



HAL
open science

Étude des mécanismes de translocation du peptide vecteur Pénétratine sur membranes modèles formées à l'interface de gouttes

Pauline Gehan

► **To cite this version:**

Pauline Gehan. Étude des mécanismes de translocation du peptide vecteur Pénétratine sur membranes modèles formées à l'interface de gouttes. Biophysique. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS001 . tel-03939529

HAL Id: tel-03939529

<https://theses.hal.science/tel-03939529v1>

Submitted on 15 Jan 2023

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.

THÈSE DE DOCTORAT
DE SORBONNE UNIVERSITÉ

Spécialité : Biophysique

École doctorale de chimie physique et chimie analytique de Paris Centre

Présentée par

Pauline GEHAN

pour obtenir le grade de :

Docteur de Sorbonne Université

Sujet de la thèse :

**Étude des mécanismes de translocation du peptide vecteur Pénétratine
sur membranes modèles formées à l'interface de gouttes**

Présentée et soutenue publiquement le 14 janvier 2021

devant le jury composé de :

M ^{me} Isabel Alves	Rapporteure
M. Pierre Joseph	Rapporteur
M ^{me} Christine Gourier	Présidente du jury
M. Ivan Lopez-Montero	Examineur
M ^{me} Sophie Cribier	Directrice de thèse
M. Nicolas Rodriguez	Encadrant
M. Kieu Ngo	Invité

Il n'existe que deux espèces de folies contre lesquelles on doit se protéger. L'une est la croyance selon laquelle nous pouvons tout faire. L'autre est celle selon laquelle nous ne pouvons rien faire.

André Brink, *Une saison blanche et sèche*.

La connaissance du réel est une lumière qui projette toujours quelque part des ombres.

Gaston Bachelard, *La formation de l'esprit scientifique*.

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Isabel Alves, Christine Gourier, Pierre Joseph et Ivan Lopez-Montero qui me font l'honneur et le plaisir d'examiner ce travail de thèse.

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire des Biomolécules, dirigé par Sandrine Sagan que je remercie pour son accueil, sa bienveillance et ses conseils avisés.

Je remercie très chaleureusement mes directeurs de thèse Sophie Cribier et Nicolas Rodriguez pour la confiance qu'ils m'ont accordé, aussi bien lorsque je me suis présentée à eux (bien que non physicienne) que tout au long de ces trois années. Je les remercie de m'avoir initiée au monde passionnant de la biophysique. Merci à cheffe Sophie pour son exigence (à tout niveau), ses nombreux conseils et ses petites attentions. Je remercie Nicolas pour sa gentillesse, sa disponibilité, son enthousiasme scientifique et pour avoir répondu avec patience à mes questions. Leur bienveillance, les cafés, le chocolat et les délicieux repas ont largement contribué au bon déroulement de ces trois années.

Mes remerciements vont également à Kieu Ngo qui depuis le Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques a été d'une aide précieuse pour la microfluidique. Je le remercie pour sa gentillesse et son soutien.

Je remercie toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce projet. Je pense aux stagiaires impliqués dans ce projet et en particulier à Marie Razafinimanana qui a apporté une contribution importante à ces travaux. Je la remercie pour son enthousiasme, et l'intérêt porté à ce projet ainsi que pour les belles images de « Blobby ». Je remercie Justine Laurent pour son aide précieuse pour l'écriture directe et sa disponibilité. Merci à Françoise Pillier pour les séances de microscopie électronique à balayage et la qualité de ses clichés. Je remercie également Patrick Fuchs, Raphaëlle Versini, Dror Warschawski et Astrid Walrant pour leur aide et l'apport de leur expertise dans ce projet.

Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire pour la bonne ambiance et la bienveillance qui règnent entre ces murs. Les nombreuses discussions au détour du couloir ou lors d'évènements ont contribué à mon épanouissement dans ce laboratoire. Merci à Jean-Jacques Lacapere et Sylvie Noinville pour leur bonne humeur et leur compagnie en salle de manip 505, sas de ma petite 509. Les discussions entre pièces interposées ont plus d'une fois égaillé des journées d'expériences compliquées. Je remercie bien évidemment tous les membres du pôle 2 pour leur bienveillance, leurs conseils et les discussions autour de ce projet. Mes remerciements vont également à Éliane Moulinié et Karine Gherdi pour le soutien administratif dont elles font preuve et sans qui le laboratoire aurait bien du mal à tourner.

J'ai eu le plaisir d'enseigner au sein de la licence de chimie et à ce titre, je voudrais re-

mercier Christelle Mansuy et Astrid Walrant pour leur confiance et leurs bons conseils qui m'ont permis de m'épanouir pleinement en tant que jeune enseignante.

Bien évidemment, la vie de laboratoire ne serait pas la même sans la présence précieuse des doctorants et doctorantes. Je tiens donc à tous et toutes les remercier pour l'ambiance chaleureuse, pour les apéros, les petits déjeuners de Noël (et les cadeaux), les raclettes, les goûters d'anniversaires et toutes les autres réjouissances quotidiennes. Merci à Agathe et Talen pour les discussions entre deux expériences, les confidences et le réconfort au quotidien. Merci à Mathieu pour son humour et pour partager avec moi les répliques Friends (même si ses scores aux quizz sont bien médiocres). Je remercie du plus profond du coeur mes supers collègues du « bureau des pleurs et des plaintes », Alexandre (mon chouchou, mon râleur préféré, qui m'a accompagné pendant ces trois années), Mathilde, Marinette, Nathalie et Sonia. Merci pour ces moments de détente, le grand n'importe quoi du vendredi après-midi, les réserves de bonbons, votre soutien sans faille et tout l'amour qui règne dans ce bureau. Une pensée à Nathalie pour sa générosité, son humour et ses expressions du Nord qui m'ont plus d'une fois conduite aux larmes, pour son soutien et l'intérêt porté à ce projet et aux « bigouttes ».

Même si la thèse est un investissement permanent, les moments en dehors du laboratoire ont été salutaires. À ce titre, les amis sont d'un soutien infaillible. Je tiens donc à remercier très chaleureusement Léa Pinon pour nos déjeuners (quasi) hebdomadaires, nos discussions, sa bonne humeur constante ainsi que d'avoir répondu patiemment à mes nombreuses questions, quelles soient sur la microfluidique, les émulsions ou encore la fluorescence. Sa culture scientifique ne cessera jamais de m'étonner. Je la remercie pour son soutien constant, ses encouragements et son amitié qui me tient tant à coeur.

Un grand merci à mes copines rouennaises (Lucile, Manon et Margot) pour les apéros-tarots et les week-ends qui vident l'esprit et emplissent le coeur. Je tiens à remercier les copains de la bande de « Nanterre » pour leur soutien, leurs questions et débats alambiqués de sociologues, les parties enflammées de Codes Names et tous les bons moments partagés autour d'un verre ou d'un bon repas (mention spéciale au Ceviche de Mauricio). Une pensée particulière pour Sarah Escamilla, qui s'est penchée sur le vaste sujet des femmes en sciences et qui à ce titre s'est d'autant plus intéressée à mon travail de thèse.

Je ne serais arrivée là sans le soutien et les encouragements de ma famille. Ma reconnaissance et mon affection vont à mes parents et à ma soeur. Une pensée toute particulière à ma maman, son exigence et son amour ont été les éléments clés de ma réussite. Je ne peux trouver les mots pour la remercier.

Enfin, je remercie Nicolas qui par sa patience, son attention et son amour m'a soutenue tout au long de cette thèse et de ces années. Tu as su me guider et me transmettre ton exigence et ton goût du travail bien fait. Merci d'avoir toujours cru en moi, je ne sais pas si j'y serais arrivée sans toi. Merci Nicolas d'emplir mon quotidien de tendresse et de bienveillance. La vie est bien plus douce à tes côtés.

Table des matières

Remerciements	v
Introduction générale	1
Partie I Introduction	3
Chapitre 1 – La membrane plasmique	5
1.1 Les lipides membranaires	6
1.1.1 Les différentes classes de lipides	6
1.1.2 Organisation et propriétés des lipides	9
1.1.3 Asymétrie et dynamique de la membrane	11
1.2 Les protéines liées à la membrane	14
1.2.1 Les protéines intégrales	14
1.2.2 Les protéines périphériques	15
1.3 Les sucres de surface	16
1.3.1 Glycolipides	16
1.3.2 Glycoprotéines et protéoglycanes	16
1.4 Perméabilité et transport	17
1.4.1 Petites molécules et ions : canaux et transporteurs	18
1.4.2 Trafic vésiculaire et endocytose	19
Chapitre 2 – Les peptides de pénétration cellulaire	23
2.1 Découverte des peptides vecteurs	24
2.1.1 Le peptide Pénétratine	24
2.1.2 Le peptide Tat	25
2.2 Études structure-activité	26
2.2.1 Les polyarginines	26
2.2.2 Les peptides RW et RL	27
2.3 Internalisation des CPP	29
2.3.1 Translocation et endocytose	29
2.3.2 Les partenaires membranaires des CPP	30
2.3.3 Les mécanismes de translocation	34
Chapitre 3 – Modéliser la membrane plasmique	41
3.1 Modèles de membranes	41
3.1.1 Les liposomes	42

3.1.2	Les bicouches planes	43
3.1.3	Accéder à des modèles de bicouches asymétriques	45
3.2	Les bicouches à l'interface de gouttes	51
3.2.1	Formation d'émulsions adhésives	52
3.2.2	Description de l'adhésion	54
3.2.3	Stabilité des bicouches	55
3.3	Les bicouches à l'interface de gouttes comme modèles de membranes	58
3.3.1	Mesures électriques	59
3.3.2	Insertion de protéines et asymétrie lipidique	60
3.3.3	Les bicouches à l'interface de gouttes comme modèles d'étude des peptides membranotropes	62
 Partie II Étude de la Pénétratine sur bicouches formées à l'interface de gouttes		67
 Chapitre 4 – Étude de la translocation de la Pénétratine sur bicouches à l'interface de gouttes		69
4.1	Formulation et caractérisation du système	70
4.1.1	Principe des expériences	70
4.1.2	Formulation des émulsions	71
4.1.3	Caractérisation	72
4.1.4	Quantification de la translocation	74
4.2	Étude de la translocation sur bicouches symétriques	74
4.2.1	Influence de la charge des lipides	74
4.2.2	Nature de la tête polaire	78
4.2.3	Influence de la concentration en peptide	79
4.2.4	Conclusion	80
4.3	Étude de la translocation sur bicouches asymétriques	80
4.3.1	Bicouches asymétriques POPG/POPC	80
4.3.2	Bicouches asymétriques POPG/POPS	82
4.3.3	Conclusion	83
4.4	Discussion	84
4.4.1	La nature de la tête polaire des lipides anioniques impacte la translocation	84
4.4.2	Implication du feuillet distal	85
4.4.3	Mécanisme(s) de translocation	85
4.5	Vers un système biomimétique	88
4.5.1	Implication du PIP ₂	88
4.5.2	Les sucres de surface, premiers partenaires membranaires à la surface des cellules	91
4.6	Conclusion du chapitre	93
 Chapitre 5 – Mesures électriques sur bicouches à l'interface de gouttes		95
5.1	Caractérisation des bicouches	96
5.1.1	Propriétés électriques de la membrane	96
5.1.2	Dispositif expérimental et caractérisation des bicouches	98
5.2	Simulation du potentiel en présence de Pénétratine	100
5.2.1	Potentiel de membrane et translocation	100
5.2.2	Taux de recouvrement de la membrane	101

5.2.3	Estimation du potentiel en présence de Pénétratine	103
5.3	Mesure du potentiel de membrane sur bicouches	107
5.3.1	Principe et mesures	107
5.3.2	Discussion	109
5.4	Conclusion et perspectives	110
 Partie III La microfluidique pour la formation de bicouches à l'interface de gouttes		111
 Chapitre 6 – Introduction à la microfluidique		115
6.1	Physique des écoulements à l'échelle micrométrique	116
6.1.1	Nombre de Reynolds	116
6.1.2	Résistance hydrodynamique	117
6.1.3	Formation de gouttelettes en système microfluidique	117
6.2	La microfabrication	121
6.2.1	La photolithographie	122
6.2.2	L'écriture directe	125
6.2.3	La lithographie "molle"	126
 Chapitre 7 – Développement d'une puce microfluidique pour la formation de bicouches à l'interface de gouttes		129
7.1	Choix de la géométrie des pièges	130
7.1.1	Principe général	130
7.1.2	Exemples de géométries de pièges testées	131
7.1.3	Le piégeage hydrodynamique	134
7.2	Première génération de puces	137
7.2.1	Retour sur la géométrie 3	137
7.2.2	Modifications et dimensionnement	137
7.2.3	Évaluation de la tension de surface des émulsions	141
7.2.4	Discussion	144
7.3	Seconde génération de puces	144
7.3.1	Nouvelles dimensions	145
7.3.2	Traitements de surfaces	147
7.3.3	Discussion	151
7.4	Conclusion et perspectives	151
 Conclusion générale		153
 Matériels et méthodes		157
 Bibliographie		173
 Publications		187

Introduction générale

Les peptides de pénétration cellulaire également appelés peptides vecteurs ou CPP (« Cell-Penetrating peptides ») sont de courts peptides, composés au plus d'une trentaine d'acides aminés, qui se caractérisent par leur capacité à traverser les membranes cellulaires. Ils sont capables de transporter des cargaisons au sein des cellules avec une faible cytotoxicité et présentent donc un intérêt particulier pour la biologie appliquée ou fondamentale (délivrance de médicaments, imagerie cellulaire, etc.). Leur internalisation a lieu par endocytose et translocation directe. Ces mécanismes sont concomitants et leur proportion varie selon la concentration en peptide, sa nature, la lignée cellulaire étudiée, les conditions physico-chimiques (température, pH), etc. L'endocytose est un mécanisme dépendant de l'ATP au cours duquel les molécules sont acheminées au sein des cellules *via* le trafic vésiculaire. Au contraire, la translocation directe est un mécanisme indépendant de l'ATP et des récepteurs au cours duquel les molécules et leur cargaison rejoignent directement le cytosol des cellules. La première étape de ce mécanisme implique l'interaction électrostatique du peptide avec des partenaires anioniques de la membrane plasmique. Cependant, bien que plusieurs modèles aient été proposés pour expliquer le passage de tels peptides à travers la membrane plasmique, ils restent hypothétiques et la (ou les) structure(s) clés de ces mécanismes n'ont pu être clairement identifiées.

L'objectif de cette thèse vise à obtenir une description des étapes clés de la translocation après liaison du peptide à la membrane et à dégager des pistes de description de la déstabilisation de celle-ci. Pour ce faire, nous étudions la translocation du peptide vecteur Pénétratine sur un modèle de membrane original formé à l'interface de gouttes.

Ce manuscrit débute par une partie introductive, composée de trois chapitres, qui fournit au lecteur une description détaillée de la membrane plasmique (chapitre 1), détaille la littérature relative à la compréhension des mécanismes de translocation des peptides vecteurs (chapitre 2) et rend compte des modèles de membranes propices à l'étude de ces phénomènes (chapitre 3). Le modèle de membrane utilisé durant cette thèse est exposé, de même que des exemples d'applications pour l'étude de peptides membranotropes.

La deuxième partie expose les principaux résultats de l'étude de la translocation du peptide vecteur Pénétratine sur ce modèle de membrane. La distinction entre le recrutement du peptide à la membrane et son internalisation est soulevée. De plus, l'étude sur bicouches de

compositions asymétriques révèle l'implication des lipides du feuillet distal (feuillet interne) dans le processus de translocation. Ces résultats sont détaillés dans le chapitre 4. Au cours du chapitre 5, nous nous intéressons au comportement électrique des bicouches notamment afin de caractériser les membranes et d'étudier l'influence de la liaison du peptide à la membrane sur le potentiel transmembranaire et la déstabilisation de la bicouche.

Enfin, la troisième partie présente le développement d'une puce microfluidique ayant pour objectif de contrôler la formation des gouttes et leur appariement afin d'obtenir une plateforme performante pour l'étude de la translocation sur bicouches à l'interface de gouttes. La méthodologie employée afin de développer cet outil est exposée au chapitre 7, précédé d'une brève introduction à la microfluidique (chapitre 6).

Première partie

Introduction

Chapitre 1

La membrane plasmique

La membrane plasmique a pour rôle principal de séparer l'intérieur de la cellule, le milieu intracellulaire, de son environnement. Cette propriété de compartimentation est conférée par la présence d'une bicouche de phospholipides. Celle-ci, d'environ 5 nm d'épaisseur, comprenant un coeur hydrophobe, constitue une barrière fortement imperméable aux molécules hydrophiles. Elle permet ainsi le maintien des concentrations en ions dans le milieu intracellulaire dont la composition est très différente de celle du milieu extracellulaire.

Cependant, les échanges sont essentiels à la survie de la cellule. Tandis que les petites molécules hydrophobes diffusent facilement à travers la membrane, pour la plupart des autres molécules, la membrane constitue une barrière pratiquement imperméable. Sa traversée est alors facilitée par des protéines insérées dans la bicouche lipidique (figure 1.1). Celles-ci assurent le transport de molécules vers l'intérieur ou l'extérieur de la cellule. D'autres protéines de la membrane interviennent quant à elles davantage dans les processus intracellulaires ou l'interaction avec l'environnement. À la surface des cellules, on trouve également des glucides sous forme de glycoconjugués associés aux protéines (glycoprotéines) ou aux lipides (glycolipides) (figure 1.1). Ils forment l'enveloppe la plus externe de la membrane, le glycocalyx. Ils sont notamment impliqués dans les processus de reconnaissance et les interactions cellulaires et moléculaires.

La membrane plasmique est une entité dynamique. En effet, les lipides sont mobiles et peuvent diffuser latéralement. Le modèle de la mosaïque fluide a été proposé en 1972 par Singer et Nicolson [Singer and Nicolson, 1972] pour représenter cette dynamique. Ce modèle a depuis été compléxifié notamment par la mise en évidence de l'existence de micro-domaines lipidiques, induisant des régions plus ou moins rigides et ordonnées, dont la taille et la durée de vie sont encore débattues. Ces observations amènent alors à penser la membrane comme une mosaïque structurée et dynamique et non plus comme purement fluide [Vereb et al., 2003].

Au cours de ce chapitre, seront détaillés les différents éléments évoqués ci-dessus. L'organisation et les propriétés de la bicouche lipidique seront particulièrement détaillées (1.1). La perméabilité de la membrane (1.4) sera également un élément clé de ce chapitre.

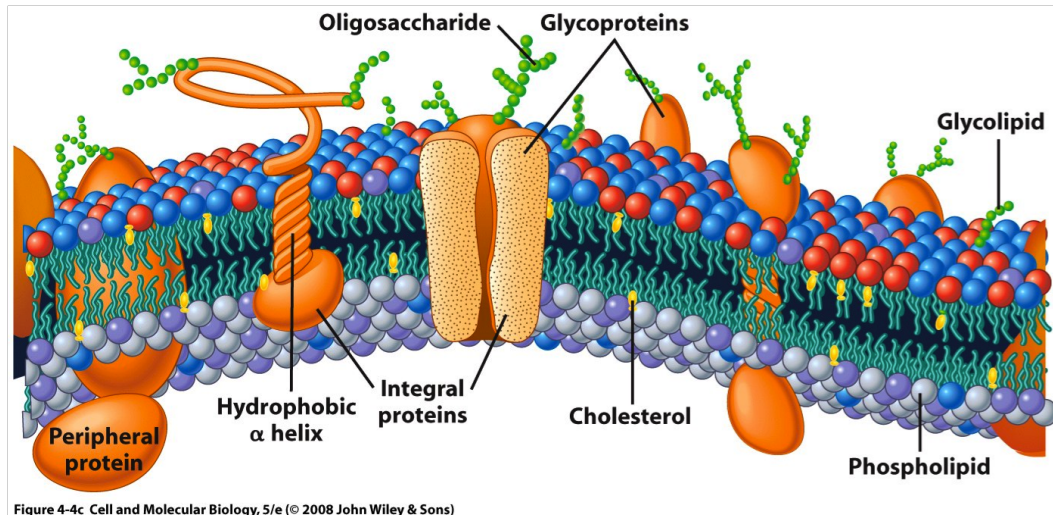


FIGURE 1.1 – Représentation de la membrane mosaïque fluide. Elle tient compte de l'hétérogénéité des constituants et de la répartition asymétrique des lipides entre le feuillet interne et le feuillet externe de la membrane.

1.1 Les lipides membranaires

Les lipides sont les constituants majeurs de la membrane plasmique. Ils ont comme rôle premier de former une bicouche imperméable autour du cytoplasme des cellules. Ils permettent l'ancrage de protéines et influent sur leurs fonctions par des interactions spécifiques. La structure des différents lipides, leurs propriétés physico-chimiques, leur organisation et leur mobilité dans la membrane seront présentées au cours de cette section.

1.1.1 Les différentes classes de lipides

Les glycérophospholipides

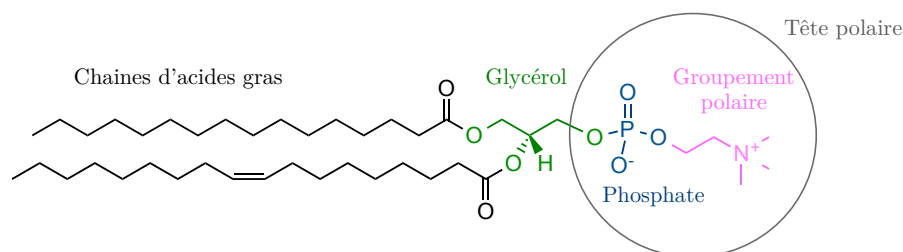


FIGURE 1.2 – Structure générale des glycérophospholipides. Sont représentés en noir les acides gras, en vert le groupement glycérol, en bleu le groupement phosphate et en rose le groupement polaire variable (ici la choline). La 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) est représentée ici.

Les glycérophospholipides représentent la majorité des lipides de la membrane plasmique. Il s'agit de molécules de glycérol estérifiées par deux acides gras et un phosphate. On appelle cette unité de base : l'acide phosphatidique (PA). Le groupement phosphate porte un groupement polaire qui varie selon la nature du phospholipide (figure 1.2) et définit alors la charge globale du lipide. En effet, le pKa du groupement phosphate étant compris entre 1 et 2, il est chargé négativement à pH physiologique. Ainsi, on distingue les lipides anioniques (PS, PG, PI, PA : voir figure 1.3) qui possèdent un groupement polaire globalement neutre et les lipides zwitterioniques (PC, PE) pour lesquels le groupement polaire est chargé positivement (à pH physiologique).

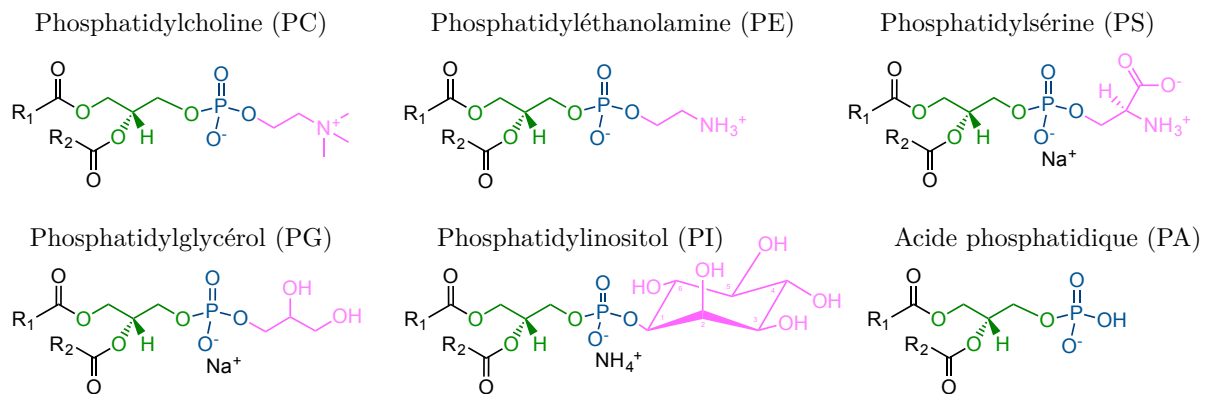


FIGURE 1.3 – Représentation des différentes têtes polaires des glycérophospholipides. Les acides gras sont représentés en noir avec R_1 et R_2 les chaînes carbonées saturées ou insaturées.

Les lipides zwitterioniques de type phosphatidylcholine (PC) sont les plus abondants de la membrane plasmique. Ils représentent plus de 50% des phospholipides de la membrane de cellules eucaryotes et 75% d'entre eux se trouvent sur le feuillet externe. Les phospholipides à tête polaire éthanolamine (PE) sont également zwitterioniques et sont présents majoritairement sur le feuillet interne.

Les lipides anioniques sont davantage présents sur le feuillet interne des membranes. Parmi eux, les phosphatidylsérines (PS) sont les lipides anioniques les plus abondants. L'acide phosphatidique (PA) et les phosphatidylinositols (PI) ne sont présents qu'en faibles quantités. Les dérivés de PI, phosphorylés au niveau des groupements hydroxyles de l'inositol, peuvent ainsi porter plusieurs charges négatives. Enfin, les lipides de type phosphoglycérol (PG) sont absents de la membrane plasmique des cellules eucaryotes mais sont des composants importants des membranes bactériennes.

En plus de la diversité des têtes polaires, il existe une grande hétérogénéité des chaînes d'acides gras composant les phospholipides. Ceci est dû, d'une part, à la disparité de longueur de chaînes et, d'autre part, à la présence possible d'insaturations sur les chaînes carbonées. En effet, les cellules eucaryotes peuvent comporter des chaînes d'acides gras possédant jusqu'à 26

carbones avec des combinaisons diverses de chaînes saturées et/ou insaturées. Les chaînes les plus couramment rencontrées possèdent 16, 18 ou 20 carbones. Les longues chaînes carbonées apportent de la rigidité à la bicouche. La majorité des lipides membranaires possèdent une chaîne saturée et une chaîne insaturée. Les doubles liaisons sont majoritairement en configuration *cis* pour les lipides naturels, les chaînes sont donc plus fluides, peu orientées et empêchent le compactage ordonné.

Les sphingolipides

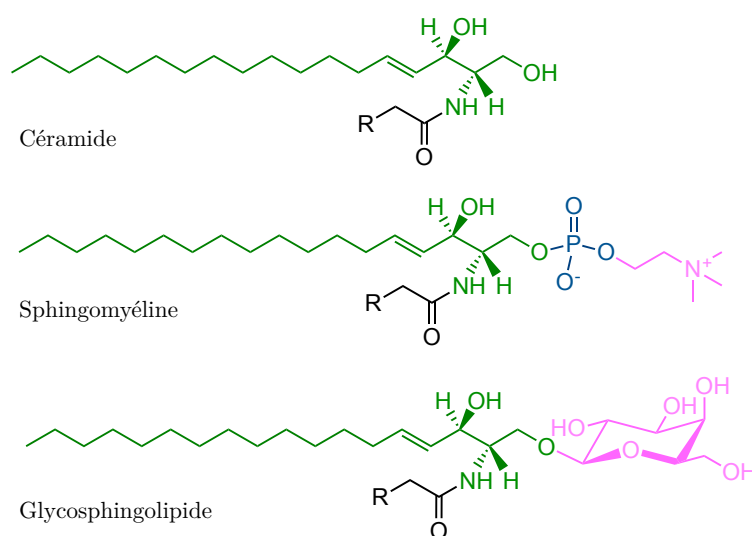


FIGURE 1.4 – Structure des sphingolipides. La sphingosine est représentée en vert, l'acide gras (R) en noir, le groupement phosphate en bleu et les têtes polaires en rose.

Les sphingolipides sont constitués d'une unité de base, le céramide, composé d'une sphingosine reliée à un acide gras par une liaison amide (figure 1.4). Les phosphosphingolipides sont constitués d'un céramide, d'un groupement phosphate et d'une tête polaire. La sphingomyéline, composée d'une tête choline, est le plus abondant de ceux-ci (figure 1.4). Sa présence est corrélée à de nombreuses fonctions de signalisation cellulaire. Par exemple, la dégradation de la sphingomyéline en céramide est impliquée dans le signalement de l'apoptose de cellules épithéliales [Slotte and Ramstedt, 2007]. On distingue également les glycosphingolipides qui se composent d'un céramide glycosylé (une ou plusieurs fois) (figure 1.4). Ils sont présents dans toutes les membranes plasmiques de cellules animales et représentent environ 5% des lipides de la monocouche externe. Il existe une grande variété de structure de glycosphingolipides. Ce sont des antigènes spécifiques du type cellulaire et du stade de développement, ce qui en fait des effecteurs essentiels de la reconnaissance cellulaire et de la modulation de la signalisation transmembranaire [Hakomori and Igarashi, 1995].

Les stérols

Les stérols sont constitués d'un noyau d'hydrocarbure cyclique portant un groupement hydroxyle. Ce noyau d'hydrocarbures cycliques lui confère une grande rigidité. Le cholestérol est le plus répandu des stérols dans les membranes plasmiques eucaryotes. On en retrouve une quantité importante pouvant atteindre jusqu'à 30% de la masse des lipides. Cette structure s'intercale entre les phospholipides avec son groupement hydroxyle situé à proximité des têtes polaires des phospholipides. Les noyaux stéroïdes interagissent avec les chaînes carbonées des phospholipides et diminuent leur mobilité.

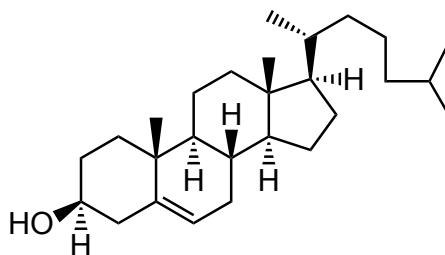


FIGURE 1.5 – Structure du cholestérol. Le groupement hydroxyle constitue la tête polaire de ce lipide.

1.1.2 Organisation et propriétés des lipides

La membrane plasmique est un système auto-organisé en raison des propriétés physico-chimiques des lipides qui sont ses principaux constituants (plus de 50% en masse). Ce sont des molécules amphiphiles dont les chaînes carbonées forment le domaine hydrophobe et les têtes polaires le domaine hydrophile. Les interactions défavorables entre chaînes d'acides gras et molécules d'eau entraînent l'assemblage de ces molécules amphiphiles afin de minimiser la surface hydrophobe exposée. Il s'agit de l'effet hydrophobe responsable de la cohésion des chaînes d'acides gras sous formes d'agrégats lorsqu'ils se trouvent en solution. L'organisation des lipides sous forme d'agrégats minimise l'énergie si le gain énergétique lié à l'effet hydrophobe compense la perte entropique due à la ré-organisation des molécules d'eau. Les lipides s'auto-organisent alors selon leur nature.

Le modèle d'Israelachvili permet de prévoir le type d'assemblage selon la nature des lipides grâce au paramètre d'empilement $V/l.S$ avec V le volume occupé par les chaînes grasses de longueur L , et S la surface occupée par la tête polaire à l'interface. Les différentes formes de lipides et leurs assemblages sont représentés dans la table 1.1. Si le paramètre critique d'empilement est inférieur à $1/3$ comme c'est le cas pour les lipides à chaînes courtes, les lipides ont une forme de cône et adoptent une structure sous forme de micelles (sphériques ou cylindriques). Si le paramètre est aux alentours de 1, les lipides ont une forme cylindrique et s'assemblent sous la forme d'une bicouche, appelée phase lamellaire. Enfin, si le paramètre est supérieur à 1, comme c'est le cas des lipides PE (petite tête polaire) et à chaînes insaturées,

les lipide possèdent une forme de cône inversé et s'associent sous forme de micelles inverses. Les membranes de cellules eucaryotes sont composées en majorité de lipides à tête PC de forme cylindrique. Elles s'organisent donc sous forme de bicouches lamellaires [Israelachvili et al., 1980].

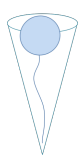
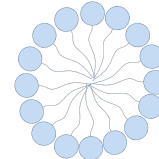
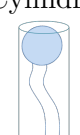
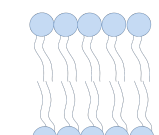
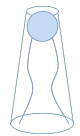
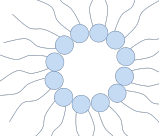
Lipides	V/l.S	Forme	Phase
Chaînes courtes Détergents Lysophospholipides	$<1/3$	Cône 	Micelle 
Lipides à deux chaînes, tête polaire encombrante (PC, SM, PS, PI, PG, PA)	~ 1	Cylindre 	Bicouche 
Tête polaire peu encombrante, chaînes insaturées (PE chaînes insaturées)	>1	Cône inverse 	Micelle inverse 

TABLE 1.1 – Assemblages des lipides en fonction de la forme et du paramètre d'empilement $V/l.S$ selon le modèle d'Israelachvili. Adapté de [Israelachvili et al., 1980].

Dépendante de paramètres tels que la température, l'hydratation, le pH ou encore la force ionique, la phase lamellaire existe sous différentes formes. En phase gel, c'est-à-dire à basses températures, les chaînes grasses sont orientées en configuration *trans* et le compactage est optimal. Les chaînes sont étendues au maximum ce qui forme une bicouche épaisse. L'angle d'inclinaison des chaînes, par rapport au plan de la bicouche, augmente avec l'hydratation des têtes. Ces deux paramètres contribuent à la diminution de l'épaisseur de la bicouche. En augmentant la température au-delà de la température de transition (T_m), les lipides s'organisent sous forme de phase lamellaire fluide (figure 1.6). L'augmentation de la température entraîne l'apparition de défauts dans les chaînes hydrophobes ce qui induit une diminution de l'organisation des lipides. Les chaînes d'acides gras sont alors moins étendues qu'en phase gel et la bicouche est ainsi légèrement plus fine.

La température de transition est influencée par la nature des chaînes d'acides gras des lipides. Pour une tête polaire donnée et des chaînes saturées, elle est d'autant plus élevée que la chaîne est longue. Cela est lié à l'augmentation des interactions de Van der Waals entre

lipides adjacents. Il faut donc augmenter l'agitation thermique pour désorganiser les chaînes. La présence d'insaturations, va elle, au contraire, diminuer les interactions entre chaînes en entraînant des défauts et une diminution des interactions de Van der Waals. La température de transition sera donc abaissée (par rapport à une chaîne saturée de même longueur).

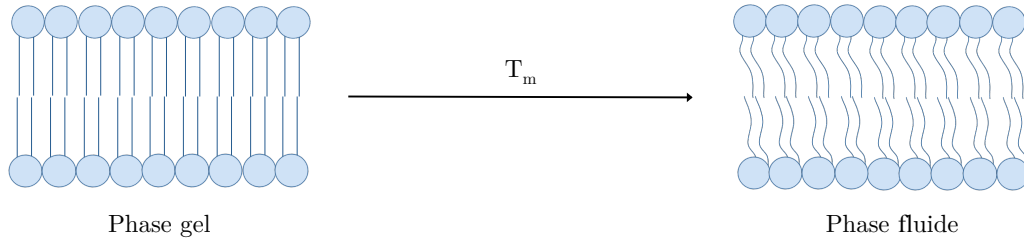


FIGURE 1.6 – Transition de phases gel-fluide dans une phase lamellaire.

1.1.3 Asymétrie et dynamique de la membrane

La membrane plasmique sépare deux environnements, le cytosol et le milieu extracellulaire, au sein desquels prennent place des fonctions cellulaires très différentes. Cette disparité fonctionnelle se reflète dans la disparité de composition lipidique des deux feuillettes. On parle alors d'asymétrie transverse. Pour les mêmes raisons, leur répartition n'est pas statique.

Asymétrie lipidique

Le feuillet externe de la membrane plasmique est majoritairement composé de lipides zwitterioniques tels que la phosphatidylcholine et la sphingomyéline ainsi que quelques pourcents de glycosphingolipides neutres ou anioniques. En revanche, le feuillet interne est principalement composé de lipides à tête éthanolamine et de lipides anioniques, tels que la phosphatidylsérine, l'acide phosphatidique, le phosphatidylinositol et ses dérivés phosphorylés, ce qui lui confère de nombreuses charges négatives. La distribution des lipides entre les deux feuillettes de la bicouche d'une membrane d'érythrocyte humain est représentée sur la figure 1.7.

La distribution du cholestérol repose sur son affinité avec les différents composants de la membrane (protéines et lipides). Cependant, en raison de sa petite tête polaire, cette molécule est capable de diffuser transversalement entre les deux feuillettes. Les différentes études menées afin de déterminer sa localisation et ses proportions sur chaque feuillet ont conduit à des conclusions incohérentes. En conséquence, bien que l'on soit sûr que le cholestérol puisse être présent sur les deux feuillettes, sa distribution reste incertaine [Steck and Lange, 2018].

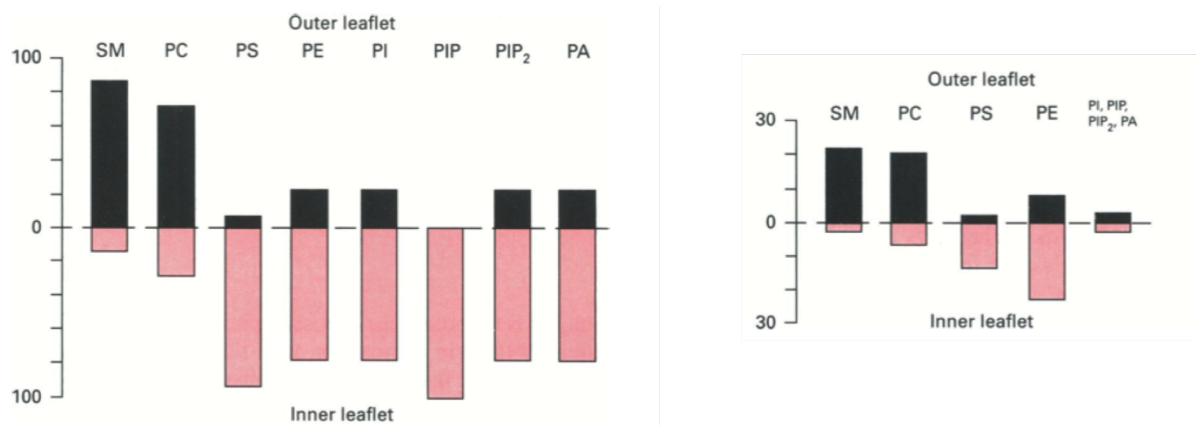


FIGURE 1.7 – Distribution des phospholipides entre les deux feuillets de la membrane plasmique d'érythrocytes humains. À gauche, la distribution est donnée en pourcentage de chaque phospholipide. À droite, la distribution est donnée en pourcentage total des phospholipides [Zachowski, 1993].

L'asymétrie lipidique est essentielle dans le maintien de nombreux processus cellulaires. En effet, nous verrons au cours de la section suivante que les lipides sont fortement impliqués dans le maintien des protéines membranaires grâce aux interactions avec celles-ci. Ainsi, les interactions entre la PS du feuillet interne et les protéines du cytosquelette sont importantes pour la stabilité mécanique des globules rouges. En raison de leur forme en cône inversé, la présence de lipides PE sur le feuillet interne est essentielle à la formation d'invaginations impliquées dans les processus de transport et de fusion membranaire. L'apparition de PS sur le feuillet externe est un signe d'apoptose et permet aux cellules phagocytaires de reconnaître les cellules qui les exposent [Fadok et al., 1998; Erwig and Henson, 2008].

Diffusion transverse

La synthèse des lipides a lieu dans le réticulum endoplasmique du côté cytoplasmique de sa membrane. Les lipides nouvellement synthétisés rejoignent le feuillet interne de la membrane plasmique. Ainsi, certains lipides, doivent être pris en charge pour être redistribués du côté exoplasmique de la membrane. Les cellules sont ainsi munies de protéines de transport qui permettent cette redistribution des phospholipides. C'est notamment le cas pour les phosphatidylcholines [Bishop and Bell, 1985] présents majoritairement sur le feuillet externe. Cependant, l'asymétrique répartition des lipides génère une bicouche dans un état hors équilibre et qui tend donc à une redistribution symétrique des lipides. Ils sont ainsi capables de diffuser d'un feuillet à l'autre. Ce phénomène, appelé *flip-flop*, est très lent (temps caractéristique : 10^{+5} s) car le passage de la tête polaire à travers la bicouche hydrophobe est énergétiquement défavorable (figure 1.8). Cette diffusion peut pousser à une redistribution symétrique des lipides sur les feuillets et ainsi entraver la signalisation cellulaire. La présence de protéines transportant les lipides d'un feuillet à l'autre est donc importante pour l'établissement et le maintien de l'asymétrie [Daleke, 2003]. Le passage d'un lipide du feuillet

externe au feuillet interne (*flip*) peut être pris en charge par des flippases, de même que le passage du feuillet interne au feuillet externe (*flop*) est assuré par des floppases (figure 1.8). Ces enzymes sont dépendantes d'un apport en énergie (ATP ou autre) et sont spécifiques de certains lipides.

Les flippases, autrement appelées aminophospholipides translocases, sont hautement sélectives des lipides PS et catalysent leur translocation du feuillet externe vers le feuillet interne de la membrane plasmique [Seigneuret and Devaux, 1984]. Elles sont donc impliquées dans le maintien de l'asymétrie. Il existe différents types de floppases, de moindre spécificité, qui prennent chacune en charge un ou deux types de lipides [Daleke, 2003]. Notamment, la floppase ABCC1 prend en charge les lipides PC ainsi que les sphingolipides. Ces enzymes sont donc impliquées dans le maintien de la distribution des lipides après leur synthèse au sein de la cellule.

Les scramblases participent à la diffusion des lipides d'une monocouche à l'autre. Contrairement aux flippases et floppases, elles sont indépendantes de l'ATP mais dépendantes de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} . En condition normale, le compartiment cytosolique de la cellule possède une très faible quantité de Ca^{2+} , les scramblases sont alors peu actives. Lors de l'augmentation de la concentration cytosolique en Ca^{2+} , ces protéines catalysent la translocation des lipides du feuillet interne vers le feuillet externe et inversement. Ces enzymes jouent un rôle important dans la réorganisation de la membrane en réponse aux stimulations cellulaires puisqu'elles accompagnent notamment l'activation de l'apoptose par l'exposition des phospholipides PS sur le feuillet externe de la membrane plasmique [Erwig and Henson, 2008].

Diffusion latérale

La diffusion latérale d'un lipide par mouvement brownien dans le feuillet où il se trouve correspond à l'échange avec son voisin (figure 1.8). Contrairement à la translocation d'un feuillet à l'autre, ce mouvement est très rapide (temps caractéristique : 10^{-7} s). La présence de protéines diminue la diffusion latérale des lipides car ils doivent les « contourner » pour pouvoir diffuser. On observe également des différences de coefficients de diffusion entre les deux feuillets d'une même membrane en raison de l'asymétrie lipidique. La diffusion est plus rapide sur le feuillet cytoplasmique que sur le feuillet exoplasmique. Les chaînes d'acides gras des lipides PS et PE présents sur le feuillet interne sont davantage insaturées que les chaînes de PC et de la sphingomyéline localisés sur le feuillet externe [Zachowski, 1993].

Cette diffusion latérale des lipides remet en cause le modèle de la mosaïque fluide proposé par Singer et Nicolson décrivant la distribution homogène des lipides sur les feuillets. En effet, la présence de protéines peut induire des interactions préférentielles avec certains lipides et ainsi créer des petites régions enrichies en certains lipides. Cette hétérogénéité parfois caractérisée par le terme de « domaine », a été observée sur bicouches modèles et correspond à une séparation de phase des lipides. Cependant, ces modèles ne reflètent pas toute la disparité

de nature des lipides et la présence de protéines des membranes biologiques. Le modèle des radeaux lipidiques a été proposé en 1997 comme étant des domaines de très petites tailles (10-200 nm) et de durée de vie très courte (100 ms) [Simons and Ikonen, 1997; Brown and London, 1997]. Finalement, ces domaines enrichis en sphingolipides et cholestérol n'ont pu être observés et leur existence reste très contestée.

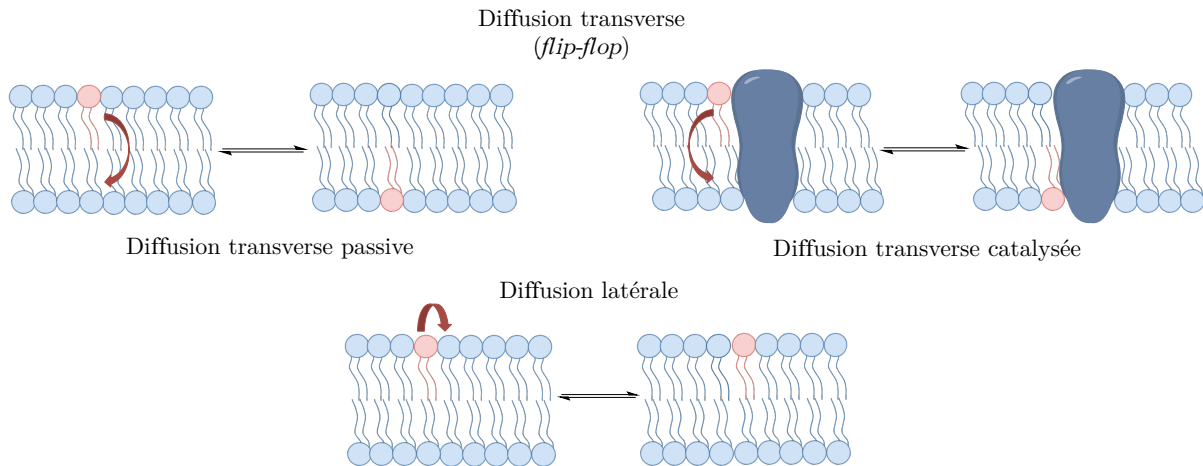


FIGURE 1.8 – Représentation schématique des différents mouvements de diffusion des phospholipides.

1.2 Les protéines liées à la membrane

La présence de protéines associées à la membrane est indispensable aux échanges de la cellule avec son milieu extérieur ainsi que pour la communication intercellulaire. Les fonctions d'une lignée cellulaire donnée se reflètent dans le type et la proportion de protéines associées à sa surface. Parmi les fonctions de ces protéines, certaines présentes sur le feuillet externe facilitent la liaison à des molécules exogènes (protéines de signalisation, ions, glucose..) qui induisent différentes réponses cellulaires. Certaines sont insérées dans la bicouche et forment des canaux ou des pores qui assurent le transport de molécules à travers la membrane plasmique. D'autres, présentes sur le feuillet interne, permettent l'ancrage de protéines (protéines du cytosquelette par exemple) et assurent les processus de signalisation intracellulaire.

1.2.1 Les protéines intégrales

Les protéines intégrales sont amphiphiles. Elles possèdent une partie hydrophobe qui permet l'ancrage dans la membrane et une partie hydrophile en contact avec le cytosol et/ou le milieu extracellulaire. Elles peuvent être constituées d'un ou plusieurs domaines hydrophobes repliés en hélices α ou en feuillets β . Ces protéines peuvent également être liées de façon covalente avec les lipides par une liaison amide entre l'extrémité aminoterminal et l'acide gras ou par liaison thioester entre une cystéine et un groupement prényle. L'ancrage peut

également se faire grâce à un lipide portant un ou plusieurs saccharides, comme dans le cas des ancrés glycosylphosphatidylinositols (GPI) qui sont présents sur le feuillet externe de la membrane (figure 1.9).

Les domaines transmembranaires traversent la bicouche lipidique et présentent une extrémité hydrophile de chaque côté (figure 1.9). Ainsi, certaines protéines sont capables de prendre en charge des molécules et de les transporter à travers la membrane. Les protéines insérées uniquement dans les monocouches sont quant à elles souvent impliquées dans les processus de signalisation cellulaire.

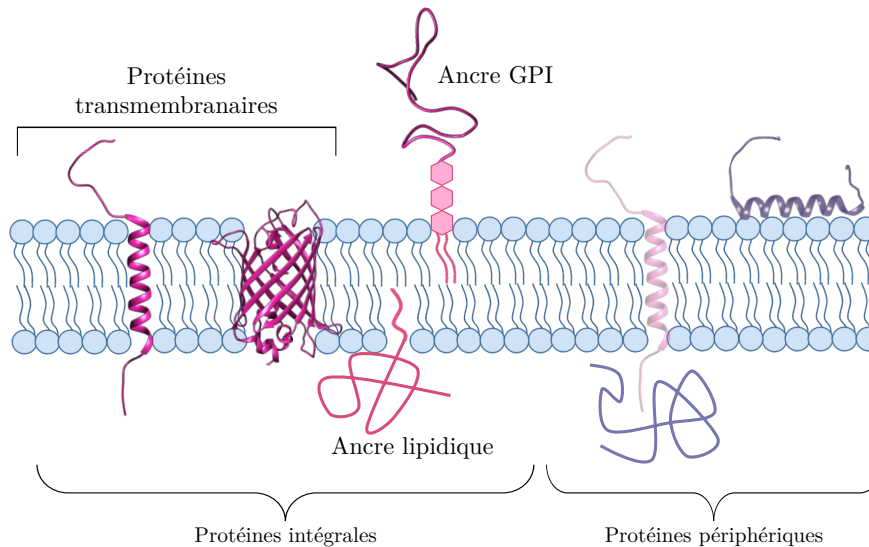


FIGURE 1.9 – Les différentes classes de protéines liées à la membrane. On distingue les protéines intégrales (ou membranaires), ancrées dans la membrane, et les protéines périphériques, à la surface de la membrane. Parmi les protéines intégrales, on trouve des protéines transmembranaires (hélices α , tonneaux β), des protéines liées par une ancre GPI, ou liées à un lipide. Les protéines périphériques sont liées à la membrane par des interactions non covalentes avec des protéines transmembranaires ou par interaction avec les têtes polaires des phospholipides.

1.2.2 Les protéines périphériques

Les protéines périphériques ne sont pas ancrées de façon permanente dans la membrane [Goñi, 2002]. Elles s’y lient, et restent à l’interface, par des interactions électrostatiques avec les têtes polaires des lipides ou par association à des protéines intrinsèques. Elles peuvent être localisées sur le feuillet extracellulaire ou intracellulaire.

L’association des protéines périphériques avec les phospholipides est facilitée par l’interaction électrostatique entre un résidu basique de la protéine et la tête polaire d’un lipide anionique. La liaison à la membrane peut également être promue par l’insertion d’un résidu hydrophobe de la protéine dans la bicouche. Ces interactions peuvent revêtir un caractère permanent ou transitoire. Il existe, par exemple, des enzymes qui ont besoin de se lier à la membrane pour exercer leur activité enzymatique [Burn and Dalle Carbonare, 1997].

1.3 Les sucres de surface

Les glycoconjugués sont les troisièmes constituants essentiels de la membrane plasmique. Ils forment le glycocalyx, l'enveloppe la plus externe de la membrane. Ils sont ainsi impliqués dans les processus de reconnaissance et d'interactions cellulaires et moléculaires ainsi que dans les processus de signalisation cellulaire. Leur liaison à la membrane plasmique se fait par liaison covalente avec les lipides (glycolipides) ou avec les protéines (glycoprotéines et protéoglycane). La diversité de nature des glycanes provient de la composition des monosaccharides les constituant (galactose, glucose, mannose, etc.) et de leurs dérivés (N-acétylgalactosamine, etc.), de la nature de la liaison entre les sucres, des anomères, des autres substitutions (sulfatations), de la nature de leur partie non glucidique (partie aglycone) et du type de liaison avec celle-ci. La diversité de la nature des glycoconjugués est représentée sur la figure 1.10.

1.3.1 Glycolipides

Les glycolipides portent un ou plusieurs saccharides. Parmi eux, les glycosylphosphatidylinositols (GPI) sont composés d'un phosphatidylinositol lié par un groupement hydroxyl à un polysaccharide. Celui-ci est lié à l'acide aminé C-terminal d'une protéine *via* un groupement phosphate éthanolamine. Les GPI sont présents sur le feuillet externe de la membrane plasmique et sont importants pour l'ancrage des protéines. En effet, 20% des protéines attachées au feuillet externe de la membrane plasmique eucaryote le sont par une unité glycosylphosphatidylinositol. On trouve également des sucres reliés à l'unité céramide, les glycosphingolipides. Parmi eux, les gangliosides sont composés d'oligosaccharides avec un ou plusieurs résidus d'acides sialiques. La présence de ces résidus leur confère une charge nette négative qui confère des propriétés de reconnaissance cellulaire en agissant notamment comme récepteur de molécules extracellulaires.

1.3.2 Glycoprotéines et protéoglycanes

Les glycoprotéines sont des protéines membranaires intégrales qui portent un oligosaccharide *via* une fonction hydroxyle présente sur des sérines ou thréonines (O-glycanes) ou *via* l'azote de la chaîne latérale des asparagines (N-glycanes) des protéines. Les N-glycanes et O-glycanes, souvent ramifiés, se terminent par un acide sialique, essentiel dans les processus de réponse immunitaire. Les glycoprotéines sont fortement impliquées dans la reconnaissance intercellulaire.

Les protéoglycanes constituent une sous-classe de glycoprotéines. Il s'agit de protéines reliées à une longue chaîne de glycosaminoglycanes (GAG). Ceux-ci sont constitués de longues chaînes linéaires composées d'une unité disaccharidique comprenant une hexosamine (glucosamine ou galactosamine) et un acide hexauronique (acide glucuronique, acide iduronique ou galactose). Il existe une grande hétérogénéité de GAG en raison de la longueur variable,

de leur unité disaccharidique ainsi que de leurs modifications (sulfatations, acétalysations, épimérisations). On distingue ainsi les héparines, les héparanes sulfates (HS), l'acide hyarulonique (AH), les chondroïtines sulfates (CS), les dermatanes sulfates et les kératanes sulfates. Leur haut degré de sulfatation leur confère une forte densité de charges négatives à pH physiologique. Cette charge permet l'interaction avec les résidus chargés positivement des protéines dictant ainsi leur affinité et leur sélectivité.

