_1 - n_0)\langle\phi\rangle$ , with  $n_1$  the refractive

index of the pure layer material. For laterally homogeneous layers,  $\langle \phi \rangle = \langle \phi \rangle_z$  is averaged over the volume probed by the SPR, *i.e.* over a thickness  $\Lambda$ . Only the part filled by the probed layer contributes, and we finally get:

$$\Delta R_{SPR} = \frac{\Delta R}{\Delta \langle n \rangle} \Delta \langle n \rangle = S(n_1 - n_0) \alpha \frac{e}{\Lambda} \quad (1)$$

where we added the surface coverage ratio  $\alpha$  among the factors affecting the average. This equation is equivalent to the well-known Fleitjer's formula  $\Gamma = (\Delta R/S)[\Lambda/(\partial n/\partial c)]$ , with  $\Gamma$  the surface excess. It expresses the SPRi signal as the product of the probed layer differential refractive index, surface coverage, and thickness without possible separation of the three quantities, at least when working with a single wavelength. When deriving Equation (1), we made another implicit approximation, which is uniform lighting in the  $\Lambda$  layer. If we account for the exponential decay in the evanescent wave and integrate over the accordingly weighted  $z$  volume elements, we find, instead of Equation (1):

$$\Delta R_{SPR} = S(n_1 - n_0) \alpha \left(1 - e^{-\frac{e}{\Lambda}}\right) \quad (2)$$

Equation (2) shows the limits of the implicit approximation made in Equation (1). With  $e = 100$  nm and  $\Lambda = 100$  nm, for instance, as encountered with a liposome layer, the thickness estimated from Equation (1) is underestimated by 40 %. More information is given in Supplement 2. With SPRi in place of SPR, the same considerations apply down to the instrumental resolution. Here, we found helpful to derive Equations (1) and (2) from scratch when using the volume fraction instead of the more usual  $\partial n/\partial c$ , but similar results can be found for instance in References [32], [87] or [88] with possibly a different meaning of  $\Lambda$  (depending if  $\Lambda$  is relative to the electromagnetic field or the energy) and  $S$  (defined by the sole factor  $\Delta\theta/\Delta\langle n \rangle$  in [88]).

## BALM reflectivity vs layer thickness

BALM is an interferometric technique, which essentially probes the thickness  $e$  of a deposited layer on an ARA surface, as illustrated in Supplement 3. The BALM reflectivity  $R(e)$  finds a minimum ( $e_{min}, R_{min}$ ) close to the zero thickness and obeys a parabolic variation in the proximity of the minimum. The position and the amplitude of each characteristic parabola are very sensitive to many factors, including the exact composition of the BALM substrate, the aperture of the microscope, the wavelength or the spectrum of the light source, the spectral

response of the camera, and the refractive index of the solvent and of the added layer. For instance, based on numerical calculations, Figure 1C and 1D show the trajectory of the minimum  $(e_{min}, R_{min})$  in the  $(e, R)$  plane when the refractive index of the solution and the (supposed unique) wavelength of the source respectively vary. It was shown that whatever the detail of all these parameters, the BALM reflectivity obeys a parabolic variation with the thickness  $e$  of the added layer [81]. The proposed strategy was therefore not to try to precisely handle all these parameters, but to determine afterward, on a case-by-case basis, the three parameters which govern the exact shape of the parabola. As long as the refractive index of the added layer remains the same, knowledge of the three parameters is sufficient to convert the measured reflectivity into quantitative thickness measurements. The three parameters are: the zero thickness reflectivity  $R_0$ , the minimum reflectivity  $R_{min}$  and the layer thickness  $e_{min}$  for which this minimum is reached. For a biological layer thickness tending towards zero, what we call “initial” state, the variation of the BALM reflectivity with  $e$  may be positive or negative, depending on the sign of  $e_{min}$ . The corresponding situations are referred to as “positive contrast” ( $e_{min} < 0$ ) and “negative contrast” ( $e_{min} > 0$ ). We insist that it refers to the *initial* contrast. The BALM parabola and the various contrast cases are illustrated in Figure 1E. With negative contrast, the reflectivity will decrease with increasing layer thickness until the minimum is reached and then, increase with layer thickness. In the opposite case,  $R(e)$  is a monotonic increasing function. In this case, the minimum of the parabola would be attained with a negative thickness, which is experimentally impossible, and the minimum is said virtual. Note that with SPR, choosing a working point on the right or the left side of the SPR curve (see Figure 1B) leads to similar negative and positive contrast situations. The analogy could be taken further in order to apply the BALM approach to the SPR measurement, but this is beyond the scope of the present work. In Figure 1A, the variation of the red and green signals is monotonic and conforms to a case of negative contrast. In addition, the minimum of the red and green parabolas is never reached in the experiment because  $e$  always stays lower than  $e_{min}$ . The blue curve behaves differently. In Figure 1A, we cross the minimum during the second stage of the kinetics. As a consequence, the slope of  $R(e)$  has an opposite sign in the first and the third stages. To simplify the analysis, the blue channel will be ignored in the present work. Since the green and the red channels both correspond to negative

contrast, and since the green minimum is located on the left side of the red minimum, the red signal is always far from its minimum. In such conditions, it should be a quasi-linear function of the layer thickness. Following Abou Khachfe *et al.* [81], the BALM analysis lies on the fundamental equation:

$$f^2(R) \equiv \frac{R-R_{min}}{R_0-R_{min}} = \left(\frac{e}{e_{min}} - 1\right)^2 \quad (3)$$

One can check that it becomes  $f^2(R) \cong 1 - 2\frac{e}{e_{min}}$  when  $\frac{e}{e_{min}} \ll 1$ .

To determine  $e/e_{min}$  from the measurement of  $R$ , one should know the two parameters  $R_0$  and  $R_{min}$ . The first one ( $R_0$ ) is directly measured with the bare surface against the buffer solvent. The bare substrate can be chosen as the bare gold, making a global reference for the entire experiment, or else as the gold already covered with a given component at the end of a given step (after rinsing) in order to refine the analysis of the next following step. Note that the added layer has a different nature, thus a different refractive index, in each stage of the kinetics investigated here. The second one ( $R_{min}$ ) can also be obtained experimentally when the minimum is crossed during the experiment. It is not the case here with the red and green channels. We will have to determine  $R_{min}$  from data comparison. Restricting ourselves to the monotonic variation  $R(e)$  with negative contrast observed with the red and the green channels, Equation (3) simplifies in  $e/e_{min} = 1 - f(R)$ , showing that  $\sqrt{R - R_{min}}$  is a linear function of  $e$ , "linear" being taken in the sense of "affine". Therefore,  $\sqrt{R_G - R_{min,G}}$  (for the green channel) and  $\sqrt{R_R - R_{min,R}}$  (for the red channel) are also linear functions of each other (Figure 1F). This holds only with the correct value of the two  $R_{min}$ . Thus,  $R_{min,G}$  and  $R_{min,R}$  can be obtained stage-by-stage by optimizing the linear relationship between the two square root quantities with respect to the two parameters, that is to say from a two parameters linear fit. This process was implemented in Supplement 4. Note that  $R_0$ , by contrast with  $R_{min}$ , does not affect this linearity. Its value is not needed to build a function of  $R$  which is linear with thickness. The last unknown parameter in Equation (3) is  $e_{min}$ . It plays the role of the thickness unit and does not either affect the linear relationship between  $e$  and  $f(R)$ . Its determination requires some additional calibrating information. The  $e_{min}$  parameter in BALM is thus very similar to the  $S$  parameter in SPR, see Equation (1). About the thickness range of validity of Equation (3), the BALM canonic parabola is a low thickness approximation of a cosine variation as classically found with interferential methods. Considering that the

cosine can be assimilated to a parabola from the minimum to the inflexion point, our analysis would be acceptable up to  $n_1 e_{Max} = \lambda/4$  in the case of a negative contrast (while  $n_1 e_{Max} < \lambda/8$  with a positive contrast). It typically gives 100 nm with  $n_1 = 1,45$  for soft biological matter [89]. To summarize, the linearity of the SPR and the BALM reflectivities with thickness has a comparable validity range, slightly exceeded with the 120 nm liposomes in our experiment. Both techniques would underestimate such thickness.

## Quantitative estimation

On the basis of Equation (1), Supplement 11 describes in details the expected evolution of  $\Delta R_{SPR}$  during the three stages of the process, which should actually be decomposed in 7 steps to include the rinsing periods because of the refractive index change with each new solution.

With the biomimetic system investigated here, the SPRi and BALM saturation levels are linked by a linear relationship (see Supplement 4). This remains reasonably true during the entire kinetics as reported in Figure 1G. From both measurements, the level of the final layer after the fusion (third) stage and rinsing is 40 % of that of the liposome (second) grafting stage after rinsing. Because liposomes are made of a mixture of buffer and lipids, we suppose that only the lipids contribute to their refractive index. In Supplement 11, it is shown that the lipid layer (with lipid refractive index) equivalent to one liposome with diameter  $D$  has an effective thickness  $6h$ , with  $h$  the bilayer thickness, this layer being distributed on a disk with diameter  $D$ , i.e the projected liposome footprint. However, the liposome layer after the second stage and rinsing is far from being closed-packed. Taking into account the liposome surface coverage  $\alpha$  (see SPR Equations 1 and 2), the equivalent lipid thickness is  $6\alpha h$ . Also, we know from Equation (2) and Supplement (2) that the liposome surface excess, hence this equivalent thickness, is underestimated by the SPR measurement by a factor 1.59. For comparison with other measured values, the correcting factor to apply to the real thickness  $6\alpha h$  in order to obtain the apparent SPR thickness [measured from Equation (1)] is therefore 1/1.59. We get  $3.81\alpha h$ . This correcting factor does not apply to the after fusion and rinsing amount because at the end of the third stage the layer is thin, most of the liposomes being

converted into lipid layers. At first sight, the latter corresponds to 40 % of  $3.81\alpha h$ , the other 60% having flown away during the fusion stage. This makes a final lipid thickness  $1.52\alpha h$ . For this final thickness to correspond to a single bilayer as expected, one must have  $\alpha = 1/1.52 = 64\%$ . Although this coverage ratio after liposome rinsing exactly corresponds to the random close-packed density of spheres, it is fortuitous because the above reasoning was simplified to keep things simple. Indeed, we assimilated the ratio of the SPR levels in stages 2 and 3 to the ratio of the lipid quantities, thus ignoring the contribution of the tether peptide layer to the SPR signal. When taking into account this constant contribution in the top and bottom of the 40% experimental ratio, we end up with a final lipid thickness  $2.09 \alpha h$  in place of  $1.52\alpha h$ . Then we find  $\alpha = 1/2.09 = 48 \%$  in place of 64%. This is demonstrated in the technical Supplement 11 after writing rigorous equations for the SPR analysis. Secondly, when deriving the average liposome refractive index (see the Supplement), it was supposed constant over the liposome height. Considering for instance that this distribution must exhibit two peaks (top and bottom) and that only the upper peak is affected by the SPR distortion factor, we would end up with a lower coverage ratio  $\alpha = 39\%$ . Concerning finally the tether peptide layer, one can estimate from Figures 1F or 1G that the tether peptide saturation signal is typically half of the final bilayer saturation signal (to which it is added at the end of the experiment). Using this value, taking  $n_0 = 1.34$  for the solution,  $n_1 = 1.50$  and  $e_1 = 5nm$  for the bilayer and  $n_1 = 1.42$  for the peptide layer because it is much more hydrated, reporting these values into Equation (1) (or Equation S11-11), and comparing tether and lipid terms, we get  $\alpha e_1$  of order 5 nm for the tether peptide. Since the extended peptide is 9 nm long and the globular peptide less than 3 nm in diameter, this is perfectly consistent with a dense peptide layer covering a minority fraction of the surface, namely  $1/3$  with these numbers, and with a low peptide density elsewhere.

By contrast with saturation levels, large differences between BALM and SPR were observed in the characteristic times (hence in the apparent kinetic constants) of the successive adsorption/desorption stages. Such differences were not confirmed when reproducing the same experiment with a model POPC system, in which strictly identical BALM and SPR characteristic times were observed. The results obtained with POPC are reported in Supplement 5. Hence, the differences



observed with the biomimetic sample had not their origin in the measurement techniques but more likely in the variations of the surface state. Indeed, with a BALM full field of 100  $\mu\text{m}$  in the present experiment, related to the objective lens magnification, the probed area was much smaller than with the SPR, thus enhancing a variability which is not specific to the BALM surfaces but which is just smoothed out with the SPR. This observed variability of the surface and surface behavior is probably one of the main lessons of our study.

However, the aim of the present study was not to measure affinity constants, but to probe the mechanisms involved in the bilayer formation. As they involve inhomogeneities and matter exchange at a local scale, the information extracted from global measurements is very limited. Focusing on averaged quantities over the surface could even have the pernicious effect to encourage viewing the surface as invariant and interpreting the results as if the surface was evolving in a uniform way, according to closely packed and repeated dynamic patterns. In order to probe local mechanisms, we must therefore escape surface integrated measurements and call out the BALM imaging capabilities.

We shall also see that the local observations give a topographical evidence of the presence of a final regular bilayer which is more direct than any surface-averaged measurement combined with implicit assumptions such as constant  $dn/dc$ , linear response or shape preservation during liposome adsorption and with the ad-hoc adjustment of unknown parameters such as coverage ratios.

## **Imaging the local topography during pep-tBLM formation**

With SPRi, lateral resolution is intrinsically limited by the extension of the propagating surface plasmons to about 20 microns. By contrast, BALM in this experiment has the diffraction-limited resolution of optical microscopy, *i.e.* 200 nm, approaching the 120 nm liposome diameter. The two resolutions differ by two orders of magnitude. With better-resolved images, we can locally follow the sequential reactions on the surface. BALM imaging contributions are illustrated in Figure 2A, where typical snapshots of the same ( $7 \times 5$ )  $\mu\text{m}^2$  zone of the sample were extracted from the kinetics and associated with the corresponding point of the averaged red BALM curve. The ten “antired” images of the series are displayed with

the same Look Up Table (LUT), with blue and red colors extending below and above the white average level, respectively. The minimum and maximum intensity levels in the LUT, hence the LUT range, are the same in all images, making meaningful color comparisons in the series. The global color evolution of the BALM images conforms with the BALM reflectivity curves, with a blue or red dominance depending on the height of the Anti-BALM signal. Note the apparition of a white pattern (hence higher thickness) on the buffer blue background with tether peptide injection (Figure 2A, 2 and 3) and the strong shift from blue to white and from white to red (hence further higher thickness) with liposome injection (Figure 2A, 4 to 6). Finally, the fusogenic peptide injection makes the layer thickness increase in a first time (Figure 2A, 7), before gradually decreasing as indicated by the shift to bluer and whiter hues (Figure 2A, 8 to 10), to reach a final situation consistent with a lipid bilayer grafted on top of the tether peptides. This evolution is also visualized in a topographic mode with the surface plots shown in Figure 2B, highlighting strong correlations in the images of a same  $1\mu\text{m}^2$  area in the buffer stage (1), the end of each step after rinsing (2, 3 and 5) and the very beginning of the fusion stage (4).

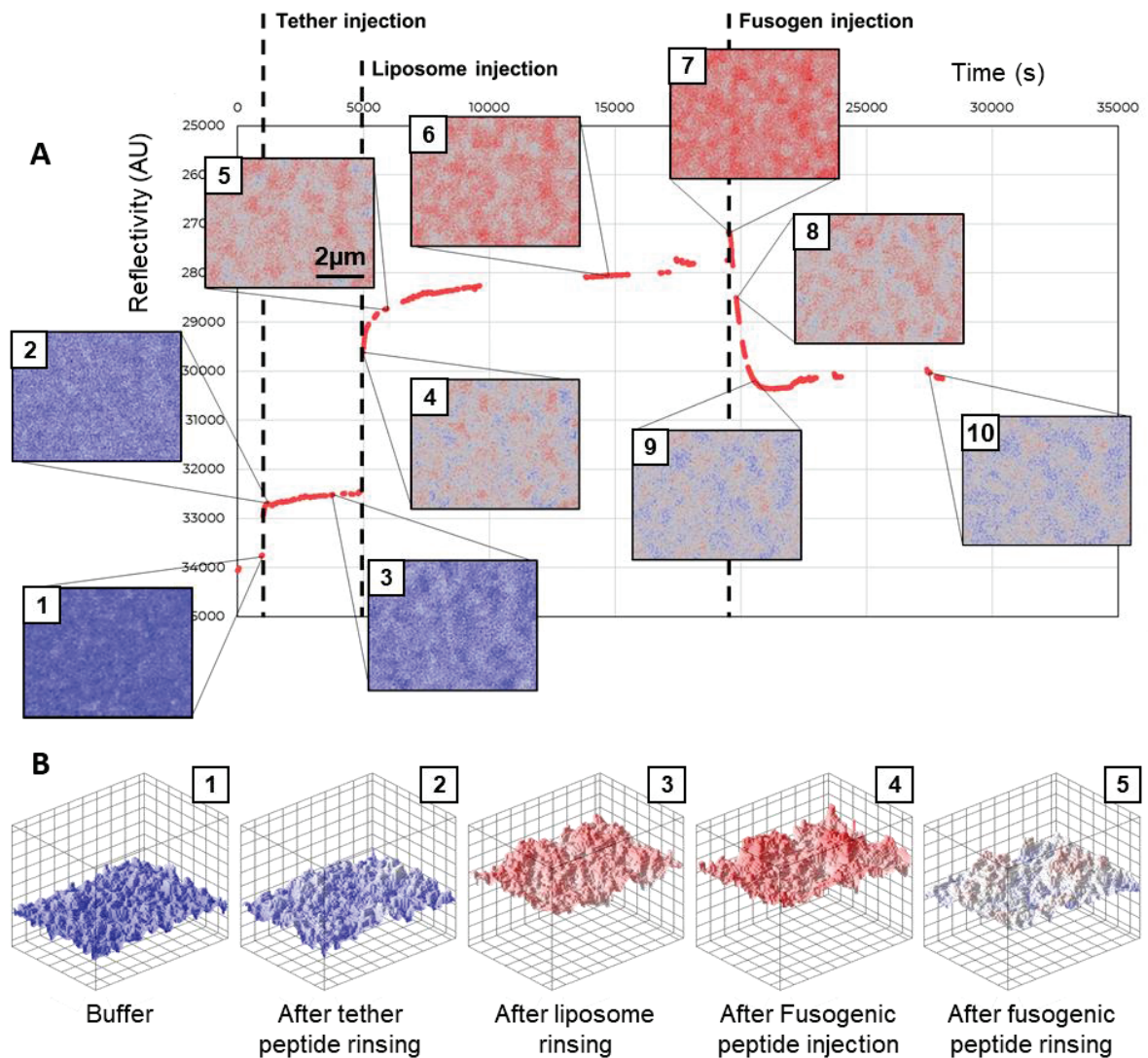


Figure 2: Local evolution of the sample at the submicron scale during the formation kinetics of the biomimetic pep-tBLM. A similar representation for a POPC membrane is shown in Supplement 6.

A. Series of high resolution images each associated with the corresponding point in the AntiBALM curve.

B. Surface plots showing the local evolution of the surface patterns for significant steps in the formation process over a  $0.9\mu\text{m} \times 1.2\mu\text{m}$  area.

The most striking characteristics of these images is the presence of a persistent patterns, from the second image onwards. They appear with the tether peptide injection (Figure 2A, 2) and show a clear correlation with a pre-existing pattern in the buffer solution (Figure 2A, 1). A point of importance is that prior to peptide injection this pre-existing pattern was constantly renewing with no correlation at

all between consecutive images taken one second apart. This fluctuating pattern cannot be attributed to any constitutive irregularity or pollution of the gold surface. It is necessarily due to some component in the buffer solution. By contrast, the strong correlation of the last observed pattern before peptide injection and the same reinforced pattern observed after peptide injection demonstrates that the adsorption of the tether peptide is guided by the distribution of the said component. Once this early adsorption occurred, the resulting pattern will last for the entire experiment. This amazing observation makes also BALM appear as a powerful tool to probe local surface chemistry.

The persistent patterns may hamper the detection of the deposited material during each further stage. This is why a refined analysis requires either to follow the quantitative evolution of these patterns during the kinetics, as done along a line in Figure 3, or to use differential images in order to highlight the molecular fluxes, as done in Figure 4.

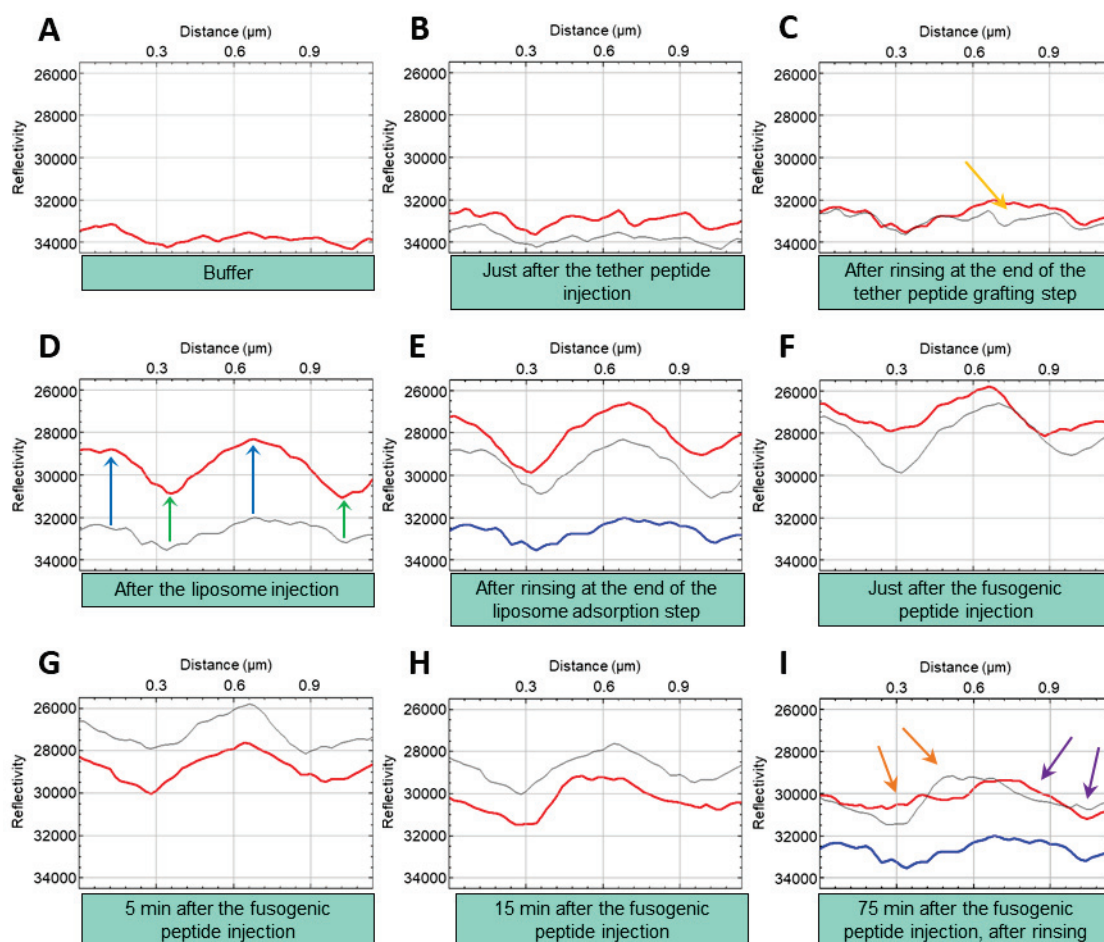


Figure 3: Direct plot profiles of the BALM red channel with inverted intensity scale along a ten-pixel wide, 1.2 μm long line at nine significant steps of the peptide-

tethered bilayer formation from biomimetic liposomes. In red, the plot profile corresponding to the given step; recalled in grey, the plot profile of the previous step; recalled in blue (Figure 3E and I) the plot profile corresponding to the end of the tether grafting step. Each plot profile was obtained after averaging the signal of four successive images, applying both an inverted phase LUT and a median 1-pixel wide filter. The images used are available in Supplement 7. Similar measurements for a POPC membrane are available in Supplements 8 and 9.

Figure 3 shows the evolution of a same surface profile at nine significant stages of the kinetics, indicated in the figure. Figure 3A shows the pattern which was pre-existing before tether peptide injection. It is recalled in grey in Figure 3B, and juxtaposed with the new profile, in red, immediately following the peptide injection. We have proceeded the same way in all further sub-figures. Adsorption of the tether peptides is clearly guided by the buffer pattern. Figure 3C shows tether peptide aggregation with formation of enlarging plateaus, as pointed by the yellow arrow. Once formed, these growing aggregates will keep a constant height, which proves the absence of vertically growing structures. It suggests a conformational change of the peptide molecules from either globular or horizontal at low density to vertical and closely packed at high density, as classically found with self-assembled monolayers. The coverage ratio at the end of the tether grafting stage is ill-defined because of the coexistence of these different peptide density states. Most of the surface is covered, but only part of it is covered by the dense plateau. Figures 3D and 3E show that the tether surface pattern is further reinforced by the liposome deposition, pointing a preferential interaction with peptide-rich (blue arrows) compared to peptide-poor regions (green arrows). At the end of the liposome grafting step, the whole surface is covered with lipid material, although the total layer thickness is not homogeneous. Considering that the tether acts as an anchor for the liposomes, it makes sense that peptide-rich regions attracts more liposomes than peptide-poor ones.

The next plot profiles in Figures 3F to 3I illustrate the reputed most critical stage, the liposome fusion. The first one shows an initial increase in layer thickness which is consistent with previous QCM-D experiments on forming SLBs [90]. It was shown that the fusogenic peptide was inserting in a curved membrane like the one of

liposomes, causing the formation of pores and/or microvilli in the membrane and then swelling of the liposomes by the buffer before liposome rupture after a small delay [90,91]. Figure 3F shows that the early fusogenic peptide action was concentrated in the regions with the lower lipid density. From there, one may infer that the liposomes in the lower density regions are more flat, thus exhibiting a higher curvature at their edge. Indeed, it was shown that the insertion of the fusogenic peptide is favored by the presence of a high membrane curvature [92]. In the rest of the fusion stage, see Figures 3G and 3H, an uniform material loss is observed. The profile obtained at the end of this stage, displayed in red in Figure 3I, is very similar to that in Figure 3C, recalled in blue. It demonstrates a uniform thickness shift with respect to the tether pattern, which is perfectly consistent with the presence of a regular bilayer. The arrows in Figure 3I point the late stage lateral flows which had to take place between Figures 3H and 3I to reach this situation. These rearrangements clearly respect matter conservation at the micron scale. They can be as well directed up (purple arrows) or down (orange arrows) the tether density gradient, with the common effect of smoothing the deposited material to reach a uniform bilayer. Moreover, the existence of these surface fluxes even after fusogenic peptide rinsing demonstrates by itself bilayer continuity. Concerning the fusogenic peptide, it was demonstrated with SLBs that the fusogenic peptide desorbs from the lipid membrane when its curvature disappears, so it should not remain present in the planar bilayer [90,93].

To gain further insights into the local dynamics, differential images were used to point the FluxIN and the FluxOUT happenings, *i.e.* the added and departed matter respectively. The FluxIN and FluxOUT images were obtained after subtraction of an image to another image taken one minute further, with FluxIN images colored using the “Yellow” LUT, and FluxOUT using the “Green” LUT. Then they were superimposed to the first image displayed with the phase LUT (red for high density and blue for low density). Figure 4 presents sets of original, FluxIN and FluxOUT images at many instants of the kinetics.

Figures 4A and 4B address the tether peptide grafting step. Comparison of the FluxIN and FluxOUT images shows that the yellow area is much greater than the blue, showing that peptide adsorption from the solution is more important than desorption or lateral displacement. Figures 4A and 4B show that grafting-starts on

the pre-existing pattern and then takes place at the edge of the aggregates, consistent with their observed height saturation. The existence of the minority blue spots in the regions with intermediate density (white) reveals either desorption or migration of the low density peptides. Because the amount of blue is higher at the beginning of the stage than later on (line A vs line B), it cannot be desorption towards the solution. Indeed, desorption would not decrease with increasing adsorbed amount. It demonstrates lateral mobility of the “grafted” peptide molecules from the low-density towards the high-density regions. Similar mobility of grafted alkyl-thiols was previously reported [94]. To summarize, peptide adsorption proceeds from nucleation and growth, with a twofold growth mechanism (adsorption and migration), while nucleation is triggered by the pre-existing buffer pattern.

The next set of images, Figures 4C and 4D, shows that the liposome adsorption exclusively takes place on the regions with high peptide density, in agreement with previous Figure 3D. It is therefore dependent on either the density or the conformation of the adsorbed peptides. An important observation is that the FluxOUT is absent from the beginning of the liposome stage and present at the end, exclusively located in the low density regions. With the same argument as before, it cannot be desorption. We incline for short range liposome migration to reinforce aggregates, because of the remarkable balance between the yellow and the blue areas. To explain the absence of FluxOUT in Figure 4C, we would infer very different kinetic constants in the high and low density regions. In other words, the lipid material climbs the sides of the aggregates.

Figures 4E-4J were taken during the fusion stage. Figure 4E shows that in the first minute of the fusion stage, the fusogenic peptide invades the aggregated liposomes. It seems in contradiction with figure 3F where the fusogenic peptide was seen to privilege the spread liposomes. But this is just a question of time scale.

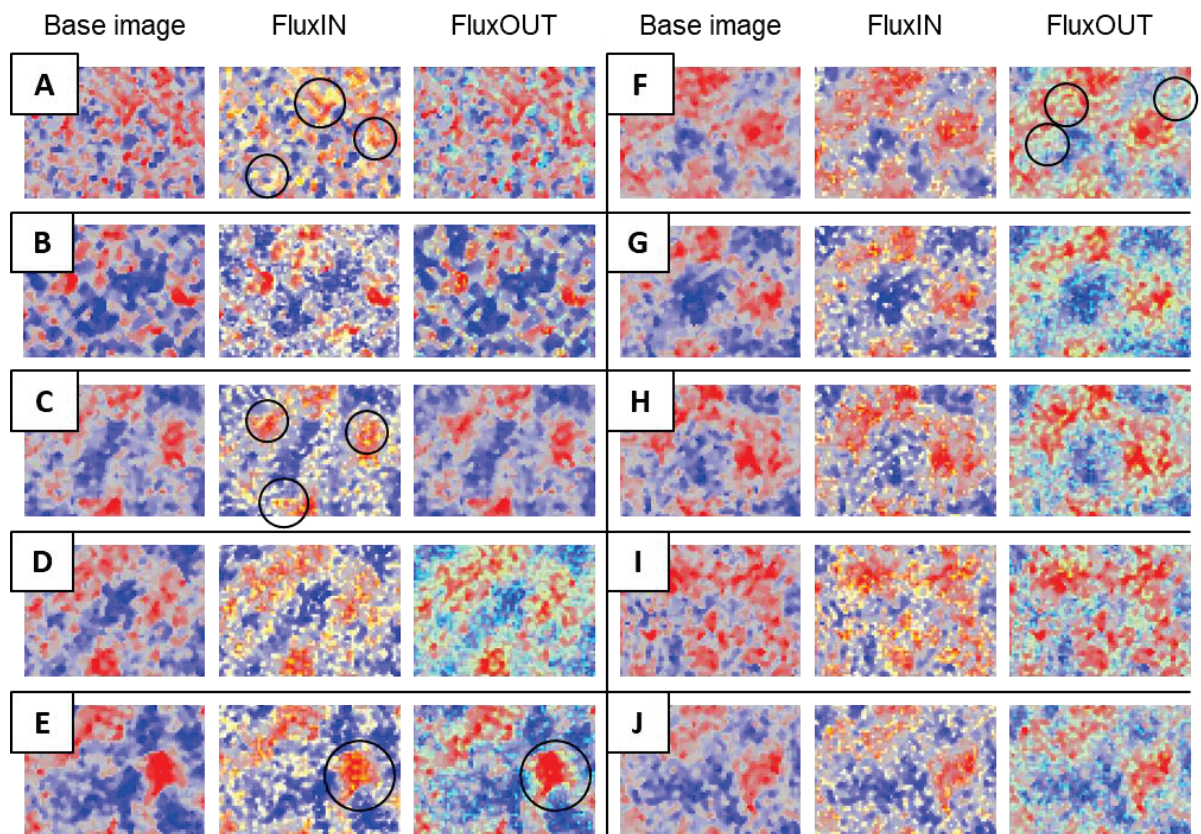


Figure 4: Eight series of 14  $\mu\text{m}$  x 10  $\mu\text{m}$  images (left) repeated with superimposed FluxIN (middle) and FluxOUT (right) differential images. The raw images were stage by stage corrected by subtracting the first image of the stage, which does not affect the FluxIN and FluxOUT images. The resulting images were colored with the “phase” LUT, with FluxIN in yellow and FluxOUT in green. Contrast in each raw image was adjusted independently to maximize the height difference, and a median 1-pixel wide filter was applied to help the eye focus on the lateral patterns. FluxIN and FluxOUT represent the evolution of the image intensities over 1 minute. A. just after the tether peptide injection; B. 10 minutes after tether peptide injection; C. just after the liposome injection; D. 15 minutes after the liposome injection; E. just after the fusogenic peptide injection; F. 5 minutes after the fusogenic peptide injection; G. 15 minutes after the fusogenic peptide injection; H. 30 minutes after the fusogenic peptide injection; I. 1h after the fusogenic peptide injection; J. 2h after the fusogenic peptide injection and after rinsing.

Indeed, five minutes later (Figure 4F), a dominant material loss is observed, which takes place essentially in the white regions with lower intermediate thicknesses. It must follow a FluxIN of fusogenic matter between one and five minutes in the same



regions which was missed in Figure 4. Comparison of the raw images in the two figures actually reveals the spreading of large white, intermediate-density zones around the red aggregates within the five minutes time interval. The next Figures, 4F and 4H present common trends, with a dominant fluxOUT located in the intermediate-density zones, and a weaker fluxIN mainly located in the pink regions juxtaposing the red ones. Hence, the intermediate thickness is fed on one side by the liposomes in fusion, and drained on the other side by the lipid escaping towards the solution. Altogether, the white zone supports important lipid fluxes. The IN and OUT surface fluxes in the white layer cannot be balanced at any time, and we actually see that the white layer area is reduced between 4F and 4G before increasing again in 4H and 4I. These fast and fluctuating exchanges between the white layer and the remaining liposomes resemble the respiratory swelling of a hydrophilic layer in a humid atmosphere. They are the mark of a continuous lipid layer, which progressively percolates over the surface. Figure 4I and 4J show that the lipid rearrangement on the surface goes on at constant lipid quantity (shown by identical yellow and blue surface coverages) for hours. The persistence of the balanced FluxIN and FluxOUT; late after rinsing demonstrates that these fluxes are actually surface flows. It requires the presence of a fluid membrane covering the surface. These results are consistent with those previously obtained in Figure 3I, which showed that the coverage over the initial peptide pattern is uniform at the end.

Up to now, it was considered that the rupture of the liposomes was immediately yielding a flat membrane, with the fusogenic peptide escaping after the transform [90,95]. This experiment confirms that the fusogenic peptide converts the large liposomes into thinner structures, but not immediately into a large uniform bilayer spread all over the surface. From the above description, the transient nano-structures are rather finite extend bi- or transitory multi-layers continuously exchanging with liposomes and progressively percolating to eventually form flat membranes. A schematic drawing is proposed in Figure 5A, where such late liposome remnants coexist as vesicular pockets with the bilayer, sharing one wall with it and free to move by rolling over it. This view would be consistent with the displacements observed after rinsing in Figure 4J. It must be stressed that those pockets occupy only a small fraction of the surface layer. The final layer is therefore

mostly regular and continuous, in agreement with the conclusions of previous AFM and FRAP studies [39]. Finally, Figures 5B and 5C demonstrate with an example taken in the liposome stage that BALM offers the possibility to conduct very local kinetic studies. They show the evolution of two spots with respectively a high and a low tether density. The area of the former is  $0.4 \mu\text{m}^2$  and that of the latter  $0.2 \mu\text{m}^2$ . This is thousand times smaller than the SPRi measuring resolution  $400 \mu\text{m}^2$ . The comparison of the two curves supports the conjecture of lipid mobility from low to high density regions. The spots used are shown in Supplement 10, together with similar local kinetics in the tether and the fusion stages.

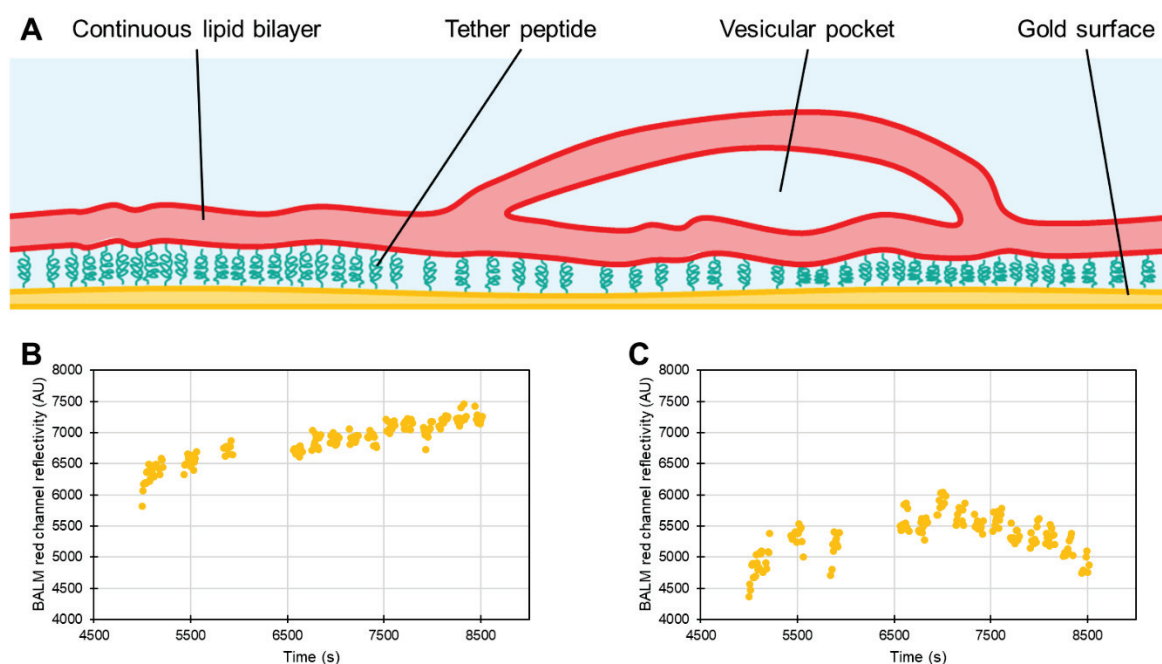


Figure 5: Local structural insights and measurements enabled by BALM.

A. Schematic drawing of the proposed surface lipid structure at the end of the fusion step with realistic scales. B. Local kinetics of the liposome grafting stage over an  $0.4 \mu\text{m}^2$  spot with a high tether density. C. Same kinetics over an  $0.2 \mu\text{m}^2$  spot with a low tether density.

## CONCLUSION

To conclude, when using BALM to monitor the formation of biomimetic peptide-tethered BLMs, the SPR results are quantitatively reproduced by the averaged

intensity of the BALM images after appropriate transformation, with an exact correspondence of the saturation levels, and a correspondence comparable to the SPR reproducibility for the entire kinetics. This transformation renders the BALM response linear (with thickness) and allows a self-calibration of the BALM signals without any knowledge of the instrumental parameters, based on the comparison of two color channels. This is promising for automated procedures. It is worth to mention that the same signal processing could extend as well to other sensitive techniques such as SEEC or even SPR itself.

Yet, beside reproducing the surface averaged measurements which were already available with SPR and confirming the expected final formation of a (majority) regular bilayer, the main contribution of the BALM technique is to improve the resolution of these measurements by two orders of magnitude, giving access to local phenomena. In the present study, it made us discover the presence of unexpected heterogeneities on a surface sample that up to now had ever been considered smooth. Thanks to this resolution, the implication of some buffer component in the peptide grafting or the nucleation-growth mechanism involved in the peptide layer formation were also demonstrated. Thus one should not be surprised by sample heterogeneity since heterogeneous deposition is inherent to this mechanism. The other important features that were revealed are the after grafting peptide mobility, the presence of highly mobile and fluctuating liposome remnants decorating the final bilayer, the astonishing persistence of the initial peptide pattern governing every subsequent matter adsorption and desorption until the end of the process, and the correlation between the shape of the liposomes and the time scale of the fusogenic peptide insertion in their membrane.

Beside confirmation of previous studies and complementary information, this work demonstrates, under the control of the reference technique SPRi, the application of BALM to very local (sub- $\mu\text{m}^2$ ), real time and quantitative studies of in biomolecular processes and surface chemistry. Considering similar implementation, similar measuring capacity and much higher imaging possibilities, BALM should rapidly rise alongside SPR in daily biological, pharmaceutical and medical research. With a great simplicity in the

instrumentation, it should also constitute an effective basis for the development of ultra-high density and low-cost imaging sensors.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

JB conducted experiments; JB, OM and DA analyzed the data; RA and DA contributed analytic tools; JB and DA developed the analytical model based on underlying physical parameters; AGE and DA designed research; AGE supervised the work; JB, DA and AGE wrote the manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

Julien Bompard was supported by a French Ministry of Higher Education and Research fellowship. We would like to thank Dr Giovanna Lollo for her help in DLS measurements performed at LAGEPP UMR 5007, CNRS/University of Lyon, France. This work was supported in parts by CNRS and University of Lyon 1.

## REFERENCES

- 1 Nicolson, G.L. (2014) The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: Still Relevant to Understanding the Structure , Function and Dynamics of Biological Membranes after More than 40 Years. *Biochim Biophys Acta*, Elsevier B.V., **1838**, 1451–1466.
- 2 van Meer, G., Voelker, D.R. and Feigenson, G.W. (2008) Membrane Lipids: Where They Are and How They Behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 112–124.
- 3 Yin, H. and Flynn, A.D. (2016) Drugging Membrane Protein Interactions. *Annu Rev Biomed Eng*, **18**, 51–76.
- 4 Rebaud, S., Maniti, O. and Girard-Egrot, A.P. (2014) Tethered Bilayer Lipid Membranes (TBLMs): Interest and Applications for Biological Membrane Investigations. *Biochimie*, **107**, 135–142.
- 5 Yildiz, A.A., Yildiz, U.H., Liedberg, B. and Sinner, E.K. (2013) Biomimetic Membrane Platform: Fabrication, Characterization and Applications. *Colloids Surf, B*, **103**, 510–516.
- 6 Coutable, A., Thibault, C., Chalmeau, J., François, J.M., Vieu, C., Noireaux, V. and Trévisiol, E. (2014) Preparation of Tethered-Lipid Bilayers on Gold Surfaces for the Incorporation of Integral Membrane Proteins Synthesized by Cell-Free Expression. *Langmuir*, **30**, 3132–3141.

- 7 Zieleniecki, J.L., Nagarajan, Y., Waters, S., Rongala, J., Thompson, V., Hrmova, M. and Köper, I. (2016) Cell-Free Synthesis of a Functional Membrane Transporter into a Tethered Bilayer Lipid Membrane. *Langmuir*, **32**, 2445–2449.
- 8 Jackman, J.A., Knoll, W. and Cho, N.J. (2012) Biotechnology Applications of Tethered Lipid Bilayer Membranes. *Materials*, **5**, 2637–2657.
- 9 Tamm, L.K. and McConnell, H.M. (1985) Supported Phospholipid Bilayers. *Biophys J*, **47**, 105–113.
- 10 Brian, A.A. and McConnell, H.M. (1984) Allogeneic Stimulation of Cytotoxic T Cells by Supported Planar Membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, **81**, 6159–6163.
- 11 Sackmann, E. and Tanaka, M. (2000) Supported Membranes on Soft Polymer Cushions: Fabrication, Characterization and Applications. *Trends Biotechnol*, **18**, 58–64.
- 12 Sackmann, E. (1996) Supported Membranes: Scientific and Practical Applications. *Science*, **271**, 43–48.
- 13 Wagner, M.L. and Tamm, L.K. (2000) Tethered Polymer-Supported Planar Lipid Bilayers for Reconstitution of Integral Membrane Proteins: SilanePolyethyleneglycol-Lipid as a Cushion and Covalent Linker. *Biophys J*, **79**, 1400–1414.
- 14 Cullison, J.K., Hawkrigde, F.M., Nakashima, N. and Yoshikawa, S. (1994) A Study of Cytochrome c Oxidase in Lipid Bilayer Membranes on Electrode Surfaces. *Langmuir*, **10**, 877–882.
- 15 Terrettaz, S., Mayer, M. and Vogel, H. (2003) Highly Electrically Insulating Tethered Lipid Bilayers for Probing the Function of Ion Channel Proteins. *Langmuir*, **19**, 5567–5569.
- 16 Silin, V.I., Wieder, H., Woodward, J.T., Valincius, G., Offenhausser, A. and Plant, A.L. (2002) The Role of Surface Free Energy on the Formation of Hybrid Bilayer Membranes. *J Am Chem Soc*, **124**, 14676–14683.
- 17 Ogier, S.D., Bushby, R.J., Cheng, Y., Evans, S.D., Evans, S.W., Jenkins, A.T.A., Knowles, P.F. and Miles, R.E. (2000) Suspended Planar Phospholipid Bilayers on Micromachined Supports. *Langmuir*, **16**, 5696–5701.
- 18 Römer, W. and Steinem, C. (2004) Impedance Analysis and Single-Channel Recordings on Nano-Black Lipid Membranes Based on Porous Alumina. *Biophys J*, **86**, 955–965.
- 19 Römer, W., Lam, Y.H., Fischer, D., Watts, A., Fischer, W.B., Göring, P., Wehrspohn, R.B., Gösele, U. and Steinem, C. (2004) Channel Activity of a Viral Transmembrane Peptide in Micro-BLMs: Vpu1–32 from HIV-1. *J Am Chem Soc*, **126**, 16267–16274.
- 20 Naumann, R., Schiller, S.M., Giess, F., Grohe, B., Hartman, K.B., Kärcher, L., Köper, I., Lübben, J., Vasilev, K. and Knoll, W. (2003) Tethered Lipid Bilayers on Ultraflat Gold Surfaces. *Langmuir*, **19**, 5435–5443.
- 21 Guidelli, R., Aloisi, G., Becucci, L., Dolfi, A., Rosa Moncelli, M. and Tadini Buoninsegni, F. (2001) Bioelectrochemistry at Metal/Water Interfaces. *J Electroanal Chem*, **504**, 1–28.
- 22 Lang, H., Duschl, C. and Vogel, H. (1994) A New Class of Thiolipids for the Attachment of Lipid Bilayers on Gold Surfaces. *Langmuir*, **10**, 197–210.
- 23 Schilleer, S.M., Naumann, R., Lovejoy, K., Kunz, H. and Knoll, W. (2003) Archaea Analogue Thiolipids for Tethered Bilayer Lipid Membranes on Ultrasooth Gold Surfaces. *Angew Chem Int Ed*, **42**, 208–211.
- 24 Förtig, A., Jordan, R., Graf, K., Schiavon, G., Purrucker, O. and Tanaka, M. (2004) Solid-Supported Biomimetic Membranes with Tailored Lipopolymer Tethers.

- Macromol Symp*, **210**, 329–338.
- 25 Knoll, W., Frank, C.W., Heibel, C., Naumann, R., Offenhäusser, A., Rühle, J., Schmidt, E.K., Shen, W.W. and Sinner, A. (2000) Functional Tethered Lipid Bilayers. *Rev Mol Biotechnol*, **74**, 137–158.
- 26 Rossi, C., Homand, J., Bauche, C., Hamdi, H., Ladant, D. and Chopineau, J. (2003) Differential Mechanisms for Calcium-Dependent Protein/Membrane Association as Evidenced from SPR-Binding Studies on Supported Biomimetic Membranes. *Biochemistry*, **42**, 15273–15283.
- 27 Deniaud, A., Rossi, C., Berquand, A., Homand, J., Campagna, S., Knoll, W., Brenner, C. and Chopineau, J. (2007) Voltage-Dependent Anion Channel Transports Calcium Ions through Biomimetic Membranes. *Langmuir*, **23**, 3898–3905.
- 28 Veneziano, R., Rossi, C., Chenal, A., Devoisselle, J.M., Ladant, D. and Chopineau, J. (2013) Bordetella Pertussis Adenylate Cyclase Toxin Translocation across a Tethered Lipid Bilayer. *PNAS*, **110**, 20473–20478.
- 29 Koenig, J. V., Krueger, S., Orts, W.J., Majkrzak, C.F., Berk, N.F., Silverton, J. V and Gawrisch, K. (1996) Neutron Reflectivity and Atomic Force Microscopy Studies of a Lipid Bilayer in Water Adsorbed to the Surface of a Silicon Single Crystal. *Langmuir*, **12**, 1343–1350.
- 30 Richter, R.P., Bérat, R. and Brisson, A.R. (2006) Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View. *Langmuir*. <https://doi.org/10.1021/la052687c>.
- 31 Keller, C.A., Glasmästar, K., Zhdnov, V.P. and Kasemo, B. (2000) Formation of Supported Membranes from Vesicles. *Phys Rev Lett*, **84**, 5443–5446.
- 32 Parkkila, P. and Viitala, T. (2020) Partitioning of Catechol Derivatives in Lipid Membranes: Implications for Substrate Specificity to Catechol-O-Methyltransferase. *ACS Chem Neurosci*, **11**, 969–978.
- 33 Andersson, J. and Köper, I. (2016) Tethered and Polymer Supported Bilayer Lipid Membranes: Structure and Function. *Membranes (Basel)*, **6**, 30.
- 34 Sinner, E., Ritz, S., Naumann, R., Schiller, S., Knoll, W. and Gregory, S.M. (2009) Self-Assembled Tethered Bimolecular Lipid Membranes. *Adv Clin Chem*, **49**, 159–179.
- 35 Tanaka, M., Rossetti, F.F. and Kaufmann, S. (2008) Native Supported Membranes: Creation of Two-Dimensional Cell Membranes on Polymer Supports (Review). *Biointerphases*, **3**, FA12–FA16.
- 36 Tanaka, M. and Sackmann, E. (2005) Polymer-Supported Membranes as Models of the Cell Surface. *Nature*, **437**, 656–663.
- 37 Köper, L., Schiller, S.M., Giess, F., Naumann, R. and Knoll, W. (2006) Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes.
- 38 Penkauskas, T. and Preta, G. (2019) Biological Applications of Tethered Bilayer Lipid Membranes. *Biochimie*, **157**, 131–141.
- 39 Chadli, M., Rebaud, S., Maniti, O., Tillier, B. and Corte, S. (2017) New Tethered Phospholipid Bilayers Integrating Functional G - Protein-Coupled Receptor Membrane Proteins. *Langmuir*, **33**, 10385–10401.
- 40 Rossi, C. and Chopineau, J. (2007) Biomimetic Tethered Lipid Membranes Designed for Membrane-Protein Interaction Studies. *Eur Biophys J*, **36**, 955–965.
- 41 Robelek, R., Lemker, E.S., Wiltschi, B., Kirste, V., Naumann, R., Oesterhelt, D. and Sinner, E.-K. (2007) Incorporation of in Vitro Synthesized GPCR into a Tethered Artificial Lipid Membrane System. *Angew Chem Int Ed Engl*, **46**, 605–608.

- 42 Rossi, C., Doumiati, S., Lazzarelli, C., Davi, M., Meddar, F., Ladant, D. and Chopineau, J. (2011) A Tethered Bilayer Assembled on Top of Immobilized Calmodulin to Mimic Cellular Compartmentalization. *PLoS One*, **6**, e19101.
- 43 Jackman, J.A. and Cho, N.-J. (2012) Model Membrane Platforms for Biomedicine: Case Study on Antiviral Drug Development. *Biointerphases*, **7**, 18.
- 44 Maccarini, M., Gayet, L., Alcaraz, J., Ligori, L., Stidder, B., Watkins, E.B., Lenormand, J. and Martin, D.K. (2017) Functional Characterization of Cell-Free Expressed OprF Porin from *Pseudomonas Aeruginosa* Stably Incorporated in Tethered Lipid Bilayers. *Langmuir*, **33**, 9988–9996.
- 45 S, W., Kozuch, J., Forbrig, E., Tzschucke, C.C., Jeuken, L.J.C. and Hildebrandt, P. (2016) Monitoring the Transmembrane Proton Gradient Generated by Cytochrome *Bo3* in Tethered Bilayer Lipid Membranes Using SEIRA Spectroscopy. *J Phys Chem B*, **120**, 2249–2256.
- 46 Alghalayini, A., Garcia, A., Berry, T. and Cranfield, C.G. (2019) The Use of Tethered Bilayer Lipid Membranes to Identify the Mechanisms of Antimicrobial Peptide Interactions with Lipid Bilayers. *Antibiotics (Basel)*, **8**, 12.
- 47 Yildiz, A.A., Kang, C.B. and Sinner, E.K. (2013) Biomimetic Membrane Platform Containing HERG Potassium Channel and Its Application to Drug Screening. *Analyst*, **138**, 2007–2012.
- 48 Chadli, M., Maniti, O., Marquette, C., Tilier, B., Cortès, S. and Girard-Egrot, A. (2018) A New Functional Membrane Protein Microarray Based on Tethered Phospholipid Bilayers. *Analyst*, **143**, 2165–2173.
- 49 Reimhult, E. and Kumar, K. (2008) Membrane Biosensor Platforms Using Nano- and Microporous Supports. *Trends Biotechnol*, **26**, 82–89.
- 50 Andersson, J., Köper, I. and Knoll, W. (2018) Tethered Membrane Architectures—Design and Applications. *Front Mater*, **5**, 1–11.
- 51 Munro, J.C. and Franck, C.W. (2004) In Situ Formation and Characterization of Poly(Ethylene Glycol)-Supported Lipid Bilayers on Gold Surfaces. *Langmuir*, **20**, 10567–10575.
- 52 Andersson, J., Knobloch, J.J., Perkins, M. V, Holt, S.A. and Köper, I. (2017) Synthesis and Characterization of Novel Anchorlipids for Tethered Bilayer Lipid Membranes. *Langmuir*, **33**, 4444–4451.
- 53 Knoll, W., Bender, K., Förch, R., Frank, C., Götz, H., Heibel, C., Jenkins, T., Jonas, U., Kibrom, A., Kügler, R., Naumann, C., Naumann, R., Reisinger, A., Rühle, J., Schiller, S. and Sinner, E.K. (2010) Polymer-Tethered Bimolecular Lipid Membranes. *Polymer Membranes/Biomembranes*, 87–111.
- 54 Naumann, R., Schmidt, E.K., Jonczyk, A., Fendler, K., Kadenbach, B., Liebermann, T., Offenhäusser, A. and Knoll, W. (1999) The Peptide-Tethered Lipid Membranes as a Biomimetic System to Incorporate Cytochrome *c* Oxidase in a Functionally Active Form. *Biosens Bioelectron*, **14**, 651–662.
- 55 Naumann, R.L.C. and Knoll, W. (2008) Protein Tethered Lipid Bilayer: An Alternative Mimic of the Biological Membrane (Mini Review). *Biointerphases*, **3**, FA101–FA107.
- 56 Giess, F., Friedrich, M.G., Heberle, J., Naumann, R.L. and Knoll, W. (2004) The Protein-Tethered Lipid Bilayer: A Novel Mimic of the Biological Membrane. *Biophys J*, **87**, 3213–3220. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.046169>.
- 57 Proux-Delrouye, V., Elie, C., Laval, J.M., Loiroux, J. and Bourdillon, C. (2002) Formation of Tethered and Streptavidin-Supported Lipid Bilayers on a Microporous Electrode for the Reconstitution of Membranes of Large Surface

- Area. *Langmuir*, **18**, 3263–3272.
- 58 Berquand, A., Mazeran, P.E., Pantigny, J., Proux-Delrouye, V., Laval, J.M. and Bourdillon, C. (2003) Two-Step Formation of Streptavidin-Supported Lipid Bilayers by PEG-Triggered Vesicle Fusion. Fluorescence and Atomic Force Microscopy Characterization. *Langmuir*, **19**, 1700–1707.
- 59 Taylor, J.D., Linman, M.J., Wilkop, T. and Cheng, Q. (2009) Regenerable Tethered Bilayer Lipid Membrane Arrays for Multiplexed Label-Free Analysis of Lipid-Protein Interactions on Poly(Dimethylsiloxane) Microchips Using SPR Imaging. *Anal Chem*, **81**, 1146–1153.
- 60 Elie-Caille, C., Fliniaux, O., Pantigny, J., Mazière, J.C. and Bourdillon, C. (2005) Self-Assembly of Solid-Supported Membranes Using a Triggered Fusion of Phospholipid-Enriched Proteoliposomes Prepared from the Inner Mitochondrial Membrane. *Langmuir*, **21**, 4661–4668.
- 61 Sumino, A., Dewa, T., Takeuchi, T., Sugiura, R., Sasaki, N., Misawa, N., Tero, R., Urisu, T., Gardiner, A.T., Cogdell, R.J., Hashimoto, H. and Nango, M. (2011) Construction and Structural Analysis of Tethered Lipid Bilayer Containing Photosynthetic Antenna Proteins for Functional Analysis. *Biomacromolecules*, **12**, 2850–2858.
- 62 Junghans, A. and Köper, I. (2010) Structural Analysis of Tethered Bilayer Lipid Membranes. *Langmuir*, **26**, 11035–11040.
- 63 Leitch, J., Kunze, J., Goddard, J.D., Schwan, A.L., Faragher, R.J., Naumann, R., Knoll, W., Dutcher, J.R. and Lipkowski, J. (2009) In Situ PM-IRRAS Studies of an Archaea Analogue Thiolipid Assembled on a Au(111) Electrode Surface. *Langmuir*, **25**, 10354–10363. <https://doi.org/10.1021/la900907d>.
- 64 Naumann, R., Baumgart, T., Gräber, P., Jonczyk, A., Offenhäusser, A. and Knoll, W. (2002) Proton Transport through a Peptide<sup>-</sup> Tethered Bilayer Lipid Membrane by the H<sup>+</sup>-ATP Synthase from Chloroplasts Measured by Impedance Spectroscopy. *Biosens Bioelectron*, **17**, 25–34.
- 65 Bunjes, N., Schmidt, E.K., Jonczyk, A., Rippmann, F., Beyer, D., Ringsdorf, H., Gräber, P., Knoll, W. and Naumann, R. (1997) Thiopeptide-Supported Lipid Layers on Solid Substrates. *Langmuir*, **13**, 6188–6194.
- 66 Schmidt, E.K., Liebermann, T., Kreiter, M., Jonczyk, A., Naumann, R., Offenhäusser, A., Neumann, E., Kukol, A., Maelicke, A. and Knoll, W. (1998) Incorporation of the Acetylcholine Receptor Dimer from *Torpedo Californica* in a Peptide Supported Lipid Membrane Investigated by Surface Plasmon and Fluorescence Spectroscopy. *Biosens Bioelectron*, **13**, 585–591.
- 67 Yildiz, A.A., Knoll, W., Gennis, R.B. and Sinner, E.K. (2012) Cell-Free Synthesis of Cytochrome *Bo*(3) Ubiquinol Oxidase in Artificial Membranes. *Anal Biochem*, **423**, 39–45.
- 68 Naumann, R., Jonczyk, A., Kopp, R., van Esch, J., Ringsdorf, H., Knoll, W. and Gräber, P. (1995) Incorporation of Membrane Proteins in Solid-Supported Lipid Layers. *Angew Chem Int Ed Engl*, **34**, 2056–2058.
- 69 Sinner, E.K., Reuning, U., Kök, F.N., Sacca, B., Moroder, L., Knoll, W. and Oesterhelt, D. (2004) Incorporation of Integrins into Artificial Planar Lipid Membranes: Characterization by Plasmon-Enhanced Fluorescence Spectroscopy. *Anal Biochem*, **333**, 216–224.
- 70 Girard-Egrot, A., Maniti, O. and Rebaud, S. (2016) Substrate/Peptide/Lipid Bilayer Assembly, Preparation Methods and Associated Detection Methods. International Patent WO/2016/066947.
- 71 Koldso, H., Shorthouse, D., Hélie, J. and Sansom, M.S.P. (2014) Lipid Clustering Correlates with Membrane Curvature as Revealed by Molecular Simulations



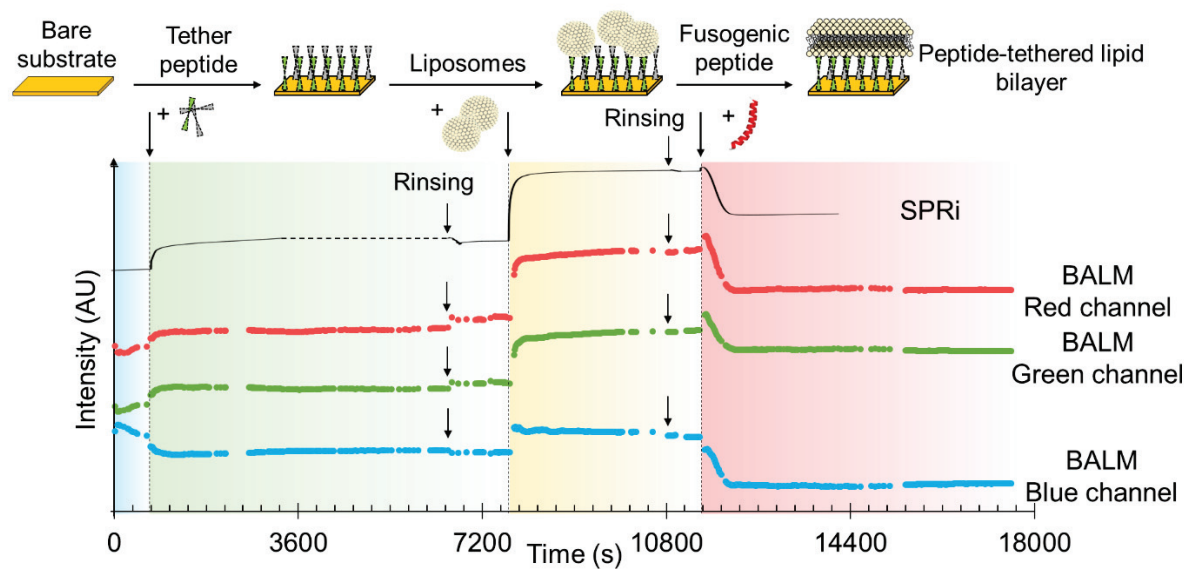
- of Complex Lipid Bilayers. *PLoS Comput Biol*, **10**, e1003911.
- 72 Wilttschi, B., Knoll, W. and Sinner, E.K. (2006) Binding Assays with Artificial Tethered Membranes Using Surface Plasmon Resonance. *Methods*, **39**, 134–146.
- 73 Munguira, I., Casuso, I., Takahashi, H., Rico, F., Miyagi, A., Chami, M. and Scheuring, S. (2016) Glasslike Membrane Protein Diffusion in a Crowded Membrane. *ACS Nano*, **10**, 2584–2590.
- 74 Ausserré, D. and Valignat, M.P. (2006) Wide-Field Optical Imaging of Surface Nanostructures. *Nano Lett*, **6**, 1384–1388.
- 75 Ausserre, D., Abou Khachfe, R., Roussille, L., Brotons, G., Vonna, L., Lemarchand, F., Zerrad, M. and Amra, C. (2014) Anti-Reflecting Absorbing Layers for Electrochemical and Biophotonic Applications. *J Nanomed Nanotechnol*, **5**, 2–6.
- 76 Theodody, O., Garcia-Seyda, N., Bedu, F., Luo, X., Gabriele, S., Mignot, T., Giermanska, J., Chapel, J.P., Metivier, M. and Valignat, M.P. (2018) Live Nanoscopic to Mesoscopic Topography Reconstruction with an Optical Microscope for Chemical and Biological Samples. *PLoS One*, **13**, e0207881.
- 77 Gunnarsson, A., Bally, M., Jönson, P., Médard, N. and Höök, F. (2012) Time-Resolved Surface-Enhanced Ellipsometric Contrast Imaging for Label-Free Analysis of Biomolecular Recognition Reactions on Glycolipid Domains. *Anal Chem*, **84**, 6538–6545.
- 78 Ducret, A., Valignat, M.P., Mouhamar, F., Mignot, T. and Theodody, O. (2012) Wet-Surface-Enhanced Ellipsometric Contrast Microscopy Identifies Slime as a Major Adhesion Factor during Bacterial Surface Motility. *Proc Natl Acad Sci USA*, **109**, 10036–10041.
- 79 Campidelli, S., Aboukhachfe, R., Jaouen, K., Monteiller, J., Amra, C., Zerrad, M., Cornut, R., Derycke, V. and Ausserré, D. (2017) Backside Absorbing Layer Microscopy: Watching Graphene Chemistry. *Sci Adv*, **3**, e1601724.
- 80 Lemineur, J.F., Noëm, J.M., Ausserré, D., Combellas, C. and Kanoufi, F. (2018) Combining Electrodeposition and Optical Microscopy for Probing Size-Dependent Single Nanoparticle Electrochemistry. *Angew Chem int Ed*, **57**, 11998–12002.
- 81 Abou Khachfe, R. and Ausserré, D. (2020) Backside Absorbing Layer Microscopy: A Universal Relationship between Physical Thickness and Reflectivity. *Opt Express*, **28**, 4836–4844.
- 82 Bompard, J., Rosso, A., Brizuela, L., Mebarek, S., Blum, L.J., Trunfio-Sfarghiu, A.-M., Lollo, G., Granjon, T., Girard-Egrot, A. and Maniti, O. (2020) Membrane Fluidity as a New Means to Selectively Target Cancer Cells with Fusogenic Lipid Carriers. *Langmuir*, American Chemical Society, **36**, 5134–5144.
- 83 Pankov, R., Markovska, T., Antonov, P., Ivanova, L. and Momchilova, A. (2006) The Plasma Membrane Lipid Composition Affects Fusion between Cells and Model Membranes. *Chem Biol Interact*, **164**, 167–173.
- 84 Virtanen, J.A., Cheng, K.H. and Somerharju, P. (1998) Phospholipid Composition of the Mammalian Red Cell Membrane Can Be Rationalized by a Superlattice Model. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 4964–4969.
- 85 Gray, G.M. and Yardley, H.J. (1975) Lipid Compositions of Cells Isolated from Pig, Human, and Rat Epidermis. *J Lipid Res*, **16**, 434–440.
- 86 Spector, A.A. and Yorek, M.A. (1985) Membrane Lipid Composition and Cellular Function. *J Lipid Res*, **26**, 1015–1035.
- 87 S, J.L., Campbell, C.T., Chinowsky, T.M., Mar, M.N. and Yee, S.S. (1998) Quantitative Interpretation of the Response of Surface Plasmon Resonance

- Sensors to Adsorbed Films. *Langmuir*, **14**, 5636–5648.
- 88 Parkkila, P., Elderfi, M., Bunker, A. and Viitala, T. (2018) Biophysical Characterization of Supported Lipid Bilayers Using Parallel Dual-Wavelength Surface Plasmon Resonance and Quartz Crystal Microbalance Measurements. *Langmuir*, **34**, 8081–8091.
- 89 Winsel, K., Hönig, D., Lunkenheimer, K., Geggel, K. and Witt, C. (2003) Quantitative Brewster Angle Microscopy of the Surface Film of Human Broncho-Alveolar Lavage Fluid. *Eur Biophys J*, **32**, 544–552.
- 90 Cho, N.J., Wang, G., Edvardsson, M., Glenn, J.S., Hook, F. and Frank, C.W. (2009) Alpha-Helical Peptide-Induced Vesicle Rupture Revealing New Insights into the Vesicle Fusion Process as Monitored in Situ by Quartz Crystal Microbalance-Dissipation and Reflectometry. *Anal Chem*, **81**, 4752–4761.
- 91 Cho, N.J., Cho, S.J., Kwang, H.C., Glenn, J.S. and Frank, C.W. (2007) Employing an Amphipatic Viral Peptide to Create a Lipid Bilayer on Au and TiO<sub>2</sub>. *J Am Chem Soc*, **129**, 10050–10051.
- 92 Jackman, J.A., Zan, G.H., Zhdanov, V.P. and Cho, N.J. (2013) Rupture of Lipid Vesicles by a Broad-Spectrum Antiviral Peptide: Influence of Vesicle Size. *J Phys Chem B*, **117**, 16117–16128.
- 93 Cho, N.J., Frank, C.W., Kasemo, B. and Höök, F. (2010) Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring of Supported Lipid Bilayers on Various Substrates. *Nac Protoc*, **5**, 1096–1106.
- 94 Inkpen, M.S., Liu, Z.F., Li, H., Campos, L.M., Neaton, J.B. and Venkataraman, L. (2019) Non-Chemisorbed Gold-Sulfur Binding Prevails in Self-Assembled Monolayers. *Nat Chem*, **11**, 351–358.
- 95 Hardy, G.H., Nayak, R., Alam, S.M., Shapter, J.G., Heinrich, F. and Zauscher, S. (2012) Biomimetic Supported Lipid Bilayers with High Cholesterol Content Formed by  $\alpha$ -Helical Peptide-Induced Vesicle Fusion. *J Mater Chem*, **22**, 1956–19513.

# Supplements

Supplement 1:

**Figure 1A curves reproduced with POPC liposomes.**



The BALM curves show a good qualitative correspondence with the SPR curve, as we can easily follow every step of the tBLM formation process. With the help of the cartoon on top of the figure, we can identify the tether peptides grating, the subsequent liposome anchoring, and their fusion in a flat lipid bilayer.

Supplement 2:

### The limits of SPR linearity with thickness.

When treating the electromagnetic field profile in the evanescent wave as a constant between  $z = 0$  and  $z = \Lambda$ , the average variation of the refractive index is  $\Delta\langle n \rangle = (n_1 - n_0)\langle \phi \rangle$ , with  $\langle \phi \rangle = \frac{1}{\Lambda} \int_0^\Lambda \phi(z) dz$ .

The thickness of the layer with refractive index  $n_1$  is  $e$ , hence  $\langle \phi \rangle = \frac{1}{\Lambda} \int_0^e 1 dz = \frac{e}{\Lambda}$  and

$$\Delta\langle n \rangle = (n_1 - n_0) \frac{e}{\Lambda} \quad (\text{S2-1})$$

This is what we used in the main text, Equation (1).

When taking into account the field profile  $E(z) = e^{-z/\Lambda}$  in the evanescent wave, we must replace in  $\Delta\langle n \rangle$  the simple average  $\langle \phi \rangle = \frac{1}{\Lambda} \int_0^\Lambda \phi(z) dz$  by the weighted average  $\langle E\phi \rangle = \frac{1}{\Lambda} \int_0^\infty e^{-z/\Lambda} \phi(z) dz$ , with  $\phi(z) = 1$  for  $0 < z \leq e$  and  $\phi(z) = 0$  elsewhere. It gives:

$$\langle E\phi \rangle = \frac{1}{\Lambda} \int_0^e e^{-z/\Lambda} dz = (1 - e^{-\frac{e}{\Lambda}})$$

The variation of the average refractive index is therefore:

$$\Delta_\Lambda \langle n \rangle = (n_1 - n_0)(1 - e^{-\frac{e}{\Lambda}}) \quad (\text{S2-2})$$

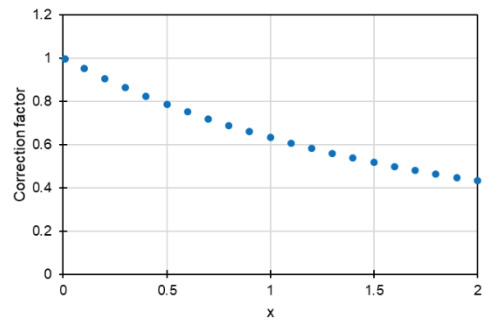
, with the index  $\Lambda$  referring to the account of the field profile.

This is what we used in the main text, Equation (2).

Comparison of Equation (S2-1) and Equation (S2-2) makes a simple distortion factor appear:

$$\Delta_\Lambda \langle n \rangle / \Delta \langle n \rangle = \frac{(1 - e^{-x})}{x}$$

, with  $x = \frac{e}{\Lambda}$ .



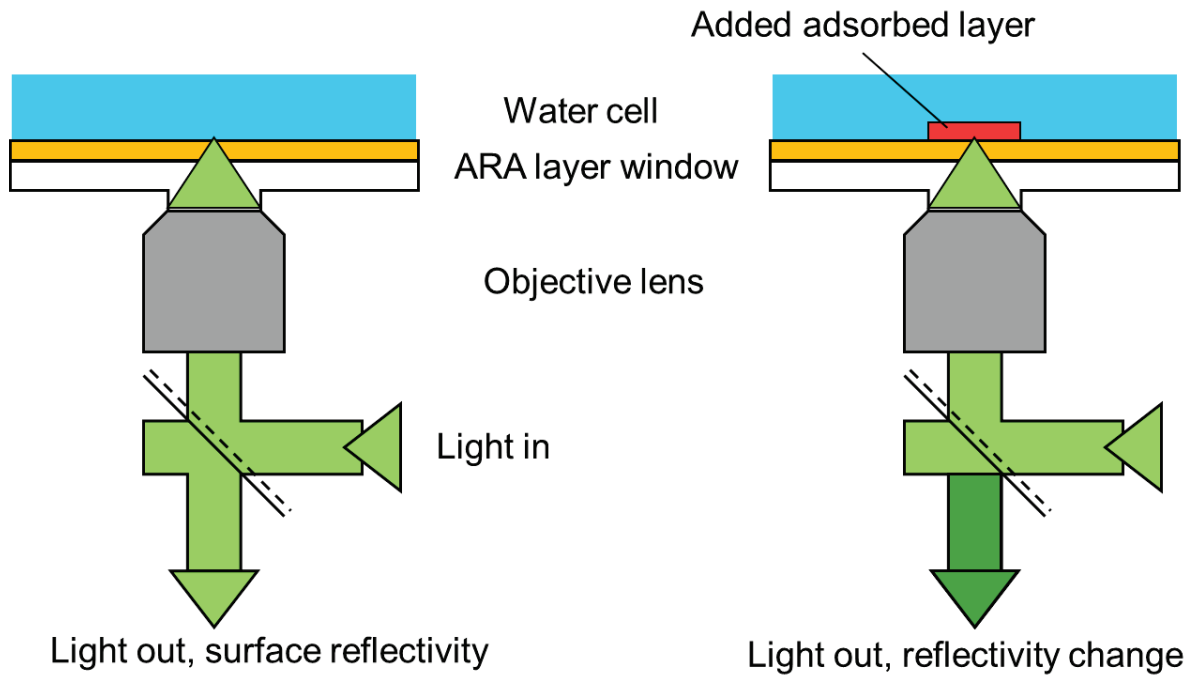
The distortion factor is plotted in the opposite figure. Note that the relative error made ( $= 1 - \text{distortion factor}$ ) is already as much as 10% with a  $\Lambda/5$  layer thickness, for instance a 20 nm layer if  $\Lambda = 100$  nm as for the SPRi apparatus used in this study. It reaches 37% for the liposomes treated as homogeneous objects (i.e. with constant index profile). It follows that the liposome thickness (or surface excess) is underestimated by SPR by 37%. Knowing that the equivalent lipid layer thickness per footprint is  $6\alpha h$ , the distorted SPR signal will correspond to  $3.81\alpha h$  and must be interpreted as such. When exploiting the data, the correction factor will be  $(1/\text{distortion factor})$ .

As an additional remark, we want to stress out a difficulty with the definition of  $\Lambda$ . We took it as the decay length of the electromagnetic field because the refractive index affects the field propagation equations, including their imaginary form. Yet, it is sometimes interpreted as the decay length of the electromagnetic energy, probably because the measured reflectivity is an intensity. We believe it is not correct for SPR because the field to energy conversion takes place outside the evanescent wave. By contrast, it might be correct for instance when expressing a TIRF intensity (Total Internal Reflection Fluorescence) because the energy conversion is inside. Therefore, the effective penetration depth for SPR and TIRF could differ by a factor of 2.

---

Supplement 3:

**The principle of the BALM measurement.**



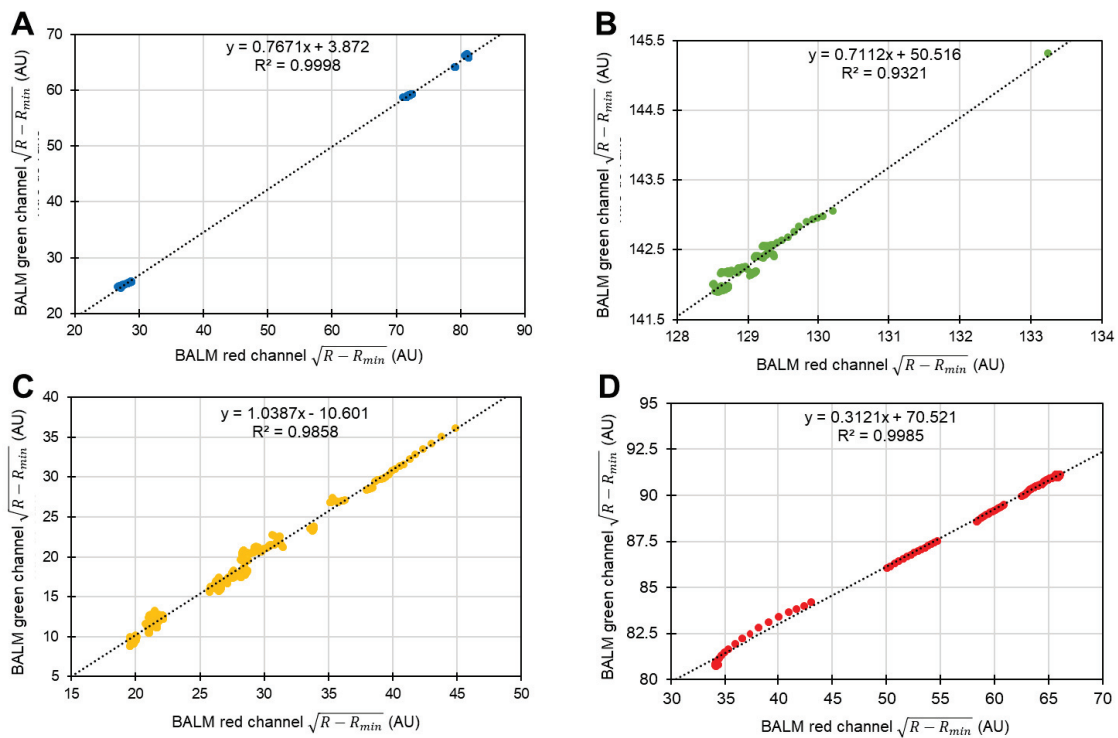
The figure on the left schematizes the BALM setup. The objective lens is linked to the front (lower) side glass window by a drop of immersion oil. Thus, the sole reflecting element is the top (back) surface of the window. Moreover, the presence of the ARA layer with an optimal thickness makes this reflection very weak. When a thin layer is added on that layer, the reflectivity changes to higher (positive contrast) or lower (negative contrast) values, but as long as the added layer stays counted in nanometers, it remains very weak. The low reflectivity results from multiple interferences in the ARA layer (bare substrate) or in the superimposed ARA and added layers (sample).

---

Supplement 4:

### Protocol for quantitative comparisons.

The stage by stage adjustment of the  $R_{min}$  values was conducted by independently adjusting the red and green  $R_{min}$  values. This was made possible by optimizing the linearity between the two BALM ( $R$ ) =  $\sqrt{\frac{R-R_{min}}{R_0-R_{min}}}$ . Since the denominator is constant over a stage, it is equivalent and sufficient to optimize the linearity between the two numerators  $n(R) = \sqrt{R - R_{min}}$ . The 4 curves below show the variation of  $n(R)$  Green as a function of  $n(R)$  Red obtained after each two parameters optimization in each step.

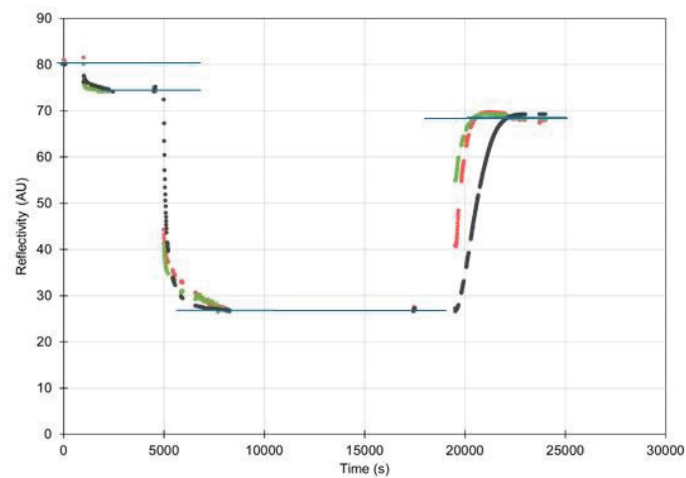


A: Buffer + rinsing stages. B: Tether grafting stage. C: Liposomes anchoring stage. D: fusion stage.

Once the  $R_{min}$  parameters fixed, the linearity between BALM and SPR was checked by adjusting  $a$  and  $b$  in

$$f(R) = a * \Delta R(SPR) + b \quad (S4-1)$$

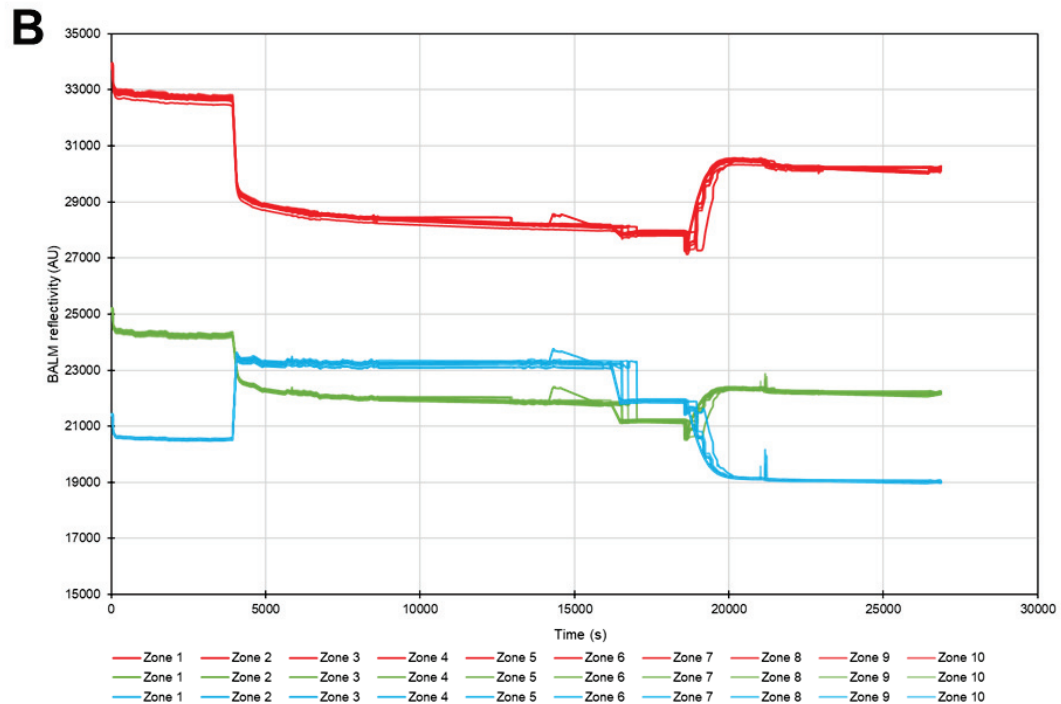
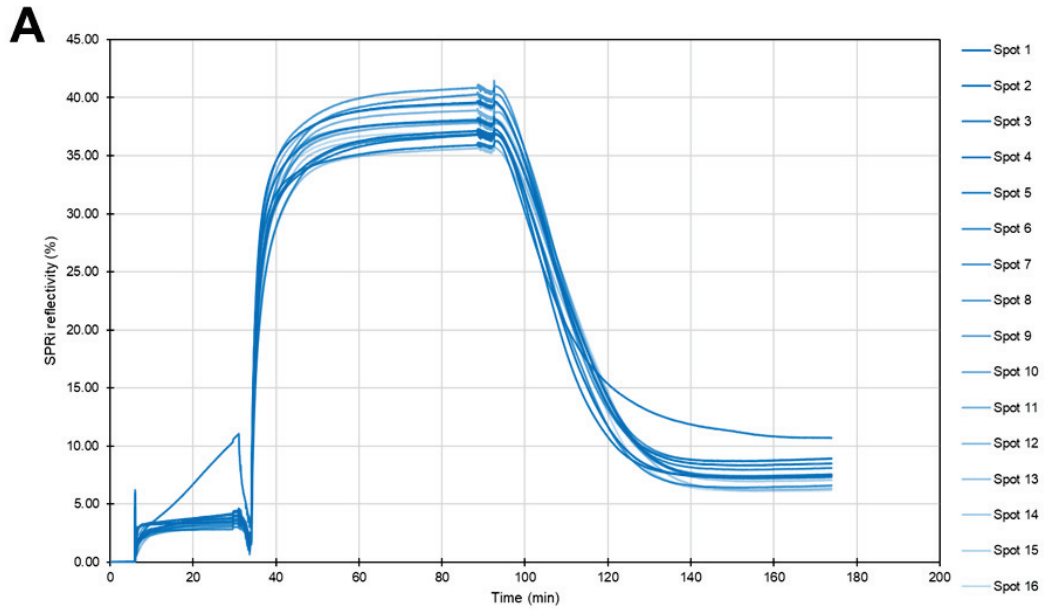
in such a way that the saturation levels are the same. The first member (Red and Green) and second member of this formula after adjustment are plotted in the figure below. The saturation levels are marked with the blue lines.



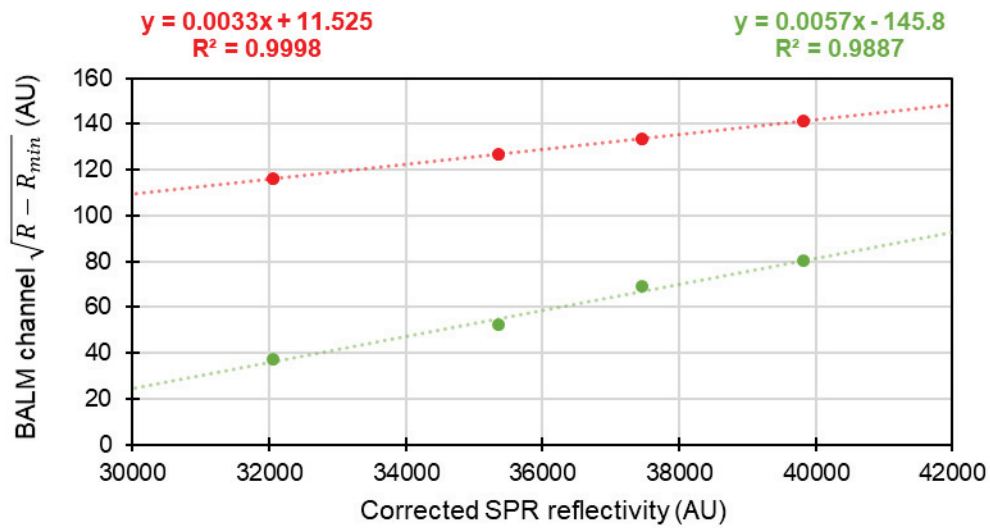
We explain the differences between the SPR and BALM curves by different sensitivities to the distant lipids forming the liposomes. A difference is also observed in the apparent kinetic constants, but this one is specific to the precise experiment that we reported, i.e. not related to the optical techniques, see Supplement 6.

To relativize the importance of these differences, the next figure shows the dispersion of the raw SPRi and BALM measurements in the 16 SPRi spots (A) and in 10 zoomed subzones drawn in the BALM images (B).



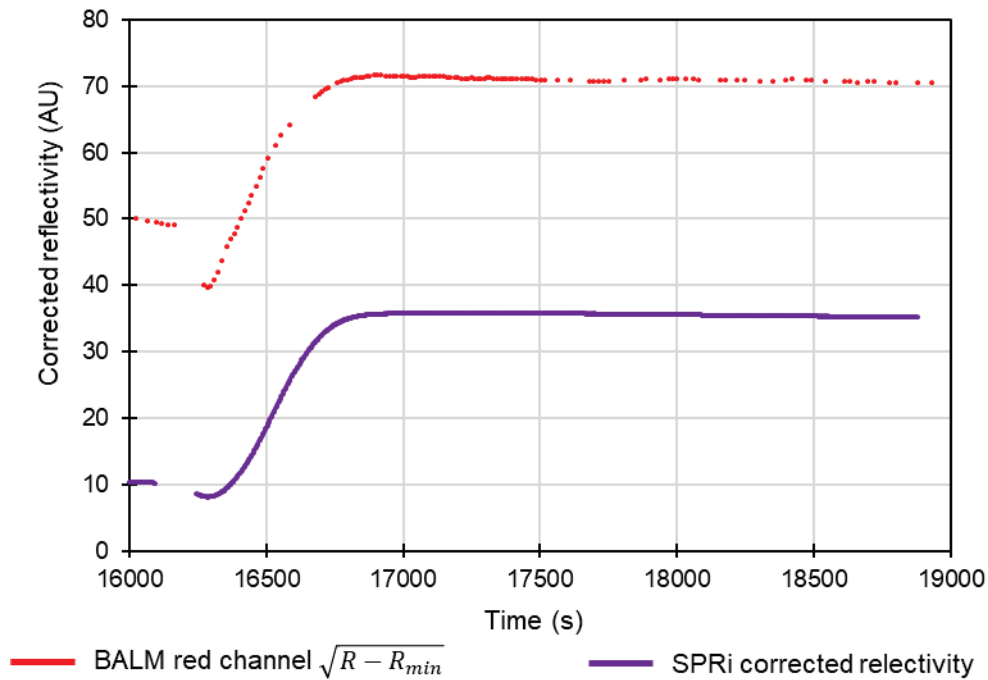


Finally, the linearity of BALM  $\sqrt{R - R_{min}}$  with  $\Delta R$  (SPR) is excellent with the red channel and satisfactory with the green, as plotted in the figure below. It shows BALM  $\sqrt{R - R_{min}}$  as a function of  $\Delta R$  (SPR) for the four saturation levels, *i.e.* for the initial buffer stage and the subsequent rinsing stages. The  $R_{min}$  used correspond to those previously optimized, *i.e.* stage by stage, as explained in the first part of the Supplement 4.