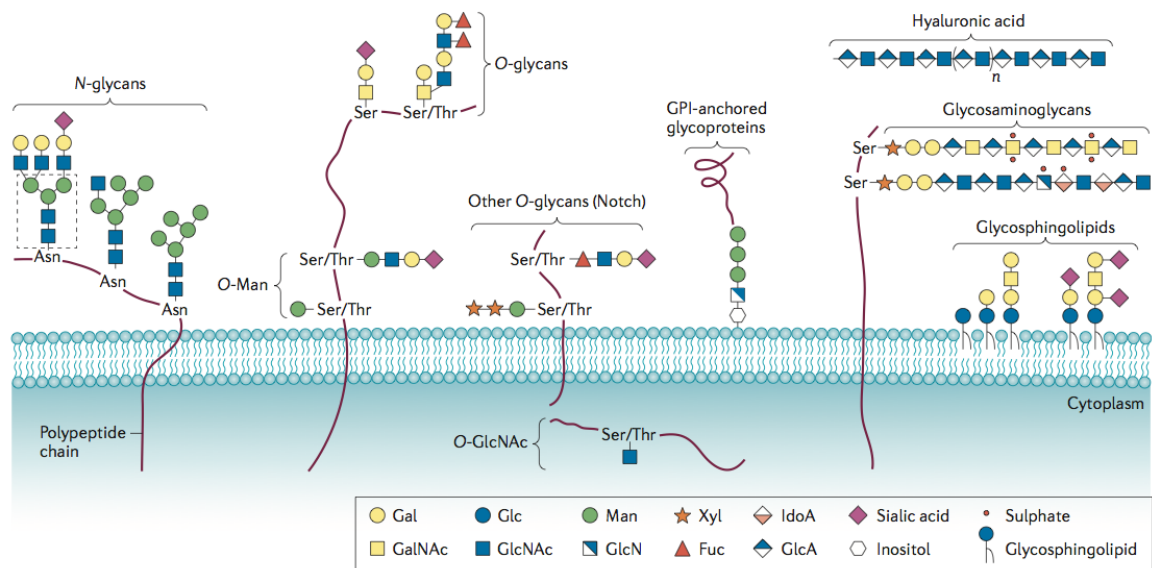


FIGURE 1.10 – Les différentes classes de glycoconjugués présents sur la membrane plasmique de cellules animales [Pinho and Reis, 2015].

1.4 Perméabilité et transport

La membrane plasmique forme une barrière fortement imperméable à la plupart des molécules polaires en raison de la présence du coeur hydrophobe de la bicouche de lipides. Ceci est important pour le maintien des concentrations des compartiments intra- et extra-cellulaires. Cette propriété est illustrée sur la figure 1.11 où l'on peut observer que seules les petites molécules non polaires, comme les gaz, et les petites molécules polaires non chargées peuvent diffuser à travers la bicouche. Cependant, la survie de la cellule nécessite des échanges de matière de part et d'autre de la membrane plasmique. Ces échanges peuvent avoir lieu grâce à des protéines transmembranaires spécialisées dans le transport spécifique d'ions et de petites molécules. Il s'agit des canaux et des transporteurs. En revanche, ils ne peuvent prendre en charge le transport de plus grosses molécules et, à cette fin, la cellule dispose d'un autre processus : l'endocytose.

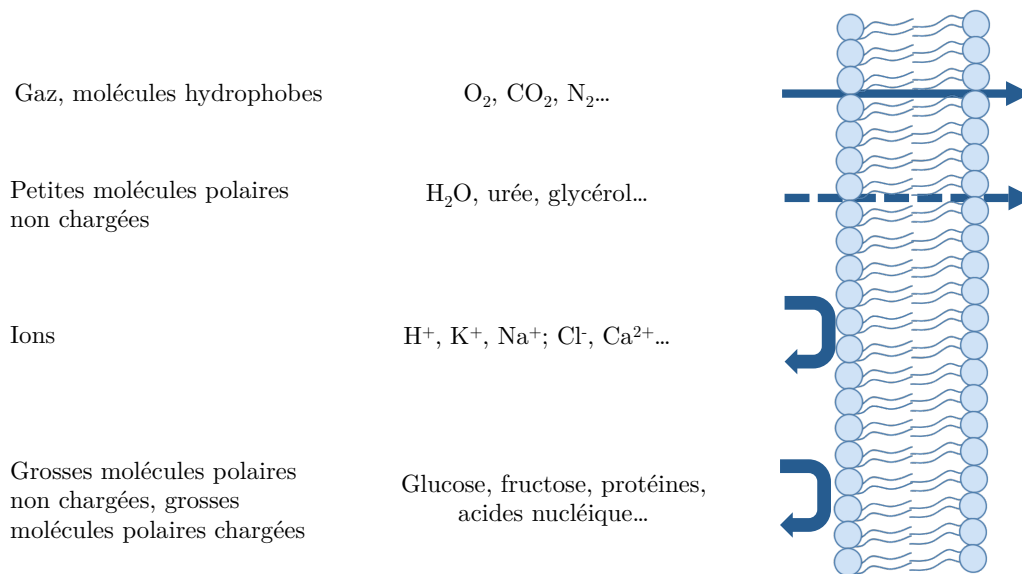


FIGURE 1.11 – Perméabilité relative d’une bicouche lipidique pour différentes catégories de molécules. Adaptée de [Alberts, 1994].

1.4.1 Petites molécules et ions : canaux et transporteurs

Le transport d’ions et de petites molécules à travers la membrane plasmique a lieu par le biais de deux effecteurs : les canaux protéiques et les protéines de transport. On distingue le transport passif du transport actif.

Le transport passif est effectué par des canaux ioniques ou des protéines de transport. Dans ce cas, aucun apport d’énergie n’est requis pour permettre le transport de l’ion ou de la molécule à travers la membrane. Les canaux ioniques sont des protéines formant des pores hydrophiles qui transportent des ions spécifiques (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-) et des petites molécules dans le sens de leur gradient électrochimique (figure 1.12). Ces canaux ne sont pas ouverts en permanence puisque leur ouverture est soumise à des stimuli spécifiques. Ceux-ci sont liés à la modification de la différence de potentiel transmembranaire, à une stimulation mécanique ou encore à la fixation d’un ligand tel qu’un médiateur extracellulaire (neurotransmetteur par exemple) ou intracellulaire (ion ou nucléotide). Le stimuli peut également correspondre à une phosphorylation ou déphosphorylation des protéines formant les canaux.

Le transport actif est effectué par des protéines de transport qui agissent comme des pompes afin de transférer le soluté d’un compartiment à l’autre. Elles possèdent un site de fixation spécifique pour le substrat dont la fixation entraîne un changement de conformation réversible. Le site de liaison est ainsi successivement exposé sur une face puis l’autre de la membrane plasmique. Ce phénomène dépend de la présence d’une source d’énergie qui peut être l’hydrolyse de l’ATP ou un gradient ionique permettant ainsi de transporter le substrat contre son gradient électrochimique (figure 1.12).

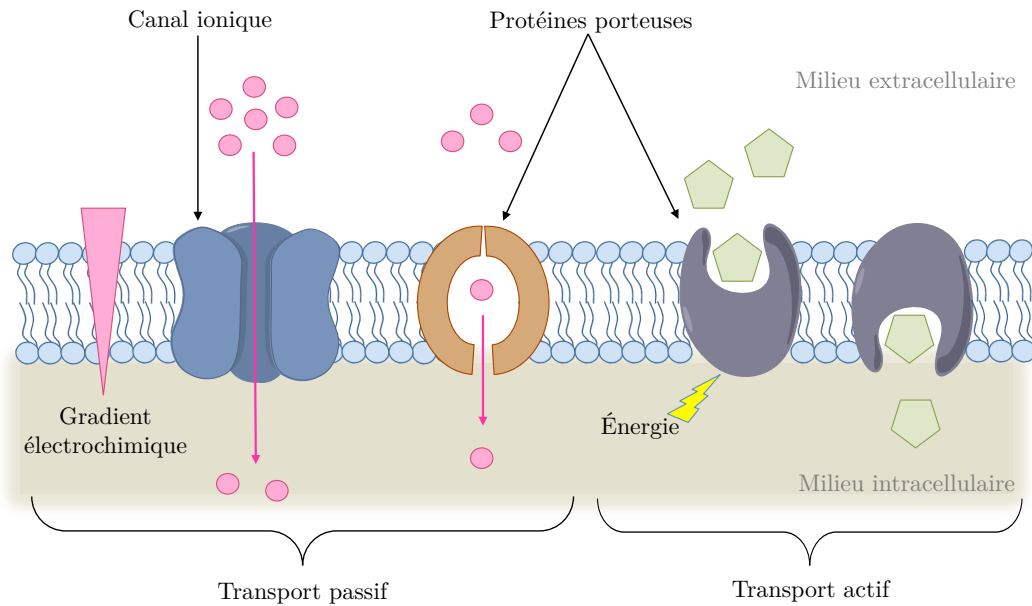


FIGURE 1.12 – Schématisation du transport de petites molécules (en vert) et d'ions (en rose) grâce aux canaux et protéines de transport (ou protéines porteuses). On distingue le transport passif du transport actif.

1.4.2 Trafic vésiculaire et endocytose

Certaines macromolécules ne peuvent être prises en charge par les protéines de transport. Leur transport nécessite la formation de vésicules lipidiques. On parle alors de trafic vésiculaire. Ce mécanisme, appelé endocytose, implique l'invagination de la membrane puis son détachement sous forme de vésicule intracellulaire qui encapsule la molécule à transporter et fusionne ensuite avec les lysosomes afin d'y libérer son contenu. Les macromolécules sont alors digérées par des enzymes contenus dans les lysosomes, puis les métabolites résultants sont transportés vers le cytoplasme. Le mécanisme responsable de la libération des protéines et des glucides produits par la cellule, l'exocytose, est similaire. Dans ce cas, les vésicules intracellulaires fusionnent avec la membrane plasmique pour libérer leur contenu dans le compartiment extracellulaire. L'endocytose et l'exocytose sont des mécanismes complexes, parfaitement régulés, qui impliquent de nombreux partenaires protéiques et lipidiques. Dans le cadre de cette thèse, nous détaillerons uniquement les voies d'entrée dans la cellule.

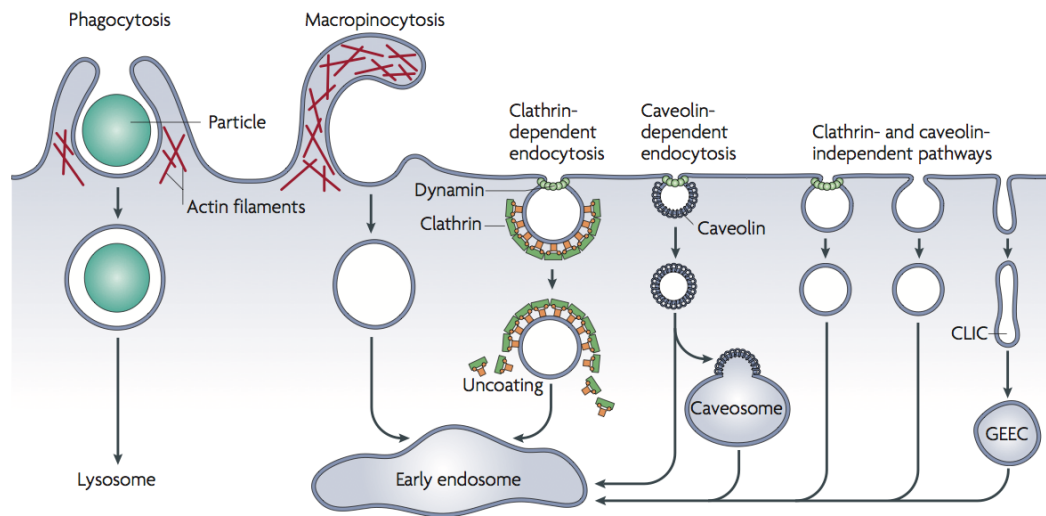


FIGURE 1.13 – Les différentes voies d’endocytoses [Mayor and Pagano, 2007].

Macropinocytose et phagocytose

La phagocytose et la macropinocytose impliquent le remodelage de la membrane plasmique dirigé par la polymérisation d’actine. La membrane forme une poche qui se referme englobant un compartiment aqueux. Ce phénomène est non spécifique dans le cas de la macropinocytose et la poche formée, le macropinosome, englobe un volume de liquide extracellulaire. Dans le cas de la phagocytose, la poche englobe des particules telles que des pathogènes. Elle permet l’internalisation de grosses particules dans des vésicules de plus de 250 nm de diamètre, des phagosomes [Mayor and Pagano, 2007]. Ce phénomène est fortement impliqué dans les mécanismes de réponses immunitaires et implique la reconnaissance de ligands portés par la macromolécule à transporter.

Endocytose dépendante de la clathrine

L’endocytose dépendante de la clathrine implique la reconnaissance de la macromolécule à transporter par des récepteurs à la surface de la membrane plasmique. La formation de ce complexe induit le recrutement des clathrines qui permettent alors l’invagination de la membrane. La vésicule recouverte de clathrine est alors pincée par une protéine, la dynamine, afin de se détacher et d’être prise en charge par le cytosquelette. Les clathrines se détachent de la vésicule qui fusionne ensuite avec l’endosome avant d’être digérée par un lysosome (figure 1.13).

Endocytose dépendante de la cavéoline

L’endocytose dépendante de la cavéoline a lieu par la liaison du ligand sur un récepteur GPI provoquant la formation d’une vésicule, appelée cavéole. Celle-ci est recouverte d’un domaine de la membrane enrichi en cholestérol et glycosphingolipides. La vésicule est tapissée

de cavéoline, une protéine transmembranaire qui contrairement à la clathrine n'est pas recrutée mais tapisse constamment ces domaines. Le détachement de la vésicule de la membrane plasmique a également lieu par l'action de la dynamine. Les vésicules sont ensuite dirigées vers les endosomes ou les cavéosomes (figure 1.13).

D'autres voies d'endocytose ne nécessitant pas l'intervention de la clathrine ou de la cavéoline existent pour l'internalisation de macromolécules. Elles impliquent d'autres protéines (flotillines, CDC42 ...) et ne requièrent pas nécessairement l'action de la dynamine. Ce sont les voies indépendantes de la clathrine et de la cavéoline représentées figure 1.13.

Conclusion

En somme, la membrane plasmique forme une enveloppe fortement imperméable autour des cellules. Nous avons pu voir que cette imperméabilité est conférée par la présence d'une bicouche de lipides qui permet notamment de maintenir la différence de concentration en ions entre le milieu exoplasmique et le milieu cytoplasmique. Cette bicouche assure également l'ancrage de protéines et glucides essentiels aux fonctions cellulaires et à la communication avec l'environnement extérieur. Parmi ces fonctions, la prise en charge de molécules et leur transport à travers la membrane plasmique est primordiale. Ces processus sont complexes et permettent ainsi un tri des molécules pouvant être internalisées. Les macromolécules doivent donc être en mesure d'interagir et d'induire une réponse de la membrane plasmique afin de la traverser. Ainsi, il est important de cibler et de développer des molécules qui pourront interagir avec les cellules et être internalisées à des fins thérapeutiques.

Chapitre 2

Les peptides de pénétration cellulaire

Les peptides membranotropes exercent leur activité en interagissant avec les membranes cellulaires ou bactériennes. Les peptides antimicrobiens agissent en perturbant la membrane tandis que les peptides vecteurs, autrement appelés peptides de pénétration cellulaire (CPP pour « Cell-Penetrating Peptide ») la traversent.

Les CPP sont généralement cationiques et composés de moins de 30 acides aminés. Ils peuvent conserver leurs propriétés d'internalisation même lorsqu'ils sont liés à une autre molécule, et ainsi l'entraîner à l'intérieur de la cellule. Cette cargaison peut être liée de façon covalente ou par interactions électrostatiques et avoir un poids moléculaire bien supérieur à celui du peptide transporteur. Ces cargaisons peuvent revêtir différentes natures : ADN, oligonucléotides, peptides, protéines, sondes fluorescentes, etc. [Gallo et al., 2019]. Ils présentent une cytotoxicité limitée ce qui en fait d'excellents candidats pour de nombreuses applications thérapeutiques telles que la délivrance de médicaments, l'imagerie médicale, le diagnostic *in vivo*, la thérapie anti-cancéreuse ou encore la radiothérapie moléculaire [Gallo et al., 2019].

L'internalisation de ces peptides peut avoir lieu par endocytose. Dans ce cas, les peptides et leur cargaison se retrouvent souvent bloqués dans les endosomes et sont détruits par les lysosomes avant d'avoir pu atteindre le cytoplasme et les différents compartiments intracellulaires où ils peuvent exercer leur activité. Leur internalisation par endocytose présente donc peu d'intérêt thérapeutique, à moins d'avoir recours à un adressage cellulaire efficace. Cependant, il a été montré que les peptides vecteurs peuvent également être internalisés au sein des cellules par un mécanisme indépendant des voies vésiculaires classiques. Ce mécanisme, appelé translocation directe, permet l'internalisation du peptide et de sa cargaison directement dans le cytosol sans être dégradés. Ainsi, la cargaison peut atteindre les différents compartiments intracellulaires et exercer son activité. La découverte de ces peptides s'est ainsi accompagnée de la découverte de nouvelles voies d'internalisations jusqu'alors insoupçonnées.

Depuis, un grand nombre de peptides vecteurs ont été étudiés. Beaucoup d'entre eux dérivent de séquences existantes issues de protéines et ont été utilisés dans des études structure-

activité afin d’appréhender le rôle de la séquence peptidique dans les interactions avec la membrane plasmique et la traversée de celle-ci. Quelques exemples ayant largement contribué à l’avancée des recherches pour la compréhension des mécanismes de translocation seront développés ici (2.2). Nous verrons également que ces phénomènes sont complexes et diffèrent d’une séquence peptidique à l’autre ainsi qu’en fonction des conditions expérimentales (2.3).

Peptide	Origine	Séquence
Dérivés de protéines		
Pénétratine	Homéodomaine Antp (résidus 43-58)	RQJKIWFQNRRMKWKK
Tat	Protéine Tat HIV-1 (résidus 48-60)	GRKKRRQRRRPPQ
Synthétiques		
RW16	Dérivé de la Pénétratine	RRWRRWWRRWWRRWRR
RL16	Dérivé de RW16	RRLRLLRLLRLLRLLR
RW9	Dérivé de RW16	RRWRRWRR
RL9	Dérivé de RL16	RRLRLLR

TABLE 2.1 – Exemples de CPP présentés dans ce chapitre classés selon leur origine (dérivés de protéines ou synthétiques). Les résidus basiques sont représentés en bleu et les résidus hydrophobes en rose.

2.1 Découverte des peptides vecteurs

2.1.1 Le peptide Pénétratine

En 1991, le groupe d’Alain Prochiantz se penche sur l’étude de la protéine régulatrice Antennapedia qui contrôle l’expression de l’ADN en s’y fixant par son homéodomaine. Une mutation de cette protéine entraîne une différenciation morphologique incarnée par la présence de pattes à la place des antennes chez la Drosophile. Au cours de leur étude, les auteurs montrent que l’homéoprotéine Antennapedia (Antp) traverse les membranes biologiques grâce à son homéodomaine constitué d’une séquence de 60 acides aminés [Joliot et al., 1991]. Ce peptide est en mesure de pénétrer au sein des cellules et d’atteindre le noyau provoquant ainsi les différences morphologiques observées. La séquence minimale nécessaire à l’internalisation se compose de 16 acides aminés (résidus 43 à 58, table 2.1) reproduisant l’hélice 3 de l’homéodomaine. Ce peptide est rebaptisé « Pénétratine » [Derossi et al., 1996] (figure 2.1).

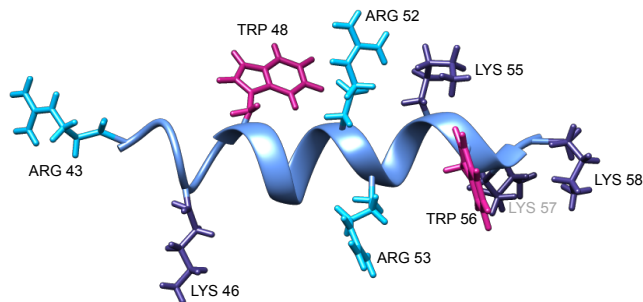


FIGURE 2.1 – Structure de la Pénétratine en hélice α , générée à l'aide du logiciel Chimera.

Des analogues avec des orientations chirales ou des ordres d'acides aminés différents (D-Pénétratine ou retro-Pénétratine) sont tout de même internalisés. Il en est ainsi déduit qu'un récepteur chiral n'est pas impliqué [Derossi et al., 1996, 1994]. L'hydrophobicité et la charge du peptide étant des facteurs clés de la formation de vésicules d'endocytoses, des études d'internalisation à 4°C bloquant les voies d'internalisation classiques sont réalisées. L'internalisation du peptide est tout de même observée dans ces conditions ce qui prouve qu'un autre mécanisme est mis en jeu. L'étude de mutants contenant des prolines, connues pour empêcher la structuration en hélice alpha, montre que cette structuration n'est pas indispensable à l'internalisation. Ces éléments permettent aux auteurs de supposer l'existence d'un mécanisme indépendant de l'ATP et de récepteurs. De plus, la délétion des résidus tryptophanes provoque une diminution de l'internalisation et laisse entendre que la formation de micelles inverses est impliquée car les résidus tryptophanes sont connus pour induire de telles structures [Killian et al., 1985].

2.1.2 Le peptide Tat

La protéine Tat (« Trans-Activator of Transcription ») est essentielle pour la réplication du VIH et a pour rôle la trans-activation des gènes du virus. En 1988, Frankel et Pabo [Frankel and Pabo, 1988] mesurent son activité sur des cellules en endommageant transitoirement les membranes ce qui permet au milieu extracellulaire contenant la protéine de pénétrer dans le cytoplasme. Ils observent que la protéine purifiée est internalisée et a un effet sur l'expression de protéines de la cellule (protéine CAT). Cependant, ils s'aperçoivent que sans endommager les membranes, si la protéine Tat est présente dans le milieu de culture, l'expression de CAT augmente de façon proportionnelle à la concentration en Tat et ce, même lorsque l'endocytose est inhibée chimiquement. En 1997, il est montré que la séquence minimale d'internalisation correspond au fragment 48-60 (table 2.1) contenant un domaine basique non structuré en hélice [Vives et al., 1997]. L'internalisation du dérivé D-Tat indique l'absence de récepteurs chiraux spécifiques [Futaki et al., 2001]. Enfin, des sondes fluorescentes ne sont pas internalisées lors d'expériences de co-incubation avec le peptide Tat ce qui indique que celui-ci n'est

pas à l'origine d'une perméabilisation de la membrane [Vives et al., 1997].

Très vite, ces peptides sont envisagés comme potentiels transporteurs de molécules (oligonucléotides, oligopeptides) à travers la membrane plasmique à des fins thérapeutiques [Derossi et al., 1998]. Cependant, les mécanismes par lesquels ces peptides hydrophiles traversent une bicouche hydrophobe faiblement perméable sans forcément emprunter les voies d'internalisation classiques restent flous. Les résidus cationiques, présents à la fois dans la séquence de la Pénétratine et Tat, peuvent potentiellement former des interactions électrostatiques avec des partenaires anioniques présents à la surface des cellules. Ceci pourrait conduire à la formation d'une structure de perméation engendrant la translocation du peptide. Dans le cas de la Pénétratine, la présence de tryptophanes amène à supposer la formation de micelles inverses. Cependant, l'absence de résidu tryptophane dans la séquence de Tat ne permet pas de conclure à un mécanisme unique de translocation.

2.2 Études structure-activité

Les peptides synthétiques sont issus d'études structure-activité réalisées sur des séquences existantes. Ils permettent de mettre en évidence les propriétés physico-chimiques nécessaires à l'internalisation. Dans la continuité des résultats présentés pour le peptide Tat et la Pénétratine, le cas des polyarginines et des peptides RW/RL sera développé ici.

2.2.1 Les polyarginines

La forte présence de résidus arginines dans la séquence de Tat conduit l'équipe de Rothbard à étudier leur rôle dans la pénétration cellulaire [Wender et al., 2000]. Ils montrent que la délétion ou la substitution d'arginines inhibe l'internalisation tandis que la délétion ou la substitution de lysines est sans conséquence. La position des arginines dans la séquence présente également un impact sur l'internalisation. Une étude menée sur les polymères d'acides aminés basiques montre que les polymères d'arginines sont internalisés plus efficacement dans les cellules que les polymères de lysine, d'histidine ou d'ornithine [Mitchell et al., 2000]. La longueur du peptide a également un impact sur sa capacité à entrer dans les cellules. En effet, les séquences de moins de 5 résidus d'acides aminés sont moins bien internalisées que celles de 6 à 15 résidus. Cependant, ces peptides sont peu solubles et présentent une cytotoxicité qui les empêche d'être de bons candidats à des fins thérapeutiques.

Les résidus arginines, par leurs groupements guanidinium, offrent la possibilité de former des liaisons hydrogènes bidentates très fortes avec les anions (phosphates, carboxylates, sulfates) présents à la surface des cellules (figure 2.2). Cette interaction produit un complexe de paire d'ions de moindre polarité capable de diffuser dans la membrane. Ceci explique en partie l'insertion des peptides polyarginines dans la bicouche mais la force motrice permettant la translocation d'une telle structure n'a pu être démontrée.

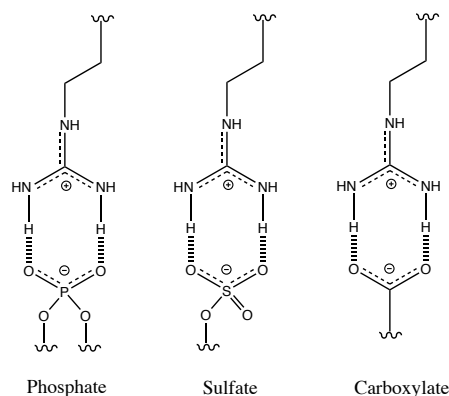


FIGURE 2.2 – Liaisons hydrogènes bidentates formées entre les groupements guanidiniums des arginines et les différents groupements anioniques présents à la surface des cellules : phosphates, sulfates et carboxylates

2.2.2 Les peptides RW et RL

Des analogues de la Pénétratine ont été étudiés afin d'examiner l'impact des mutations des résidus basiques et hydrophobes. Ceci a révélé que la substitution des résidus basiques en C-terminal du peptide ainsi que celle des tryptophanes (Trp) est critique pour la translocation [Fischer et al., 2000; Drin et al., 2001]. Plus précisément, il a pu être montré que la mutation du Trp48 induit une diminution de l'internalisation alors que la mutation de Trp56 ne semble pas l'impacter. La position des Trp dans la séquence a donc une incidence sur les propriétés du peptide. De plus, la mutation des Trp en phénylalanine (Phe) n'induit pas d'altération de l'affinité du peptide avec des modèles de membranes composés de lipides PC:PG (à un ratio 70:30) tandis que les substitutions des résidus Lys46 et Arg52 en alanines ont pour conséquences une diminution de l'affinité des peptides avec ces bicouches [Drin et al., 2001]. Ainsi, comme pour Tat, il est supposé que les résidus basiques de la Pénétratine sont primordiaux pour l'interaction avec la surface des cellules. Les résidus tryptophanes semblent également importants pour la propriété de translocation de ces peptides.

Des peptides composés de ces deux acides aminés sont alors proposés comme modèles pour étudier les propriétés de translocation de la Pénétratine. Les travaux de Derossi ont montré que le peptide RW16 (table 2.1) est internalisé dans les cellules [Derossi et al., 1998]. En revanche le peptide RL16, un analogue de RW16 dont les tryptophanes ont été remplacés par d'autres résidus hydrophobes, des leucines, n'est pas internalisé bien qu'il conserve à la fois une structure en hélice amphiphile, un nombre important de charges positives et le même nombre de groupements hydrophobes. Cependant, ces analogues sont tout deux cytotoxiques [Alves et al., 2008; Delaroche et al., 2010].

Des analogues plus courts, non cytotoxiques, RW9 et RL9 (table 2.1) sont alors proposés [Delaroche et al., 2007]. Bien que ces deux peptides se structurent de façon identique et soient de même charge, seul RW9 est internalisé, à la fois par endocytose et par translocation [Delaroche et al., 2007; Jiao et al., 2009]. Walrant *et al.* ont étudié ces deux peptides afin de comprendre leur différence de comportement [Walrant et al., 2011]. Les expériences

de calorimétrie sur des bicouches modèles montrent que ces deux peptides n'induisent pas d'interaction avec la tête polaire zwitterionique des lipides DMPC. En revanche, en présence de lipides anioniques tels que DMPG, RL9 affecte leur pré-transition sans modifier leur transition principale. Cela signifie que RL9 interagit avec les têtes polaires sans altérer la fluidité de la membrane. Au contraire, RW9 interagit à la fois avec les têtes polaires des lipides anioniques et s'insère dans le cœur hydrophobe de la bicouche affectant ainsi les deux transitions de phase du lipide. La différence de comportement entre ces deux peptides provient donc de la nature des résidus hydrophobes de leur séquence. La mutation des tryptophanes de RW9 en phénylalanines produit des peptides de même charge qui s'accumulent tout autant sur les membrane. Cependant, l'internalisation par endocytose et translocation directe de ces mutants est moindre que celle de RW9 [Jobin et al., 2015]. Il est alors supposé que la présence de résidus aromatiques tels que Leu et Phe plus hydrophobes que Trp induisent un enfouissement plus important dans la bicouche. Les peptides sont alors retenus dans le cœur de la membrane tandis que RW9 établit des interactions transitoires et s'insère moins profondément ce qui favorise son internalisation.

Ces résultats appuient le rôle essentiel des tryptophanes pour la translocation des peptides analogues de la Pénétratine. Les positions Trp4 et Trp7 de RW9 (table 2.1) sont particulièrement importantes et permettent des interactions π -cationiques avec l'Arg8. Celles-ci masquent partiellement la charge du peptide ce qui diminue la barrière énergétique de translocation. En 2020, l'étude de peptides RW, de 9 à 12 acides aminés, où les résidus arginines sont successivement remplacés par des tryptophanes, montre que le mode de translocation est différent selon le nombre de tryptophanes présent dans la séquence [Walrant et al., 2020]. Les peptides sans ou avec un seul tryptophane interagissent avec des partenaires membranaires chargés négativement de façon purement électrostatique en raison de la forte présence de résidus arginine. Un mécanisme de translocation non perturbant peut alors être envisagé. En revanche, les peptides avec 2 tryptophanes, moins chargés, sont moins efficacement internalisés. Les analogues constitués de 3 tryptophanes semblent palier la perte de charge (due à la perte d'arginines) par des interactions de paires d'ions ce qui induit une accumulation du peptide à la surface membranaire favorable à l'internalisation. Les peptides avec 4 tryptophanes sont les plus internalisés mais présentent une forte cytotoxicité ce qui laisse supposer que leur internalisation a lieu par la formation de pores nocifs pour la cellule.

Ces études de relation structure-activité laissent entrevoir des premières pistes pour la compréhension des mécanismes de la translocation directe. Ainsi, les polyarginines, issues de l'étude du peptide Tat, purement cationiques, semblent tirer profit de l'interaction des arginines avec les charges négatives à la surface des cellules grâce aux liaisons hydrogènes bidentates pour traverser la bicouche [Rothbard et al., 2004, 2005]. Dans le cas de la Pénétratine et de ses analogues, la présence des résidus arginines permet la liaison des peptides à la membrane et ainsi leur accumulation à la surface notamment en présence de lipides anioniques. Cependant, leur insertion et leur translocation sont favorisées par la présence de résidus tryptophanes hydrophobes. Les interactions π -cationiques masquent localement les

charges du peptide ce qui diminue la barrière énergétique due à la présence de la bicouche hydrophobe. À partir de la compréhension de ces interactions, des suppositions mécanistiques peuvent être établies pour expliquer la traversée des CPP à travers la membrane plasmique par mécanismes indépendants de l'ATP. Les principaux mécanismes de translocation envisagés seront développés dans la section suivante.

2.3 Internalisation des CPP

Les peptides vecteurs empruntent deux voies d'internalisation pour traverser la bicouche hydrophobe des membranes cellulaires : la translocation directe et l'endocytose. Nous verrons que ces mécanismes peuvent avoir lieu simultanément et que la proportion de ces deux voies d'internalisation peut varier, pour un peptide donné, selon les facteurs expérimentaux [Jiao et al., 2009; Walrant et al., 2017]. Les interactions avec les partenaires membranaires ont un rôle déterminant dans le devenir de ces peptides.

2.3.1 Translocation et endocytose

Les premières études des CPP se focalisent essentiellement sur la translocation directe, mécanisme indépendant de l'ATP, et laissent de côté l'hypothèse selon laquelle les voies d'endocytoses peuvent être impliquées. Les expériences sur cellules ayant conduit à cela sont cependant rapidement remises en cause. Les protocoles employés, notamment la fixation des cellules, ne permettent pas de différencier la quantité de peptide lié à la membrane de la quantité de peptide internalisé. Ainsi, la fraction de peptide capable de transloquer à travers la membrane plasmique lors de l'inhibition de l'endocytose a été surestimée. La mise en place d'un protocole impliquant la dégradation des peptides liés à la membrane permet d'affirmer que l'internalisation de ces peptides est fortement réduite lorsque les voies d'endocytose sont inhibées [Richard et al., 2003]. De plus, Duchardt *et al.* montrent que la Pénétratine est internalisée par endocytose selon trois mécanismes (macropinocytose, endocytose dépendante en clathrines et endocytose dépendante en cavéolines) pour des concentrations allant jusqu'à 40 μM sur la lignée cellulaire HeLa [Duchardt et al., 2007]. Finalement, une quantification par spectrométrie de masse précédée d'une étape d'élimination des peptides associés à la membrane indique clairement que les CPP sont internalisés à la fois par translocation directe et par endocytose [Jiao et al., 2009] (figure 2.3).

Bien que les deux mécanismes soient impliqués dans l'internalisation des CPP, leur étude sur cellules est difficile en raison des conditions expérimentales pouvant varier d'une expérience à l'autre (concentration en peptide, modification des propriétés physico-chimiques par l'ajout d'une sonde fluorescente, lignée cellulaire, état de différenciation cellulaire, etc. [Mueller et al., 2008]) ce qui explique la disparité des résultats entre les groupes de recherche. En effet, les conditions expérimentales ont notamment un impact sur la liaison des peptides à leurs partenaires membranaires et peuvent ainsi influencer le mécanisme d'internalisation.

Quel que soit le mécanisme emprunté, les partenaires à la surface de la cellule sont les premiers éléments que rencontrent les peptides vecteurs. Les interactions ainsi formées sont importantes pour le devenir du peptide.

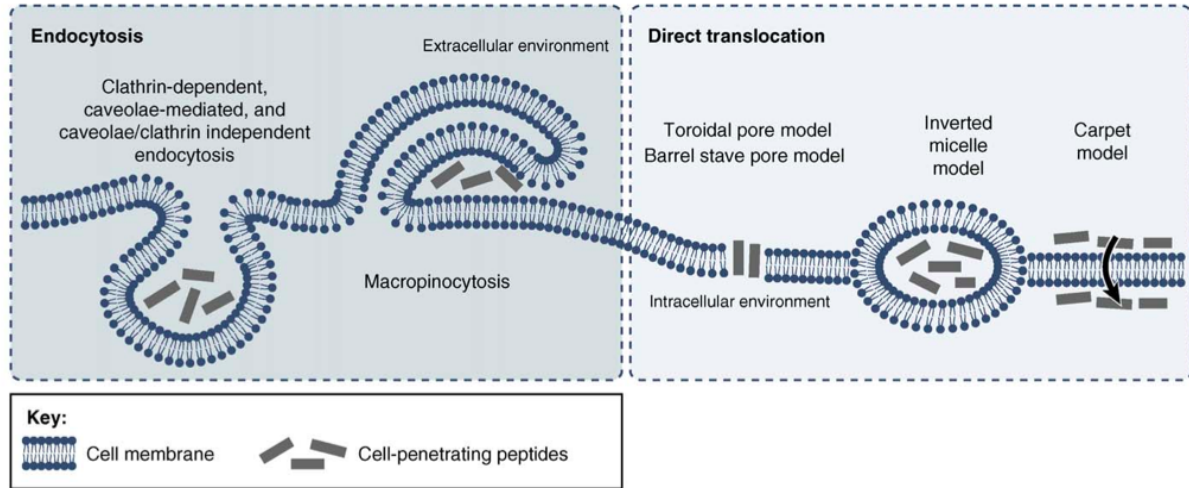


FIGURE 2.3 – Mécanismes d’internalisation des peptides vecteurs. Celle-ci peut avoir lieu à la fois par des mécanismes d’endocytose et des mécanismes de translocation directe à travers la bicouche de phospholipides. Figure issue de [Järver et al., 2010].

2.3.2 Les partenaires membranaires des CPP

Le mode d’internalisation dépend des interactions moléculaires établies avec les partenaires présents à la surface de la cellule. La plupart des CPP étant cationiques, les premiers partenaires qu’ils rencontrent sont chargés négativement. Il s’agit donc des sucres de surface et des lipides anioniques.

Les sucres de surface

Comme nous l’avons vu au cours du premier chapitre, les glycoconjugués du glycocalyx forment l’enveloppe la plus externe de la membrane. La présence de GAG composés notamment d’héparanes sulfates et de chondroïtes sulfates est en majeure partie responsable de la charge négative présente à la surface de la membrane plasmique. Ils forment des liaisons hydrogènes bidentates très fortes avec les groupements guanidiniums des arginines des peptides *via* leurs groupements sulfates et carboxylates (figure 2.2). Ces interactions mènent à l’agrégation des GAG sous forme d’amas constitués de plusieurs chaînes de GAG réticulées par les CPP [Ziegler and Seelig, 2008]. Lorsque les héparanes sulfates sont dégradés de la surface de la cellule, la formation de ces agrégats est inhibée et l’internalisation est fortement réduite [Walrant et al., 2017].

Cependant, l’affinité pour les sucres de surface n’est pas nécessairement corrélée à l’internalisation. Par exemple, bien que la Pénétratine soit moins affine pour les cellules déficientes en acides sialiques, elle est internalisée dans les mêmes proportions que dans les cellules

sauvages à $1 \mu M$ [Alves et al., 2011]. En revanche, à $10 \mu M$ la Pénétratine est davantage internalisée dans les cellules sauvages que dans les cellules déficientes en GAG (figure 2.4). Ces différences suggèrent qu'à faible concentration, la Pénétratine se lie aléatoirement aux GAG et que son internalisation, par translocation, n'est pas liée à cette interaction. Cependant, à forte concentration, la Pénétratine permet le recrutement des héparanes sulfates et leur agrégation. Ceux-ci sont connus pour agir comme récepteurs à la surface des cellules induisant l'endocytose de macromolécules [Christianson and Belting, 2014]. Ceci explique que la traversée du peptide ait lieu majoritairement par cette voie dans ces conditions [Jiao et al., 2009].

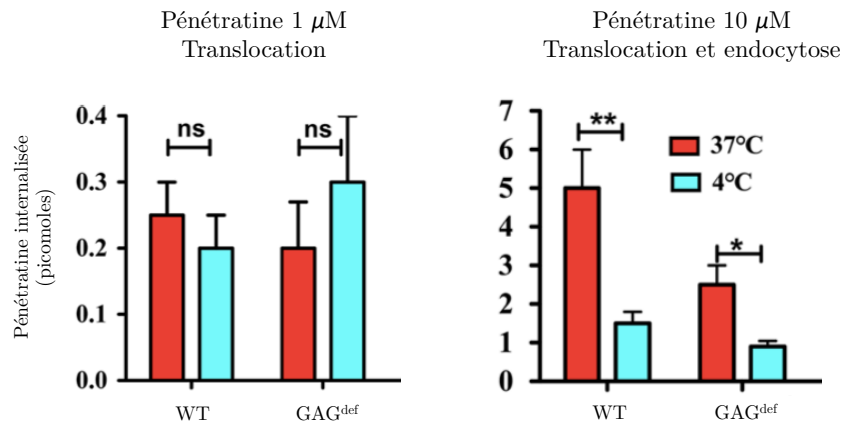


FIGURE 2.4 – Internalisation de la Pénétratine à différentes concentrations sur lignée cellulaire native et déficiente en GAG. Figure adaptée de [Walrant et al., 2017].

Ces résultats montrent que les GAG, premiers partenaires rencontrés à la surface des cellules, induisent dans certaines conditions le recrutement des CPP et leur internalisation par endocytose. Ils peuvent également établir des interactions de façon aléatoire sans induire de signal d'endocytose. Dans ce cas, la traversée du peptide a lieu par translocation directe où les interactions avec les lipides de la membrane plasmique jouent un rôle primordial.

Les lipides membranaires

Les expériences d'internalisation sur membranes modèles ont révélé que les lipides membranaires établissent des interactions importantes avec les CPP. Leur traversée à travers des bicouches de phospholipides a montré que la translocation pouvait être indépendante de tout autre partenaire membranaire [Thorén et al., 2000]. Ces interactions sont perçues comme une étape importante du processus de translocation et il est donc crucial d'en comprendre le rôle dans le(s) mécanisme(s) de translocation.

Les modèles de membrane sont des outils pertinents pour l'étude des interactions peptide-lipide notamment par mesure des affinités par calorimétrie de titrage isothermique (ITC), par spectroscopie de fluorescence du tryptophane, ou encore par évaluation de la perturbation des bicouches à l'aide de la calorimétrie différentielle à balayage (DSC). Ainsi, l'affinité de

la Pénétratine pour des vésicules composées de lipides zwitterioniques (EggPC) ou de lipides anioniques (EggPG) a été évaluée par ITC. L'affinité de la Pénétratine pour les lipides anioniques est plus importante que pour les lipides zwitterioniques avec des constantes de dissociation (K_D) de $0,3 \mu M$ et $28 \mu M$, respectivement [Alves et al., 2011]. Ces expériences témoignent de l'importance des interactions électrostatiques entre les résidus cationiques du peptide et les charges négatives portées par les lipides anioniques. L'insertion du peptide dans des bicouches a été évaluée par spectroscopie de fluorescence du tryptophane, pour lequel un déplacement du pic d'émission (« blue-shift ») est observé lorsque le milieu est davantage hydrophobe. Il a ainsi été montré que la Pénétratine s'insère dans les bicouches lipidiques [Persson et al., 2003]. Il est donc possible de distinguer deux contributions à l'affinité de liaison d'un peptide à la membrane : la contribution des interactions électrostatiques et la contribution hydrophobe. L'interaction de la Pénétratine avec la bicouche semble donc s'effectuer en deux étapes. Dans un premier temps, le peptide est recruté par l'établissement d'interactions électrostatiques avec les lipides anioniques du feuillet externe, puis les résidus tryptophanes s'insèrent dans le coeur hydrophobe de la bicouche.

La translocation a été étudiée sur des vésicules afin de montrer la contribution de ces interactions dans l'internalisation de CPP. Walrant *et al.* ont utilisé la spectrométrie de masse pour quantifier l'internalisation d'analogues marqués de CPP dans des LUV de différentes compositions [Walrant et al., 2013]. Dans un autre protocole, le *quenching* de fluorescence des CPP en solution permet de déterminer la fraction ayant traversée la bicouche de liposomes [Swiecicki et al., 2014]. La translocation de peptides marqués par un fluorophore dans des GUV a également été étudiée par microscopie de fluorescence [Thorén et al., 2000; Whaaten et al., 2013]. Ces méthodes ont montré que la présence de lipides anioniques tels que POPG sont nécessaires à la translocation. Les interactions électrostatiques entre le peptide et les lipides sont donc un pré-requis à la translocation. Cependant, cette interaction n'est pas suffisante à l'internalisation de CPP comme le montre le cas du peptide RL9 qui interagit avec les bicouches POPG sans pour autant être internalisé [Walrant et al., 2013]. Les lipides à tête PE, bien que zwitterioniques, présentent des affinités avec la Pénétratine similaires à celles observées en présence de lipides PG [Alves et al., 2011]. Ces lipides coniques (chapitre 1, figure 3) sont enclins à induire des courbures de membranes négatives et pourraient agir sur la translocation directe par la formation de micelles inverses [Baumgärtner et al., 2007].

Les études sur membranes modèles ont souvent recouru à l'utilisation de lipides PG bien qu'ils ne soient pas représentatifs des membranes de cellules eucaryotes. Par ailleurs, les lipides anioniques sont minoritaires sur le feuillet externe de la membrane plasmique. De petites proportions de lipides à têtes PS ou PA ainsi que des phosphatidylinositols phosphorylés (PIP2) (figure 1.7) sont cependant présentes sur le feuillet externe de la membrane de cellules eucaryotes. Il a d'ailleurs été rapporté que les lipides PIP2 sont recrutés par des interactions électrostatiques avec des domaines basiques de protéines [Golebiewska et al., 2006; Gambhir et al., 2004]. Ces protéines interagissent davantage avec les lipides anioniques multivalents (portants plusieurs charges négatives) tels que le PIP2 qu'avec les lipides anioniques mo-

novalents comme la PS (portant une seule charge négative) non recrutés par les protéines. L'étude du domaine effecteur de la protéine MARCKS a montré que l'interaction des têtes polaires du PIP2 avec le domaine basique se fait *via* les résidus lysines et arginines [Charlier et al., 2014]. Ces observations permettent de suggérer qu'un tel phénomène puisse avoir lieu en présence de CPP cationiques possédant notamment des résidus d'arginines et de lysines. Des expériences sur cellules en présence de néomycine, un antibiotique connu pour se lier au PIP2 avec une forte affinité [Gabev et al., 1989], mènent à une diminution de l'internalisation de la Pénétratine dans la première heure de l'expérience puis son efficacité est retrouvée [Jiao et al., 2009]. Ceci démontre une probable contribution du PIP2 dans l'internalisation de la Pénétratine. Le retour de l'internalisation indique qu'après 1h, le peptide emprunte une voie d'internalisation indépendante du PIP2 ou que l'affinité entre celui-ci et la néomycine est proche de celle du PIP2 et de la Pénétratine et que ces interactions entrent en compétition libérant progressivement le PIP2 de la néomycine [Jiao et al., 2009].

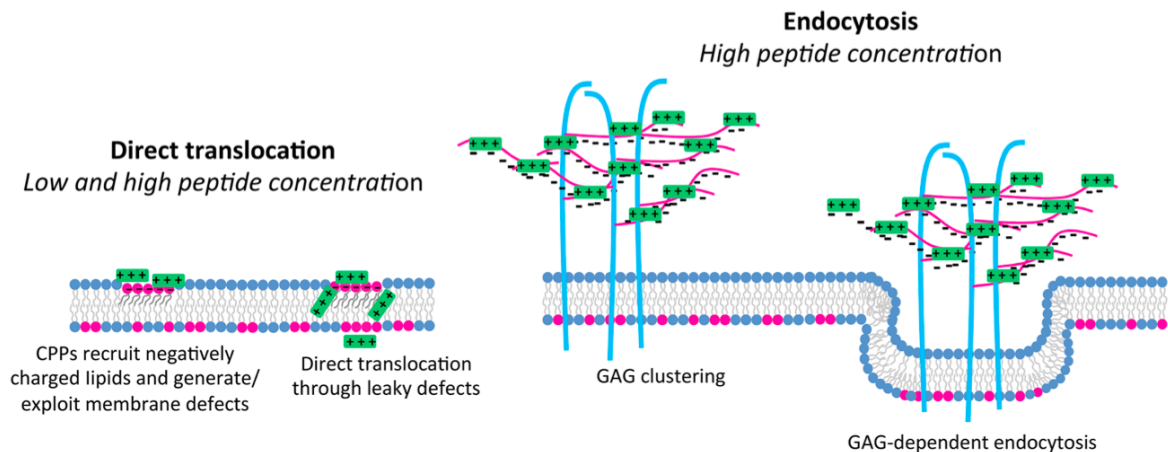


FIGURE 2.5 – Schématisation de l'interaction des CPP à la surface de la cellule et implications pour la translocation. À faible concentration en peptide, la translocation est favorisée grâce aux interactions avec les lipides membranaires. À fortes concentrations, les peptides s'accumulent par liaison aux sucre de surface ce qui permet leur internalisation à la fois par endocytose et par translocation directe [Walrant et al., 2017].

En résumé, les sucres de surface et les lipides membranaires sont des partenaires privilégiés des CPP à la surface des cellules. Leur liaison influe sur la traversée du peptide. À faible concentration en peptide, l'internalisation se fera préférentiellement par translocation *via* le recrutement de lipides anioniques. L'internalisation par l'intermédiaire des GAG est un processus coopératif qui requiert l'accumulation de peptides à la surface de la cellule. Ainsi, à concentration plus élevée, l'endocytose sera favorisée mais une fraction de ces peptides peut tout de même emprunter la ou les voie(s) de la translocation directe (figure 2.5).

2.3.3 Les mécanismes de translocation

Les études sur l'internalisation des peptides vecteurs ont suggéré qu'un mécanisme indépendant à la fois de l'ATP et de récepteurs était impliqué. Cependant, ces peptides de poids moléculaires élevés et fortement chargés ne peuvent traverser la bicouche hydrophobe par diffusion passive en raison d'une énergie de Born élevée dans un tel milieu. Différents modèles de translocation ont donc été proposés pour expliquer la traversée de peptides à travers la bicouche. Cette section a pour objectif de dresser une description des principaux mécanismes de translocation directe envisagés dans le cas des peptides cationiques.

La translocation par formation de pores transitoires

La similitude des peptides vecteurs avec les peptides anti-microbiens (AMP) en raison de leur caractère cationique et amphiphile a poussé à l'évaluation de leur activité antimicrobienne. Ainsi, il a été observé qu'à forte concentration les CPP induisent une perturbation et une perméabilisation de la membrane de bactéries [Palm et al., 2006]. L'effet de la Pénétratine a alors été comparé à celui de la mellitine, un puissant anti-microbien connu pour perméabiliser les membranes par la formation de pores. La fuite de molécules fluorescentes étudiée sur des GUV a été observée en présence de mellitine mais pas en présence de la Pénétratine, même à forte concentration, indiquant que cette dernière n'est pas à l'origine d'une perméabilisation de la membrane [Thorén et al., 2000]. Sur cellules, les expériences de fuite de lactate deshydrogénase, une enzyme du cytosol dont la détection dans le milieu extracellulaire indique un endommagement de la membrane, ont montré qu'à concentrations raisonnables les CPP n'endommagent pas la membrane et n'induisent donc pas la formation de pores [Alves et al., 2008]. Ainsi, l'hypothèse de la translocation par la formation de pores endommageant la membrane de façon permanente a été écartée. En revanche, la présence de pores transitoires pourrait expliquer que la traversée du peptide ait lieu sans endommager la membrane et sans induire de diffusion d'autres molécules telles que les fluorophores. Ainsi, plusieurs modèles de pores transitoires ont été proposés (figure 2.6).

Le modèle tonneau

Dans le cas du modèle tonneau, les peptides en hélice α s'associent et s'insèrent dans la bicouche en exposant leur face hydrophile vers la phase aqueuse, formant l'intérieur du pore, et leur face hydrophobe vers l'intérieur de la bicouche (figure 2.6). Ainsi, les chaînes hydrophobes des lipides sont protégées du milieu aqueux [Magzoub and Gräslund, 2004]. Dans ce modèle, un nombre minimum de monomères adhérent est requis pour la formation du pore. Il est supposé que ces pores apparaissent et se désagrègent de façon répétée expliquant le caractère transitoire de ce modèle.

Le modèle tapis

Le modèle tapis a initialement été proposé pour expliquer la toxicité des peptides anti-microbiens. La liaison des peptides aux phospholipides anioniques, de façon parallèle à la

bicouche, résulte en un « tapissage » de la membrane. À partir d'une certaine concentration en peptides, la compaction des lipides est perturbée localement et entraîne une déstabilisation de la bicouche. Ceci conduit à sa micellisation et à l'internalisation du peptide (figure 2.6). On parle alors d'effet détergent. Il a été montré que l'immobilisation de vésicules internes sur le site perturbé de la membrane lui permet de retrouver son étanchéité rapidement [Palm-Apergi et al., 2009]. Ainsi, la membrane est « réparée » ce qui explique la faible cytotoxicité de ce mécanisme ainsi que son caractère transitoire.

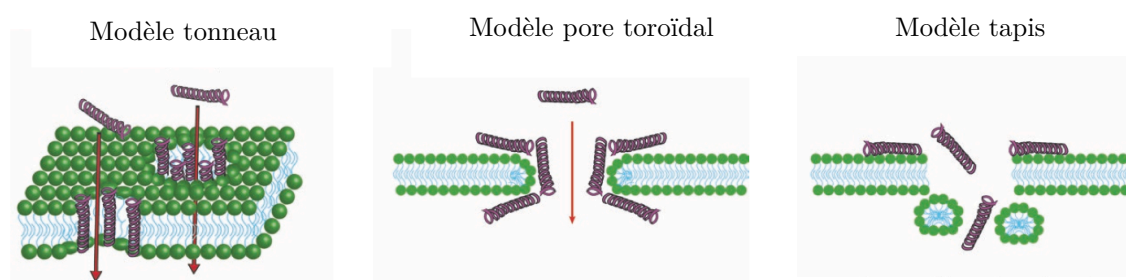


FIGURE 2.6 – Structure des trois types de pores transitoires proposés pour la translocation. Le modèle tonneau est formé par l'exposition des parties hydrophiles du peptide vers la phase aqueuse et des parties hydrophobes vers le coeur de la bicouche. Le modèle du pore toroïdal implique la restructuration de la bicouche. Le modèle tapis induit la micellisation de la bicouche. Adaptée de [Gestin et al., 2017].