Supplement 5:

### Characteristic times of the fusion stage with POPC liposomes.

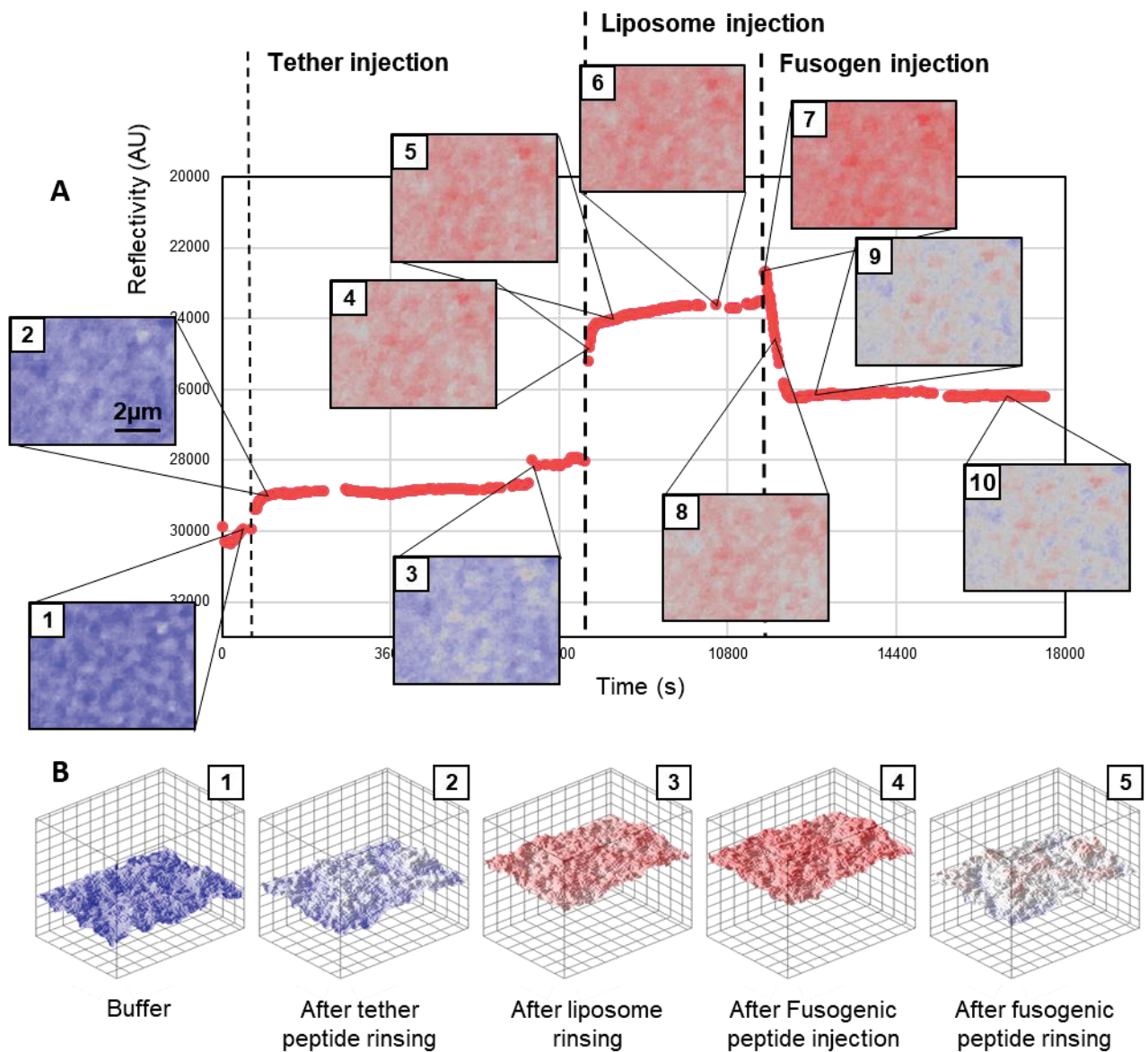


Evolution of the BALM and SPR (corrected) reflectivities during the fusion stage. By contrast with the biomimetic system, the characteristic time of the kinetics as seen with BALM  $\sqrt{R - R_{min}}$  and SPR is the same. Hence, the two techniques can be used indifferently in affinity constant measurements. We note a more sigmoidal shape with SPR, more exponential with BALM. We attribute this difference to a weaker sensitivity of SPR to distant bilayers (the upper part of the liposomes). The SPR reflectivity  $x$  has been redistributed according to  $y = ax + b$ , with  $a = -1.5$ ,  $b = 70$ , with the value of  $|a|$  of order 1 showing comparable sensitivity.

---

Supplement 6:

**Local evolution of the sample at the submicron scale during the formation kinetics of the POPC pep-tBLM.**



A. Series of high resolution images each associated with the corresponding point in the AntiBALM curve.

B. Surface plots displaying the local evolution of the surface patterns for significant steps in the formation process over a  $0.9\mu\text{m} \times 1.2\mu\text{m}$  area.

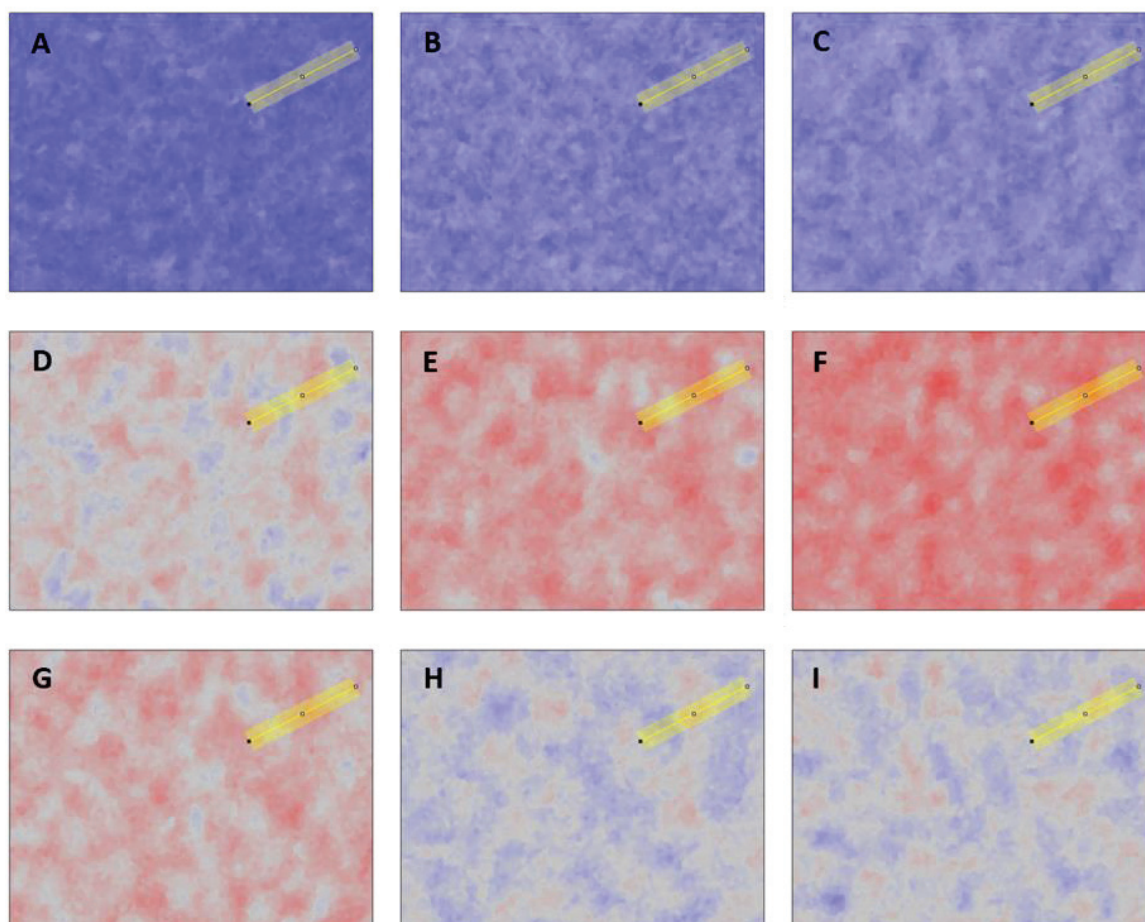
The series of images show the same color shifts than obtained with the biomimetic liposomes: from an intense blue with the buffer to whiter hues after tether peptide injection; then red after the liposome injections and finally, a medium intensity after

fusion. The intensity variation is easily followed with the surface plots in Supplement 6B, with a progressive swelling until liposome fusion.

---

Supplement 7:

**Images used to make the Figure 3 plot profiles.**

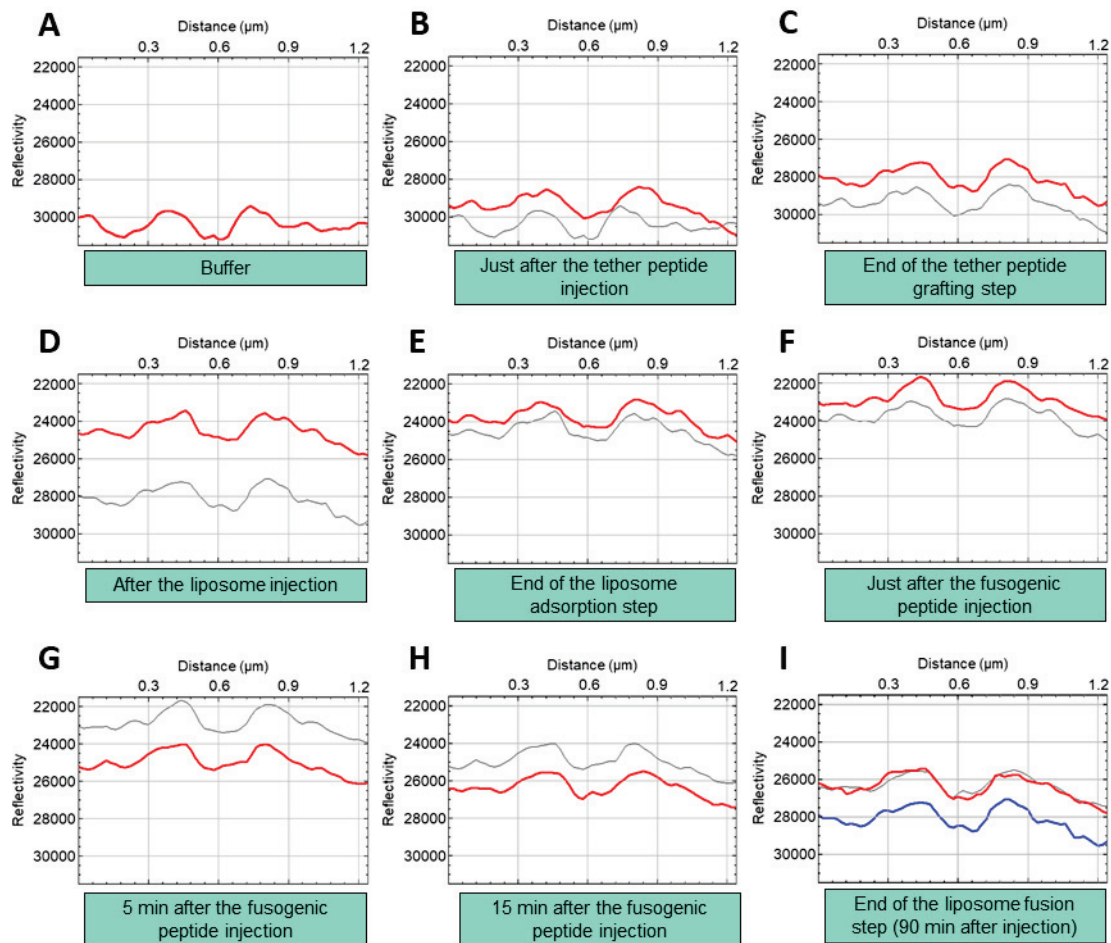


Each image was obtained after averaging the signal of four successive images, applying both an inverted phase LUT and a median 1-pixel wide filter. In yellow, the ten-pixel wide, 1.2 μm long line used for the plot profiles. Each image is 3.1 μm tall and 4.1 μm wide.

---

Supplement 8:

**Plot profiles along a ten-pixel wide, 1.2  $\mu\text{m}$  long line at nine significant steps of the peptide-tethered bilayer formation from POPC liposomes.**



In red, the plot profile corresponding to the given step; in black the plot profile of the previous step; in blue (Supplement 8I) the plot profile corresponding to the end of the tether grafting step. Each plot profile was obtained after averaging the signal of four successive images, applying an inverted phase LUT and applying a median 1-pixel wide filter. The images used are available in Supplement 9.

The plot profiles obtained once again show the expected matter transfers in each step, with an elevation in the thickness during the tether peptide and the liposome injections, up to the early fusion step. Then, the thickness gradually decreases until a homogeneous layer is formed, as evidenced by the difference between the red (plot profile at the end of the fusion step) and blue (plot profile at the end of the tether peptide grafting step) curves in Supplement 8I.

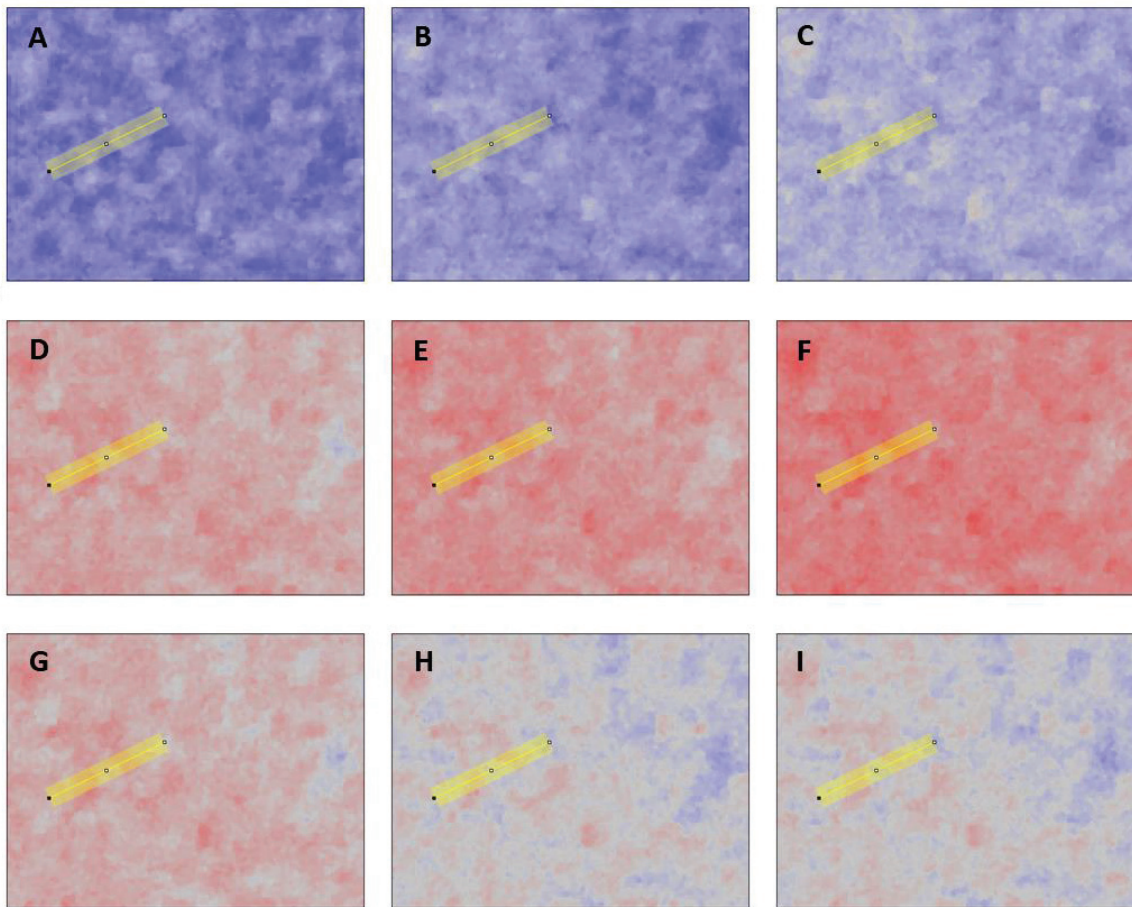
The plot profiles obtained with POPC liposomes are considerably more stable than the ones obtained with the biomimetic liposome composition. Such stark differences can be explained by the lipid segregation expected with the biomimetic mixture, as it is rich in both cholesterol and SM, which are lipids traditionally involved in segregation processes in biological membranes. Therefore, the liposome composition affects the bilayer formation mechanism.

---



Supplement 9:

**Images used to make the Supplement 8 plot profiles.**



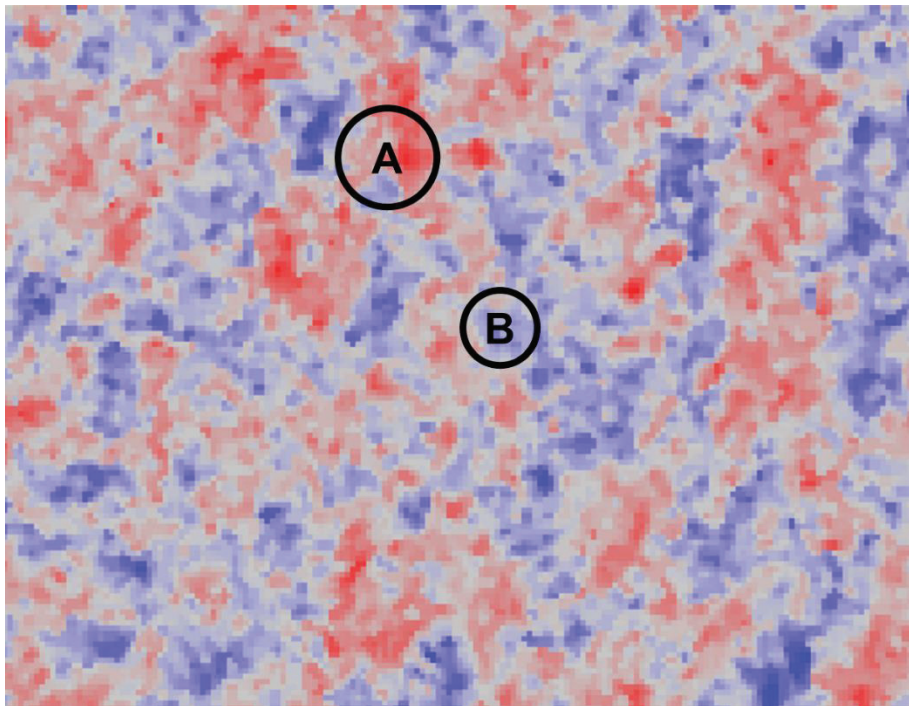
Each image was obtained after averaging the signal of four successive images, applying both an inverted phase LUT and a median, 1-pixel wide filter. In yellow, the ten-pixel wide, 1.2  $\mu\text{m}$  long line used for the plot profiles. Each image is 2.8  $\mu\text{m}$  tall and 3.7  $\mu\text{m}$  wide.

---

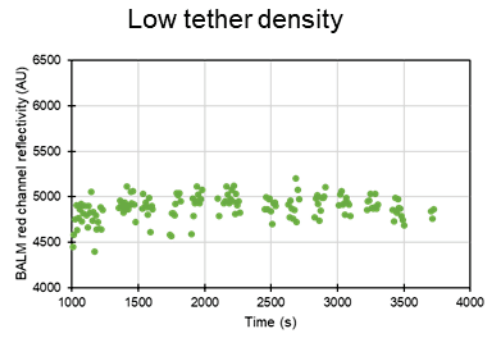
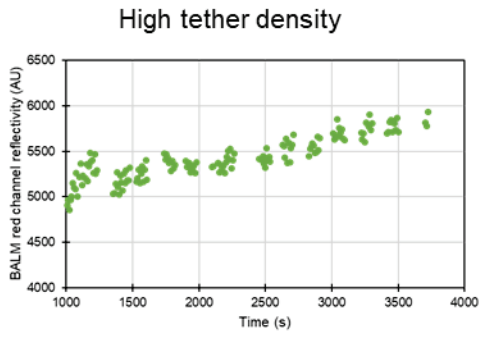
Supplement 10:

### **Local kinetic measurements in the liposome stage.**

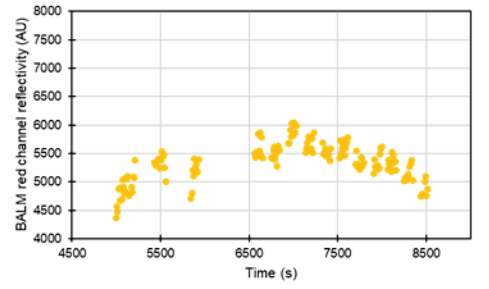
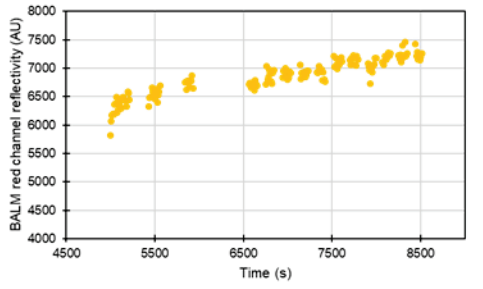
We work in the same  $7 \times 5 \mu\text{m}^2$  zone as used in Figure 2. Since the pattern appearing at the beginning is conserved for the whole duration of the kinetics, we could select two fixed spots in this zone corresponding to a high (A) and a low tether (B) density, respectively. These regions are drawn in the image below, corresponding to the end of the tether grafting step, where a median 1-pixel wide filter was applied and the contrast adjusted to maximize the height difference, in order to drive the eye toward the tether pattern on the surface. The zones areas are respectively  $0,4 \mu\text{m}^2$  (A) and  $0,2 \mu\text{m}^2$  (B).



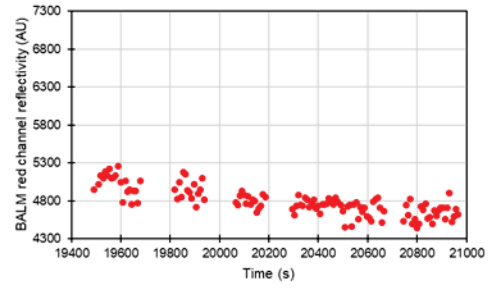
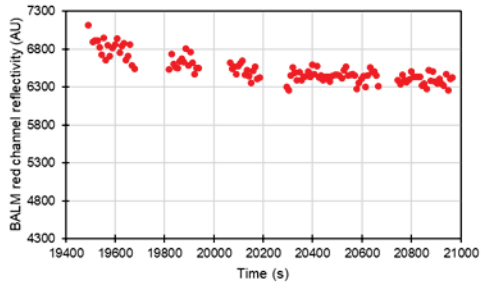
Then, we could follow the evolution of the BALM reflectivity in each defined zone. We choose the red channel because it is “almost” proportional to the film thickness. The results obtained in each stage are plotted under the image, with the high and the low tether density making the left and the right column. The y scale has the same amplitude in each pair. The quality of each curve would permit estimation of kinetic constants. This example demonstrates that BALM can provide local real time and *in situ* measurements of minute amounts much under the micron scale.



Tether peptide  
grafting stage



Liposome  
grafting stage



Fusion stage

Supplement 11:

**Stage by stage SPR derivation of  $\Delta R_{SPR}$  on the basis of Equation (1).**

**Starting buffer:** refractive index  $\equiv n_0$

$$\Delta R_{SPR 0} = 0 \quad (\text{S11-0})$$

**Tether peptide grafting stage:** refractive index of the current solute  $\equiv n_i$ , volume fraction  $\phi_i$ .

$$\Delta R_{SPR 1} = S \left\{ \phi_1(n_1 - n_0) + [n_1 - n_0 - \phi_1(n_1 - n_0)]\alpha_1 \frac{e_1}{\Lambda} \right\}$$

The first term is the contribution of the solution, the so-called jump in index affecting the entire probing depth. Note that it is not affected by the reduction factor  $\frac{e_1}{\Lambda}$ , which explains its relative importance. The second term may be read  $\{n_1 - [n_0 + \phi_1(n_1 - n_0)]\}\alpha_1 \frac{e_1}{\Lambda}$  showing that it conforms to Equation (1) after replacing  $n_0$  by the new appropriate value. We finally get:

$$\Delta R_{SPR 1} = S \left[ \phi_1(n_1 - n_0) + (1 - \phi_1)(n_1 - n_0)\alpha_1 \frac{e_1}{\Lambda} \right] \quad (\text{S11-1})$$

End of kinetics: The final (or saturation) value of  $\alpha_i e_i$  is  $A_i E_i$ , with  $i$  the stage number.

$$\Delta R_{SPR 1Sat} = S \left[ \phi_1(n_1 - n_0) + (1 - \phi_1)(n_1 - n_0)A_1 \frac{E_1}{\Lambda} \right] \quad (\text{S11-2})$$

After tether rinsing: ( $\Delta R_{SPR 2}$  is always counted with respect to the starting pure buffer)

$$\Delta R_{SPR 2} = S(n_1 - n_0)A_1 \frac{E_1}{\Lambda} \quad (\text{S11-3})$$

**Liposome anchoring stage:** liposome refractive index  $\equiv n_2$

$$\Delta R_{SPR 3} = S \left\{ \phi_2(n_2 - n_0) + [n_1 - n_0 - \phi_2(n_2 - n_0)]A_1 \frac{E_1}{\Lambda} + [n_2 - n_0 - \phi_2(n_2 - n_0)]\alpha_2 \frac{e_2}{\Lambda} \right\}$$

, where the first and second brackets may be read as before as, respectively,  $n_1 - [n_0 + \phi_2(n_2 - n_0)]$  and  $n_2 - [n_0 + \phi_2(n_2 - n_0)]$  to show the mechanism of the derivation.

$$\Delta R_{SPR 3} = S \left\{ \phi_2(n_2 - n_0) + [n_1 - \phi_2 n_2 - (1 - \phi_2)n_0]A_1 \frac{E_1}{\Lambda} + (1 - \phi_2)(n_2 - n_0)\alpha_2 \frac{e_2}{\Lambda} \right\}$$

$$\Delta R_{SPR3} = S \left\{ \phi_2(n_2 - n_0) + [n_1 - n_2 + (1 - \phi_2)(n_2 - n_0)] A_1 \frac{E_1}{\Lambda} + (1 - \phi_2)(n_2 - n_0) \alpha_2 \frac{e_2}{\Lambda} \right\}$$

$$\Delta R_{SPR3} = S \left[ \phi_2(n_2 - n_0) + (n_1 - n_2) A_1 \frac{E_1}{\Lambda} + (1 - \phi_2)(n_2 - n_0) \left( A_1 \frac{E_1}{\Lambda} + \alpha_2 \frac{e_2}{\Lambda} \right) \right] \quad (S11-4)$$

The second term with  $(n_1 - n_2)$  in this expression may be viewed as a correction balancing the counting of  $A_1 \frac{E_1}{\Lambda}$  with the index  $n_2$  in the third term.

End of kinetics:

$$\Delta R_{SPR3 Sat} = S \left[ \phi_2(n_2 - n_0) + (n_1 - n_2) A_1 \frac{E_1}{\Lambda} + (1 - \phi_2)(n_2 - n_0) \left( A_1 \frac{E_1}{\Lambda} + A_2 \frac{E_2}{\Lambda} \right) \right] \quad (S11-5)$$

After liposome rinsing:

$$\Delta R_{SPR4} = S \left[ (n_1 - n_0) A_1 \frac{E_1}{\Lambda} + (n_2 - n_0) A_2 \frac{E_2}{\Lambda} \right] \quad (S11-6)$$

**Fusion stage:** refractive index of the fusogenic peptide  $\equiv n_3$

An additional difficulty appears with the lipid vanishing during the conversion of liposomes into bilayers.  $A_2 \frac{E_2}{\Lambda}$  is corrected by  $-\alpha'_2 \frac{e'_2}{\Lambda}$  in presence of the  $n_3$  solution. To account for this transformation, the liposomes are counted as an equivalent lipid layer with refractive index  $n_2$ .

$$\Delta R_{SPR5} = S \left\{ \phi_3(n_3 - n_0) + (n_1 - n_3) A_1 \frac{E_1}{\Lambda} + (n_2 - n_3) \left( A_2 \frac{E_2}{\Lambda} - \alpha'_2 \frac{e'_2}{\Lambda} \right) + (1 - \phi_3)(n_3 - n_0) \left[ A_1 \frac{E_1}{\Lambda} + \left( A_2 \frac{E_2}{\Lambda} - \alpha'_2 \frac{e'_2}{\Lambda} \right) + \alpha_3 \frac{e_3}{\Lambda} \right] \right\} \quad (S11-7)$$

End of kinetics:

$$\Delta R_{SPR5 Sat} = S \left\{ \phi_3(n_3 - n_0) + (n_1 - n_3) A_1 \frac{E_1}{\Lambda} + (n_2 - n_3) \left( A_2 \frac{E_2}{\Lambda} - A'_2 \frac{E'_2}{\Lambda} \right) + (1 - \phi_3)(n_3 - n_0) \left[ A_1 \frac{E_1}{\Lambda} + \left( A_2 \frac{E_2}{\Lambda} - A'_2 \frac{E'_2}{\Lambda} \right) + A_3 \frac{E_3}{\Lambda} \right] \right\} \quad (S11-8)$$

After fusion rinsing:

$$\Delta R_{SPR6} = S \left[ (n_1 - n_0) A_1 \frac{E_1}{\Lambda} + (n_2 - n_0) \left( A_2 \frac{E_2}{\Lambda} - A'_2 \frac{E'_2}{\Lambda} \right) + (n_3 - n_0) A_3 \frac{E_3}{\Lambda} \right] \quad (S11-9)$$

### **Exploitation of the saturation levels:**

After rinsing levels are given by the blue equations (S11-0), (S11-3), (S11-6) and (S11-9). From the first to the last one, the contributions of the various deposited components add in sequence. The last term in (S11-9) with subscript 3 is relative to the fusogenic peptide. It is responsible for the brief bump at the beginning of the fusion stage, and then expected (from previous studies) to leave with the departing lipids. Hence  $E_3 = 0$  and:

$$\Delta R_{SPR\ final} = S \left[ (n_1 - n_0) A_1 \frac{E_1}{\Lambda} + (n_2 - n_0) \left( A_2 \frac{E_2}{\Lambda} - A'_2 \frac{E'_2}{\Lambda} \right) \right] \quad (S11-10)$$

The after rinsing levels of the second and the third stage are both expressed in terms of lipid equivalent layers with refractive index  $n_2$ . Assuming a homogeneous bilayer at the end, (S11-10) can be written:

$$\Delta R_{SPR\ final} = S \left[ (n_1 - n_0) A_1 \frac{E_1}{\Lambda} + (n_2 - n_0) \frac{h}{\Lambda} \right] \quad (S11-11)$$

, with  $h$  the thickness of the bilayer.

### **Conversion of the liposomes into equivalent bilayers:**

This conversion is based on the use of a liposome-equivalent lipid layer. In other words, the liposomes which are a mixture of lipids and water are described as the equivalent dense lipid layer, as if they were just emptied from water and shrunk to a dense state. This is supported as follows:

- i) the liposome refractive index  $n_L$  is the average of lipid and buffer refractive indices  $n_2$  and  $n_0$  in their respective volume proportions in the liposome  $n = \left( \pi D^2 h n_2 + \frac{1}{6} \pi D^3 n_0 \right) / \left( \pi D^2 h + \frac{1}{6} \pi D^3 \right) = \left( h n_2 + \frac{D}{6} n_0 \right) / \left( h + \frac{D}{6} \right) \cong n_0 \left[ 1 + 6 \frac{h}{D} (n_2 - n_0) \right]$ , with  $D$  the liposome diameter.
- ii)  $\Delta R_{SPR}$  with respect to the buffer reference is sensitive to the product  $(n - n_0) D$  for the liposomes. At first order in  $\frac{h}{D}$ , we have  $(n - n_0) D \cong 6h(n_2 - n_0)$ , showing that the refractive index  $n$  and thickness  $D$  of the liposome can be converted into the lipid refractive index  $n_2$  and a lipid thickness  $6h$ , which makes 6 equivalent bilayers per liposome footprint  $\pi D^2/4$ .
- iii) Then this equivalent thickness must be corrected by the number of liposomes footprints per surface unit, that is to say the liposome coverage ratio  $A_2$ . Its maximum possible value corresponds to the hexagonal

packing density  $A_2 \cong 0.81$ , leading to  $(n - n_0)D \cong 4.84 h(n_2 - n_0)$ . Another interesting reference is the random packing density  $A_2 \cong 0.64$ , leading to  $(n - n_0)D \cong 3.84 h(n_2 - n_0)$ .

Liposome surface coverage:

The after liposome after rinsing  $\Delta R_{SPR4}$  may now be written:

$$\Delta R_{SPR4} = S \left[ (n_1 - n_0) A_1 \frac{E_1}{\Lambda} + 6 A_2 (n_2 - n_0) \frac{h}{\Lambda} \right] \quad (S11-12)$$

In addition to (S11-11) and (S11-12), the experiment gives:

$$\Delta R_{SPR\ final} = 0.4 \Delta R_{SPR4} \quad (S11-13)$$

Combining the three equations, we get:

$$-\Delta R_{SPR\ final} + \Delta R_{SPR4} = 0.6 \Delta R_{SPR4} = 5 A_2 (n_2 - n_0) \frac{h}{\Lambda}$$

From where:

$$(n_1 - n_0) A_1 \frac{E_1}{\Lambda} = \frac{1.4}{0.6} A_2 (n_2 - n_0) \frac{h}{\Lambda} = 2.33 A_2 (n_2 - n_0) \frac{h}{\Lambda}$$

And:

$$\Delta R_{SPR\ final} = 0.4 S \Delta R_{SPR4} = 3.33 A_2 S (n_2 - n_0) \frac{h}{\Lambda}$$

Applying afterwards the correction for the exponential decay (given to 1.59 in the main text), we finally get ( $3.33/1.59 = 2.09$ ):

$$\Delta R_{SPR\ final} = 2.09 A_2 S (n_2 - n_0) \frac{h}{\Lambda} \quad (S11-14)$$

The above procedure may be used in general to get rid of some embarrassing contribution in the analysis of multistep SPR data.

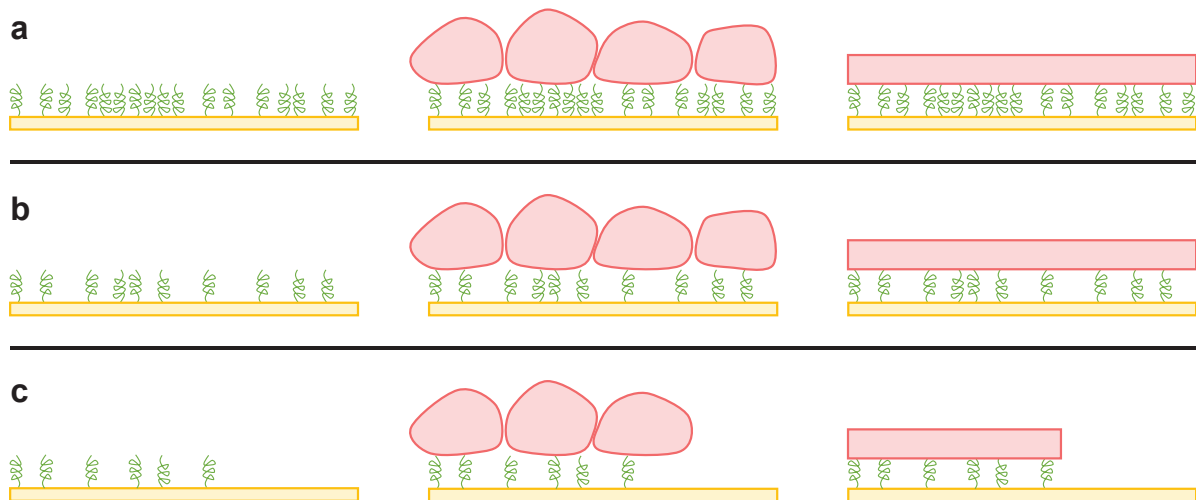
$A_2$  in this supplement corresponds to  $\alpha$  in the text.

---

### 2.1.3. Comparaison entre la BALM, la QCM-D et la SPRi

Dans ce chapitre, nous avons étudié la formation de pep-tBLM par une méthode développée au laboratoire. La caractérisation de cette formation a été réalisée par deux méthodes nouvelles sur ce système, la QCM-D et la BALM, ainsi que par la SPRi, la méthode de référence utilisée. La QCM-D et la BALM ont montré qu'elles étaient tout aussi capables que la SPRi de suivre qualitativement la formation des pep-tBLM à chaque étape du processus.

La comparaison des signaux BALM et SPRi avec les expérimentations en QCM-D, bien que préliminaires, permet de faire la correspondance entre plusieurs observations. Notamment, en ce qui concerne le peptide pilotis, les images de BALM ont permis de montrer que le pilotis s'adsorbait en s'agrégeant, formant ainsi des motifs conservés sur la surface. Ce résultat est tout à fait cohérent avec l'observation faite en QCM-D sur la concentration du peptide pilotis: aux concentrations usuelles (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), le peptide pilotis est en excès, et peut donc former des agrégats (**Figure 76a**).



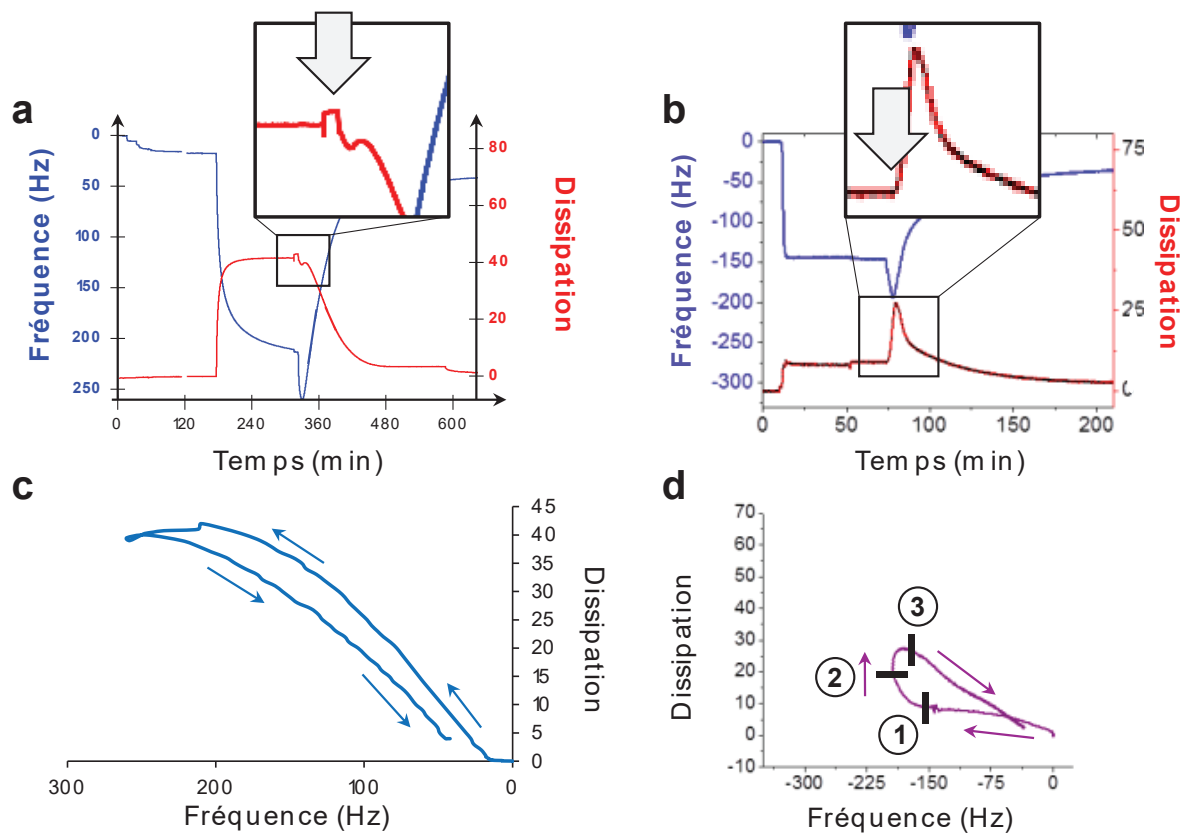
**Figure 76.** Représentation schématique de l'influence de la concentration en peptide pilotis sur l'accrochage des liposomes et la qualité de la pep-tBLM finale.

- a. Concentration élevée (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de peptide pilotis.
- b. Concentration moyenne (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de peptide pilotis.
- c. Concentration faible (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de peptide pilotis.



Réduire la concentration en peptide pilotis conduit donc à une réduction de l'agrégation, mais n'affecte pas significativement la disponibilité du peptide, ce dernier élément étant critique pour permettre l'accrochage des liposomes (**Figure 76b**). Les pep-tBLM formées sont donc probablement de qualité similaire. En revanche, passée sous un certain seuil, la quantité de peptide pilotis devient limitante, ce qui se traduit alors par une diminution de la disponibilité en peptide et une réduction de l'ancrage des liposomes, et par conséquent, de la qualité de la bicouche finale (**Figure 76c**).

L'une des particularités de la QCM-D est la double mesure effectuée sur la fréquence et la dissipation. La première donne une information sur la quantité de masse adsorbée à la surface ; la seconde renseigne sur la viscosité de la couche adsorbée. Ici, le signal de dissipation est très élevé lors de l'adsorption des liposomes et chute drastiquement lors de la fusion, alors qu'il était très faible lors de l'adsorption des peptides pilotis. Ce résultat est dû à la structure des différents éléments considérés : là où les peptides pilotis et la bicouche lipidique sont des structures plus rigides mécaniquement parlant, les liposomes sont de grosses sphères « molles » remplies d'eau et vont donc fortement dissiper l'énergie de vibration. En gardant ces considérations à l'esprit, l'évolution du signal observé lors de la fusion des liposomes induite par le peptide fusogène est très intéressante. L'évolution de la fréquence de vibration montre initialement une arrivée de matière, avant un départ progressif lors de la fusion, un résultat confirmé par la SPRi et par la BALM. Comme précisé dans la discussion de la publication soumise dans *Biophysical Journal*, cette donnée est en accord avec la littérature scientifique sur le mécanisme d'action du peptide fusogène. Ce dernier est doté d'une structure hélicoïdale permettant son insertion dans les membranes présentant un rayon de courbure élevé. L'insertion du peptide déstabilise la membrane et conduit à un gonflement des liposomes par formation de pores et/ou de microvillosités, avant éclatement/fusion des liposomes [346]. Ici, plus que l'insertion du peptide fusogène, l'augmentation de la masse adsorbée sur la surface semble traduire ce gonflement des liposomes. Le signal de dissipation associé à cette phase de la cinétique montre une baisse initiale de la dissipation, qui augmente de nouveau après quelques minutes avant de finalement diminuer jusqu'à la formation de la pep-tBLM (**Figure 77a**). Ce comportement a été reproduit dans toutes les expérimentations réalisées.



**Figure 77.** Comparaison entre les résultats obtenus et ceux de la littérature scientifique, pour le suivi par QCM-D de la formation de bicouches biomimétiques (pep-tBLM ou SLB) à partir de liposomes de 120 nm de diamètre (publication de J.A. Jackman *et al.* de 2013 dans *J Phys Chem B* [315]).

**a.** Courbe de QCM-D obtenue avec notre système de pep-tBLM. L'encadré représente un zoom sur la section de la courbe de dissipation que nous commentons, la flèche grise représente l'injection du peptide fusogène.

**b.** Courbe équivalente à la courbe **77a** pour des SLB, données de J.A. Jackman *et al.*, Figure S2 D [315]. L'encadré représente un zoom sur la section de la courbe de dissipation que nous commentons, la flèche grise représente l'injection du peptide fusogène.

**c.** Relation indépendante du temps de la fréquence et de la dissipation obtenue avec notre système de pep-tBLM.

**d.** Courbe équivalente à la courbe **77c** pour des SLB, données de J.A. Jackman *et al.*, Figure S3 D [315]. Les trois phases identifiées par les auteurs sont **1**) insertion du peptide fusogène, **2**) réarrangements structuraux des liposomes (gonflement) et **3**) rupture des liposomes et fusion.

Par contraste, les études ayant précédemment décrit le mécanisme d'action du peptide fusogène sur des SLB par QCM-D avaient montré une modification de la dissipation en deux temps, représentée **Figure 77b** ; l'injection du peptide fusogène conduisant dans un premier temps à une augmentation de la dissipation avant de décroître progressivement jusqu'à la formation des SLB [315,346]. La différence entre les deux systèmes, pep-tBLM et SLB, est également visible lorsque sont tracées les courbes de la dissipation en fonction de la variation de fréquence, ce qui permet de s'affranchir de la notion du temps (**Figure 77c et 77d**).

Il apparaît ici que la seule différence notable entre notre système et celui utilisé par J. A. Jackman *et al.* soit la présence de peptides pilotis sous-jacents dans notre système, le leur étant composé de vésicules directement adsorbées sur la surface métallique. Les vésicules utilisées étaient extrêmement similaires, composées de POPC et ayant un diamètre moyen de 120 nm. Bien que les vésicules utilisées dans notre système aient été dopées par 2 % (rapport molaire) de DOGS-NTA(Ni), il est peu vraisemblable qu'une si faible proportion ait un impact aussi majeur sur la dissipation observée.

Comme décrit précédemment, le peptide pilotis a une conformation hélicoïdale s'apparentant à un ressort. Dans ce contexte, l'absence de pic de dissipation lors de la fusion des vésicules pourrait s'expliquer par un effet amortisseur du pilotis. Il est également à noter que, comme précédemment mentionné, l'analyse de l'évolution des signaux obtenus au début de la phase de fusion est rendue complexe par la superposition de deux événements opposés, à savoir le gonflement des liposomes et leur ouverture. Bien que cette contrainte soit présente dans les deux systèmes, la différence apparente entre les signaux de dissipation observés sur des SLB et sur des pep-tBLM pourrait refléter une différence sur le mécanisme d'action du peptide fusogène. Le peptide pilotis ancre les liposomes à la surface, par l'intermédiaire d'un lipide particulier. Ce phénomène, que nous avons déjà amplement détaillé, a vraisemblablement un impact sur la conformation adoptée par les liposomes fixés sur les peptides pilotis, comme l'on montré l'analyse en BALM, avec un aplatissement des liposomes adsorbés dans des régions pauvres en peptides pilotis. Cette différence de conformation des liposomes influe vraisemblablement sur les rayons de courbures de leurs membranes, ce qui peut à

son tour influencer la cinétique d'action du peptide fusogène. Ce dernier est d'autant plus efficace que le rayon de courbure est élevé, ce qui pourrait expliquer les différences observées entre SLB et pep-tBLM.

## 2.2. Mise en place d'un système membranaire biomimétique naturel

### 2.2.1. Contexte et enjeux du caractère biomimétique

La mise en place de systèmes de formation de membranes biomimétiques répond à la volonté d'étudier des propriétés ou des protéines des membranes cellulaires. En découplant l'étude de la membrane de celle du reste de la cellule, les modèles membranaires biomimétiques permettent d'évaluer avec précision l'implication de la membrane dans de nombreux phénomènes sans influence du reste de la cellule. De surcroît, ils permettent de recourir à des techniques autrement impossibles à mettre en place avec des cellules entières. Pour être de bonne qualité, les systèmes biomimétiques doivent être capables de reproduire au mieux la membrane qu'ils miment. Ce critère est absolument crucial, les informations tirées d'un modèle n'ayant de pertinence biologique qu'au regard de la fiabilité et de la robustesse du modèle sur lequel l'analyse a été faite. De telles considérations sont applicables peu importe la discipline scientifique, mais elles sont particulièrement prégnantes dans ce cas précis. En effet, le caractère biomimétique d'un système membranaire est très difficile à mesurer et à comparer compte tenu de l'extrême complexité des membranes cellulaires. Cette grande complexité a pu être mise en exergue en « **Etude bibliographique** ». Elle repose sur une extraordinaire diversité de compositions moléculaires, sur les phénomènes de ségrégation et d'asymétrie qui y prennent place, mais également sur les liens étroits entre membranes cellulaires, cytosquelette et matrice extracellulaire, qui influent grandement sur les propriétés des membranes. Ainsi, de très nombreux modèles sont qualifiés de biomimétiques, malgré les énormes différences pouvant parfois exister. Il convient néanmoins de préciser que le besoin d'un caractère biomimétique fidèle dépend de l'objectif recherché ; la recherche de conditions pour la reconstitution de protéines membranaires n'a de réel intérêt que dans des modèles ayant pour but l'étude de telles protéines, et serait complètement accessoire, par exemple, pour une étude axée sur le suivi d'interactions sucres - lipides au niveau des membranes. A ce jour, les deux principaux facteurs différenciant les différents modèles biomimétiques

sont leur composition et leur organisation. Le caractère biomimétique est alors assuré par l'utilisation d'une composition lipidique et d'une organisation en bicouche lipidique aussi proches que possible de celles de la membrane étudiée.

A cet égard, le système biomimétique membranaire mis au point au laboratoire est très performant, puisque non seulement il forme des bicouches lipidiques, mais il peut aussi s'adapter à de nombreuses compositions lipidiques différentes pour être compatible avec la reconstitution de protéines membranaires. En revanche, il présente plusieurs limitations :

- il nécessite d'utiliser un peptide pilotis particulier ;
- il ne permet pas la reproduction de l'asymétrie membranaire biologique ;
- il nécessite un substrat recouvert d'une couche d'or pour permettre la fixation des peptides pilotis à la surface.

De nombreuses compositions lipidiques ont ainsi pu être testées et ont montré la formation d'une bicouche biomimétique. Le caractère biomimétique des membranes est alors assuré par l'utilisation d'une composition lipidique proche de la composition réelle de la membrane étudiée. Or, la composition exacte d'une membrane est, comme nous l'avons précédemment rappelé, extrêmement complexe, même si on ne s'intéresse qu'à la fraction lipidique. Par souci de simplicité, les membranes biomimétiques sont ainsi formées à partir de compositions simplifiées, le plus souvent constituées de mélanges de PC, de PE, de SM et de cholestérol. Nous avons d'ailleurs utilisé une telle composition dans le développement de l'application de la BALM au suivi de la formation des pep-tBLM. Cependant, comme nous avons pu le voir dans le premier chapitre de résultats, de menues différences dans la composition lipidique peuvent avoir de grands effets sur les interactions membrane-membrane. Dans ce contexte, et dans le but d'étudier plus avant ces interactions par le biais de méthodes accessibles uniquement à des systèmes biomimétiques, nous avons cherché à mettre au point un système biomimétique constitué d'une bicouche de lipides naturels.

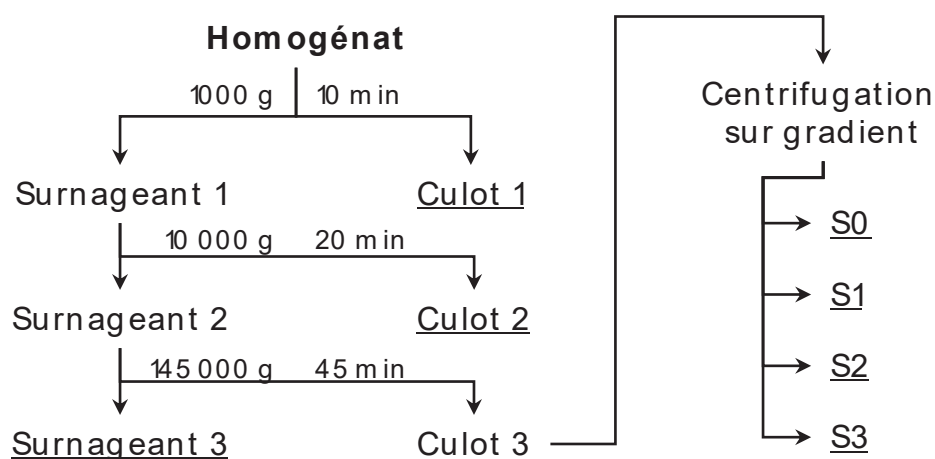
A cet égard, la bicouche lipidique a été formée selon la méthode développée au laboratoire, mais à partir de liposomes constitués de lipides naturels extraits (et enrichis en DOGS-NTA(Ni) pour permettre leur accrochage aux peptides pilotis). L'idée était alors de réaliser un fractionnement cellulaire sur des culots des

différentes lignées prostatiques utilisées, afin d'isoler des fractions contenant la membrane plasmique, puis d'extraire les lipides de ces fractions afin de s'en servir pour former des liposomes. A terme, ce projet avait pour but la formation de quatre systèmes membranaires biomimétiques distincts de par leur composition lipidique, reproduisant ainsi la membrane des quatre lignées prostatiques utilisées, pour étudier l'interaction de ces modèles naturels avec des vecteurs lipidiques.

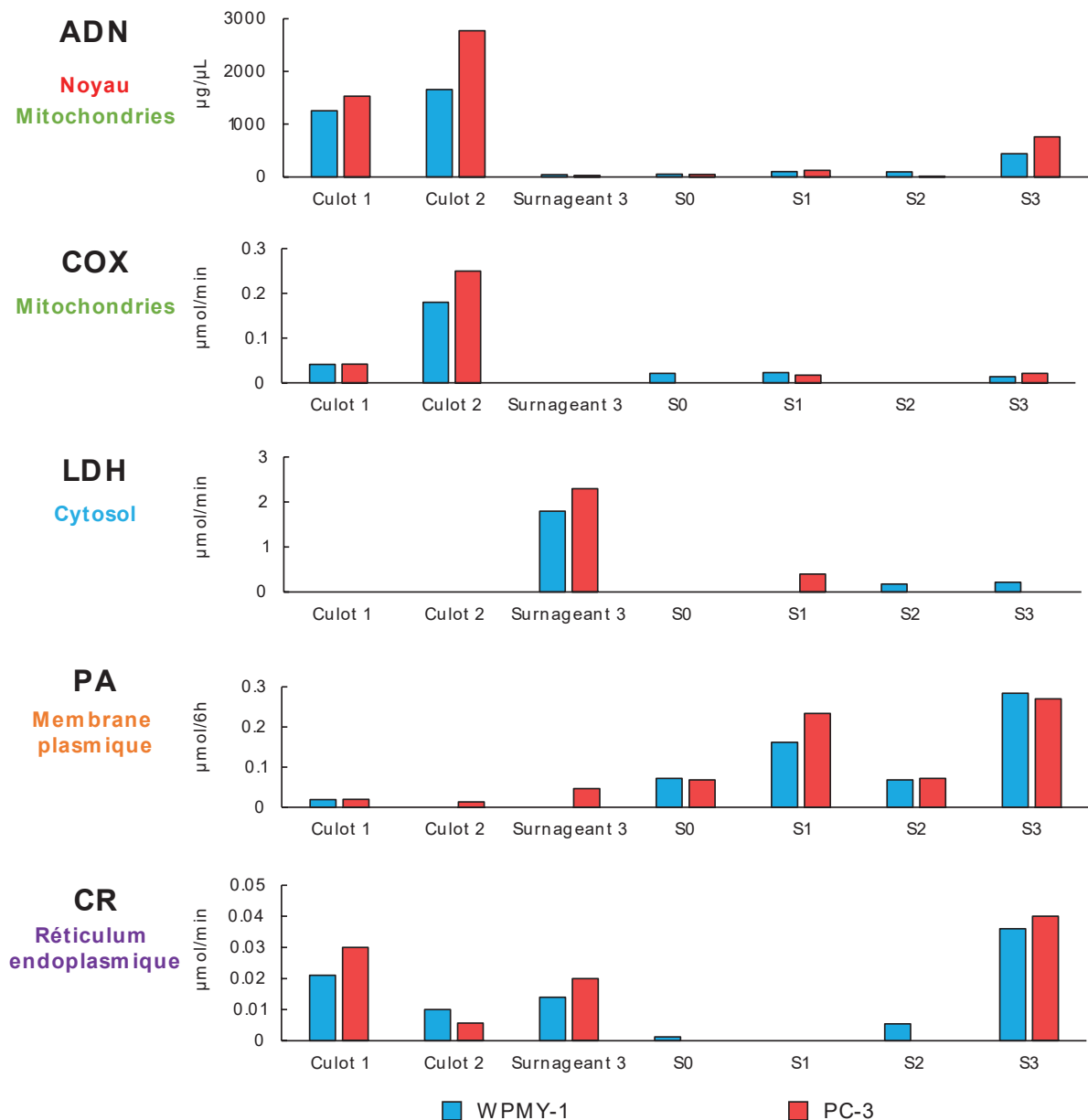
## 2.2.2. Préparation de liposomes naturels

### 2.2.2.1. Fractionnement cellulaire

Un protocole de fractionnement cellulaire a été mis en place, sur la base de données de la littérature [124], en collaboration avec le Dr Saïda MEBAREK (ICBMS - UMR CNRS 5246 - Equipe MEM<sup>2</sup>). 200 millions de cellules WPMY-1 et PC-3 ont progressivement été mises de côté sous forme de culots secs. Après centrifugations différentielles et centrifugation isopycniqque (**Figure 78**), les fractions récupérées ont été analysées par différents tests afin de s'assurer du bon déroulement du fractionnement (**Figure 79**).



**Figure 78.** Fractions obtenues lors du fractionnement cellulaire, selon le protocole décrit en « **MATÉRIEL ET MÉTHODES** » (3.4.1., page 113).



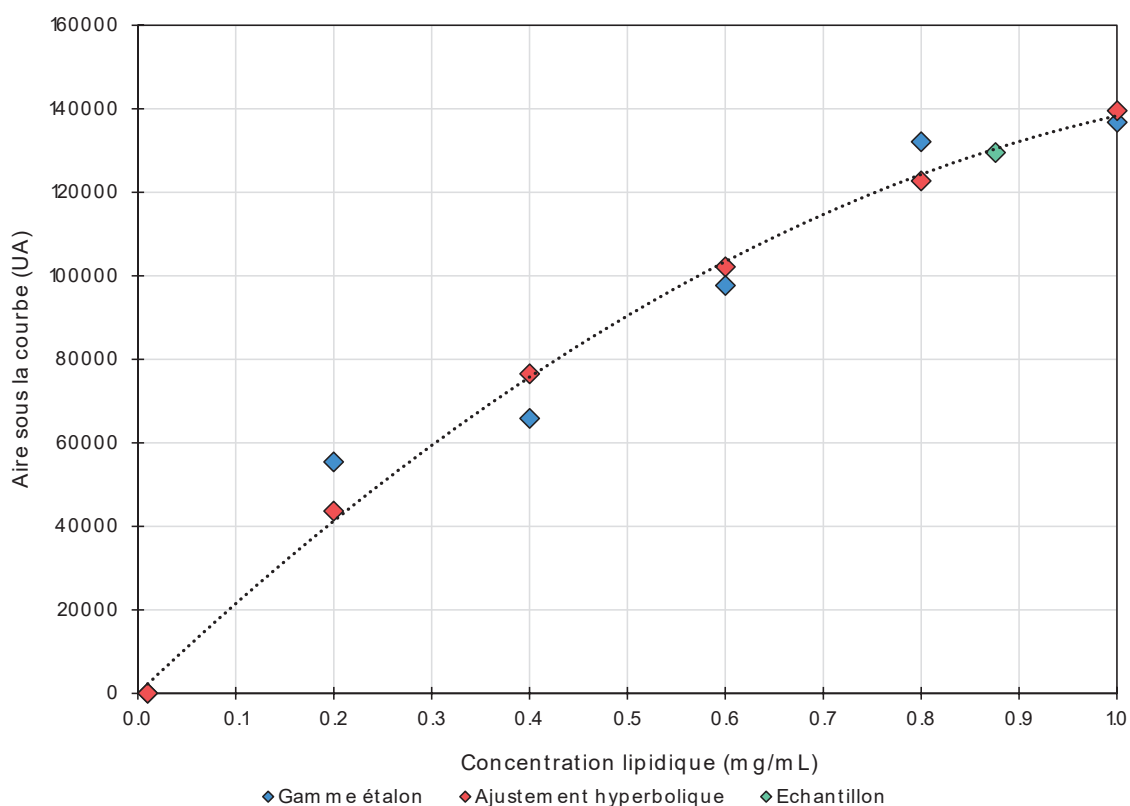
**Figure 79.** Caractérisation des fractions obtenues après fractionnement de 200 millions de cellules WPMY-1 et PC-3, selon les protocoles décrits en « **MATÉRIEL ET MÉTHODES** » (3.4.2., page 115). Pour chaque test sont indiqués le ou les organe(s) concerné(s).

Ces tests ont permis de confirmer la présence d'une activité de la phosphatase alcaline dans les fractions issues des microsomes, ce qui montre la présence de membrane plasmique. Parmi les fractions microsomales, les fractions S1 et S3 contiennent le plus de membrane plasmique, mais les fractions S3 contiennent également de l'ADN ainsi qu'une forte activité de la Cytochrome C NADPH Réductase (CR), qui est le marqueur du réticulum endoplasmique. En comparaison,

les fractions S1 ne contiennent pas ces éléments et ont donc été collectées pour la suite de l'étude.

### 2.2.2.2. Dosage de lipides

Après extraction par la méthode de Bligh & Dyer, les lipides naturels provenant de la fraction S1 des cellules PC-3 ont été utilisés pour la formation de liposomes appelés liposomes LN (pour « Lipides Naturels »). Lors de la préparation des liposomes LN, les lipides ont été dopés par 2% (rapport molaire) de DOGS-NTA(Ni), afin de permettre l'accrochage des liposomes formés aux peptides pilotis. Une fois les liposomes formés, la quantité de lipide a été mesurée par le dosage au Dioll. Le principe de ce dosage repose sur les propriétés intrinsèques du Dioll, ce dernier ne fluoresçant qu'une fois inséré dans une membrane. L'intensité de fluorescence totale dépend alors de la quantité de membranes, c'est-à-dire de la quantité de lipides. De plus amples explications sur la mise au point de ce dosage et la publication qui y est associée sont données en « **Annexe** » (1.2., page 260).



**Figure 80.** Dosage des lipides par le Dioll. L'aire sous la courbe est mesurée sur les spectres d'émission du Dioll inséré dans les liposomes.



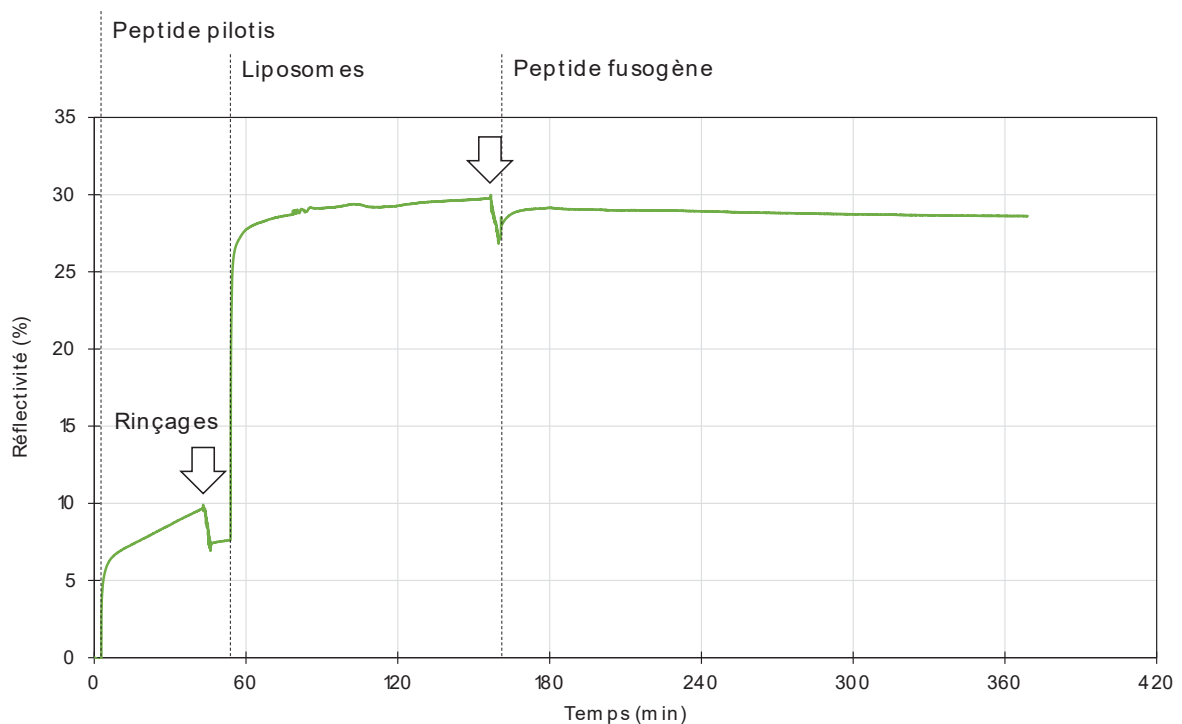
Le dosage des lipides dans les liposomes préparés a donné une concentration en lipides de 0,88 mg/mL, tout à fait compatible avec la concentration nécessaire pour la formation de pep-tBLM, la formation d'une pep-tBLM nécessitant 0,04 mg de lipides (**Figure 80**).

### 2.2.3. Formation de bicouches biomimétiques

Une fois des liposomes LN préparés, la formation d'une pep-tBLM à partir de ces liposomes a été caractérisée par la SPRi puis par la BALM.

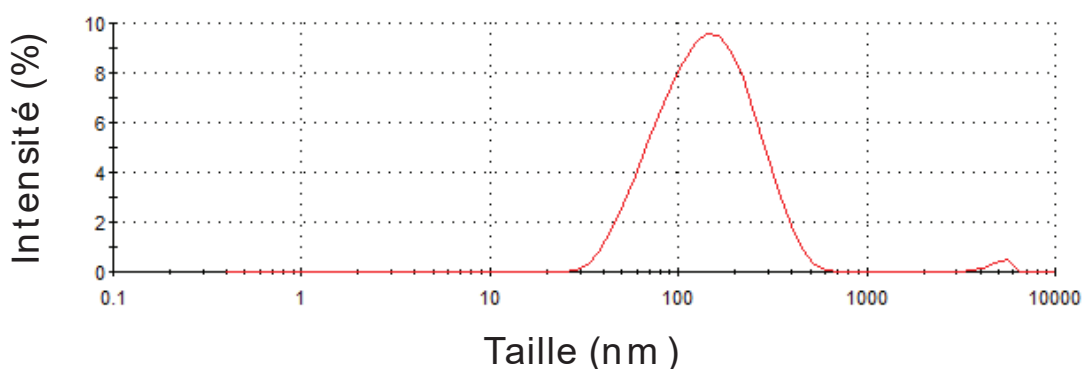
#### 2.2.3.1. Suivi par SPRi

La caractérisation en SPRi de la formation d'une pep-tBLM à partir de liposomes LN est présentée **Figure 81**.



**Figure 81.** Suivi par SPRi de la formation d'une pep-tBLM à partir de liposomes LN. Les différentes étapes de la formation de la pep-tBLM sont rappelées sur la figure par les traits pointillés noirs (correspondant aux injections), les flèches blanches correspondant aux rinçages.

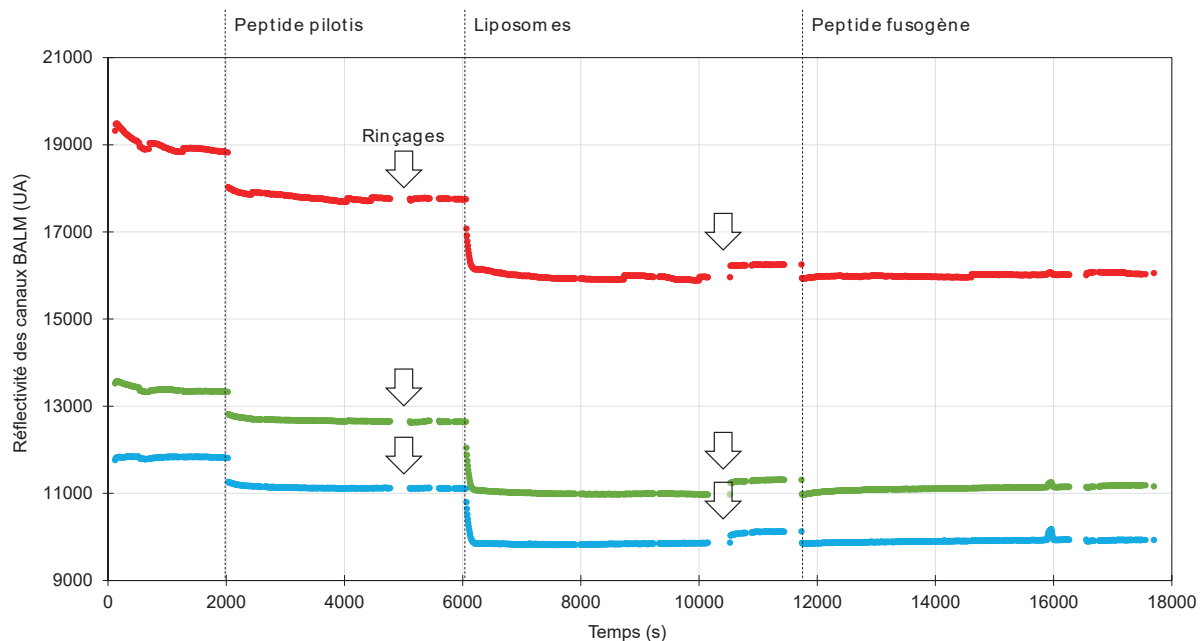
Il apparaît que ces liposomes se fixent avec succès aux peptides pilotis, mais on n'observe pas de fusion induite par l'ajout de peptide fusogène. Ces résultats sont assez surprenants, le système ayant préalablement été testé sur de nombreuses compositions lipidiques différentes [349]. Cet effet n'est vraisemblablement pas dû à la taille des liposomes, la mesure en DLS de cette dernière ayant montré que les liposomes LN ont un diamètre moyen de 125,3 ( $\pm 1$ ) nm, similaire à celui des liposomes habituellement utilisés avec ce système (**Figure 82**). Il est également important de préciser que la qualité des peptides pilotis et fusogènes n'était vraisemblablement pas en cause, les mêmes solutions ayant été utilisées avec succès pour former des pep-tBLM à partir de liposomes différents.



**Figure 82.** Mesure de la taille des liposomes LN par DLS.

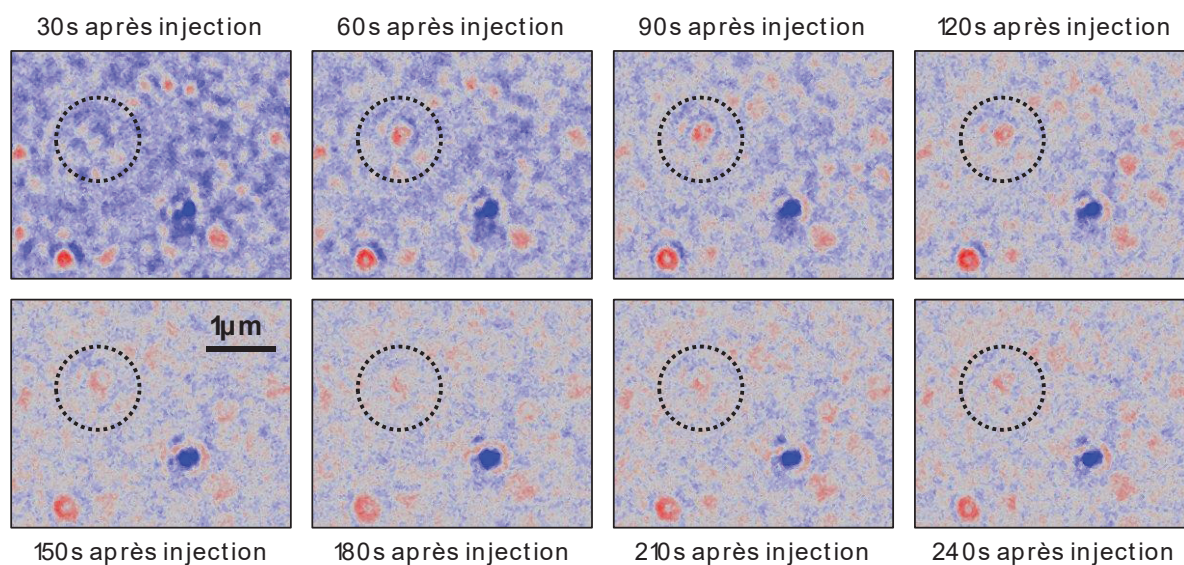
### 2.2.3.2. *Suivi par BALM*

Même si le suivi par SPRi de la formation d'une pep-tBLM à partir de liposomes LN n'a pas été concluant, nous avons néanmoins procédé au suivi de ce même processus par BALM. Les résultats de l'évolution de la réflectivité moyennée au cours de la cinétique sont présentés **Figure 83**. Ces résultats reproduisent ceux obtenus par SPRi : bien que les deux premières phases de fixation des pilotis et des liposomes soient clairement visibles, l'ajout de peptide fusogène ne semble pas, en première approximation, induire la fusion des liposomes, que l'on suppose pourtant bien présents au vu de la hausse de réflectivité induite par l'injection des liposomes.



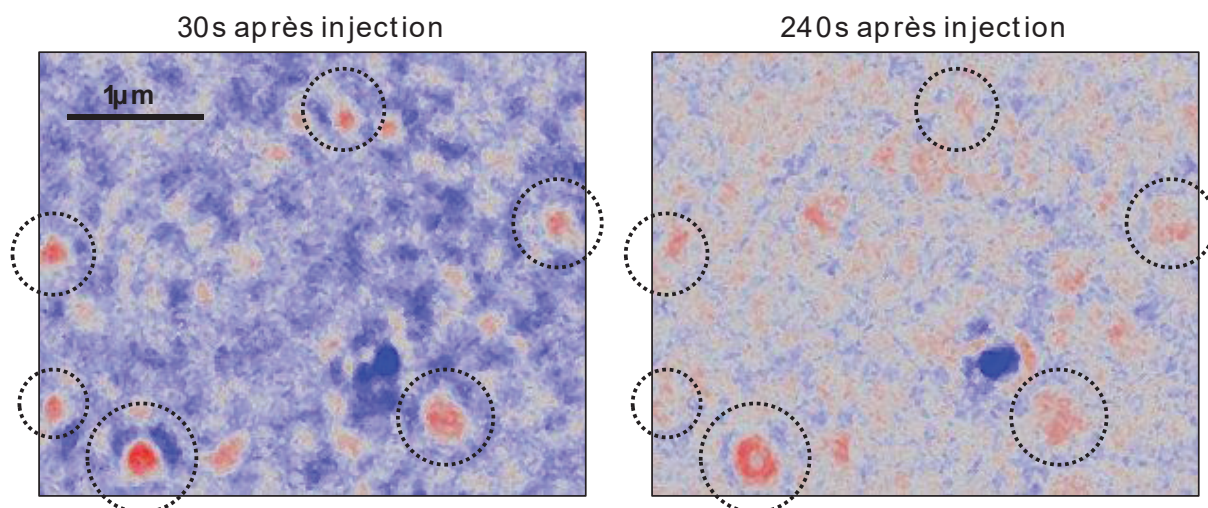
**Figure 83.** Suivi par la BALM de l'évolution de la réflectivité au cours de la cinétique de formation d'une tBLM à partir de liposomes LN. Chaque courbe est colorée du canal de BALM qu'elle représente.

L'analyse à l'échelle locale des images obtenues lors de l'injection du peptide fusogène ne permet pas de mettre en évidence le moindre changement significatif au niveau de la surface. En revanche, l'analyse des images correspondant à la phase de fixation des liposomes est extrêmement intéressante. Le cercle pointillé noir sur la **Figure 84** montre une zone de faible épaisseur (colorée en bleu) dans laquelle un élément (coloré en rouge) apparaît brusquement soixante secondes après injection (deuxième image). Un tel signal est caractéristique de l'arrivée soudaine d'un liposome à la surface. En effet, un tel phénomène augmente brusquement l'épaisseur de la couche adsorbée, représentée par une translation du bleu vers le rouge.



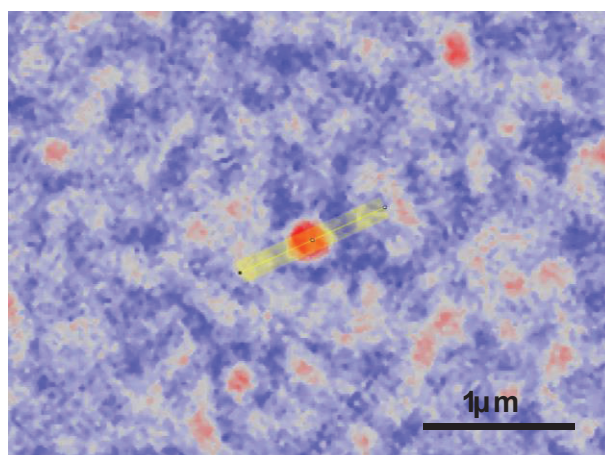
**Figure 84.** Cinétique imagée par la BALM de la phase de fixation de liposomes LN sur des peptides pilotis. Les images ont été colorées par la table de conversion ou LUT (pour « *LookUp Table* ») « phase », qui colorie les intensités basses en bleu, les intensités moyennes en blanc et les intensités élevées en rouge.

Après fixation, le liposome semble progressivement s'estomper, sa couleur passant du rouge intense à des tons pâles plus proches du rose. En parallèle, les zones bleues autour du liposome passent elles aussi progressivement à des tons plus proches du rose. Ce phénomène s'explique par l'étalement du liposome et est particulièrement fréquent, comme le montre la **Figure 85** avec les cercles pointillés noirs, où de nombreuses taches rouges qui s'élargissent et s'éclaircissent en quelques minutes.

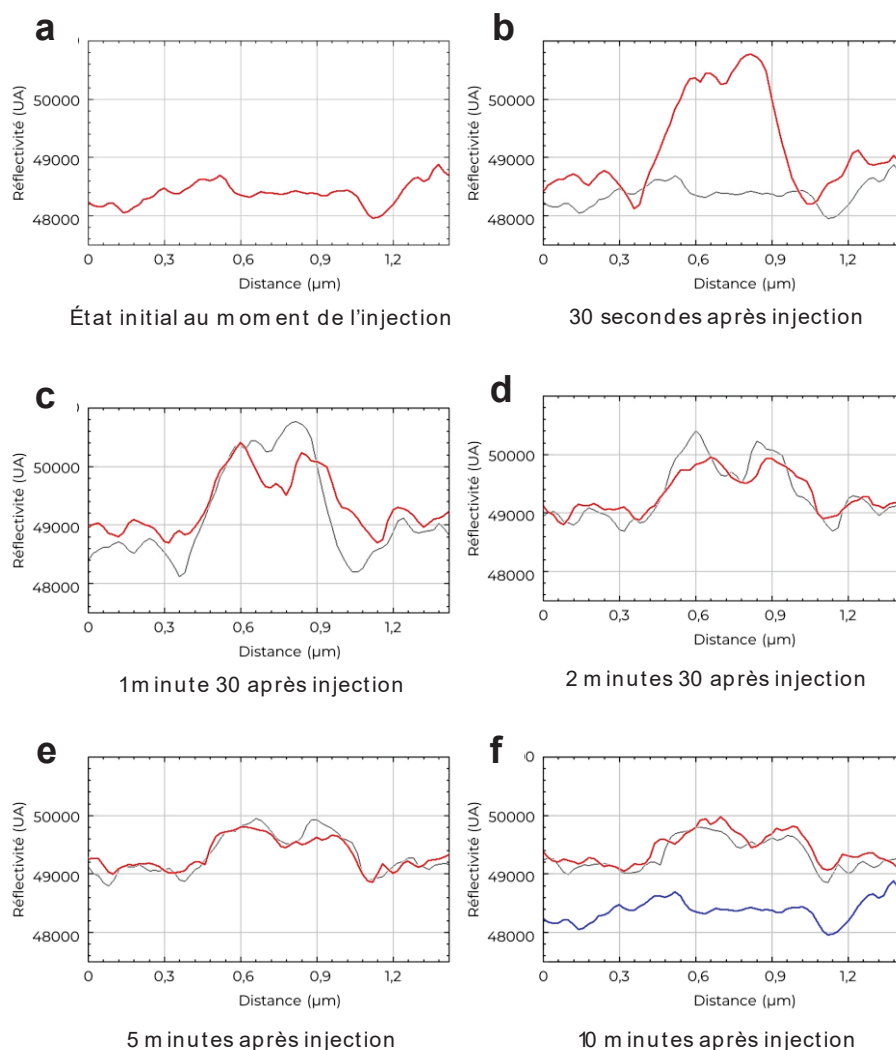


**Figure 85.** Cinétique imagée par la BALM de la phase de fixation de liposomes LN sur des peptides pilotis. Les images ont été colorées par la LUT « phase », qui colorie les intensités basses en bleu, les intensités moyennes en blanc et les intensités élevées en rouge.

Afin de mieux visualiser l'évolution des liposomes lors de leur adsorption, l'étude de la réflectivité le long d'une ligne traversant un liposome (**Figure 86**) a permis d'obtenir les profils de réflectivité présentés **Figure 87**.



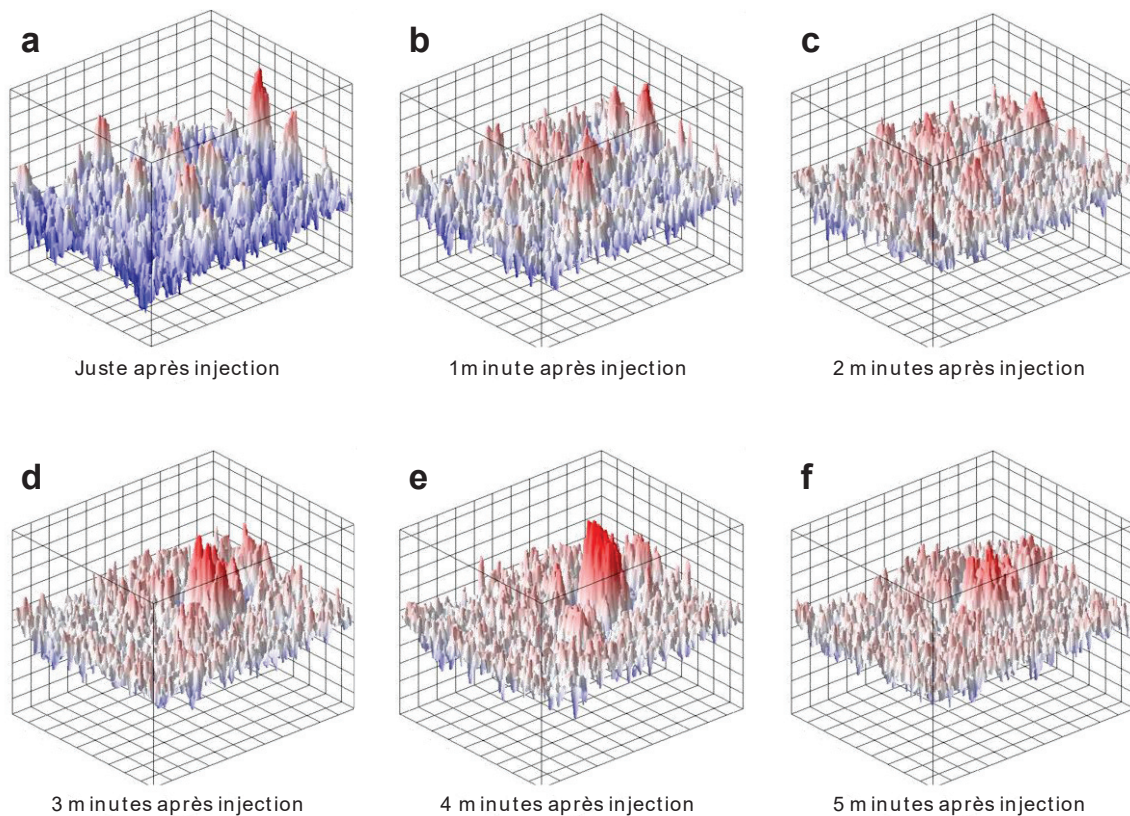
**Figure 86.** Définition de la zone étudiée, représentée par un trait jaune, dans la cinétique d'ancrage des liposomes LN sur des peptides pilotis. Les images ont été colorées par la LUT « phase », qui colorie les intensités basses en bleu, les intensités moyennes en blanc et les intensités élevées en rouge.



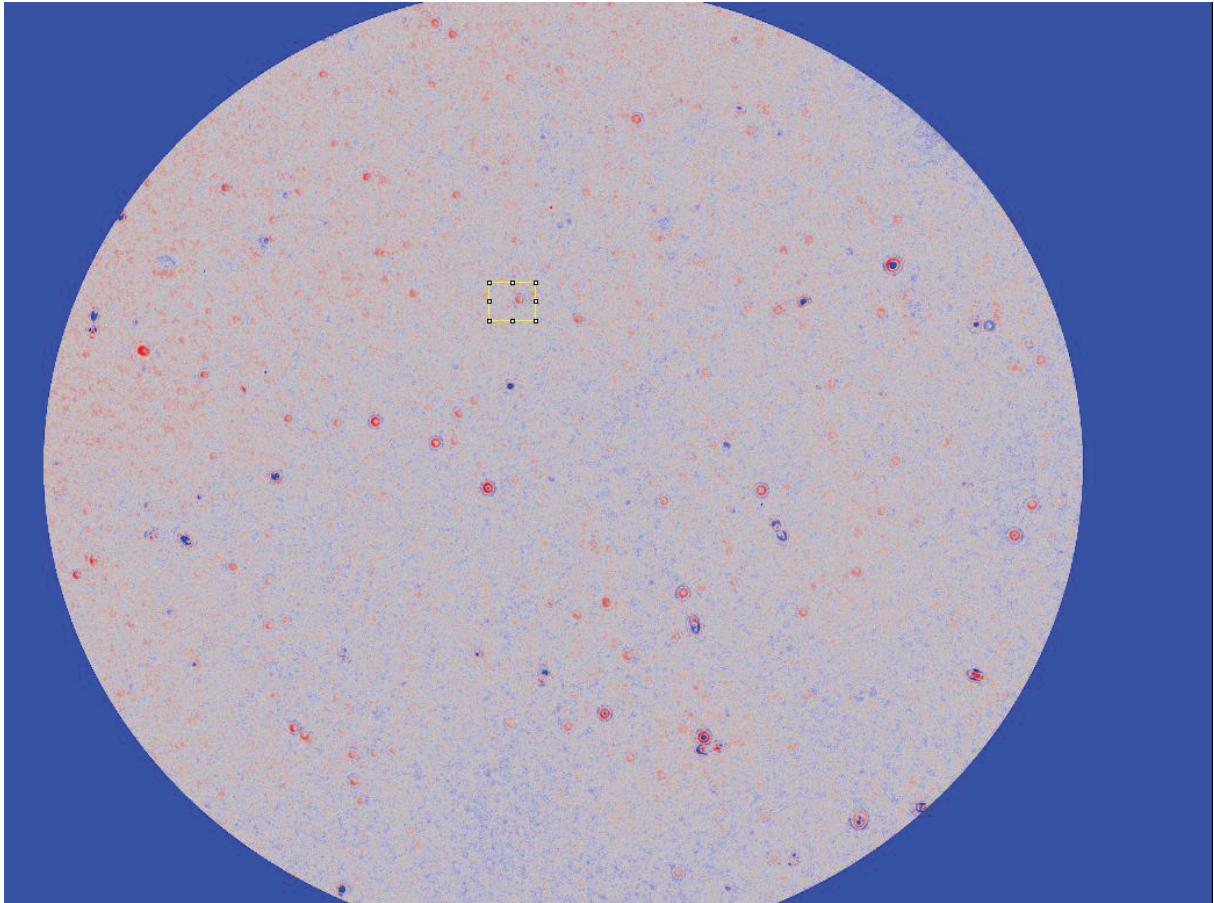
**Figure 87.** Evolution du profil de réflectivité le long d'une ligne de 10 pixels de large lors de la phase d'ancrage des liposomes LN sur des peptides pilotis. Sur chaque image, la courbe rouge représente le profil du moment donné ; la courbe grise rappelle le profil précédent ; la courbe bleue (sur la **Figure 87f**) représente le profil initial.

La **Figure 87a** montre que la surface greffée de peptides pilotis présente des motifs, mais ces derniers sont très faiblement marqués. 30 secondes plus tard, la **Figure 87b** montre l'arrivée d'un liposome, traduite par une très forte augmentation de la réflectivité. On observe également que la zone aux pieds du liposome adsorbé croît en réflectivité, ce qui indique une augmentation d'épaisseur. Les **Figures 87c** à **87f** montrent quant à elle l'aplatissement progressif du liposome, qui est concomitant à une augmentation de la réflectivité aux pieds du liposome. Enfin, la comparaison entre les courbes rouges et bleues de la **Figure 87f** montre que la réflectivité a

augmenté sur toute la surface étudiée, un schéma reproduit par ailleurs lorsque l'on compare l'évolution du niveau moyen de réflectivité sur la **Figure 84**. Le dépôt de matière sur toute la surface ne peut ici que correspondre à un dépôt de lipides, sous la forme de bicouches ou de structures vésiculaires plus ou moins déformées. L'évolution du niveau global de la surface, représentée sur la **Figure 88**, montre bien ce dépôt de matière sur toute la surface : entre les figures **88a** et **88c**, on observe une diminution du niveau des pics rouges, qui correspond aux liposomes fixés et qui est corrélée à l'augmentation du niveau des zones sans liposomes. Sur les **Figure 88d** et **88e**, un gros pic rouge apparaît au milieu de la zone étudiée, signe de l'adsorption d'un nouveau liposome. La **Figure 88f** montre ensuite son étalement, illustré par une diminution de la réflectivité.



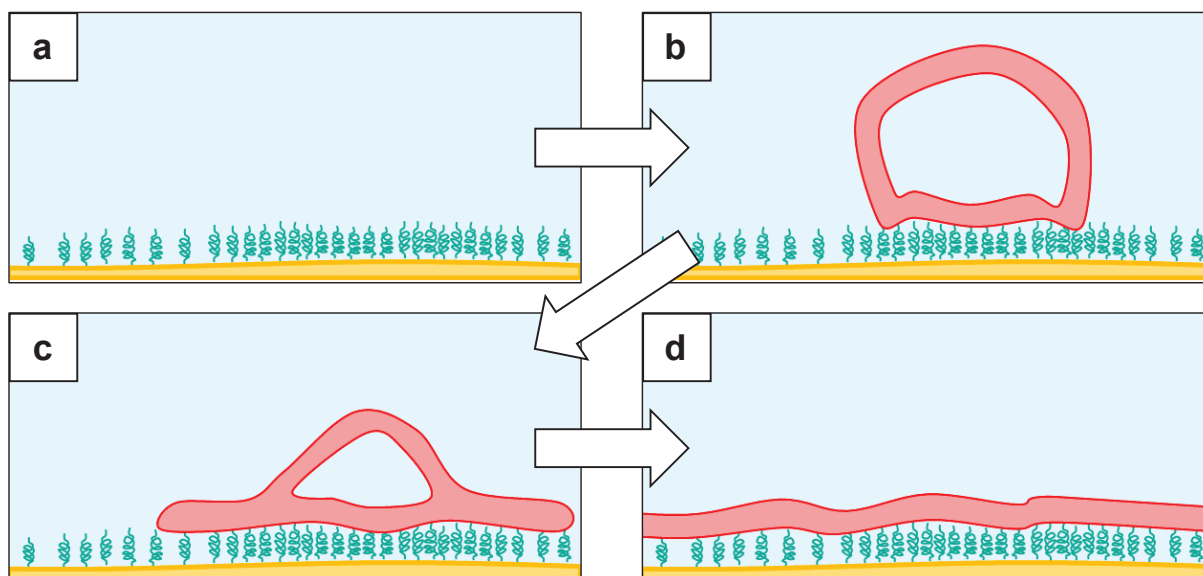
**Figure 88.** Evolution du niveau de réflectivité de la surface lors de la phase d'ancrage des liposomes LN sur des peptides pilotis pour une zone de  $2,7 \mu\text{m} \times 3,3 \mu\text{m}$  représentée **Figure 89**. Les images ont été colorées par la LUT « phase », qui colorie les intensités basses en bleu, les intensités moyennes en blanc et les intensités élevées en rouge.



**Figure 89.** Zone de  $2,7\ \mu\text{m} \times 3,3\ \mu\text{m}$  ayant servi à réaliser la **Figure 88**, représentée par le rectangle jaune. Les images ont été colorées par la LUT « phase », qui colorie les intensités basses en bleu, les intensités moyennes en blanc et les intensités élevées en rouge.