Le modèle toroïdal

Le modèle de pores toroïdaux a été suggéré pour expliquer l'internalisation du peptide Tat et de la Pénétratine [Herce and Garcia, 2007; Herce et al., 2009]. Les chaînes latérales des arginines et lysines du peptide interagissent avec les groupements phosphates et carboxylates des lipides ce qui favorise son insertion sur le feuillet externe à l'interface entre les phosphates et les carbonyles (figure 2.7.a). Le peptide est ensuite attiré par les groupements phosphates du feuillet opposé. En conséquence, la bicouche s'amincit lorsque la concentration de peptide sur ces régions est suffisante et le peptide s'insère dans la bicouche (figure 2.7.a). Les molécules d'eau avoisinantes pénètrent et solvatent les groupements chargés du peptide. Un réarrangement des phospholipides induit la formation d'un pore aqueux de 3 nm de diamètre le long duquel le peptide diffuse (figure 2.7.b) [Herce and Garcia, 2007]. Le pore se referme rapidement après la translocation de quelques peptides expliquant le caractère transitoire de ce phénomène. La perméabilisation ionique entraînée par la formation de ces structures transitoires a été mise en évidence sur des bicouches planes [Herce et al., 2009]. En effet, une augmentation de la conductance de la membrane est observée en présence du CPP. Le signal électrique indique différentes étapes de la formation du pore et la perméabilisation se caractérise par des sauts discrets de courant différents de ceux provoqués par des canaux ioniques bien définis. Ceci témoigne de l'existence et du caractère transitoire de ces structures. Elles ont été observées à la fois pour Tat et la Pénétratine [Herce and Garcia, 2007; Herce et al.,

2009].

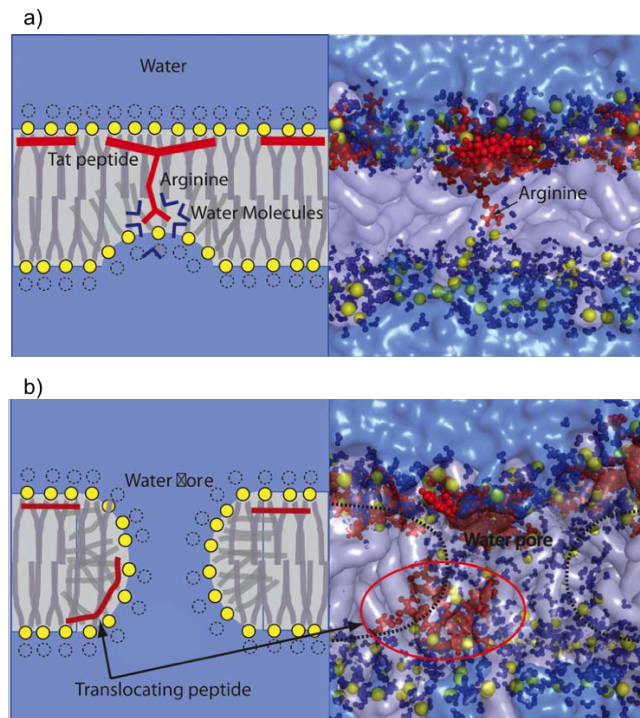


FIGURE 2.7 – Schématisation (à gauche) et simulation (à droite) d'un pore toroidal. Les peptides sont représentés en rouge, les groupements phosphates des lipides par des sphères jaunes et les molécules d'eau par des sphères bleues. La simulation est réalisée avec 92 lipides, 4 peptides Tat et 8 795 molécules d'eau. On observe en a) l'insertion du peptide entre les phosphates et les carbonyles des lipides du feuillet externe ainsi que l'amincissement de la bicouche et en b) la translocation du peptide par diffusion le long du pore aqueux [Herce and Garcia, 2007].

L'endocytose sans protéine

L'endocytose sans protéine, parfois appelée "endocytose physique", a été proposée suite à l'observation de déformations de vésicules géantes (GUV) en présence de CPP. Leur agrégation de façon locale induit la formation d'invaginations vers l'intérieur des membranes et la formation de vésicules ou de tubes. Ces structures favorisent alors l'entrée des CPP par voie vésiculaire, un processus indépendant de l'ATP [Lamazière et al., 2007].

La translocation par formation de micelles inverses

Très rapidement après la découverte des CPP, il est proposé que leur internalisation passe par un mécanisme impliquant la formation de micelles inverses [Derossi et al., 1996]. La présence de tryptophanes, essentiels à la translocation de certains peptides, peut notamment expliquer la formation de ces structures. En effet, ces acides aminés sont connus pour induire le passage d'une phase lamellaire à une phase hexagonale [Killian et al., 1985]. Ainsi, après

sa liaison sur la bicouche par interactions électrostatiques, le peptide peut induire une déstabilisation de la membrane par la formation de courbures négatives [Alves et al., 2008]. Le peptide se retrouve encapsulé dans une invagination (figure 2.8.b) formant une micelle inverse (figure 2.8.c) puis est relargué dans le cytoplasme [Kawamoto et al., 2011].

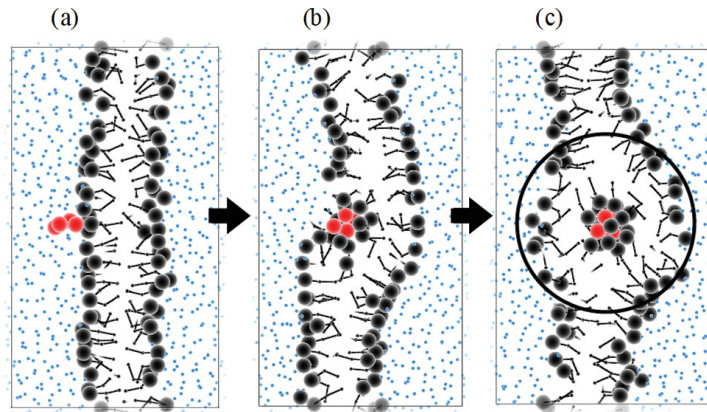


FIGURE 2.8 – Simulation de la translocation par formation de micelles inverses. Les têtes des phospholipides sont représentées par des cercle noirs, les molécules d'eau par des points bleus et les peptides par des cercles rouges. La simulation prend en compte 128 lipides (DPPC) et 3 000 molécules d'eau On observe en a) à 0 ns, une première étape d'adhésion du peptide, suivie de l'insertion dans la bicouche de phospholipides (b, à 8 ns) puis de la formation d'une structure sous forme de micelle inverse encapsulant les peptides (c, à 16 ns) [Kawamoto et al., 2011]

La translocation adaptative

Les travaux de Rothbard et *al.*, suggèrent qu'un mécanisme impliquant la neutralisation des peptides cationiques et diminuant leur hydrophilie, permet leur diffusion passive à travers la bicouche lipidique. Ce modèle implique la formation d'un complexe stable grâce aux liaisons hydrogènes bidentates entre les résidus arginines du peptide et les lipides anioniques de la membrane. Cela réduit la polarité du peptide et favorise sa diffusion à travers la membrane. La paire d'ions formée se sépare de la bicouche et migre à travers celle-ci sous l'effet de la différence de potentiel membranaire. Le complexe se dissocie ensuite sur le feuillet interne de la membrane et relargue le peptide dans le cytosol [Rothbard et al., 2004].

La translocation par électroporation

L'électroporation est un mécanisme induit par la présence d'un champ électrique au niveau de la bicouche de phospholipides. Tieleman *et al.* ont montré par dynamique moléculaire que l'application d'un champ électrique d'environ 0,4 V/nm, correspondant à une différence de potentiel de part et d'autre de la membrane de 3V, induit la formation de pores aqueux [Tieleman et al., 2003; Tieleman, 2004]. Les molécules d'eau se réorganisent sous l'action du champ électrique créant des défauts d'eau au niveau la bicouche. Les molécules d'eau présentes au voisinage du feuillet interne pénètrent à l'intérieur des chaînes d'acides gras et induisent la

réorientation des têtes polaires des phospholipides. Ces défauts s'étendent et mènent à la formation rapide (de l'ordre de la ns) d'un pore hydrophile bordé par les groupements polaires des phospholipides [Tieleman et al., 2003; Tieleman, 2004]. Les simulations menées par Gurtovenko *et al.* ont montré que des pores transitoires pouvaient être induits par un déséquilibre des concentrations des espèces ioniques transmembranaires [Gurtovenko and Vattulainen, 2005]. Ce déséquilibre de répartition des ions induit une différence de potentiel transmembranaire d'environ 2,85 V correspondant à un champ électrique de 0,4 V/nm. La formation d'un pore hydrophile s'accompagne d'une traversée des ions à travers ce canal réduisant la différence de charges à travers la bicouche ainsi que la différence de potentiel. En dessous d'une différence de potentiel limite, le pore devient métastable et se referme [Gurtovenko and Vattulainen, 2005].

Un mécanisme similaire a été reporté en présence d'un peptide antimicrobien [Jean-François et al., 2008]. Les auteurs détectent la formation de pores de durées de vie de l'ordre de la seconde sur des liposomes. Ils supposent que leur formation est liée à un déséquilibre des charges résultant de la liaison du peptide chargé sur le feuillet externe de la membrane. L'inégale répartition du peptide sur les deux feuillets de la bicouche crée un champ électrique perpendiculaire à la membrane (d'environ 0,1 V/nm) déstabilisant la membrane par formation de défauts d'eau. Ces défauts engendrent la formation d'un pore stable si un peptide à proximité du défaut est suffisamment inséré dans le feuillet externe ce qui explique le caractère stochastique d'un tel évènement [Jean-François et al., 2008].

Enfin, deux études démontrent l'importance des interactions électrostatiques dans l'internalisation de peptides vecteurs tels que la Pénétratine et les polylysines et les relient au phénomène d'électroporation [Diederich et al., 1998; Binder and Lindblom, 2003]. Ils estiment une différence de potentiel limite, au-delà de laquelle la membrane devient perméable et permet au peptide de traverser la bicouche. Cette traversée est facilitée par la réorientation des têtes des phospholipides à travers le pore hydrophile qui protège les résidus polaires du peptide des chaînes hydrophobes des lipides et minimise les interactions défavorables. L'équilibration de la concentration de peptide entre le feuillet externe et le feuillet interne de la bicouche diminue la valeur du champ électrique et rétablit la stabilité de la bicouche. Un autre évènement transitoire peut avoir lieu lorsque suffisamment de peptides se lient à nouveau sur le feuillet externe [Binder and Lindblom, 2003].

Les étapes d'un tel mécanisme sont représentées sur la figure 2.9 en présence de Pénétratine dans une bicouche de DPPC en présence d'une force de traction dirigée vers le centre de la bicouche. La liaison du peptide sur la monocouche supérieure (étapes a et b) entraîne la formation d'un pore (étape c) dans lequel s'engouffre le peptide. Celui-ci est dirigé vers le centre de la bicouche sous l'action de la force de traction (étape d) et rejoint la monocouche inférieure (étape e) avant de s'extraire de la membrane.

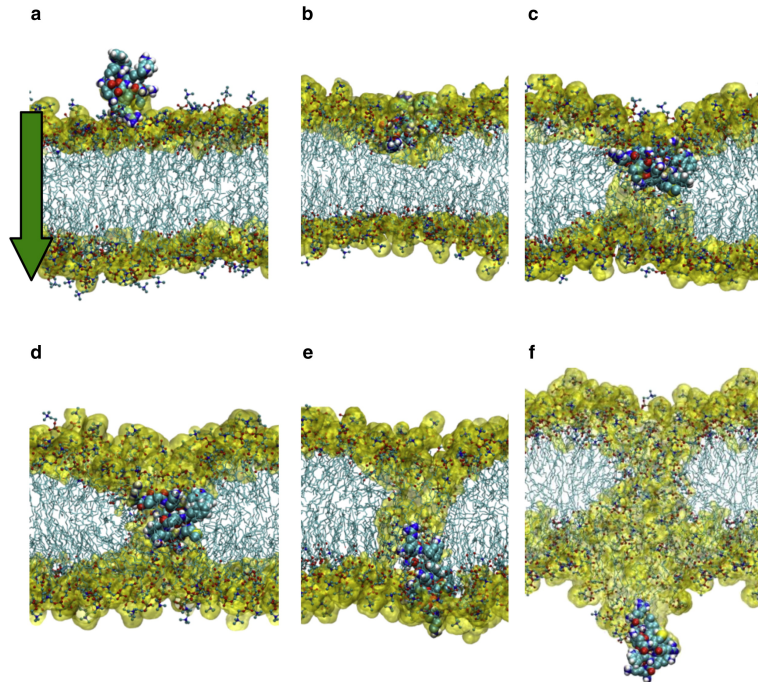


FIGURE 2.9 – Simulation illustrant les étapes de translocation par électroporation de la Pénétratine dans une bicouche de DPPC en présence d’une force de traction dirigée vers le coeur de la bicouche. La surface semi-transparente jaune représente l’interface lipide-eau [Yesylevskyy et al., 2009]

Conclusion

En somme, au cours de ce chapitre, nous avons vu que les peptides vecteurs interagissent avec des partenaires tels que les sucres de surface (GAG) et les lipides anioniques de la membrane plasmique. Après cette étape de liaison, ils sont internalisés au sein de la cellule. Il est maintenant bien admis que ces peptides peuvent emprunter différentes voies pour traverser la membrane plasmique : l’endocytose et la translocation directe. Ces deux phénomènes peuvent avoir lieu simultanément et dans des proportions différentes selon les paramètres expérimentaux. Différents mécanismes ont été proposés afin d’expliquer la translocation directe. Cependant, en raison des nombreux paramètres pouvant influencer les résultats (type de CPP, nature de la cargaison, concentration, type cellulaire, ratio peptide/lipide, traitements des cellules, phase du cycle cellulaire, protocole de quantification etc.), il est difficile de conclure quant au type de structure lipidique impliquée. Les expériences sur membranes modèles permettent de s’affranchir de certains de ces paramètres. Cependant, les membranes biologiques sont complexes et certains modèles ne permettent pas de prendre en considération toutes les particularités de la bicouche de phospholipides membranaires.

Chapitre 3

Modéliser la membrane plasmique

La complexité des membranes biologiques rend difficile l'étude des peptides membranotropes. L'émergence des modèles de membrane a constitué un apport majeur à l'étude des propriétés physiques et fonctionnelles des membranes et des interactions membranes-peptides ou membranes-protéines. Nous avons vu au chapitre 1 que l'asymétrie lipidique est notamment une caractéristique importante de la membrane plasmique, aussi bien d'un point de vue structural que fonctionnel. Il convient donc de prendre en compte cette spécificité lors des études sur membranes modèles. L'accès à de tels modèles est parfois fastidieux, dans certains cas les bicouches formées sont peu stables ou incompatibles avec certaines expériences. Par conséquent, peu d'études de protéines ou de peptides membranotropes sont menées sur des membranes asymétriques. En ce sens, un modèle original de bicouches formées à l'interface de gouttes s'est révélé être un outil pertinent pour l'étude des membranes et des peptides membranotropes.

Au cours de ce chapitre, les modèles courants et leurs évolutions pour accéder à l'asymétrie seront exposés et leurs limites seront soulevées (section 3.1). Un modèle original de bicouches formées à partir d'émulsions adhésives sera présenté (section 3.2) de même que ses applications (section 3.3).

3.1 Modèles de membranes

Les modèles de membranes les plus courants sont les liposomes (3.1.1) et les bicouches planes (3.1.2). Ils sont plus ou moins représentatifs des conditions biologiques (taille, composition, courbure, etc.) et il convient de choisir avec soin celui qui permettra d'accéder aux informations appropriées à la problématique. De nombreux efforts ont été fournis pour mimer au mieux les membranes biologiques et accéder à l'asymétrie lipidique. Ces protocoles seront présentés à la section 3.1.3.

3.1.1 Les liposomes

Les vésicules lipidiques, ou liposomes, sont les modèles les plus couramment utilisés dans le cadre de l'étude des interactions peptides-lipides. Il s'agit de vésicules formées par une ou plusieurs bicouches lipidiques concentriques encapsulant un compartiment aqueux. Selon la méthode de préparation, différents types (multilamellaires, unilamellaires,) et différentes tailles de vésicules sont obtenues (figure 3.1).

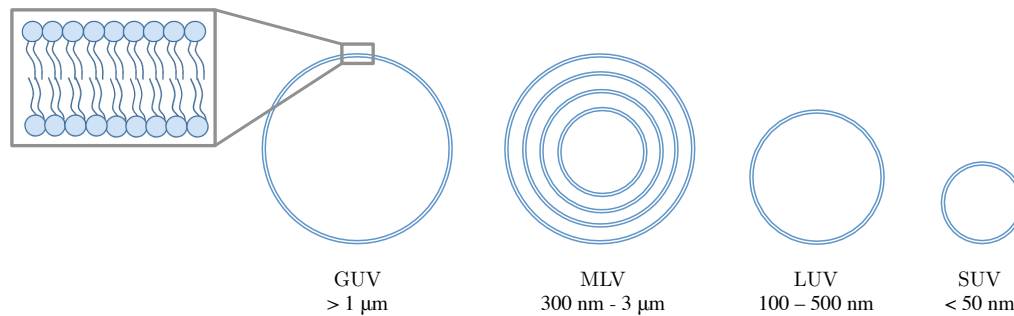


FIGURE 3.1 – Les différents types de liposomes et leurs diamètres caractéristiques.

Les vésicules multilamellaires (MLV)

Les vésicules multilamellaires ou MLV (*Multi-Lamellar Vesicles*) sont les plus simples à obtenir. Leur formation consiste en l'hydratation douce d'un film lipidique sec à une température supérieure à la température de transition de phase des lipides. Ces vésicules sont composées d'un empilement de plusieurs bicouches concentriques séparées par des molécules d'eau. Leur diamètre est compris entre 300 nm et 3 μ m. Cependant cette méthode génère une importante hétérogénéité de lamellarité et de taille. Cette dernière peut tout de même être homogénéisée par plusieurs cycles de congélation-décongélation.

Les vésicules unilamellaires de petite taille (SUV)

Les SUV (*Small Unilamellar Vesicles*), de diamètres inférieurs à 50 nm, sont obtenues par la sonication des MLV. Leur petite taille leur confère une courbure de membrane importante. La courbure du feuillet interne, plus importante que celle du feuillet externe, provoque une différence importante du nombre de lipides entre les deux feuillets. Leur petit volume (environ 10 fL) limite leur utilisation pour les études de perméabilité des membranes en raison du faible taux d'encapsulation de molécules.

Les vésicules unilamellaires de grande taille (LUV)

Les vésicules unilamellaires de grande taille, ou LUV (*Large Unilamellar Vesicles*) sont également obtenues à partir de MLV soumises à des cycles de congélation-décongélation puis d'extrusion à travers une membrane dont le diamètre des pores est défini. Ainsi, les vésicules

obtenues sont monodisperses et de diamètre contrôlé par la taille des pores (entre 100 et 500 nm) [Mayer et al., 1986]. Contrairement aux SUV, elles imposent moins de contraintes de courbure des lipides ce qui en fait de meilleurs modèles des membranes biologiques.

Les MLV, SUV et LUV sont des modèles pertinents pour l'étude de l'association des peptides membranotropes aux membranes notamment par des techniques telles que la calorimétrie, la spectroscopie de fluorescence ou le dichroïsme circulaire [Persson et al., 2003; Walrant et al., 2011].

Les vésicules unilamellaires géantes (GUV)

Les vésicules unilamellaires géantes (*Giant Unilamellar Vesicles*) sont formées par hydratation d'un film lipidique sur une surface de téflon. Pour cela, le film peut être hydraté par une solution de « pousse » pour gonfler les vésicules ou par l'application d'un champ électrique oscillant (électroformation) [Angelova et al., 1992]. Les vésicules ainsi formées ont des diamètres supérieurs à 1 μm ce qui en fait des objets observables en microscopie optique, contrairement aux LUV et SUV, et compatibles avec des expériences impliquant leur micro-manipulation. De plus, grâce à leur taille et leur courbure proches de celle des cellules, elles constituent des systèmes biomimétiques pertinents.

Les vésicules géantes de membrane plasmique (GPMV)

Les GPMV (*Giant Plasma Membrane Vesicles*) sont constituées de membranes provenant directement de cellules. Pour cela, la vésiculation de la membrane plasmique des cellules est provoquée par un traitement au paraformaldehyde et au DTT. Les vésicules obtenues ont des tailles similaires aux GUV et sont ainsi aisément observables en microscopie optique. Bien que les constituants présents à la membrane des cellules (tels que les GAG) soient conservés, l'asymétrie lipidique est perdue. On observe par exemple l'exposition des lipides PS sur le feuillet externe [Baumgart et al., 2007]. Ces modèles ont notamment été utilisés pour étudier la translocation directe des CPP en présence de séparation de phases des lipides [Säälik et al., 2011] ou dans le cadre de l'étude de l'endocytose sans protéines [Maniti et al., 2012].

3.1.2 Les bicouches planes

Il existe principalement deux types de bicouches planes : les bicouches supportées et les bicouches suspendues. Elles possèdent la particularité de présenter une courbure de membrane nulle.

Les bicouches supportées

Les bicouches supportées sont fixées ou déposées sur une surface solide (figure 3.2). Elles sont obtenues par la fusion de vésicules sur la surface du support [Brian and McConnell, 1984] ou par la méthode de Langmuir-Blodgett [Osborn and Yager, 1995]. Celle-ci repose sur

le transfert d'une monocouche de lipides présente à l'interface eau-air en immergeant le support à travers l'interface. Cette étape est répétée une seconde fois afin de déposer la seconde couche. La bicouche est séparée du substrat par une très fine couche d'eau mais il peut être fonctionnalisé pour l'espacer du substrat et favoriser l'insertion de protéines membranaires.

Ces modèles sont simples à préparer et peuvent être étudiés par microscopie de fluorescence ou par des techniques de caractérisation de surface telles que la microscopie à force atomique (AFM), la microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF) ou encore la résonance plasmonique de surface (SPR) [Eeman and Deleu, 2009]. Elles permettent notamment d'étudier les différences de structure, de morphologie et de chimie de la surface après interaction avec des molécules. Bien que les bicouches planes soient caractérisables par électrophysiologie, la présence du substrat peut affecter la diffusion latérale et la cinétique de transfert des lipides [Gerelli et al., 2013]. De plus, les membranes ainsi formées sont fragiles ce qui limite leur durée de vie.

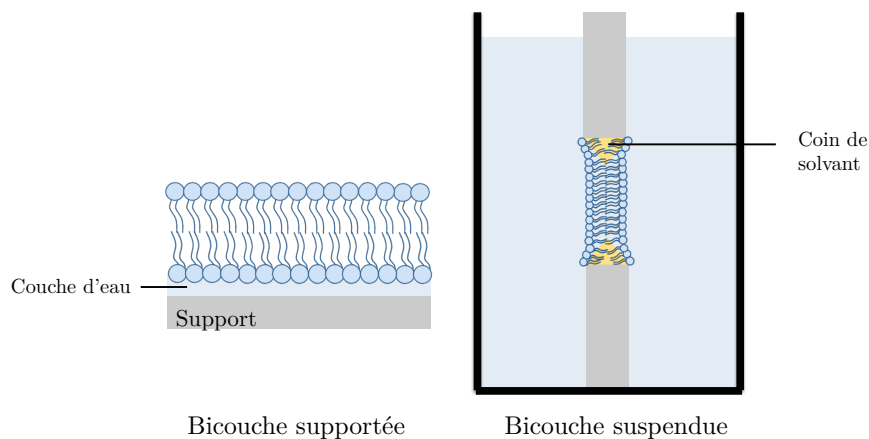


FIGURE 3.2 – Schémas de bicouches planes. À gauche, une bicouche supportée et à droite une bicouche suspendue.

Les bicouches suspendues

Les bicouches suspendues, aussi appelées films noirs, sont préparées au niveau de l'ouverture présente sur une paroi de téflon séparant deux compartiments (figure 3.2). Elles sont formées à partir de lipides solubilisés dans un alcane déposés sur l'ouverture de la paroi. Les bicouches ainsi formées sont stables quelques heures. L'accès aux deux compartiments permet d'imposer des conditions différentes (pH, concentration ionique, etc.) de part et d'autre de la membrane et d'effectuer des mesures électriques à travers celle-ci. Il est alors possible d'étudier les protéines membranaires et les canaux. Cependant, un film d'alcane, indispensable à son maintien au support, reste présent autour de la bicouche au niveau de ses extrémités. Ce film peut modifier son épaisseur et perturber ses propriétés.

3.1.3 Accéder à des modèles de bicouches asymétriques

L'asymétrie lipidique est une caractéristique structurale importante des membranes (Chapitre 1). Bien que tous les effets de cette asymétrie sur les propriétés de la membrane ne soient pas connus, il est démontré qu'elle est essentielle à la survie des cellules et impliquée dans de nombreux processus biologiques. Outre leur rôle de messagers secondaires, les lipides ont des fonctions spécifiques en particulier en lien avec les protéines liées à la membrane. Par exemple, le PIP₂, lipide minoritaire et présent majoritairement sur le feuillet interne est important pour la formation de vésicules d'endocytose et s'associe à des protéines cytoplasmiques impliquées dans la voie d'endocytose médiée par la clathrine [Weinberg and Drubin, 2012]. L'apparition de lipides à tête sérine sur le feuillet externe de la membrane pendant l'apoptose des cellules est un signal de reconnaissance pour les macrophages qui les prennent en charge afin de les éliminer [Fadok et al., 1998]. Ainsi la distribution des lipides sur la membrane plasmique n'est pas aléatoire. Il est donc primordial de développer des modèles qui tiennent compte de cette spécificité. Nous présenterons ici quelques exemples de protocoles compatibles avec la formation de bicouches asymétriques.

Modification de lipides par des protéines

Les premières vésicules asymétriques rapportées reposent sur l'utilisation de protéines catalysant l'échange ou la conversion de lipides. L'équipe de Zilversmit [Johnson et al., 1975] utilise une protéine spécifique des phosphatidylcholines, la phospholipase D (PLD), qui hydrolyse la phosphatidylcholine en acide phosphatidique. En présence de liposomes composés de lipides à tête PC, cette enzyme hydrolyse les lipides du feuillet externe menant à des vésicules de composition asymétrique (PC sur le feuillet interne et PA sur le feuillet externe) [Johnson et al., 1975; de Kruijff and Baken, 1978] (figure 3.3).

Plus récemment, le groupe de Nakano a repris ce principe afin de former des vésicules asymétriques de compositions plus variées en exploitant une autre propriété de la phospholipase D [Takaoka et al., 2018]. Cette protéine catalyse également la réaction de transphosphatidylation, c'est-à-dire l'échange des têtes polaires, en présence d'alcools primaires tels que la sérine ou l'éthanolamine [Yang et al., 1967]. Des LUV composées de PC sont alors mises en présence de la PLD, de sérines et d'éthanolamines afin de former des vésicules composées de PC sur le feuillet interne et de PE et PS sur le feuillet externe (figure 3.3). De la même façon, la phosphatidylsérine décarboxylase catalyse la transphosphatidylation de la PS en PE et permet ainsi de générer des vésicules dont le feuillet interne est composé de PS et le feuillet externe de PE [Denkins and Schroit, 1986].

Ces méthodes d'échanges ou d'hydrolyse des phospholipides sont relativement rapides à mettre en place et conduisent à des rendements élevés de vésicules asymétriques. Cependant, la spécificité de ces protéines nécessite d'avoir recourt à différentes enzymes selon la composition en phospholipides souhaitée. Il est donc nécessaire de disposer d'une « bibliothèque » de protéines ce qui peut s'avérer coûteux. De plus, par cette méthode seul le feuillet externe

peut être modifié ce qui limite le nombre de combinaisons possibles. Enfin, en raison de la double activité enzymatique des PLD, la réaction de transphosphatidylation peut être suivie d'une étape d'hydrolyse des lipides. L'extraction de la protéine après formation des vésicules asymétriques est donc nécessaire mais difficile en raison de sa liaison aux membranes. Ainsi, l'ajout d'étapes de purification rend cette méthode fastidieuse.

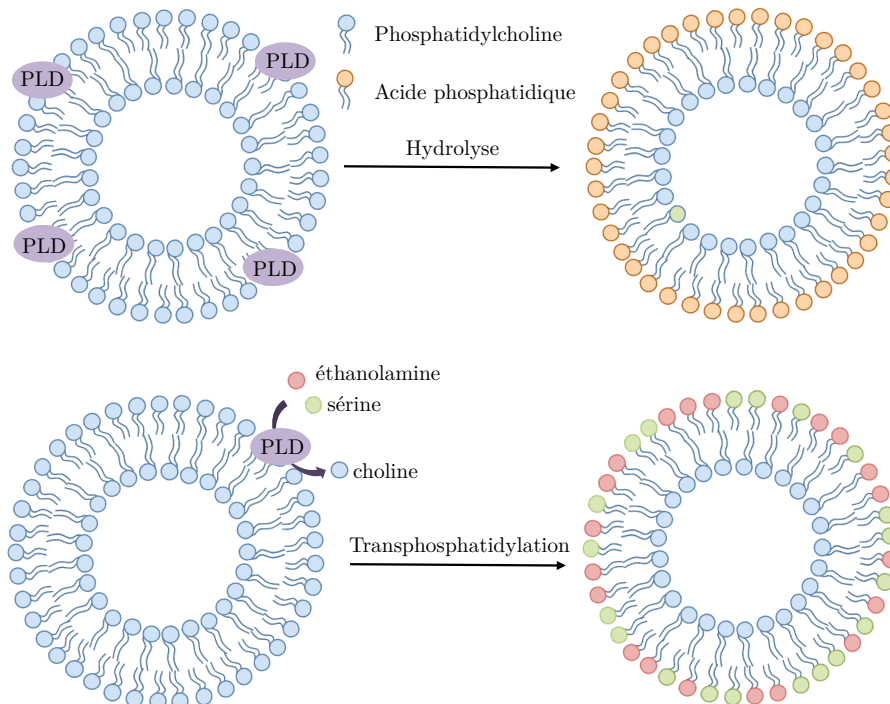


FIGURE 3.3 – Formation de vésicules asymétriques par l'utilisation de la phospholipase D (PLD). Celle-ci permet la réaction d'hydrolyse des phosphatidylcholines ou leur transphosphatidylation en présence d'alcools primaires.

***Flip-flop* induit par un gradient de pH**

En 1989, le groupe de Cullis prouve qu'un gradient de pH entre l'intérieur et l'extérieur de LUV induit une translocation rapide des lipides anioniques [Hope et al., 1989]. Quand des vésicules composées de PC et de quelques pourcents de PG sont préparées avec une différence de pH (intérieur basique, extérieur acide), les lipides PG s'équilibrent rapidement pour se regrouper sur la monocouche interne alors qu'ils sont répartis équitablement en absence de gradient. L'inversion du gradient (intérieur acide, extérieur basique) mène à l'asymétrie inverse. Cependant, ce gradient doit être maintenu afin de stabiliser la composition asymétrique des vésicules formées. Cela contraint l'expérimentateur à travailler dans des conditions de gradients de pH qui peuvent être déstabilisantes pour l'étude de certaines protéines. Enfin, cette méthode ne permet d'accéder qu'à de rares compositions asymétriques, ce qui restreint son utilisation.

Échanges de lipides par des cyclodextrines

Les méthyl- β -cyclodextrines (M β CD) sont des polymères cycliques de sucres formant une cavité interne hydrophobe (figure 3.4) suffisamment grande pour accueillir les acides gras des lipides. Les M β CD sont capables d'extraire les lipides de vésicules pour former un complexe réversible (étape 1, figure 3.4 b). Ainsi, elles sont utilisées pour extraire les lipides de vésicules « donneuses » et catalyser leur échange avec les lipides du feuillet externe de vésicules « acceptrices » (étape 2, figure 3.4 b). Cela engendre la formation de vésicules asymétriques dont le feuillet interne aura la composition lipidique des vésicules acceptrices et le feuillet externe, la composition des lipides extraits des vésicules donneuses par les M β CD avec une efficacité d'échange de 60 à 90% [Cheng et al., 2009]. Les vésicules asymétriques formées sont ensuite séparées des vésicules donneuses. Pour cela, la différence de densité entre les vésicules est utilisée. Dans un premier protocole [Cheng et al., 2009], les vésicules acceptrices encapsulent une solution dense de saccharose tandis que les vésicules donneuses sont formées dans une solution aqueuse. La séparation a lieu par l'ajout d'une solution de saccharose de densité intermédiaire. Après ultracentrifugation, les vésicules asymétriques sont récupérées dans le culot (étape 3, figure 3.4 b). Cette méthode présente cependant quelques inconvénients. En effet, la solution de saccharose à l'intérieur des LUV asymétriques peut entraîner un choc osmotique et provoquer un gonflement ou l'éclatement des vésicules. Le saccharose peut également migrer à travers la bicouche, augmenter son épaisseur et limiter la durée de vie des vésicules [Peyret et al., 2018].

Pour contrer ces difficultés, une variante du protocole a été mise au point [Doktorova et al., 2018] (figure 3.4 c). La stratégie est inversée et les vésicules donneuses sont préparées dans la solution de saccharose (étape 1, figure 3.4 c) de manière à être recueillies dans le culot après centrifugation (étape 3, figure 3.4 c). Les vésicules asymétriques formées sont ainsi hydratées en phase aqueuse et récupérées dans le surnageant. Elles sont ensuite séparées des cyclodextrines par une étape d'ultrafiltration par centrifugation (étape 4, figure 3.4 c). En contre-partie, des étapes de purifications supplémentaires peuvent être nécessaires si les lipides du donneur sont moins denses que ceux de l'accepteur. Ces étapes supplémentaires influencent le rendement en vésicules asymétriques obtenues (entre 50 et 75 %) [Doktorova et al., 2018].

Cette méthode de formation de vésicules asymétriques présente l'avantage de nécessiter peu d'équipements, d'être applicable à différents types de vésicules (SUV, LUV, GUV [Chiantia et al., 2011]) ainsi qu'à différents lipides. Cependant, elle comporte un nombre important d'étapes et s'avère fastidieuse. Ce protocole a également été adapté afin de former des bicouches planes asymétriques. Les bicouches sont formées par la fusion de vésicules puis les M β CD sont utilisées pour enrichir le feuillet exposé [Visco et al., 2014].

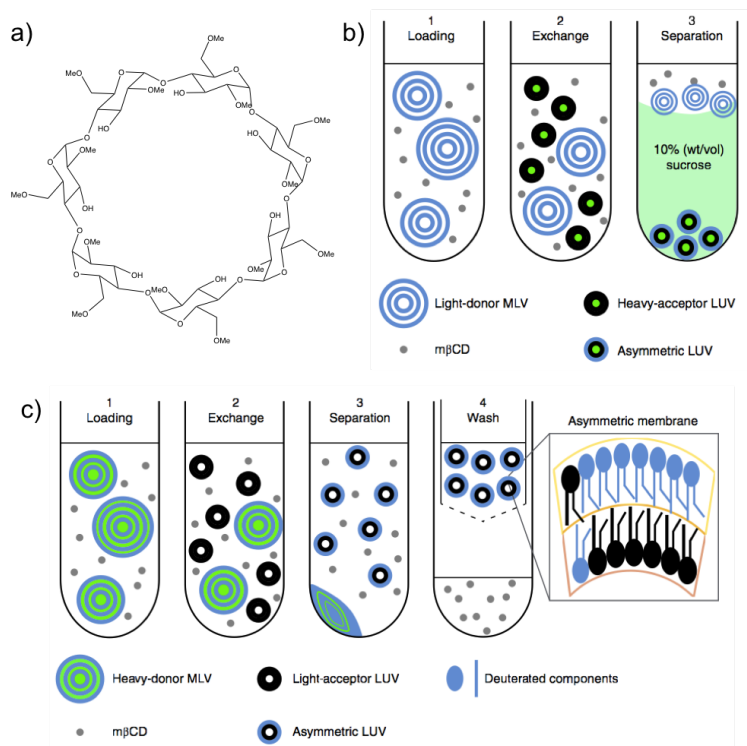


FIGURE 3.4 – Formation de vésicules asymétriques par échanges de lipides par des cyclodextrines [Doktorova et al., 2018]. a) Structure de la méthyl- β -cyclodextrine. b) Protocole utilisant des vésicules acceptrices denses. c) Protocole impliquant des vésicules donneuses denses.

Les émulsions inverses pour la fabrication de vésicules

Les propriétés amphiphiles des lipides peuvent être exploitées pour former des vésicules à partir d'émulsions d'eau dans l'huile qui tendent à se couvrir spontanément de phospholipides formant ainsi des monocouches à leur interface. Ces objets ont été exploités pour la formation de vésicules asymétriques.

Pautot *et al.* ont mis au point un protocole consistant au recouvrement successif de gouttes d'eau par des phospholipides [Pautot et al., 2003]. Une première émulsion recouverte de lipides est générée constituant le feuillet interne des futures vésicules (figure 3.5). Ces gouttes sont ensuite déposées sur une interface eau-huile recouverte d'une monocouche de lipides (de composition différente des gouttes). Ces gouttes, plus denses que la phase huile, traversent l'interface lors d'une centrifugation, en se recouvrant d'une seconde monocouche formant des vésicules de composition asymétrique (figure 3.5). Cependant, l'étape de centrifugation redisperse les vésicules formées, leur diamètre diminue fortement et leur taille ne peut être contrôlée. Cette méthode a notamment été utilisée pour l'encapsulation de molécules afin de servir de vecteurs de médicaments ou de plateformes pour des études de perméabilité des membranes [Pautot et al., 2003]. Cependant, lors de la formation de vésicules, des molécules d'huile peuvent s'intercaler et altérer la structure de la bicouche.

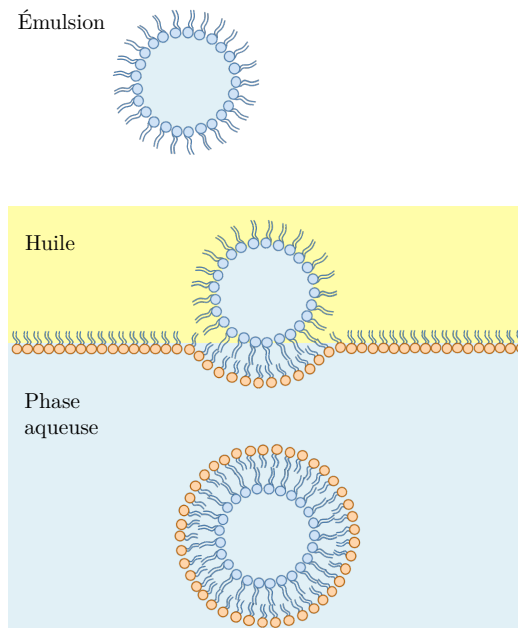


FIGURE 3.5 – Génération de vésicules asymétriques par l’immersion de gouttelettes recouvertes de lipides à travers un film lipidique formé à l’interface eau-huile. D’après [Pautot et al., 2003]

Apport de la microfluidique

Le protocole de Pautot *et al.* [Pautot et al., 2003] a été adapté dans un système microfluidique afin de former des émulsions monodisperses ensuite extraites afin d’être soumises au protocole classique (figure 3.6 a) [Hu et al., 2011]. Cependant, l’étape de centrifugation induit une redispersion des GUV asymétriques formées, de sorte que les vésicules finales ont des diamètres compris entre 10 et 100 μm . En 2013, Paegel et Matosevic [Matosevic and Paegel, 2013] mettent au point un dispositif afin de former les GUV directement au sein de la puce. Pour cela, des gouttes d’eau recouvertes d’une monocouche de lipides sont générées et coincées dans un piège. Le milieu est ensuite remplacé par un mélange d’huile et de lipides, de composition différente. L’écoulement d’une phase aqueuse induit le retrait de l’huile et le dépôt d’une seconde couche de lipides formant le feuillet externe de la vésicule asymétrique (figure 3.6.b). La répétition de cette étape conduit à la formation de vésicules multilamelaires. Les vésicules sont observables au sein de la puce mais ne peuvent en être extraites pour être caractérisées par d’autres techniques.

L’équipe de Chiarot s’est inspirée de ce principe d’assemblage « couche par couche » afin de générer des GUV asymétriques, monodisperses et manipulables en dehors de la chambre microfluidique [Lu et al., 2015]. Pour cela, des émulsions sont formées puis les phases sont changées successivement afin de former des émulsions doubles eau/huile/eau. Dans une dernière étape, ces émulsions sont recueillies et la phase huile intermédiaire est extraite libérant des vésicules asymétriques. Cependant, les procédés d’extraction de l’huile sont contraignants

et très longs.

Bien que les GUV formées par microfluidique soient de tailles contrôlées, elles sont incompatibles avec certaines techniques expérimentales (dichroïsme circulaire, calorimétrie) et la fabrication de vésicules de petites tailles telles que les SUV et des LUV demeure un défi pour la recherche en microfluidique.

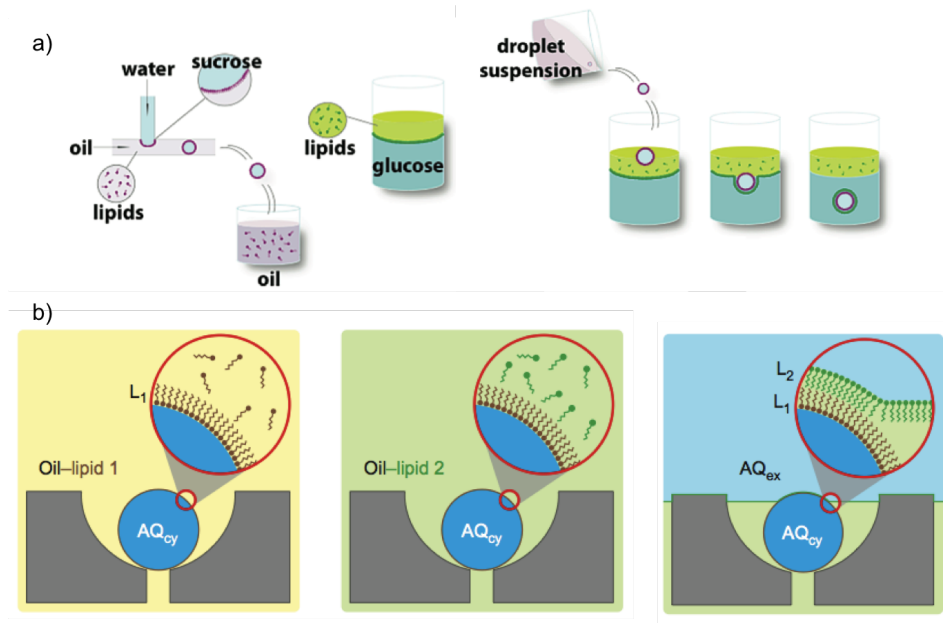


FIGURE 3.6 – Exemples de formation de vésicules asymétriques par microfluidique. a) Des gouttes recouvertes d’une première monocouche sont générées à une jonction en T, la deuxième monocouche est obtenue par passage à travers une interface eau-huile recouverte de phospholipides de composition différente [Hu et al., 2011]. b) Une goutte d’eau dans l’huile, recouverte de phospholipides, est piégée, le milieu est remplacé par une huile contenant des lipides d’une autre composition. Par remplacement de la phase huile par une phase aqueuse, la deuxième couche se dépose sur la goutte piégée [Matosevic and Paegel, 2013].

Les modèles exposés au cours de cette section présentent donc tous des avantages et des inconvénients pour leurs applications. Ils sont regroupés dans la table 3.1.

Modèle	Avantages	Inconvénients
GUV	Asymétrie (cas des émulsions) Micromanipulation Microscopie optique Courbure proche de celle des cellules	Pas d'électrophysiologie Membranes fragiles
SUV/LUV	Modèle simple, pratique Techniques biophysiques (calorimétrie, dichroïsme circulaire..)	Pas d'électrophysiologie Asymétrie fastidieuse et limitée SUV : instabilité
Bicouches supportées	AFM, TIRF, SPR Électrophysiologie possible mais peu répandue	Fragiles Insertion de protéines difficile
Bicouches suspendues	Électrophysiologie Asymétrie	Fragiles, peu accessibles par microscopie

TABLE 3.1 – Les principaux modèles de membranes, leurs avantages et leurs inconvénients.

Ainsi, chaque modèle possède ses spécificités et il est important de choisir judicieusement celui qui conviendra aux expériences envisagées. Récemment, les émulsions se sont révélées être des objets pertinents pour la fabrication de bicouches ou de vésicules de tailles et de compositions contrôlées. Les vésicules formées à partir d'émulsions constitueront probablement dans l'avenir des outils précieux pour l'étude des interactions d'objets biologiques ou synthétiques avec les membranes. La section suivante présente un modèle original de bicouches formées à l'interface d'émulsions.

3.2 Les bicouches à l'interface de gouttes

Les émulsions sont obtenues par la dispersion d'une phase (appelée phase dispersée) sous forme de gouttelettes, dans une phase continue. Elles sont ainsi souvent composées d'une phase huile et d'une phase aqueuse. Les émulsions directes, sont obtenues par la dispersion

de la phase huile dans la phase aqueuse et les émulsions inverses par la dispersion de la phase aqueuse dans la phase huile. Il existe également des émulsions multiples comme nous avons pu le voir avec l'exemple des émulsions eau/huile/eau.

Les émulsions ne sont pas dans un état thermodynamique stable qui correspondrait à la séparation des deux liquides en deux phases distinctes. Cependant, par l'ajout de tensioactifs, elles peuvent être stabilisées cinétiquement sur une période de temps finie. On parle alors de métastabilité. Les tensioactifs s'adsorbent spontanément aux interfaces eau/huile et forment une monocouche. Leur présence modifie les propriétés de l'interface (tension de surface, angle de contact). De nombreux phénomènes mènent à la déstabilisation des émulsions. Ces phénomènes sont notamment dépendants des interactions mises en jeu entre les gouttes. Par exemple, la coalescence a lieu lorsque les gouttes présentent des interactions attractives plus importantes que les interactions répulsives. Cependant, dans certains cas, les gouttes peuvent entrer en contact sans induire leur déstabilisation. On parle d'émulsions adhésives.

3.2.1 Formation d'émulsions adhésives

Aronson et Princen [Aronson and Princen, 1980] ont montré que des gouttes d'émulsions directes deviennent adhésives par l'ajout de sel dans la phase aqueuse continue. Dans le cas des émulsions inverses, qui sera traité ici, l'adhésion est obtenue en diminuant l'affinité, et donc la solubilité, des tensioactifs (phospholipides) pour la phase continue [Poulin and Bibette, 1998]. Dans ce cas, l'adhésion entre gouttes est due au développement d'interactions entre les chaînes aliphatiques des phospholipides par interactions hydrophobes et non affinité pour la phase continue [Helm et al., 1992]. Les chaînes hydrophobes des phospholipides des monocouches de deux gouttes s'assemblent et une répulsion électrostatique due à leur tête polaire stabilise le système vis à vis de la coalescence. Les gouttes adhèrent alors entre elles et forment à leur interface une bicouche lamellaire de phospholipides (figure 3.7).

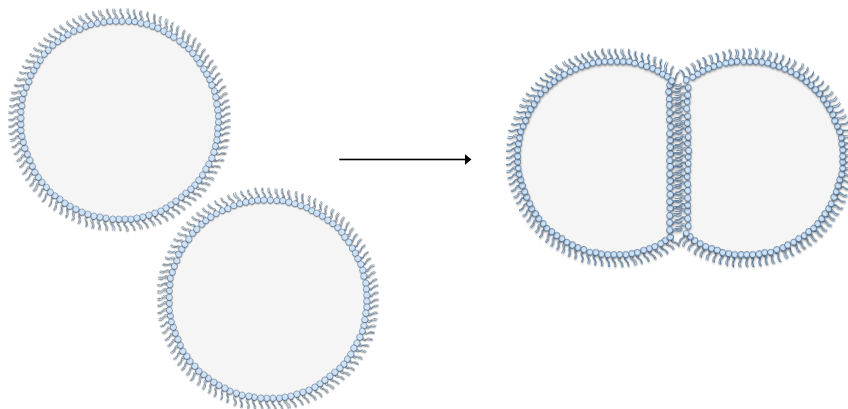


FIGURE 3.7 – Formation d'une bicouche à l'interface d'émulsions adhésives d'eau dans l'huile en présence de tensioactifs (phospholipides).

Ces émulsions adhésives permettent de former des bicouches de phospholipides à l'interface des gouttelettes, on parle alors de bicouches à l'interface de gouttes (DIB, « *Droplet Interface Bilayers* »). La nature de l'huile impacte fortement l'adhésion des gouttes. Elle doit être un « mauvais » solvant des phospholipides pour favoriser l'assemblage des chaînes hydrophobes et former des bicouches stables. L'ajout d'un co-solvant, dans lequel les tensioactifs sont solubles (bon solvant), aide à solubiliser les lipides et leur adsorption à l'interface eau-huile. Ce procédé de formation de bicouches est référencé comme la méthode « lipid-out » (figure 3.8). Les lipides sont introduits en solution dans la phase continue et s'adsorbent aux interfaces après mélange avec la phase aqueuse et émulsification. Une autre technique (« lipid-in ») est employée pour la formation de DIB. Elle consiste à déposer des gouttelettes d'eau, dans lesquelles sont encapsulées des vésicules, dans l'huile. Dans ce cas, les monocouches sont formées par la fusion des vésicules à l'interface eau-huile [Hwang et al., 2008] (figure 3.8). Nous nous intéresserons plus particulièrement à la formulation et à la stabilité des bicouches formées par la méthode « lipid-out ».

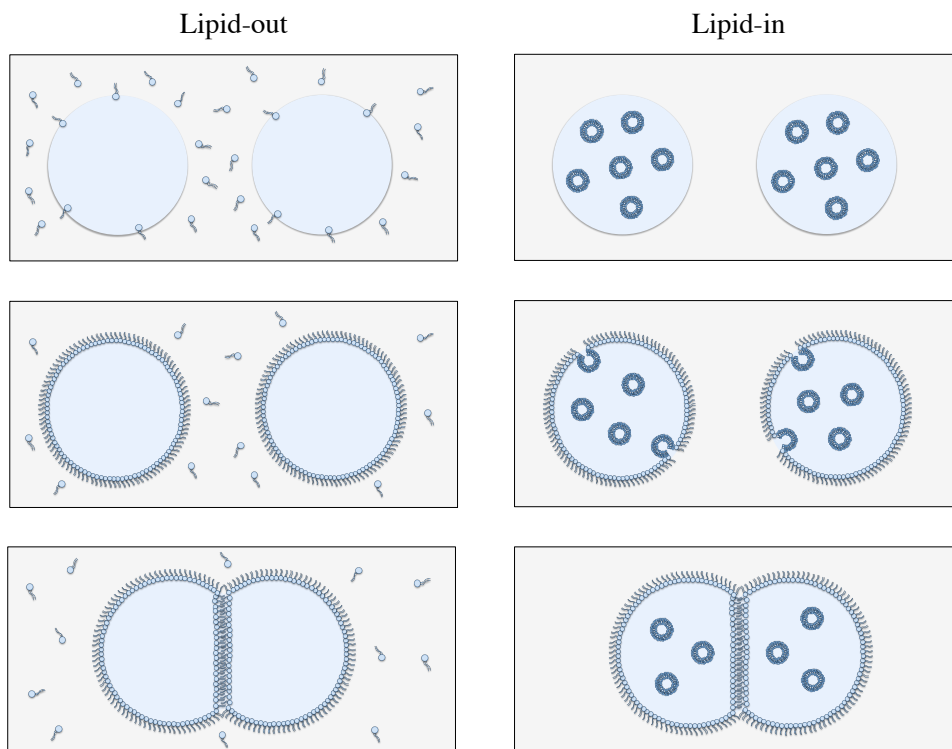


FIGURE 3.8 – Principe des techniques de formation de bicouches à l'interface de gouttes. Pour la méthode « Lipid-out » (à gauche), les phospholipides sont placés dans le phase huile et pour la méthode « Lipid-in » (à droite) les lipides sont présents dans la phase aqueuse sous forme de liposomes. Adaptée de [Hwang et al., 2008].

3.2.2 Description de l'adhésion

L'adhésion des monocouches est possible grâce à la balance entre les forces attractives et les forces répulsives à courte portée nécessaires pour stabiliser les gouttes vis-à-vis de la coalescence [Aronson and Princen, 1980]. Ces interactions entraînent une réduction de l'énergie libre du système (énergie de Gibbs), également appelée énergie d'adhésion (ΔF). Elle dicte la favorabilité thermodynamique de la formation de la bicouche et peut être calculée à partir de la géométrie des gouttes à l'équilibre et de la tension de surface d'une monocouche (γ) par (3.2.2) [Poulin and Bibette, 1998] :

$$\Delta F = 2\gamma (1 - \cos \theta)$$

ΔF reflète la quantité d'énergie que le système gagne par unité de surface en formant la bicouche et s'exprime en énergie par unité de surface (couramment en mN/m). Plus l'énergie d'adhésion est élevée, plus la formation de la bicouche est favorable. La tension de surface de la bicouche formée (γ_b) est différente de la tension de surface des interfaces isolées. Elle dépend de la tension de surface des monocouches (γ) et de l'angle de contact à l'interface (θ) :

$$\gamma_b = 2\gamma \cos \theta$$

Cette tension est importante en l'absence de tensioactifs ou lorsque les monocouches sont peu recouvertes. Elle conduit à la coalescence des gouttes afin de minimiser l'énergie de surface totale du système. L'énergie d'adhésion et la tension de la bicouche sont déterminées par la mesure de la tension de surface des monocouches (γ) et de l'angle de contact formé à leur interface (θ). La tension de surface d'une monocouche à l'interface eau-huile recouverte de phospholipides est déterminée par des méthodes usuelles telles que la méthode de la goutte pendante [Berry et al., 2015] ou par l'aspiration de gouttes par des micropipettes [Yeung et al., 2000]. L'angle de contact θ , formé à l'équilibre, est défini par la géométrie des gouttes (détaillée sur la figure 3.9), et peut être calculé à partir de leurs rayons (R_1 et R_2) et du rayon du patch adhésif (r), d'après l'équation :

$$2\theta = \sin^{-1}\left(\frac{r}{R_1}\right) + \sin^{-1}\left(\frac{r}{R_2}\right)$$

L'angle de contact reflète l'énergie d'adhésion de la bicouche. Plus cet angle est important, plus l'énergie d'adhésion est grande. Elle dépend de la nature des tensioactifs utilisés, de leur concentration, de la nature de la phase continue et de la phase aqueuse et de la température [Booth et al., 2017].