L'affaissement progressif des pics, représentant des liposomes adsorbés, suggère que le dépôt de matière se fait par adsorption de liposomes puis étalement de ces derniers, selon le mécanisme schématisé **Figure 90**.





**Figure 90.** Représentation schématique du mécanisme de dépôt de matière lors de la phase d'accrochage des liposomes LN sur des peptides pilotis.

- a. Surface initiale recouverte de peptide pilotis.
- b. Adsorption du liposome.
- c. Aplatissement progressif du liposome.
- d. Formation d'une bicouche.

Il est à ce point très difficile de caractériser précisément l'état structural de la surface à la fin de la phase d'adsorption des liposomes LN. Il apparaît que la surface toute entière est recouverte de matière lipidique, mais la distribution de cette dernière est très inégale, entre des zones de bicouches à peu près plates et de gros amas de matière correspondant à des liposomes adsorbés, avec vraisemblablement le maintien de nombreuses structures intermédiaires.

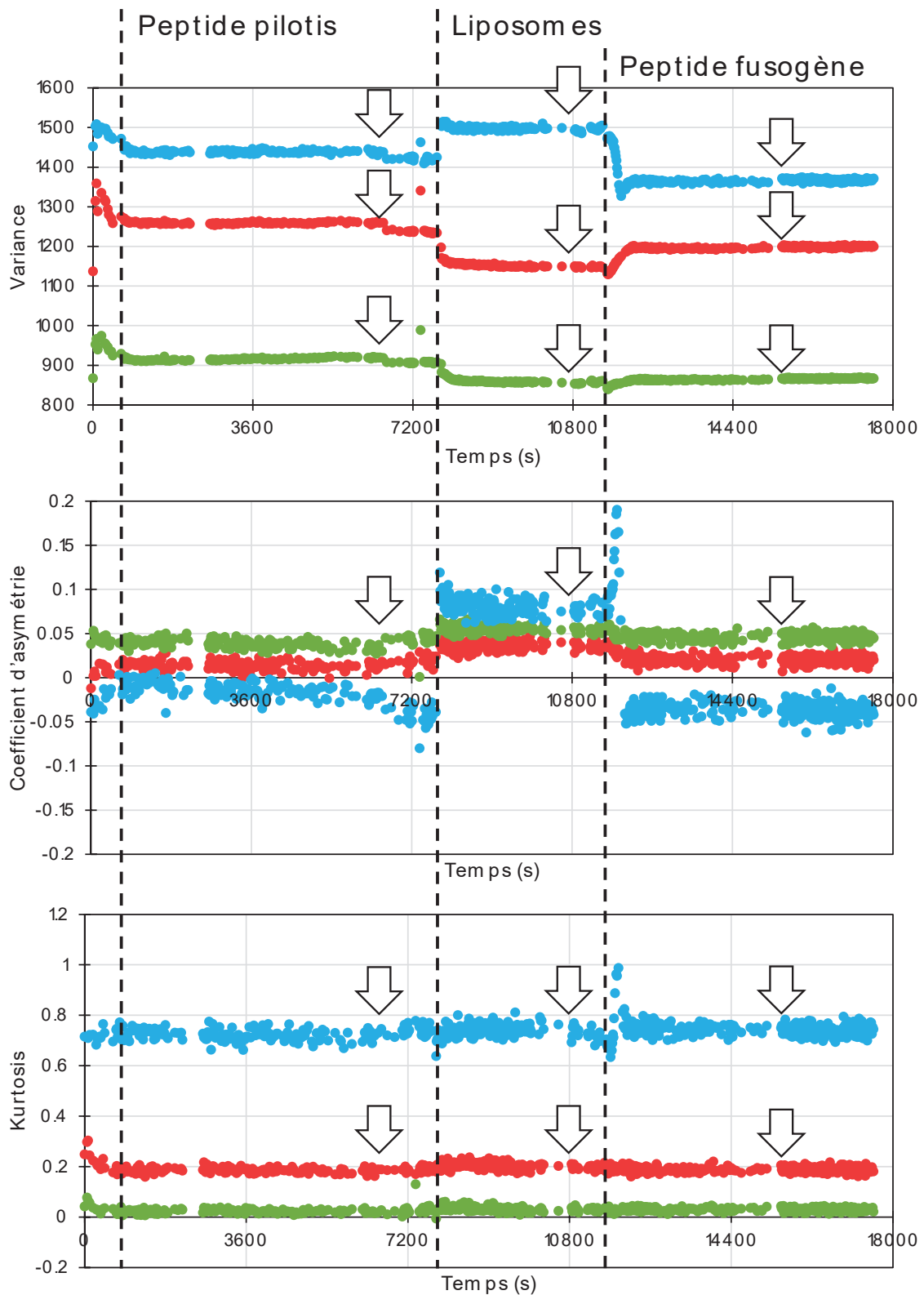
### 2.3. Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre ont été présentées les différentes approches étudiées pour caractériser plus en détail l'interaction liposome-membrane. Ces approches se sont appuyées sur des systèmes biomimétiques, ces derniers permettant l'analyse *in situ* de la membrane par des méthodes physicochimiques puissantes. Dans une première partie, nous avons présenté les travaux réalisés sur la caractérisation d'un système biomimétique particulier, précédemment développé au laboratoire au cours de deux thèses [311,312]. Ce système modèle repose sur la formation de pep-

tBLM en trois étapes, consistant à la fixation d'un peptide pilotis, l'accrochage de liposomes sur ce peptide et la fusion des liposomes sous l'action d'un peptide fusogène. Des résultats intéressants ont été obtenus lors de la caractérisation par QCM-D et par BALM, ces derniers travaux ayant permis la rédaction d'une publication soumise dans *Biophysical Journal*. La BALM est une méthode de microscopie récemment introduite dans le champ de l'électrochimie et de la chimie de surface. Cette méthode, très sensible, à haute résolution et en temps réel, avait ainsi déjà pu permettre d'imager des structures nanométriques comme des feuillets de graphène [350,351]. Dans le cadre de cette thèse, la BALM a été appliquée au domaine de la physicochimie membranaire, par le biais de la caractérisation de pep-tBLM. Le suivi en BALM de la formation des pep-tBLM a montré un signal comparable à celui de la SPRi, la méthode de référence sur le système utilisé, ce qui montre l'adéquation de la BALM à un suivi de processus physicochimiques. Cependant, la caractérisation par la BALM ne se limite pas seulement à un suivi global de la surface, mais permet également d'obtenir des informations locales renseignant sur l'homogénéité de la surface étudiée et permettant la mise en évidence de flux dynamiques de matière. La comparaison des signaux BALM, SPRi et QCM-D a permis de valider, par des techniques et des méthodes d'analyse différentes, les différentes informations mécanistiques obtenues, notamment en ce qui concerne l'agrégation du peptide pilotis. Une différence a néanmoins été observée quant au signal de dissipation observé sur notre système par rapport aux données de la littérature scientifique. Cette différence a été attribuée à la présence dans notre système d'une couche de peptides pilotis, qui pourrait soit jouer un rôle d'amortisseur, soit modifier la conformation des liposomes accrochés, mais ces hypothèses restent à confirmer.

Les propriétés de la BALM permettent de la démarquer des techniques usuellement utilisées pour caractériser des membranes biomimétiques. Ces dernières peuvent être en temps réel (SPR et QCM-D par exemple) et permettent alors de suivre la formation de la membrane. Cependant, ces méthodes traitent toute la surface comme homogène, ce qui limite leur utilité sur des systèmes hétérogènes. D'autres méthodes à haute résolution (AFM et FRAP par exemple) permettent de sonder l'homogénéité de la membrane, mais elles sont limitées par leur temps de mesure qui empêche leur utilisation sur des modèles dynamiques.

Ici, la BALM combine ces deux aspects grâce à l'analyse de la réflectivité moyenne de la surface qui reproduit le signal SPR d'une part, et les images haute résolution qu'elle fournit, qui permettent de mettre en évidence des événements locaux d'autre part. Combinant les deux, la BALM apporte une solution pour la visualisation de flux de matière, locaux et dynamiques, qui permettent d'obtenir des informations inédites en temps réel. Cependant, la BALM en est encore au stade expérimental de mise au point ; le système utilisé n'est pas encore optimisé pour une utilisation en routine. Les deux principales optimisations à réaliser concernent le système de mise au point et le traitement des images. Lors des différentes expériences en BALM, nous avons été limités par une dérive de la mise au point de l'image. Une mise au point automatique avec assujettissement sur une zone invariable de l'image permettrait de contourner cette limitation. Avoir une mise au point stable permettrait notamment des analyses fines de la dispersion par le biais de la variance, du coefficient d'asymétrie et du degré de voussure (ou kurtosis). Ces différents paramètres, qui représentent respectivement les différents moments d'ordres 2, 3 et 4, permettent de mesurer la dispersion d'une valeur et reflètent l'hétérogénéité de l'échantillon, ici en matière de distribution de l'épaisseur. La mesure de ces paramètres est similaire à la mesure de la réflectivité moyenne, cette dernière correspondant au moment d'ordre 1, ce qui permet d'envisager un suivi au cours de la cinétique illustré **Figure 91**.



**Figure 91.** Evolution de la variance, du coefficient d'asymétrie et du Kurtosis (degré de voussure) le long de la cinétique de formation d'une pep-tBLM à partir de liposomes POPC. Chaque courbe représente le canal de la couleur correspondante. Les étapes de rinçage sont représentées par des flèches blanches.

Cependant, tout comme pour la mesure de la réflectivité moyenne, l'évolution de ces paramètres ne peut actuellement pas être suivie en direct, et doit se faire sur les images après traitement. De ce point de vue, le développement d'un logiciel adapté, qui extrairait des images obtenues les informations recherchées, permettrait de faciliter le suivi de l'expérimentation en cours. De plus, le système actuel d'acquisition des images n'est pas du tout automatisé et nécessite la présence d'un expérimentateur pour prendre les images, ce qui limite l'obtention de cinétiques sans ellipses. Les protocoles d'analyse des images de BALM ne sont également pas encore tous définis, ce qui a notamment limité l'exploitation des images réalisée et présentée dans la publication soumise à *Biophysical Journal*. Ainsi, ces différentes pistes n'ont pas pu être explorées plus en avant, faute de temps. Parmi les approches envisagées, figure l'analyse précédemment mentionnée de la dispersion des réflectivités par le biais de la variance, du coefficient d'asymétrie et du degré de voussure. Nous avons également envisagé la mesure de constantes cinétiques d'adsorption/désorption, avec une analyse différentielle entre les zones riches et les zones pauvres en peptide pilotis. L'ensemble constitue une piste prometteuse pour continuer le développement de la BALM à des applications biologiques. Enfin, nous pouvons mentionner que la BALM, de par son caractère ultra-résolutif, est parfaitement adaptée à l'étude d'éléments isolés. Dans un tel contexte, suivre l'adsorption puis la fusion de liposomes dilués permettrait de confirmer les mécanismes proposés.

Des travaux précédents ont montré que l'analyse par BALM pouvait permettre la mesure précise de l'épaisseur de la couche adsorbée [352]. Cependant, cette mesure n'est que relative et nécessite des points de repères clairement définis. Elle est de plus perturbée par les changements d'indice, ces derniers modifiant les paramètres utilisés pour la mesure, en l'occurrence les  $R_{\min}$ . La mesure précise de l'épaisseur de la couche finale est de plus délicate du fait de la nature de la bicouche formée (celle-ci comportant des poches vésiculaires rendant le tout hétérogène) et de la conformation du peptide pilotis. Une modélisation du peptide basée sur sa séquence d'acides aminés suggère la formation d'une hélice alpha, permettant l'espacement de ses deux extrémités [312]. Néanmoins, rien n'indique que cette conformation soit conservée pendant toute la formation des pep-tBLM ; il se peut

tout à fait que le peptide pilotis agisse comme un ressort, et soit capable de se replier et de se détendre à façon, dans une amplitude de quelques nanomètres.

Dans la seconde partie de ce chapitre, nous avons présenté les travaux de formation d'un système biomimétique à partir de lipides naturels. Cette partie répond à la problématique du caractère biomimétique, et avait pour but la reconstitution d'un modèle membranaire aussi proche que possible de la membrane des cellules prostatiques étudiées dans le premier chapitre de « **Résultats et discussion** ». L'objectif recherché était la mise en place d'un système permettant de comparer la caractérisation de l'interaction liposome-membrane réalisée sur les cellules en culture avec celle réalisée sur le système biomimétique. L'approche privilégiée a consisté à isoler la membrane plasmique de cellules par fractionnement cellulaire, à extraire les lipides de cette fraction isolée et à les utiliser pour recréer une bicouche lipidique biomimétique naturelle par la méthode de formation de pep-tBLM développée au laboratoire. La formation de liposomes composés de lipides naturels (Liposomes LN) a pu être menée à bien à partir de cellules PC-3, la lignée modèle d'une métastase très agressive de cancer de la prostate. En revanche, lors du suivi par SPRi de la formation de la pep-tBLM à partir des liposomes LN, il est apparu que les liposomes, une fois fixés, ne fusionnaient pas sous l'effet du peptide fusogène. Ce résultat a été confirmé par l'étude de la réflectivité globale par BALM. En revanche, l'étude en BALM des images obtenues lors de la phase d'accrochage des liposomes sur les peptides pilotis a permis de mettre en évidence que les mécanismes mis en œuvre avec les liposomes LN étaient différents de ceux impliqués avec les autres compositions liposomales testées. Le mécanisme dépeint pour les lipides naturels est celui d'une adsorption de liposomes qui s'étalent spontanément en formant directement une structure lipidique sur toute la surface (sans apport de peptide fusogène).

Ce premier résultat est très encourageant puisqu'il constitue, si la présence d'une bicouche est confirmée, le premier modèle membranaire constitué de lipides naturels. Cependant, il est encore nécessaire de s'assurer d'une part de la présence de la bicouche, mais également de sa continuité et de son homogénéité, les images de BALM montrant la présence d'éléments semi-vésiculaires encore volumineux. Des études complémentaires, en FRAP ou AFM, permettrait d'élucider plus en

détail la structure formée, en renseignant notamment sur la continuité de la bicouche. En parallèle, répéter la procédure avec des lipides extraits d'autres types cellulaires permettrait l'établissement d'une gamme de modèles membranaires pour l'étude de l'interaction liposome-membrane. Enfin, une analyse lipidomique précise des lipides présents permettrait de s'assurer de la qualité des modèles, en termes de respect de la composition lipidique biologique.

Toutes ces expérimentations avaient pour but de tester l'interaction liposome-membrane sur des modèles biomimétiques. Les travaux réalisés, bien qu'intéressants et prometteurs, n'ont pas pu aller jusqu'à la caractérisation de cette interaction. Cependant, les différents outils, notamment la BALM, mis en place durant cette thèse forment un point de départ solide pour cette caractérisation. L'un des avantages de la BALM consiste en sa grande flexibilité. En effet, en plus de l'acquisition de signal « traditionnelle » précédemment décrite, la BALM peut s'adapter à des techniques complémentaires telles que la fluorescence ou l'électrochimie. Cela permet d'envisager un dispositif expérimental où, une fois la pep-tBLM formée, l'ajout de liposomes et leur devenir pourraient être suivis soit par électrochimie, soit par fluorescence. Dans le premier cas, le suivi électrochimique est rendu possible par l'utilisation de liposomes complexés à des systèmes redox. Dans le second, le suivi de liposomes marqués par des lipides fluorescents permettrait de suivre le devenir de ces lipides. Les différences d'interaction présentées dans le premier chapitre de « **Résultats et discussion** » ont pointé le rôle clé de la composition lipidique des liposomes sur l'interaction avec la membrane plasmique de cellules en culture. Le mécanisme de fusion membranaire observé renforce l'idée que la fraction lipidique est impliquée dans la sélectivité des interactions entre membranes ; la fusion de la membrane des liposomes avec la membrane plasmique des cellules ne reposant vraisemblablement pas sur l'implication de systèmes protéiques.

Il est à noter que, comme précisé dans la discussion traitant des enjeux du caractère biomimétique des modèles en « **Résultats et discussion** » (2.2.1., page 232), la complexité du modèle utilisé est avant tout dictée par l'objet d'étude. Dans notre cas, nous nous sommes tout particulièrement intéressés à la membrane plasmique, cette dernière étant l'élément clé de l'interaction liposome-cellule.

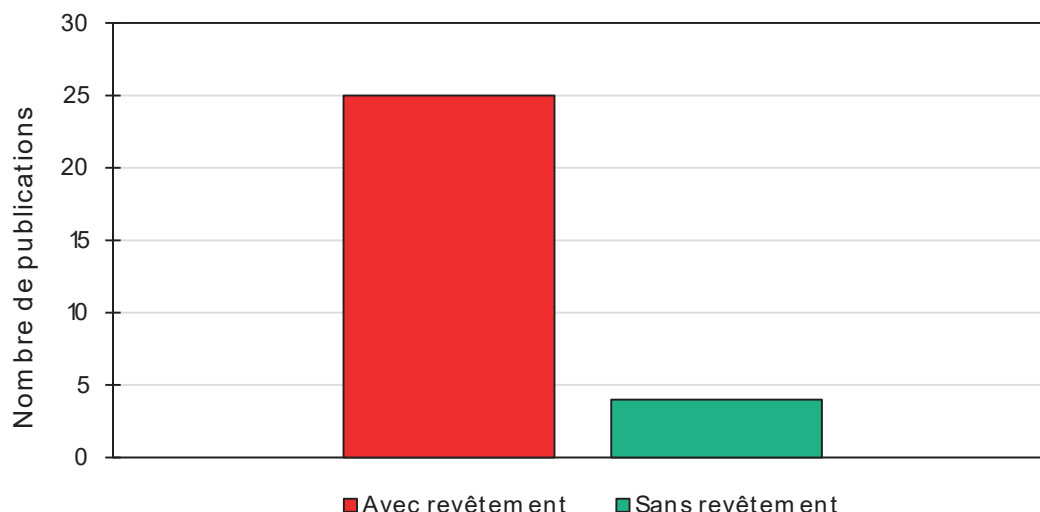
Nous nous sommes de plus principalement intéressés à la fraction lipidique de la membrane, du fait de son importance prépondérante dans le processus de fusion et les nombreux réarrangements membranaires impliqués. Ainsi, les modèles de membrane que nous avons cherchés à développer dans le cadre de cette thèse n'ont comme but que la reproduction de la composition lipidique des cellules utilisées, au détriment de la fraction protéique et glucidique des membranes. En un sens, la présence d'un ancrage à la surface des tBLM par le biais des peptides pilotis peut également être apparenté à l'ancrage de la membrane plasmique au cytosquelette dans des cellules, ces deux éléments agissant comme des forces restreignant la mobilité des molécules de la membrane, ce qui réduit la fluidité membranaire. Il est également important de préciser que, bien que les lipides utilisés proviennent de l'extraction de lipides de la membrane plasmique de cellules en culture, les modèles utilisés ne reproduisent la composition lipidique réelle qu'avec deux approximations. La première concerne le DOGS-NTA(Ni), rajouté à hauteur de 2 % (rapport molaire) pour permettre l'accrochage des liposomes formés sur les peptides pilotis ; bien que la proportion de DOGS-NTA(Ni) soit faible, ce lipide n'est pas naturellement présent et pourrait influencer le comportement de la membrane. La seconde porte sur l'asymétrie membranaire. Comme présenté dans la partie « **Etude bibliographique** » (1.1.2.4., page 28), les membranes cellulaires présentent une différence de compositions lipidiques entre les deux feuillets d'une même membrane, une asymétrie qui a une implication fonctionnelle importante et dont le maintien est assuré par des enzymes spécialisées. Ici, cette asymétrie n'est pas reproduite, ce qui peut participer à une différence de mécanisme entre les modèles biomimétiques et les modèles cellulaires. Cependant, malgré ces approximations, les modèles de membranes reconstitués à partir de lipides naturels représentent une plateforme idéale pour évaluer l'implication de la fraction lipidique de la membrane plasmique dans l'interaction liposome-cellule, et plus largement, l'interaction entre deux membranes.



## CONCLUSION GÉNÉRALE

Lors de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux interactions membranaires, dans le cadre du traitement chimiothérapeutique du cancer. Plus particulièrement, au travers du prisme de la fluidité, nous avons montré qu'il existait une relation étroite entre les propriétés des membranes cellulaires et celles de vecteurs lipidiques, qui leur permettent d'interagir *via* un mécanisme de fusion membranaire. Les résultats mettent en exergue le rôle fonctionnel de la composition en lipides des liposomes dans l'interaction avec les cellules, les liposomes ayant une membrane fluide ciblant préférentiellement les cellules ayant une membrane fluide elles-aussi, et inversement. Que l'interaction liposome-membrane se déroule selon un processus de fusion membranaire renforce le rôle des lipides dans la spécificité du ciblage observé, le processus de fusion membranaire reposant essentiellement sur un réarrangement local de la fraction lipidique de la membrane plasmique.

Les stratégies actuelles de vectorisation liposomale ciblée assurent leur spécificité par le biais d'un couplage avec un élément, le plus souvent un ligand ou un fragment protéique, capable de reconnaître la cible cellulaire. Ces stratégies sont, dans la très grande majorité des cas, dépendantes d'un enrobage des liposomes par un polymère hydrophile, comme des chaînes de PEG. Ce polymère permet d'assurer à la fois la stabilité des liposomes dans la circulation sanguine en limitant leur opsonisation, et le découplage entre la bicouche lipidique et les molécules greffées, ce qui permet d'améliorer leur reconnaissance pour leur cellule cible. Cependant, la présence d'une couche de polymère hydrophile à la surface des liposomes présente des inconvénients pour la vectorisation. L'inconvénient majeur consiste en la diminution de l'internalisation des liposomes par fusion membranaire, au profit de l'endocytose. La prédominance des stratégies de ces revêtements hydrophiles dans les stratégies actuellement développées est illustrée dans le **Figure 92**.



**Figure 92.** Etude de la présence de revêtements hydrophiles dans les formulations liposomales récemment développées. Les publications ont été sélectionnées dans la revue « *New developments in Liposomal Drug Delivery* » de Bhushan *et al.* dans *Chem Rev* (2015) [353]. La liste des publications utilisées est disponible dans le **Tableau 6** en « **Annexe** » (2., page 280).

Dans un tel contexte, l'utilisation de la fluidité membranaire des liposomes pour assurer la spécificité de leur ciblage nécessite de se passer des revêtements hydrophiles si prisés. Il est à noter que la stabilité dans la circulation sanguine de tels liposomes doit toujours être assurée, même en absence de revêtements hydrophiles. Cependant, des solutions alternatives existent, comme nous l'avions précédemment décrit en « **Etude Bibliographique** » (3.3.2., page 74). La stratégie de ciblage spécifique développée dans le cadre de cette thèse s'est limitée à des études *in vitro*, et ne s'est pas intéressée à la vectorisation dans un modèle animal ou humain.

Dans un organisme complet, les différents types cellulaires présentent une composition lipidique différente, et donc, une fluidité membranaire différente. Dans l'optique d'un traitement systémique, il convient alors de quantifier la fluidité membranaire du type cellulaire ciblé par rapport aux autres cellules de l'organisme. Dans le cas contraire, un ciblage non spécifique pourrait être obtenu. Si on prend, par exemple, le cas du traitement d'un cancer pulmonaire, une différence de fluidité entre cellules tumorales et cellules saines ne pourra être utilisée comme

paramètre de ciblage que si aucun autre type cellulaire sain ne présente de fluidité membranaire similaire à celle des cellules tumorales pulmonaires.

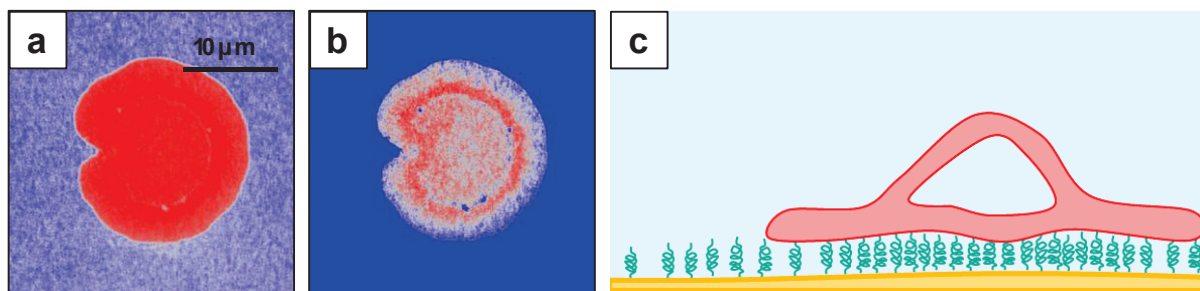
Par la suite, deux principales directions se dégagent pour le développement de la stratégie élaborée : la prise en charge des liposomes par des systèmes les adressant préférentiellement au site tumoral, ou bien, la modification des liposomes par un facteur de ciblage supplémentaire. Dans le premier cas, les liposomes pourraient être eux-mêmes encapsulés dans des microcapsules fonctionnalisées, ce qui permettrait leur libération directement au niveau du site tumoral, la fluidité membranaire permettant ensuite de limiter l'interaction des liposomes avec les cellules saines. Le besoin en spécificité des liposomes est également considérablement réduit dans le cas de solutions de vectorisation locale plutôt que systémique, la libération sur une zone restreinte réduisant le nombre de types cellulaires potentiellement exposés au traitement. La deuxième solution propose de combiner deux approches différentes de ciblage pour en assurer la spécificité. Dans ce cas, la difficulté vient du fait que l'ajout d'un deuxième élément de ciblage spécifique ne doit pas gêner le processus de fusion membranaire, sous peine de limiter l'implication de la fluidité membranaire dans la délivrance spécifique du principe actif à la cellule tumorale.

Dans la seconde partie de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de membranes biomimétiques, dans le but d'étudier le détail de l'interaction liposome-membrane par des méthodes biophysiques. A partir d'un système en trois étapes précédemment développé au laboratoire, nous avons réalisé la caractérisation de pep-tBLM par QCM-D et BALM, une méthode de microscopie optique ultraperformante récemment introduite. Les résultats obtenus ont permis de mettre en exergue de nouveaux mécanismes et de mieux comprendre la formation de ce type de tBLM. Dans ce contexte, la BALM a fait la preuve de son efficacité et de son intérêt pour l'étude de processus biologiques complexes grâce à sa haute résolution et sa mesure en temps réel.

La BALM est un système possédant deux principaux modes d'analyse : la mesure moyenne d'un paramètre sur toute la surface dans une configuration proche de la SPR ou de la QCM-D, et une analyse locale des images obtenues. Dans le premier

cas, la BALM a une sensibilité similaire à la SPR, ce qui fait d'elle un candidat intéressant pour des mesures en routine ordinairement effectuées par SPR. Cependant, la BALM se démarque par son deuxième mode d'analyse, qui permet de détecter des éléments très petits puisqu'il est alors possible de modifier à volonté l'étendue de la surface étudiée. Ainsi, la BALM se présente comme une solution pour la détection d'éléments/événements rares allant jusqu'à la détection d'éléments uniques, un domaine en pleine expansion [354]. Cependant, pour que cette détection soit aussi précise que possible, il est nécessaire de limiter au maximum les phénomènes non spécifiques, ces derniers étant de plus en plus importants lorsque l'on réduit le nombre d'objets étudiés. Dans un tel contexte, la BALM se présente comme une solution optimale pour des analyses de biopuces au format réduit.

En ce qui concerne l'étude de membranes biomimétiques, la sensibilité de la mesure en BALM permet de s'affranchir de nombreuses contraintes quant à la qualité globale des membranes formées. En effet, puisque la zone étudiée peut être librement définie, la formation de bicouches avec des défauts ou de bicouches partiellement fusionnées n'influe plus sur la qualité du modèle étudié. Ce phénomène est néanmoins assujéti à conditions, comme notamment la capacité de la BALM à reconnaître ces défauts pour pouvoir les éviter. Des analyses préliminaires sur la détection par la BALM de l'adsorption de GUV sur une surface (**Figure 93**) ont montré que ces derniers s'étaient partiellement, en formant une couronne de bicouche plate.



**Figure 93.** Visualisation en BALM de l'adsorption de GUV sur une surface recouverte de peptide pilotis. Les images ont été colorées de la LUT « phase », qui colorie les intensités basses en bleu, les intensités moyennes en blanc et les intensités élevées en rouge.

- a. GUV adsorbée à la surface (vue au microscope par-dessus).
- b. Image **a** avec ajustement du contraste pour mettre en exergue les différents niveaux de réflectivité présents dans la GUV (vue au microscope par-dessus).
- c. Représentation schématique d'une GUV adsorbée (vue de profil).

Enfin, nous avons cherché à développer un système de membrane biomimétique constitué de lipides naturels, obtenus après fractionnement de cellules, isolement de la membrane plasmique et extraction des lipides. Ce système, testé en SPRI et en BALM, a révélé un mécanisme de formation de tBLM différent de celui précédemment décrit. Ici, les liposomes s'aplatiraient lors de leur adsorption, selon un mécanisme proche de celui décrit plus tôt pour l'adsorption de GUV. La nature de la structure formée à la fin du processus est cependant très difficile à déterminer en s'appuyant uniquement sur la BALM. Il apparaît néanmoins que la structure finale s'apparente à une bicouche lipidique relativement continue, bien que contenant de nombreuses poches vésiculaires partiellement fusionnées.

L'ensemble de ces travaux représente un pas en avant vers une meilleure compréhension de l'implication des propriétés membranaires dans les applications de vectorisation de médicaments. Le modèle sur lequel repose la stratégie développée s'appuie à la fois sur les résultats obtenus lors de cette thèse (et en amont) et sur toute la littérature scientifique. Il est conforté par plusieurs études récentes ayant montré des tendances similaires à celles observées. En ça, l'utilisation de la stratégie développée pour la conception de nouveaux vecteurs lipidiques permettrait à terme l'amélioration de traitements chimiothérapeutiques, en réduisant les nombreux effets indésirables de ces

derniers. De plus, nous avons réalisé la première application concrète de la BALM à l'analyse de processus biologiques complexes, en montrant ses nombreux avantages par rapport aux méthodes actuellement utilisées en routine pour ce genre d'études. Enfin, les résultats préliminaires obtenus pour la formation de bicouches lipidiques biomimétiques « naturelles » constituent un point de départ solide pour un futur développement de tels modèles, qui permettraient d'approfondir encore plus notre compréhension des mécanismes impliquant les membranes cellulaires.

# ANNEXES

## 1. Synthèse du Dioll et application au dosage de lipides

### 1.1. Synthèse du Dioll et marquage cellulaire

Au cours de cette thèse, j'ai pu prendre part à des travaux concernant le développement d'une sonde fluorescente permettant d'évaluer la fluidité membranaire, le Dioll, et son implication au marquage de cellules. Cette sonde, initialement développée lors de la thèse de Mouhedine CHENIOUR, a été conçue comme un dérivé du Laurdan, une sonde commercialement disponible [355]. Le Laurdan a été introduit dans les années 90 comme une sonde fluorescente sensible à la fluidité membranaire. Cependant, il est limité par sa forte hydrophobicité, qui limite considérablement son utilisation dans un contexte biologique au regard de l'hydrophilicité des échantillons étudiés. Le Dioll a ainsi été conçu comme un dérivé plus hydrophile du Laurdan, en substituant un groupement méthyl par un propanediol. Ce projet, auquel j'ai pris part, a fait l'objet d'une publication en cours de rédaction. Cette publication est intitulée « *Introducing Dioll, an excellent fluorescent probe to sense fluidity variations in cell membranes and faithfully render membrane organelle state by confocal microscopy. Astonishing opportunities for cell imaging* », et représente le travail de S. Ibanez\*, M. Cheniour\*, D. Gueyrard, L. Socrier, J. Zouaoui, M. Nitenberg, J. Bompard, T. Guillot, L. Ben Trad, A. Girard-Egrot, P. Goekjian, O. Marcillat, O. Maniti, A. Vigneron, T. Granjon (\* : co-premiers auteurs). Dans cet article, nous présentons la synthèse chimique du Dioll, les étapes de caractérisation de sa sensibilité à la fluidité membranaire ainsi que les marquages cellulaires montrant la fluidité des différentes organelles. Mon implication dans ce projet a principalement concerné la préparation et la caractérisation des liposomes.

## 1.2. Application du Dioll au dosage de lipides en phase aqueuse

### 1.2.1. Principe du dosage et résumé de la publication

Le marquage des membranes en fonction de leur fluidité membranaire n'est pas la seule propriété du Dioll, qui peut également servir lors du dosage de lipides. En effet, les travaux réalisés par Meriem CHADLI au cours de sa thèse ont permis de mettre en évidence que le Dioll, en plus de sa sensibilité à la fluidité membranaire, permettait également le dosage de membranes lipidiques. Concrètement, ce protocole de dosage repose sur l'exploitation des rendements quantiques du Dioll à des longueurs d'ondes d'émission de 440 nm (état rigide) et de 490 nm (état fluide). Ces deux rendements étant très proches, cela signifie que la quantité totale de photons émis par le Dioll ne varie que très peu en fonction de la longueur d'onde d'émission, et donc de l'état de fluidité de la membrane où est inséré le Dioll. Ainsi, à concentration constante de Dioll, la quantité totale de photons de fluorescence émis ne va dépendre que de la quantité de membrane présente.

Ce travail a permis la rédaction d'une publication, actuellement en cours de soumission. Dans celle-ci, nous comparons les résultats que nous avons obtenus avec ceux d'une méthode de référence pour le dosage de phospholipides (le dosage de Stewart). Là où le dosage des lipides par le Dioll est réalisé sur des vésicules en suspension aqueuse par simple ajout de Dioll dans le milieu réactionnel, ce qui est idéal pour le dosage de lipides d'échantillons biologiques, le dosage de Stewart nécessite une extraction préalable des lipides, ici réalisée par la méthode de Bligh & Dyer.

La comparaison de la quantité de lipides dosés par les deux techniques (dosage par le Dioll et dosage de Stewart) sur des compositions de fluidités membranaires variées a permis de montrer que le dosage de lipides par le Dioll n'est pas sensible à la fluidité membranaire tel qu'il est conçu, c'est-à-dire en se basant sur l'aire sous la courbe des spectres d'émission. Les deux méthodes ont donné des concentrations lipidiques identiques pour des compositions variées, comportant ou non du cholestérol ou des lipides chargés, montrant ainsi une excellente corrélation entre ces deux techniques. Enfin, le dosage de lipides d'échantillons biologiques tels que des exosomes et des Vésicules Géantes de la Membrane



Plasmique ou GPMV par le Dioll a aussi montré une excellente corrélation avec la méthode de référence.

L'ensemble de ces résultats montre le potentiel du Dioll, non seulement comme agent de marquage de cellules pour le suivi de la fluidité membranaire, mais également comme moyen de doser, facilement et rapidement, les lipides d'un échantillon biologique.

### 1.2.2. Publication

#### **Fluorescence-based method to quantify membrane amount in artificial and natural lipid and proteolipid vesicles**

Meriem Chadli<sup>1‡</sup>, Samira Samba-Mossiamasson<sup>1‡</sup>, Julien Bompard<sup>1</sup>, Larissa Socier<sup>1†</sup>, Sebastien Ibanez<sup>1</sup>, Thomas Guillot<sup>1</sup>, Leyre Brizuela-Madrid<sup>1</sup>, Arnaud Vigneron<sup>2</sup>, David Gueyrard<sup>1</sup>, Thierry Granjon<sup>1</sup>, Agnès Girard-Egrot<sup>1</sup> and Ofelia Maniti<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, ICBMS UMR 5246, Univ Lyon, Université Lyon 1, CNRS, Lyon, France

<sup>2</sup>Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Cancer Research Center of Lyon, Equipe Labellisée Ligue contre le Cancer, Lyon, France; LabEx DEVweCAN, Université de Lyon, Lyon, France.

<sup>†</sup> present address Max Planck Society, Institute for Dynamics and Self-Organization, Am Faßberg 17, 37077 Göttingen, Germany

and Georg-August-Universität Göttingen, Institute of Organic and Biomolecular Chemistry, Tammannstraße 2, 37077 Göttingen, Germany

\*to whom correspondence should be addressed [ofelia.maniti@univ-lyon1.fr](mailto:ofelia.maniti@univ-lyon1.fr)

<sup>‡</sup> these authors contributed equally

**ABSTRACT:** Quantification methods of membrane content in various samples are scarce and require lipid extraction in organic solvents, energetic conditions or costly instruments. Here, we present an easy-to-use method of lipid membrane quantification in artificial and natural vesicles based on the fluorescence of an in-house synthesized Laurdan-derivative, Dioll. This fluorophore has a very low fluorescence in aqueous buffers, but when it spontaneously inserts into lipid bilayers its fluorescence increases with a hyperbolic dependency on the membrane amount in the sample. Thus, a plain solution

of POPC liposomes of known concentrations served as standard curve to determine lipid membrane concentration in samples of diverse compositions and regardless of membrane order or charge. The method was successfully used to quantify membrane content in proteoliposome samples, exosomes and giant plasma membrane vesicles.

## INTRODUCTION

Membranes as selective barriers between the inner and the outer compartments regulate a plethora of phenomena related to signalling, molecule entry into cells, metabolite exchange or membrane trafficking. Therefore, investigations in the field of membranes are exponentially increasing to-day. The complexity of biological membranes, as major components of the living cell, and their numerous interactions with intra- and extracellular networks, make their direct investigation difficult. Therefore, biomimetic models have been developed. Liposomes 1–4, various supported or tethered bilayers 5–9, monolayers 10–12, bicelles 13,14 or nanodiscs 15, to name only some, are largely used systems to mimic plasma and organelle membranes.

Among such models, liposomes are widely used to probe protein-lipid interactions, lipid organization and molecule penetration across membranes. They are also versatile assemblies in drug delivery systems, as they are non-toxic, biodegradable, and large scale production is possible 4,16–19. They are also extensively used for the reconstitution of transmembrane proteins, to form proteoliposomes, the lipid bilayer offering a native-like medium for membrane-spanning domains 20. For all these applications, liposomes undergo various fabrication processes:

extrusion, centrifugation, protein reconstitution, cell-free protein synthesis, molecule grafting, etc 2,21–24. It is therefore of interest to determine lipid concentrations after various processes and in different production batches.

To estimate liposome concentration, several methods are popular. Among them, colorimetric methods such as Bartlett 25 and Rouser 26 methods are based on the reaction between the inorganic phosphate obtained after liposome treatment with perchloric acid and ammonium molybdate to obtain phosphomolybdate. The addition of a reducing agent such as 1-amino-2-naphthol-4 sulfonic acid (Bartlett method) and ascorbic acid (Rouser method) leads to formation of a violet complex absorbing at 820-830 nm. Both methods are rather sensitive (LOD and LOQ around 5 and 20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , respectively). Alternatively, the Stewart method 27, probably the most widely used method for phospholipid determination, is based on the formation of a complex between the phosphate group of the lipid polar head and ammonium ferrothiocyanate, absorbing at 485 nm. It is rather fast and easy to implement, but requires lipid extraction in organic solvent and the use of chloroform-resistant recipes and protection. LOD and LOQ are evaluated at 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  and 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , respectively.

Chromatographic methods of lipid separation, together with mass spectroscopy 28–30 or NMR 31,32 are also used for lipid detection and quantification, as one can obtain not only the lipid amount, but also the lipid class distribution. Yet, they are time consuming, rather expensive and not readily used in routine experiments. Among non-destructive methods we can cite the report from Elmer-Dixon and Bowler, 2017, which proposes an interesting quantification of cardiolipin-containing liposomes based on absorbance measurements and Mie diffusion using MatLab algorithms 33.

Given the number of studies dwelling on liposomes, proteoliposomes and on cell-derived vesicles, we propose a simple method to estimate the amount of membranes in aqueous solutions. This method is based on the fluorescence of an in-house synthesized Laurdan-derived fluorophore, Dioll (Patent pending EPO19306175.1, 1-(6-((2,3-dihydroxypropyl)(methyl)amino)naphthalen-2-yl)dodecan-1-one). This fluorophore, as its more illustrious analogue, Laurdan 34–36, is a membrane probe sensitive to the viscosity of its environment, used for the study of membrane fluidity and organization<sup>37</sup>. Both Dioll and Laurdan have a very low fluorescence emission intensity in aqueous buffers, but the fluorescence intensity increases drastically when the fluorophore is inserted into a lipid bilayer. In this report, we analyzed the evolution of the fluorescence emission of Dioll with respect to the amount of membranes in the sample and found that it followed a hyperbolic function. Fitting the experimental results to a

hyperbola permitted us to quantify membrane amount in various preparations.

The Dioll-based quantification method was found to be robust with respect to membrane fluidity, presence of charges, or cholesterol content, and was used to determine membrane content in proteoliposomes and in two types of natural vesicles, exosomes and giant plasma membrane vesicles (GPMV).

## EXPERIMENTAL SECTION

### Materials

Lipids were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, Al). Dioll was produced as described elsewhere (patent pending EPO19306175.1). HEPES, PBS, NaCl, ferric chloride hexahydrate ( $\text{FeCl}_3(\text{H}_2\text{O})_6$ ) and ammonium thiocyanate ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ ) were purchased from Sigma Aldrich (St Quentin Falavier, France). Ultrapure water was obtained with a PureLabOption Q7 system (Véolia Water STI, Decines, France).

### Liposome preparation

Liposomes were prepared using a classical freeze/thaw protocol. Briefly, the appropriate lipid mixture solubilized in chloroform was dried under vacuum, then solubilized with 1 ml buffer under strong agitation. Assays were done either in HEPES 20 mM pH 7.4 buffer 100 mM NaCl or in PBS. The liposome emulsion obtained was submitted to 6 freeze/thaw cycles (5 min in liquid nitrogen/10 min in water bath at 37°C, 1 minute strong agitation) to decrease the number of

bilayers and obtain unilamellar vesicles. To obtain homogenous vesicles, the liposome solution was extruded successively through a 400 nm and 100 nm polycarbonate membrane using an extruder (Avanti Polar Lipids). Liposomes were routinely prepared at lipid concentrations between 1 and 10 mg.ml<sup>-1</sup> and subsequently diluted at the desired concentration.

### **Dioll fluorescence-based liposome quantification**

A POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phospho-choline) liposome solution of known concentration (100 µg.ml<sup>-1</sup>) was used as standard. Increasing volumes of the standard solution were diluted with buffer in a 96 well plate (Nunc). The final volume per well was 200 µl and lipid concentrations between 0 and 80 µg.ml<sup>-1</sup> were used. Samples were prepared in parallel to a final volume of 200 µl per well.

A constant volume of Dioll solution in ethanol (5 µl) was added in each well to obtain a final Dioll concentration of 2 µM. The volume of ethanol added represented 2.5 % of the final volume and had no effect on liposome integrity. The plate was incubated at room temperature for 10 min. Fluorescence emission spectra were recorded between 420 nm and 600 nm for an excitation wavelength of 390 nm with a TECAN InfiniteM200 plate reader. Spectra were recorded at 21°C.

The surface under the spectrum was calculated for each condition using an Excel complementary function, IntegralP ([www.fordom.free.fr](http://www.fordom.free.fr)), which allows calculating the integral of a function when

discrete data sets are available. Maximum fluorescence intensity or surface under the curve were plotted as a function of the lipid concentration to obtain the standard curve. They both showed a hyperbolic variation and the equation of the standard curve was obtained using a hyperbolic fit  $y=ax/(x+b)$  (SigmaPlot). The calculation of the *a* and *b* coefficients allowed us to determine unknown concentrations in the samples. As various volumes were used for the assays, the concentration of the stock liposome solution was presented taking into account various dilution factors. Measurements were performed in triplicate.

For the estimation of the limit of detection (LOD) and of quantification (LOQ), the fluorescence spectra of 2 µM Dioll in aqueous buffer were recorded in the absence of liposomes and the surface under the curve was calculated to estimate the blank value on 5 independent measurements. LOD and LOQ were calculated as 3 times or 10 times the standard deviation of the blank, respectively.

Sensitivity was estimated from the slope of the linear fit for low liposome concentrations. As the fluorescence intensity is dependent on the instrument used, in this study we estimated that an increase of 100 A.U. in the fluorescence intensity obtained with TECAN InfiniteM200 was significant.

To conclude upon the repeatability of the method, the coefficient of variation (CV) was calculated as the percentage of the standard deviation on the

mean of 5 independent measurements. Accuracy was deduced from the difference between the concentrations obtained with the Dioll-based method and a standard method of phospholipid quantification, in our case the Stewart method 27.

### **Lipid quantification with Stewart Method**

Lipids were extracted from the various samples with chloroform. In brief, aqueous samples were mixed with chloroform (10 times the volume of the sample) under vigorous shaking. The samples were then centrifuged at 300 x g for 10 min to accelerate phase separation (Multifuge 3 LR, Heraeus). The chloroform (bottom) phase was recovered with a glass pipette.

A POPC standard solution was prepared at 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  in chloroform. Increasing volumes of the standard solution were diluted with chloroform in glass centrifuge tubes to a final volume of 2 ml. Samples extracted in chloroform were prepared in parallel and diluted to 2 ml. 2 ml of Ferrothiocyanate solution (obtained by mixing 20.7 g of Ferric chloride hexahydrate and 30.4 g of ammonium thiocyanate in 1L of ultrapure water) was added to each tube. The solutions were vigorously mixed and then, centrifuged at 300 x g for 10 min (Multifuge 3 LR, Heraeus). The chloroform phase was recovered and the absorbance was measured at 485 nm in glass cuvettes with a Jasco V-730 spectrophotometer. For quantification, absorbance at 485 nm was plotted against the phospholipid concentration.

Proteoliposomes were a kind gift from Syntheliss (Grenoble, France) and were prepared according to previously published protocols 38.

Exosomes were obtained by series of differential centrifugations adapted from 39. In brief, 120 ml of HMEC culture medium were collected after two days culture, and centrifuged at 2 000 x g at 4°C during 10 min (Multifuge 3LR Heraeus™). Supernatants were collected and ultracentrifuged at 20 000 x g, 4°C during 30 min (Optima LE-80 Beckman™ with a fixed rotor angle 50.2 Ti Beckman™). A second ultracentrifugation was realized at 100 000 x g, 4 °C during 2 h. Pellets were resuspended with 1 mL of PBS buffer, pooled in the same tube and ultracentrifuged at 100 000 x g, 4 °C during 1 h. Finally, the pellet was resuspended in 200  $\mu\text{L}$  of PBS buffer to obtain concentrated exosomes.

Giant Plasma Membrane Vesicles (GPMV) were prepared according to previously described protocol 40, but adapted to PC-3 cell culture. In brief, PC-3 were cultured in RPMI-1640 10% FBS 100 U/mL penicillin and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin under a humidified atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$  at 37°C at 80 % cell confluence in 25  $\text{cm}^2$  plastic flasks. Growth medium was removed and cell were incubated for 1h with 25 mM formaldehyde 2 mM DTT in PBS buffer at room temperature under shaking. The supernatant containing GPMVs was recovered and the presence of GPMVs was checked with an optical microscope. For Dioll-based measurements, 200  $\mu\text{l}$  of the GPMV preparation was incubated with 5  $\mu\text{l}$  Dioll ethanol solution (2  $\mu\text{M}$  final concentration) and fluorescence spectra were recorded as described above. The lipid concentration was determined against a standard

curved obtained with POPC liposomes of known concentration.

## RESULTS

To probe the dependency of Dioll fluorescence upon liposome amount, increasing concentrations of POPC liposomes were incubated with a constant concentration of 2  $\mu\text{M}$  Dioll. Fluorescence spectra were recorded and plotted in Figure 1A. Fluorescence intensity increased progressively with lipid amount, but seemed to reach saturation at concentrations over 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . The fluorescence intensity emission maximum was obtained at 490 nm, which corresponded to lipid membranes in liquid disordered state, as expected for POPC liposomes at 21°C ( $T_m -4^\circ\text{C}$ ). Fluorescence intensity at 490 nm as a function of the lipid concentration in the well (Figure 1B) showed a hyperbolic evolution. Yet, for polarity-sensitive probes, like Dioll, the position of the maximum fluorescence emission largely depends on the order state of the lipid membrane. This characteristic, which makes them valuable for determining the order state of the membrane, is an inconvenient when sample fluidity does not match that of the standard solution. Therefore, to overcome this inconvenient, the fluorescence intensity parameter was replaced by the surface under the peak, which does not depend on the fluidity state of the membrane 34,35. The surface under the peak was estimated by integrating the spectra obtained between 420 and 560 nm. When plotted as a function of the liposome concentration, the surface under the peak also nicely fitted a hyperbolic function (Figure 1C). Therefore, the

hyperbolic dependency between the surface under the experimental fluorescence emission spectra and the liposome concentration in the well can be used as a calibration curve to measure liposome concentration in various samples.

The limit of detection (LOD), the lowest concentration that can be detected but not quantified, and the limit of quantification (LOQ), the lowest concentration that can be quantified with a reasonable degree of confidence, of the calibration curve were determined from the standard deviation of the blank solution (2  $\mu\text{M}$  Dioll in buffer) (Figure 1D). The LOD, which corresponded to the lipid concentration obtained at 3 times the standard deviation of the blank, was equal to 0.4  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , whereas the LOQ, which corresponded to 10 times the standard deviation of the blank, was equal to a lipid concentration of 1.2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . These limits are rather low and make this method interesting for measuring low lipid concentrations, when small or diluted sample volumes are available.

The sensitivity of the detection method is defined as the dependency between the instrumental response and the variation in the concentration of the compound of interest. It is instrument-dependent. In our conditions, the slope of the linear part equaled to 105 A.U. per concentration unit ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). That means that, considering that the sensitivity limit of TECAN InfiniteM200 used in this study was 100 A.U., one can detect variations in liposome concentration of the sample as low as 1  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

The repeatability of the method, which represents the determination of how close values are to each other under identical experimental conditions, was assessed by determination of the concentration of a POPC liposome solution prepared independently of the standard solution. A concentration of  $914 \pm 56 \mu\text{g ml}^{-1}$  was obtained with 3 replicates, which gave a repeatability of 6 %. To assess the accuracy of the new quantification method, the same POPC liposome solution was measured using the largely used Stewart method. A difference of 1.2 % was obtained between mean values obtained with the two methods. Results were therefore consistent and opened the possibility to routinely use the Dioll as a probe to measure membrane amount in various samples, without lipid extraction and in a rather short time (less than 30 min).

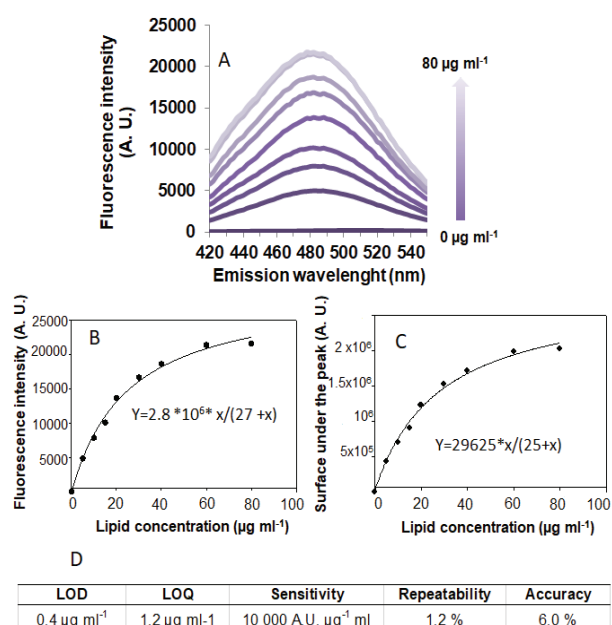


Figure 1. Quantification of POPC liposomes with Dioll : A. Fluorescence emission spectra of Dioll inserted in the lipid bilayer ( $\lambda_{\text{ex}}$  390 nm) - 2  $\mu\text{M}$

Dioll was added to increasing liposome concentrations. B. Maximum fluorescence intensity (490 nm) as function of the lipid concentration – experimental data was fitted to a hyperbolic function. C. Surface under the peak as a function of the lipid concentration a hyperbolic fit of the data. Data sets are representative of at least 3 independent measurements. D. Validation of the detection method: LOD, LOQ and sensitivity were determined as described in material and methods section. Repeatability was determined with a POPC liposome preparation different of the standard on 5 independent measurements. Accuracy was determined with respect to phospholipid quantification by Stewart method.

Robustness of the Dioll method was checked with respect to various parameters. One major point of interest was whether the membrane fluidity, which largely influences Dioll fluorescence, had an impact on the Dioll-based quantification method. To this purpose, liposomes constituted of DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) and DPPC (1,2-dipalmitoyl-glycero-3-phosphocholine) were prepared (Table 1).

Liposome preparation	Lipid	Acyl chain composition	Schematic structure	T <sub>m</sub>
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine	16:0-18:1 PC		-4°C
DMPC	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	14:0 PC		24°C
DPPC	1,2-dipalmitoyl-glycero-3-phosphocholine	16:0 PC		41°C

Table 1: Liposome preparations used and corresponding gel-to-liquid crystalline phase transition temperatures ( $T_m$ ).

In our experimental conditions ( $21^\circ\text{C}$ ), DMPC (with a gel-to-liquid crystalline transition temperature ( $T_m$ ) of  $24^\circ\text{C}$ ) is expected to be in an ordered state, but close to the liquid ordered-liquid disordered transition, and DPPC ( $T_m$  of  $41^\circ\text{C}$ ) in an ordered configuration. Independently, a standard liposome solution was prepared for each type of liposomes to obtain the corresponding calibration curves. DMPC-inserted Dioll fluorescence spectra (Figure 2A) showed a maximum fluorescence emission at 440 nm consistent with lipid membranes in an ordered state, with a contribution at 490 nm corresponding to the fluid phase.

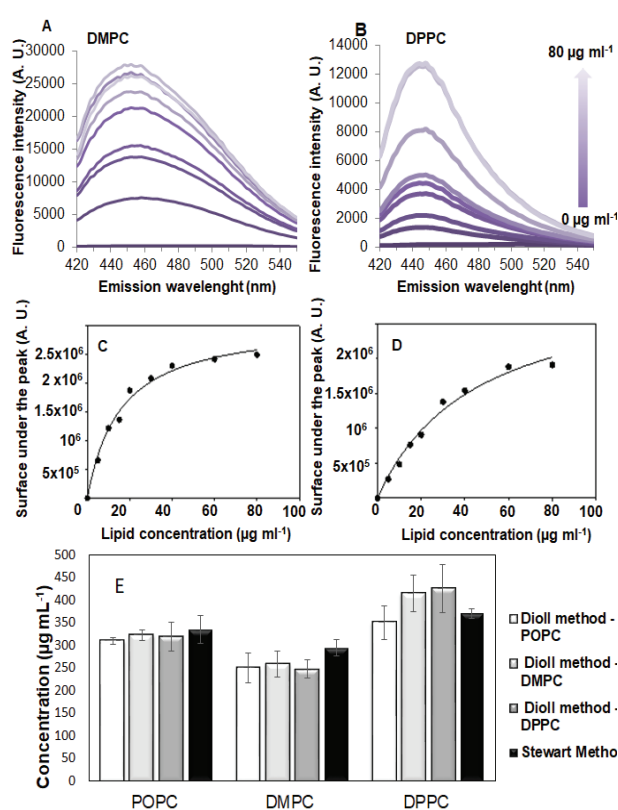


Figure 2. Robustness of Dioll quantification method upon variations of lipid bilayer fluidity: Fluorescence emission spectra of Dioll ( $2 \mu\text{M}$ ) inserted in DMPC (A) or DPPC (B) liposomes ( $\lambda_{\text{ex}} 390 \text{ nm}$ )- Dioll was added to increasing liposome concentrations. Surface under the peak calculated from spectra from figure A and B as a function of DMPC (C) or DPPC (D) liposome concentration. E. Cross calculations of concentrations of POPC, DMPC or DPPC test solutions using POPC (white bars), DMPC (light grey), DMPC (grey) standard solutions or by Stewart method (black bars). Error bars represent standard deviation obtained with 3 independent measurements.

Although it is difficult to calculate the proportion of each state, the fluorescence emission spectra indicated that, in our experimental conditions, DMPC liposomes make a good model of membranes in which two phases coexist. When inserted in DPPC liposomes, Dioll maximum fluorescence emission was obtained at 440 nm, which is consistent with a membrane in gel/ordered state (Figure 2B). For both DMPC and DPPC liposomes, the surface under the peak estimated as described above gave hyperbolic evolutions (Figure 2C and D). The equations obtained by fitting the experimental data to a hyperbola allowed us to estimate concentration of liposomes in various samples.

To check the influence of the membrane fluidity on the quantification method, POPC, DMPC and DPPC liposomes were prepared and their concentration was determined using either



POPC, DMPC or DPPC calibration curves, or by the Stewart method with POPC in chloroform solution as standard. Results are presented in figure 2E. The concentration of the POPC solution measured using either POPC, DMPC or DPPC calibration curves was consistent with that obtained by the Stewart method. Similar results were obtained for DMPC and DPPC liposomes quantified using Dioll-based calibration curves or by Stewart method. Therefore, the surface under the peak parameter as a function of the liposome concentration can successfully replace the fluorescence intensity to measure sample concentration, whatever the membrane fluidity state. This is particularly interesting as membrane fluidity in samples of interest is usually unknown. Cholesterol is one major component of membranes and also a major modulator of membrane order<sup>41</sup>. Depending on membranes, the proportion of cholesterol varies between 10 and 30 % of lipid total mass. Liposomes containing a mixture of POPC and cholesterol where prepared and, the concentration was measured using Dioll method and POPC liposomes of known concentration as standard curve. The concentration obtained for 10, 20 and 30 % cholesterol correlated with the concentration of phospholipids obtained using the Stewart method (Figure 3A), and was not influenced by the cholesterol content in the sample.

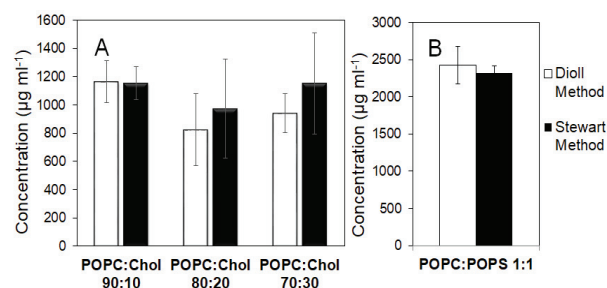


Figure 3. Cholesterol and charge effect on liposome quantification with Dioll: A. Quantification of POPC: cholesterol (10, 20 and 30 mass %) liposomes using POPC liposomes as standard (white bars). Phospholipid content was determined by Stewart method (black bars). B. Quantification of POPC : POPS (1:1 molar ratio) liposomes using POPC liposomes as standard (white bars) or by Stewart method (black bars). Error bars are SD obtained with 3 independent measurements.

Membranes contain non negligible amounts of negatively charged lipids with precise and fundamental functions. It is thus of interest to check the robustness of the Dioll-based quantification method towards negatively charged lipids. As an example, we have chosen to prepare liposomes containing 50 % POPC and 50 % POPS (1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphoserine). The concentration of the prepared liposome solution was estimated either by the Dioll-based method, with POPC liposomes of known concentration as standard curve, or by the Stewart method with POPC chloroform solution as standard (Figure 3B). The two methods gave consistent results.

Liposomes are an environment that preserves transmembrane protein structure and function. Therefore, they are largely used to produce various transmembrane proteins in a native-like environment by different strategies. Whatever the production strategy, it is important that, after various preparation and purification steps, one easily estimates the proteoliposome amount in the sample without additional extraction steps.

The transmembrane protein used as a model in this study was the C-X-C motif chemokine receptor 4 (CXCR4), a 7 transmembrane domains G protein-coupled receptors (GPCR). CXCR4 was obtained with a cell-free expression system allowing a one-step synthesis reaction of the protein with concomitant insertion in a lipid bilayer through the addition of liposomes to the reaction mix (Syntheliss). Liposome composition used was DOPC/DOPE/DMPA/chol 31:17:20:32 molar ratio and the functionality of CXCR4 was tested using T22, a synthetic antagonist specific to this receptor 38,42. To probe the use of the Dioll-based fluorescence quantification method for proteoliposomes, we quantified membrane amount in seven different protein production batches (Figure 4).

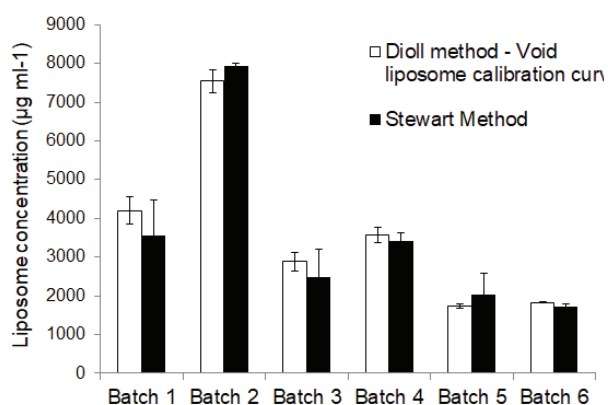


Figure 4 : Proteoliposome quantification with Dioll : six different proteoliposome preparations were quantified with Dioll method (with void liposomes as standard) (white bars) or Stewart method (black bars). Proteoliposomes were obtained according to previously described protocols. Error bars are SD obtained with 3 independent measurements.

Transmembrane protein are known to modify membrane fluidity towards a more disordered conformation. This was the case for CXCR4, which increased the 490 nm contribution on the Dioll fluorescence emission spectrum, which corresponds to a membrane in a more fluid state (not shown). As described above, the surface under the curve parameter allowed us to overcome the modifications in membrane fluidity and in the shape of the spectrum. Indeed, membrane amount in the sample obtained by Dioll method correlated well with phospholipid membrane amount obtained by Stewart method, after protein precipitation with acetone and lipid extraction with chloroform. Dioll-based quantification of membranes may be a fast and easy to use method of proteoliposome quantification.

To sum up, by using the surface under the curve parameter instead of the fluorescence emission intensity, the new fluorescence-based quantification method of membrane proved to be robust with respect to the order state of the membrane. By using a simple standard curve such as plain liposomes of increasing concentration and a constant fluorophore

concentration, one can determine membrane amount in samples of different compositions: DMPC, DPPC, cholesterol-containing liposomes, negatively charged liposomes or protein-containing liposomes.

The challenge was now to measure membrane amount in various natural vesicles, such as extracellular vesicles in general, and exosomes in particular. Studies on exosomes in various physiological and pathological conditions are exponentially growing in number.

Indeed, exosomes are small vesicles (50 to 150 nm) secreted by cells, specific of their origin cell and which can be extracted from numerous body fluids (blood, urine...). They are therefore of interest for studies of pathologies, but also for the development of non-invasive diagnostic tools, notably in oncology 43. Measuring exosome concentration rapidly, with small sample volumes, in a non-destructive manner is of growing interest. Therefore, we adapted the Dioll-based quantification method to this type of vesicles. A standard curve based on POPC liposomes of known concentration in the presence of a constant Dioll concentration (2  $\mu\text{M}$ ) was recorded as the surface under the curve vs. liposome concentration in the well, as described above. Exosome samples were incubated with the same Dioll concentration as the standard solution, and the surface under the curve was calculated. Vesicle concentration was obtained using a hyperbolic fit of the standard curve and a value of  $98 \pm 10 \mu\text{g.ml}^{-1}$  was calculated, which correlated with phospholipid determination

obtained using Stewart method ( $102 \pm 10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) (Figure 5).

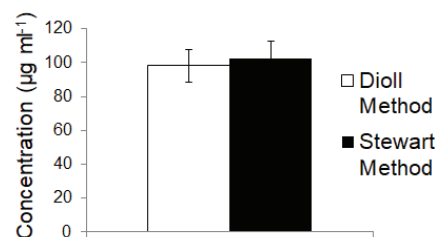


Figure 5: Quantification of exosomes using Dioll and POPC liposomes as standard (white bars) with Stewart method (black bars). Error bars are SD obtained with 3 independent measurements.

A second type of vesicles used in this study was obtained from living cells by plasma membrane budding. GPMVs are derived from biological cells, by chemically induced plasma membrane vesiculation (here with 25 mM formaldehyde, 2 mM DTT in PBS) or “blebbing”40.

This type of vesicles are largely used to analyze phase coexistence in systems with realistic biological membrane compositions 40,44,45 or peptide penetration across membranes 46,47. Given the raising interest in the study of plasma membrane heterogeneities, we determined the amount of membranes in the GPMVs samples. As expected from literature data 40,44, GPMVs obtained by this method show simple, low-curvature geometries of giant unilamellar vesicles and appear free of cytoskeletal constraints (Figure 6A). Using Dioll fluorescence, a lipid concentration of  $84 \pm 1 \mu\text{g.ml}^{-1}$  was obtained from an estimated PC-3 cell population of 5 million. Using the Stewart

method a good correlation was observed with an estimated phospholipid sample concentration of  $87 \pm 1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Figure 6B).

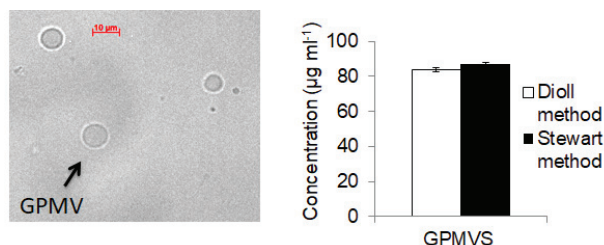


Figure 6: Quantification of GPMV: A. GPMV were obtained by incubation of PC-3 cells with a 2 mM DTT/ 25 mM formaldehyde solution and observed with an optical microscope. B. The GPMV preparation was quantified using Dioll and POPC liposomes as standard (white bars). Lipids were extracted with chloroform and quantified with Stewart Method (black bars). Error bars are SD obtained with 3 independent measurements.

## Discussion

Quantification methods of membrane content in various samples are scarce and require either lengthy protocols involving lipid extraction, costly instruments, or energetic conditions.

Here, we present a new, rapid and easy to use method of lipid membrane quantification in artificial and natural vesicles based on the fluorescence of a Laurdan derivative, Dioll 1-(6-((2,3-dihydroxypropyl)(methylamino) naphthalen-2-yl)dodecan-1-one). This fluorophore has a very low fluorescence in aqueous buffers, but when it spontaneously inserts into lipid bilayers its fluorescence drastically increases. We

checked therefore whether this was a regular increase by incubating a constant amount of fluorophore with increasing amounts of liposomes (Figure 1). A hyperbolic dependency existed, not only between the maximum fluorescence intensity, but also between the surface under the fluorescence emission spectra and the lipid amount in the sample. This parameter, does not depend on the membrane fluidity and may serve as a universal parameter to quantify membranes.

To check this hypothesis, 3 types of liposomes were prepared with lipids with different ordering degrees at room temperature (23°C): POPC (fluid state), DMPC (phase transition) and DPPC (gel state). The amount of liposomes was quantified using as standards either liposome solutions of the same nature, or liposome solutions of different fluidity. Quantification results (Figure 2) show that similar results were obtained whatever the composition of the standard solution. Moreover, the lipid concentrations in the samples correlated well with those obtained by Stewart method after lipid extraction in chloroform. Thus, a plain solution of POPC liposomes of known concentration may serve as standard curve for samples of diverse lipid composition and diverse membrane states.

Detection and quantification limits of the POPC standard curve attained values as low as 0.4 and  $1.2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , respectively, comparable with those of Bartlett and Stewart methods, which allows one to quantify low amounts of biological samples. Although a fluorophore is inserted into

the bilayer, this method is not destructive and liposomes, proteoliposomes or diverse vesicles may be used for further applications.

The sensitivity of the method was good up to 40  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Above this value, the intensity of fluorescence reaches a plateau and samples require dilution. The sensitivity of the method depends on the instrumental response to the variation in the analyte concentration, therefore it is instrument-dependent. In our conditions, by using an instrument such as TECAN InfiniteM200, we were able to detect variations in the liposome concentrations in the range of 1  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Robustness of the detection method was checked with respect to the presence of cholesterol (Figure 3A) and negatively charged lipids (Figure 3B). A good correlation was obtained with phospholipid quantification by Stewart method. Therefore, this method was used for quantification of more complex vesicles, such as proteoliposomes (Figure 4), and natural vesicles, such as exosomes (Figure 5) and GPMVs (Figure 6). If we consider the insertion mode of its analogue, Laurdan, Dioll is expected to fit between lipids at the level of the glycerol backbone 48. Therefore, the fluorescence intensity is dependent on the amount of phospholipid membranes. Cholesterol and other components, like proteins in proteoliposomes, or glycolipids in natural vesicles, largely influence membrane fluidity and, consequently, the shape of the spectrum, but did not influence fluorescence yield in terms of surface under the

curve. Therefore, systematic correlation was obtained between membrane content determined by Dioll and phospholipid concentration determined by Stewart method.

To conclude, Dioll fluorescence can be used as a parameter to measure the amount of phospholipid membranes in complex samples without solvent extraction and that, by using simple liposome compositions as standards. The detection method, based on fluorescence, is fast, simple to use, sensitive and requires standard lab equipment.

**Acknowledgments:** We acknowledge funding from CNRS (pre-maturation program) and the Technology Transfer Accelerator Office Lyon-Saint-Etienne *Pulsalys*. We thank Synthelis (Grenoble, Fr) for kind gift of proteoliposomes.

## References

- (1) Sezgin, E.; Schwille, P. Model Membrane Platforms to Study Protein-Membrane Interactions. *Mol. Membr. Biol.* **2012**, *29* (5), 144–154. <https://doi.org/10.3109/09687688.2012.700490>.
- (2) Shen, H.-H.; Lithgow, T.; Martin, L. Reconstitution of Membrane Proteins into Model Membranes: Seeking Better Ways to Retain Protein Activities. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (1), 1589–1607. <https://doi.org/10.3390/ijms14011589>.
- (3) Pick, H.; Alves, A. C.; Vogel, H. Single-Vesicle Assays Using Liposomes and Cell-Derived Vesicles: From Modeling Complex Membrane Processes to Synthetic Biology and Biomedical Applications. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (18), 8598–8654. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00777>.
- (4) Torchilin, V. P. Multifunctional, Stimuli-Sensitive Nanoparticulate Systems for Drug Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13* (11), 813–827. <https://doi.org/10.1038/nrd4333>.
- (5) Tamm, L. K.; McConnell, H. M. Supported Phospholipid Bilayers. *Biophys. J.* **1985**. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(85\)83882-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(85)83882-0).
- (6) Sackmann, E.; Tanaka, M. Supported Membranes on Soft Polymer Cushions: Fabrication, Characterization and Applications. *Trends Biotechnol.* **2000**, *18* (2), 58–64. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(99\)01412-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(99)01412-2).
- (7) Sackmann, E. Supported Membranes: Scientific and Practical Applications. *Science (80-. )*. **1996**, *271* (5245), 43–48. <https://doi.org/10.1126/science.271.5245.43>.
- (8) Richter, R. P.; Bérat, R.; Brisson, A. R. Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View. *Langmuir* **2006**, *22* (8), 3497–3505. <https://doi.org/10.1021/la052687c>.
- (9) Rebaud, S.; Maniti, O.; Girard-Egrot, A. P. Tethered Bilayer Lipid Membranes (TBLMs): Interest and Applications for Biological Membrane Investigations. *Biochimie* **2014**, *107* (Part A), 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.06.021>.
- (10) Elderdfi, M.; Sikorski, A. F. Langmuir-Monolayer Methodologies for Characterizing Protein-Lipid Interactions. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2018, pp 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.01.008>.
- (11) Daear, W.; Mahadeo, M.; Prenner, E. J. Applications of Brewster Angle Microscopy from Biological Materials to Biological Systems. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2017**, *1859* (10), 1749–1766. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.06.016>.
- (12) Brezesinski, G.; Möhwald, H. Langmuir Monolayers to Study Interactions at Model Membrane Surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2003**, *100–102* (SUPPL.), 563–584. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(02\)00071-4](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(02)00071-4).
- (13) Poulos, S.; Morgan, J. L. W.; Zimmer, J.; Faham, S. Bicelles Coming of Age: An Empirical Approach to Bicelle Crystallization. *Methods Enzymol.* **2015**, *557*, 393–416. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.12.024>.
- (14) Durr, U. H. N.; Gildenberg, M.; Ramamoorthy, A. The Magic of Bicelles Lights up Membrane Protein Structure. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (11), 6054–6074. <https://doi.org/10.1021/cr300061w>.
- (15) Borch, J.; Hamann, T. The Nanodisc: A Novel Tool for Membrane Protein Studies. *Biol. Chem.* **2009**, *390* (8), 805–814. <https://doi.org/10.1515/BC.2009.091>.

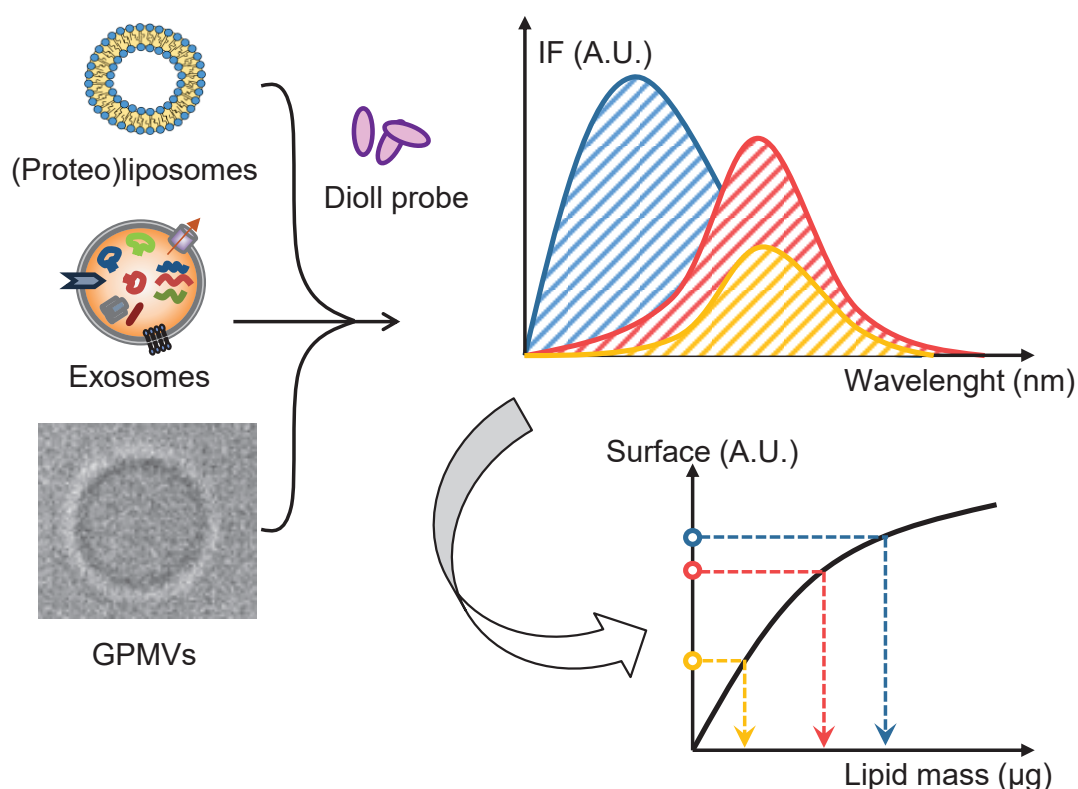
- (16) Allen, T. M.; Cullis, P. R. Liposomal Drug Delivery Systems: From Concept to Clinical Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65* (1), 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037>.
- (17) Samad, A.; Aqil, Y. S. and M. Liposomal Drug Delivery Systems: An Update Review. *Current Drug Delivery*. 2007, pp 297–305. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/156720107782151269>.
- (18) Ahmed, K. S.; Hussein, S. A.; Ali, A. H.; Korma, S. A.; Lipeng, Q.; Jinghua, C. Liposome: Composition, Characterisation, Preparation, and Recent Innovation in Clinical Applications. *J. Drug Target.* **2018**, 1–20. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1527337>.
- (19) Shah, S.; Dhawan, V.; Holm, R.; Nagarsenker, M. S.; Perrie, Y. Liposomes: Advancements and Innovation in the Manufacturing Process. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2020**. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.002>.
- (20) Kuhn, A.; Haase, M.; Leptihn, S. Assisted and Unassisted Protein Insertion into Liposomes. *Biophys. J.* **2017**, *113* (6), 1187–1193. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.03.027>.
- (21) Rigaud, J.-L.; Pitard, B.; Levy, D. Reconstitution of Membrane Proteins into Liposomes: Application to Energy-Transducing Membrane Proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1995**, *1231* (3), 223–246. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(95\)00091-V](https://doi.org/10.1016/0005-2728(95)00091-V).
- (22) Soranzo, T.; Martin, D. K.; Lenormand, J.-L.; Watkins, E. B. Coupling Neutron Reflectivity with Cell-Free Protein Synthesis to Probe Membrane Protein Structure in Supported Bilayers. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 3399. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03472-8>.
- (23) Mus-Veteau, I.; Demange, P.; Zito, F. Membrane Protein Production for Structural Analysis. In *Membrane Proteins Production for Structural Analysis*; 2014; pp 3–44. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0662-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0662-8_1).
- (24) Carlson, E. D.; Gan, R.; Hodgman, C. E.; Jewett, M. C. Cell-Free Protein Synthesis: Applications Come of Age. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30* (5), 1185–1194. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.016>.
- (25) Bartlett, R.; Clinic, S.; Jolla, L. Phosphorus Assay in Column. *J. Biol. Chem.* **1959**, *234* (3), 466–448.
- (26) G, R.; S, F.; A, Y. Two Dimensional Thin Layer Chromatographic Separation of Polar Lipids and Determination of Phospholipids by Phosphorus Analysis of Spots. *Lipids* **1970**, *5*, 494–496. <https://doi.org/10.4218/etrij.17.0116.0074>.
- (27) Stewart, J. C. M. Colorimetric Determination of Phospholipids with Ammonium Ferrothiocyanate. *Anal. Biochem.* **1980**, *104* (1), 10–14. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90269-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90269-9).
- (28) Brouwers, J. F. Liquid Chromatographic-Mass Spectrometric Analysis of Phospholipids. Chromatography, Ionization and Quantification. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **2011**, *1811* (11), 763–775. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.08.001>.
- (29) Ayciriex, S.; Regazzetti, A.; Gaudin, M.; Prost, E.; Dargère, D.; Massicot, F.; Auzeil, N.; Laprévotte, O. Development of a Novel Method for Quantification of Sterols and Oxysterols by UPLC-ESI-HRMS: Application to a Neuroinflammation Rat Model. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6396-6>.
- (30) Roces, C. B.; Kastner, E.; Stone, P.; Lowry, D.; Perrie, Y. Rapid Quantification and Validation of Lipid Concentrations within Liposomes. *Pharmaceutics* **2016**. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8030029>.

- (31) Han, Y.; Wen, Q.; Chen, Z.; Li, P. Review of Methods Used for Microalgal Lipid-Content Analysis. In *Energy Procedia*; 2011. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2011.10.124>.
- (32) Hein, R.; Uzundal, C. B.; Hennig, A. Simple and Rapid Quantification of Phospholipids for Supramolecular Membrane Transport Assays. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (7), 2182–2185. <https://doi.org/10.1039/c5ob02480c>.
- (33) Elmer-Dixon, M. M.; Bowler, B. E. Rapid Quantification of Cardiolipin and DOPC Lipid and Vesicle Concentration. *Anal. Biochem.* **2017**, *520*, 58–61. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.12.024>.
- (34) Parasassi, T.; Gratton, E. Membrane Lipid Domains and Dynamics as Detected by Laurdan Fluorescence. *J. Fluoresc.* **1995**, *5* (1), 59–69. <https://doi.org/10.1007/BF00718783>.
- (35) Parasassi, T.; Di Stefano, M.; Loiero, M.; Ravagnan, G.; Gratton, E. Influence of Cholesterol on Phospholipid Bilayers Phase Domains as Detected by Laurdan Fluorescence. *Biophys. J.* **1994**, *66* (1), 120–132. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(94\)80763-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80763-5).
- (36) Parasassi, T.; Conti, F.; Gratton, E. Time-Resolved Fluorescence Emission Spectra of Laurdan in Phospholipid Vesicles by Multifrequency Phase and Modulation Fluorometry. *Cell. Mol. Biol.* **1986**, *32* (1), 103–108.
- (37) Bompard, J.; Rosso, A.; Brizuela, L.; Mebarek, S.; Blum, L. J.; Trunfio-Sfarghiu, A.-M.; Lollo, G.; Granjon, T.; Girard-Egrot, A.; Maniti, O. Membrane Fluidity as a New Means to Selectively Target Cancer Cells with Fusogenic Lipid Carriers. *Langmuir* **2020**, *36* (19), 5134–5144. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00262>.
- (38) Chadli, M.; Rebaud, S.; Maniti, O.; Tillier, B.; Cortès, S.; Girard-Egrot, A. New Tethered Phospholipid Bilayers Integrating Functional G-Protein-Coupled Receptor Membrane Proteins. *Langmuir* **2017**, *33* (39), 10385–10401. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01636>.
- (39) Théry, C.; Amigorena, S.; Raposo, G.; Clayton, A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Curr. Protoc. cell Biol.* **2006**, *30* (1), 3.22.1-3.22.29. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>.
- (40) Baumgart, T.; Hammond, A. T.; Sengupta, P.; Hess, S. T.; Holowka, D. A.; Baird, B. A.; Webb, W. W. Large-Scale Fluid/Fluid Phase Separation of Proteins and Lipids in Giant Plasma Membrane Vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (9), 3165–3170. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611357104>.
- (41) Yeagle, P. L. Cholesterol and the Cell Membrane. *BBA - Reviews on Biomembranes*. 1985. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(85\)90011-5](https://doi.org/10.1016/0304-4157(85)90011-5).
- (42) Chadli, M.; Maniti, O.; Marquette, C.; Tillier, B.; Cortès, S.; Girard-Egrot, A. A New Functional Membrane Protein Microarray Based on Tethered Phospholipid Bilayers. *Analyst* **2018**, *143* (9), 2165–2173. <https://doi.org/10.1039/c8an00260f>.
- (43) Colombo, M.; Raposo, G.; Théry, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2014**. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>.
- (44) Baumgart, T.; Hess, S. T.; Webb, W. W. Imaging Coexisting Fluid Domains in Biomembrane Models Coupling Curvature and Line Tension. *Nature* **2003**, *425* (6960), 821–824. <https://doi.org/10.1038/nature02013>.



- (45) Lingwood, D.; Ries, J.; Schwille, P.; Simons, K. Plasma Membranes Are Poised for Activation of Raft Phase Coalescence at Physiological Temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (29), 10005–10010. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804374105>.
- (46) Maniti, O.; Piao, H. R.; Ayala-Sanmartin, J. Basic Cell Penetrating Peptides Induce Plasma Membrane Positive Curvature, Lipid Domain Separation and Protein Redistribution. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2014**, *50* (1), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.02.017>.
- (47) Maniti, O.; Blanchard, E.; Trugnan, G.; Lamazire, A.; Ayala-Sanmartin, J. Metabolic Energy-Independent Mechanism of Internalization for the Cell Penetrating Peptide Penetratin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2012**, *44* (6), 869–875. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.02.010>.
- (48) Jurkiewicz, P.; Cwiklik, L.; Jungwirth, P.; Hof, M. Lipid Hydration and Mobility: An Interplay between Fluorescence Solvent Relaxation Experiments and Molecular Dynamics Simulations. *Biochimie.* 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.06.027>.

Insert Table of Contents artwork here



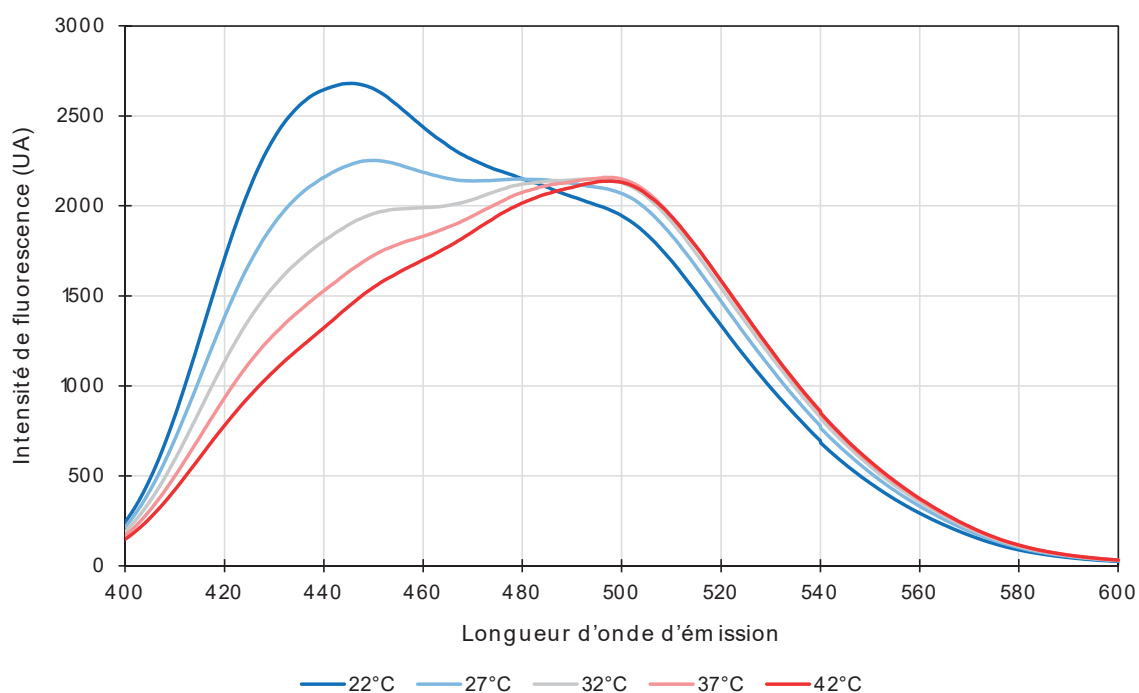
### 1.2.3. Perspectives

Les perspectives de ces travaux sont nombreuses. D'un côté, le dosage de lipides sur des échantillons biologiques en phase aqueuse représente une avancée très intéressante, les méthodes alternatives nécessitant un appareillage lourd et coûteux là où le dosage par le Dioll est relativement simple et rapide à réaliser. L'application du Dioll au marquage de cellules, pour mettre en évidence la fluidité des différentes membranes cellulaires, représente un premier pas vers l'utilisation du Dioll comme méthode de détection de cellules possédant une fluidité membranaire anormale. Des tests basés sur le Dioll pourraient ainsi avoir une implication clinique dans le diagnostic de pathologies comme le cancer, les pathologies cardiovasculaires ou encore les pathologies neurodégénératives.

D'un autre côté, le principe même du dosage des lipides par le Dioll reste encore mal compris. L'hypothèse initialement formulée est que la quantité de Dioll qui s'incorpore dans les membranes dépend de la « quantité de membrane disponible », qui se traduit alors grossièrement par la quantité de lipides présents. Cette hypothèse a été confirmée dans la publication sur des vésicules unilamellaires composées de phospholipides simples (PC et PS). Cependant, il est à noter que le dosage par le Dioll a été validé par comparaison avec le dosage par la méthode de Stewart. Or, cette dernière ne permet que le dosage des phospholipides uniquement. Dans le cas du dosage de lipides dans des compositions comportant à la fois des phospholipides et du cholestérol, le dosage par la méthode de Stewart ne va ainsi permettre que le dosage de la fraction phospholipidique, en ignorant complètement la fraction de stérols. Le dosage par le Dioll de ces compositions a donné des résultats similaires à ceux obtenus par le dosage de Stewart, ce qui signifie que le Dioll n'a pas non plus dosé le cholestérol.

Ce résultat montre que le dosage de lipides par le Dioll, bien que tout à fait fonctionnel par comparaison avec le test de Stewart, ne permet pas de doser tous les lipides. De plus, comme précisé précédemment, le Dioll est sensible à la fluidité membranaire. Pour s'affranchir de la dépendance de l'émission de fluorescence à la fluidité membranaire, le signal utilisé correspond ainsi à l'aire sous la courbe. Pour que cette dernière reflète correctement la quantité de membranes présentes, peu importe la fluidité membranaire, les rendements quantiques du Dioll à 440 nm et

490 nm doivent être identiques. Ici, bien que ces deux rendements soient proches, ils ne sont pas égaux, ce qui conduit à une légère distorsion du résultat final. Ce phénomène est tout particulièrement marqué lorsque l'on suit l'évolution des spectres d'émission du Dioll pour un même échantillon à différentes températures (**Figure 94**).



**Figure 94.** Evolution du spectre d'émission du Dioll inséré dans des vésicules de POPC en fonction de la température.

Alors que la quantité totale de lipides reste constante, l'aire sous la courbe chute lorsque la température augmente. Ce phénomène est dû au rendement quantique du Dioll à 440 nm, qui est supérieur au rendement à 490 nm.

Ainsi, dans l'optique de proposer une méthode universelle de dosage des lipides, il serait intéressant d'étudier deux paramètres :

- Les classes lipidiques réellement dosées par le Dioll, afin de déterminer les mécanismes précis qui régissent l'insertion du Dioll dans les membranes ;
- L'influence de la fluidité d'une membrane sur l'aire sous la courbe mesurée sur les spectres d'émission du Dioll, afin de pouvoir obtenir une mesure indépendante de la fluidité membranaire en corrigeant l'aire sous la courbe par un certain coefficient.