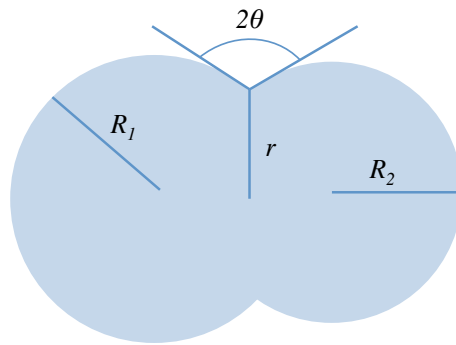


FIGURE 3.9 – Géométrie des gouttes adhésives.

3.2.3 Stabilité des bicouches

Dans certaines conditions, les bicouches formées sont instables et mènent à la coalescence des gouttelettes en contact. Ce phénomène (décrit ci-dessous) peut être évité avec une formulation adéquate de l'émulsion.

Coalescence

La coalescence correspond à la fusion irréversible des gouttes suite à la rupture du film liquide formé à l'interface de gouttes en contact. Le mécanisme de coalescence se fait principalement en deux étapes.

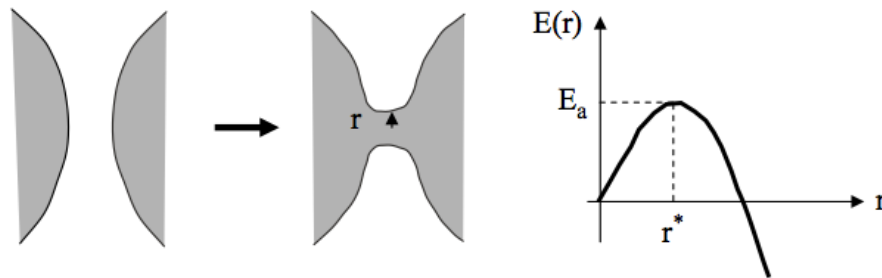


FIGURE 3.10 – Formation d'un trou et variation d'énergie en fonction du rayon r du trou [Leal-Calderon et al., 2007].

Dans un premier temps, les gouttes se rapprochent, le film s'amincit localement, jusqu'à une épaisseur critique au-dessous de laquelle il est instable et finit par se rompre localement. De la sorte, la nucléation d'un trou est initiée par contact des phases aqueuses (figure 3.10). Puis, le trou croît sous l'action de la tension de surface du système jusqu'à atteindre une taille critique r^* lorsque l'énergie est suffisante pour atteindre l'énergie d'activation (E_a , figure 3.10). Au-delà de celle-ci, le trou est instable et croît jusqu'à fusion complète des gouttes. En revanche, si l'énergie d'activation n'est pas atteinte, le trou se referme et provoque des phénomènes de perméation.

Cette instabilité peut être due à différents facteurs, comme la courbure des lipides [Kabalnov and Wennerström, 1996]. L'instabilité du film peut également provenir de défauts de compaction des tensioactifs à l'interface qui favorisent la mise en contact des phases dispersées entre gouttes et mènent à la coalescence des gouttes [Sonneville-Aubrun et al., 2000]. La nature des phospholipides, leur concentration, leur compaction et la nature de l'huile sont des paramètres importants pour la stabilité des bicouches à l'interface de gouttes.

Stabilisation des émulsions

Rôle des tensioactifs

La stabilisation des bicouches à l'interface de gouttes repose sur les propriétés de l'interface. Les lipides doivent recouvrir l'interface eau/huile de sorte à saturer l'interface. En général, le nombre de molécules à l'interface augmente lorsque la concentration en phospholipides en solution augmente. Les tensioactifs doivent être introduits de sorte à être en excès par unité de surface d'une goutte. Ainsi, les émulsions formées avec des concentrations en phospholipides ne permettant pas le recouvrement des interfaces du système mènent à de nombreux événements de coalescence. Ces tensioactifs doivent être densifiés aux interfaces et lorsque cette compaction est maximale, la tension de surface atteint sa valeur minimale [Venkatesan et al., 2018].

La compaction des phospholipides est également impactée par la nature elle-même du lipide. Les lipides coniques inversés, tels que DOPE, présentent un déséquilibre de taille entre la tête hydrophile et la queue hydrophobe et auront tendance à être moins compactés, ou plus difficilement. Ils possèdent une tension de surface plus élevée que les lipides cylindriques, tels que DOPC [Yanagisawa et al., 2013]. Yanagisawa *et al.* ont montré que l'énergie d'adhésion dépend également de la longueur de la chaîne aliphatique des lipides et diminue lorsque la chaîne carbonée est constituée de moins de 16 carbones [Yanagisawa et al., 2013].

Composition de la phase continue

Préparées à une concentration qui permet la saturation de l'interface, les émulsions peuvent tout de même mener à des événements de coalescence. Ces événements sont souvent dus à des problèmes de diffusion des tensioactifs. Dans un bon solvant des phospholipides, tel que l'éther ou le chloroforme, l'énergie d'adhésion entre deux gouttelettes est faible et la bicouche à l'interface n'est pas stable. Par l'ajout d'un mauvais solvant (huile silicone par exemple), la solubilité des lipides diminue et l'énergie d'adhésion augmente jusqu'à atteindre un point d'inflexion au delà duquel les gouttelettes adhèrent entre elles (figure 3.11). L'énergie d'adhésion et l'angle de contact augmentent donc avec la quantité de mauvais solvant. Cependant, l'énergie d'adhésion d'un tel système n'est pas directement reliée à sa stabilité. La formation de la bicouche peut être favorable tout en étant instable une fois formée. Dans ce cas, la coalescence des gouttes est souvent observée très tôt après leur contact. Cette instabilité est due à des problèmes de diffusion des tensioactifs, peu solubles dans le mauvais

solvant. Ainsi, la formulation de la phase continue doit prendre en compte ce phénomène et la réduction de la proportion de mauvais solvant entraîne une stabilisation de la bicouche en favorisant la diffusion des tensioactifs à l'interface. De plus, il existe une limite en fraction de mauvais solvant au delà de laquelle les lipides ne sont pas solubles, l'angle de contact entre les gouttes atteint une valeur seuil de 90° et les gouttes coalescent systématiquement [Thiam et al., 2012]. La stabilité d'un tel système repose donc sur les proportions entre bons et mauvais solvants.

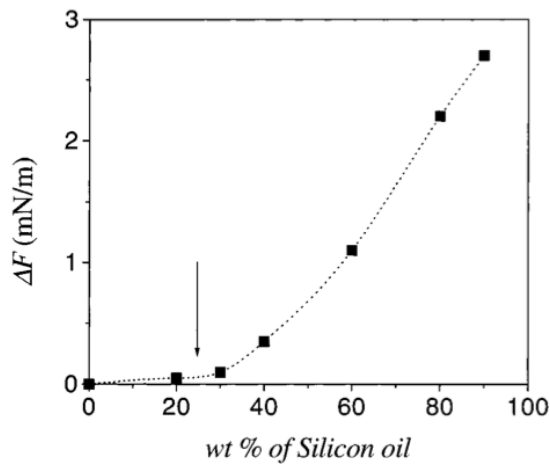


FIGURE 3.11 – Énergie d'adhésion (ΔF) entre des gouttes recouvertes d'EggPC dans un mélange silicone/éther. La flèche représente la proportion d'huile à partir de laquelle la solubilité des lipides dans le mélange diminue [Poulin and Bibette, 1998].

La formation de bicouches dont la tension (γ_b) est proche de zéro est intéressante afin de mimer au mieux les membranes biologiques. Cette tension de bicouche correspond à une énergie d'adhésion pour laquelle les gouttes forment un angle de contact de 90° . Or, nous venons de mentionner que les bicouches sont instables pour de telles émulsions en raison de la limite de solubilité des tensioactifs. Ainsi, la formation de bicouches de tensions proches de zéro avec une fraction en mauvais solvant proche de la limite de solubilité des lipides est difficile. Une alternative consiste à préparer des émulsions avec une fraction importante de bon solvant s'évaporant rapidement. Les gouttes sont ainsi rapidement recouvertes de lipides et la bicouche est stable. Après formation, la fraction en mauvais solvant augmente au fur et à mesure de l'évaporation du bon solvant et l'angle de contact croît en même temps. À l'équilibre, les bicouches atteignent ainsi un angle de contact proche de 90° tout en étant stables [Thiam et al., 2012].

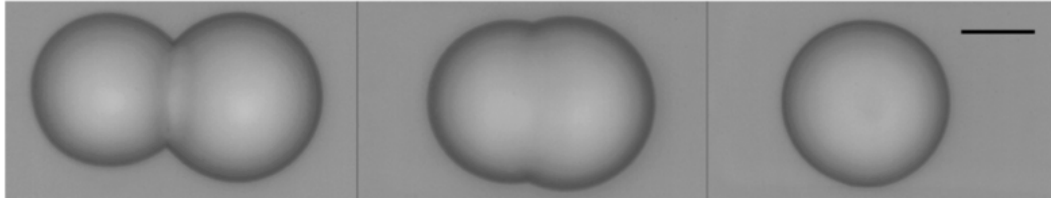


FIGURE 3.12 – Images d’une séquence chronologique de paires de gouttes adhésives. Sur la troisième image, on observe que la bicouche de DPPC forme un angle de contact de 90° après évaporation du bon solvant (chloroforme) dans l’huile silicone. La barre d’échelle représente $50 \mu m$ [Thiam et al., 2012].

Ajout d’un contre-ion

La cohésion de la bicouche lipidique est assurée par les interactions hydrophobes s’exerçant entre les chaînes des phospholipides dans un solvant pour lequel elles ont peu d’affinité [Helm et al., 1992]. Les têtes polaires développent également des interactions de part leur caractère hydrophile. Cependant, elles se repoussent par répulsion électrostatique. Or, nous avons vu que la formation de monocouches compactes est importante pour la stabilité des bicouches. Ainsi, l’ajout d’un cation divalent dans la phase aqueuse améliore la stabilité des bicouches [Poulin and Bibette, 1998]. Ces cations entraînent une meilleure solubilisation des tensioactifs par l’écrantage des répulsions électrostatiques entre têtes polaires adjacentes. Ils assurent un « pontage » des têtes polaires, les tensioactifs sont alors densifiés. Ainsi, une meilleure compaction des monocouches réduit la formation de défauts et prévient les événements de coalescence [Kabalnov and Wennerström, 1996].

3.3 Les bicouches à l’interface de gouttes comme modèles de membranes

Les bicouches formées à l’interface de gouttes constituent des modèles de membrane pertinents. En effet, elles possèdent des courbures et des tensions de surface proches de celles des membranes biologiques. Elles sont facilement observables en microscopie optique et micromanipulables grâce à leur taille de quelques dizaines de μm . La présence de deux compartiments aqueux distincts, de part et d’autre de la bicouche, permet d’introduire des solutions aqueuses différentes et mimer les compositions en ions des milieux intra- et extra-cellulaires. La caractérisation de phénomènes situés au niveau de la membrane plasmique (perméabilité membranaire, propriétés électriques de la bicouche, etc.) est possible car les compartiments aqueux sont accessibles pour réaliser des expériences d’électrophysiologie (3.3.1). Nous verrons que ce modèle est compatible avec l’étude fonctionnelle de protéines membranaires (3.3.2) ou de peptides membranotropes (3.3.3) d’autant plus que la formation de bicouches asymétriques est aisée.

3.3.1 Mesures électriques

Comme nous l'avons vu au chapitre 1, les échanges entre la cellule et son environnement sont parfaitement contrôlés et maintiennent le potentiel transmembranaire de repos. La membrane constitue un matériau isolant en raison de son coeur hydrophobe ne laissant pas circuler librement les ions. La conductance G de la membrane (inverse de la résistance R) est définie comme étant sa capacité à laisser passer un courant I en présence d'un potentiel U selon la formule : $G = \frac{I}{U}$. La conductance spécifique par unité de surface d'une membrane est d'environ $10^{-3} \Omega^{-1}.m^{-2}$ pour une bicouche purement lipidique [Goldup et al., 1970]. Dans le cas des membranes biologiques, cette conductance est de plusieurs ordres de grandeur plus élevée en raison de la présence de canaux ioniques qui laissent les ions circuler.

En s'affranchissant de cette complexité biologique, les propriétés électriques de la cellule peuvent être vues comme deux milieux conducteurs (les milieux intra et extra-cellulaires composés d'ions chargés) séparés par un milieu isolant, le coeur hydrophobe de la bicouche qui agit comme barrière au transport des ions. La bicouche peut donc être modélisée par un condensateur en parallèle d'une résistance (figure 3.13 a). L'isolant possède une certaine capacité C à accumuler une charge Q sous l'effet d'une différence de potentiel U ($C = \frac{Q}{U}$). Elle fournit un moyen de stocker la charge ou de générer et propager des signaux capacitifs. La capacité spécifique (aussi appelée capacité surfacique) C_M des membranes est correctement modélisée en considérant la constante diélectrique des lipides et l'épaisseur de la bicouche. Contrairement à la conductance, elle est peu influencée par la présence de canaux et de pores. Elle est calculée à partir de l'équation (3.1) :

$$C_M = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0}{e} \quad (3.1)$$

où e et ε_r correspondent respectivement à l'épaisseur et à la constante diélectrique de la région hydrophobe de la bicouche, et ε_0 , à la permittivité du vide.

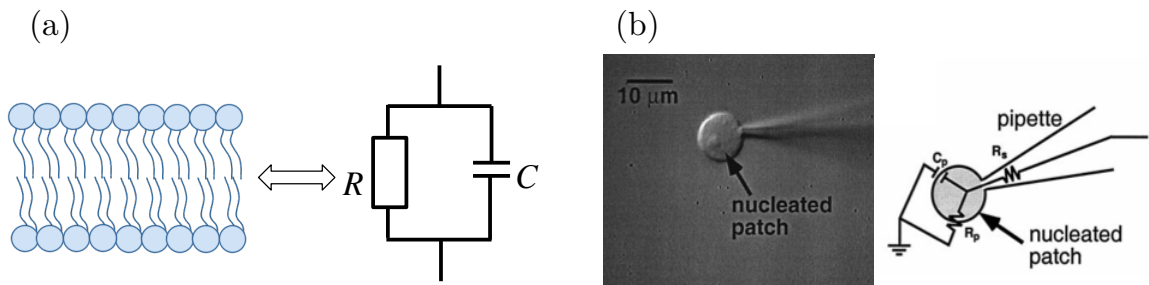


FIGURE 3.13 – a) Circuit électrique équivalent d'une bicouche lipidique. b) Cellule neuronale en continuité électrique avec l'intérieur d'une pipette et schéma électrique équivalent. Celui-ci comprend la résistance R_S due à la pipette, la résistance R_P et la capacité C_P de la membrane [Gentet et al., 2000].

Ainsi, la caractérisation électrique de la membrane (conductance, capacité) reflète ses propriétés physiques. La perméabilité de la membrane au transport de l'eau et des ions peut être évaluée grâce à sa résistance. Les propriétés (permittivité, épaisseur) du coeur hydrophobe sont déduites de la capacité de la bicouche. La manipulation de cellules par des micropipettes contenant des électrodes permet de réaliser de telles mesures. Ce dispositif peut être schématisé par le circuit électrique représenté sur la figure 3.13.b.

Ces études sont également réalisables sur membranes modèles. Pour cela, les deux côtés de la bicouche doivent être accessibles comme c'est le cas des bicouches formées à l'interface de gouttes. L'insertion d'électrodes dans chaque goutte permet de suivre les propriétés de la bicouche au cours du temps. Il est possible d'évaluer la résistance de la bicouche ainsi que sa capacité (C_B).

Les capacités spécifiques de bicouches formées à l'interface de gouttes ont ainsi été mesurées dans différentes conditions de lipides et d'huiles. Les valeurs obtenues, entre 0,3 et 0,7 $\mu F.cm^{-2}$ [Gross et al., 2011; Taylor et al., 2015] sont proches de celles mesurées sur cellules (1 $\mu F.cm^{-2}$) [Gentet et al., 2000]. Les épaisseurs calculées, à partir de la capacité surfacique C_M (3.1), par différents groupes [Gross et al., 2011; Taylor et al., 2015] correspondent aux épaisseurs attendues pour le coeur hydrophobe d'une bicouche de phospholipides dans laquelle il y a très peu ou pas de solvant. Par exemple, dans le cas de lipides DPhPC dans une huile heptadecane, l'épaisseur calculée est de $28,4 \pm 0,7 \text{ \AA}$ [Gross et al., 2011] en accord avec les données obtenues par diffraction de neutrons sur une bicouche supportée ne contenant pas de solvant ($28,6 \pm 1,4 \text{ \AA}$) [Valincius et al., 2008]. Des écarts à cette idéalité sont tout de même observés en présence de certains solvants. En effet, Gross *et al.* observent que l'épaisseur de la bicouche augmente lorsque la longueur de la chaîne alkyle de l'huile diminue [Gross et al., 2011]. Ils en déduisent que les molécules de solvant les plus petites s'intercalent dans la bicouche et augmentent son épaisseur.

Par ces mesures électriques il est également possible d'étudier les comportements de phase des lipides [Taylor et al., 2017], la perméabilité à l'eau de la membrane [Milianta et al., 2015] ou la modification des propriétés électriques lors de la liaison de protéines ou de peptides affectant la capacité surfacique C_M . Nous verrons aux paragraphes suivant des exemples d'études de protéines et de peptides membranotropes.

3.3.2 Insertion de protéines et asymétrie lipidique

L'étude fonctionnelle des protéines membranaires est difficile du fait de leur insolubilité dans l'eau et de leur différence de comportement (conformation, activité) lorsqu'elles sont isolées des membranes. Ces protéines peuvent être insérées dans des bicouches planes et caractérisées par électrophysiologie tout en contrôlant leur environnement (composition du tampon, lipides, potentiel de membrane, etc.). Cependant, ces modèles sont instables et peu reproductibles ce qui rend leur utilisation difficile. Pour ces raisons, le modèle des DIB s'avère

être une alternative pertinente pour étudier les protéines membranaires. Ainsi, en 2006, Funakoshi *et al.* démontrent qu'il est possible d'insérer des protéines membranaires dans des bicouches formées à l'interface de gouttes [Funakoshi *et al.*, 2006]. Ils utilisent l' α -hémolysine (α HL), une toxine bactérienne qui se lie à la couche externe de la membrane, s'oligomérise et forme des canaux aqueux perméables aux ions et aux petites molécules. La toxine est ajoutée à la phase aqueuse d'une gouttelette avant la formation de la bicouche. Pour vérifier son insertion, le courant traversant la membrane, soumise à une tension de -50 mV, est enregistré. Quelques minutes après la mise en contact des gouttes, des sauts de courants sont observés prouvant l'insertion de l' α HL dans la membrane.

Différents groupes ont depuis utilisé le modèle des DIB afin d'étudier des protéines membranaires. En 2008, le groupe de H. Bayley démontre que la synthèse *in vitro* de protéines dans un tel système est possible [Syeda *et al.*, 2008]. Ainsi, l' α -hémolysine est produite dans une goutte avant de former la bicouche (figure 3.14.a). L'augmentation du courant traversant la membrane confirme l'insertion de la protéine et ainsi sa production *in vitro* (figure 3.14.c). Des blocages transitoires du courant sont observés en présence d'une γ -cyclodextrine (γ CD) connue pour bloquer transitoirement les pores de l' α HL (figure 3.14.b).

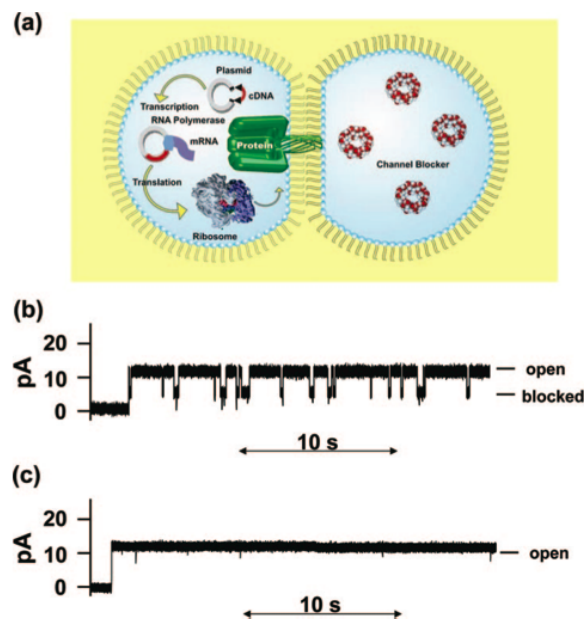


FIGURE 3.14 – Expression et analyse de la toxine α HL dans une bicouche formée à l'interface de gouttes. (a) Représentation schématique de la transcription et de la traduction *in vitro* dans la goutte de gauche. La goutte de droite contient la γ CD. (b) Courant enregistré lors de l'insertion de l' α HL. (c) Courant enregistré lors de l'insertion de l' α HL en absence de γ CD. Figure et légende issues de [Syeda *et al.*, 2008].

Ce même groupe réalise des mesures électriques sur des bicouches asymétriques formées par la méthode « lipid-in » en encapsulant des vésicules de compositions lipidiques différentes dans chaque goutte (figure 3.15.a) [Hwang *et al.*, 2008]. Bien que le temps caractéristique de

flip-flop des lipides soit, en théorie, de l'ordre de l'heure ou du jour [Devaux et al., 2002], les auteurs s'assurent du maintien de l'asymétrie dans un tel système. Pour cela, une goutte composée de lipides DPhPC contenant un faible pourcentage de lipides fluorescents est mise en contact avec une goutte composée uniquement de DPhPC (figure 3.15.b). 24h après la formation de la bicouche, aucune fluorescence n'est observée dans la goutte initialement non fluorescente. L'asymétrie est donc parfaitement maintenue durant ce temps en présence de ces lipides.

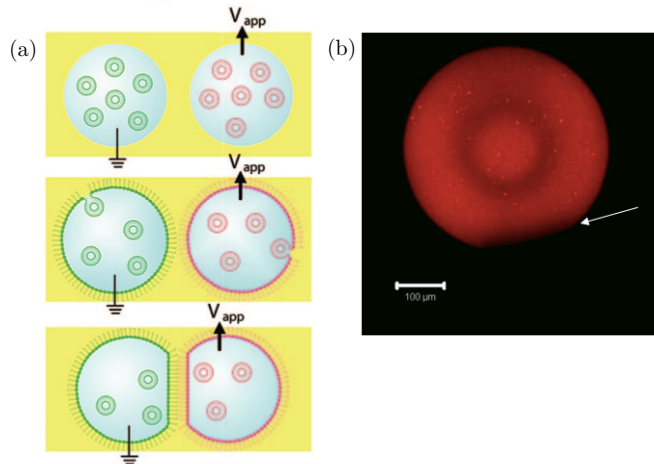


FIGURE 3.15 – a) Formation d'une bicouche à l'interface de gouttes par la méthode « Lipid-in » à partir de gouttes contenant des liposomes de compositions lipidiques différentes. Les gouttes sont ensuite mises en contact et forment une bicouche asymétrique. b) Image de microscopie à confocale (projection en z) d'une paire de gouttes asymétriques 24h après leur mise en contact. La goutte du haut est constituée de DPhPC comprenant 1% de lipides fluorescents et la goutte du bas (noire) uniquement de DPhPC. La flèche indique l'emplacement de la bicouche. La barre d'échelle représente $100 \mu\text{m}$ [Hwang et al., 2008].

Malgré l'aspect prometteur de ce modèle, à ce jour, seules quelques études ont exploité la formation de bicouches asymétriques à l'interface de gouttes afin de répondre à des problématiques de biophysique portant sur l'asymétrie des membranes. Milianta *et al.* ont utilisé ce système afin de montrer que la distribution asymétrique des stérols affecte la perméabilité à l'eau de la membrane [Milianta et al., 2015]. Barlow *et al.* ont étudié la stabilité et la perméabilité des bicouches asymétriques en fonction de leur composition en s'intéressant à la fuite de colorants [Barlow et al., 2017]. Quelques travaux portent également sur l'étude de peptides membranotropes.

3.3.3 Les bicouches à l'interface de gouttes comme modèles d'étude des peptides membranotropes

Comme mentionné précédemment, bien que les liposomes soient très utilisés pour l'étude des interactions peptides-membranes, ils sont incompatibles avec les expériences d'électrophysiologie et permettent difficilement de quantifier la translocation. De plus, en raison de la difficulté à accéder à des bicouches asymétriques, celle-ci n'est que rarement abordée dans ces

études. Cependant, la composition lipidique de la membrane, et donc l'asymétrie de celle-ci, joue un rôle majeur dans les interactions et les processus membranaires.

En 2011, Huang *et al.* rapportent la première utilisation des DIB pour l'étude de peptides membranotropes en se penchant sur la translocation du peptide vecteur Pep-1 [Huang et al., 2011]. Le peptide est co-incubé avec l'enzyme peroxydase *Horseradish* (HRP) afin de former un complexe capable de traverser la membrane par translocation. Le complexe est placé dans la phase aqueuse d'une goutte (goutte « réservoir ») mise en contact avec une goutte « réceptrice » contenant uniquement du tampon. Durant cette étape, la bicouche est suivie par électrophysiologie afin de s'assurer de sa formation et de son maintien (figure 3.16. a, étape 1). Les gouttes sont ensuite séparées et la goutte réceptrice est fusionnée avec une troisième goutte contenant le substrat de l'enzyme avec lequel elle réagit et génère un complexe fluorescent dont la quantification reflète la quantité d'enzyme ayant traversé la bicouche (figure 3.16.a, étape 2). Les auteurs montrent que la translocation à travers une bicouche symétrique composée de lipides zwiterrioniques (DPhPC) nécessite la présence d'une différence de potentiel. Ils préparent alors des bicouches asymétriques constituées d'un feuillet neutre (DPhPC 100%) et d'un feuillet anionique (DPhPC + 10% de DPhPG). La translocation du complexe est observée lorsque le peptide se trouve du côté du feuillet neutre (DPhPC) mais inhibée lorsqu'il est introduit du côté du feuillet anionique (figure 3.16. b). Ces expériences indiquent que la présence d'un potentiel de membrane ou de charges négatives sur le feuillet distal de la bicouche peuvent agir comme forces motrices pour la translocation du peptide vecteur Pep-1 [Li et al., 2017]. Ces résultats montrent pour la première fois que l'asymétrie lipidique peut avoir un rôle dans le processus de translocation.

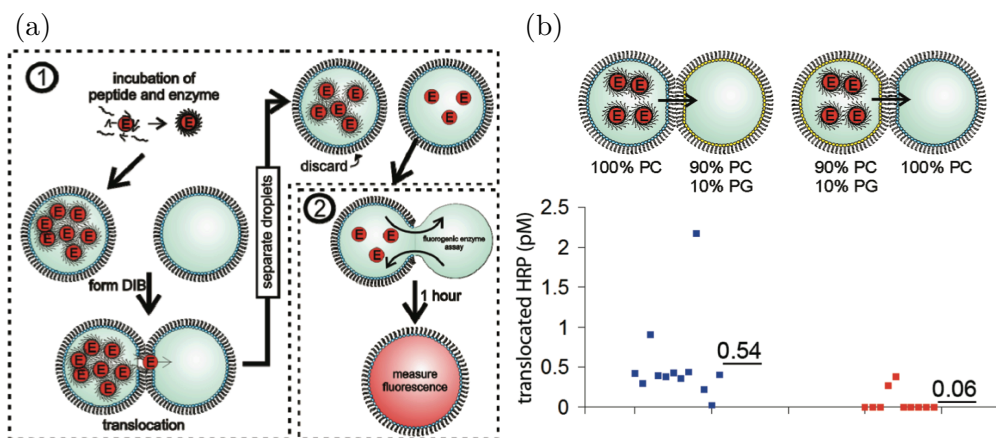


FIGURE 3.16 – Schématisation de l'expérience permettant la quantification du transport d'HRP par Pep-1. Le complexe Pep-1-HRP est introduit dans une goutte, la bicouche est formée puis à la fin de l'expérience, les gouttes sont séparées. La goutte « réceptrice » est ensuite fusionnée avec une goutte contenant le substrat de l'enzyme libérant un produit fluorescent [Huang et al., 2011].

L'étude de la formation de pores par un autre peptide membranotrope, la Magainine un puissant antimicrobien, est réalisée par mesure du courant traversant la bicouche [Watanabe and Kawano, 2016]. La taille du pore, le nombre de monomères impliqués et le modèle du pore sont déduits grâce au signal électrique. Les signaux en forme de marche (« step-like ») correspondent au modèle tonneau où le pore a la forme d'un anneau rigide. Les signaux irréguliers (« multi-level » et « spike ») correspondent davantage au modèle de pore toroïdal ou à des défauts dans la membrane (figure 3.17). En effet, ces structures sont plus fragiles et varient dynamiquement en taille provoquant un signal fluctuant. En déterminant le taux d'apparition de chaque signal, la nature du pore est déduite.

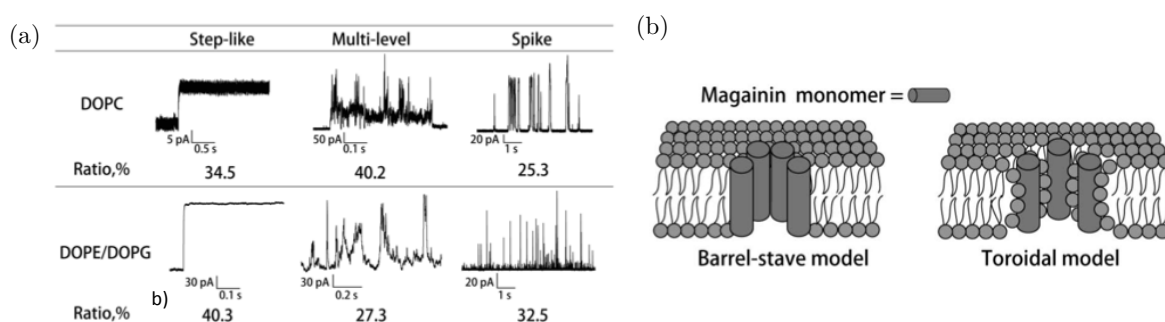


FIGURE 3.17 – a) Courants observés pour différentes compositions lipidiques. Ces courants sont classés en trois catégories selon leur forme (« step-like », « multi-level » et « spike »). Le pourcentage de chaque signal est précisé. b) Représentation du modèle tonneau et toroïdal formé par la Magainine par assemblage de monomères [Watanabe and Kawano, 2016].

Conclusion

Les modèles de membranes sont des objets judicieux pour l'étude des phénomènes prenant place au niveau de la membrane plasmique. Ils permettent de s'affranchir de la complexité biologique des membranes cellulaires. De nombreux efforts ont été déployés pour adapter ces modèles à la formation de bicouches asymétriques. Cependant, nous avons pu voir que ces protocoles sont parfois fastidieux et les bicouches formées ne sont pas nécessairement stables. En conséquence, la littérature rapporte peu d'études de protéines membranaires ou de peptides membranotropes sur ces modèles asymétriques. Ainsi, les bicouches formées à l'interface de gouttes constituent des modèles substitutifs. En effet, les propriétés physico-chimiques de telles émulsions en font des objets stables (durée de vie de plusieurs heures ou jours [Hwang et al., 2008]) dont les caractéristiques sont proches de celles des membranes biologiques (tension de bicouche, courbure, épaisseur, etc.). L'asymétrie lipidique est également aisément obtenue. De plus, ce modèle est compatible avec de nombreuses applications telles que l'insertion d'électrodes, de protéines, la fusion contrôlée par l'application d'un champ électrique, la séparation des gouttes, la formation de réseaux (2D ou 3D) pour la formation de tissus

synthétiques, etc. [Bayley et al., 2008; Huang et al., 2011; Aghdaei et al., 2008; Booth et al., 2019]. Ainsi, diverses expériences, telles que la caractérisation électriques de membranes, le contrôle du potentiel ou la détection de perturbations telles que la formation de pores, ont notamment été réalisées sur ce modèle. Il offre donc une perspective nouvelle pour l'étude des peptides membranotropes et des protéines membranaires.

Deuxième partie

Étude de la Pénétration sur bicouches formées à l'interface de gouttes

Chapitre 4

Étude de la translocation de la Pénétratine sur bicouches à l'interface de gouttes

Les mécanismes par lesquels des peptides chargés traversent une bicouche dont le coeur est hydrophobe sont encore controversés. L'échelle moléculaire à laquelle ces mécanismes prennent place rend difficile une observation directe. Bien que de nombreux mécanismes aient été proposés et que certains soient admis, nous ne sommes aujourd'hui pas en mesure d'affirmer avec certitude l'existence de ces mécanismes, ni d'évaluer leur implication dans la traversée de tel ou tel peptide vecteur. Leur étude est complexe et dépend de nombreux paramètres que nous avons évoqués au chapitre 2. Le recrutement du peptide en présence de lipides anioniques est un pré-requis à la translocation sur membranes modèles. Cette interaction est suivie d'une insertion du peptide dans la bicouche induisant sa déstabilisation dans les conditions appropriées. Cependant, cette déstabilisation est mal connue et la contribution du feuillet distal (feuillet interne) de la bicouche n'a pu être explorée.

Ainsi, le premier objectif de ce travail fut d'étudier la translocation du peptide vecteur Pénétratine sur bicouches symétriques et asymétriques de diverses compositions lipidiques. Pour cela, le modèle choisi fut celui des bicouches formées à l'interface de gouttes d'émulsions adhésives. En effet, la simplicité de mise en place de ce modèle et sa versatilité sont un atout pour former des bicouches asymétriques. Ainsi, la translocation du peptide marqué par un fluorophore a pu être suivie par microscopie à épifluorescence.

Ce travail s'appuie sur des thèses précédemment réalisées au laboratoire qui ont permis de définir les meilleures conditions de formulation des émulsions, de prouver leur intérêt à travers des expériences préliminaires de translocation et de montrer que l'asymétrie lipidique de telles bicouches est conservée au cours de l'expérience [Soule, 2015; Kulifaj, 2018].

Ce chapitre présentera dans un premier temps la formulation des émulsions, le principe des expériences et les contrôles réalisés (4.1). Les résultats issus de l'étude de la translocation

du peptide vecteur Pénétratine et de son contrôle RL9 sur des bicouches symétriques (4.2) et sur des bicouches asymétriques (4.3) seront présentés. Ces résultats seront discutés et replacés dans le contexte de la bibliographie dans une quatrième section afin de proposer des modèles concordants avec nos observations (4.4). Enfin, la cinquième section de ce chapitre présentera des expériences exploratoires dont l'objectif est d'accéder à un système plus pertinent d'un point de vue du biomimétisme des membranes cellulaires eucaryotes (4.5).

4.1 Formulation et caractérisation du système

La translocation de la Pénétratine est étudiée à partir du modèle des bicouches formées à l'interface de gouttes par la méthode « lipid-out ». Contrairement à la méthode « lipid-in » cette technique permet de s'affranchir de la présence de lipides sous forme de vésicules dans la phase aqueuse, avec lesquels les peptides pourraient interagir et ainsi rester en solution sans adhérer à la bicouche. Bien que peu utilisée en comparaison à la méthode « lipid-in », cette technique est néanmoins compatible avec la formation de bicouches asymétriques.

4.1.1 Principe des expériences

Les expériences de translocation reposent sur la préparation de deux populations de gouttes qui diffèrent par la composition de leur phase aqueuse. La phase aqueuse d'une première population est composée du peptide à étudier, marqué en fluorescence, et la phase aqueuse de la seconde population contient uniquement du tampon (figure 4.1). Lorsque les deux populations de gouttes sont mélangées, leur rencontre aléatoire conduit à la formation de paires issues de la même population de gouttes (paires « non-mixtes ») et de paires « mixtes » c'est-à-dire composées d'une goutte issue de chaque population (figure 4.1). Ainsi, la paire de gouttes est constituée d'une goutte contenant le peptide, il s'agit de la goutte « réservoir », appelée goutte *cis*, et d'une goutte initialement vide en peptide appelée goutte « réceptrice » ou goutte *trans*. La translocation du peptide à travers la bicouche ainsi formée est suivie par microscopie de fluorescence. Une augmentation de l'intensité de fluorescence dans la goutte *trans* est la signature d'un évènement de translocation.

Les expériences de translocation sont menées en présence de Pénétratine marquée par le fluorophore Alexa Fluor 488 (Pen-A488). Celui-ci est lié au peptide de façon covalente par un lien maléimide avec la chaîne latérale d'une cystéine ajoutée à l'extrémité N-terminale du peptide. La sonde Alexa Fluor 488 a été choisie car elle présente un bon rendement quantique de fluorescence et une très bonne photostabilité, contrairement à des sondes classiques telles que la carboxyfluorescéine. Comme cela a déjà été mentionné au chapitre 2, l'ajout d'une sonde fluorescente peut modifier les propriétés physico-chimiques d'un peptide vecteur et influencer sa translocation. En effet, l'ajout d'un fluorophore augmente l'hydrophobicité du peptide qui accentue alors la perturbation de la membrane. Il a ainsi été montré que la Pénétratine couplée à la carboxyfluorescéine présente une plus grande cytotoxicité sur cellules

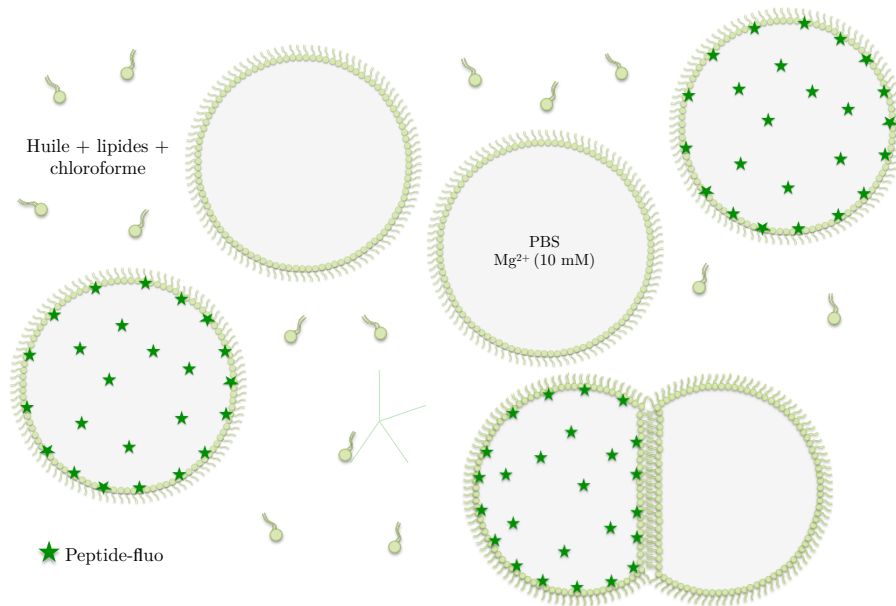


FIGURE 4.1 – Préparation de bicouches à l’interface de gouttes par la méthode « lipid-out » pour l’étude de la translocation de peptides marqués par un fluorophore.

que la Pénétratine non marquée [Dupont et al., 2007]. Afin de s’assurer que l’ajout de la sonde fluorescente à la Pénétratine n’induit pas de perméation de la membrane et ne soit pas responsable de la translocation, nous avons utilisé un peptide contrôle, RL9, également marqué par la sonde Alexa488. RL9 interagit avec les têtes polaires des phospholipides anioniques mais n’est pas internalisé en cellules ou liposomes [Walrant et al., 2011]. Ainsi, en comparant la translocation de Pen-A488 à celle de RL9-A488, on peut supposer que les propriétés de translocation du peptide ne sont pas dues à la présence de la sonde fluorescente qui pourrait perturber la membrane. De plus, le fluorophore n’est pas le seul paramètre susceptible d’induire une perméabilisation non spécifique de la membrane par la Pénétratine. En effet, notre modèle pourrait être moins imperméable que la membrane cellulaire (tension différente, présence de défauts, d’huile, etc.). Ainsi, le peptide RL9-A488 permet aussi de s’assurer que la membrane formée ne soit pas perméable aux peptides. Nous verrons que RL9-A488 ne traverse pas la bicouche dans les conditions étudiées et constitue donc un contrôle pertinent. La concentration en peptide choisie pour l’étude de la translocation de la Pénétratine-A488 et de son contrôle RL9-A488 est de $5 \mu M$. Cette concentration correspond à un rapport peptide/lipide (P/L) de 1/20, pour une goutte de $100 \mu m$ de diamètre, et correspond à la gamme de ratios utilisés dans les expériences classiques de translocation [Thorén et al., 2000; Binder and Lindblom, 2003].

4.1.2 Formulation des émulsions

La phase continue est composée d’une huile squalène (un triterpène), de phospholipides et de chloroforme. Ce dernier joue le rôle de co-solvant afin d’augmenter la solubilisation des lipides dans l’huile. La concentration micellaire critique n’étant pas un critère valable

pour un système triphasique, la quantité de lipides à introduire dans la phase continue a été évaluée expérimentalement à partir de la stabilité de paires de gouttes. Ainsi, il a été montré qu'environ 0,01% en masse de lipides par rapport à la masse de squalène est nécessaire pour la formation de paires de gouttes stables [Soule, 2015]. La meilleure stabilité a été obtenue pour une fraction en lipides de 0,08% en masse de squalène. En supposant que les gouttes ont des diamètres d'environ $100 \mu m$, en considérant que la surface d'une tête polaire de lipide occupe $\sim 1 nm^2$, il faut alors environ $3 \cdot 10^{10}$ lipides pour couvrir une goutte. En considérant que l'on forme $4 \cdot 10^4$ gouttes par dépôt, il faut alors environ $3 \cdot 10^{14}$ lipides (= 1 équivalent) pour couvrir l'interface de chaque gouttelette. Or, la phase huile du dépôt est préparée avec environ $13 \mu g$ de lipides soit environ $1 \cdot 10^{16}$ lipides, nous avons donc 8 équivalents de lipides dans notre mélange. Cela correspond donc à un large excès de lipides de sorte à recouvrir totalement l'interface des gouttes formées. Ainsi, la variation de la taille des gouttes formées a peu d'impact sur leur couverture car nous sommes toujours en présence d'un excès de lipides. Le chloroforme est ajouté à 15% en volume par rapport à l'huile afin de solubiliser les lipides [Soule, 2015]. Enfin, la phase dispersée est constituée de tampon phosphate salin (PBS) à pH 7,4 supplémenté avec 10 mM de Mg^{2+} afin de stabiliser les bicouches (chapitre 3).

Les émulsions sont préparées par ajout de la phase aqueuse dans un tube eppendorfTM contenant la phase huile puis l'émulsification est réalisée par agitation mécanique (manuelle ou vortex). Le tube est ouvert quelques minutes afin de favoriser l'évaporation du chloroforme et le mélange est déposé sur une lame de verre pour observation en microscopie optique.

4.1.3 Caractérisation

Épaisseur de la bicouche

Nous avons vu au chapitre 3 que les bicouches à l'interface de gouttes sont compatibles avec les mesures électrochimiques par insertion d'électrodes dans la phase aqueuse. Le dispositif employé et les détails expérimentaux seront développés au chapitre 5. Nous avons donc mesurer l'épaisseur des bicouches afin de s'assurer qu'il n'y ait pas d'huile intercalée entre les chaînes d'acides gras qui pourrait modifier les propriétés de la membrane. Ainsi, les bicouches composées de POPG présentent une épaisseur de $3,45 \pm 0,63$ nm et une capacité spécifique (C_b/S) de $0,72 \pm 0,12 \mu F \cdot cm^{-2}$. Ces valeurs correspondent à celles attendues pour une bicouche de phospholipides [Binder and Gawrisch, 2001; Kučerka et al., 2012; Pan et al., 2014; Taylor et al., 2015]. Nous pouvons donc en conclure qu'il n'y a pas, ou très peu, d'huile insérée dans la bicouche avec notre modèle.

Maintien de l'asymétrie

Des bicouches asymétriques sont formées à partir de la méthode « lipid-out ». Le principe est le même que la formation de bicouches symétriques mais diffère par la composition de la phase continue. Deux phases huiles sont préparées avec des compositions en lipides différentes donnant lieu à deux populations de gouttes de compositions lipidiques distinctes après

émulsification. Tout comme pour la formation de bicouches symétriques, les deux populations de gouttes sont déposées successivement sur la lame de verre. Leur rencontre aléatoire mène alors à la formation de bicouches asymétriques (figure 4.2).

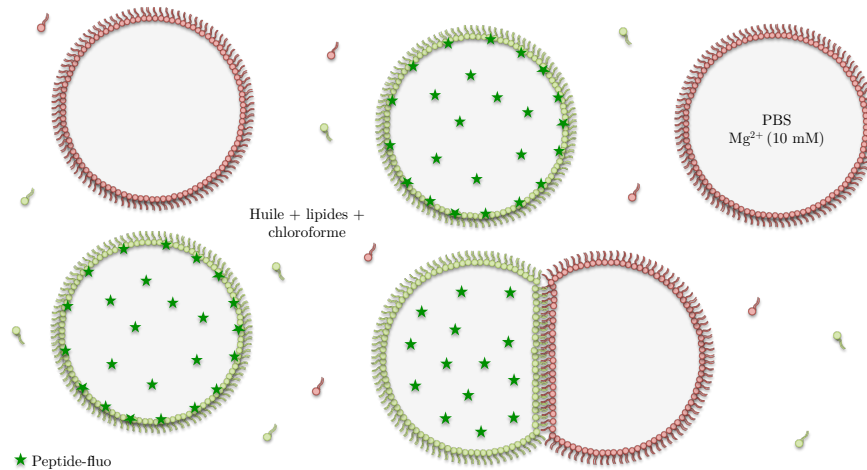


FIGURE 4.2 – Préparation de bicouches à l’interface de gouttes asymétriques par la méthode « lipid-out ». Les deux populations de gouttes sont préparées séparément et réunies pour observation.

Le maintien de l’asymétrie a été évalué afin de s’assurer qu’il n’y ait pas d’échanges de lipides par *flip-flop* entre les deux feuilletts de la bicouche ou par échange entre les lipides des gouttes et ceux présents dans la phase huile environnante [Kulifaj, 2018; Gehan et al., 2020]. Pour cela, l’annexine V marquée par le fluorophore Alexa488 a été utilisée. Il s’agit d’une protéine qui lie spécifiquement les têtes phosphatidylsérines des lipides en présence de Ca^{2+} . Deux populations de gouttes sont alors préparées : une population composée de lipides DOPS et une population composée de lipides DOPC dont la phase aqueuse contient l’annexine V marquée. La protéine se répartit alors de façon homogène dans la goutte comme en atteste la répartition de fluorescence dans le volume de la goutte. Si les lipides PS accèdent à la monocouche de la gouttelette initialement recouverte de lipides PC, l’annexine V reconnaît les lipides PS et la fluorescence apparaît alors plus marquée sur la monocouche ce qui signifie que l’asymétrie lipidique est perdue. Le suivi de paires de gouttes asymétriques a prouvé que l’asymétrie est maintenue pendant au moins 45 minutes car les gouttes DOPC ne présentent pas de marquage fluorescent de leur monocouche sur ce laps de temps. Nous avons alors supposé que ceci est également vrai pour d’autres compositions lipidiques. Nous verrons dans le cadre d’expériences en présence de peptide que cette hypothèse est confirmée. Ces résultats viennent appuyer ceux obtenus par Hwang *et al.* pour lesquels l’asymétrie lipidique est maintenue sur un système « lipid-in » [Hwang et al., 2008].

4.1.4 Quantification de la translocation

La translocation est évaluée à partir de la mesure des intensités de fluorescence dans les gouttes *cis* et *trans* 30 minutes après leur mise en contact. Pour cela, la fluorescence est mesurée sur une zone au centre des gouttes en s'assurant de se situer sur une région où la fluorescence n'est pas « polluée » par la présence d'une autre goutte à proximité. L'intensité de fluorescence de la goutte initialement vide en peptide fluorescent (goutte *trans*) est comparée à celle de la goutte contenant initialement le peptide (goutte *cis*) par le ratio des intensités I_{trans}/I_{cis} . De la sorte, la correction à apporter pour tenir compte du photoblanchiment est négligeable car nous considérons le rapport de fluorescence des deux gouttes qui sont soumises au photoblanchiment dans les mêmes proportions. Les différentes conditions (une condition équivaut à un couple peptide-fluorescent/composition lipidique) sont ensuite comparées entre elles par un test statistique de Mann-Whitney afin de comparer la proximité des médianes des deux groupes testés. Ce test a été privilégié au test classique de Fisher (student t-test) car il s'agit d'un test non-paramétrique, c'est-à-dire qui ne fait pas l'hypothèse que les données suivent une distribution selon une loi normale. Il est également adapté à de petits échantillons. Pour chaque condition, nous considérons que la translocation a lieu lorsque la médiane du ratio des intensités I_{trans}/I_{cis} est significativement différente de celle du contrôle (RL9-A488) qui ne transloque pas ou très peu.

4.2 Étude de la translocation sur bicouches symétriques

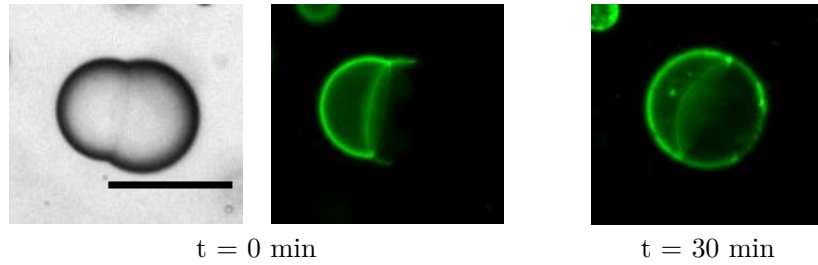
4.2.1 Influence de la charge des lipides

Comme mentionné au chapitre 2, les expériences de calorimétrie sur membranes modèles ont révélé la présence d'interactions fortes entre les lipides anioniques et la Pénétratine [Alves et al., 2008]. Les résultats obtenus pour la quantification de la translocation de la Pénétratine sur liposomes par spectrométrie de masse [Walrant et al., 2013], par extinction de fluorescence [Terrone et al., 2003] ou encore par microscopie de fluorescence [Thorén et al., 2000; Wheaten et al., 2013] s'accordent pour montrer que la translocation repose la présence d'interactions électrostatiques entre le peptide et les lipides anioniques.

Bicouches symétriques POPG

Nous avons préparé des bicouches symétriques composées de lipides anioniques POPG. La Pénétratine ($5 \mu M$) marquée à l'Alexa-488 est introduite dans l'une des deux gouttes (côté *cis*) et la goutte opposée contient uniquement de tampon (côté *trans*). Des images de la paire de goutte en lumière blanche et en épifluorescence sont présentées sur la figure 4.3 au temps initial de l'observation de la bicouche (c'est-à-dire quelques secondes après sa formation) et après 30 minutes d'expérience. Nous observons que les bords des gouttes *cis* sont davantage fluorescents que leur volume ce qui témoigne de l'interaction du peptide avec les lipides anioniques POPG de la monocouche qui favorisent son adhésion sur le bord des gouttes.

Pen-A488



RL9-A488

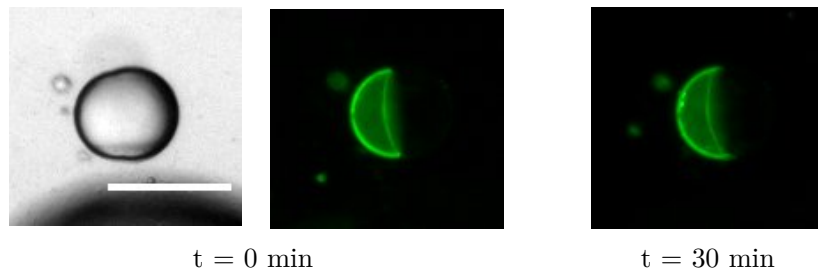


FIGURE 4.3 – Paires de gouttes formant des bicouches symétriques composées de lipides POPG en présence de Pénétratine-A488 (en haut) et de RL9-A488 (en bas) après formation de la bicouche ($t = 0$ min) en lumière blanche et épifluorescence et après 30 minutes d'expérience (épifluorescence). La goutte de gauche contient initialement le tampon contenant le peptide et la goutte de droite du tampon sans peptide. La barre d'échelle représente $50 \mu m$.

Après 30 minutes d'expérience, la fluorescence de la goutte *trans* a augmenté (initialement sans peptide) (figure 4.3). L'évolution de l'intensité de fluorescence pour les gouttes *cis* et *trans* au cours du temps, pour une expérience typique, est représentée sur la figure 4.4.a. L'intensité de la goutte *trans* croît tandis que l'intensité de la goutte *cis* décroît. Ces variations sont la signature de la translocation du peptide. La figure 4.4.b, représente le rapport des intensités de fluorescence I_{trans}/I_{cis} après 30 minutes pour 7 bicouches distinctes (en bleu).