## 2. Liste des publications utilisées pour la Figure 92

Principe actif	Indication	Formulation liposomale et voie d'administration	Revêtement hydrophile ?	Références
Paclitaxel	Cancer	Liposomes hybrides encapsulant des nanoparticules d'or conjuguées à du paclitaxel ; IV	Oui	[356]
	Hypertension artérielle	Liposomes furtifs couplés à de l'octaarginine ; IV	Oui	[357]
Paclitaxel + Artéméther	Glioblastome	Liposomes multifonctionnels encapsulant du paclitaxel et de l'artéméther ; IV	Oui	[358]
Doxorubicine	Cancer	Liposomes conjugués à un aptamère ARN spécifique du cancer de la prostate ; IV	Oui	[359]
	Cancer métastatique	Liposomes PEGylés couplés à Lyp-1 ; SC	Oui	[360]
	Gliome	Liposomes PEGylés conjugués à un complexe Transférine-TATp ; IV	Oui	[361]
Vincristine	Cancer MDR	Liposomes PEGylés couplés à de l'acide folique ; IV	Oui	[362]
	Etude PK chez le chien	Liposomes PC/Cholestérol ; IV	Non	[363]
Docétaxel	Délivrance au SNC	Liposomes modifiés par des glucosides pour la pénétration de la barrière hématoencéphalique ; IV	Oui	[364]
Docétaxel + ARNsi anti-BCL-2	Cancer MDR	Liposomes PEGylés cationiques ; IV	Oui	[365]
Docétaxel + ARNsi anti-VEGF	Glioblastome	Liposomes couplés à un duo de peptides de ciblage ; IV + IT	Oui	[366]
Oligonucléotide anti-BCL-2	Cancer	Complexe hybride de copolymère anionique et de liposomes cationiques ; IT	Oui	[367]
ARNsi anti-EphA2	Cancer	Liposomes encapsulés dans des particules poreuse de silicone ; IV	Non	[368]
ARNsi anti-MGMT	Glioblastome	Complexe ARNsi-Liposomes cationiques ; IV	Non indiqué	[369]

<b>Principe actif</b>	<b>Indication</b>	<b>Formulation liposomale et voie d'administration</b>	<b>Revêtement hydrophile ?</b>	<b>Références</b>
Ovalbumine antigénique	Cancer	Liposomes conjugués à des polymères ; SC	Oui	[370]
Indole-3-carbinol	Cancer du poumon	Dispersion de liposomes ; Intranasal	Oui	[371]
di-GMP cyclique	Cancer	Liposomes polymériques fusogéniques ; SC	Oui	[372]
Ciprofloxacine	Tularémie	Liposomes ; IV / Aérosol	Revue	[373]
Primaquine	Paludisme	Liposomes couplés à de l'héparine ; IV	Oui	[374]
$\beta$ -méthasone hémisuccinate	Neuro-paludisme	Liposomes couplés à de l'hémisuccinate pour une pénétration de la barrière hématoencéphalique ; IV	Oui	[375]
Rifampicine + Isoniazide + Pyrazinamide	Tuberculose	Liposomes enrobés ; Poudre pour inhalation	Oui	[376]
Pyrazinamide + Lévofloxacine	Tuberculose	Proliposomes ; Poudre pour inhalation	Oui	[377]
Amikacine ou Prostglandine	Infections pulmonaires	Dispersion liposomale ; Aérosol	Non	[378,379]
Amphotéricine B	Aspergillose disséminée	Liposomes conjugués à de l'érythroïétine ; IV	Non indiqué	[380]
Lovastatine	Hypolipidémie	Proliposomes pour limiter l'élimination hépatique ; Orale	Non	[381]
Nimodipine	AVC	Proliposomes ; Orale	Oui	[382]
Insuline humaine recombinate	Diabète	Liposomes incorporant des sels biliaires ; Orale	Oui	[383]
Insuline	Diabète	Liposomes biotinylés ; Orale	Non indiqué	[384]
Calcitonine	Hypercalcémie Ostéoporose	Liposome enrobé ; Orale	Oui	[385]
Kétoprofène	Inflammation	Proliposomes ; Orale	Oui	[386]
Curcumine	Inflammation	Liposomes enrobés ; Transdermale	Oui	[387]

Principe actif	Indication	Formulation liposomale et voie d'administration	Revêtement hydrophile ?	Références
Diclofénac	Inflammation	Liposomes enrobés ; Dermale	Oui	[388]
Lidocaine	Douleur	Liposomes polymériques ; Transdermale	Oui	[389]
Psoralen	Psoriasis	Ethosomes ; Dermale / Transdermale	Non indiqué	[390]

**Tableau 6.** Liste des publications utilisées pour réaliser la **Figure 93**. Les publications concernées correspondent au tableau 4 « *Recently Conducted In Vivo Studies with Liposome-Based Drug Delivery* » de la publication de Bhushan *et al.* dans *Chem Rev* (2015) [353]. IV : Intraveineuse ; SC : Sous-cutané ; MDR : « *Multi-Drug Resistant* » ; PK : Pharmacocinétique ; IT : Intra-tumoral ;

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 Gorter, E. et Grendel, F. (1931) On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J Exp Med*, **41**, 439-443.
- 2 Danielli, J. et Davson, H. (1935) A contribution to the theory of permeability of thin films. *J Cell Comp Physiol*, **5**, 495-508.
- 3 Sjostrand, F.S., Andersson-Cedergren, E. et Dewey, M.M. (1958) The ultrastructure of the intercalated discs of frog, mouse and guinea pig cardiac muscle. *J Ultrastruct Res*, **1**, 271-287.
- 4 Robertson, J.D. (1959) The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. *Biochem Soc Symp*, **16**, 3-43.
- 5 Robertson, J.D. (1960) The molecular structure and contact relationships of cell membranes. *Prog Biophys Mol Biol*, **10**, 343-418.
- 6 Mukherjee, S. et Maxfield, F.R. (2004) Membrane domains. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **20**, 839-866.
- 7 Engelman, D.M. (2005) Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*, **438**, 578-580.
- 8 Nicolson, G.L. (2014) The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim Biophys Acta*, Elsevier B.V., **1838**, 1451-1466.
- 9 Escribá, P. V., Busquets, X., Inokuchi, J.I., Balogh, G., Török, Z., Horváth, I., Harwood, J.L. et Vígh, L. (2015) Membrane lipid therapy: Modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment. *Prog Lipid Res*, **59**, 38-53.
- 10 Dudek, J. (2017) Role of Cardiolipin in Mitochondrial Signaling Pathways. *Front Cell Dev Biol*, **5**, 90.
- 11 Vance, J.E., Pan, D., Vance, D.E. et Campenot, R.B. (1991) Biosynthesis of Membrane Lipids in Rat Axons. *J Cell Biol*, **115**, 1061-1068.
- 12 Block, M.A., Dorne, A., Joyard, J. et Douce, R. (1983) Preparation and Characterization of Membrane Fractions Enriched in Outer and Inner Envelope Membranes from Spinach Chloroplasts: nolamine or cardiolipin could be detected in either. *J Biol Chem*, **258**, 13281-13286.
- 13 Kobayashi, K. (2016) Role of membrane glycerolipids in photosynthesis,

- thylakoid biogenesis and chloroplast development. *J Plant Res*, Springer Japan, **129**, 565-580.
- 14 Schulz, G.E. (2000) beta-Barrel membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **10**, 443-447.
- 15 Alberts. (2011) Les Protéines Membranaires. Biologie moléculaire de la cellule - Cinquième édition, 630.
- 16 Roberts, W.L., Santikarn, S., ReinholdIII, V.N. et Rosenberrysii, T.L. (1988) Structural characterization of the glycoinositol phospholipid membrane anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase by fast atom bombardment mass spectrometry. *J Biol Chem*, **263**, 18776-18784.
- 17 Martin, D.D., Beauchamp, E. et Berthiaume, L.G. (2011) Post-translational myristoylation: Fat matters in cellular life and death. *Biochimie*, Elsevier Masson SAS, **93**, 18-31.
- 18 Maltese, W.A. (1990) Posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells. *FASEB J*, **4**, 3319-3328.
- 19 Nalefski, E.A. et Falke, J.J. (1996) The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci*, **5**, 2375-2390.
- 20 Curry, F.E. et Adamson, R.H. (2012) Endothelial glycocalyx: permeability barrier and mechanosensor. *Ann Biomed Eng*, **40**, 828-839.
- 21 Lee, K.B., Loganathan, D., Merchant, Z.M. et Linhardt, R.J. (1990) Carbohydrate analysis of glycoproteins. A review. *Appl Biochem Biotechnol*, **23**, 53-80.
- 22 Vaki, A., Cummings, R. et Esko, J. (1999) Proteoglycans and Glycosaminoglycans. Essentials of Glycobiology.
- 23 Pavlova, V., Paunova-Krasteva, T., Stoitsova, S. et Nikolova, E. (2015) Distribution patterns of carbohydrates in murine glycocalyx. *Biotechnol Biotechnol Equip*, Taylor & Francis, **29**, 357-362.
- 24 Rothman, J.E. et Lenard, J. (1977) Membrane asymmetry. *Science*, **195**, 743-753.
- 25 Devaux, P.F. et Morris, R. (2004) Transmembrane Asymmetry and Lateral Domains in Biological Membranes. *Traffic*, **5**, 241-246.
- 26 Bretcher, M.S. (1972) Asymmetrical Lipid Bilayer Structure for Biological Membranes. *Nat New Biol*, **236**, 11-12.
- 27 Fadeel, B. et Xue, D. (2010) The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **44**, 264-277.



- 28 Sharom, F.J. (2011) Flipping and Flopping — Lipids on the Move. *Life*, **63**, 736-746.
- 29 Sahu, S.K., Gummadi, S.N., Manoj, N. et Aradhyam, G.K. (2007) Phospholipid scramblases: An overview. *Arch Biochem Biophys*, **462**, 103-114.
- 30 Hankins, H.M., Baldrige, R.D., Xu, P. et Graham, T.R. (2016) Role of flippases, scramblases and transfer proteins in phosphatidylserine subcellular distribution. *Traffic*, **16**, 35-47.
- 31 Devaux, P.F., Herrmann, A., Ohlwein, N. et Kozlov, M.M. (2008) How lipid flippases can modulate membrane structure. *Biochim Biophys Acta*, **1778**, 1591-1600.
- 32 Evans, R.M., Wardt, D.C. et Fink, L.M. (1979) Asymmetric distribution of plasma membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**, 6235-6239.
- 33 Chen, J., Gao, J., Zhang, M., Cai, M., Xu, H., Jiang, J., Tian, Z. et Wang, H. (2016) Systemic localization of seven major types of carbohydrates on cell membranes by dSTORM imaging. *Sci Rep*, **6**, 30247.
- 34 Sprovieri, P. et Martino, G. (2018) The Role of the Carbohydrates in Plasmatic Membrane. *Physiol Res*, **67**, 1-11.
- 35 Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S., Marshall, H.E. et Stamler, J.S. (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 150-166.
- 36 Melino, G., Bernassola, F., Knight, R.A., Corasaniti, M.T., Nisticò, G. et Finazzi-agrò, A. (1997) S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature*, **388**, 432-433.
- 37 Hughes, A.R. et Putney Jr, J.W. (1990) Inositol Phosphate Formation and Its Relationship to Calcium Signaling. *Environ Health Per*, **84**, 141-147.
- 38 Yoshida, Y. et Imai, S. (1997) Structure and Function of Inositol 1,4,5-triphosphate Receptor. *Jpn J Pharmacol*, **74**, 125-137.
- 39 Tseng, K.Y., Caballero, A., Dec, A., Cass, D.K., Simak, N., Sunu, E., Park, M.J., Blume, S.R., Sammut, S., Park, D.J. et West, A.R. (2011) Inhibition of Striatal Soluble Guanylyl Cyclase-cGMP Signaling Reverses Basal Ganglia Dysfunction and Akinesia in Experimental Parkinsonism. *PLoS One*, **6**, e27187.
- 40 Wu, C., Butz, S., Ying, Y. et Anderson, R.G. (1997) Tyrosine Kinase Receptors Concentrated in Caveolae-like Domains from Neuronal Plasma Membrane \*. *J Biol Chem*, **272**, 3554-3559.
- 41 Draeger, A., Monastyrskaya, K., Burkhard, F.C., Wobus, A.M., Moss, S.E. et Babiychuk, E.B. (2003) Membrane segregation and downregulation of raft

- markers during sarcolemmal differentiation in skeletal muscle cells. *Dev Biol*, **262**, 324-334.
- 42 Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S. et Eggeling, C. (2017) The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **18**, 361-374.
- 43 Simons, K. et Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569-572.
- 44 Allen, J.A., Halverson-tamboli, R.A. et Rasenick, M.M. (2007) Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat Rev Neurosci*, **8**, 128-140.
- 45 Munro, S. (2003) Lipid Rafts: Elusive or Illusive? *Cell*, **115**, 377-388.
- 46 Alonso, M.A. et Millán, J. (2001) The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes. *J Cell Sci*, **114**, 3957-3965.
- 47 Pike, L.J. (2009) The challenge of lipid rafts. *J Lipid Res*, **50**, S323-S328.
- 48 Caroni, P. (2001) New EMBO Members' Review: Actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P(2) rafts. *EMBO J*, **20**, 4332-4336.
- 49 Holowka, D., Sheets, E.D. et Baird, B. (2000) Interactions between Fc  $\epsilon$  RI and lipid raft components are regulated by the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*, **113**, 1009-1019.
- 50 Jamora, C. et Fuchs, E. (2002) Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol*, **4**, 101-108.
- 51 Geiger, B. (1989) Cytoskeleton-associated cell contacts. *Curr Opin Cell Biol*, **1**, 103-109.
- 52 Mège, R.M., Gavard, J. et Lambert, M. (2006) Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 541-548.
- 53 Eeman, M. et Deleu, M. (2010) From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnol Agron Soc Environ*, **14**, 719-736.
- 54 Macdonald, A.G., Wahle, K.W., Cossins, A.R. et Behan, M.K. (1988) Temperature, pressure and cholesterol effects on bilayer fluidity; a comparison of pyrene excimer/monomer ratios with the steady-state fluorescence polarization of diphenylhexatriene in liposomes and microsomes. *Biochim Biophys Acta*, **938**, 231-242.
- 55 Subczynski, W.K., Pasenkiewicz-gierula, M., Widomska, J., Mainali, L. et Raguz, M. (2018) High cholesterol/low cholesterol: Effects in biological membranes Review. *Cell Biochem Biophys*, **75**, 369-385.

- 56 Heron, D.S., Shinitzky, M., Hershkowitz, M. et Samuel, D. (1980) Lipid fluidity markedly modulates the binding of serotonin to mouse brain membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **77**, 7463-7467.
- 57 Pande, A.H., Qin, S. et Tatulian, S.A. (2005) Membrane Fluidity Is a Key Modulator of Membrane Binding, Insertion, and Activity of 5-Lipoxygenase. *Biophys J*, **88**, 4084-4094.
- 58 Lee, A.G. (2003) Lipid – protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochim Biophys Acta*, **1612**, 1-40.
- 59 Duquesne, K. et Sturgis, J.N. (2010) membrane protein solubilization. *Methods Mol Biol*, **601**, 205-217.
- 60 Seddon, A.M., Curnow, P. et Booth, P.J. (2004) Membrane proteins , lipids and detergents : not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta*, **1666**, 105-117.
- 61 Prabudiansyah, I., Kusters, I., Caforio, A. et Driessen, A.J.M. (2015) Characterization of the annular lipid shell of the Sec translocon. *Biochim Biophys Acta*, **1848**, 2050-2056.
- 62 Levine, M. V, Khelashvili, G., Shi, L., Quick, M., Javitch, J.A. et Weinstein, H. (2016) Role of Annular Lipids in the Functional Properties of Leucine Transporter LeuT Proteomicelles. *Biochemistry*, **55**, 850-859.
- 63 Lande, M.B., Donovan, J.M. et Zeidel, M.L. (1995) The Relationship between Membrane Fluidity and Permeabilities to Water, Solutes, Ammonia, and Protons. *J Gen Physiol*, **106**, 67-84.
- 64 Rossignol, M., Uso, T. et Pierre, T. (1985) Relationship between Fluidity and Ionic Permeability of Bilayers from Natural Mixtures of Phospholipids. *J Membrane Biol*, **87**, 269-275.
- 65 Gensure, R.H., Zeidel, M.L. et Hill, W.G. (2006) Lipid raft components cholesterol and sphingomyelin increase H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup> permeability of phosphatidylcholine membranes. *Biochem J*, **398**, 485-495.
- 66 Agmon, N. (1995) The Grotthuss mechanism. *Chem Phys Lett*, **244**, 456-462.
- 67 Codorniu-hernández, E. et Kusalik, P.G. (2013) Probing the mechanisms of proton transfer in liquid water. *Proc Natl Acad Sci USA*, **110**, 13697-13698.
- 68 Tepper, H.L. et Voth, G.A. (2005) Protons May Leak through Pure Lipid Bilayers via a Concerted Mechanism. *Biophys J*, **88**, 3095-3108.
- 69 Israelachvili, J.N. et Mitchell, D.J. (1975) A model for the packing of lipids in bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta*, **389**, 13-19.

- 70 Dawaliby, R., Trubbia, C., Delporte, C., Noyon, C., Ruyschaert, J.M., Van Antwerpen, P. et Govaerts, C. (2016) Phosphatidylethanolamine Is a Key Regulator of Membrane Fluidity in Eukaryotic Cells. *J Biol Chem*, **291**, 3658-3667.
- 71 de Armas-Rillo, L., Valera, M.S., Marrero-Hernandez, S. et Valenzuela-Fernandez, A. (2016) Membrane dynamics associated with viral infection. *Rev Med Virol*, **26**, 146-160.
- 72 Vaillle-Perret, E., Motta, C. et Jalenques, I. (2002) Étude de l'évolution clinique et des modifications de fluidité membranaire chez des patients schizophrènes traités par neuroleptiques. *Ann Méd Psychol*, **160**, 58-66.
- 73 Li, M., Yasumura, D., Ma, A.A.K., Matthes, M.T., Yang, H., Nielson, G., Huang, Y., Szoka, F.C., Lavail, M.M. et Diamond, M.I. (2013) Intravitreal Administration of HA-1077 , a ROCK Inhibitor , Improves Retinal Function in a Mouse Model of Huntington Disease. *PLoS One*, **8**, 1-8.
- 74 Keddak, K., Théron, P., Motta, C., Baussan, C. et Legrand, A. (1996) Alterations in erythrocyte membrane fluidity and fatty acid composition in glycogen storage disease. *Biochim Biophys Acta*, **1315**, 61-65.
- 75 Ajdžanović, V., Mojić, M., Maksimović-Ivanić, D., Bulatović, M., Mijatović, S., Milošević, V. et Spasojević, I. (2013) Membrane fluidity, invasiveness and dynamic phenotype of metastatic prostate cancer cells after treatment with soy isoflavones. *J Membr Biol*, **246**, 307-14.
- 76 Revin, V. V., Gromova, N. V., Revina, E.S., Martynova, M.I., Seikina, A.I., Revina, N. V., Imarova, O.G., Solomadin, I.N., Tychkov, A.Y. et Zhelev, N. (2016) Role of Membrane Lipids in the Regulation of Erythrocytic Oxygen-Transport Function in Cardiovascular Diseases. *Biomed Res Int*, **2016**, 3429604.
- 77 Sok, M., Sentjurc, M. et Schara, M. (1999) Membrane fluidity characteristics of human lung cancer. *Cancer Lett*, **139**, 215-20.
- 78 Sherbert, G. V. (1989) membrane fluidity and cancer metastasis. *Exp Cell Biol*, **57**, 198-205.
- 79 Baritaki, S., Apostolakis, S., Kanellou, P., Dimanche-Boitrel, M.T., Spandidos, D.A. et Bonavida, B. (2007) Reversal of Tumor Resistance to Apoptotic Stimuli by Alteration of Membrane Fluidity: Therapeutic Implications. *Adv Cancer Res*, **98**, 149-190.
- 80 Riedel, S., Abel, S., Swanevelder, S. et Gelderblom, W.C.A. (2015) Induction of an

- altered lipid phenotype by two cancer promoting treatments in rat liver. *Food and Chemical Toxicology*, **78**, 96-104.
- 81 Pucci, B., Kasten, M. et Giordano, A. (2000) Cell Cycle and Apoptosis. *Neoplasia*, **2**, 291-299.
- 82 Hanahan, D. et Weinberg, R.A. (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- 83 Clark, W.H. (1991) Tumour progression and the nature of cancer. *Br J Cancer*, **64**, 631-644.
- 84 Kawashima, Y., Campos, A.C.L., Meguid, M.M., Kurzer, M. et Oler, A. (1989) Ability of a Benign Tumor to Decrease Spontaneous Food Intake and Body Weight in Rats. *Cancer*, **63**, 693-699.
- 85 Liu, A., Wang, J.-M., Li, G.-L., Sun, Y.-L., Sun, S.-B., Luo, B. et Wang, M.-H. (2014) Clinical and pathological analysis of benign brain tumors resected after Gamma Knife surgery. *J Neurosurg*, **121**, 179-187.
- 86 Livolsi, V.A. et Baloch, Z.W. (2018) The Pathology of Hyperthyroidism. *Front Endocrinol*, **9**, 737.
- 87 Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. et Jemal, A. (2018) Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *Ca Cancer J Clin*, **68**, 394-424.
- 88 Kimman, M., Jan, S., Kingston, D., Monaghan, H., Sokha, E., Thabrany, H., Bounxouei, B., Bhoo-pathy, N., Khin, M., Cristal-luna, G., Khuhaprema, T., Hung, N.C. et Woodward, M. (2012) Socioeconomic Impact of Cancer in Member Countries of the Association of Southeast Asian Nations ( ASEAN ): the ACTION Study Protocol. *Asian Pacific J Cancer Prev*, **13**, 421-425.
- 89 Sasieni, P.D., Shelton, J., Ormiston-Smith, N., Thomson, C.S. et Silcocks, P.B. (2011) What is the lifetime risk of developing cancer?: the effect of adjusting for multiple primaries. *Br J Cancer*, **105**, 460-465.
- 90 Yabroff, R.K., Lund, J., Kepka, D. et Mariotto, A. (2011) Economic Burden of Cancer in the US: Estimates, Projections, and Future Research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **20**, 2006-2014.
- 91 Institut National du Cancer (2019) <https://www.e-cancer.fr/Institut-national-du-cancer/Qui-sommes-nous/Budget>. Page consultée le 15/04/2020.
- 92 Cooper, G. (2000) The Development and Causes of Cancer. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition.

- 93 Batool, A., Karimi, N., Xiang-Nan, W., Chen, S.-R. et Liu, Y.-X. (2019) Testicular germ cell tumor: a comprehensive review. *Cell Mol Life Sci*, **76**, 1713-1727.
- 94 Brodowska-kania, D., Kotwica, E., Paturej, A., Sosnicki, W., Patera, J., Gizewska, A. et Niemczyk, S. (2016) What do we know about pulmonary blastoma?: review of literature and clinical case report. *Nagoya J Med Sci*, **78**, 507-516.
- 95 Balogh, J., Iii, D.V., Asham, E.H., Gordon, S.G., Boktour, M., Saharia, A., Li, X., Ghobrial, R.M. et Monsour Jr, H.P. (2016) Hepatocellular carcinoma: a review. *J Hepatocell Carcinoma*, **3**, 41-53.
- 96 Skubitz, K. et D'Adamo, D. (2007) Sarcoma. *Mayo Clin Proc*, **82**, 1409-1432.
- 97 Williams, G.H. et Stoeber, K. (2012) The cell cycle and cancer. *J Pathol*, **226**, 352-364.
- 98 Otto, T. et Sicinski, P. (2017) Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **17**, 93-115.
- 99 Potter, M., Newport, E. et Morten, K.J. (2016) The Warburg effect: 80 years on. *Biochem Soc Trans*, **44**, 1499-1505.
- 100 Liberti, M. V et Locasale, J.W. (2017) The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci*, **41**, 211-218.
- 101 Lim, J.Y. et Kwan, H.Y. (2018) Roles of Lipids in Cancer. *Lipid Metabolism*, 1-19.
- 102 Kuhajda, F.P. (2006) Fatty Acid Synthase and Cancer: New Application of an Old Pathway. *Cancer Res*, **66**, 5977-5981.
- 103 Swinnen, J. V., Vanderhoydonc, F., Elgamal, A.A., Eelen, M., Vercaeren, I., Joniau, S., Van Poppel, H., Baert, L., Goossens, K., Heyns, W. et Verhoeven, G. (2000) On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *Int J Cancer*, **88**, 176-179.
- 104 Azordegan, N., Fraser, V., Le, K., Hillyer, L.M., Ma, D.L., Fischer, G. et Moghadasian, M.H. (2013) Carcinogenesis alters fatty acid profile in breast tissue. *Mol Cell Biochem*, **374**, 223-232.
- 105 Kloog, Y. et Cox, A.D. (2004) Prenyl-binding domains: potential targets for Ras inhibitors and anti-cancer drugs. *Semin Cancer Biol*, **14**, 253-261.
- 106 Hisano, Y., Hla, T., Program, V.B., Medical, H. et States, U. (2019) Bioactive lysolipids in cancer and angiogenesis. *Pharmacol Ther*, **193**, 91-98.
- 107 Carmeliet, P. (2005) VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer. *Oncology*, **69**, 4-10.
- 108 Paduch, R. (2016) The role of lymphangiogenesis and angiogenesis in tumor

- metastasis. *Cell Oncol*, **39**, 397-410.
- 109 Riboni, L., Campanella, R., Bassi, R., Viani, P. et Tettamanti, G. (2002) Ceramide Levels Are Inversely Associated With Malignant Progression of Human Glial Tumors. *Glia*, **39**, 105-113.
- 110 Birklé, S., Zeng, G., Gao, L., Yu, R.K. et Aubry, J. (2003) Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie*, **85**, 455-463.
- 111 Leite, B., Aufderhorst-roberts, A., Palma, M.S., Connell, S.D., Ruggiero Neto, J. et Beales, P.A. (2015) PE and PS Lipids Synergistically Enhance Membrane Poration by a Peptide with Anticancer Properties. *Biophys J*, **109**, 936-947.
- 112 Sharma, B. et Kanwar, S.S. (2018) Phosphatidylserine: A cancer cell targeting biomarker. *Semin Cancer*, **52**, 17-25.
- 113 Zalba, S. et Ten Hagen, T.L. (2017) Cell membrane modulation as adjuvant in cancer therapy. *Cancer Treat Rev*, **52**, 48-57.
- 114 Alves, A.C., Ribeiro, D., Nunes, C. et Reis, S. (2016) Biophysics in cancer: The relevance of drug-membrane interaction studies. *Biochim Biophys Acta*, **1858**, 2234-2244.
- 115 Sasaki, T., Hiroki, K. et Yamashita, Y. (2013) The Role of Epidermal Growth Factor Receptor in Cancer Metastasis and Microenvironment. *Biomed Res Int*, **2013**, 546318.
- 116 Fife, C.M., McCarroll, J.A. et Kavallaris, M. (2014) Movers and shakers: cell cytoskeleton in cancer. *Br J Pharmacol*, **171**, 5507-5523.
- 117 Yamaguchi, H. et Condeelis, J. (2007) Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta*, **1773**, 642-652.
- 118 Chen, J., Liu, T., Gao, J., Gao, L., Zhou, L., Cai, M., Shi, Y., Xiong, W., Jiang, J., Tong, T. et Wang, H. (2016) Variation in Carbohydrates between Cancer and Normal Cell Membranes Revealed by Super-Resolution Fluorescence Imaging. *Adv Sci (Weinh)*, **3**, 1600270.
- 119 Smets, L.A. et Van Beek, W.P. (1984) Carbohydrates of the tumor cell surface. *Biochim Biophys Acta*, **738**, 237-249.
- 120 Nakazawa, I. et Iwaizumi, M. (1989) A role of the cancer cell membrane fluidity in the cancer metastases: an ESR study. *Tohoku J Exp Med*, **157**, 193-198.
- 121 Sok, M., Senthurc, M., Schara, M., Stare, J. et Rott, T. (2002) Cell Membrane Fluidity and Prognosis of Lng Cancer. *Ann Thorac Surg*, **73**, 1567-1571.
- 122 Owen, D.M., Rentero, C., Magenau, A., Abu-Siniyeh, A. et Gaus, K. (2011)

- Quantitative imaging of membrane lipid order in cells and organisms. *Nat Protoc*, **7**, 24-35.
- 123 Kuriyama, S., Theveneau, E., Benedetto, A., Parsons, M., Tanaka, M., Charras, G., Kabla, A. et Mayor, R. (2014) In vivo collective cell migration requires an LPAR2-dependent increase in tissue fluidity. *J Cell Biol*, **206**, 113-127.
- 124 Van Blitterswijk, W.J., De Veer, G., Krol, J.H. et Emmelot, P. (1982) Comparative lipid analysis of purified plasma membranes and shed extracellular membrane vesicles from normal murine thymocytes and leukemic GRSL cells. *Biochim Biophys Acta*, **688**, 495-504.
- 125 Ferber, E., Schmidt, B. et Weltzien, H.U. (1980) Spontaneous and detergent-induced vesiculation of thymocyte plasma membranes. *Biochim Biophys Acta*, **595**, 244-256.
- 126 Petitou, M., Tuy, F., Rosenfeld, C., Mishal, Z., Paintrand, M., Jasnin, C., Mathe, G. et Inbar, M. (1978) Decreased microviscosity of membrane lipids in leukemic cells: Two possible mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, **75**, 2306-2310.
- 127 Boutin, C., Roche, Y., Millot, C., Deturche, R., Royer, P., Manfait, M., Plain, J., Jeannesson, P., Millot, J.-M. et Jaffiol, R. (2020) High heterogeneity of plasma membrane microfluidity in multidrug-resistant cancer cells. *J Biomedic Optics*, **14**, 1-8.
- 128 Csoboz, B., Balogh, G.E., Kusz, E., Gombos, I., Peter, M., Crul, T., Gungor, B., Haracska, L., Bogdanovics, G., Torok, Z., Horvath, I., Vigh, L., Haracska, L., Bogdanovics, G. et Torok, Z. (2013) Membrane fluidity matters: Hyperthermia from the aspects of lipids and membranes. *Int J Hyperther*, **29**, 491-499.
- 129 Peetla, C., Vijayaraghavalu, S. et Labhasetwar, V. (2013) Biophysics of Cell Membrane Lipids in Cancer Drug Resistance: Implications for Drug Transport and Drug Delivery with Nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*, **65**, 1-29.
- 130 Szakács, G., Paterson, J.K., Ludwig, J.A., Booth-genthe, C. et Gottesman, M.M. (2006) Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, **5**, 219-234.
- 131 Shapira, A., Livney, Y.D., Broxterman, H.J. et Assaraf, Y.G. (2011) Nanomedicine for targeted cancer therapy: Towards the overcoming of drug resistance. *Drug Resist Updat*, **14**, 150-163.
- 132 Larsen, A.K. et Skladanowski, A. (1998) Cellular resistance to topoisomerase-targeted drugs: from drug uptake to cell death. *Biochim Biophys Acta*, **1400**,



- 257-274.
- 133 Bernardes, N. et Fialho, A.M. (2018) Perturbing the Dynamics and Organization of Cell Membrane Components: A New Paradigm for Cancer-Targeted Therapies. *Int J Mol Sci*, **19**, 3871.
- 134 Cleeland, C.S. (2000) Cancer-related symptoms. *Semin Radiat Oncol*, **10**, 175-190.
- 135 Nikbakhsh, N., Moudi, S., Abbasian, S. et Khafri, S. (2014) Prevalence of depression and anxiety among cancer patients. *Caspian J Intern Med*, **5**, 167-170.
- 136 Ames, B.N., Swirsky Gold, L. et Willett, W.C. (1995) The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 5258-5265.
- 137 Narayanan, D.L., Saladi, R.N. et Fox, J.L. (2010) Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int J Dermatol*, **49**, 978-986.
- 138 De Pergola, G. et Silvestris, F. (2013) Obesity as a Major Risk Factor for Cancer. *J Obes*, **2013**, 291546.
- 139 Loeb, L.A. et Harris, C.C. (2009) Advances in Chemical Carcinogenesis. A Historical Review and Prospective. *Cancer Res*, **68**, 6863-6872.
- 140 Mersi, E.A., Feitelson, M. et Munger, K. (2015) Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe*, **15**, 266-282.
- 141 AACR Cancer Progress Report Writing Committee. (2013) AACR Cancer Progress Report 2013. *Clin Cancer Res*, **19**, S4-S98.
- 142 Blokhin, I.O. et Lentz, S.R. (2015) Mechanisms of thrombosis in obesity. *Curr Opin Hematol*, **20**, 437-444.
- 143 Parsonnet, J. (1995) Bacterial Infection as a Cause of Cancer. *Environ Health Perspect*, **103**, 263-268.
- 144 Tong, H. van, Brindley, P.J., Meyer, C.G. et Velavan, T.P. (2017) Parasite Infection, Carcinogenesis and Human Malignancy. *EBioMedicine*, The Authors, **15**, 12-23.
- 145 Soerjomataram, I., Shield, K., Marant-Micallef, C., Vignat, J., Hill, C., Rogel, A., Menvielle, G., Dossus, L., Ormsby, J.N., Rehm, J., Rushton, L., Vineis, P., Parkin, M. et Bray, F. (2018) Cancers related to lifestyle and environmental factors in France in 2015. *Eur J Cancer*, **105**, 103-113.
- 146 Lasserre, A., Gaillot, J., Deutsch, A., Chauvet, C., Bessette, D. et Ancellin, R. (2017) Prévention des cancers en France: quel rôle pour les professionnels de santé? *Bull Cancer*, **104**, 237-244.

- 147 Rousseau, S., Gaillot-de Saintignon, J. et Barret, A.S. (2019) Challenges in the implementation of HPV vaccination for cancer prevention. *Rev Prat*, **69**, 529-534.
- 148 Donaldson, M.S. (2004) Nutrition and cancer : A review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutr J*, **3**, 1-21.
- 149 Howell, A., Anderson, A.S., Clarke, R.B., Duffy, S.W., Evans, D.G., Garcia-Closas, M., Gescher, A.J., Key, T.J., Saxton, J.M. et Harvie, M.N. (2014) Risk determination and prevention of breast cancer. *Breast Cancer Res*, **16**, 1-19.
- 150 Shyamala, K., Girish, H.C. et Murgod, S. (2014) Risk of tumor cell seeding through biopsy and aspiration cytology. *J Int Soc Prev Community Dent*, **4**, 5-11.
- 151 Mor, V., Masterson-Allen, S., Goldberg, R., Guadagnoli, E. et Wool, M.S. (1990) Pre-diagnostic symptom recognition and help seeking among cancer patients. *J Community Health*, **15**, 253-266.
- 152 King, C.R. (2000) Patterns of prostate cancer biopsy grading: trends and clinical implications. *Int J Cancer*, **90**, 305-311.
- 153 Bayat, M.R., Homayouni, T.S., Baluch, N., Morgatskaya, E., Kumar, S., Das, B. et Yeger, H. (2017) Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*, **8**, 38022-38043.
- 154 Bruera, E. et Yennurajalingam, S. (2012) Palliative care in advanced cancer patients: how and when? *Oncologist*, **17**, 267-273.
- 155 Bleicher, R.J., Ruth, K., Sigurdson, E.R., Beck, J.R., Ross, E., Wong, Y., Patel, S.A., Boraas, M., Chang, E.I., Topham, N.S. et Egleston, B.L. (2017) Time to Surgery and Breast Cancer Survival in the United States. *JAMA Oncol*, **2**, 330-339.
- 156 Demicheli, R., Retsky, M.W., Hrushesky, W.J., Baum, M. et Gukas, I.D. (2008) The effects of surgery on tumor growth: a century of investigations. *Ann Oncol*, Elsevier Masson SAS, **19**, 1821-1828.
- 157 Schena, E., Saccomandi, P. et Fong, Y. (2017) Laser Ablation for Cancer: Past , Present and Future. *J Funct Biomater*, **8**, 19.
- 158 Bakowsky, H., Richter, T., Kneuer, C., Hoekstra, D., Rothe, U., Bendas, G., Ehrhardt, C. et Bakowsky, U. (2008) Adhesion characteristics and stability assessment of lectin-modified liposomes for site-specific drug delivery. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, **1778**, 242-249.
- 159 Sukegawa, S., Kanno, T., Shibata, A., Matsumoto, K., Sukegawa-Takahashi, Y.,

- Sakaida, K. et Furuki, Y. (2017) Use of the bioactive resorbable plate system for zygoma and zygomatic arch replacement and fixation with modified Crockett's method for maxillectomy: A technical note. *Mol Clin Oncol*, **7**, 47-50.
- 160 Hasen, K. V, Few, J.W. et Fine, N.A. (2002) Plastic surgery: a component in the comprehensive care of cancer patients. *Oncology (Williston Park)*, **16**, 1685-1698.
- 161 Baskar, R., Lee, K.A., Yeo, R. et Yeoh, K.-W. (2012) Cancer and Radiation Therapy : Current Advances and Future Directions. *Int J Med Sci*, **9**, 193-199.
- 162 Shinohara, E.T. et Maity, A. (2009) Increasing sensitivity to radiotherapy and chemotherapy by using novel biological agents that alter the tumor microenvironment. *Curr Mol Med*, **9**, 1034-1045.
- 163 Zaorsky, N.G., Davis, B.J., Nguyen, P.L., Showalter, T.N., Hoskin, P.J., Yoshioka, Y., Morton, G.C. et Horwitz, E.M. (2017) The evolution of brachytherapy for prostate cancer. *Nat Rev Urol*, **14**, 415-439.
- 164 Lumachi, F., Luisetto, G., Basso, S.M., Basso, U., Brunello, A. et Camozzi, V. (2011) Endocrine therapy of breast cancer. *Curr Med Chem*, **18**, 513-522.
- 165 Zaitzu, M., Yamanoi, M., Mikami, K., Takeshima, Y., Okamoto, N., Imao, S., Tonooka, A. et Takeuchi, T. (2012) Surgical Castration in Hormone-Refractory Metastatic Prostate Cancer Patients Can Be an Alternative for Medical Castration. *Adv Urol*, **2012**, 979154.
- 166 Pelosof, L.C. et Gerber, D.E. (2010) Paraneoplastic Syndromes: An Approach to Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc*, **85**, 838-854.
- 167 Galluzzi, L., Vacchelli, E., Pedro, J.B., Buqué, A., Senovilla, L., Baracco, E.E., Bloy, N., Castoldi, F., Abastado, J., Agostinis, P., Apte, R.N., Aranda, F., Ayyoub, M., Beckhove, P., Blay, J.-Y., Bracci, L., Caignard, A., Castelli, C., Cavallo, F., Celis, E., Cerundolo, V., Clayton, A., Colombo, M.P., Coussens, L., Dhodapkar, M. V, Eggermont, A.M., Fearon, D.T., Fridman, W.H., Fucikova, J., Gabrilovich, D.I., Galon, J., Garg, A., Ghiringhelli, F., Giaccone, G., Gilboa, E., Gnjatic, S., Hoos, A., Hosmalin, A., Jäger, D., Kalinski, P., Kärre, K., Kepp, O., Kiessling, R., Kirkwood, J.M., Klein, E., Knuth, A., Lewis, C.E., Liblau, R., Lotze, M.T. et Lugli, E. (2014) Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget*, **5**, 12472-12508.
- 168 Huang, C., Ju, D., Chang, C., Reddy, P.M. et Velmurugan, B.K. (2017) A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating

- non – small cell lung cancer. *Biomedicine (Taipei)*, **7**, 12-23.
- 169 Ramirez, L.Y., Kuestis, S.E., Yap, T.Y., Zyzanski, S., Drotar, D. et Kodish, E. (2009) Potential chemotherapy side effects: what do oncologists tell parents? *Pediatr Blood Cancer*, **52**, 497-502.
- 170 Hamman, J.H., Demana, P.H. et Olivier, E.I. (2007) Targeting Receptors, Transporters and Site of Absorption to Improve Oral Drug Delivery. *Drug Target Insights*, **2**, 71-81.
- 171 Pawar, V.K., Gopal, J., Singh, Y., Chaurasia, M., Reddy, B.S. et Chourasia, M.K. (2014) Targeting of gastrointestinal tract for amended delivery of protein/peptide therapeutics: Strategies and industrial perspectives. *J Control Release*, Elsevier B.V., **196**, 168-183.
- 172 Viswanathan, P., Muralidaran, Y. et Ragavan, G. (2017) Challenges in oral drug delivery: a nano-based strategy to overcome. *Nanostructures for Oral Medicine*, 183-196.
- 173 Magalhães, J., Vieira, A., Santos, S., Pinheiro, M. et Reis, S. (2017) Oral Administration of Nanoparticles-Based TB Drugs. *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics*, 312-320.
- 174 Wiley, D.T., Webster, P., Gale, A. et Davis, M.E. (2013) Transcytosis and brain uptake of transferrin-containing nanoparticles by tuning avidity to transferrin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, **110**, 8662-8667.
- 175 McDannold, N., Vykhodtseva, N. et Hynynen, K. (2008) Blood-brain barrier disruption induced by focused ultrasound and circulating preformed microbubbles appears to be characterized by the mechanical index. *Ultrasound Med Biol*, **34**, 834-840.
- 176 Marcos-contreras, O.A., Lizarrondo, S.M. De, Bardou, I., Orset, C., Pruvost, M., Anfray, A., Frigout, Y., Hommet, Y., Lebouvier, L., Montaner, J., Vivien, D. et Gauberti, M. (2016) Hyper fibrinolysis increases blood – brain barrier permeability by a plasmin- and bradykinin-dependent mechanism. *Blood*, **128**, 2423-2434.
- 177 Basseville, A., Hall, M.D., Robey, R.W. et Chau, C.H. (2016) The ABCG2 multidrug transporter. *ABC Transporters - 40 Years on*, 195-226.
- 178 Zhou, Y., Peng, Z., Seven, E.S. et Leblanc, R.M. (2018) Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *J Control Release*, **270**, 290-303.
- 179 Benet, L.Z. et Zia-amirhosseini, P. (1995) *Basic Principles of Pharmacokinetics*.

- Toxicol Pathol*, **23**, 115-123.
- 180 Ratain, M.J. et Plunkett, W.K. (2003) Principles of Pharmacodynamics. Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition.
- 181 Shi, J., Kantoff, P.W., Wooster, R. et Farokhzad, O.C. (2016) Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer*, **17**, 20-37.
- 182 Matsumura, Y. et Maeda, H. (1986) A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res*, **46**, 6387-6392.
- 183 Danhier, F. (2016) To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic , what is the future of nanomedicine? *J Control Release*, Elsevier B.V., **244**, 108-121.
- 184 Nichols, J.W. et Bae, Y.H. (2014) EPR: Evidence and fallacy. *J Control Release*, **190**, 451-464.
- 185 Lammers, T., Kiessling, F., Hennink, W.E. et Storm, G. (2012) Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *J Control Release*, Elsevier B.V., **161**, 175-187.
- 186 Lammers, T., Peschke, P., Kühnlein, R., Subr, V., Ulbrich, K., Debus, J., Huber, P., Hennink, W. et Storm, G. (2007) Effect of radiotherapy and hyperthermia on the tumor accumulation of HPMA copolymer-based drug delivery systems. *J Control Release*, **117**, 333-341.
- 187 Rofstad, E.K., Galappathi, K. et Mathiesen, B.S. (2014) Tumor interstitial fluid pressure-a link between tumor hypoxia, microvascular density, and lymph node metastasis. *Neoplasia*, **16**, 586-594.
- 188 Heldin, C., Rubin, K., Pietras, K. et Östman, A. (2004) High interstitial fluid pressure — an obstacle in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **4**, 806-813.
- 189 Navalitloha, Y., Schwartz, E.S., Groothuis, E.N., Allen, C. V, Levy, R.M. et Groothuis, D.R. (2006) Therapeutic implications of tumor interstitial fluid pressure in subcutaneous RG-2 tumors. *Neuro Oncol*, **8**, 227-233.
- 190 Wolinsky, J.B., Colson, Y.L. et Grinstaff, M.W. (2012) Local drug delivery strategies for cancer treatment: gels, nanoparticles, polymeric films, rods, and wafers. *J Control Release*, **159**, 14-26.
- 191 Exner, A.A. et Saidel, G.M. (2008) Drug-eluting polymer implants in cancer

- therapy. *Expert Opin Drug Deliv*, **5**, 775-788.
- 192 Yoshii, T., Hafeman, A.E., Nyman, J.S., Esparza, J.M., Shinomiya, K., Spengler, D.M., Mundy, G.R., Gutierrez, G.E. et Guelcher, S.A. (2010) A sustained release of lovastatin from biodegradable, elastomeric polyurethane scaffolds for enhanced bone regeneration. *Tissue Eng Part A*, **16**, 2369-2379.
- 193 Fan, D.Y., Tian, Y. et Liu, Z.J. (2019) Injectable Hydrogels for Localized Cancer Therapy. *Front Chem*, **7**, 675.
- 194 Leung, S.J. et Romanowski, M. (2012) Light-Activated Content Release from Liposomes. *Theranostics*, **2**, 1020-1036.
- 195 Muthu, M.S. et Feng, S.-S. (2013) Theranostic liposomes for cancer diagnosis and treatment: current development and pre-clinical success. *Expert Opin Drug Deliv*, **10**, 151-155.
- 196 Jeelani, S., Reddy, R.C., Maheswaran, T., Asokan, G.S., Dany, A. et Anand, B. (2014) Theranostics: A treasured tailor for tomorrow. *J Pharm Bioallied Sci*, **6**, S6-S8.
- 197 Chen, H.H.W. et Kuo, M.T. (2017) Improving radiotherapy in cancer treatment: Promises and challenges. *Oncotarget*, **8**, 62742-62758.
- 198 Ngwa, W., Kumar, R., Sridhar, S., Korideckk, H., Zygmanski, P., Cormack, R.A., Berbeco, R. et Makrigiorgos, G.M. (2014) Targeted radiotherapy with gold nanoparticles: current status and future perspectives. *Nanomedicine (Lond)*, **9**, 1063-1082.
- 199 Kodama, H., Suzuki, M., Katayose, Y., Shinoda, M., Sakurai, N., Takemura, S., Yoshida, H., Saeki, H., Asano, R., Ichiyama, M., Imai, K., Hinoda, Y., Matsuno, S. et Kudo, T. (2002) Specific and effective targeting cancer immunotherapy with a combination of three bispecific antibodies. *Immunol Lett*, **81**, 99-106.
- 200 Hainfield, J.F., Slatkin, D.N. et Smilowitz, H.M. (2004) The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys Med Biol*, **49**, 309-315.
- 201 Xia, M., Liu, C., Zhao, Z., Wang, J., Lin, C., Xu, Y., Heo, J., Dai, S., Han, J. et Zhao, X. (2017) Surface Passivation of CdSe Quantum Dots in All Inorganic Amorphous Solid by Forming Cd<sub>1-x</sub>Zn<sub>x</sub>Se Shell. *Sci Rep*, **7**, 42359.
- 202 Yoon, H.C., Lee, S., Song, J.K., Yang, H. et Do, Y.R. (2018) Efficient and Stable CsPbBr<sub>3</sub> Quantum-Dot Powders Passivated and Encapsulated with a Mixed Silicon Nitride and Silicon Oxide Inorganic Polymer Matrix. *ACS Appl Mater Interfaces*, **10**, 11756-11767.

- 203 Akerman, M.E., Chan, W.C.W., Laakkonen, P., Bhatia, S.N. et Ruoslati, E. (2002) Nanocrystal targeting in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 12617-12621.
- 204 Dahan, M., Lévi, S., Luccardini, C., Rostaing, P., Riveau, B. et Triller, A. (2003) Diffusion Dynamics of Glycine Receptors Revealed by Single-Quantum Dot Tracking. *Science*, **302**, 442-445.
- 205 Fang, M., Peng, C., Pang, D. et Li, Y. (2012) Quantum Dots for Cancer Research: Current Status, Remaining Issue , and Future Perspectives. *Cancer Biol Med*, **9**, 151-163.
- 206 Zherebetsky, D., Scheele, M., Zhang, Y., Bronstein, N., Thompson, C., Britt, D., Salmeron, M., Alivisatos, P. et Wang, L.W. (2014) Hydroxylation of the Surface of PbS Nanocrystals Passivated With Oleic Acid. *Science*, **344**, 1380-1384.
- 207 Pelley, J.L., Daar, A.S. et Saner, M.A. (2009) State of Academic Knowledge on Toxicity and Biological Fate of Quantum Dots. *Toxicol Sci*, **112**, 276-296.
- 208 Ahmad, M.Z., Akhter, S., Jain, G.K., Rahman, M., Pathan, S.A., Ahmad, F.J. et Khar, R.K. (2010) Metallic nanoparticles: technology overview & drug delivery applications in oncology. *Expert Opin*, **7**, 927-942.
- 209 Gupta, A.K. et Gupta, M. (2005) Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, **26**, 3995-4021.
- 210 Elemike, E., Fayemi, O., Ekennia, A., Onwudiwe, D. et Ebenso, E. (2017) Silver Nanoparticles Mediated by Costus afer Leaf Extract: Synthesis, Antibacterial, Antioxidant and Electrochemical Properties. *Molecules*, **22**, 701.
- 211 Lohcharoenkal, W., Wang, L., Chen, Y.C. et Rojanasakul, Y. (2014) Protein Nanoparticles as Drug Delivery Carriers for Cancer Therapy. *Biomed Res Int*, 180549.
- 212 Uekama, K., Hirayama, F. et Irie, T. (1998) Cyclodextrin Drug Carrier Systems. *Chem Rev*, **98**, 2045-2076.
- 213 Verma, D., Gulati, N., Kaul, S., Mukherjee, S. et Nagaich, U. (2018) Protein Based Nanostructures for Drug Delivery. *J Pharm (Cairo)*, **2018**, 9285854.
- 214 Miele, E., Spinelli, G.P., Miele, E., Tomao, F. et Tomao, S. (2009) Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane ABI-007) in the treatment of breast cancer. *Int J Nanomedicine*, **4**, 99-105.
- 215 Zhao, M., Lei, C., Yang, Y., Bu, X., Ma, H., Gong, H., Liu, J., Fang, X., Hu, Z. et Fang, Q. (2015) Abraxane, the Nanoparticle Formulation of Paclitaxel Can Induce Drug Resistance by Up-Regulation of P-gp. *PLoS One*, **10**, e0131429.

- 216 Gidwhani, B. et Vyas, A. (2015) A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs. *Biomed Res Int*, **2015**, 198268.
- 217 Weiss, G.J., Chao, J., Neidhart, J.D., Ramanathan, R.K., Bassett, D., Neidhart, J.A., Choi, C.H.J., Chow, W., Chuung, V., Forman, S.J., Garmey, E., Hwang, J., Kalinoski, D.L., Koczywas, M., Longmate, J., Melton, R.J., Morgan, R., Oliver, J., Peterkin, J.J., Ryan, J.L., Schluep, T., Synold, T.W., Twardowski, P., Davis, M.E. et Yen, Y. (2013) First-in-human phase 1/2a trial of CRLX101, a cyclodextrin-containing polymer-camptothecin nanopharmaceutical in patients with advanced solid tumor malignancies. *Invest New Drugs*, **31**, 986-1000.
- 218 Thu, H., Dass, C.R. et Dunstan, D.E. (2008) Injectable chitosan hydrogels for localised cancer therapy. *J Control Release*, **126**, 205-216.
- 219 Li, P., Dai, Y., Zhang, J., Wang, A. et Wei, Q. (2008) Chitosan-Alginate Nanoparticles as a Novel Drug Delivery System for Nifedipine. *Int J Biomed Sci*, **4**, 221-228.
- 220 Zurick, K.M. et Bernards, M. (2014) Recent biomedical advances with polyampholyte polymers. *J Appl Polym Sci*, **131**, 40069.
- 221 Xiao, Y., Shi, K., Qu, Y., Chu, B. et Qian, Z. (2018) Engineering Nanoparticles for Targeted Delivery of Nucleic Acid Therapeutics in Tumor. *Mol Ther Methods Clin Dev*, **12**, 1-18.
- 222 Puri, A., Loomis, K., Smith, B., Lee, J.H., Yavlovich, A., Heldman, E. et Blumenthal, R. (2009) Lipid-Based Nanoparticles as Pharmaceutical Drug Carriers: From Concepts to Clinic. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, **26**, 523-580.
- 223 Torchilin, V.P. (2005) Lipid-core micelles for targeted drug delivery. *Curr Drug Deliv*, **2**, 319-327.
- 224 Croy, S.R. et Kwon, G.S. (2006) Polymeric micelles for drug delivery. *Curr Pharm, Des*, **12**, 4669-4684.
- 225 Bangham, A.D. et Horne, R.W. (1964) Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J Mol Biol*, **8**, 660-668.
- 226 Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S.W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M. et Nejati-Koshki, K. (2013) Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett*, **8**, 102.
- 227 de Gier, J., Mandersloot, J.G. et van Deenen, L.L. (1968) Lipid composition and



- permeability of liposomes. *Biochim Biophys Acta*, **150**, 666-675.
- 228 Coderch, L., Fonollosa, J., De Pera, M., Estelrich, J., De La Maza, A. et Parra, J.L. (2000) Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR. Relationship with percutaneous absorption. *J Control Release*, **68**, 85-95.
- 229 Patil, Y.P. et Jadhav, S. (2014) Novel methods for liposome preparation. *Chem Phys Lipids*, **177**, 8-18.
- 230 Jahn, A., Vreeland, W.N., Gaitan, M. et Locasio, L.E. (2004) Controlled vesicle self-assembly in microfluidic channels with hydrodynamic focusing. *J Am Chem Soc*, **126**, 2674-2675.
- 231 Shen, H.H., Lithgow, T. et Martin, L. (2013) Reconstitution of membrane proteins into model membranes: seeking better ways to retain protein activities. *Int J Mol Sci*, **14**, 1589-1607.
- 232 Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S.Y., Sood, A.K. et Hua, S. (2015) Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Front Pharmacol*, **6**, 1-13.
- 233 Yan, X., Scherpf, G.L. et Kamps, J.A. (2005) Liposome opsonization. *J Liposome Res*, **15**, 109-139.
- 234 Suk, J.S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J. et Ensign, L.M. (2016) PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, **99**, 28-51.
- 235 Pasto, A., Giordano, F., Evangelopoulos, M., Amadori, A. et Tasciotti, E. (2019) Cell membrane protein functionalization of nanoparticles as a new tumor-targeting strategy. *Clin Transl Med*, **8**, 8.
- 236 Verhoef, J.J. et Anchoroguy, T.J. (2013) Questioning the Use of PEGylation for Drug Delivery. *Drug Deliv Transl Res*, **3**, 499-503.
- 237 Hoang Thi, T.T., Pilkington, E.H., Nguyen, D.H., Lee, J.S., Park, K.D. et Truong, N.P. (2020) The Importance of Poly(ethylene glycol) Alternatives for Overcoming PEG Immunogenicity in Drug Delivery and Bioconjugation. *Polymers (Basel)*, **12**, E298.
- 238 Fang, Y., Xue, J., Gao, S., Lu, A., Yang, D., Jiang, H., He, Y. et Shi, K. (2017) Cleavable PEGylation: a strategy for overcoming the "PEG dilemma" in efficient drug delivery. *Drug Deliv*, **24**, 22-32.
- 239 Sarkis, J. et Vié, V. (2020) Biomimetic Models to Investigate Membrane Biophysics Affecting Lipid-Protein Interaction. *Front Bioeng Biotechnol*, **8**,

- 270.
- 240 Rawlings, A.E. (2016) Membrane proteins: Always an insoluble problem? *Biochem Soc Trans*, **44**, 790-795.
- 241 Ryu, H., Fuwad, A., Yoon, S., Jang, H., Lee, J.C., Kim, S.M. et Jeon, T.J. (2019) Biomimetic membranes with transmembrane proteins: State-of-the-Art in transmembrane protein applications. *Int J Mol Sci*, **20**, 1437.
- 242 Fuwad, A., Ryu, H., Malmstadt, N., Kim, S.M. et Jeon, T.J. (2019) Biomimetic membranes as potential tools for water purification: Preceding and future avenues. *Desalination*, **458**, 97-115.
- 243 Ham, M., Choi, J.H., Boghossian, A. a, Jeng, E.S., Graff, R. a, Heller, D. a, Chang, A.C., Mattis, A., Bayburt, T.H., Grinkova, Y. V, Zeiger, A.S., Vliet, K.J. Van, Hobbie, E.K., Sligar, S.G., Wraight, C. a et Strano, M.S. (2010) Photoelectrochemical complexes for solar energy conversion that chemically and autonomously regenerate. *Nat Chem*, **2**, 929-936.
- 244 Kasianowicz, J.J., Brandin, E., Branton, D. et Deamer, D.W. (1996) Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 13770-13773.
- 245 Mombaerts, P. (1999) Seven transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science*, **286**, 707-711.
- 246 Du, L., Wu, C., Peng, H., Zhao, L., Huang, L. et Wang, P. (2013) Bioengineered olfactory sensory neuron-based biosensor for specific odorant detection. *Biosens Bioelectron*, **40**, 401-406.
- 247 Misawa, N., Osaki, T. et Takeuchi, S. (2018) Membrane protein-based biosensors. *J R Soc Interface*, **15**, 20170952.
- 248 Brink, C.B., Harvey, B.H., Bodenstein, J., Venter, D.P. et Oliver, D.W. (2004) Recent advances in drug action and therapeutics: Relevance of novel concepts in G-protein-coupled receptor and signal transduction pharmacology. *Br J Clin Pharmacol*, **57**, 373-387.
- 249 Bleicher, K.H., Böhm, H.J., Müller, K. et Alanine, A.I. (2003) Hit and lead generation: Beyond high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discov*, **2**, 369-378.
- 250 Bull, S.C. et Doig, A.J. (2015) Properties of protein drug target classes. *PLoS ONE*, **10**, e0117955.
- 251 Fang, Y., Frutos, A.G. et Lahiri, J. (2002) Membrane protein microarrays. *J Am*

- Chem Soc*, **124**, 2394-2395.
- 252 Ayub, M., Stoddart, D. et Bayley, H. (2015) Nucleobase Recognition By Truncated  $\alpha$ -Hemolysin Pores. *ACS Nano*, **9**, 7895-7903.
- 253 Angevine, C.E., Seashols-Williams, S.J. et Reiner, J.E. (2016) Infrared Laser Heating Applied to Nanopore Sensing for DNA Duplex Analysis. *Anal Chem*, **88**, 2645-2651.
- 254 Rodrigues, C.G., Machado, D.C., Chevtchenko, S.F. et Krasilnikov, O. V. (2008) Mechanism of KCl enhancement in detection of nonionic polymers by nanopore sensors. *Biophys J*, **95**, 5186-5192.
- 255 Mathé, J., Aksimentiev, A., Nelson, D.R., Schulten, K. et Meller, A. (2005) Orientation discrimination of single-stranded DNA inside the alpha-hemolysin membrane channel. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**, 12377-12382.
- 256 Akeson, M., Branton, D., Kasianowicz, J.J., Brandin, E. et Deamer, D.W. (1999) Microsecond time-scale discrimination among polycytidylic acid, polyadenylic acid, and polyuridylic acid as homopolymers or as segments within single RNA molecules. *Biophys J*, **77**, 3227-3233.
- 257 Nova, I.C., Derrington, I.M., Craig, J.M., Noakes, M.T., Tickman, B.I., Doering, K., Higinbotham, H., Laszlo, A.H. et Gundlach, J.H. (2017) Investigating asymmetric salt profiles for nanopore DNA sequencing with biological porin MspA. *PLoS ONE*, **12**, e0181599.
- 258 Hélix-Nielsen, C. (2018) Biomimetic membranes as a technology platform: Challenges and opportunities. *Membranes*, **8**, 44.
- 259 Kayushin, L.P. et Skulachev, V.P. (1974) Bacteriorhodopsin as an electrogenic proton pump: Reconstitution of bacteriorhodopsin proteoliposomes generating  $\Delta\psi$  and  $\Delta\text{pH}$ . *FEBS Lett*, **39**, 39-42.
- 260 Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. et Michel, H. (1985) Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center of. *Nature*, **318**, 618-624.
- 261 Oesterhelt, D. et StoECKenius, W. (1973) Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, **70**, 2853-2857.
- 262 Xie, G., Wen, L. et Jiang, L. (2016) Biomimetic smart nanochannels for power harvesting. *Nano Res*, **9**, 59-71.
- 263 Boghossian, A.A., Choi, J.H., Ham, M.H. et Strano, M.S. (2011) Dynamic and reversible self-assembly of photoelectrochemical complexes based on lipid

- bilayer disks, photosynthetic reaction centers, and single-walled carbon nanotubes. *Langmuir*, **27**, 1599-1609.
- 264 Steinberg-Yfrach, G., Liddell, P.A., Hung, S.C., Moore, A.L., Gust, D. et Moore, T.A. (1997) Conversion of light energy to proton potential in liposomes by artificial photosynthetic reaction centres. *Nature*, **385**, 239-241.
- 265 Bjørkskov, F.B., Krabbe, S.L., Nurup, C.N., Missel, J.W., Spulber, M., Bomholt, J., Molbaek, K., Helix-Nielsen, C., Gotfryd, K., Gourdon, P. et Pedersen, P.A. (2017) Purification and functional comparison of nine human Aquaporins produced in *Saccharomyces cerevisiae* for the purpose of biophysical characterization. *Sci Rep*, **7**, 16899.
- 266 Bomholt, J., Hélix-Nielsen, C., Scharff-Poulsen, P. et Pedersen, P.A. (2013) Recombinant Production of Human Aquaporin-1 to an Exceptional High Membrane Density in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*, **8**, e56431.
- 267 Chatterjee, S.N. et Agarwal, S. (1988) Liposomes as membrane model for study of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med*, **4**, 51-72.
- 268 Siontorou, C.G., Nikoleli, G.P., Nikolelis, D.P. et Karapetis, S.K. (2017) Artificial lipid membranes: Past, present, and future. *Membranes*, **7**, 38.
- 269 Zasadzinski, J.A., Viswanathan, R., Madsen, L., Granaes, J. et Schwartz, D.K. (1994) Langmuir-Blodgett films. *Science*, **263**, 1726-1733.
- 270 Pinto, O.A. et Disalvo, E.A. (2019) A new model for lipid monolayer and bilayers based on thermodynamics of irreversible processes. *PLoS ONE*, **14**, e0212269.
- 271 Shokurov, A. V., Novak, D.N., Ostroverkhov, P. V., Grin, M.A., Zaytseva, A. V., Raitman, O.A., Moroté, F., Cohen-Bouhacina, T., Grauby-Heywang, C. et Selektor, S.L. (2020) Lipid monolayer as a simple model membrane for comparative assessment of the photodynamic therapy photosensitizer efficiency via macroscopic measurements. *J Photochem Photobiol B*, **210**, 111958.
- 272 Bozzuto, G. et Molinari, A. (2015) Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine*, **10**, 975-999.
- 273 Ciancaglini, P., Simão, A.M.S., Bolean, M., Millán, J.L., Rigos, C.F., Yoneda, J.S., Colhane, M.C. et Stabeli, R.G. (2012) Proteoliposomes in nanobiotechnology. *Biophys Rev*, **4**, 67-81.
- 274 Scalise, M., Pochini, L., Giangregorio, N., Tonazzi, A. et Indiveri, C. (2013) Proteoliposomes as tool for assaying membrane transporter functions and

- interactions with xenobiotics. *Pharmaceutics*, **5**, 472-497.
- 275 Chadli, M., Rebaud, S., Maniti, O., Tillier, B. et Corte, S. (2017) New Tethered Phospholipid Bilayers Integrating Functional G - Protein-Coupled Receptor Membrane Proteins. *Langmuir*, **33**, 10385-10401.
- 276 Poltorak, L., Verheijden, M.L., Bosma, D., Jonkheijm, P., de Smet, L.C.P.M. et Sudhölter, E.J.R. (2018) Lipid bilayers cushioned with polyelectrolyte-based films on doped silicon surfaces. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, **1860**, 2669-2680.
- 277 Rajapaksha, S.P., Wang, X. et Lu, H.P. (2013) Suspended lipid bilayer for optical and electrical measurements of single ion channel proteins. *Anal Chem*, **85**, 8951-8955.
- 278 Castellana, E.T. et Cremer, P.S. (2006) Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design. *Surf Sci Rep*, **61**, 429-444.
- 279 Glazier, R. et Salaita, K. (2017) Supported Lipid Bilayer Platforms to Probe Cell Mechanobiology. *Biochim Biophys Acta*, **1859**, 1465-1482.
- 280 Weirich, K.L., Israelachvili, J.N. et Fygenson, D.K. (2010) Bilayer edges catalyze supported lipid bilayer formation. *Biophys J*, **98**, 85-92.
- 281 Andrecka, J., Spillane, K.M., Ortega-Arroyo, J. et Kukura, P. (2013) Direct observation and control of Supported lipid bilayer formation with interferometric scattering Microscopy. *ACS Nano*, **7**, 10662-10670.
- 282 Vafaei, S., Tabaei, S.R. et Cho, N.J. (2017) Optimizing the Performance of Supported Lipid Bilayers as Cell Culture Platforms Based on Extracellular Matrix Functionalization. *ACS Omega*, **2**, 2395-2404.
- 283 Hardy, G.J., Nayak, R. et Zauscher, S. (2013) Model cell membranes: Techniques to form complex biomimetic supported lipid bilayers via vesicle fusion. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, **18**, 448-458.
- 284 Lv, Z., Banerjee, S., Zagorski, K. et Lyubchenko, Y.L. (2018) Supported Lipid Bilayers for Atomic Force Microscopy Studies. *Methods Mol Biol*, **1814**, 129-143.
- 285 Ogier, S.D., Bushby, R.J., Cheng, Y., Evans, S.D., Evans, S.W., Jenkins, A.T.A., Knowles, P.F. et Miles, R.E. (2000) Suspended Planar Phospholipid Bilayers on Micromachined Supports. *Langmuir*, **16**, 5696-5701.
- 286 Bright, L., Baker, C., Bränstör, R. et Saavedra, Aspinwall, C. (2015) Methacrylate Polymer Scaffolding Enhances the Stability of Suspended Lipid Bilayers for Ion Channel Recordings and Biosensor Development. *ACS*

- Biomater Sci Eng*, **1**, 955-963.
- 287 Wong, J.Y., Majewski, J., Seitz, M., Park, C.K., Israelachvili, J.N. et Smith, G.S. (1999) Polymer-cushioned bilayers. I. A structural study of various preparation methods using neutron reflectometry. *Biophys J*, **77**, 1445-1457.
- 288 Wong, J.Y., Park, C.K., Seitz, M. et Israelachvili, J.N. (1999) Polymer-cushioned bilayers, II. An investigation of interaction forces and fusion using the surface forces apparatus. *Biophys J*, **77**, 1458-1468.
- 289 Sackmann, E. et Tanaka, M. (2000) Supported membranes on soft polymer cushions: fabrication, characterization and applications. *Trends Biotechnol*, **18**, 58-64.
- 290 Tancrède, P., Paquin, P., Houle, A. et Leblanc, R.M. (1983) Formation of asymmetrical planar lipid bilayer membranes from characterized monolayers. *J Biochem Biophys Methods*, **7**, 299-310.
- 291 Giess, F., Friedrich, M.G., Heberle, J., Naumann, R.L. et Knoll, W. (2004) The protein-tethered lipid bilayer: A novel mimic of the biological membrane. *Biophys J*, **87**, 3213-3220.
- 292 Naumann, R., Schiller, S.M., Giess, F., Grohe, B., Hartman, K.B., Kärcher, L., Köper, I., Lübben, J., Vasilev, K. et Knoll, W. (2003) Tethered Lipid Bilayers on Ultraflat Gold Surfaces. *Langmuir*, **19**, 5435-5443.
- 293 Coutable, A., Thibault, C., Chalmeau, J., François, J.M., Vieu, C., Noireaux, V. et Trévisiol, E. (2014) Preparation of tethered-lipid bilayers on gold surfaces for the incorporation of integral membrane proteins synthesized by cell-free expression. *Langmuir*, **30**, 3132-3141.
- 294 Alghalayini, A., Garcia, A., Berry, T. et Cranfield, C.G. (2019) The Use of Tethered Bilayer Lipid Membranes to Identify the Mechanisms of Antimicrobial Peptide Interactions with Lipid Bilayers. *Antibiotics (Basel)*, **8**, 12.
- 295 Shenoy, S., Moldovan, R., Fitzpatrick, J., Vanderah, D.J., Deserno, M. et Lösche, M. (2010) In-plane homogeneity and lipid dynamics in tethered bilayer lipid membranes (tBLMs). *Soft Matter*, **2010**, 1263-1274.
- 296 Andersson, J. et Köper, I. (2016) Tethered and Polymer Supported Bilayer Lipid Membranes: Structure and Function. *Membranes (Basel)*, **6**, 30.
- 297 Andersson, J., Köper, I. et Knoll, W. (2018) Tethered Membrane Architectures—Design and Applications. *Front Mater*, **5**, 1-11.
- 298 Konarzewska, D., Juhaniwicz, J., Güzeloğlu, A. et Şek, S. (2017)

- Characterization of planar biomimetic lipid films composed of phosphatidylethanolamines and phosphatidylglycerols from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, **1859**, 475-483.
- 299 Arslan Yildiz, A., Yildiz, U.H., Liedberg, B. et Sinner, E.K. (2013) Biomimetic membrane platform: Fabrication, characterization and applications. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **103**, 510-516.
- 300 Rao, N.M., Plant, A.L., Silin, V., Wight, S. et Hui, S.W. (1997) Characterization of biomimetic surfaces formed from cell membranes. *Biophys J*, **73**, 3066-3077.
- 301 Milhiet, P.E., Gubellini, F., Berquand, A., Dosset, P., Rigaud, J.L., Le Grimellec, C. et Lévy, D. (2006) High-resolution AFM of membrane proteins directly incorporated at high density in planar lipid bilayer. *Biophysical Journal*, **91**, 3268-3275.
- 302 Hsia, C.Y., Chen, L., Singh, R.R., DeLisa, M.P. et Daniel, S. (2016) A Molecularly Complete Planar Bacterial Outer Membrane Platform. *Sci Rep*, **6**, 32715.
- 303 Makky, A., Michel, J.P., Maillard, P. et Rosilio, V. (2011) Biomimetic liposomes and planar supported bilayers for the assessment of glycodendrimeric porphyrins interaction with an immobilized lectin. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, **1808**, 656-666.
- 304 Eid, M., Rippa, S., Castano, S., Desbat, B., Chopineau, J., Rossi, C. et Béven, L. (2010) Exploring the membrane mechanism of the bioactive peptaibol ampullosporin A using lipid monolayers and supported biomimetic membranes. *J Biophys*, **2010**, 179641.
- 305 Kiessling, V., Liang, B., Kreutzberger, A.J.B. et Tamm, L.K. (2017) Planar supported membranes with mobile SNARE proteins and quantitative fluorescence microscopy assays to study synaptic vesicle fusion. *Front Mol Neurosci*, **10**, 72.
- 306 González-Henríquez, C.M., Villegas-Opazo, V.A., Sagredo-Oyarce, D.H., Sarabia-Vallejos, M.A. et Terraza, C.A. (2017) Thermal response analysis of phospholipid bilayers using ellipsometric techniques. *Biosensors (Basel)*, **7**, 34.
- 307 He, K., Ludtke, S.J., Wu, Y. et Huang, H.W. (1993) X-ray scattering with momentum transfer in the plane of membrane. Application to gramicidin organization. *Biophys J*, **64**, 157-162.
- 308 He, K., Ludtke, S.J., Worcester, D.L. et Huang, H.W. (1996) Neutron scattering

- in the plane of membranes: Structure of alamethicin pores. *Biophys J*, **70**, 2659-2666.
- 309 Akabori, K., Huang, K., Treece, B.W., Jablin, M.S., Maranville, B., Woll, A., Nagle, J.F., Garcia, A.E. et Tristram-Nagle, S. (2014) HIV-1 Tat membrane interaction probed using X-ray and neutron scattering, CD spectroscopy and MD simulations. *Biochim Biophys Acta*, **1838**, 3078-3087.
- 310 Kučerka, N., Heberle, F.A., Pan, J. et Katsaras, J. (2015) Structural significance of lipid diversity as studied by small angle neutron and X-ray scattering. *Membranes (Basel)*, **5**, 454-472.
- 311 Chadli, M. Développement de la technologie « TransMembraChip » : biopuces à membranes pour la réinsertion et le criblage d'agonistes / antagonistes de protéines membranaires. Université de Lyon, 2018. NNT : 2018LYSE1118.
- 312 Rebaud, S. Étude de l'interaction d'une famille de protéines myristoylées, les Visinin-Like Proteins, avec des membranes biomimétiques et développement d'un nouveau modèle membranaire dédié à l'étude de l'interaction protéine / lipide. Université de Lyon, 2015. NNT : 2015LYSE35.
- 313 Girard-Egrot, A., Maniti, O., Rebaud, S. (2016) Substrate/Peptide/Lipid Bilayer Assembly, Preparation Methods and Associated Detection Methods. WO/2016/066947.
- 314 Cho, N.J., Cho, S.J., Kwang, H.C., Glenn, J.S. et Frank, C.W. (2007) Employing an amphipatic viral peptide to create a lipid bilayer on Au and TiO<sub>2</sub>. *J Am Chem Soc*, **129**, 10050-10051.
- 315 Jackman, J.A., Zan, G.H., Zhdanov, V.P. et Cho, N.J. (2013) Rupture of lipid vesicles by a broad-spectrum antiviral peptide: Influence of vesicle size. *J Phys Chem B*, **117**, 16117-16128.
- 316 Cho, N.J., Dvory-Sobol, H., Xiong, A., Cho, S.J., Frank, C.W. et Glenn, J.S. (2009) Mechanism of an amphipatic  $\alpha$ -helical peptide's antiviral activity involves size-dependent virus particle lysis. *ACS Chem Biol*, **4**, 1061-1067.
- 317 Muller, J.P.E., Aytar, B.S., Kondo, Y., Lynn, D.M. et Abbott, N.L. (2012) Incorporation of DOPE into lipoplexes formed from a ferrocenyl lipid leads to inverse hexagonal nanostructures that allow redox-based control of transfection in high serum. *Soft Matter*, **8**, 2608-2619.
- 318 Chernomordik, L., Kozlov, M.M. et Zimmerberg, J. (1995) Lipids in biological membrane fusion. *J Membr Biol*, **146**, 1-14.



- 319 Avanti Polar Lipids (2020) <https://avantilipids.com/divisions/equipment-products>. Page consultée le 24/04/2020.
- 320 Lollo, G., Matha, K., Bocchiardo, M., Bejaud, J., Marigo, I., Virgone-Carlotta, A., Dehoux, T., Rivière, C., Rieu, J.P., Briançon, S., Perrier, T., Meyer, O. et Benoit, J.P. (2019) Drug delivery to tumours using a novel 5-FU derivative encapsulated into lipid nanocapsules. *J Drug Target*, **27**, 634-645.
- 321 Cheniour, M., Gueyrard, D., Goekjian, P. G., Granjon, T. et Marcillat O. (2016) A convenient and versatile synthesis of Laurdan-like fluorescent membrane probes: characterization of their fluorescence properties. *RSC Adv*, **6**, 5547–5557.
- 322 Pourchet, L. Développement d'une bio-encre pour la bioimpression 3D de tissus vivants : étude de la formulation et caractérisation du développement tissulaire. Université de Lyon, 2018. NNT : 2018LYSE1232.
- 323 Dai, X., Cheng, H., Bai, Z. et Li, J. (2017) Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping. *J Cancer*, **8**, 3131-3141.
- 324 Bligh, E. et Dyer, W. (1961) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, **37**, 911-917.
- 325 Pankov, R., Markovska, T., Antonov, P., Ivanova, L. et Momchilova, A. (2006) The plasma membrane lipid composition affects fusion between cells and model membranes. *Chem Biol Interact*, **164**, 167-173.
- 326 Nitenberg, M., Bénarouche, A., Maniti, O., Marion, E., Marsollier, L., Géan, J., Dufourc, E.J., Cavalier, J.F., Canaan, S. et Girard-Egrot, A.P. (2018) The potent effect of mycolactone on lipid membranes. *PLoS Pathogen*, **14**, e1006814.
- 327 Virtanen, J.A., Cheng, K.H. et Somerharju, P. (1998) Phospholipid composition of the mammalian red cell membrane can be rationalized by a superlattice model. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 4964-4969.
- 328 Voros, J. (2004) The Density and Refractive Index of Adsorbing Protein Layers. *Biophys J*, **87**, 553-561.
- 329 Matsuzaki, K., Murase, O., Sugishita, K., Yoneyama, S., Akada, K., Ueha, M., Nakamura, A. et Kobayashi, S. (2000) Optical characterization of liposomes by right angle light scattering and turbidity measurement. *Biochim Biophys Acta*, **1467**, 219-226.
- 330 Colas, J., Shi, W., Rao, V.S.N.M., Omri, A., Mozafari, M.R. et Singh, H. (2007) Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by

- Mozafari method and their bacterial targeting. *Micron*, **38**, 841-847.
- 331 Luchini, A., Gerelli, Y., Fragneto, G., Nylander, T., Pálsson, G.K., Appavou, M.S. et Paduano, L. (2017) Neutron Reflectometry reveals the interaction between functionalized SPIONs and the surface of lipid bilayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **151**, 76-87.
- 332 Di Silvio, D., Maccarini, M., Parker, R., Mackie, A., Fragneto, G. et Baldelli Bombelli, F. (2017) The effect of the protein corona on the interaction between nanoparticles and lipid bilayers. *Journal of Colloid and Interface Science*, **504**, 741-750.
- 333 Peetla, C., Stine, A. et Labhasetwar, V. (2009) Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery. *Mol pharm*, **6**, 1264-1276.
- 334 Abumanhal-masarweh, H., da Silva, D., Poley, M., Zinger, A., Goldman, E., Krinsky, N., Kleiner, R., Shenbach, G., Schroeder, J.E., Shklover, J., Shainsky-Roitman, J. et Schroeder, A. (2019) Tailoring the lipid composition of nanoparticles modulates their cellular uptake and affects the viability of triple negative breast cancer cells. *J Control Release*, **307**, 331-341.
- 335 Carradori, D., dos Santos, A.G., Masquelier, J., Paquot, A., Saulnier, P., Eyer, J., Pr eat, V., Muccioli, G.G., Mingeot-leclercq, M. et des Rieux, A. (2018) The origin of neural stem cells impacts their interactions with targeted-lipid nanocapsules: Potential role of plasma membrane lipid composition and fluidity. *J Control Release*, **292**, 248-255.
- 336 Takechi-haraya, Y., Sakai-kato, K., Abe, Y., Kawanishi, T., Okuda, H. et Goda, Y. (2016) Atomic Force Microscopic Analysis of the Effect of Lipid Composition on Liposome Membrane Rigidity. *Langmuir*, **32**, 6074-6082.
- 337 Zouaoui, J. Caractérisation biom ecanique et biophysique  a différentes échelles des cellules du cancer de la prostate : Marqueurs biologiques pertinents pour évaluer le potentiel métastatique cellulaire. Université de Carthage, 2018.
- 338 Peetla, C., Vijayaraghavalu, S. et Labhasetwar, V. (2013) Biophysics of cell membrane lipids in cancer drug resistance: Implications for drug transport and drug delivery with nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*, **65**, 1686-1698.
- 339 Casares, D., Escriv, P. V et Rossello, C.A. (2019) Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and

- Compartmentalization and Therapeutic Avenues. *Int J Mol Sci*, **20**, 2167.
- 340 Sameni, S., Malacrida, L., Tan, Z. et Digman, M.A. (2018) Alteration in Fluidity of Cell Plasma Membrane in Huntington Disease Revealed by Spectral Phasor Analysis. *Sci Rep*, **8**, 734.
- 341 Cell, B., Downloaded, B., Claude, U. et Lyon, B. (2013) Increased oxidative stress and decreased membrane fluidity in erythrocytes of CAD patients. *Biochim Cell Biol*, **318**, 315-318.
- 342 Collins, R.N., Holz, R.W. et Zimmerberg, J. (2012) 5.14 The Biophysics of Membrane Fusion. *Comprehensive Biophysics*, 273-289.
- 343 Risselada, H.J., Bubnis, G. et Grubmüller, H. (2014) Expansion of the fusion stalk and its implication for biological membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci USA*, **111**, 11043-11048.
- 344 Brunger, A.T. (2005) Structure and function of SNARE and SNARE-interacting proteins. *Q Rev Biophys*, **38**, 1-47.
- 345 Brunger, A.T. (2001) Structure of proteins involved in synaptic vesicle fusion in neurons. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **30**, 157-171.
- 346 Cho, N.J., Wang, G., Edvardsson, M., Glenn, J.S., Hook, F. et Frank, C.W. (2009) Alpha-helical peptide-induced vesicle rupture revealing new insights into the vesicle fusion process as monitored in situ by quartz crystal microbalance-dissipation and reflectometry. *Anal Chem*, **81**, 4752-4761.
- 347 Kučerka, N., Nieh, M.P. et Katsaras, J. (2011) Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, **1808**, 2761-2771.
- 348 Lantzsch, G., Binder, H. et Heerklotz, H. (1994) Surface area per molecule in lipid/C12En membranes as seen by fluorescence resonance energy transfer. *J Fluoresc*, **4**, 339-343.
- 349 Chadli, M., Rebaud, S., Maniti, O., Tilier, B., Cortès, S. et Girard-Egrot, A. (2017) New Tethered Phospholipid Bilayers Integrating Functional G-Protein-Coupled Receptor Membrane Proteins. *Langmuir*, **33**, 10385-10401.
- 350 Jaouen, K. Backside absorbing layer microscopy : un nouvel outil pour l'étude des matériaux 2D. Université Paris-Saclay, 2019. NNT : 2019SACLS296.
- 351 Campidelli, S., Aboukhachfe, R., Jaouen, K., Monteiller, J., Amra, C., Zerrad, M., Cornut, R., Derycke, V. et Ausserré, D. (2017) Backside absorbing layer microscopy: watching graphene chemistry. *Sci Adv*, **3**, e1601724.

- 352 Abou Khachfe, R. et Ausserré, D. (2020) Backside absorbing layer microscopy: a universal relationship between physical thickness and reflectivity. *Opt Express*, **28**, 4836-4844.
- 353 Pattni, B.S., Chupin, V. V. et Torchilin, V.P. (2015) New Developments in Liposomal Drug Delivery. *Chem Rev*, **115**, 10938-10966.
- 354 Shashkova, S. et Leake, M.C. (2017) Single-molecule fluorescence microscopy review: shedding new light on old problems. *Biosci Rep*, **37**, 1-19.
- 355 Cheniour, M. Etude de l'interaction de la créatine kinase mitochondriale avec des membranes biomimétiques et développement de sondes de fluorescence en vue d'une caractérisation fine de l'organisation latérale des lipides membranaires. Université de Lyon, 2012. NNT : 2012LYSE220.
- 356 Bao, Q.Y., Zhang, N., Geng, D.D., Xue, J.W., Merritt, M., Zhang, C. et Ding, Y. (2014) The enhanced longevity and liver targetability of Paclitaxel by hybrid liposomes encapsulating Paclitaxel-conjugated gold nanoparticles. *Int J Pharm*, **477**, 408-415.
- 357 Yin, Y., Wu, X., Yang, Z., Zhao, J., Wang, X., Zhang, Q., Yuan, M., Xie, L., Liu, H. et He, Q. (2013) The potential efficacy of R8-modified paclitaxel-loaded liposomes on pulmonary arterial hypertension. *Pharm Res*, **30**, 2050-2062.
- 358 Li, X.Y., Zhao, Y., Sun, M.G., Shi, J.F., Ju, R.J., Zhang, C.X., Li, X.T., Zhao, W.Y., Mu, L.M., Zeng, F., Lou, J.N. et Lu, W.L. (2014) Multifunctional liposomes loaded with paclitaxel and artemether for treatment of invasive brain glioma. *Biomaterials*, **35**, 5591-5604.
- 359 Baek, S.E., Lee, K.H., Park, Y.S., Oh, D.K., Oh, S., Kim, K.S. et Kim, D.E. (2014) RNA aptamer-conjugated liposome as an efficient anticancer drug delivery vehicle targeting cancer cells in vivo. *J Control Release*, **196**, 234-242.
- 360 Yan, Z., Wang, F., Wen, Z., Zhan, C., Feng, L., Liu, Y., Wei, X., Xie, C. et Lu, W. (2012) LyP-1-conjugated PEGylated liposomes: a carrier system for targeted therapy of lymphatic metastatic tumor. *J Control Release*, **157**, 118-125.
- 361 Zong, T., Mei, L., Gao, H., Cai, W., Zhu, P., Shi, K., Chen, J., Wang, Y., Gao, F. et He, Q. (2014) Synergistic dual-ligand doxorubicin liposomes improve targeting and therapeutic efficacy of brain glioma in animals. *Mol Pharm*, **11**, 2346-2357.
- 362 Wang, C., Feng, L., Yang, X., Wang, F. et Lu, W. (2013) Folic acid-conjugated liposomal vincristine for multidrug resistant cancer therapy. *Asian J Pharm Sci*, **8**, 118-127.

- 363 Zhong, J., Mao, W., Shi, R., Jiang, P., Wang, Q., Zhu, R., Wang, T. et Ma, Y. (2014) Pharmacokinetics of liposomal-encapsulated and unencapsulated vincristine after injection of liposomal vincristine sulfate in beagle dogs. *Cancer Chemother Pharmacol*, **73**, 459-466.
- 364 Qu, B., Li, X., Guan, M., Li, X., Hai, L. et Wu, Y. (2014) Design, synthesis and biological evaluation of multivalent glucosides with high affinity as ligands for brain targeting liposomes. *Eur J Med Chem*, **73**, 110-118.
- 365 Qu, M.H., Zeng, R.F., Fang, S., Dai, Q.S., Li, H.P. et Long, J.T. (2014) Liposome-based co-delivery of siRNA and docetaxel for the synergistic treatment of lung cancer. *Int J Pharm*, **474**, 112-122.
- 366 Yang, Z.Z., Li, J.Q., Wang, Z.Z., Dong, D.W. et Qi, X.R. (2014) Tumor-targeting dual peptides-modified cationic liposomes for delivery of siRNA and docetaxel to gliomas. *Biomaterials*, **35**, 5226-5239.
- 367 Peddada, L.Y., Garbuzenko, O.B., Devore, D.I., Minko, T. et Roth, C.M. (2014) Delivery of antisense oligonucleotides using poly(alkylene oxide)-poly(propylacrylic acid) graft copolymers in conjunction with cationic liposomes. *J Control Release*, **194**, 103-112.
- 368 Shen, H., Rodriguez-Aguayo, C., Xu, R., Gonzalez-Villasana, V., Mai, J., Huang, Y., Zhang, G., Guo, X., Bai, L., Qin, G., Deng, X., Li, Q., Erm, D.R., Aslan, B., Liu, X., Sakamoto, J., Chavez-Reyes, A., Han, H.D., Sood, A.K., Ferrari, M. et Lopez-Berestein, G. (2013) Lopez-Berestein, G. Enhancing chemotherapy response with sustained EphA2 silencing using multistage vector delivery. *Clin Cancer Res*, **19**, 1806-1815.
- 369 Tsujiuchi, T., Natsume, A., Motomura, K., Kondo, G., Ranjit, M., Hachisu, R., Sugimura, I., Tomita, S., Takehara, I., Woolley, M., Barua, N.U., Gill, S.S., Bienemann, A.S., Yamashita, Y., Toyokuni, S. et Wakabayashi, T. (2014) Preclinical evaluation of an O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase-siRNA/liposome complex administered by convection-enhanced delivery to rat and porcine brains. *Am J Transl Res*, **6**, 169-178.
- 370 Yuba, E., Harada, A., Sakanishi, Y., Watarai, S. et Kono, K. (2013) A liposome-based antigen delivery system using pH-sensitive fusogenic polymers for cancer immunotherapy. *Biomaterials*, **34**, 3042-3052.
- 371 Song, J.M., Kirtane, A.R., Upadhyaya, P., Qian, X., Balbo, S., Teferi, F., Panyam, J. et Kassie, F. (2014) Intranasal delivery of liposomal indole-3-carbinol improves

- its pulmonary bioavailability. *Int J Pharm*, **477**, 96-101.
- 372 Miyabe, H., Hyodo, M., Nakamura, T., Sato, Y., Hayakawa, Y. et Harashima, H. (2014) A new adjuvant delivery system 'cyclic di-GMP/YSK05 liposome' for cancer immunotherapy. *J Control Release*, **184**, 20-27.
- 373 Hamblin, K.A., Wong, J.P., Blanchard, J.D. et Atkins, H.S. (2014) The potential of liposome-encapsulated ciprofloxacin as a tularemia therapy. *Front Cell Infect Microbiol*, **4**, 79.
- 374 Marques, J., Moles, E., Urban, P., Prohens, R., Busquets, M.A., Sevrin, C., Grandfils, C. et Fernandez-Busquets, X. (2014) Application of heparin as a dual agent with antimalarial and liposome targeting activities toward Plasmodium-infected red blood cells. *Nanomedicine*, **10**, 1719-1728.
- 375 Guo, J., Waknine-Grinberg, J.H., Mitchell, A.J., Barenholz, Y. et Golenser, J. (2014) Reduction of experimental cerebral malaria and its related proinflammatory responses by the novel liposome-based betamethasone nanodrug. *Biomed Res Int*, **2014**, 292471.
- 376 Bhardwaj, A., Kumar, L., Narang, R.K. et Murthy, R.S. (2013) Development and characterization of ligand-appended liposomes for multiple drug therapy for pulmonary tuberculosis. *Artif Cells, Nanomed, Biotechnol*, **41**, 52-59.
- 377 Rojanarat, W., Nakpheng, T., Thawithong, E., Yanyium, N. et Srichana, T. (2012) Inhaled pyrazinamide proliposome for targeting alveolar macrophages. *Drug Deliv*, **19**, 334-345.
- 378 Rose, S.J., Neville, M.E., Gupta, R. et Bermudez, L.E. (2014) Delivery of aerosolized liposomal amikacin as a novel approach for the treatment of nontuberculous mycobacteria in an experimental model of pulmonary infection. *PLoS One*, **9**, e108703.
- 379 Ivanova, V., Garbuzenko, O.B., Reuhl, K.R., Reimer, D.C., Pozharov, V.P. et Minko, T. (2013) Inhalation treatment of pulmonary fibrosis by liposomal prostaglandin E2. *Eur J Pharm Biopharm*, **84**, 334-344.
- 380 Rousseau, N., Picot, S. et Bienvenu, A.L. (2014) Erythropoietin Combined with Liposomal Amphotericin B Improves Outcome during Disseminated Aspergillosis in Mice. *Front Immunol*, **5**, 502.
- 381 Yanamandra, S., Venkatesan, N., Kadajji, V.G., Wang, Z., Issar, M. et Betageri, G. V. (2014) Proliposomes as a drug delivery system to decrease the hepatic first-pass metabolism: case study using a model drug. *Eur J Pharm Sci*, **64**, 26-36.

- 382 Sun, C., Wang, J., Liu, J., Qiu, L., Zhang, W. et Zhang, L. (2013) Liquid proliposomes of nimodipine drug delivery system: preparation, characterization, and pharmacokinetics. *AAPS PharmSciTech*, **14**, 332-338.
- 383 Niu, M., Tan, Y., Guan, P., Hovgaard, L., Lu, Y., Qi, J., Lian, R., Li, X. et Wu, W. (2014) Enhanced oral absorption of insulin-loaded liposomes containing bile salts: a mechanistic study. *Int J Pharm*, **460**, 119-130.
- 384 Zhang, X., Qi, J., Lu, Y., He, W., Li, X. et Wu, W. (2014) Biotinylated liposomes as potential carriers for the oral delivery of insulin. *Nanomedicine*, **10**, 167-176.
- 385 Gradauer, K., Barthelmes, J., Vonach, C., Almer, G., Mangge, H., Teubl, B., Roblegg, E., Dunnhaupt, S., Frohlich, E., Bernkop-Schnurch, A. et Prassl, R. (2013) Liposomes coated with thiolated chitosan enhance oral peptide delivery to rats. *J Control Release*, **172**, 872-878.
- 386 Gangishetty, H., Eedara, B.B. et Bandari, S. (2015) Development of ketoprofen loaded proliposomal powders for improved gastric absorption and gastric tolerance: in vitro and in situ evaluation. *Pharm Dev Technol*, **20**, 641-651.
- 387 Zhao, Y.Z., Lu, C.T., Zhang, Y., Xiao, J., Zhao, Y.P., Tian, J.L., Xu, Y.Y., Feng, Z.G. et Xu, C.Y. (2013) Selection of high efficient transdermal lipid vesicle for curcumin skin delivery. *Int J Pharm*, **454**, 302-309.
- 388 Caddeo, C., Sales, O.D., Valenti, D., Sauri, A.R., Fadda, A.M. et Manconi, M. (2013) Inhibition of skin inflammation in mice by diclofenac in vesicular carriers: liposomes, ethosomes and PEVs. *Int J Pharm*, **443**, 128-136.
- 389 Wang, Y., Su, W., Li, Q., Li, C., Wang, H., Li, Y., Cao, Y., Chang, J. et Zhang, L. (2013) Preparation and evaluation of lidocaine hydrochloride-loaded TAT-conjugated polymeric liposomes for transdermal delivery. *Int J Pharm*, **441**, 748-756.
- 390 Zhang, Y.T., Shen, L.N., Wu, Z.H., Zhao, J.H. et Feng, N.P. (2014) Comparison of ethosomes and liposomes for skin delivery of psoralen for psoriasis therapy. *Int J Pharm*, **471**, 449-452.