La translocation de RL9-A488 a été étudiée dans les mêmes conditions. De même que pour la Pénétratine, la présence de bords fluorescents sur la goutte *cis* témoigne de l'interaction du peptide avec les lipides anioniques POPG (figure 4.3) [Walrant et al., 2011]. Après 30 minutes d'expérience, aucune fluorescence significative n'est détectée dans la goutte *trans*. Le peptide ne transloque donc pas à travers la bicouche bien qu'il interagisse avec les lipides. Plusieurs expériences sont présentées sur la figure 4.4.b (en mauve). Ainsi, en comparant les données pour les deux peptides, il est possible de conclure que Pen-A488 traverse la bicouche composée de lipides POPG tandis que RL9-A488 ne transloque pas. De plus, ceci prouve que dans nos conditions, la translocation de Pen-A488 n'est pas due à une perméabilité de la membrane ou à la présence de la sonde fluorescente.

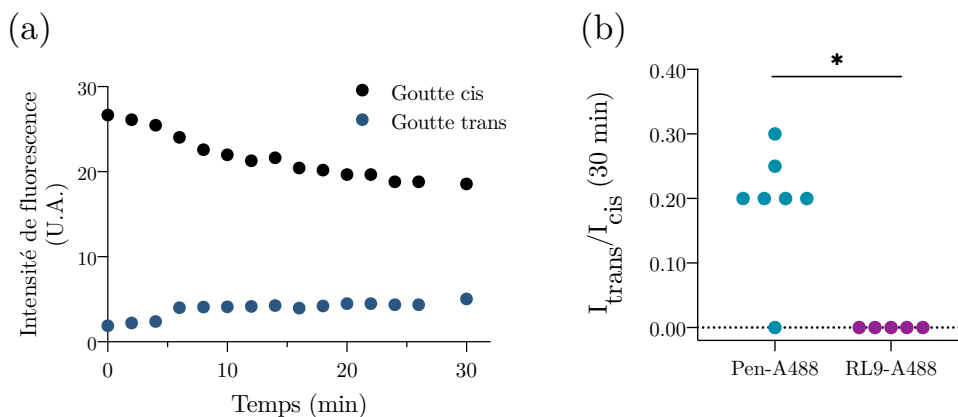


FIGURE 4.4 – Expériences de translocation à travers des bicouches de POPG. **a.** Évolution des intensités de fluorescence mesurées à l’intérieur des gouttes d’une paire dont la goutte *cis* contient de la Pénétratine marquée à l’Alexa488 et dont la goutte *trans* contient uniquement du tampon. **b.** Rapport des intensités de fluorescence I_{trans}/I_{cis} après 30 minutes d’expérience pour Pen-A488 et RL9-A488. La significativité entre les deux conditions est comparée par un test de Mann-Whitney : * : $p < 0,05$.

Observations sur la translocation

Les cinétiques de translocation de Pen-A488 ont été étudiées (non présentées ici, se référer aux données supplémentaires de [Gehan et al., 2020], présentes en annexe). Plusieurs observations découlent de ces données. D’une part, la translocation a lieu rapidement après la formation de la bicouche, c’est-à-dire en moyenne dans les dix premières minutes de l’expérience. D’autre part, la fluorescence de la goutte *trans* atteint un plateau qui ne correspond pas à l’équilibre des concentrations du peptide entre la goutte *trans* et la goutte *cis*. L’équilibre observé (stagnation de la fluorescence) témoigne d’un probable effet coopératif de la translocation qui nécessite la présence d’une certaine quantité de peptide afin de former une structure de perméation nécessaire à la translocation.

De plus, nous observons qu’une expérience de translocation sur sept (4.4.b) présente un rapport d’intensité I_{trans}/I_{cis} égal à zéro après 30 minutes. Il n’y a donc pas eu d’évènement de translocation détectable au cours de cette expérience. Ceci témoigne du caractère stochastique de la translocation, qui peut, par exemple, dépendre de la formation d’une structure de perméation dont la formation et/ou la durée de vie sont aléatoires. Ces observations seront discutées plus en détail dans la section discussion de ce chapitre (4.4). La translocation peut donc être décrite de façon probabiliste. Dans ce cas, la capacité de translocation d’un peptide dans une condition donnée est évaluée en terme d’évènements de « translocation » ou de « non translocation ». Les taux d’occurrence de la translocation entre les différentes conditions sont alors comparés. Les résultats présentés dans ce chapitre ont été publiés sous la forme de probabilités [Gehan et al., 2020]. Dans le cadre de ce manuscrit de thèse, les données de fluorescence sont présentées. Les conclusions restent les mêmes.

Bicouches symétriques POPC:POPG

Afin d'évaluer le rôle des interactions électrostatiques dans le processus de translocation, nous avons réalisé des bicouches symétriques composées de lipides zwitterioniques POPC. Dans ce cas, les monocouches ne présentent pas de fluorescence prononcée (figure 4.5), ce qui témoigne de l'absence d'interaction entre les lipides zwitterioniques à têtes PC et le peptide Pen-A488, en accord avec les données de calorimétrie [Alves et al., 2008]. Dans ces conditions, le peptide ne traverse pas la bicouche. Il en va de même pour RL9-A488 (figure 4.6). Cela confirme que la présence d'interactions entre les lipides et le peptide est une condition nécessaire pour la translocation sur membranes modèles.

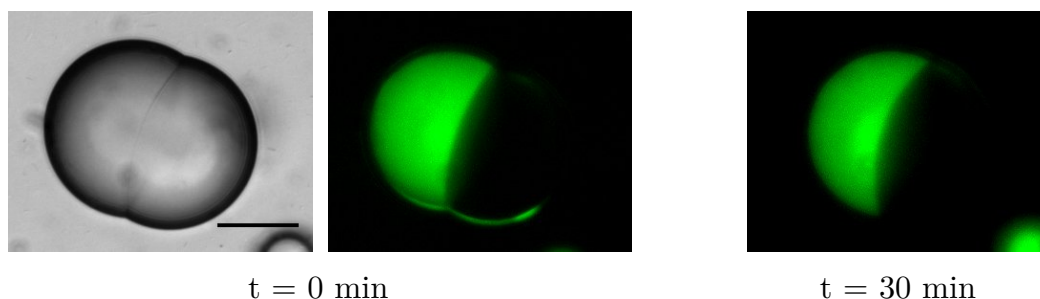


FIGURE 4.5 – Paire de gouttes formant une bicouche symétrique composée de POPC, en présence de Pen-A488 à $t = 0$ min (lumière blanche et épifluorescence) et $t = 30$ min (épifluorescence). La barre d'échelle représente $30 \mu m$.

Afin d'estimer la proportion de lipides anioniques POPG nécessaires à la translocation de Pen-A488, nous avons réalisés des expériences en présence de mélanges binaires de POPC et POPG à divers ratios molaires. La translocation de Pen-A488 et de RL9-A488 a été évaluée pour des bicouches composées de 100, 80, 60, 40, 20 et 0 % de POPG (dans la POPC). Les moyennes du rapport I_{trans}/I_{cis} après 30 minutes d'expérience sont présentées pour Pen-A488 (en bleu) et RL9-A488 (en mauve) sur la figure 4.6. La translocation a lieu de façon significative lorsque les bicouches sont composées d'au moins 40 % de lipides anioniques. En dessous de ce seuil, la translocation de Pen-A488 et de RL9-A488 a lieu dans les mêmes proportions. Cela confirme que la quantité de charges anioniques présentes sur la bicouche est importante pour le recrutement de la Pénétratine et sa translocation.

Il est à noter que l'expérience sur bicouches composées de 60 % de POPG présente une p -value de 0,07 ce qui est au dessus de l'intervalle de confiance de 95 %. Cette valeur est à imputer au caractère stochastique de la translocation. En raison du faible nombre d'expériences dans chaque condition (entre 5 et 10), ce caractère stochastique peut impacter les données statistiques. Cette condition présentant tout de même une forte propension à la translocation de Pen-A488, nous pouvons la considérer comme une condition dans laquelle la Pénétratine est capable de traverser la bicouche.

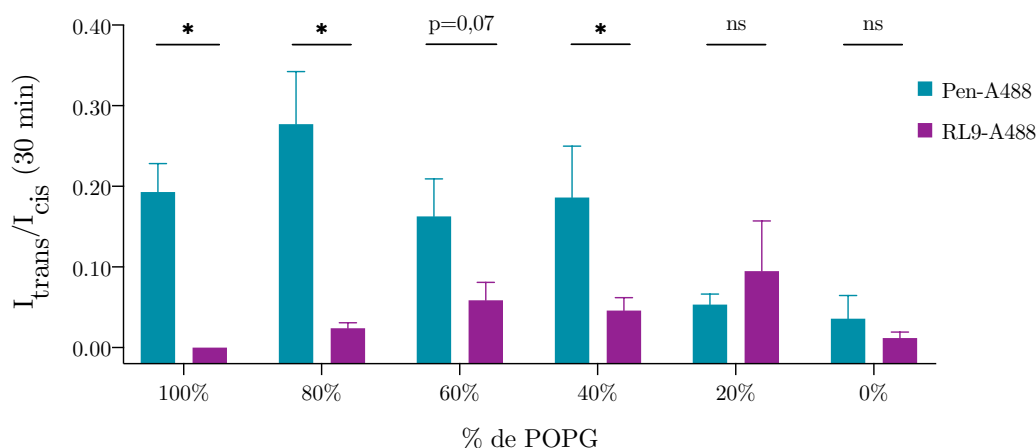


FIGURE 4.6 – Moyennes des rapports des intensités de fluorescence I_{trans}/I_{cis} après 30 minutes d’expérience en présence de Pen-A488 ou de RL9-A488 pour des bicouches symétriques de POPE et de POPG en différentes proportions. La barre d’erreur représente l’erreur type sur la moyenne. La significativité entre les conditions est évaluée par un test de Mann-Whitney : * : $p < 0,05$; ns : $p > 0,05$ ($5 \leq n \leq 10$).

4.2.2 Nature de la tête polaire

En supposant que l’interaction entre les lipides et le peptide soit purement d’origine électrostatique, la nature chimique de la tête polaire ne doit pas impacter la translocation tant qu’elle est chargée négativement. Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé des bicouches composées de POPS. De même que les lipides PG, ils possèdent une charge nette de -1 (à pH 7).

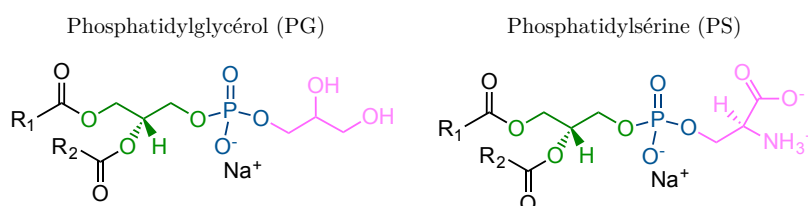


FIGURE 4.7 – Représentation des têtes polaires PG et PS à pH 7.

L’interaction électrostatique entre le peptide et les lipides PS est visualisée par une fluorescence prononcée des monocouches et bicouches des gouttes (figure 4.8.a). Malgré cette interaction, la translocation de Pen-A488 n’est pas observée (figure 4.8.b). Il semble donc que l’interaction électrostatique entre le peptide et les têtes polaires des lipides anioniques ne soit pas une condition suffisante à la translocation et que la nature chimique du groupe polaire ait un impact sur la capacité de translocation du peptide. Ce point sera discuté dans la section discussion de ce chapitre (4.4).

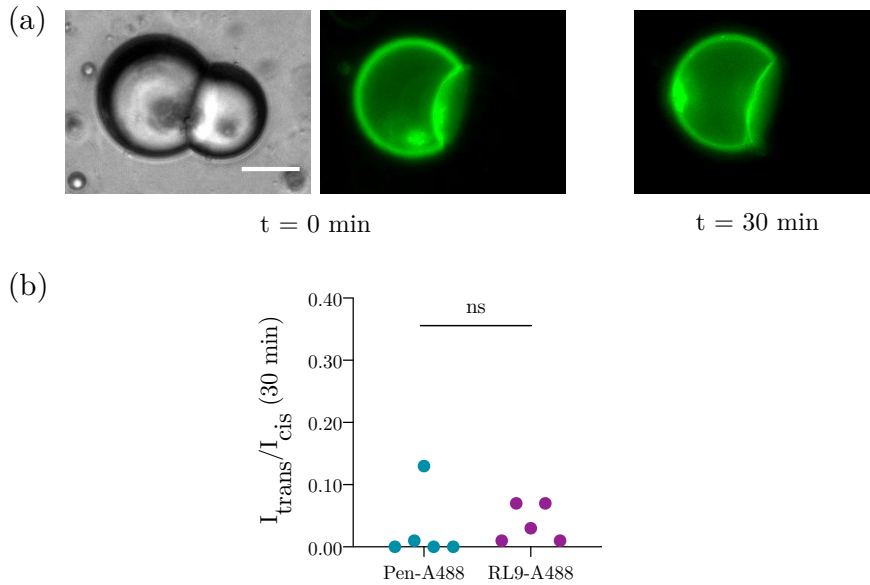


FIGURE 4.8 – **a.** Paire de gouttes formant une bicouche symétrique composée de POPS en présence de Pen-A488 à $t = 0$ min (lumière blanche et épifluorescence) et $t = 30$ min (épifluorescence). La barre d'échelle représente $20 \mu m$. **b.** Rapports des intensités de fluorescence I_{trans}/I_{cis} après 30 minutes d'expérience pour Pen-A488 et RL9-A488. La significativité entre les deux conditions est comparée par un test de Mann-Whitney : ns : $p > 0,05$.

4.2.3 Influence de la concentration en peptide

Nous avons étudié l'influence de la concentration en Pénétratine sur la translocation. Pour cela, les gouttes sont préparées avec $2 \mu M$ de Pénétratine correspondant à un ratio peptide/lipide (P/L) de 1/50 et comparées aux expériences à $5 \mu M$ (soit un ratio P/L de 1/20). Les moyennes des rapports d'intensité de fluorescence après 30 minutes sont reportées sur la figure 4.9. On remarque alors que la translocation du peptide est fortement réduite à $2 \mu M$. Le test de significativité présente cependant une p -value de 0,06. Tout comme le cas mentionné précédemment, cet écart est dû au caractère stochastique de la translocation et au faible échantillonnage de nos expériences. La majorité des expériences ne conduisant pas à la translocation du peptide, nous considérons cette condition comme différente de la condition à $5 \mu M$. De plus, lorsque les résultats sont analysés en terme de probabilité de translocation, l'analyse mène à la même conclusion : la translocation est fortement réduite à $2 \mu M$ [Gehan et al., 2020].

Cette baisse de la translocation par diminution de la concentration en peptide est cohérente avec une étape de translocation dépendante de la concentration en peptide. Cette étape est susceptible d'impliquer plusieurs peptides afin de déstabiliser collectivement la bicouche. La translocation relève donc d'un phénomène coopératif. Ce résultat est concordant avec l'observation d'un plateau d'intensité de fluorescence dans la goutte *trans* (figure 4.4.a) qui peut être dû à une diminution de la quantité de Pénétratine dans la goutte *cis* qui n'est alors plus suffisante pour induire l'effet coopératif nécessaire à la translocation.

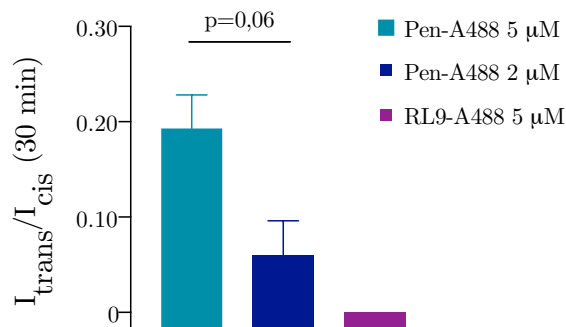


FIGURE 4.9 – Moyennes des rapports des intensités de fluorescence I_{trans}/I_{cis} après 30 minutes d’expérience en présence de Pen-A488 (5 μ M ou 2 μ M) et de RL9-A488 (5 μ M) pour des bicouches POPG. La barre d’erreur représente l’erreur type sur la moyenne. La significativité entre conditions est évaluée par un test de Mann-Whitney ($5 \leq n \leq 7$).

4.2.4 Conclusion

Ces premières expériences de translocation sur bicouches à l’interface de gouttes ont démontré la pertinence de ce modèle pour l’étude de la translocation du peptide vecteur Pénétratine marqué par un fluorophore. Il permet l’évaluation qualitative de l’affinité du peptide fluorescent pour les lipides et sa translocation à travers la bicouche. Les résultats ainsi obtenus corroborent ceux provenant d’études sur d’autres modèles de membranes [Walrant et al., 2011, 2013]. Les expériences présentées ici montrent que le recrutement du peptide est une condition nécessaire mais non suffisante à la translocation de la Pénétratine. La nature chimique de la tête polaire dicte, quant à elle la favorabilité de la translocation.

4.3 Étude de la translocation sur bicouches asymétriques

Afin de se rapprocher de la composition des bicouches biologiques et de décomposer le mécanisme de translocation des peptides vecteurs en étapes correspondant à leur interaction avec chaque feuillet de la bicouche, nous avons évalué la translocation sur des bicouches asymétriques.

4.3.1 Bicouches asymétriques POPG/POPC

Dans un premier temps, nous avons réalisé des bicouches asymétriques composées de POPG sur un feuillet et de POPC sur l’autre. Le peptide est introduit dans la goutte composée de lipides POPG d’une part, et d’autre part dans la goutte composée de lipides POPC. Le feuillet de la goutte contenant initialement le peptide est nommé feuillet proximal et le second, feuillet distal (figure 4.10).

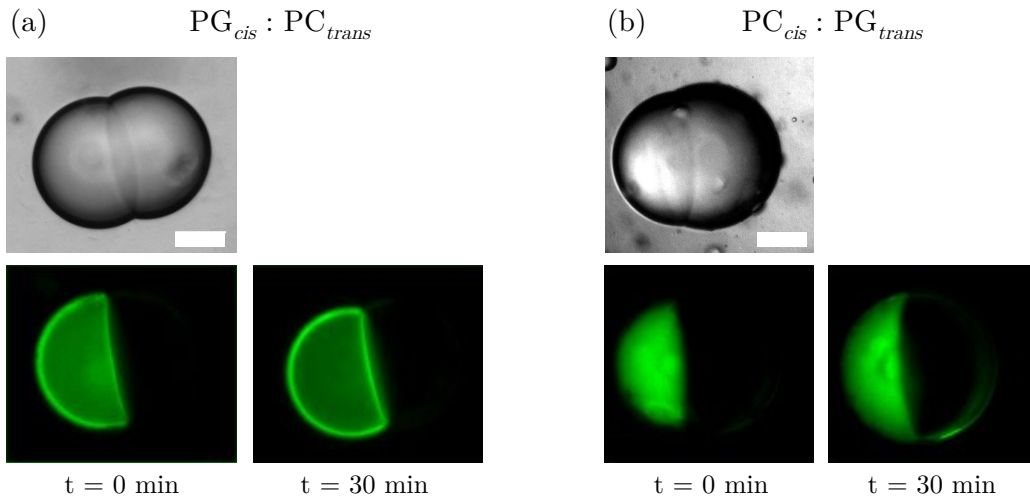


FIGURE 4.10 – Bicouches asymétriques POPG/POPC en présence de Pen-A488 à $t = 0 \text{ min}$ (lumière blanche et épifluorescence) et $t = 30 \text{ min}$ (épifluorescence). **a.** Le peptide est présent sur le feuillet proximal composé de lipides PG, le feuillet distal est composé de lipides PC. La barre d'échelle représente $20 \mu\text{m}$. **b.** Le peptide est présent sur le feuillet proximal composé de lipides PC, le feuillet distal est composé de lipides PG. La barre d'échelle représente $40 \mu\text{m}$.

La figure 4.10 présente des expériences réalisées sur bicouches asymétriques PG_{cis}/PC_{trans} (a) et PC_{cis}/PG_{trans} (b). À nouveau, le bord des gouttes contenant des lipides anioniques présente une fluorescence prononcée témoignant de leur interaction avec le peptide tandis que les gouttes composées de lipides zwitterioniques ne présentent pas de bords fluorescents. Il est intéressant de noter que cette absence de fluorescence sur la monocouche des gouttes POPC est maintenue tout au long de l'expérience lorsqu'elle adhère à une goutte composée de POPG. Ainsi, les lipides POPG ne rejoignent pas le feuillet de PC par *flip-flop*, ni par diffusion le long de la monocouche, ni même par échange avec la phase continue. L'asymétrie lipidique est donc maintenue au cours de nos expériences. Ceci confirme les expériences menées en présence d'annexine V et de lipides PS et PC (section 4.1.3).

Les résultats des expériences de translocation sur ces bicouches asymétriques sont représentés sur la figure 4.11. La translocation n'a lieu dans aucune des configurations, que le feuillet proximal soit composé de lipides PG ou de PC. Dans ce dernier cas, ceci n'a rien de surprenant car nous avons vu que la translocation nécessite le recrutement du peptide au niveau de la bicouche, or cela n'a pas lieu en présence de lipides zwitterioniques. L'expérience PG_{cis}/PC_{trans} montre que la présence de POPG sur le feuillet proximal n'est pas suffisante pour induire la translocation de Pen-A488 et que le feuillet distal joue un rôle dans ce processus. Nous avons alors supposé que la présence de charges anioniques sur le feuillet distal pouvait être nécessaire à la translocation.

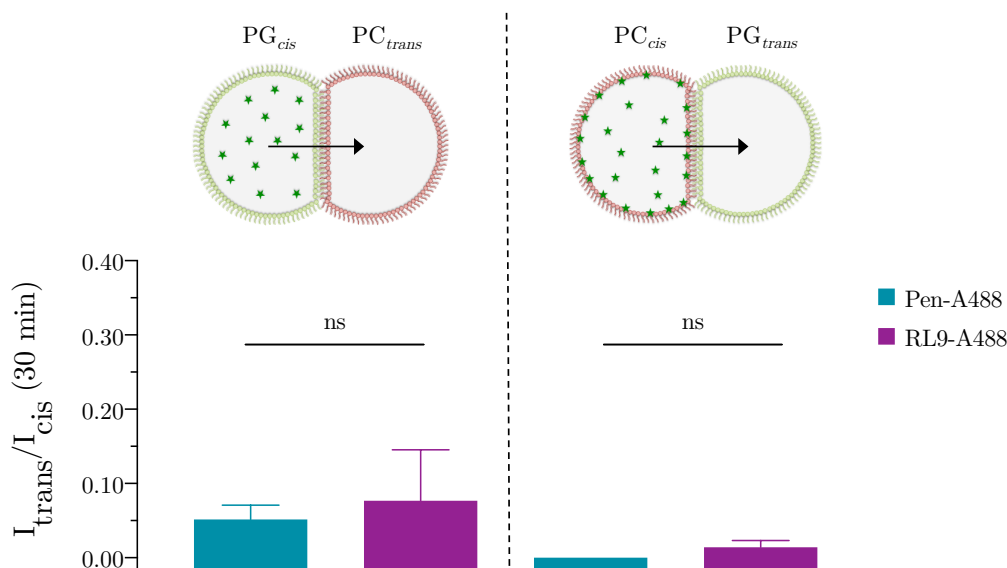


FIGURE 4.11 – Moyennes des rapports des intensités de fluorescence I_{trans}/I_{cis} après 30 minutes d’expérience en présence de Pen-A488 ou de RL9-A488 pour des bicouches asymétriques composées d’un feuillet de POPG et d’un feuillet de POPC. La barre d’erreur représente l’erreur type sur la moyenne. La significativité entre conditions est évaluée par un test de Mann-Whitney : ns : $p > 0,05$ ($5 \leq n \leq 6$).

4.3.2 Bicouches asymétriques POPG/POPS

Afin d’évaluer l’impact de la présence de lipides anioniques sur le feuillet distal, nous avons préparé des bicouches asymétriques composées de lipides POPG et de lipides POPS (figure 4.12). Le peptide est inséré successivement sur le feuillet proximal composé de lipides PG (PG_{cis}/PS_{trans}, figure 4.12.a) ou de lipides PS (PS_{cis}/PG_{trans}, figure 4.12.b). La translocation est observée dans le cas où le feuillet proximal est composé de lipides POPG (figure 4.12.a et c). En revanche, lorsque la POPS compose le feuillet proximal, la translocation de Pen-A488 n’a pas lieu (figure 4.12.b et c). Ces expériences montrent alors que lorsque POPG est présent sur le feuillet proximal, la présence de lipides anioniques sur le feuillet opposé est essentielle à la translocation.

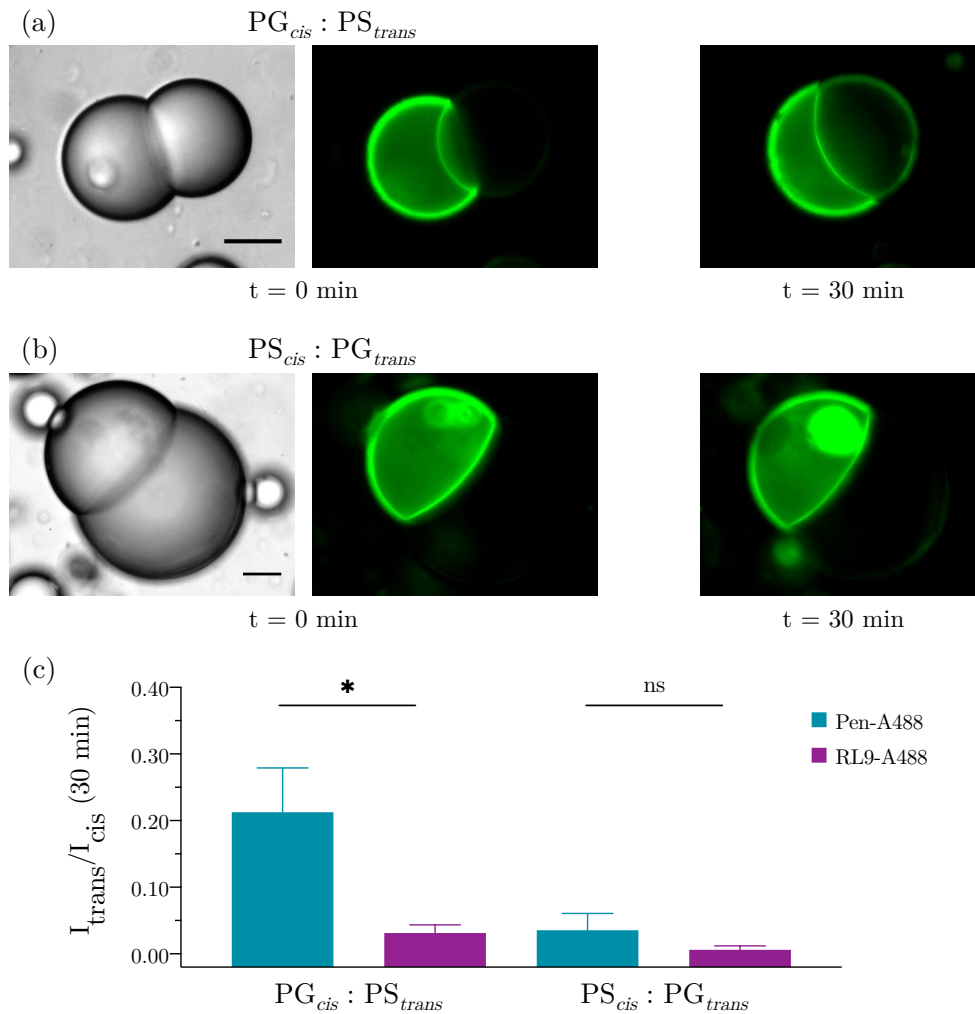


FIGURE 4.12 – **a. et b.** Bicouches asymétriques POPG/POPS en présence de Pen-A488 à $t = 0$ min (lumière blanche et épifluorescence) et $t = 30$ min (épifluorescence). La barre d'échelle représente $40 \mu m$. **c.** Moyennes des rapports des intensités de fluorescence I_{trans}/I_{cis} après 30 minutes d'expérience en présence de Pen-A488 ($5 \mu M$) ou de RL9-A488 ($5 \mu M$) pour des bicouches asymétriques composées d'un feuillet de POPG et d'un feuillet de POPS. La barre d'erreur représente l'erreur type sur la moyenne. La significativité entre conditions est évaluée par un test de Mann-Whitney : * : $p < 0,05$; ns : $p > 0,05$ ($5 \leq n \leq 7$).

4.3.3 Conclusion

Ces expériences sur bicouches asymétriques apportent une perspective nouvelle sur l'implication du feuillet distal dans le processus de translocation. En effet, l'interaction spécifique établie entre le peptide et les têtes polaires PG ne suffit pas à induire la traversée du peptide à travers la bicouche et la présence de charges négatives sur le feuillet distal est nécessaire. Ces charges peuvent provenir d'un autre lipide anionique tel que la POPS. Ainsi, le processus de translocation semble se décomposer en plusieurs étapes. Les implications en terme de mécanisme(s) de translocation seront discutées à la section suivante.

4.4 Discussion

4.4.1 La nature de la tête polaire des lipides anioniques impacte la translocation

Les expériences sur bicouches de POPC ont montré que le peptide n'est pas en mesure de traverser la bicouche en absence d'interactions avec les lipides. Ces résultats concordent avec les données de calorimétries pour lesquelles il a été montré que la Pénétratine n'affecte pas les transitions de phase des lipides zwitterioniques [Jobin et al., 2013]. En revanche, en présence de lipides anioniques POPG, l'interaction est visualisée par l'apparition de bords fluorescents et la translocation est observée. Les expériences de DSC montrent que la Pénétratine perturbe la pré-transition et la transition principale de lipides DMPG ce qui signifie qu'elle interagit avec les têtes polaires et perturbe les chaînes d'acides gras en s'insérant dans la bicouche [Alves et al., 2008]. Le peptide contrôle RL9, interagit avec les lipides anioniques sans induire de modification de la transition de phase principale de ces lipides ce qui montre que le peptide interagit uniquement avec la tête polaire sans affecter la compaction des chaînes d'acides gras et donc sans s'y insérer [Walrant et al., 2011].

De façon surprenante, la translocation de la Pénétratine n'est pas observée sur des bicouches composées de POPS bien que son interaction soit attestée par la présence de bords fluorescents. L'absence de données de calorimétrie en présence de lipides POPS ne nous permet pas de comparer nos expériences à la littérature. La tête polaire PG est composée d'un groupement phosphate et d'un groupement glycérol qui lui confèrent une charge nette de -1 (à pH physiologique). La tête polaire PS possède également une charge nette de -1 mais est composée d'un groupement phosphate (-1) et d'un groupement zwitterionique (NH_3^+ et COO^- , à pH 7) (figure 4.7). Les lipides PS peuvent alors établir des interactions électrostatiques supplémentaires avec le peptide. Il est alors possible de supposer que ces interactions entraînent des différences d'insertion du peptide dans la bicouche restreignant sa translocation.

Alhakamy *et al.* ont évalué l'insertion des peptides amphiphiles RW9 et RL9 dans des monocouches de Langmuir de différentes compositions [Alhakamy et al., 2015]. Ils observent que la pression à surface constante de monocouches composées de POPG est supérieure à celle des monocouches de POPS en présence de peptides. Ceci suggère que les peptides s'insèrent davantage dans les monocouches de POPG que de POPS. Cette différence d'insertion est attribuée à la nature des têtes polaires et aux interactions des peptides avec le groupement sérine susceptible de les retenir davantage en surface. Ces observations soutiennent notre hypothèse. Cependant, elles sont à considérer avec précautions car les résultats obtenus sur monocouches peuvent différer de ceux provenant d'expériences sur bicouches [Walrant et al., 2012].

Afin de comprendre si les différences de comportement du peptide observées entre les bicouches de POPG et de POPS sont bien dues à une différence d'insertion, nous envisageons d'avoir recours à d'autres techniques. La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) nous

permettra d'évaluer l'impact du peptide sur les transitions de phase de lipides à tête PS qui n'est à ce jour pas rapportée dans la littérature. Ces expériences pourront être appuyées par des expériences de RMN du phosphore afin d'évaluer le paramètre d'ordre de bicouches de différentes compositions en présence de la Pénétratine par la méthode PROCOSA [Yan et al., 2020; Warschawski et al., 2018]. Ces expertises sont présentes au laboratoire et nous pourrons prochainement réaliser ces expériences (collaborations avec Astrid Walrant et Dror Warchawski). La modélisation moléculaire de l'insertion dans les différentes bicouches par modélisation « gros grain » par utilisation du champ de force MARTINI [Marrink et al., 2007] est en cours de réalisation (collaboration avec Patrick Fuchs et Raphaëlle Versini).

4.4.2 Implication du feuillet distal

Bien que des études sur des bicouches asymétriques formées à l'interface de gouttes en présence du peptide vecteur Pep-1 soulèvent le rôle potentiel de l'asymétrie lipidique dans la translocation [Li et al., 2017], à notre connaissance aucune étude de la Pénétratine sur bicouches asymétriques ne semble avoir été menée. Nos expériences soulèvent pour la première fois l'implication du feuillet distal dans le processus de translocation de ce peptide.

Le recrutement du peptide et son insertion dans la bicouche rendus possibles par la présence de lipides POPG sur le feuillet proximal ne suffisent pas à la traversée du peptide. La présence de charges anioniques sur le feuillet distal semble pour cela indispensable. Ce feuillet est donc impliqué dans le processus de translocation. Plusieurs hypothèses peuvent alors être formulées. La première est que l'interaction du peptide avec le feuillet distal peut conduire à un amincissement local de la bicouche et à une déstabilisation de la membrane permettant la formation d'une structure de perméation. La seconde hypothèse est que la présence de charges négatives sur le feuillet interne puisse être nécessaire à l'établissement d'un potentiel transmembranaire agissant comme force motrice pour la translocation. Ces implications en terme de mécanismes de translocation seront développées aux paragraphes suivants.

4.4.3 Mécanisme(s) de translocation

Mécanisme coopératif, effet stochastique

Les cinétiques de translocation montrent que ce processus a lieu en quelques dizaines de minutes. La fluorescence mesurée dans la goutte *trans* présente ensuite un plateau. La quantité de peptides liés au feuillet proximal diminue au fur et à mesure qu'ils rejoignent le feuillet distal par translocation. Nos observations suggèrent donc que la translocation est un processus qui nécessite une quantité minimale de peptides sur le feuillet proximal afin d'engendrer une déstabilisation de la membrane. Les expériences réalisées en présence de 2 μM de Pénétratine montrent que la concentration en peptide est un paramètre critique pour la translocation. Ces résultats laissent supposer que le recouvrement de la membrane (ou la concentration locale en peptide) n'est pas suffisante pour induire sa déstabilisation. Ceci témoigne du caractère coopératif de la translocation : les peptides agissent collectivement

afin de déstabiliser la membrane. Les expériences en présence de différents ratios molaires de POPG et de POPC appuient ces observations. En effet, en dessous de 40% de lipides anioniques sur la bicouche, la translocation diminue. Les charges négatives ne sont plus suffisantes pour recruter suffisamment de peptides nécessaires à la déstabilisation de la membrane.

L'effet stochastique observé peut s'expliquer par l'effet coopératif de la translocation. En effet, la formation d'une structure de perméation peut dépendre de la présence de suffisamment de peptides localisés à proximité du site de déstabilisation afin de stabiliser transitoirement la structure de sorte à permettre la translocation des peptides.

Un ou des mécanisme(s) en trois étapes

La translocation apparaît comme un processus en trois étapes. La première implique le recrutement du peptide par la présence de charges négatives sur le feuillet externe de la bicouche. L'insertion du peptide mène alors à la déstabilisation locale de la bicouche et à la formation d'une structure de perméation. Cette deuxième étape est dépendante de la nature des lipides présents sur les deux feuillets de la bicouche et notamment de la présence de lipides PG sur le feuillet proximal et de lipides anioniques sur le feuillet distal. La Pénétratine étant peu hydrophobe, elle s'insère superficiellement dans les bicouches et de façon parallèle à la surface, à l'interface entre les queues et les têtes des phospholipides, en insérant le noyau de ses résidus tryptophanes vers le coeur hydrophobe [Drin et al., 2001; Zhang and Smith, 2005]. Son insertion provoque une ré-orientation des têtes polaires favorable à la formation d'une structure de perméation transitoire dépendante de la concentration de peptide. Dans une troisième étape, le peptide traverse la bicouche grâce à cette structure de perméation et atteint le compartiment opposé.

Déstabilisation de la bicouche

Plusieurs structures de perméation ont été proposées afin d'expliquer la déstabilisation de la membrane en présence de peptides vecteurs (se référer au chapitre 2 pour plus de détails sur ces structures). L'hypothèse de la formation de pores de taille définie et stable dans le temps tels que ceux formés par les peptides anti-microbiens a été écartée car la fuite de sondes fluorescentes n'est pas observée en présence de peptides vecteurs (chapitre 2). La ou les structures de perméation impliquées dans la déstabilisation de la membrane restent à l'état de suppositions. Les résultats présentés dans ce chapitre concordent avec plusieurs mécanismes proposés.

Réarrangement des lipides

L'insertion du peptide à l'interface tête-queue des phospholipides et la ré-organisation subséquente de ces derniers peut provoquer des défauts de compaction des lipides et mener à la formation de défauts d'eau. Cette ré-organisation des lipides sous forme de courbures négatives permet de protéger les peptides du coeur hydrophobe de la bicouche et d'abaisser la barrière énergétique due aux chaînes d'acides gras. Ce schéma correspond à la formation

d'un pore transitoire tel que le modèle toroïdale présenté au chapitre 2. Deux observations viennent appuyer cette hypothèse. En effet, l'absence de translocation à travers des bicouches de POPS peut résulter d'une moindre insertion du peptide. En présence de lipides PG, le peptide pourrait être capable de s'insérer suffisamment profondément afin de déstabiliser la bicouche et de lier les lipides du feuillet interne menant à un amincissement local de la bicouche. Dans l'hypothèse d'un tel mécanisme, la présence de charges négatives sur le feuillet interne est indispensable à la translocation du peptide. Or, nous avons vu par le biais des expériences sur bicouches asymétriques que cela est requis pour la translocation de la Pénétratine. Ainsi, le ré-arrangement des lipides provoque la formation d'un pore aqueux le long duquel le peptide diffuse. L'effet coopératif observé peut justifier le caractère transitoire de ces pores.

Le mécanisme de translocation par micelle inverse implique également la réorganisation des lipides et la formation de courbures négatives. Cependant le passage de la bicouche d'une phase lamellaire à une phase hexagonale et n'a pu être prouvé [Zhang and Smith, 2005]. Il est probable qu'un tel mécanisme induise une perte d'asymétrie lipidique puisqu'elle implique que les vésicules traversent la bicouche (chapitre 2). Cependant, nos conditions d'expériences ne permettent pas de prouver que cette perte d'asymétrie a lieu lors de la translocation. En effet, celle-ci est observée uniquement lorsque les deux feuillets de la bicouche sont chargés. La fluorescence des bords est alors déjà prononcée et ne permet pas de distinguer l'apparition de lipides du feuillet proximal sur le feuillet distal.

Champ électrique et déstabilisation de la membrane

Le mécanisme d'électroporation concorde également avec nos observations. En effet, l'accumulation de peptides chargés à la surface de la bicouche peut entraîner une inégale répartition de charges entre le feuillet proximal et le feuillet distal restant chargé négativement. Cette inégale répartition des charges conduirait à la formation d'un champ électrique qui, au-delà d'une certaine valeur, entraîne la formation de défauts d'eau et une déstabilisation de la membrane favorisant la translocation du peptide par la formation d'un pore transitoire. Au fur et à mesure que les peptides rejoignent le feuillet distal, le feuillet proximal est dépeuplé et les charges entre les deux feuillets s'équilibrent. Le champ électrique est alors réduit et la stabilité de la bicouche rétablie. Ce phénomène peut notamment expliquer l'absence d'équilibre de concentration du peptide de part et d'autre de la bicouche dans nos expériences ainsi que l'absence de translocation observée à $2 \mu M$. De plus, l'hypothèse qu'une quantité de charges anioniques minimale pour recruter suffisamment de peptide est nécessaire à l'établissement d'un champ électrique déstabilisant la membrane concorde avec ces observations.

Enfin, la translocation adaptative a été présentée comme un modèle plausible pour la translocation. Dans celui-ci, le potentiel de membrane a un rôle prépondérant et sert de force motrice à la translocation [Terrone et al., 2003]. Ainsi, l'apparition d'un champ électrique dû à l'adsorption de la Pénétratine sur le feuillet externe peut être un élément clé de la translocation. L'hydrophobicité des lipides est également impliquée dans la formation d'une paire d'ion peptide-lipide. En effet, Esbjorner *et al.* ont montré que la partition du peptide

dans un mélange eau/octanol est dépendante de la nature du lipide. Les lipides davantage hydrophobes tels que les phosphatidylinositols et les phosphatidylglycérols favorisent la formation de la paire d'ion menant à la solvatation dans l'octanol [Esbjörner et al., 2007]. La plus faible hydrophobicité des lipides PS peut ralentir la solvatation. Un tel mécanisme peut donc également correspondre à nos observations.

Conclusion

Bien que les expériences réalisées sur bicouches à l'interface de gouttes ne nous permettent pas de conclure quant à un mécanisme unique de translocation, elles concordent avec certains mécanismes proposés et apportent des informations sur le déroulement de celle-ci. La formation d'une structure de perméation dépend de la nature des phospholipides présents aussi bien sur le feuillet proximal que le feuillet distal. Nous avons également pu montrer que la translocation revêt un caractère stochastique et coopératif. L'évaluation de la translocation en présence de partenaires membranaires plus pertinents d'un point de vue biologique pourrait nous conduire à une meilleure identification des partenaires et effecteurs de la translocation.

4.5 Vers un système biomimétique

Bien que les lipides anioniques POPG soient très utilisés dans les études sur membranes modèles, ils ne reflètent pas la composition réelle des membranes de cellules eucaryotes. En effet, nous avons vu au cours du chapitre 1, que le feuillet externe est majoritairement composé de lipides zwitterioniques à tête PC, de sphingomyéline et d'une petite proportion ($< 10\%$) de lipides anioniques (PS, PI, PIP₂, PA). Nous pouvons alors nous demander quel est l'effecteur présent sur le feuillet externe des membranes biologiques qui joue le rôle que nous imputons aux lipides PG. Pour tenter d'apporter des réponses à cette question, nous avons décidé de remplacer les lipides anioniques POPG par des composants plus pertinents d'un point de vue biologique. Ainsi, les lipides anioniques PIP₂, présents en faible proportion sur la membrane plasmique ($\sim 1\%$ pour les érythrocytes humains [McLaughlin and Murray, 2005]) ainsi que les sucres de surface fortement chargés sont de bons candidats pour se substituer à la POPG.

4.5.1 Implication du PIP₂

Comme mentionné au chapitre 2, le PIP₂ est recruté par les domaines basiques de certaines protéines par l'intermédiaire de leurs résidus lysines et arginines [Golebiewska et al., 2006; Gambhir et al., 2004; Charlier et al., 2014]. L'incubation de cellules avec de la néomycine, bloquant les têtes polaires PIP₂, modifie la cinétique d'internalisation de la Pénétratine [Jiao et al., 2009]. Ceci suggère que la compétition de liaison entre la Pénétratine et la néomycine sur le PIP₂ force le peptide à emprunter une autre voie d'internalisation. Le PIP₂ pourrait donc être un partenaire de liaison de la Pénétratine et un potentiel effecteur de l'internalisation.

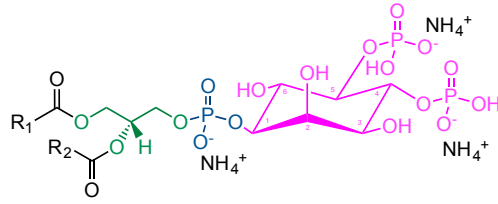


FIGURE 4.13 – Structure du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate PI(4,5)P₂.

Au laboratoire, des études par calorimétrie ont montré que la Pénétratine interagit avec des bicouches comportant une fraction de PIP₂ (PC/PS/PIP₂ 80/15/5). Des mesures en spectroscopie de fluorescence ont révélé que l’affinité de liaison de la Pénétratine avec le PIP₂ est supérieure à celle avec les lipides PS [Bechtella, 2019]. La modélisation moléculaire a appuyé ces résultats en montrant que le peptide recrute favorablement le PIP₂ tandis que les lipides PS diffusent librement sur le feuillet. Ainsi, nous pouvons supposer que la Pénétratine puisse former des domaines par ségrégation latérale du PIP₂ afin de s’insérer dans la bicouche. Ces lipides pourraient donc agir comme effecteur de l’internalisation par translocation directe. Ces expériences amènent à une meilleure compréhension de l’interaction entre les lipides PIP₂ et la Pénétratine mais ne permettent pas d’évaluer sa contribution dans la translocation.

Formation de bicouches à l’interface de gouttes contenant du PIP₂

Afin d’évaluer l’implication de l’interaction entre le PIP₂ et la Pénétratine dans la translocation directe, des bicouches contenant 10% de PI(4,5)P₂ dans du DOPC ont été réalisées (figure 4.13). Ces expériences montrent que 10% de PI(4,5)P₂ dans des bicouches zwitterioniques sont suffisants pour observer la formation de bords fluorescents et donc le recrutement des peptides sur la monocouche et la bicouche (figure 4.14). En revanche, la translocation du peptide à travers ces bicouches n’a pu être observée (figure 4.16).

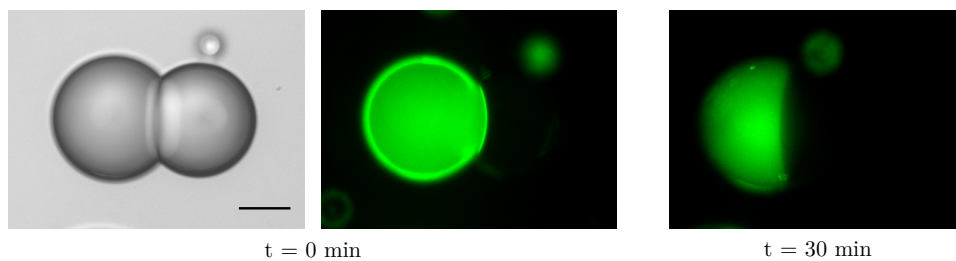


FIGURE 4.14 – Paire de goutte composée de 10% de PI(4,5)P₂ dans la DOPC, en présence de Pen-A488 à t = 0 min (lumière blanche et épifluorescence) et t = 30 min (épifluorescence). La barre d’échelle représente 30 μ m.

De façon intéressante, la fluorescence des bords de gouttes contenant le peptide évolue au cours du temps. La figure 4.15.a. présente la photographie d’une goutte après 30 minutes d’expérience. La formation de « patch » fluorescents est observée. Ces zones de fluorescences prononcées peuvent être dues à la formation de domaines enrichis en PI(4,5)P₂. Ces observations concordent avec les données de modélisation moléculaire mentionnées ci-dessus qui

rappellent la ségrégation latérale du PIP₂ en présence de Pénétratine. Néanmoins, il a été rapporté que le PIP₂ forme des clusters en présence de certaines concentrations en cations divalents tels que Ca²⁺ (> 25 μ M) et Mg²⁺ (> 300 μ M) en raison de leur interaction avec les groupements phosphates du PIP₂ [Carvalho et al., 2008]. La co-localisation de ces clusters avec des protéines ou des domaines basiques de protéines montre que malgré la formation de ces clusters, les charges négatives du PIP₂ restent disponibles pour lier les protéines. Ainsi, la ségrégation du PIP₂ et la formation de domaines chargés peuvent agir comme zones de docking des protéines [Ma et al., 2017].

Afin de s'assurer que les zones de forte fluorescence que nous observons soient dues à l'interaction spécifique entre le PIP₂ et la Pénétratine et non pas à la ségrégation du PIP₂ en présence de cations divalents, nous avons réalisé des gouttes en absence de MgCl₂ (figure 4.15.b). Celles-ci présentent également des zones de fortes intensités de fluorescences. Nous pouvons alors affirmer que même si la présence de cations divalents peut accentuer la formation de ces zones de fortes densités de PIP₂, la présence de la Pénétratine est en partie responsable de ces phénomènes.

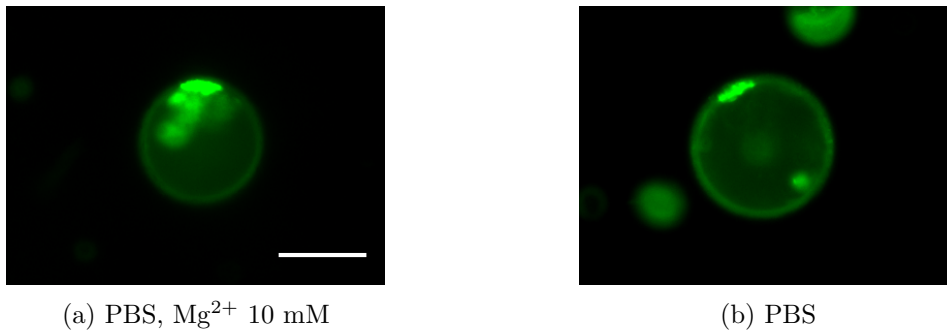


FIGURE 4.15 – Gouttes de DOPC contenant 10% de PIP₂. La phase aqueuse contient 5 μ M de Pénétratine-A488. La barre d'échelle représente 30 μ m.

La translocation n'étant pas observée en présence de 10% de PIP₂ dans la DOPC, nous avons supposé que les charges négatives sur le feuillet distal n'étaient pas suffisantes pour induire la translocation du peptide. Nous avons donc évalué la translocation de Pen-A488 sur des bicouches asymétriques dont le feuillet proximal est composé de DOPC contenant 10% de PIP₂ et dont le feuillet distal est composé de DOPS. Une seule expérience sur sept mène alors à l'observation de la translocation du peptide à travers la bicouche asymétrique. Les données pour ces expériences sont reportées sur la figure 4.16 et comparées aux expériences sur bicouches symétriques (DOPC + PIP₂ 10%). Ces deux conditions n'apparaissent pas significativement différentes. Nous pouvons conclure que la translocation du peptide n'est pas non plus observée sur les bicouches asymétriques composées de lipides anioniques PS sur le feuillet distal.

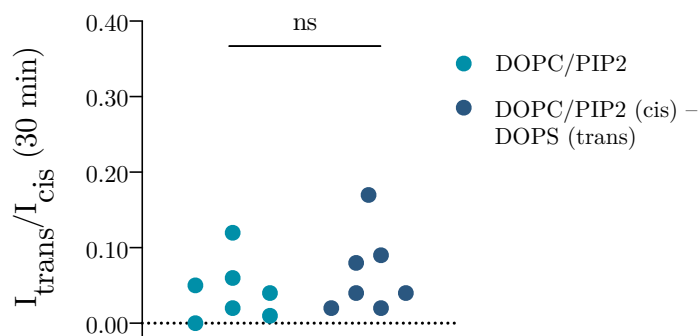


FIGURE 4.16 – Rapport des intensités de fluorescence I_{trans}/I_{cis} après 30 minutes d’expérience pour Pen-A488 sur bicouches symétriques (DOPC + PIP₂ 10%) et bicouches asymétriques (*cis* : DOPC + PIP₂ 10% ; *trans* : DOPS). La significativité entre les deux conditions est comparée par un test de Mann-Whitney : * : $p < 0,05$.

Nous observons cependant que la fluorescence des bords de gouttes décroît dans certaines expériences. Cela est visible sur la figure 4.14 où la goutte *cis* ne présente plus de bords fluorescents à la fin de l’expérience. Cela peut provenir de la concentration locale des phosphatidylinositols sous l’action du peptide. Néanmoins, ces lipides présentent une forte solubilité dans l’eau et il serait intéressant de s’assurer que les lipides ne passent pas en solution au cours de l’expérience. Si un tel phénomène se produit, il est logique que la translocation du peptide ne puisse avoir lieu. Des analogues fluorescents du PIP₂ ou des protéines marquées par fluorescence ayant une forte affinité pour le PIP₂ (domaine PH de la phospholipase C) [Beber et al., 2019] pourraient être employés afin de détecter la localisation du PIP₂ au cours de l’expérience.

4.5.2 Les sucres de surface, premiers partenaires membranaires à la surface des cellules

Les glycosaminoglycanes sont en majeure partie responsables de la forte proportion de charges négatives à la surface des cellules, en particulier par la présence de sucres hautement sulfatés tels que les héparanes sulfates et les chondroïtes sulfates (figure 4.17). Ce sont donc les premiers partenaires que rencontrent les peptides cationiques à la surface des cellules. Ils forment des liaisons hydrogènes bidentates avec les guanidiniums des résidus arginines des CPP *via* à leurs groupements sulfates et carboxylates. Cette interaction entraîne la formation d’agrégats de GAG pouvant agir comme signal d’endocytose [Ziegler and Seelig, 2008; Christianson and Belting, 2014]. Il a été montré qu’à forte concentration en peptide (10 μM), l’internalisation par endocytose est réduite sur lignée déficiente en GAG en comparaison aux cellules natives. En revanche, à faible concentration en peptide (1 μM), la contribution de l’endocytose est négligeable et le peptide semble internalisé uniquement par translocation directe aussi bien sur cellules natives que sur cellules déficientes en GAG [Walrant et al., 2017]. Il semble donc que ceux-ci ne soient pas impliqués dans le phénomène de translocation directe. Il n’est cependant pas impossible qu’en l’absence de GAG, le peptide emprunte une

autre voie d'internalisation. Aucune expérience de translocation sur modèle de membrane n'a été réalisée en présence de GAG liés à la bicouche, il n'est donc pas possible d'exclure totalement l'hypothèse de leur implication dans une voie de translocation directe.

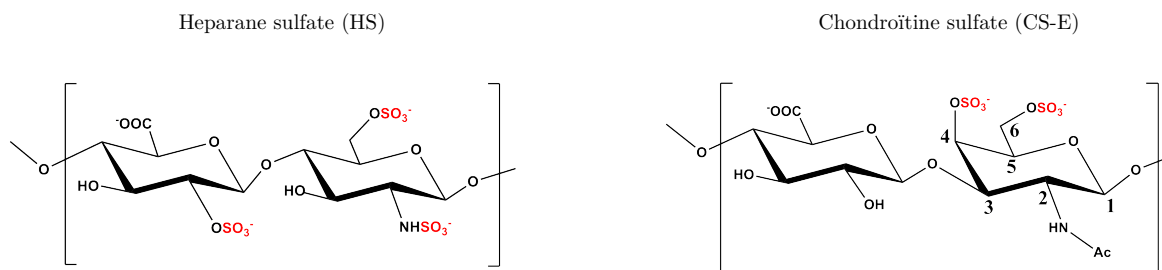


FIGURE 4.17 – Unité disaccharidique de l'héparane sulfate (HS) et de la chondroïtine sulfate (CS-E)

Au laboratoire, il a été montré que les lipides PC peuvent établir des interactions avec certains sucres en présence de cations divalents [He, 2020]. Des expériences de titration calorimétrique isotherme (ITC) ont permis de mesurer des constantes d'affinités de l'ordre du nanomolaire entre les chondroïtes sulfates ou les héparanes sulfates et la POPC. En absence de cations divalents, cette interaction est abolie. En présence d'un peptide chimère (P3), combinant l'hélice 3 de la protéine Engrailed-2 et un motif de liaison aux GAG, l'affinité du complexe P3/CS-E pour des liposomes composés de DOPC est meilleure que l'affinité P3-DOPC (données non publiées).

Cette interaction sucre-lipide zwitterionique offre la possibilité de former des liposomes sur lesquels les sucres se greffent en surface et ainsi d'obtenir des modèles de membranes prenant en compte la présence de ces composants. Nous avons souhaité reproduire de telles conditions sur nos bicouches formées à l'interface de gouttes. Un tel modèle nous permettrait d'évaluer l'implication des sucres de surfaces dans la translocation directe.

Pour ce faire, nous avons préparé des gouttes recouvertes de lipides DOPC dont la phase aqueuse contient des héparanes sulfates. Afin de détecter la localisation des sucres, nous avons également ajouté un peptide de reconnaissance qui a une forte affinité pour les héparanes sulfates (motif de liaison aux GAG de la protéine Engrailed-2) marqué par la carboxyfluorescéine, CF-En-2-Gag-motif-HS, en présence de 3 mM de Ca²⁺. La présence du peptide fluorescent ayant une forte affinité pour les sucres permet de détecter si ceux-ci sont présents en volume dans les gouttes ou si l'affinité des héparanes pour les lipides anioniques induit leur présence sur les monocouches. De la sorte, les bords des gouttes devraient apparaître davantage fluorescents que le volume. Le ratio peptide/lipide a été fixé à 1/100 et différents ratio sucre/lipide ont été évalués. Les différentes conditions testées sont résumées table 4.1.

Ratio S/L	DOPC	DOPG
1/1000	Volume	Volume et monocouche
1/500	Volume	Volume et monocouche
1/100	Volume	Volume et monocouche
1/50	Volume	Volume et monocouche
1/10	Volume	Volume

TABLE 4.1 – Localisation de la fluorescence sur des gouttes composées de lipides DOPC ou DOPG en présence du peptide CF-En-2-Gag-motif-HS (ratio peptide/lipide 1/100) et d'héparanes sulfates à divers ratio sucre/lipide en présence de 3 mM de Ca^{2+} .

Ces différentes conditions ne mènent pas à l'observation de monocouches fluorescentes. Les héparanes sulfates ne semblent donc pas interagir avec les lipides dans nos expériences. Il semblerait donc que sur notre système, nous n'arrivons pas à reproduire l'interaction DOPC-HS observée sur liposomes. Nous envisageons d'avoir recours à l'utilisation de sucres fluorescents afin de les localiser dans les gouttes de façon directe et d'évaluer leur interaction avec les lipides zwitterioniques en présence de cations divalents. Une alternative pertinente serait le recours à des lipides liés covalamment aux sucres.

4.6 Conclusion du chapitre

Les expériences sur bicouches formées à l'interface de gouttes apportent des éléments quant au déroulement de la translocation et sur les partenaires membranaires. Nous avons vu que la translocation revêt un caractère stochastique et coopératif. Ainsi, la formation d'une structure de perméation efficace pour la translocation nécessite une quantité minimale de peptides à proximité du site de perturbation de la membrane. La dépendance en concentration de peptide et en nombre minimale de charges anioniques sur la membrane appuient ces hypothèses.

Le rôle du feuillet distal de la bicouche a notamment été soulevé. Il semblerait que la structure de perméation soit dépendante de la présence de charges négatives sur le feuillet distal. D'un point de vue biologique, cette observation est tout à fait cohérente car la majorité des lipides anioniques se trouvent sur le feuillet interne de la membrane plasmique. Le recrutement des lipides du feuillet distal et l'établissement d'un champ électrique à travers la bicouche peuvent déstabiliser la membrane et favoriser la formation d'une structure de perméation transitoire. Nous souhaitons à présent nous rapprocher d'un système biomimétique pertinent par l'intégration de lipides présents sur le feuillet externe des cellules et de sucres de surfaces.

La déstabilisation de la bicouche est encore incomprise de la communauté scientifique. Bien que différentes structures de perméation soient proposées pour expliquer la traversée du

peptide, les origines et mécanismes de la ré-organisation lipidique et la force motrice de la translocation restent à prouver. Le potentiel de membrane est néanmoins soupçonné jouer un rôle dans ces processus. Nous étudierons l'effet de la liaison du peptide à la membrane sur la différence de potentiel transmembranaire dans le chapitre suivant.

Chapitre 5

Mesures électriques sur bicouches à l'interface de gouttes

La bicouche hydrophobe constitue un matériau isolant séparant deux compartiments aqueux. D'un point de vue électrique, elle peut donc être modélisée par un condensateur. Son comportement est alors déterminé par sa capacité et sa résistance. De par leur géométrie, les bicouches formées à l'interface de gouttes permettent l'accès aux compartiments aqueux, en particulier *via* l'insertion d'électrodes de part et d'autre de la bicouche. La mesure du courant et de la tension à travers celle-ci est alors possible et permet d'évaluer les propriétés électriques de la bicouche. Celles-ci dépendent de sa composition lipidique et de sa cohésion. Elles sont obtenues par la méthode du « *voltage-clamp* » (tension imposée) qui mesure le courant traversant la bicouche lors de l'application d'une marche de tension. Au contraire, la méthode « *current-clamp* » (courant imposé) permet la mesure de la différence de potentiel (tension) de part et d'autre de la bicouche lorsqu'un courant électrique est imposé.

Nous avons donc exploité les propriétés électriques des bicouches afin, d'une part, d'obtenir une caractérisation de celles-ci (épaisseur de la membrane *via* la mesure de sa capacité) et d'autre part, d'étudier le rôle du potentiel dans le phénomène de translocation. Nous avons vu au cours des chapitres précédents que le potentiel de membrane est présumé agir en tant que force motrice de la traversée de la membrane dans le cadre de certains mécanismes de translocation. Nous avons également soulevé la possibilité d'un mécanisme d'électroporation pour lequel la distribution de la Pénétratine sur le feuillet externe de la bicouche pourrait contribuer à la déstabilisation de la membrane.

Avertissement au lecteur : Dans ce chapitre, le terme de « potentiel » est évoqué abusivement. Celui-ci fait en réalité référence à la différence de potentiel entre deux points de l'espace. Le potentiel évoqué correspond donc au potentiel défini en fonction d'une référence. Dans le cas des cellules, la différence de potentiel correspond au potentiel à l'intérieur des cellules en référence au zéro fixé à l'extérieur des cellules. Dans le cas des simulations rencontrées dans ce chapitre, la référence correspond au zéro fixé à l'infini. Dans le cadre des mesures réalisées, la différence de potentiel est mesurée par rapport à l'électrode de référence.

5.1 Caractérisation des bicouches

Nous avons caractérisé les propriétés électriques de la bicouche de phospholipides afin de mesurer sa capacité et ainsi en déduire l'épaisseur de son coeur hydrophobe. Cette caractérisation est importante et permet de s'assurer que la bicouche contient une très faible quantité d'huile (ou en est exempt). Il a, par exemple, été montré que la formation de GUV par des émulsions mène à l'insertion d'huile dans les bicouches et à l'altération des propriétés de celles-ci [Walde et al., 2010]. Les propriétés électriques de la membrane utiles à ces mesures, le dispositif expérimental et la caractérisation de nos bicouches sont présentées dans cette section.

5.1.1 Propriétés électriques de la membrane

La membrane plasmique

La membrane plasmique est peu perméable aux espèces chargées (ions, molécules, voir chapitre 1). Elle présente donc une forte résistance électrique : les charges s'accumulent de part et d'autre. Cette barrière sépare deux milieux distincts, le cytoplasme et le milieu extracellulaire dont les concentrations en ions sont très différentes. La présence de ces ions chargés et leur inégale répartition de part et d'autre de la membrane plasmique génère une différence de potentiel. Les propriétés de la membrane à l'origine de cette différence de potentiel proviennent de la bicouche de phospholipides et des protéines membranaires.

La bicouche de phospholipides agit comme une barrière imperméable en raison de son caractère hydrophobe. En tant que milieu isolant entre deux milieux conducteurs, elle possède les propriétés électriques d'un condensateur de capacité C_M . La capacité de la bicouche est d'environ $1 \mu F.cm^{-2}$ et varie peu d'un élément de membrane à l'autre. Sa forte imperméabilité aux ions permet le maintien de la différence de potentiel.

Au contraire, les protéines membranaires sont responsables de la perméabilité de la membrane en laissant passer les ions à travers les canaux et pompes ioniques. Lorsque ces ions circulent, les canaux se comportent comme des générateurs de courant à conductances élevées (ou faibles résistances). Selon la nature et la densité des protéines, la résistance des membranes varie de 100 à 10 000 $\Omega.cm^{-2}$.

La membrane peut donc être modélisée par un circuit électrique comprenant une résistance R et un condensateur de capacité C en parallèle (figure 5.1). Lors de l'application d'une marche de courant, la capacité et la résistance de la membrane conjuguent leurs effets pour déterminer l'évolution dans le temps du potentiel aux bornes de la membrane. La différence de potentiel est alors décrite par une fonction exponentielle dont le paramètre caractéristique τ , la constante de temps du circuit, correspond au temps nécessaire à la membrane pour se charger. Elle correspond au produit de la résistance et de la capacité C de la membrane et s'exprime en secondes :

$$\tau = R \times C \quad (5.1)$$

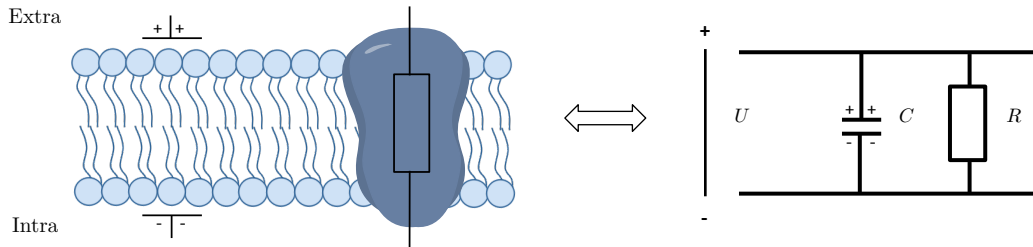


FIGURE 5.1 – Représentation schématique d’une portion de membrane plasmique traversée par un canal ionique (protéine transmembranaire) et son schéma électrique équivalent.

Cas des bicouches modèles

Les bicouches modèles sont également modélisables par un circuit "RC". Le courant capacitif transitoire domine le courant à travers la résistance de la membrane et celle-ci peut être négligée. Dans ce cas, l’équation (5.1) est toujours valable mais la résistance R correspond à la résistance du milieu entre les électrodes de mesure et la membrane (notée R_P par la suite).

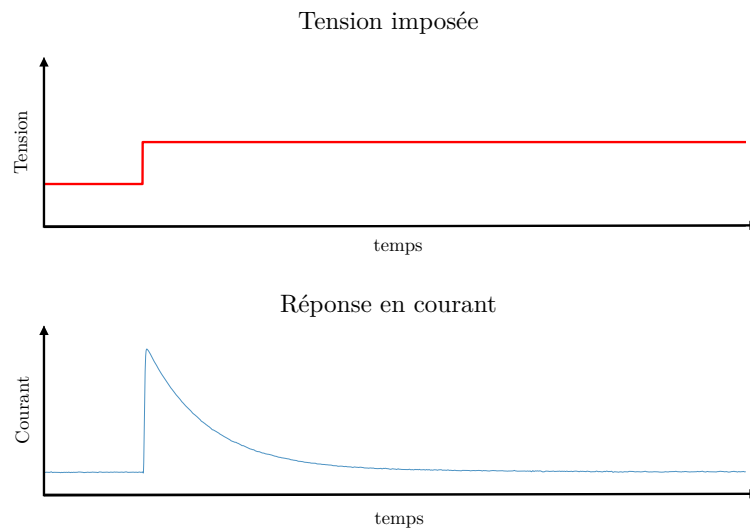


FIGURE 5.2 – Réponse en courant de la membrane lors de l’application d’une tension. Le signal correspond à la charge du condensateur. La modélisation de l’exponentielle décroissante permet d’estimer le temps caractéristique τ .

La réponse en courant d’un circuit "RC" soumis à un échelon de tension est représentée sur la figure 5.2 et correspond à la charge du condensateur. La décroissance observée suit une loi exponentielle dont l’ajustement permet de déterminer le temps caractéristique τ . À partir de cette valeur, la capacité de la bicouche est déduite à partir de la relation (5.1) (avec $R = R_P$). La bicouche étant considérée comme un matériau diélectrique, il est possible

d'en déduire l'épaisseur de son coeur hydrophobe e grâce à sa capacité spécifique C_M , ε_r la constante diélectrique de la région hydrophobe et ε_0 la permittivité du vide par la relation suivante [Montal and Mueller, 1972] :

$$C_M = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0}{e} \quad (5.2)$$

5.1.2 Dispositif expérimental et caractérisation des bicouches

Dispositif expérimental

Les gouttes sont formées à la pointe de micropipettes contenant des électrodes, celles-ci sont reliées à un amplificateur. La position des micropipettes est contrôlée grâce à un micromanipulateur. Les pipettes sont remplies de solution aqueuse et plongées dans la phase continue contenant le squalène, le chloroforme et les phospholipides. Les gouttelettes sont soufflées à l'extrémité de chaque pipette en exerçant une légère surpression. Elles sont maintenues dans la phase huile quelques minutes afin de permettre aux phospholipides de migrer à l'interface eau/huile pour former une monocouche à leur interface. Les gouttes sont ensuite rapprochées jusqu'à ce qu'elles entrent en contact et forment la bicouche. Un tel dispositif et son schéma électrique équivalent sont représentés sur la figure 5.3.

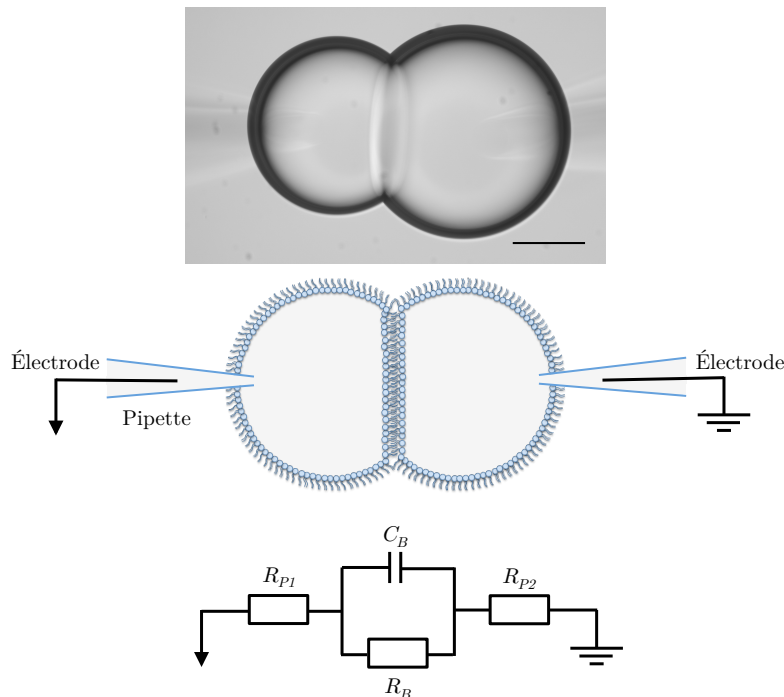


FIGURE 5.3 – Photo et schéma du dispositif expérimental pour la caractérisation électrique des bicouches à l'interface de gouttes et schéma électrique équivalent. $R_P = R_{P1} + R_{P2}$ correspond aux résistances du milieu dans les pipettes, R_B et C_B correspondent à la résistance et à la capacité de la bicouche. La barre d'échelle représente $100 \mu\text{m}$.

Capacité et épaisseur

Afin de déterminer les propriétés électriques de la bicouche, une marche de tension de 20 mV est appliquée et la réponse en courant est enregistrée. Le courant transitoire est modélisé par une exponentielle décroissante dont le temps caractéristique correspond à τ et permet de calculer la capacité de la bicouche grâce à l'équation (5.1) pour laquelle R correspond à la résistance due aux pipettes (R_P). La résistance des pipettes est obtenue en insérant les deux pipettes dans une même goutte (voir le matériel et méthode pour plus de détails). À partir de la valeur de R_P et de τ , la capacité de la bicouche (C_b) est calculée. Afin de comparer les expériences entre elles, la capacité spécifique C_M (C_b/S , avec S la surface de la bicouche) est obtenue à partir du diamètre de bicouche (la forme de la bicouche est en bonne approximation un disque) mesurés sur des images de paires de gouttes réalisées simultanément à l'enregistrement électrique.

De la sorte, la capacité spécifique C_M est estimée à $0,72 \pm 0,12 \mu F.cm^{-2}$ pour des bicouches de POPG formées dans le squalène, correspondant aux valeurs attendues pour des bicouches purement lipidiques dont la valeur se situe autour de $0,6 \mu F.cm^{-2}$ [Fujiwara et al., 2003; Gross et al., 2011]. Des mesures sur bicouches à l'interface de gouttes composées de lipides DPhPC dans l'hexadécane donnent également une capacité spécifique de $0,65 \pm 0,2 \mu F.cm^{-2}$ [Taylor et al., 2015]. C_M est dépendante de la nature du solvant et varie avec la quantité de solvant présente dans la région hydrophobe de la bicouche. Ainsi, Taylor *et al.* ont montré que lorsque la taille de la molécule du solvant diminue, la solubilité des lipides augmente dans l'huile et la quantité de solvant intercalé entre les chaînes des phospholipides augmente. La capacité surfacique diminue alors ($C_M = 0,48 \mu F.cm^{-2}$ pour des bicouches de DPhPC dans le décane) [Taylor et al., 2015]. Ainsi, la nature de l'huile impacte les propriétés électriques de la bicouche et la formulation des émulsions doit tenir compte de ces mesures.

L'épaisseur du coeur hydrophobe de la bicouche est estimée à partir de l'équation (5.2), où e et $\varepsilon_r = 2,8$ correspondent respectivement à l'épaisseur et à la constante diélectrique relative de la région hydrophobe de la bicouche [Valincius et al., 2008], et $\varepsilon_0 = 8,85.10^{-12} F.m^{-1}$, à la permittivité du vide. À partir de ces données, l'épaisseur du coeur hydrophobe de la bicouche est estimée à $3,45 \pm 0,63$ nm. Cela correspond bien à la valeur attendue pour le coeur hydrophobe d'une bicouche de phospholipides [Binder and Gawrisch, 2001]. Ainsi, les données obtenues pour l'épaisseur et la capacité spécifique de nos bicouches indiquent la très faible proportion (ou l'absence) d'huile intercalée entre les chaînes d'acides gras des phospholipides.

Limitations

Les bicouches de POPC présentent une stabilité moindre en comparaison à des bicouches de POPG. Cette instabilité n'a pas posé de problèmes dans le cadre de nos expériences par la méthode « manuelle » (chapitre 4). En effet, celle-ci génère un grand nombre d'émulsions par expérience et facilite l'observation de telles bicouches. En revanche, leur formation à la pointe

de micropipettes est davantage dépendante de la probabilité de formation des bicouches car une seule bicouche est formée par expérience. Ainsi, l'instabilité des bicouches rend difficile leur observation par cette méthode.

L'instabilité des bicouches de POPC s'explique par la présence de défauts de compaction des lipides. Venkatesan *et al.* ont évalué la cinétique de compaction de monocouches de différentes compositions en suivant la tension de surface de gouttes par la méthode de la goutte pendante [Venkatesan et al., 2018]. Ils montrent que les tensions de surface des monocouches de DOPC et de DPhPC atteignent rapidement (<5 min) leur tension de surface à l'équilibre ($\gamma = 1,99$ mN/m pour monocouches de DOPC et $\gamma = 1,18$ mN/m pour monocouches de DPhPC). En revanche, la tension de surface de gouttes recouvertes de POPC est d'environ 12,6 mN/m cinq minutes après leur formation alors que la tension d'équilibre est de 1 mN/m. Ainsi, le recouvrement de l'interface par adsorption et compaction des phospholipides est plus lente pour les lipides POPC qui présentent alors des défauts de compaction menant à la coalescence des gouttes mises en contact. Les différences entre les lipides POPC et POPG observées au cours de nos expériences peuvent être attribuées à la présence de cations divalents. En effet, les lipides POPG chargés négativement (à pH7) sont densifiés par diminution des répulsions électrostatiques entre têtes polaires adjacentes en raison du pontage par les cations divalents. Au contraire, les lipides POPC, neutres, ne peuvent bénéficier de cette interaction et leur compactage est moindre.

Pour la suite de nos expériences, nous avons donc décidé d'avoir recours aux lipides DOPC qui présentent une meilleure cinétique de compaction, lorsque des lipides zwitterioniques étaient requis. La formation de paires de gouttes gonflées sur les micropipettes s'est alors avérée efficace. La caractérisation électrique des bicouches de DOPC indique une épaisseur du coeur hydrophobe de $2,81 \pm 0,5$ nm et une capacité spécifique de $0,91 \pm 0,16 \mu F.cm^{-2}$ en accord avec les valeurs attendues pour une bicouche ne contenant pas d'huile [Montal and Mueller, 1972].

5.2 Simulation du potentiel en présence de Pénétratine

5.2.1 Potentiel de membrane et translocation

Bien que sa démonstration reste controversée, il est de plus en plus admis qu'un mécanisme impliquant la formation de pores transitoires soit impliqué dans la translocation des peptides vecteurs. La formation d'un pore par la réorganisation des lipides requiert le franchissement d'une barrière énergétique importante. Celle-ci est cependant abaissée en présence d'un champ électrique. Le potentiel de membrane est donc un élément important mais l'étendue de son implication demeure incertaine. Il apparaît comme un probable facteur mais pas nécessairement comme force motrice exclusive de la translocation puisque celle-ci est observée sur bicouches modèles et ce même en l'absence de potentiel transmembranaire.

L'accumulation de peptides chargés à la surface de la bicouche de phospholipides entraîne une répartition asymétrique des ions de part et d'autre de la bicouche. Le potentiel de membrane en présence d'un peptide résulte donc à la fois du potentiel transmembranaire intrinsèque et du potentiel généré par la présence du peptide [Cahill, 2010]. Par modélisation moléculaire, Gao *et al.* ont montré que la contribution de la liaison de CPP cationiques au potentiel de membrane est importante pour la nucléation d'un pore. En effet, ils montrent qu'en l'absence de peptide, le potentiel de membrane est insuffisant pour générer la formation de pores tandis que l'ajout de peptides favorise leur nucléation [Gao et al., 2019]. Cependant, les valeurs de potentiels obtenues par ces simulations correspondent à des potentiels membranaires élevés qui ne reflètent pas les potentiels auxquels de tels mécanismes se produisent sur cellules. En effet, les champs électriques estimés ici sont aux alentours de 0,4 V/nm alors qu'ils sont inférieurs à 0,1 V/nm dans les cellules. Des simulations sur des temps plus longs sont nécessaires pour obtenir des résultats transposables aux systèmes biologiques. Cependant, de telles simulations sont difficiles à réaliser.

D'autre part, Herce *et al.* ont montré expérimentalement que la perméabilisation de bicouches DOPC:DOPG (3:1), en présence d'une différence de potentiel de 50 mV, augmente après l'addition de Pénétratine ($7 \mu\text{M}$) [Herce et al., 2009]. L'augmentation de la perméabilité des bicouches se manifeste par une augmentation du courant ionique en présence d'une différence de potentiel imposée de part et d'autre de la membrane ainsi que par la présence de sauts discrets de courant. Les auteurs supposent alors que la présence du peptide sur la membrane entraîne la formation de pores transitoires aqueux permettant le passage des ions à travers la bicouche. Ces expériences ne permettent cependant pas de conclure quant à la translocation du peptide dans ces conditions.

Ces différentes études convergent donc vers la contribution de la liaison du peptide à la surface des membranes dans l'établissement d'un potentiel de membrane suffisant pour conduire à la formation d'un pore transitoire. Nous avons donc souhaité estimer la contribution de la Pénétratine à la différence de potentiel à travers nos bicouches. Pour cela, nous avons étudié le comportement électrique aux abords d'une membrane recouverte de Pénétratine. Ainsi, la modélisation de l'environnement électrique permet d'obtenir la valeur théorique du potentiel électrique dû à la répartition des ions aux abords de la membrane en réponse à la présence du peptide sur la bicouche. Il faut pour cela, dans un premier temps, estimer le taux de recouvrement de la membrane par la Pénétratine. Nous avons ensuite souhaité mesurer le potentiel effectif induit par le peptide de part et d'autre de la membrane.

5.2.2 Taux de recouvrement de la membrane

Le taux de recouvrement de la membrane est estimé par analyse de la fluorescence de gouttes contenant la Pénétratine marquée en comparaison à un étalon fluorescent. Ces estimations sont réalisées dans l'hypothèse d'une distribution uniforme du peptide sur la bicouche

et ne prennent pas en compte une possible accumulation locale du peptide.

Principe

Le recouvrement de la membrane par la Pénétratine est évalué par estimation de la quantité de Pénétratine fluorescente recouvrant une monocouche de POPG. Dans ce cas, les peptides se lient à la monocouche car ils présentent une forte affinité avec les lipides anioniques PG. La fluorescence n'étant pas une méthode quantitative en soi, la quantification est effectuée par comparaison de l'intensité de fluorescence de ces monocouches à des monocouches contenant des lipides marqués par fluorescence en quantité connue. Cependant, les deux fluorophores utilisés, l'Alexa488 dans le cas de la Pénétratine et la Rhodamine dans le cas des lipides POPG, n'émettent pas le même signal fluorescent. Afin de comparer ces deux sondes fluorescentes, nous avons eu recours à des étapes de normalisation du signal de fluorescence de l'Alexa488. Ces étapes sont détaillées dans la partie matériels et méthodes et décrites brièvement ici.

La première étape consiste à étalonner la fluorescence de la sonde à l'Alexa à partir de l'intensité de fluorescence d'une concentration connue, mesurée sur des gouttes de POPC contenant $5 \mu M$ de Pénétratine-Alexa488. Dans ce cas, la fluorescence se trouve uniquement en volume et permet de corréler une intensité de fluorescence à une concentration connue en sonde fluorescente. Une étape similaire est réalisée sur des gouttes contenant une concentration connue de lipides fluorescents. Grâce à ces intensités et concentrations connues, un facteur de normalisation est calculé afin de pouvoir comparer la fluorescence de l'Alexa488 à celle de la Rhodamine. Ce facteur permet, dans une seconde étape, d'évaluer la quantité de peptides fluorescents liés à la membrane à partir de la fluorescence du peptide présent sur des monocouches ou des bicouches pour lesquelles il a une affinité (POPG). Le taux de recouvrement de la bicouche correspond alors à la densité de Pénétratine marquée multipliée par la surface d'une Pénétratine. Celle-ci est estimée à $3,7 \text{ nm}^2$ lorsqu'elle est repliée en hélice alpha.

Taux de recouvrement

Ces étapes amènent à une première estimation du taux de recouvrement de la membrane en présence de Pénétratine fluorescente, dans l'hypothèse de sa distribution homogène sur la bicouche. Ce taux est alors estimé à environ 24%. Cette valeur provient d'une série d'approximations, la comparaison de sondes fluorescentes de différentes natures permet une estimation de la répartition du peptide mais l'erreur sur une telle mesure représente plusieurs pourcents.

En comparaison, nous avons estimé le taux de recouvrement de la bicouche dans l'hypothèse où tout le peptide introduit est localisé sur la monocouche des gouttes. Il suffit pour cela de comparer la surface occupée par le peptide à la surface totale d'une goutte. Soit pour une goutte de $100 \mu m$ de diamètre en présence de $C_{Pen} = 5 \mu M$ de Pénétratine, nous pouvons calculer le nombre de peptides présents sur la membrane :

$$N_{Pen} = C_{Pen} \cdot V_g \cdot N_A$$

avec N_{Pen} le nombre de peptides dans une goutte de volume V_g et N_A le nombre d'Avogadro. Sachant que le peptide sous forme d'hélice alpha occupe $3,7 \text{ nm}^2$, nous pouvons en déduire la surface S_{Pen} occupée par N_{Pen} peptides. La surface de la goutte S_g , estimée à partir de son rayon, est comparée à la surface occupée par le peptide afin d'estimer le taux de recouvrement τ de la membrane :

$$\tau = \frac{S_{Pen}}{S_g} = 0,2$$

Ainsi, si la Pénétratine (à $5 \mu\text{M}$) est entièrement localisée sur la monocouche, le taux de recouvrement de la monocouche est de 20 %, dans l'hypothèse d'un pavage uniforme.

La valeur obtenue expérimentalement est en accord avec l'estimation du taux de recouvrement de la membrane lorsque le peptide est entièrement localisé sur la monocouche. Ces estimations sont cohérentes avec des images de gouttes obtenues par microscopie à confocale pour lesquelles nous observons que le peptide est très majoritairement localisé sur les monocouches et les bicouches de gouttes (figure 5.4). Nous envisageons d'avoir recours à une quantification plus précise du taux de recouvrement de la membrane par analyse de la fluorescence sur des expériences réalisées en microscopie confocale.

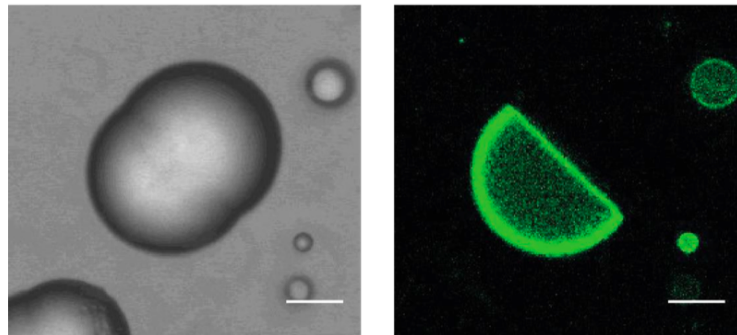


FIGURE 5.4 – Paire de gouttes composées de lipides POPG observée par microscopie confocale. La goutte de droite contient $5 \mu\text{M}$ de Pénétratine fluorescente. La barre d'échelle représente $20 \mu\text{m}$. On observe que le peptide s'accumule majoritairement au niveau de la monocouche et de la bicouche. Issue de [Soule, 2015].

5.2.3 Estimation du potentiel en présence de Pénétratine

Ces simulations numériques sont le fruit du travail de Marie Razafinimanana, accueillie au laboratoire dans le cadre de son stage de master 1 de physique.

Modèle et mise en équation

Le but est de modéliser une membrane recouverte de Pénétratine pour un système composé d'une surface chargée (par la présence de la Pénétratine) et d'électrolytes en solution.

La couche de Pénétratine est considérée comme infiniment fine et elle est confondue avec la surface extérieure de la membrane placée en $x=0^+$. Le schéma de ce modèle est représenté sur la figure 5.5.

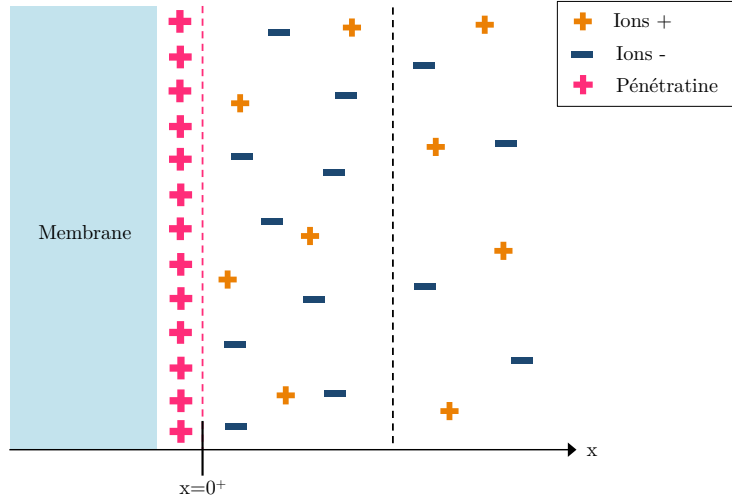


FIGURE 5.5 – Schéma du modèle utilisé pour la simulation du potentiel aux abords d'une membrane recouverte de Pénétratine. Seule la partie extérieure à la membrane (feuillelet où est introduit le peptide) est considérée. x représente la distance à la membrane.

En présence d'une surface chargée, les ions se redistribuent et modifient le potentiel de membrane. L'équation de Poisson-Boltzmann (5.3) permet de calculer le potentiel électrostatique (ψ) créé par la répartition des électrolytes en solution. Elle tient compte des interactions électrostatiques entre particules chargées et de l'agitation thermique des ions, en présence de n types d'ions de charge q_i :

$$\Delta\psi = -\frac{1}{\varepsilon_0\varepsilon_{H_2O}} \sum_{i=1}^n q_i C_i \left(\exp \frac{-q_i\psi(x)}{k_B T} \right) \quad (5.3)$$

avec C_i la concentration de l'électrolyte i en solution (quand $x \rightarrow \infty$) (en molécules/m³), $q_i = ze$ avec e la charge élémentaire électrique et z la charge de l'ion, ε_0 la permittivité diélectrique du vide, ε_{H_2O} la permittivité diélectrique relative de l'eau et T la température (fixée ici à 300 K).

Le potentiel surfacique correspond au potentiel de la condition initiale de l'équation différentielle de Poisson-Boltzmann en fonction du taux de recouvrement de la membrane par la Pénétratine ($X\%$). Le champ électrique en $x=0^+$ est calculé grâce à l'équation de Maxwell-Gauss :

$$E(x=0^+) = \frac{\sigma}{\varepsilon_0\varepsilon_{H_2O}} = X\% \frac{7e}{S\varepsilon_0\varepsilon_{H_2O}} = -\frac{d\psi}{dx}(x=0^+)$$

avec σ la densité surfacique de charge, S la surface d'un peptide (= longueur de l'hélice α \times son diamètre soit 3,7 nm²). Le potentiel en $x=0^+$ n'est pas connu et est déterminé en testant différentes valeurs afin d'obtenir celle qui modélise un potentiel qui tend vers 0 quand x tend

vers l'infini. Des détails de ces simulations sont présentés dans la section 2 du matériels et méthodes.

Résultats

De la sorte, nous avons pu simuler le potentiel électrique dû à la présence de la Pénétratine à la surface de la membrane (en $x=0^+$) en présence de PBS et MgCl_2 (10 mM). Celui-ci est d'environ 46,8 mV au niveau de la membrane. Son comportement en fonction de la distance à la membrane est représenté sur la figure 5.6. Ce potentiel n'est pas négligeable et vient s'ajouter au potentiel de membrane lorsque celui-ci est imposé.

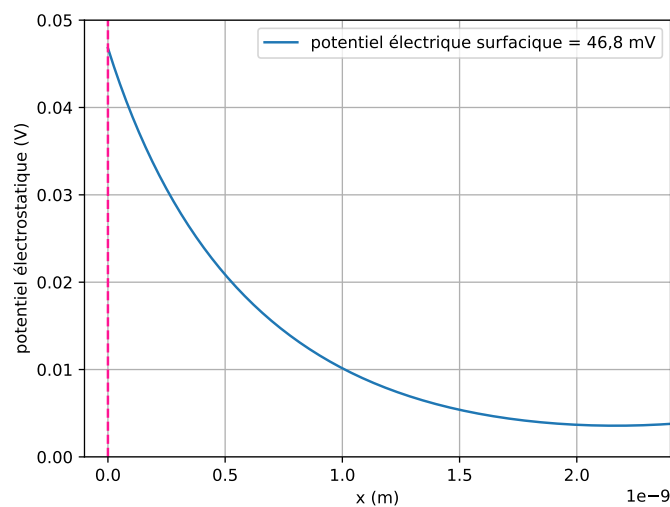


FIGURE 5.6 – Potentiel électrique aux abords d'une membrane recouverte à 20% de Pénétratine (en $x=0^+$, en rose) en fonction de la distance à la surface de la membrane en présence de PBS et 10 mM de Mg^{2+} .

Afin de s'assurer que la présence de cations divalents ne soit pas responsable d'un écrantage important des charges, nous avons également évalué le potentiel en présence de la Pénétratine aux abords de la membrane en absence de magnésium. En effet, dans le milieu extracellulaire à proximité des membranes de cellules, le contenu en cations divalents est bien inférieur à 10 mM. Le potentiel de surface créé par la Pénétratine est donc probablement supérieur. Nous avons donc réalisé la même simulation en présence de 100 mM de NaCl. Dans ce cas, le potentiel induit par la présence du peptide sur la membrane (en $x=0^+$) est estimé à environ 65 mV (figure 5.7). La présence de cations divalents Mg^{2+} induit donc effectivement un écrantage des charges de la Pénétratine. Cependant, malgré cette différence, le potentiel en présence de Pénétratine et de cations divalents est détectable et peut apporter une contribution significative au potentiel de membrane dans nos expériences.

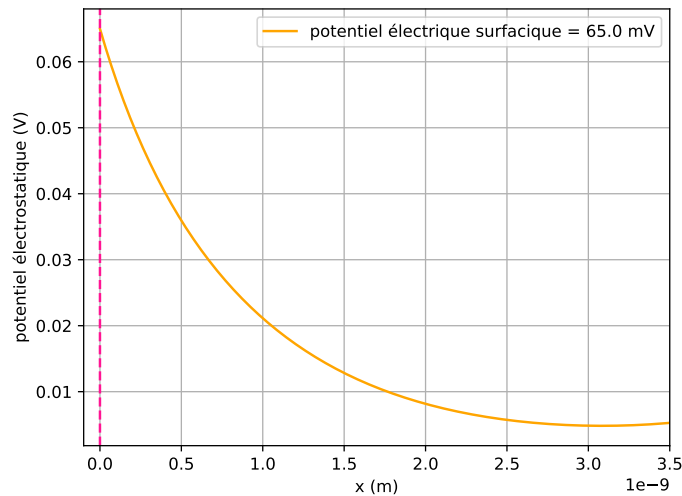


FIGURE 5.7 – Potentiel électrique aux abords d’une membrane recouverte à 20% de Pénétratine (en $x=0^+$, en rose) en fonction de la distance à la surface de la membrane en présence de 100 mM de NaCl.

Discussion

Les potentiels calculés ici aux abords de la membrane sont des effets locaux et donnent une bonne estimation des différences de potentiels qui pourraient se développer de part et d’autre de la bicouche en présence de Pénétratine. Ces potentiels, aux alentours de 46 ou 65 mV selon la composition en électrolytes, sont trop faible pour envisager que le peptide induise à lui seule une déstabilisation de la bicouche par formation de pores aqueux. Cependant, ces simulations ne prennent pas en compte de possibles effets d’accumulation locale du peptide qui pourraient générer localement un potentiel de membrane suffisamment élevé pour déstabiliser la bicouche. Les simulations de Gao *et al.* ont d’ailleurs montré que la formation de pores transitoires en présence d’un CPP cationique requiert la présence d’au moins quatre peptides afin de générer un champ électrique suffisamment important pour permettre la nucléation d’un pore aqueux [Gao et al., 2019].

Un tel phénomène peut éventuellement avoir lieu en présence de Pénétratine. Dans ce cas, le potentiel à la membrane induit par la présence du peptide est localement supérieur à nos estimations. La mesure directe du potentiel pourrait ainsi nous permettre de vérifier si le potentiel estimé par nos simulations correspond au potentiel effectif en présence du peptide. Cependant, cette mesure ne donne pas accès au potentiel local et dans l’éventualité d’une répartition non homogène de la Pénétratine sur la bicouche, nous ne pourrions pas accéder au potentiel induit dans les zones de forte densité de peptide. L’évaluation de la répartition du peptide par analyse de la fluorescence présentée dans ce chapitre, n’est pas compatible avec une évaluation de l’accumulation locale du peptide.

Enfin, il est important de noter que sur cellules, le potentiel généré par la présence du peptide s’additionne au potentiel intrinsèque de la membrane. Ainsi, bien que sur membranes

modèles le potentiel généré par le peptide soit insuffisant pour induire une déstabilisation de la membrane, sur cellules, ou en présence d'une différence de potentielle générée artificiellement, la contribution du peptide à la différence de potentiel transmembranaire peut permettre le franchissement d'une barrière énergétique nécessaire à la formation de pores.

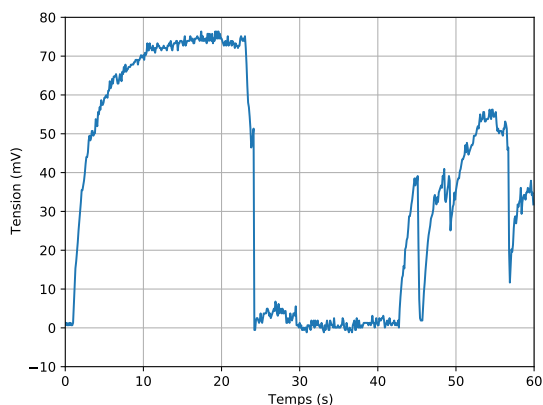
5.3 Mesure du potentiel de membrane sur bicouches

5.3.1 Principe et mesures

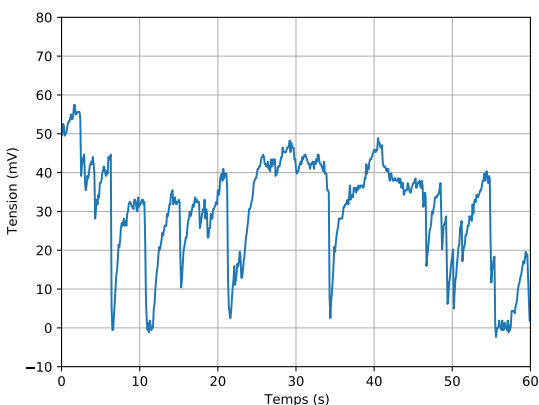
La mesure du potentiel de membrane en présence du peptide Pénétratine peut être réalisée à partir du dispositif expérimental présenté en section 5.1 en mode *Current-clamp*. La réponse correspond alors directement à la différence de potentiel à la travers la bicouche et elle est uniquement due à la présence de la Pénétratine et à la répartition subséquente des électrolytes en solution.

Les résultats préliminaires de cette étude sont présentés ici. Ces mesures sont réalisées sur bicouches de POPG en présence de Pénétratine non marquée en fluorescence ($5 \mu M$). Dans ces conditions, le peptide interagit avec les têtes polaires et la translocation du peptide est observée dans les expériences présentées au chapitre 4. La déstabilisation de la bicouche par le peptide est donc effective. Le potentiel est mesuré pendant quelques minutes afin de suivre son évolution au cours du temps. De la sorte, nous avons réalisé 6 enregistrements sur des bicouches distinctes. La différence de potentiel de part et d'autre de la bicouche est alors d'environ 0 mV.

Cependant, une des six expériences présente un comportement différent. Les deux premières minutes de mesure correspondant à cette expérience sont représentées sur la figure 5.8. Sur ces enregistrements, le potentiel augmente fortement dans les premières secondes (jusqu'à ~ 75 mV) puis chute avant de remonter à nouveau jusqu'à environ 55 mV. Des sauts de potentiel sont ainsi observés pendant les premières minutes d'enregistrement. Leur amplitude décroît au fur et à mesure jusqu'à se stabiliser autour de 0 mV après 5 minutes d'expérience. Ce signal pourrait témoigner d'un phénomène où une certaine quantité de peptide se lierait à la membrane et entraînerait la formation d'un potentiel à travers celle-ci. Le caractère transitoire des signaux peut correspondre à une liaison et dissociation des peptides à la membrane (éventuellement par translocation) qui annule transitoirement la différence de potentiel entre les deux feuillets de la bicouche. La décroissance progressive du signal peut être due à une liaison du peptide sur le feuillet distal de la bicouche qui tend à équilibrer les charges de part et d'autre de la membrane. Cet équilibre correspond alors à un potentiel nul observé après 5 minutes d'expériences. Cependant, nous n'avons observé ce signal qu'une fois sur 6 expériences et il n'est pas possible de conclure que cet enregistrement ne soit pas dû à un artefact.



(a) Première minute d'expérience



(b) Deuxième minute d'expérience

FIGURE 5.8 – Évolution de la tension aux bornes d'une bicouche en fonction du temps en présence de $5 \mu M$ de Pénétratine. Ce type d'enregistrement a été observé une fois sur six mesures.

Afin de corréler ces mesures à la présence du peptide sur la bicouche et éventuellement à des événements de translocation, nous avons réalisé les expériences en présence de Pénétratine fluorescente. De façon surprenante, la présence de peptide fluorescent n'est pas systématiquement corrélée à la présence de bords fluorescents. La figure 5.9 montre des images des deux cas de figure observés. Dans certains cas, la fluorescence du bord des gouttes ne se distingue pas de la fluorescence du volume (figure 5.9.a) et dans d'autres cas, la fluorescence des bords est observée (figure 5.9.b). Ce deuxième cas représente cependant une minorité d'expériences (3 expériences sur 10). Les enregistrements en l'absence de bords fluorescents mènent à des potentiels autour de 0 mV. Il est alors probable que l'absence de potentiel soit due à l'absence de peptide au niveau de la bicouche. Pour le moment, nous n'avons pu réaliser d'enregistrements dans le cas où les bicouches apparaissent fluorescentes. Nous ne pouvons donc pas conclure que l'expérience qui présente une variation du potentiel corresponde aux effets du peptide aux abords de la bicouche. Des expériences sont en cours afin de lever le voile sur les différences observées.

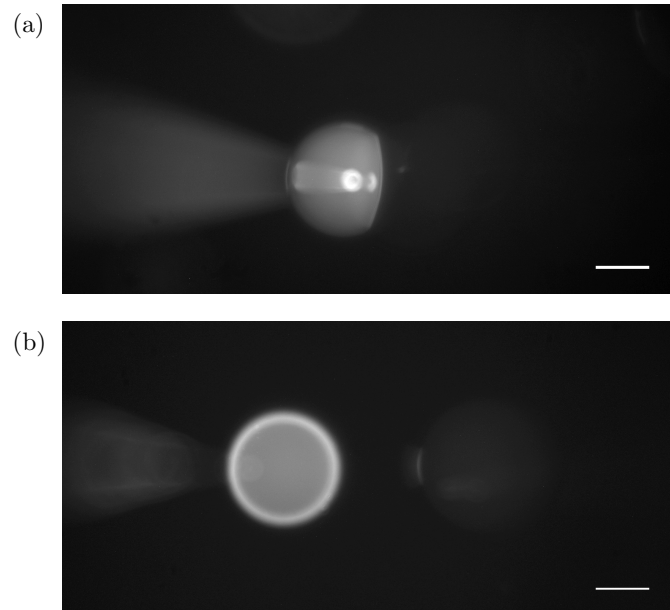


FIGURE 5.9 – Gouttes gonflées à la pointe de pipettes. Les gouttes de gauche contiennent $5 \mu M$ de Pénétratine-Alexa488 et celles de droite du tampon. La barre d'échelle représente $50 \mu m$.

5.3.2 Discussion

Deux types d'enregistrement se dégagent de nos premières expériences. L'un présente un potentiel de 0 mV et l'autre, présente des variations du potentiel (une expérience sur six). La corrélation des mesures électriques en présence de peptides fluorescents sur les bords des gouttes permettra de conclure sur le type d'enregistrements correspondant à l'effet du peptide au niveau de la bicouche. Selon le résultat deux principales hypothèses s'offriront alors à nous.

La première hypothèse, reposerait sur l'observation de variations du potentiel telles que présentées sur la figure 5.8. Dans ce cas, les signaux pourraient correspondre à des événements de liaison et de dissociation du peptide à la membrane. La décroissance du potentiel peut correspondre à une répartition du peptide entre le feuillet proximal et le feuillet distal qui tend à rééquilibrer la répartition de charges de part et d'autre de la bicouche. Un tel comportement a d'ailleurs été rapporté par Via *et al.*. Au cours de simulations de dynamique moléculaire, les auteurs observent une variation du potentiel qu'ils considèrent résulter de la traversée du peptide au travers de la bicouche. Celui-ci s'accumule alors sur le feuillet distal et tend à équilibrer les charges de part et d'autre de la bicouche [Via et al., 2018].

La seconde hypothèse s'appuierait sur la validation d'un potentiel de membrane nul même en présence de bords fluorescents sur les gouttes. Dans ce cas, le peptide pourrait s'entourer de lipides qui neutraliseraient ses charges, comme cela est proposé dans le cadre de la translocation adaptative. Ainsi, la présence du peptide n'entraînerait pas de variation du potentiel.

Il est important de garder en tête que de tels mécanismes peuvent avoir lieu simultanément.

5.4 Conclusion et perspectives

Les estimations du potentiel induit par la présence de Pénétratine aux abords d'une membrane restent à confirmer par le biais de mesures supplémentaires. Elles apporteront des réponses sur les conséquences électriques de la présence du peptide aux abords de la membrane. Nous pourrions évaluer sa contribution à la diminution de la barrière énergétique d'entrée d'un peptide vecteur dans le coeur hydrophobe de la bicouche. Dans le cas où le peptide ne se répartirait pas de façon homogène sur la membrane, le potentiel mesuré correspondrait à une moyenne des potentiels locaux. Comme mentionné précédemment, la microscopie de fluorescence ne permet pas d'estimer l'accumulation locale du peptide. La spectroscopie de corrélation de fluorescence pourrait permettre d'estimer les propriétés d'agrégation du peptide au niveau de la membrane [Vasconcelos et al., 2018].

Nous souhaitons par la suite étudier l'implication du potentiel de membrane dans la translocation de la Pénétratine. En effet, de nombreuses contradictions subsistent sur les expériences de translocation en présence d'une différence de potentiel imposée. Ces différences peuvent provenir d'une série de facteurs expérimentaux tels que la composition de la membrane, l'efficacité du dispositif de maintien du potentiel (pompes ou électrodes externes) ou le flux ionique à travers la membrane. Le rôle du potentiel de membrane dans la translocation pourra être évalué avec le dispositif présenté dans ce chapitre. Nous envisageons d'évaluer la capacité du potentiel de membrane à se substituer aux effets générés par la présence de lipides anioniques à têtes glycérol. Pour cela, la translocation sera évaluée en fonction de différents potentiels imposés sur des bicouches composées de lipides zwitterioniques (tête PC) contenant une petite fraction de lipides anioniques afin d'attirer le peptide au niveau de la bicouche. Ces expériences pourront être comparées à des expériences de translocation en présence d'un potentiel généré par un ionophore et un déséquilibre de charges de part et d'autres de la bicouche. Nous pourrions ainsi potentiellement évaluer si les divergences de la littérature proviennent du dispositif expérimental.

Troisième partie

La microfluidique pour la formation de bicouches à l'interface de gouttes

La formation de bicouches à l'interface de gouttes par la méthode présentée au chapitre 4 ne permet pas le contrôle de la taille des gouttes ni leur appariement. Les émulsions formées sont polydisperses et le mélange des deux populations de gouttes ne mène pas nécessairement à la formation de paires « mixtes ». La figure 5.10 présente un exemple typique d'expérience. Il est rare de pouvoir observer plusieurs paires de gouttes simultanément sous le champ du microscope. Ainsi, bien que cette méthode soit rapide à mettre en place, elle nécessite un nombre conséquent d'expériences pour obtenir des résultats tels que ceux présentés au chapitre 4.

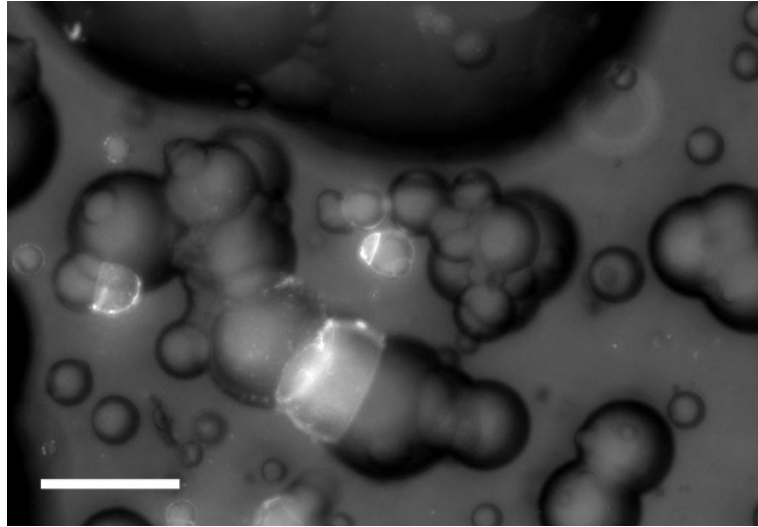


FIGURE 5.10 – Gouttes formées manuellement observées en lumière blanche et épifluorescence. La barre d'échelle représente $100 \mu m$.

La microfluidique s'avère donc être un outil de choix pour contrôler la formation des gouttes et leur appariement. La préparation de gouttes homogènes (en taille, en fluorescence) et le contrôle de la formation des paires dans un circuit où plusieurs expériences sont réalisables en même temps s'accompagne d'un gain de temps considérable et améliore la reproductibilité des expériences (pas de variation de volume des gouttes entre deux expériences). Le développement d'un tel outil est avantageux pour notre système et nous permettra de cribler efficacement davantage de conditions. De plus, l'ajout de fonctionnalités complexes par l'intégration de microélectrodes est une perspective intéressante pour le couplage des mesures électriques présentées au chapitre 5 avec les mesures de fluorescence. De plus, la microfluidique permet l'étude de compositions lipidiques compromises par la méthode manuelle. Thutupalli *et al.* ont montré qu'à l'aide d'un système microfluidique, la fabrication de bicouches à l'interface de gouttes est jusqu'à six fois plus rapide qu'en méthode manuelle. En effet, la dynamique des systèmes microfluidiques permet une saturation rapide des interfaces [Thutupalli *et al.*, 2013]. Nous nous sommes donc penchés sur le développement d'un tel outil pour améliorer la performance de nos expériences.

Au cours de cette partie, nous présenterons le travail réalisé durant cette thèse dans l'objectif de développer une puce microfluidique pour la formation et l'observation de bicouches à l'interface de gouttes (chapitre 7). Des concepts physiques relatifs à la microfluidique et des notions de microfabrication seront dans un premier temps introduits (chapitre 6).

Chapitre 6

Introduction à la microfluidique

La microfluidique se définit comme la science et la technique basée sur l'écoulement de liquides dans des canaux de taille micrométrique [Whitesides, 2006]. Elle permet de miniaturiser les expériences et de manipuler de faibles quantités de fluides (du nanolitre au femtolitre) avec une importante précision et rapidité. La sensibilité des analyses est augmentée, à faible coût et s'accompagne d'un gain de temps important par la parallélisation des expériences. La réduction à l'échelle microscopique induit un comportement des fluides différent de l'échelle macroscopique [Squires and Quake, 2005].

Empruntant initialement les techniques de microfabrication de la microélectronique, la microfluidique se distingue par le développement de matériaux souples et transparents (en opposition au silicium, rigide et opaque, utilisé en microélectronique). Ainsi, de nouvelles techniques de microfabrication se sont rapidement développées pour répondre aux besoins des applications de la microfluidique [McDonald et al., 2000].

Ces dernières s'étendent de la physique à la biologie. Ses caractéristiques en font un atout essentiel pour le développement d'outils analytiques tels que la chromatographie en phase gaz, la chromatographie liquide à haute pression et l'électrophorèse capillaire, souvent couplés à la spectrométrie de masse. L'application à la biologie, la chimie et au domaine biomédical permet de créer des plateformes de criblage de médicaments à haut-débit [Dittrich and Manz, 2006] ou de bioanalyses [Sia and Whitesides, 2003][Sackmann et al., 2014]. Le polydiméthylsiloxane (PDMS) - matériau transparent, perméable aux échanges de gaz avec l'environnement, non toxique - est adapté à la culture et à l'observation de cellules sur puces [Coluccio et al., 2019]. Les dimensions sont également adéquates pour la manipulation de cellules ou de molécules uniques [Wheeler et al., 2003][Zhao et al., 2013]. Nous avons pu également voir au chapitre 3 que la microfluidique à gouttes permet de générer des émulsions et ainsi former des systèmes biomimétiques.

Nous présenterons dans ce chapitre quelques concepts physiques fondamentaux pour l'étude de la microfluidique et notamment pour la génération de gouttes (section 6.1). Quelques techniques de microfabrication utilisées au cours de cette thèse seront également abordées (section 6.2).

6.1 Physique des écoulements à l'échelle micrométrique

La miniaturisation des systèmes d'écoulement induit un comportement physique des fluides différent de celui à l'échelle macrométrique. Les interactions entre particules sont inchangées mais l'équilibre des forces mises en jeu est perturbé. Pour comprendre les comportements des fluides à l'échelle micrométrique ainsi que la formation de gouttelettes dans de telles structures, il est nécessaire de revenir sur quelques notions de la physique des fluides à l'échelle micrométrique.

6.1.1 Nombre de Reynolds

L'équation de Navier-Stokes décrit le comportement des fluides newtoniens et permet d'évaluer la contribution des différentes forces exercées sur ces fluides. L'analyse dimensionnelle de cette équation définit des variables telles que le nombre de Reynolds qui fait intervenir la longueur caractéristique des canaux, L . Le nombre de Reynolds, Re , s'exprime :

$$Re = \frac{\rho V L}{\mu}$$

avec ρ la masse volumique du fluide ($kg.m^{-3}$), V la vitesse du fluide ($m.s^{-1}$), L la longueur caractéristique de l'écoulement (m) et μ la viscosité dynamique du fluide ($Pa.s$).

Ce nombre mesure l'importance relative des forces de frottement (liées à la viscosité) et des forces inertielles (liées à la vitesse) pour un écoulement visqueux. Si les forces inertielles dominent, Re est élevé ($Re > 2000$), l'écoulement est déstabilisé et le régime est dit turbulent (figure 6.1). Les phénomènes convectifs dominent alors. Au contraire, lorsque les forces de frottement sont prépondérantes, le frottement entre deux couches fluides maintient leur cohésion, le nombre de Reynolds est alors très petit et l'écoulement est dit laminaire (figure 6.1).

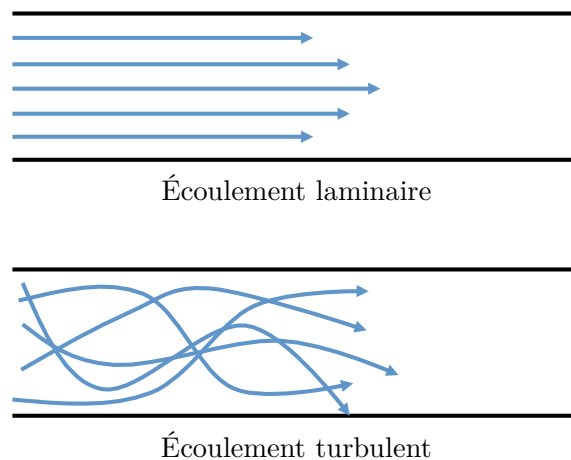


FIGURE 6.1 – Illustration décrivant un écoulement laminaire (à faible nombre de Reynolds) et un écoulement turbulent (haut nombre de Reynolds).

Dans le cas de systèmes micrométriques, la vitesse du fluide V est généralement comprise entre $1 \mu m.s^{-1}$ et $1 cm.s^{-1}$ et la longueur des canaux entre 1 et $100 \mu m$, ainsi, le nombre de Reynolds est très inférieur à 1. L'écoulement est donc laminaire et les forces inertielles sont négligeables devant les forces de frottements.

6.1.2 Résistance hydrodynamique

L'écoulement laminaire d'un liquide visqueux dans un conduit de petite taille suit la loi de Poiseuille. Celle-ci décrit la relation entre le débit de l'écoulement (Q), la viscosité du fluide (μ), la différence de pression entre l'entrée et la sortie du conduit (ΔP) et ses dimensions (sa largeur L et son rayon r) donnée par :

$$\Delta P = \frac{8\mu L}{\pi r^4} Q$$

Le terme $\frac{8\mu L}{\pi r^4}$ correspond à la résistance hydrodynamique R qui caractérise l'opposition à l'écoulement d'un fluide. La taille des systèmes influence l'écoulement du fluide, plus il est petit, plus l'écoulement est difficile. L'écoulement peut donc être contrôlé en jouant sur les dimensions du conduit. Dans le cas de la microfabrication, les canaux ne sont pas des sections circulaires mais rectangulaires, de hauteur h et de largeur w .

La résistance hydrodynamique d'une section rectangulaire est donnée par [Bithi and Vana-palli, 2010] :

$$R = \frac{12\mu L}{h^3 w} \left[1 - \frac{192}{\pi^5} \times \frac{h}{w} \times \tanh \frac{\pi w}{2h} \right]^{-1}$$

valable pour $h < w$. Cette résistance hydrodynamique est une analogie à la résistance électrique R et la loi de Poiseuille, une analogie à la loi d'Ohm $\Delta V = R.I$ où ΔV est la différence de potentiel et I l'intensité du courant. Ainsi, les circuits hydrodynamiques peuvent être traités comme des circuits électriques. Deux résistances R_1 et R_2 en série sont équivalentes à une résistance $R = R_1 + R_2$ et deux résistances en parallèle sont équivalentes à une résistance $R = \frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2}$. Il est ainsi possible d'utiliser les lois électriques pour comprendre et prévoir le comportement des fluides dans des microcanaux.

6.1.3 Formation de gouttelettes en système microfluidique

L'écoulement de deux fluides immiscibles dans des microcanaux est régi par les propriétés des interfaces et, plus particulièrement, par la tension superficielle et la force capillaire des fluides. Les écoulements diphasiques s'effectuent selon différents régimes, représentés sur la figure 6.2. Dans le cas où les deux fluides s'écoulent de façon parallèle l'un à l'autre, on parle d'écoulement stratifié. L'écoulement annulaire correspond à l'écoulement des fluides à proximité des parois avec un filet continu d'un des fluides au milieu du canal. Le dernier type d'écoulement, qui nous intéressera plus particulièrement, correspond à un écoulement

à gouttelettes où un fluide (phase dispersée) forme des gouttelettes à l'intérieur de la phase continue (figure 6.2).

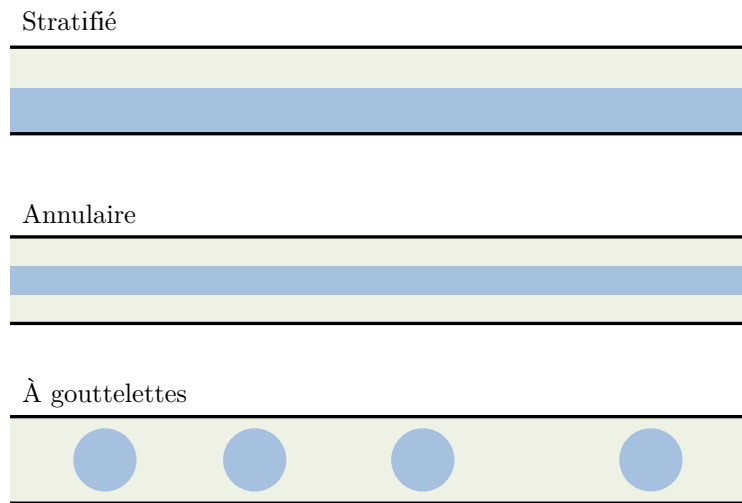


FIGURE 6.2 – Représentation schématique des différents types d'écoulements diphasiques en microfluidique.

Le nombre capillaire (Ca), sans dimension, compare les forces visqueuses et les forces interfaciales :

$$Ca = \frac{\eta v}{\gamma}$$

avec η la viscosité ($Pa.S$) et v la vitesse ($m.s^{-1}$) du fluide de la phase continue et γ la tension de surface à l'interface des fluides ($N.m^{-1}$). Dans les systèmes micrométriques, ce nombre est faible (< 1), la force capillaire est alors dominante devant les contraintes visqueuses et tend à minimiser l'aire de l'interface. Ce processus mène alors à la formation de gouttes dans un système de géométrie adéquate. Les trois principales géométries pour la formation de gouttelettes seront décrites ici : le co-écoulement, la jonction T et l'écoulement focalisé.

Le co-écoulement

Le co-écoulement ou *co-flowing* consiste à faire circuler les deux fluides dans la même direction en introduisant la phase dispersée dans le canal de la phase continue par un canal de plus petite taille (ou une aiguille) (figure 6.3). La phase dispersée, qui s'écoule ainsi en filet dans la phase continue, est perturbée par le flux de celle-ci. Le jet est alors instable, le système tend à minimiser son énergie de surface en réduisant son aire, et conduit à la formation de gouttelettes (figure 6.3) selon différents régimes. Le régime *dripping* (figure 6.3.b) induit la formation de gouttes à la pointe de l'aiguille tandis que le régime *jetting* (figure 6.3.c) forme des gouttes à partir d'un filament étendu. La taille des gouttes obtenues résulte d'un compromis entre la réduction de la tension superficielle et le mouvement du liquide. En régime *dripping*, par exemple, plus la vitesse de la phase continue est élevée, plus les contraintes de

cisaillement sont importantes et plus les gouttelettes sont de petite taille [Umbanhowar et al., 2000][Cramer et al., 2004].

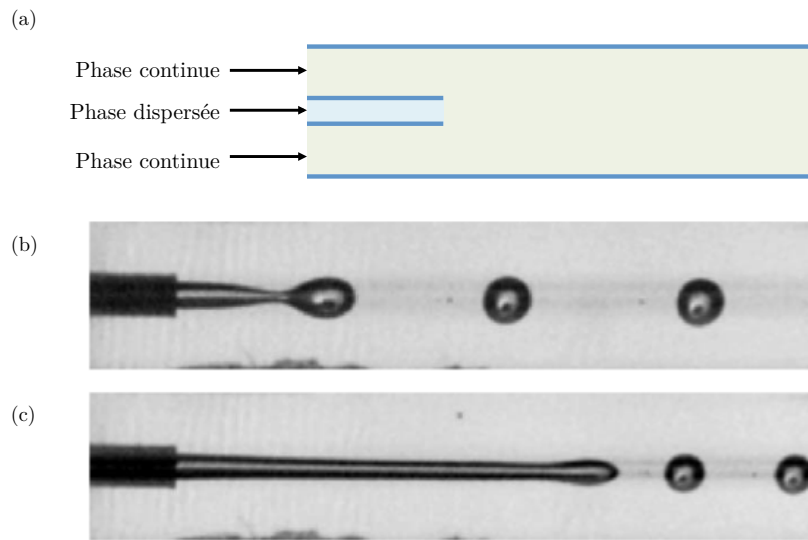


FIGURE 6.3 – Schéma et photos de la formation de gouttelettes en géométrie co-écoulement. a) La phase dispersée est introduite par un canal de petite taille placé dans un canal où s'écoule la phase continue. Écoulement en régime b) *dripping* et c) *jetting* [Cramer et al., 2004].

L'écoulement focalisé

La génération de gouttes par écoulement focalisé ou *flow-focusing* consiste à cisailer la phase dispersée par l'arrivée perpendiculaire de la phase continue (figure 6.4). La phase dispersée est dirigée vers une constriction du canal et sa rupture entraîne la formation d'un jet de gouttelettes. La phase continue exerce une pression et les contraintes visqueuses poussent le fluide à l'intérieur de la constriction en un filet étroit qui se brise (figure 6.4). Ce modèle a été initialement mis en place par Gañán-Calvo pour la génération de bulles d'air à l'intérieur d'un liquide dans des capillaires [Gañán-Calvo, 1998] puis étendu à la formation de gouttes par Anna *et al.* [Anna et al., 2003]. Un intérêt majeur de cette méthode est qu'une large gamme de taille de gouttes peut être obtenue, de diamètres inférieurs ou supérieurs à la taille de la constriction. La taille des gouttes est modulée par le ratio entre le débit de la phase continue et celui de la phase dispersée.

Trois différents régimes de formation de gouttes sont observés par écoulement focalisé. Lors du régime *squeezing* (figure 6.5.a), le jet de phase dispersée occupe toute la largeur de la constriction et entraîne la formation de gouttes de diamètres supérieurs à la largeur du canal. Ce régime est obtenu pour de faibles nombres capillaires et pour de faibles ratio de débit phase continue/phase dispersée. Le régime *dripping* correspond à la formation de gouttes de diamètres proches de la largeur du canal (figure 6.5.b). La rupture du jet se fait au niveau de l'intersection. Il est obtenu pour des valeurs élevées de nombre capillaire. Enfin,

le régime *jetting* génère des gouttes de petite taille, à fréquence élevée. Un jet fin de phase continue s'allonge à travers la constriction et les gouttes sont générées loin de l'intersection (figure 6.5.c). Ce régime a lieu à fort débit de phase continue et de phase dispersée.

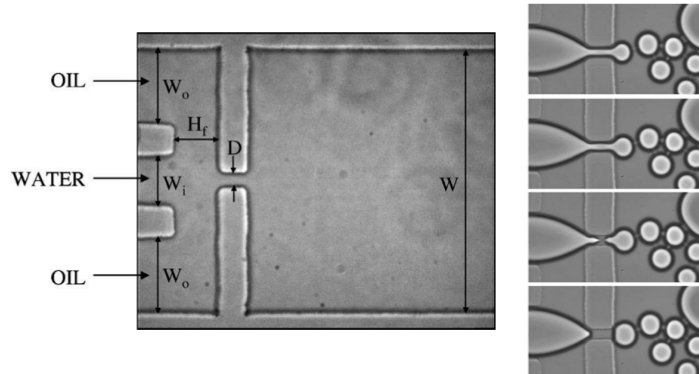


FIGURE 6.4 – Géométrie pour la formation de gouttelettes par écoulement focalisé et séquence illustrant la formation de gouttes à travers la constriction [Anna et al., 2003].

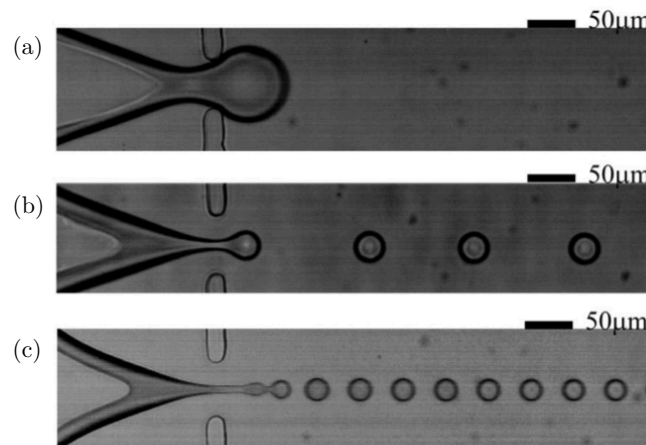


FIGURE 6.5 – Les différents régimes en écoulement focalisé. a) Régime *squeezing*, b) régime *dripping* et c) régime *jetting* [Lee et al., 2009].

La jonction T

En géométrie en jonction T, la phase dispersée arrive par un canal perpendiculaire au canal où s'écoule la phase continue (canal principal) (figure 6.6) [Thorsen et al., 2001]. Lorsque la phase dispersée pénètre dans le canal principal, elle s'allonge dans la direction de l'écoulement de la phase continue. Le cou s'amincit jusqu'à se rompre et permettre le détachement de la gouttelette. Celle-ci est alors emportée par le flux du canal principal et la phase dispersée se rétracte vers la jonction [Garstecki et al., 2006]. De même que pour l'écoulement focalisé, trois régimes de génération de gouttes existent pour la géométrie en jonction T. Ces régimes sont dépendants du nombre capillaire et de la viscosité relative des phases. Le régime *squeezing* est observé pour de faibles nombres capillaires, inférieurs à 10^{-2} (figure 6.6.a). Le régime

jetting a lieu pour les nombres capillaires élevés (10^{-1}) (figure 6.6.b) et le régime *dripping* est observé pour des nombres capillaires intermédiaires 3.10^{-2} (figure 6.6.c).

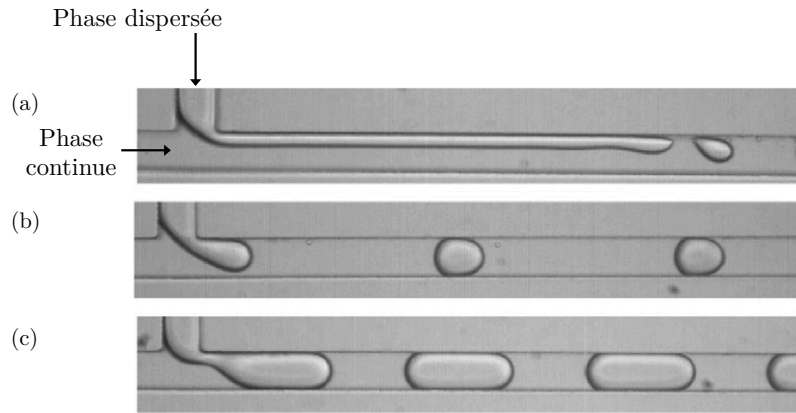


FIGURE 6.6 – Géométrie d’une jonction T et ses différents régimes d’écoulement. a) régime *squeezing*, b) régime *dripping* et c) régime *jetting* [Yeom and Lee, 2011].

6.2 La microfabrication

À ses débuts, la microfluidique s’appuie principalement sur les techniques de microfabrication de la microélectronique. Cependant, les matériaux usuels de celle-ci s’avèrent inadaptés aux applications des systèmes microfluidiques. Ainsi, le développement de la microfluidique s’accompagne du développement de polymères plastiques transparents tels que le PDMS. Cette technologie, appelée lithographie molle ou *soft-lithography*, permet la reproduction fidèle, rapide et à moindre coût de structures micrométriques. Les propriétés optiques du PDMS, transparent jusqu’à 280 nm, sont compatibles avec la microscopie optique et la fluorescence. Ce matériau présente l’avantage de réticuler à faible température, d’adhérer facilement à d’autres matériaux, sa chimie de surface peut être modifiée, et il est également biocompatible.

La microfabrication par lithographie molle repose sur l’utilisation d’un moule servant d’empreinte des structures désirées. Un exemple de procédure complète est représenté sur la figure 6.7. Brièvement, la première étape consiste à concevoir le *design* de la puce par conception assistée par ordinateur afin d’obtenir un fichier comportant le motif conçu. Ce fichier permet la préparation du masque (2D) à partir duquel est réalisée l’étape de photolithographie permettant le transfert du motif sur un substrat recouvert de résine photosensible d’épaisseur désirée. La structure est ensuite répliquée par lithographie molle. Les répliqués peuvent être soumis à divers traitements afin d’obtenir une puce fonctionnelle (figure 6.7).

Cette section n’a pas pour objectif de décrire toutes les techniques de photolithographie existantes mais plutôt de définir celles rencontrées au cours de cette thèse.

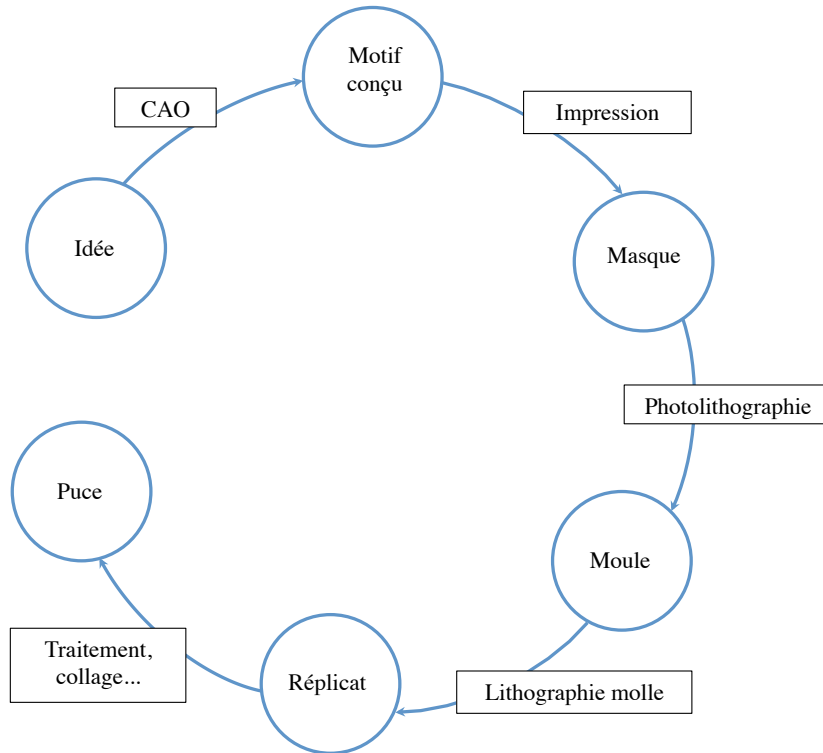


FIGURE 6.7 – Procédure pour la fabrication de puces microfluidiques par photolithographie et lithographie molle. Adaptée de [Xia and Whitesides, 1998].

6.2.1 La photolithographie

La photolithographie consiste à transférer l'image du motif souhaité (présente sur un masque) sur une surface (appelée substrat) recouverte de résine photosensible. L'exposition de la résine, d'épaisseur contrôlée, aux UV permet d'imprimer le motif sur celle-ci. De la sorte, on obtient un moule dont la réplification par lithographie molle mène à l'obtention des puces microfluidiques.

Génération du masque

L'étape de masquage consiste à reproduire le motif défini par conception assistée par ordinateur (CAO) en recouvrant un matériau transparent aux UV, généralement du quartz ou du verre, par une fine couche de chrome opaque aux UV. Pour cela, le motif est photogravé à la surface du masque au laser (Direct Writing Laser, DWL). La résolution du masque peut atteindre $0,5 \mu\text{m}$ et définira la résolution maximale du moule.

Le procédé de fabrication d'un tel masque comprend plusieurs étapes. Un dépôt de chrome de quelques centaines de nanomètres d'épaisseur est réalisé, suivi du dépôt d'une résine photosensible (environ 500 nm) directement sur la couche de chrome. La résine est ensuite exposée au laser de la tête d'écriture, selon le motif défini, afin de la dégrader. Le masque est soumis à des étapes de traitement chimique afin de dissoudre la résine photodégradée. Le chrome, se trouvant sous la résine dissoute, est ainsi accessible et décapé. Enfin, la résine restante est

retirée, générant un masque chrome-verre sur lequel l'absence de chrome dessine les motifs (figure 6.8). Il convient de contrôler les dimensions des motifs après la réalisation du masque pour s'assurer du bon dimensionnement de celui-ci.

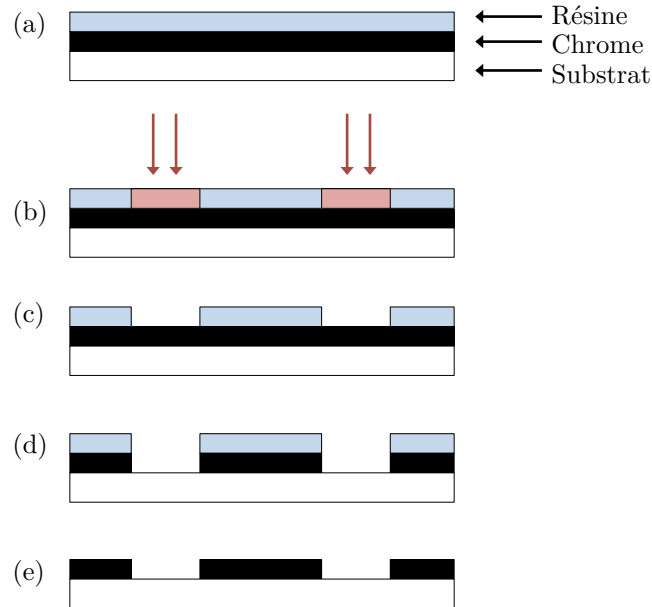


FIGURE 6.8 – Procédure de fabrication d'un masque chrome-verre par DWL. a) Les couches de chrome et de résines sont successivement déposées sur le substrat en verre. b) Insolation laser de la résine photosensible. c) La résine insolée est dissoute. d) Gravure du chrome par décapage des parties non recouvertes de résine. e) Retrait de la résine excédente et obtention du masque.

Photolithographie

Les résines et le dépôt sur substrat

L'étape principale de préparation du moule consiste à insoler une résine photosensible afin d'obtenir les motifs en négatif sur un substrat, souvent en silicium (*wafers*) (figure 6.9.a). Il existe deux types de résine qui réagissent différemment lors de l'exposition aux UV. Dans le cas des résines positives, les zones exposées aux UV deviennent solubles et sont éliminées pendant le développement tandis que la partie non exposée reste insoluble. Ainsi, l'image du masque est obtenue. Pour les résines négatives (type SU-8 par exemple), les zones exposées sont réticulées et demeurent après le développement. Les zones non exposées sont solubles et sont éliminées. Le moule obtenu correspond donc au motif complémentaire du masque.

Avant le dépôt de la résine, le *wafers* de silicium est soumis à une déshydratation, ou à un bain piranha lorsque cela est nécessaire, afin de retirer les molécules d'eau ou les molécules organiques présentes à sa surface et ainsi augmenter l'adhésion de la résine. Le dépôt de la résine peut ensuite se faire par enduction centrifuge (*spin-coating*) ou par laminage de film sec (figure 6.9.a). L'enduction centrifuge permet d'étaler une goutte de résine liquide déposée sur le substrat maintenu sur une tournette (*spin-coater*). La mise en rotation de

la tournette permet l'étalement de la résine par force centrifuge. La vitesse et le temps de rotation déterminent l'épaisseur de la résine (qui correspondra à la hauteur finale de la structure). Ces paramètres dépendent principalement de la viscosité de la résine. Il convient donc de choisir judicieusement la résine en fonction de la hauteur désirée. Les résines sous forme de film sec (*dry-film*) sont d'épaisseur bien définie. Ils sont déposés et étalés sur le substrat à l'aide d'une presse (laminage) afin de le faire adhérer.

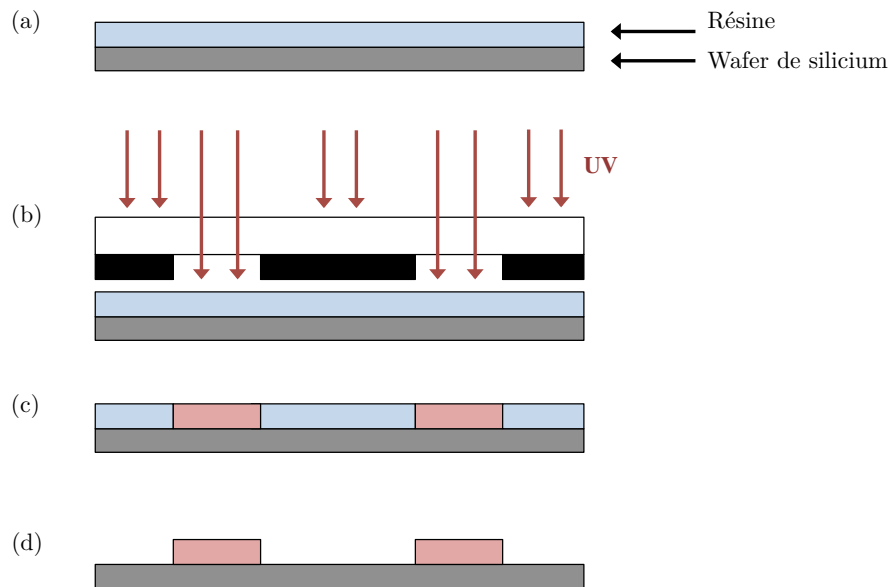


FIGURE 6.9 – Principales étapes de fabrication d'un moule par photolithographie avec une résine négative. a) La résine est déposée sur un *wafer* de silicium par enduction centrifuge ou laminage de film sec. b) Le masque est déposé sur la résine et le tout est exposé aux UV. c) La résine exposée est ainsi réticulée puis soumise à un recuit. d) Le moule est développé dans un bain de solvant. La résine non réticulée est représentée en bleu et la résine réticulée en rose.

L'insolation et le développement

Après dépôt de la résine, celle-ci est insolée à travers le masque (figure 6.9.b). Le degré d'exposition dépend de l'intensité de la source lumineuse et du temps d'exposition et correspond donc à une énergie surfacique ($J.m^{-2}$). L'insolation est un paramètre critique pour la résolution des motifs. Une sur-exposition peut mener à un élargissement des motifs tandis qu'une sous-exposition conduit à leur rétrécissement. De plus, lors de cette étape, les phénomènes de diffraction de la lumière sont critiques et influent fortement sur la résolution des motifs. Afin de les limiter, la résine et le masque peuvent être mis directement en contact. Un recuit (*post-exposure bake*) est effectué après l'insolation de la résine afin d'éliminer les traces de solvants, réduire la photosensibilité de la résine et terminer la réaction photosensible initiée par l'insolation.

Le développement consiste à plonger le substrat exposé dans un bain de solvant afin de dissoudre les parties non exposées (pour une résine négative) ou les parties exposées (résine

positive). Ces étapes sont résumées sur la figure 6.9 dans le cas d'une résine négative, qui nous intéressera plus particulièrement. Un dernier recuit à haute température est effectué afin de "figer" la résine. Des étapes de caractérisation du moule sont ensuite indispensables afin de s'assurer de sa qualité. On peut alors vérifier la résolution des motifs (par microscopie optique, microscopie électronique à balayage), le profil des côtés (par microscopie électronique à balayage) et l'épaisseur de la résine (à l'aide d'un profilomètre).

6.2.2 L'écriture directe

L'écriture directe permet de réaliser des structures en résine sans avoir recourt à la préparation de masques. Les moules ainsi formés peuvent être utilisés directement ou être répliqués par lithographie molle. De telles techniques permettent de réaliser plus aisément des structures 3D qu'en photolithographie par dépôt de résine liquide ou de film sec. Les logiciels de CAO associés à ces outils prennent en charge la découpe couche par couche des structures. L'amélioration des techniques de microfabrication par écriture directe tolère maintenant des résolutions sub-micrométriques [Farsari and Chichkov, 2009]. Différentes techniques d'écriture directe existent, chacune possédant des avantages et des inconvénients selon les besoins. Certaines techniques sont davantage réservées à un usage pour l'impression de pièces de grande taille (résolutions de l'ordre du cm) tandis que d'autres sont compatibles avec des résolutions bien moindres (μm ou nm) mais limitées à de plus petits volumes.

L'écriture laser sur résine est actuellement la technique la plus performante et présente les meilleures résolutions pour l'impression de structures en 2D ou 3D. Il est relativement rapide de préparer des échantillons avec cette technique, de l'ordre d'une à plusieurs heures selon le volume et la résolution du motif. Elle est compatible avec de nombreuses résines utilisées en photolithographie classique telles que les résines SU-8 et AZ. Elle permet également l'utilisation de biomatériaux compatibles avec la culture de cellules, l'impression de prothèses et d'implants médicaux, et autres plateformes d'études *in vitro* de tissus [Murphy and Atala, 2014] ou d'organes sur puces [Fetah et al., 2019].

La photopolymérisation repose sur la réticulation d'une résine photosensible déposée en goutte par un laser UV focalisé (figure 6.10.a). Le support se déplace et l'impression est répétée couche par couche. L'excédent de résine non réticulée est ensuite éliminé par un bain de solvant. Des résolutions jusqu'à $5 \mu m$ sont obtenues avec, par exemple, la Dilase 3D du constructeur Kloé. Celle-ci possède également une tête couvrant de plus grandes surfaces pour des impressions plus rapides.

La limitation de résolution de l'écriture directe par laser UV est supérieure au micromètre et a mené à l'élaboration d'une technique de polymérisation à deux photons (2PP), plus résolutive [Maruo et al., 1997]. Celle-ci consiste à polymériser une résine photodurcissante par l'adsorption de deux photons par impulsion très courte (femtoseconde) à l'aide d'un laser proche infrarouge (figure 6.10.b). Pour des longueurs d'ondes de 800 nm , cette technique permet de descendre à des résolutions en dessous des limites de diffraction. L'entreprise

NanoScribe propose de telles imprimantes 3D dont la résolution peut théoriquement atteindre la taille d'un voxel (équivalent 3D du pixel) de $150 \text{ nm} \times 150 \text{ nm} \times 1000 \text{ nm}$. Ils ont également développé un mode *dip-in* (DiLL, *Dip-in Laser Lithography*) pour lequel l'objectif est plongé dans la résine qui sert alors aussi d'huile d'immersion et permet ainsi de s'affranchir du support qui limite la hauteur d'impression (souvent limitée à $100 \mu\text{m}$) (figure 6.10.c) [Wegener, 2017].

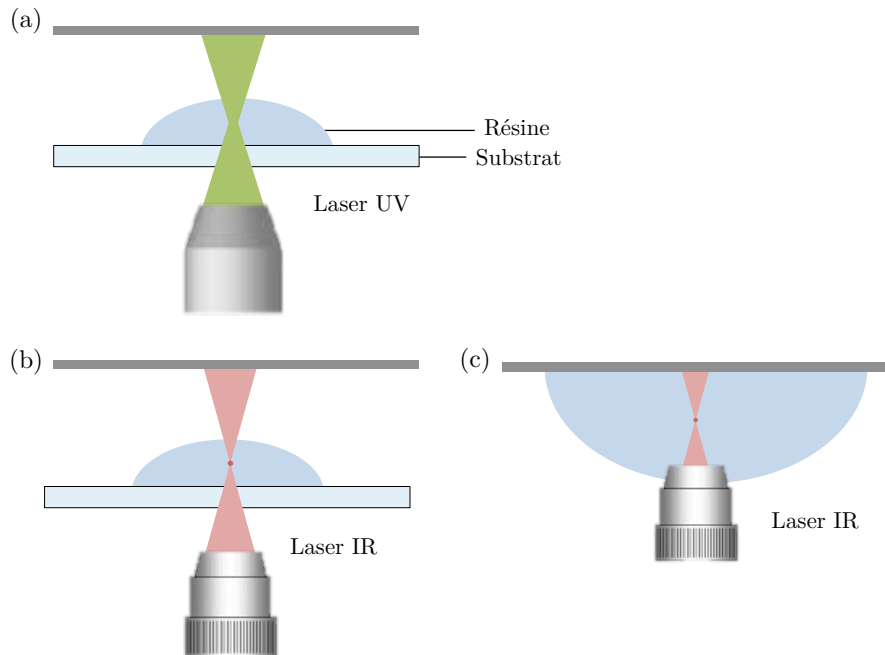


FIGURE 6.10 – Illustration du principe de photopolymérisation pour l'écriture directe par a) laser UV, b) laser infrarouge et c) laser infrarouge en mode *dip-in*.

6.2.3 La lithographie "molle"

La lithographie molle (ou *soft-lithography*) constitue la dernière étape de la fabrication de puces microfluidique (figure 6.7). Elle consiste en la réplique du moule : la résine laisse son empreinte dans un matériau élastomère tel que le polydiméthylsiloxane (PDMS) [Xia and Whitesides, 1998]. Il s'agit de l'élastomère le plus couramment utilisé en lithographie molle. Ses caractéristiques élastiques lui permettent de se détacher facilement, même de structures complexes, fragiles et de petites tailles. Il s'agit d'un polymère, de la famille des siloxanes, dont les propriétés viscoélastiques sont définies par son degré de polymérisation. À l'état de monomère, il est liquide mais sa polymérisation par l'ajout d'un réticulant mène à un matériau solide et élastique. Ainsi, par coulage sur l'empreinte (moule), il est possible d'obtenir des répliques extrêmement fiables.

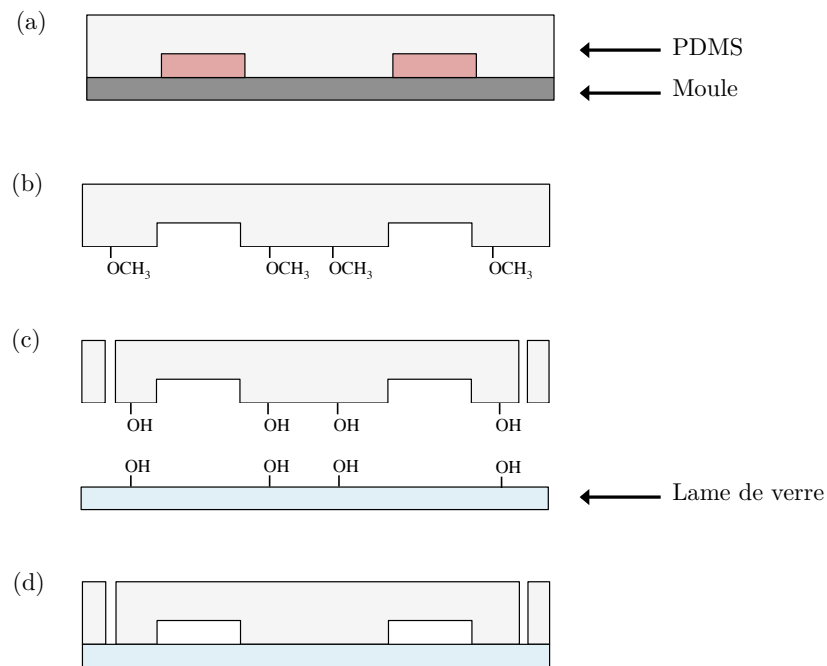


FIGURE 6.11 – Schéma des étapes de lithographie molle. a) le mélange PDMS/réticulant est coulé sur le moule. b) Après réticulation, le PDMS est décollé du moule. c) La pièce est percée et soumise à une activation au plasma d'oxygène en même temps que la lame de verre servant de support. d) La pièce est collée sur la lame de verre et mise à l'étuve à 80°C .

Les répliqués sont préparés par mélange du polymère avec son réticulant. Le mélange est coulé sur le moule (figure 6.11.a) et la réticulation est accélérée par chauffage à 80°C pendant au moins 1h. Le PDMS durci est ensuite décollé du moule (figure 6.11.b) et les entrées et sorties fluidiques sont percées. L'activation au plasma d'oxygène de la structure en PDMS et d'une lame de verre, qui sert de support, modifie leur chimie de surface. Les groupements méthoxy ($-\text{O}-\text{CH}_3$) du PDMS sont substitués par des groupements silanols ($\text{Si}-\text{OH}$) et la surface du verre est oxydée (figure 6.11.c). Ainsi, le PDMS est collé de façon covalente à la lame de verre grâce à des liaisons $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ (figure 6.11.d). La lame de verre peut éventuellement être recouverte d'une fine couche de PDMS afin de travailler avec une surface hydrophobe et d'induire un collage plus stable dans le temps. Enfin, la puce obtenue est placée à l'étuve à 80°C afin de restituer le caractère hydrophobe au PDMS. Divers traitements du PDMS sont alors envisageables pour convenir aux applications (favoriser/éviter l'adhérence de cellules, de gouttes, etc.).

Chapitre 7

Développement d'une puce microfluidique pour la formation de bicouches à l'interface de gouttes

La capacité à contrôler la formation et la trajectoire de gouttelettes en microfluidique est un enjeu important pour la parallélisation des expériences et leur reproductibilité. Dans notre cas, le développement d'une puce microfluidique a pour objectif de générer des gouttes monodisperses, les piéger par paires, de visualiser le temps initial de formation de la bicouche à leur interface et de réaliser plusieurs expériences en parallèle. Enfin, une perspective intéressante est le couplage de la mesure de fluorescence avec les mesures électriques sur bicouche par l'intégration de microélectrodes au niveau des pièges de la puce.

Lors de mon arrivée au laboratoire, le projet était déjà amorcé. Dans un premier temps, la géométrie et les dimensions de l'écoulement focalisé ont été mises au point pour former des gouttes de diamètre de l'ordre de $100\ \mu\text{m}$. L'écoulement focalisé a été préféré à la jonction T car il semblait plus stable aux fortes pressions. Une fois cette géométrie validée, elle a été dans un premier temps testée afin de former des paires de gouttes de façon aléatoire dans une chambre vide. Les gouttes formées sont effectivement monodisperses mais ne permettent pas un meilleur contrôle de la formation de paires en comparaison à la méthode manuelle. Ainsi, différentes géométries de pièges ont été envisagées afin de piéger les gouttes sous forme de paires. Mon premier objectif a donc été d'évaluer l'efficacité des différentes géométries proposées et d'effectuer un tri afin de sélectionner la plus prometteuse. À partir de ce choix, l'objectif a été d'améliorer la géométrie et son dimensionnement afin de répondre à notre cahier des charges.

Ce chapitre a pour objectif de décrire la démarche employée au cours de cette thèse afin de développer une puce microfluidique répondant à nos attentes. Dans un premier temps, quelques géométries testées seront présentées succinctement puis le principe du piégeage sera détaillé. Les modifications progressives de la géométrie et de la microfabrication ainsi que les

difficultés rencontrées seront exposées.

7.1 Choix de la géométrie des pièges

7.1.1 Principe général

Le circuit se décompose en deux parties principales. La première partie (figure 7.1) correspond à l'écoulement focalisé pour la formation des gouttes. La phase aqueuse est cisailée par l'huile contenant les phospholipides et le chloroforme. Les arrivées en huile et en eau sont suivies de « filtres » afin de bloquer les éventuels morceaux de PDMS qui se décrocheraient au moment de connecter les arrivées d'eau et d'huile. La taille des gouttes générées est contrôlée par le ratio entre la pression de la phase continue et la phase dispersée. Deux écoulements focalisés sont réalisés en parallèle afin de former deux populations de gouttes : une population de gouttes fluorescentes (peptide marqué par un fluorophore ou fluorophore seul) et une population de gouttes composées de tampon. Les gouttes sont ensuite acheminées jusqu'à la seconde partie de la puce pour y être piégées par paires et former les bicouches à leur interface.

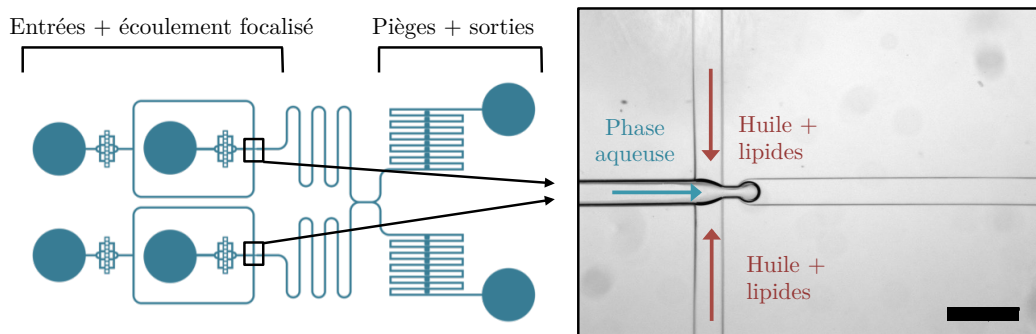


FIGURE 7.1 – Schéma général du dispositif utilisé. Les gouttes sont générées à l'aide d'un écoulement focalisé puis dirigées vers les pièges. La barre d'échelle représente $200 \mu m$.

Ces deux parties du dispositif sont reliées par un canal en forme de serpentin (figure 7.1). Celui-ci est assez long pour permettre aux gouttes de se couvrir en tensioactifs avant d'arriver aux pièges. En présence d'un flux continu autour de la goutte, le transport des lipides du milieu vers l'interface est accéléré en comparaison aux systèmes où les gouttes sont statiques. Ainsi, les interfaces des gouttelettes sont rapidement saturées en lipides [Thutupalli et al., 2013]. L'échelle de temps typique pour le transport des tensioactifs à l'interface est proportionnelle à L/v où L est la longueur du canal et v la vitesse d'écoulement de la phase continue. Ce temps caractéristique est de plusieurs ordres de grandeurs plus rapide que l'échelle de temps typique de diffusion des tensioactifs en système statique qui est proportionnel à $\rho L^2/\eta$ et dépend de la viscosité de la phase continue (η) et de la densité du tensioactif (ρ) [Thutupalli et al., 2013].

Les deux populations de gouttelettes ainsi recouvertes de phospholipides se rejoignent à une intersection avant d'être acheminées jusqu'aux voies contenant les pièges. Deux séries

de pièges peuvent être disposées en parallèle. Une des voies de piège est alors consacrée au piégeage des gouttes tandis que l'autre est utilisée comme une « voie de purge ». Celle-ci est laissée ouverte lors de l'établissement de l'écoulement focalisé tandis que la voie réservée au piégeage des gouttes est bouchée. Sa résistance est alors trop importante pour que les gouttes y soient acheminées. Ainsi, pendant la période de stabilisation de l'écoulement focalisé, les gouttes sont uniquement dirigées vers la voie de purge. De la sorte, une des séries de pièges est gardée intacte et ne peut être « polluée » par les gouttes de tailles non homogènes. Une fois l'écoulement focalisé stabilisé, la voie de « piégeage » est ouverte, les gouttes s'y dirigent ainsi afin d'y être bloquées.

Plusieurs géométries de pièges ont été imaginées ou inspirées de publications. Les géométries les plus prometteuses sont présentées aux paragraphes suivants.

7.1.2 Exemples de géométries de pièges testées

Géométrie n°1

Cette géométrie est inspirée de la publication de Chen *et al.* [Chen and Ren, 2017]. Les deux populations de gouttes sont acheminées de part et d'autre du piège qui est constitué d'une section rectangulaire cloisonnée en son centre (figure 7.2). Les gouttes se rejoignent à l'extrémité du piège où sont percées deux saignées ($15 \mu m$) et une ouverture centrale ($70 \mu m$) pour se rencontrer et former la bicouche à leur interface (figure 7.2.b). Lorsque les gouttes s'installent dans le piège, les suivantes empruntent directement la voie principale (sortie). Ainsi, les deux populations de gouttes ne se rencontrent pas avant d'atteindre le piège et la formation de paires mixtes est assurée.

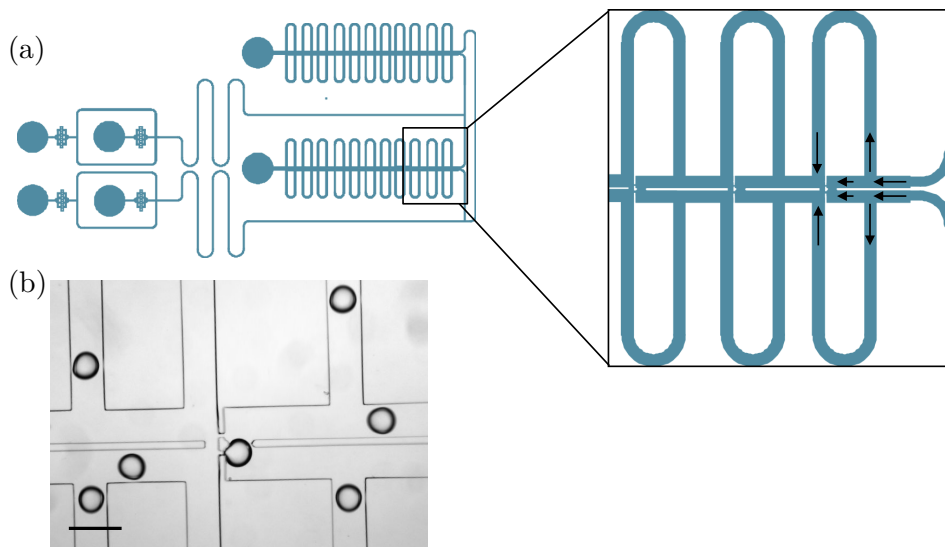


FIGURE 7.2 – (a) Schéma de la puce de géométrie 1. Les flèches représentent le sens du flux. (b) Photo de pièges en présence de gouttes. La barre d'échelle représente $200 \mu m$.

Cette géométrie a été testée mais les résultats n'ont pas été convaincants. En effet, malgré l'apparente facilité à former des paires mixtes, les gouttes piégées passent aisément d'une

position à l'autre ce qui rend difficile la formation de paires mixtes. Lorsque les gouttes ne sont pas assez grosses pour boucher totalement l'ouverture centrale du piège, il arrive qu'une seconde goutte soit acheminée jusqu'au piège et déplace la goutte déjà présente dans l'autre compartiment ou induise la formation de multiplets de gouttes. De plus, lorsque la première goutte piégée est suffisamment grosse pour boucher l'ouverture centrale, la seconde goutte n'est pas piégée et emprunte directement la voie de sortie du piège (cas de la figure 7.2.b). Cette géométrie est très sensible au flux et ne nous est pas apparue comme la plus simple à adapter à notre système.

Géométrie n°2

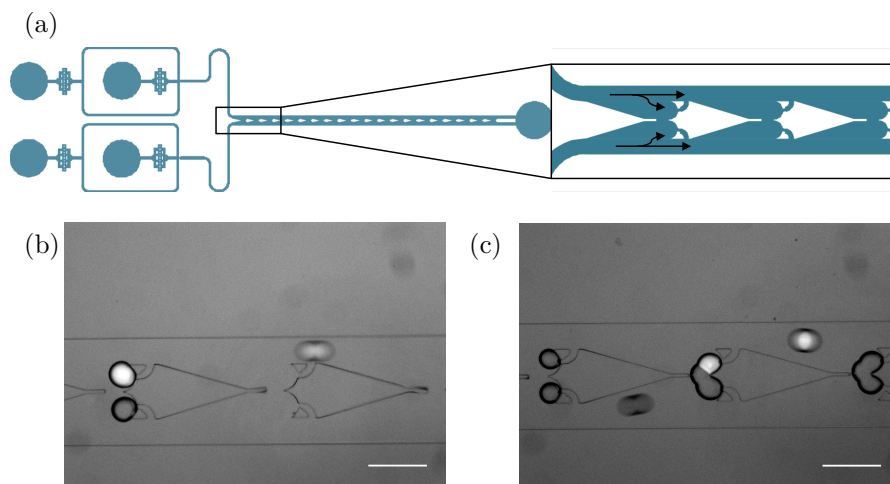


FIGURE 7.3 – (a) Schéma de la puce de géométrie 2. Les flèches représentent le sens du flux. (b) et (c) Photos de pièges en présence de gouttes. La barre d'échelle représente $200 \mu m$.

Pour cette géométrie, représentées sur la figure 7.3, les pièges sont constitués de deux receptacles dans le sens du flux. La présence d'ouvertures (saignées) perturbe l'écoulement et permet la capture des gouttes (figure 7.3.a). Les deux populations de gouttes ne se rencontrent pas avant d'être piégées assurant la formation de paires mixtes. La population de gouttes fluorescentes arrive, par exemple, par l'écoulement focalisé du haut et reste entraînée par le flux dans la partie haute de la puce. À l'inverse, la seconde population de gouttes, générée par l'écoulement focalisé du bas, reste entraînée par le flux dans la partie basse de la puce (figure 7.3.b). Les pièges se composent de deux compartiments pour retenir les gouttes, chacun percé par deux saignées de $15 \mu m$ et d'une ouverture centrale (de 50 ou $80 \mu m$) qui permet aux gouttes bloquées de se rejoindre et de former la bicouche à leur interface. Ainsi, les gouttes arrivent entraînées par le flux et sont attirées dans un piège grâce à la chute de résistance engendrée par la présence de la saignée. Cette géométrie présente l'avantage d'être facilement nettoyée et ne nécessite pas la présence d'une voie de purge.

Ces puces ont donc été testées avec des ouvertures centrales dans les pièges de 50 ou $80 \mu m$ avec différentes tailles de gouttes. Différents cas de figures peuvent se produire. Dans

un premier temps, nous avons observé que les ouvertures centrales de $80 \mu\text{m}$ entraînent l'échange d'une position à l'autre des gouttes lorsque le piège ne contient qu'une seule goutte. Des puces avec des ouvertures centrales de $50 \mu\text{m}$ résolvent ce problème. Lorsque des gouttes de petite taille sont piégées ($<80 \mu\text{m}$), elles se trouvent trop éloignées dans le piège pour entrer en contact et former une bicouche à leur interface (figure 7.3.b) ou ne modifient pas suffisamment la résistance du piège, de sorte qu'une troisième goutte puisse venir se loger dans le piège (figure 7.3.c). En revanche, les gouttes de plus gros diamètres sont souvent emportées par le flux et ne restent pas dans les pièges ou bouchent totalement l'ouverture centrale ce qui empêche le piégeage d'une seconde goutte. Cette géométrie n'a donc pas été privilégiée pour notre étude.

Géométrie n°3

La troisième géométrie présentée ici est inspirée des travaux de Nguyen *et al.* [Nguyen et al., 2016]. Les pièges sont constitués d'un puits percé par deux saignées destinées à recevoir les deux gouttes (figure 7.4). Dans cette géométrie, les gouttes sont acheminées aux pièges par un canal unique. Une difficulté de cette géométrie consiste donc à obtenir un régime alterné entre les deux populations de gouttes au niveau des pièges.

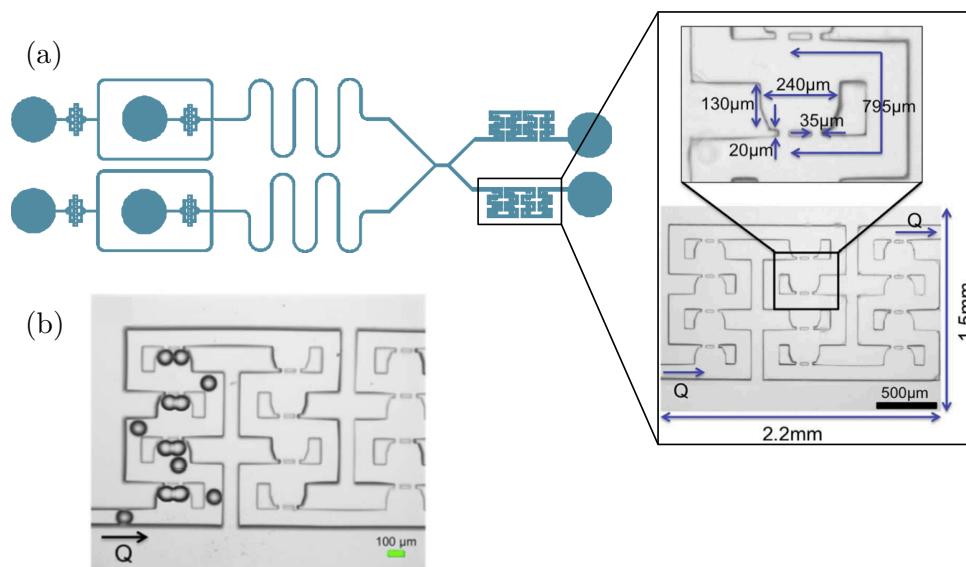


FIGURE 7.4 – (a) Géométrie de la puce et dimension des pièges de la publication de Nguyen *et al.* et (b) exemple de paires de gouttes formées [Nguyen et al., 2016] .

Nous avons reproduit cette géométrie et l'avons testée dans nos conditions. Dans un premier temps, par l'analyse de séquences vidéos de gouttes au niveau des pièges, nous avons pu observer que 70% des couples de gouttes arrivant au niveau du premier piège sont des paires mixtes. Cependant, nous avons rencontré des difficultés à piéger des paires de gouttes. Une première goutte est systématiquement piégée mais nous n'avons pas observé l'arrivée d'une deuxième goutte dans les pièges. Ceci peut s'expliquer par une augmentation de la résistance hydrodynamique du piège, supérieure à celle de la voie principale. Les gouttes

suivantes empruntent alors la voie principale. Ces effets peuvent être modulés en modifiant les dimensions de la voie principale et/ou du piège. Le principe d'un tel dispositif sera exposé en détail à la section suivante. Nous verrons que la viscosité du fluide porteur et la tension de surface des gouttes entrent en considération. Ceci explique notamment que les dimensions du système issu des travaux de Nguyen *et al.* [Nguyen et al., 2016] ne conviennent pas à notre formulation et que des modifications doivent être apportées afin que ce système soit efficace dans notre cas.

Cette géométrie nous est cependant apparue comme la plus prometteuse. Il semble tout à fait possible de piéger de façon alternée les gouttes des deux populations et le piégeage d'une première goutte sans difficulté nous a encouragé à valider cette géométrie. De plus, nous verrons à la section suivante que le principe d'un tel piégeage ainsi que son circuit électrique équivalent sont modélisables et aisément modulables. Nous avons donc décidé de poursuivre le développement de notre outil à partir de cette géométrie.

7.1.3 Le piégeage hydrodynamique

Résistances hydrodynamiques

Le piégeage hydrodynamique se base sur les différences de résistances hydrodynamiques entre les pièges et la voie principale (ou canal de contournement). Comme rappelée au chapitre précédent (section 6.1.2), la résistance d'une section rectangulaire dans un canal de taille micrométrique est définie par (7.1) :

$$R = \frac{12\mu L}{h^3 w} \left[1 - \frac{192}{\pi^5} \times \frac{h}{w} \times \tanh \frac{\pi w}{2h} \right]^{-1} \quad (7.1)$$

avec L la longueur du canal considéré, w sa largeur, h sa hauteur et μ la viscosité du fluide porteur.

L'équation (7.1) peut donc être utilisée pour concevoir des canaux de dimensions spécifiques et ainsi évaluer la résistance à l'écoulement dans le dispositif pour prévoir et contrôler la trajectoire des gouttelettes. La résistance est évaluée pour les différentes portions de la puce, telles que la résistance de la voie principale autour du piège (R_M), comme définie sur la figure 7.5, ou la résistance d'un piège (R_T). Celle-ci se calcule à partir de deux sections : la résistance du puits formant le piège R_a (calculée à partir de w_a et $L_a/2$) et la résistance de la section formant la saignée R_b telles que définies sur la figure 7.5. La résistance d'une ligne du piège R_L s'écrit donc :

$$R_L = R_a + R_b$$

Les deux lignes du piège étant en parallèle, la résistance d'un piège vide est égale à $R_L/2$.

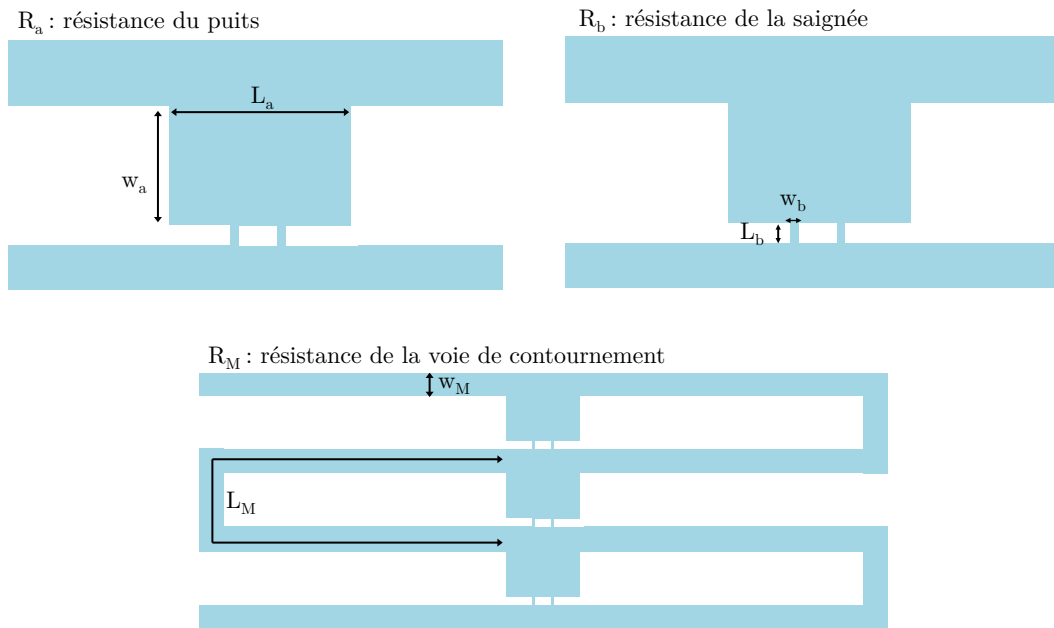


FIGURE 7.5 – Schémas des paramètres de dimensionnement à prendre en compte pour le calcul de la résistance de la voie principale (R_M) et du piège (R_T). Celle-ci est évaluée à partir de la résistance du puits (R_a) et de la résistance due à la portion du piège comprenant les saignées (R_b).

Comme mentionné précédemment (section 6.1.2), la résistance hydrodynamique est l'analogie de la résistance électrique. Le circuit électrique équivalent de la géométrie présentée ici est représenté sur la figure 7.6.1. Un piège libre possède une faible résistance à l'écoulement et un grand débit, tandis qu'un piège rempli possède une forte résistance à l'écoulement et un faible débit. Ainsi, lorsque le piège est vide, la résistance à l'écoulement est moindre et les gouttes s'y dirigent tandis que lorsque ces pièges sont remplis, les gouttes empruntent la voie principale.

Le principe d'un tel piégeage (piégeage direct) est représenté sur la figure 7.6. Lors de l'arrivée de gouttes à l'approche d'un piège, deux choix s'offrent donc à elles : suivre la voie principale ou entrer dans le piège. Les gouttes étant entraînées par le flux vers la portion de moindre résistance, le piégeage doit satisfaire trois conditions, résumées sur la figure 7.6, afin d'être efficace :

1. Lors de l'arrivée de la première goutte au niveau du piège, la résistance R_T du piège doit être inférieure à la résistance R_M de la voie principale (figure 7.6.2) : $R_T < R_M$.
2. Lorsque la première goutte est piégée, elle bloque une des saignées. Si la résistance du piège reste inférieure à celle du canal principal R_M alors une seconde goutte est entraînée dans le piège (figure 7.6.3) : $R_T < R_M$.
3. Une fois le piège rempli par les deux gouttes, les deux saignées sont bouchées et la résistance du piège augmente fortement. Si la résistance du piège devient supérieure à celle de la voie principale, les gouttes suivantes empruntent le canal principal et ne

perturbent pas les gouttes piégées. Elles sont donc acheminées vers les pièges suivants (figure 7.6.4) : $R_T > R_M$.

L'équation (7.1), montre que les paramètres géométriques critiques influençant la résistance des sections sont leur largeur w et leur longueur L pour une hauteur h donnée. Ainsi, les résistances peuvent être ajustées en modifiant la longueur et la largeur du canal principal et/ou des pièges.

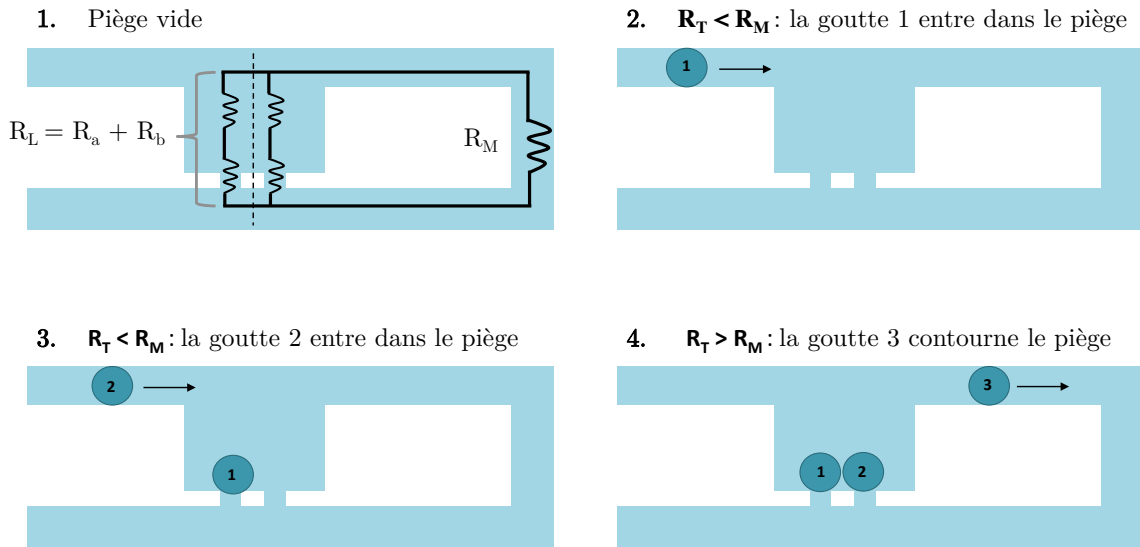


FIGURE 7.6 – Principe du piégeage hydrodynamique. Le circuit électrique équivalent est représenté en 1. et les différentes conditions à satisfaire en 2, 3 et 4. La flèche noire définit le sens du flux.

Pression de Laplace

Une quatrième condition doit être satisfaite afin de maintenir les gouttes dans les pièges afin de prévenir leur sortie à travers la saignée. En effet, la présence d'un flux impose une pression sur les gouttes piégées. La différence de pression entre l'entrée et la sortie du piège ΔP doit être inférieure à la pression critique de Laplace $\Delta P_{Laplace}$ définie par (7.2) qui correspond à la pression critique au delà de laquelle la goutte est éjectée du piège [Nguyen et al., 2016] :

$$\Delta P_{Laplace} = 2\gamma \left(\frac{1}{w_b} - \frac{1}{w_t} \right) \quad (7.2)$$

avec γ la tension de surface de l'interface goutte/huile, w_b la largeur de la saignée et w_t la profondeur du piège (figure 7.5). Cette surpression est donc définie par la géométrie du piège (w_b et w_t) ainsi que la tension de surface des gouttes recouvertes de lipides (γ).

7.2 Première génération de puces

Le principe du piégeage hydrodynamique direct a donc été retenu pour mettre en place notre système. Nous verrons au cours de cette section, l'évolution de cette géométrie pour l'adapter à notre système.

7.2.1 Retour sur la géométrie 3

À partir des équations présentées à la section précédente, nous avons évalué les résistances du dispositif adapté de la publication de Nguyen *et al.* présenté en section 7.1.2. Les résistances des différentes voies sont reportées dans la table 7.1. La résistance de la voie principale ($R_M = 2,85.10^{-6} Pa.s.\mu m^{-3}$) s'avère proche de la résistance du piège contenant une goutte ($R_{T'} = 2,13.10^{-6} Pa.s.\mu m^{-3}$). Bien que cette résistance soit inférieure à celle de la voie principale, il est tout à fait probable que leur différence soit trop faible pour être efficace. Ainsi, une fois qu'une première goutte est piégée, la résistance du piège est presque équivalente à celle de la voie principale. Cela peut donc expliquer qu'une seule goutte soit piégée dans une telle géométrie.

R_M ($Pa.s.\mu m^{-3}$)	R_T ($Pa.s.\mu m^{-3}$)	$R_{T'}$ ($Pa.s.\mu m^{-3}$)	ΔP_L ($mbar$)
$2,85.10^{-6}$	$1,06.10^{-6}$	$2,13.10^{-6}$	2,33

TABLE 7.1 – Résistances des différentes voies selon la configuration (piège vide R_T ou une saignée bouchée $R_{T'}$) et surpression maximale imposable (ΔP_L) pour la puce adaptée de Nguyen *et al.* R_M correspond à la résistance de la voie principale.

7.2.2 Modifications et dimensionnement

Forts de ces premières observations, nous avons procédé à différentes modifications des motifs initiaux proposés par Nguyen *et al.* [Nguyen et al., 2016]. Nous avons choisi d'augmenter la longueur de la voie principale afin d'augmenter sa résistance et de créer des écarts plus importants avec les résistances des pièges. Pour cela, nous avons modifié l'enchaînement des pièges afin de n'en conserver qu'un seul par niveau (figure 7.7). Nous avons également réduit la largeur et la profondeur des pièges car nous formons des gouttes de plus petit diamètre que la géométrie présentée dans la publication. De plus, les dimensions du piège ayant une influence sur la pression de Laplace (7.2), il est intéressant de moduler les paramètres w_t et w_b afin d'augmenter la pression maximale critique ΔP_L au delà de laquelle les gouttes sont éjectées des pièges. Nous avons donc réalisé des puces avec différentes tailles de saignées. Les dimensions ainsi que les résistances des différentes voies et les pressions de Laplace pour

chaque largeur de saignée sont précisées dans la table 7.2.

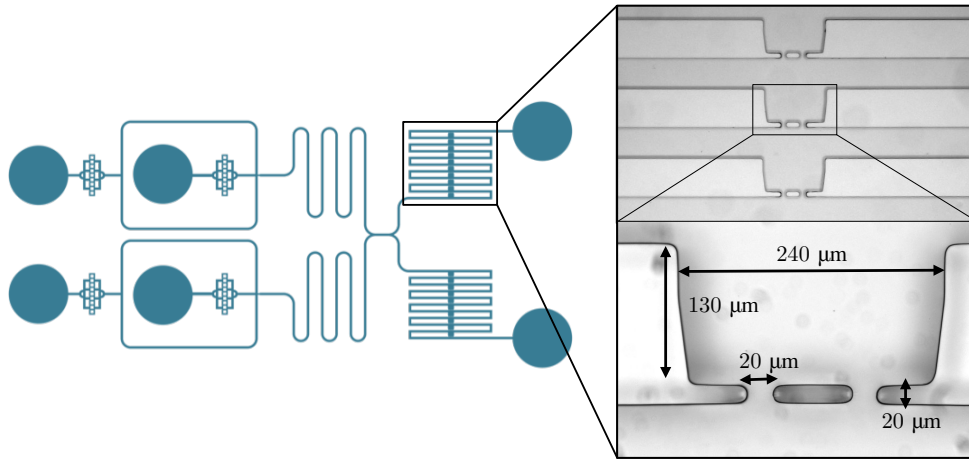


FIGURE 7.7 – Schéma et photo du dispositif modifié et dimensions des pièges pour des saignées de $20 \mu m$.

	A1	A2	A3
	$20 \mu m$	$15 \mu m$	$12 \mu m$
h (μm)	100	100	100
w_M (μm)	120	100	100
w_t (μm)	130	110	115
L_t (μm)	240	200	200
L_b (μm)	20	15	10
R_M ($Pa.s.\mu m^{-3}$)	$1,19.10^{-5}$	$1,83.10^{-5}$	$1,83.10^{-5}$
R_T ($Pa.s.\mu m^{-3}$)	$2,31.10^{-6}$	$3,80.10^{-6}$	$4,76.10^{-6}$
$R_{T'}$ ($Pa.s.\mu m^{-3}$)	$4,61.10^{-6}$	$7,63.10^{-6}$	$9,53.10^{-6}$
2 gouttes piégées	Oui	Oui	Oui
ΔP_L (mbar)	4,23	5,75	7,46

TABLE 7.2 – Valeurs des dimensions (telles que définies figure 7.5) des puces A1, A2 et A3 pour $w_b = 20/15/12 \mu m$, respectivement, et résistances des différentes voies selon la configuration (piège vide : R_T ou une saignée bouchée : $R_{T'}$) et surpression maximale imposable ($\Delta P_{Laplace}$). R_M correspond à la résistance de la voie principale ($L_M = 5600 \mu m$).

Les résistances ainsi calculées sont donc compatibles avec le piégeage hydrodynamique di-

rect. En effet, pour chaque largeur de saignée, on observe que la résistance de la voie principale (R_M) est supérieure à la résistance du piège vide (R_T) et à la résistance du piège lorsqu'une goutte est piégée ($R_{T'}$). De plus, pour des gouttes de $100\ \mu\text{m}$ de diamètre, de tension de surface de $5\ \text{mN/m}$ (tension de surface estimée par mesure de goutte de pendante [Kulifaj, 2018]), la pression de Laplace (ΔP_L) est supérieure à 2 mbar. Cette pression correspond à la pression moyenne exercée sur chaque piège dans les expériences détaillées ci-dessous.

Méthode expérimentale

Microfabrication

La microfabrication des puces présentées dans cette section est décrite ici brièvement et détaillées dans le matériels et méthodes (section A.4). Elles sont réalisées par photolithographie et répliquées par lithographie molle comme décrites au chapitre 6. Les moules sont obtenus par enduction centrifuge ou laminage de films secs de résine négative (SU-8) sur des wafers de silicium. L'étape de photolithographie est réalisée à l'aide de l'insolateur masqueur UV-Kub 2 (Kloé) à partir d'un masque chrome-verre. Les différents paramètres testés sont résumés dans le matériel et méthode, figure A.7. Les premières puces ont été réalisées par enduction centrifuge afin d'obtenir des épaisseurs de $100\ \mu\text{m}$. De meilleurs résultats (épaisseurs, optimisations des paramètres d'insolation, résolutions) ont ensuite été obtenus à l'aide de films secs dont l'épaisseur uniforme permet de s'affranchir des effets de bords, parfois présents lors de la réalisation du moule par enduction centrifuge de résine liquide. Les structures sont ensuite répliquées par lithographie molle (section A.4).

Procédure

Les puces sont connectées à un contrôleur de flux (Fluigent) relié aux réservoirs d'eau et d'huile par des tubes en téflon. La phase aqueuse est constituée de tampon PBS supplémenté de 10 mM de Mg^{2+} pour l'entrée 1 et de tampon PBS contenant de la carboxyfluorescéine à $10\ \mu\text{M}$ supplémenté de 10 mM de Mg^{2+} pour l'entrée 2. La phase organique est composée du mélange squalène, lipides et chloroforme, aux concentrations habituelles, et est identique pour les 2 entrées.

Dans un premier temps, les puces sont remplies de la phase continue afin de chasser l'air. Une fois la puce remplie d'huile, une des deux voies de pièges est bouchée à l'aide d'un scotch (généralement la voie ne possédant pas de défauts ou ne contenant aucune bulle d'air) afin d'augmenter sa résistance et empêcher les gouttes de s'y rendre. Ainsi, la voie laissée ouverte est considérée comme voie de purge. Les phases aqueuses sont ensuite connectées en prenant soin de ne pas faire pénétrer d'air dans la puce. Les surpressions de phase organique et de phase aqueuse sont ajustées afin d'obtenir un écoulement focalisé stable générant des gouttes d'environ $100\ \mu\text{m}$ de diamètre. Pour cela des surpressions aux alentours de 20 mbar sont imposées. Les premières gouttes générées sont donc envoyées vers la voie de purge le temps d'obtenir un régime stable. Une fois ce régime atteint, la voie de pièges fermée est réouverte.

Les gouttes sont ainsi acheminées jusqu’aux pièges pour y être bloquées.

Résultats

Les puces microfluidiques sont testées selon le protocole décrit ci-dessus. Les surpressions imposées en entrée de puce étant d’environ 20 mbar, la pression résultante en entrée de chaque piège est donc de 2 mbar (chaque série de piège en contient 10). Ainsi, d’après les résistances et les pressions de Laplace calculées et reportées table 7.2, deux gouttes peuvent être piégées dans un même piège et y être maintenues ($\Delta P_{imposée/piège} < \Delta P_L$).

Comme observé sur la figure 7.8.a, les débits de gouttes sont aisément ajustés de telle sorte que sont piégées une goutte fluorescente avec une goutte non fluorescente. Cependant, pour les pièges à 20 μm (dimensions A1) et 15 μm (dimensions A2), les gouttes se faufilent très rapidement à travers les saignées (de l’ordre de quelques secondes) de sorte que les bicouches n’ont pas le temps de se former (figure 7.8.b). Les dimensions de ces puces sont donc effectivement compatibles avec un piégeage hydrodynamique : la résistance de la voie de contournement (R_M) est supérieure à la résistance du piège vide (R_T) et à la résistance du piège lorsque qu’une première saignée est bouchée ($R_{T'}$). Cependant, bien que $\Delta P_{imposée/piège} = 2 \text{ mbar} < \Delta P_L$, les gouttes ne sont pas maintenues dans les pièges.

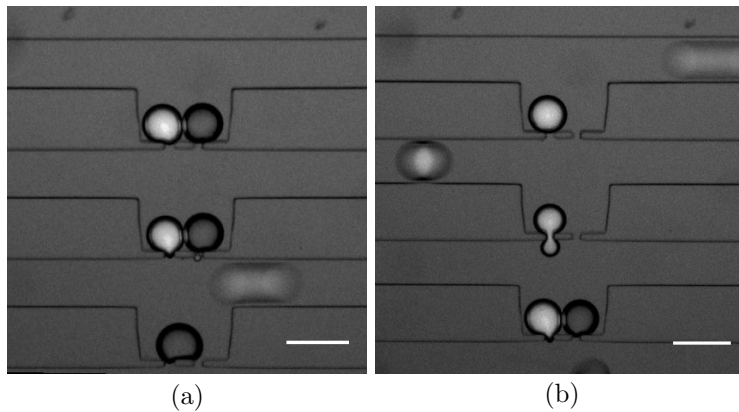


FIGURE 7.8 – Photos obtenues sur une puce de saignées de 20 μm (dimensions A1). On observe en (a) des duos de gouttes formées par une goutte de chaque population et en (b) l’échappement d’une goutte à travers la saignée. La barre d’échelle représente 150 μm .

En diminuant la taille des saignées, la pression de Laplace augmente (équation (7.2)) et les gouttes sont potentiellement maintenues. Ainsi, les puces A3, de saignées de 12 μm , ont été testées. Le piégeage hydrodynamique s’avère à nouveau efficace et l’on observe ainsi plusieurs paires de gouttes. Dans ce cas, la bicouche est formée et les paires de gouttes sont maintenues de quelques secondes à quelques minutes (jusqu’à 5 minutes) (figure 7.9). Ainsi, il est possible d’observer plusieurs bicouches se former. Cependant, les gouttes finissent par être éjectées des saignées. La pression de Laplace dans un tel dispositif est pourtant d’environ 7,46 mbar, ce qui représente un écart important par rapport aux 2 mbar de surpression locale imposée au niveau de chaque piège. De plus, nous observons que les gouttes sont très déformables ce

qui témoigne d'une tension de surface plus faible que supposée. Or, la pression de Laplace, calculée à partir de l'équation (7.2), dépend des dimensions du piège mais également de la tension de surface des gouttes. Celle-ci a été estimée à environ 5 mN/m par mesures de goutte pendante. Or, à la vue des résultats et de la déformabilité des gouttes, il est probable que cette valeur ait été sur-estimée. Une tension superficielle plus basse entraînerait des pressions de Laplace plus faibles, ce qui pourrait expliquer pourquoi les gouttes ne restent pas maintenues dans les saignées.

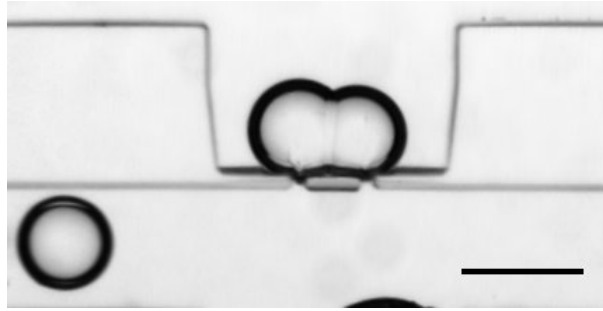


FIGURE 7.9 – Photo d'une paire de goutte formant une bicouche obtenue sur une puce de saignées de 12 μm (A3). La barre d'échelle représente 100 μm .

Conclusion

En conclusion, les essais sur cette série de puces (A1, A2, A3) pour le piégeage hydrodynamique de paires de gouttes sont encourageants. La géométrie et la démarche de mise en place de l'expérience ont pu être validées. Cependant, nous observons que les gouttes ne sont pas maintenues dans les saignées pour une durée suffisante pour nos expériences (30 minutes). Nous observons que les gouttes sont extrêmement déformables ce qui reflète une tension de surface très faible. Celle-ci a été préalablement déterminée par la méthode de la goutte pendante à 5 mN/m. Il apparaît cependant que cette valeur semble élevée face à la capacité de déformation des gouttes. Ainsi, nous avons souhaité déterminer plus précisément la tension superficielle de nos gouttes recouvertes de phospholipides.

7.2.3 Évaluation de la tension de surface des émulsions

La déformabilité d'une goutte peut être estimée par sa tension de surface. Plus celle-ci sera faible, plus la goutte sera facilement déformable. La tension de surface correspond à l'énergie à fournir pour augmenter d'une unité de surface élémentaire, la surface d'une interface entre deux milieux non miscibles. Pour réduire cette tension due aux interactions défavorables entre les deux milieux non miscibles, le système tend à diminuer la surface de son interface. Une différence de pression s'établit entre l'intérieur et l'extérieur de la goutte, il s'agit de la pression de Laplace : $\Delta P = P_{int} - P_{ext}$.

Il existe différentes méthodes pour déterminer la tension superficielle entre deux milieux. La méthode de la goutte pendante repose sur l'analyse d'une goutte déformée par la gravité

à partir de ses dimensions à l'équilibre. Les effets gravitationnels et les effets de tension de surface de la goutte maintenue à l'extrémité d'une aiguille verticale s'expriment par l'équation de Young-Laplace (7.3) :

$$\gamma\left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2}\right) = -\Delta\rho g z + \gamma \frac{2}{R_0} \quad (7.3)$$

avec R_1 et R_2 les rayons de courbure principaux au point M, $\Delta\rho$ la différence de masse volumique du fluide dans la goutte par rapport au fluide extérieur de la goutte, g est l'accélération de la pesanteur, R_0 le rayon de courbure au sommet de la goutte et γ la tension interfaciale, comme définis sur la figure 7.10. La tension de surface mesurée par cette méthode est d'environ 5 mN/m.

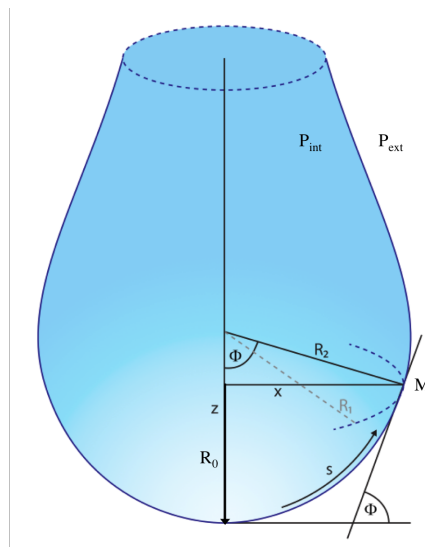


FIGURE 7.10 – Profil et dimensions d'une goutte pendante.

La tension de surface est fixée par la concentration surfacique en molécules amphiphiles à l'interface. Il faut donc prendre en compte le temps que la goutte se couvre entièrement de lipides. Cependant, par mesure de goutte pendante, il arrive que la goutte se décroche avant d'avoir atteint cette valeur. Dans ce cas, la tension mesurée ne correspond pas à l'équilibre. De plus, cette méthode nécessite de prendre en compte la masse volumique du liquide constituant la phase continue. Or dans notre cas, celle-ci est constituée d'un mélange d'huile, de lipides et de chloroforme qui s'évapore progressivement. La tension de surface est donc calculée à partir d'une approximation de la masse volumique de la phase continue qui évolue au cours du temps. Il est donc judicieux de s'affranchir de ce paramètre pour évaluer la tension de surface de notre système.

Mesure par aspiration de gouttes

La tension de surface peut également être mesurée sur une goutte déjà formée. Cette méthode, décrite par Yeung *et al.* [Yeung et al., 1998], repose sur l'aspiration d'une goutte à l'aide d'une micropipette couplée à un contrôleur de pression. La goutte se déforme localement sous l'effet de l'aspiration et ses dimensions sont mesurées pour calculer sa tension de surface grâce à l'équation de Young-Laplace. Deux différences de pression s'exercent alors. La première ΔP_g a lieu entre la goutte et le milieu extérieur, la seconde, ΔP_p , s'exerce entre l'excroissance de la goutte et la micropipette. Elles s'expriment :

$$\Delta P_g = \frac{2\gamma}{R_g} \quad \text{et} \quad \Delta P_p = \frac{2\gamma}{R_p}$$

La pression de Laplace résultante s'écrit donc :

$$\Delta P = \Delta P_p - \Delta P_g = 2\gamma \left(\frac{1}{R_p} - \frac{1}{R_g} \right) \quad (7.4)$$

avec R_g le rayon de la goutte et R_p le rayon de la pipette. ΔP correspond à la différence de pression critique (P_{crit}) qui permet une expansion de la goutte au diamètre de la pipette (figure 7.11).

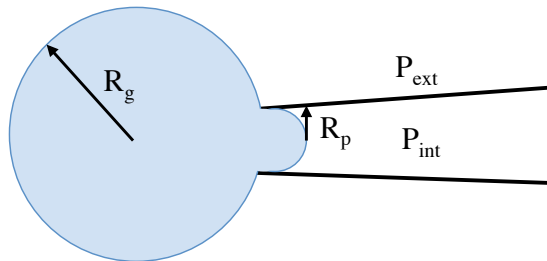


FIGURE 7.11 – Principe de la mesure de tension de surface par aspiration d'une goutte.

Nous avons donc choisi d'évaluer la tension de surface de nos gouttes recouvertes de phospholipides baignant dans la phase continue par cette méthode afin d'obtenir une mesure plus précise en s'affranchissant de la connaissance de la masse volumique de la phase continue en chaque instant de l'expérience.

Méthode expérimentale et résultats

Une micropipette est remplie de phase aqueuse et reliée à un réservoir d'eau faisant office de contrôleur de pression. Le déplacement du réservoir permet de contrôler l'aspiration en bout de pipette. Les pipettes sont traitées dans une solution de silane afin de rendre l'extérieur et la pointe intérieure de la pipette hydrophobes. Les détails expérimentaux sont fournis dans le matériel et méthode (section A.5). La pipette est ensuite trempée dans la phase continue contenant l'émulsion et mise en contact avec une goutte. Le réservoir est descendu jusqu'à atteindre la dépression qui permet d'aspirer la goutte et de former une protrusion de diamètre

égal au diamètre de la pipette (figure 7.11). À partir des images obtenues et de l'équation (7.4), la tension de surface de gouttes recouvertes de phospholipides POPG est calculée.

Mesurée de la sorte, la tension de surface moyenne est de $0,69 \pm 0,2$ mN/m. Cette valeur est significativement inférieure à celle obtenue par la méthode de la goutte pendante. Cet écart peut être due à l'approximation faite sur la valeur de la masse volumique de la phase continue ainsi qu'à la cinétique de recouvrement de l'interface. En effet, la tension de surface décroît au fur et à mesure que les tensioactifs recouvrent l'interface, jusqu'à atteindre une valeur plateau lorsque l'interface est saturée en tensioactifs. Par la méthode de l'aspiration de gouttes par micropipette, les mesures sont réalisées à l'équilibre.

7.2.4 Discussion

Ces mesures ont permis de conclure que les gouttes ont des tensions de surface très faibles, d'environ 0,7 mN/m. Une telle tension de surface explique leur très forte déformabilité. Nous avons donc ré-évalué la pression de Laplace dans chaque piège. Leurs valeurs sont regroupées dans la table 7.3 pour une tension de surface de 0,7 mN/m et rappelées pour $\gamma = 5$ mN/m. Les ΔP_L diminuent drastiquement pour une tension de surface de 0,7 mN/m. Ces valeurs sont faibles et il est difficile de générer efficacement des gouttes avec des surpressions inférieures à 10 mbar (et donc environ 1 mbar au niveau de chaque piège). Il nous faut alors revoir le dimensionnement de notre système de sorte à augmenter la pression de Laplace autorisée en entrée de chaque piège.

Largeur saignée	$\gamma = 5 \text{ mN/m}$	$\gamma = 0,7 \text{ mN/m}$
	ΔP_L (mbar)	ΔP_L (mbar)
20 μm	4,23	0,60
15 μm	5,75	0,81
12 μm	7,76	1,05

TABLE 7.3 – Surpressions maximales imposables (ΔP_L) pour les différentes puces testées pour des tensions de surface (γ) de 5 mN/m (première estimation) et 0,7 mN/m (nouvelle estimation).

7.3 Seconde génération de puces

L'estimation précise de la tension de surface de nos gouttes nous oblige à diminuer la largeur des saignées afin d'augmenter la pression de Laplace au niveau des pièges (7.2). Nous avons ainsi estimé ces surpressions ainsi que les résistances pour des pièges possédant des saignées de 10 μm et 8 μm . Ces valeurs sont regroupées sur la table 7.4 et sont également rappelées pour une puce de saignées de 12 μm .

On observe que la pression de Laplace augmente effectivement pour de plus petites saignées. De plus, le piégeage hydrodynamique semble possible pour une puce de saignée de $10 \mu m$ car la résistance de la voie principale est supérieure à celle du piège vide et contenant une goutte. Cependant, pour des saignées de $8 \mu m$, la résistance du piège contenant une goutte est supérieure à celle de la voie principale ($R_{T'} > R_M$). Le piégeage d'une paire de gouttes ne peut donc avoir lieu. Cela nous amène alors à revoir les dimensions de notre système.

	A3	A4	A5
	12 μm	10 μm	8 μm
R_M ($Pa.s.\mu m^{-3}$)	$1,83.10^{-5}$	$1,83.10^{-5}$	$1,83.10^{-5}$
R_T ($Pa.s.\mu m^{-3}$)	$4,76.10^{-6}$	$1,55.10^{-5}$	$2,97.10^{-5}$
$R_{T'}$ ($Pa.s.\mu m^{-3}$)	$9,53.10^{-6}$	$7,74.10^{-5}$	$1,48.10^{-5}$
2 gouttes piégées	Oui	Oui	Non
ΔP_L (mbar)	1,05	1,33	1,68

TABLE 7.4 – Résistances des différentes voies et pression de Laplace (ΔP_L) pour des puces possédant des saignées de $12 \mu m$, $10 \mu m$ et $8 \mu m$

7.3.1 Nouvelles dimensions

Pour effectuer ces modifications, nous avons décidé d'avoir recours à l'écriture directe pour fabriquer le moule. Celle-ci s'affranchit de l'étape de préparation du masque, ce qui s'avère être à la fois un gain en temps, en reproductibilité et en résolution. De plus, nos motifs atteignent la limite du rapport de forme (hauteur/largeur), tolérable en photolithographie, au-delà duquel il est difficile d'obtenir des structures fiables. L'écriture directe permet d'outrepasser cette limite.

L'impression de moules par écriture directe a été effectuée à l'aide de l'imprimante 3D Photonic Professional GT2 de l'entreprise Nanoscribe. Bien que cet appareil permette la préparation d'échantillons avec des résolutions sub-micrométriques, et donc bien supérieures à ce que nous avons besoin, il était le seul appareil d'écriture direct à notre disposition. Il présente cependant une contrainte en terme de surface imprimable : elle est limitée à $2 cm^2$. Ceci nous a contraint à revoir le dimensionnement de notre puce et en particulier la taille de la voie principale. Celle-ci, initialement de $5400 \mu m$ est alors réduite à $2800 \mu m$. La résistance de la voie principale diminue donc de façon significative et devient inférieure à celle des pièges. Le piégeage des gouttes ne peut donc avoir lieu. Pour contrer cet effet, nous avons donc diminué la largeur de la voie principale à $50 \mu m$ ainsi que l'épaisseur du moule à $65 \mu m$ afin d'augmenter la résistance de la voie principale. Les dimensions et les résistances alors mises

en jeu sont résumées sur la figure 7.12 et la table 7.5.

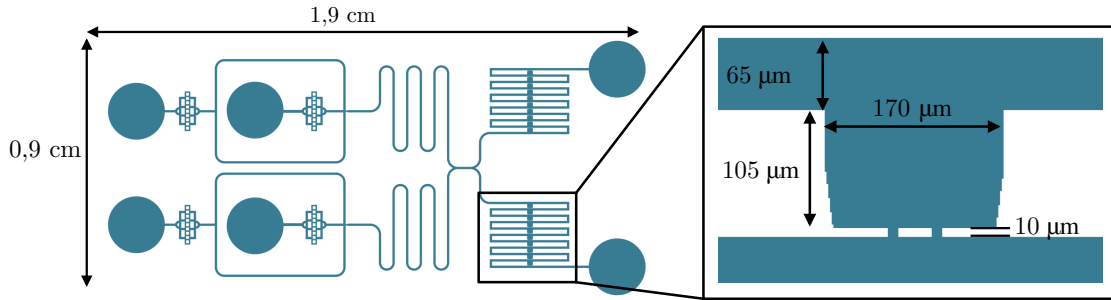


FIGURE 7.12 – Dimensions du nouveau design adapté pour l’écriture direct pour des saignées de $8 \mu m$ et une voie principale de $2800 \mu m$.

B1	
$8 \mu m$	
R_M ($Pa.s.\mu m^{-3}$)	$9,3 \cdot 10^{-5}$
R_T ($Pa.s.\mu m^{-3}$)	$3,17 \cdot 10^{-5}$
$R_{T'}$ ($Pa.s.\mu m^{-3}$)	$6,34 \cdot 10^{-5}$
2 gouttes piégées	Oui
ΔP_L (mbar)	1,68

TABLE 7.5 – Résistances des différentes voies et pression de Laplace (ΔP_L) pour la géométrie B1 possédant une saignée de largeur $8 \mu m$.

Des images obtenues en microscopie électronique à balayage sur des structures en résine et en PDMS sont présentées sur la figure 7.13. On observe des défauts sur les deux types de structures. Les structures en résine sont partiellement décrochées du substrat (figure 7.13, gauche). Les structures du réplikat en PDMS sont également endommagées (figure 7.13, droite). En effet, on observe un arrachage des structures fines et un écrasement des plots formant les saignées. L’endommagement de ces structures est du, d’une part, à une forte interaction entre le PDMS et la résine qui, au cours du démoulage, restent collés entre eux. D’autre part, l’adhésion de la résine sur le wafer de silicium n’est pas optimale et elle s’en détache facilement. Le nettoyage du moule à l’aide du pistolet d’azote mène également au détachement de la résine. Ces fragilités nous ont donc conduit à envisager de traiter les différentes surfaces.

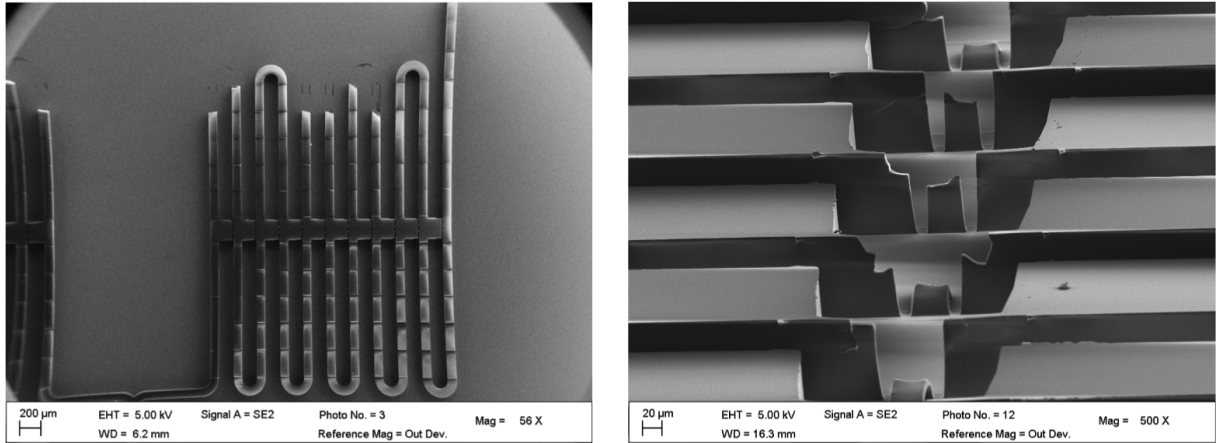


FIGURE 7.13 – Images obtenues par microscopie électronique à balayage sur le moule en résine (à gauche, vue du dessus) et sur un réplikat en PDMS (à droite, vue latérale).

7.3.2 Traitements de surfaces

Les difficultés de microfabrication peuvent être résolues par des traitements de surface du substrat et de la résine. Ces fonctionnalisations consistent à modifier les groupements chimiques exposés par ces surfaces. Il est alors possible de moduler la force d'interaction entre deux surfaces/matériaux.

Pour cela, la silanisation des substrats est couramment employée. La nature des organosilanes utilisés, l'état des surfaces ainsi que les conditions de réaction peuvent mener à de nombreuses fonctionnalisations et donc applications [Sonawane and Nimse, 2016]. De formule générale R_nSiX où R est un radical organique et X un groupement hydrolysable (OH, Cl, OMe, OEt, etc.), les organosilanes sont largement employés en traitement de surface pour la microfluidique [Glass et al., 2011]. Leur réactivité augmente avec le nombre de groupements hydrolysables présents. Ceux-ci favorisent la formation de liaisons intermoléculaires avec la surface à traiter. La nature chimique du groupement R détermine les propriétés et la réactivité du substrat fonctionnalisé. Ces composés sont utilisés pour modifier la nature chimique de la surface (changement d'hydrophobicité) et/ou en vue d'un greffage ultérieur avec d'autres molécules (ADN, peptides, etc.) [Sonawane and Nimse, 2016].

Afin de résoudre les difficultés rencontrées dans la microfabrication, nous avons procédé à des étapes de silanisation de nos différentes surfaces afin d'augmenter l'adhésion de la résine au *wafers* de silicium, d'une part, et d'autre part, de réduire les interactions entre le PDMS et la résine. La structure des silanes employés est reportée sur la figure 7.14.

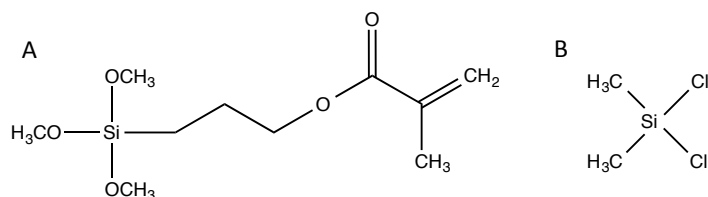


FIGURE 7.14 – Formules semi-développées des organosilanes employés. A : 3-(triméthoxysilyl)propyl méthacrylate (TMSPM) et B : dichlorodiméthylsilane (DMDCS).

Principe des silanisations employées

Amélioration de l'adhésion résine-substrat

Une première étape de traitement du substrat (*wafer* de silicium) a été envisagée afin d'améliorer l'adhésion de la résine sur celui-ci. Pour cela, nous avons exploité les propriétés du 3-(triméthoxysilyl)propyl méthacrylate (TMSPM, structure A, figure 7.14). Ce composé tri-fonctionnalisé est très réactif et pourra, lors d'une première étape, se lier de façon covalente au substrat en silicium par l'hydrolyse de ses groupements méthoxy (réaction 1, figure 7.15). Dans une seconde étape, la fonction méthacrylate, exposée en surface sur le *wafer*, est activée sous rayonnement UV pour réagir avec la résine photosensible (réaction 2, figure 7.15). Une liaison covalente s'établit alors entre le silane et la résine. Le caractère covalent de la liaison confère une grande résistance de la surface à de nombreuses conditions (solvants, hautes températures, etc.) et prévient le décollement de la résine sur le substrat lors de l'étape de démoulage du PDMS.

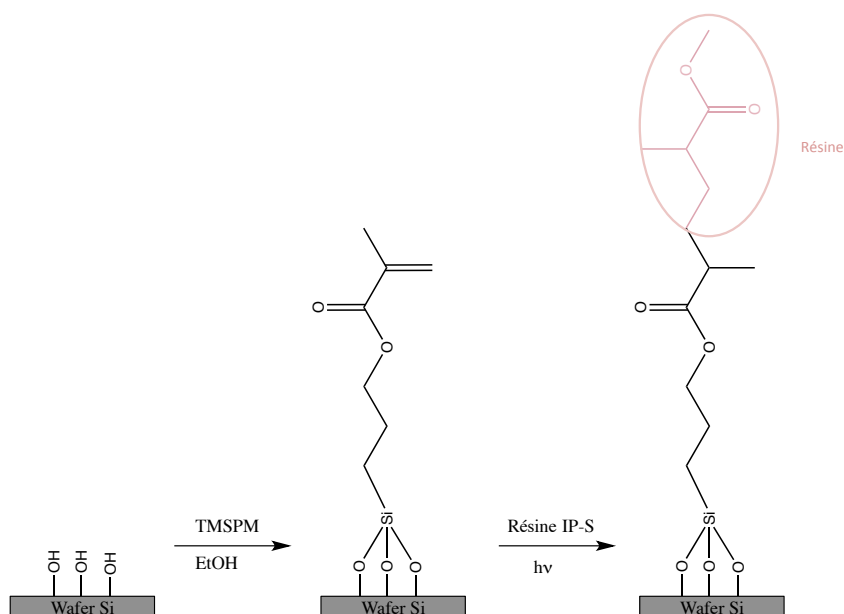


FIGURE 7.15 – Étapes de fonctionnalisation du wafer de silicium par le 3-(triméthoxysilyl)propyl méthacrylate

Fonctionnalisation de la résine

L'interaction de la résine avec le PDMS peut être évitée en augmentant l'hydrophobicité de la résine. La réaction chimique entre un groupement silanol (Si-OH) de la résine, après activation au plasma d'oxygène, et le dichlorodiméthylsilane (DMDCS, structure B, figure 7.14), conduit à la création d'une liaison covalente (Si-O-R) et à la formation d'une monocouche moléculaire à la surface de la résine (figure 7.16). Cette monocouche présente deux groupements méthyles en surface qui augmentent alors l'hydrophobicité de la résine et limitent les interactions avec le PDMS.

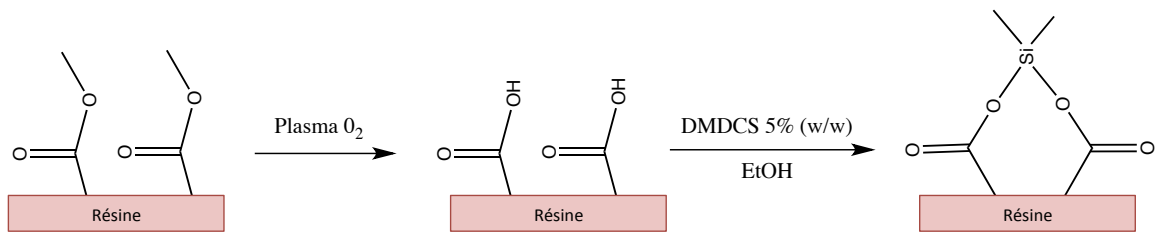


FIGURE 7.16 – Étapes de fonctionnalisation de la résine par le dichlorodiméthylsilane (DMDCS).

Méthode expérimentale

Les procédures sont détaillées dans le matériels et méthodes (section A.4.3) et décrites brièvement ici. La fonctionnalisation du *wafer* a lieu après son nettoyage à l'isopropanol et/ou par un bain piranha ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$). Il est immergé dans une solution de TMSPM dans l'éthanol, puis rincé et séché. La fonctionnalisation de la résine préalablement réticulée est effectuée par activation au plasma d'oxygène avant d'être immergée dans une solution de DMDCS à 5% en masse dans l'éthanol puis rincée et séchée.

Analyse par mesure d'angle de contact

Les traitements effectués visant à modifier les propriétés des différentes surfaces, une caractérisation par mesure d'angle de contact statique a été mise en place pour contrôler leur hydrophobie et ainsi s'assurer de l'efficacité des traitements. En effet, le mouillage de gouttes posées sur un substrat solide peut être estimé grâce à la mesure d'angle de contact entre le liquide et le solide (figure 7.17). Les angles de contact des différents substrats avant et après traitements ont donc été mesurés.

Résultats

La mesure d'angle de contact entre une goutte d'eau et le *wafer* avant silanisation a été réalisée sur un *wafer* soumis à un bain piranha et sur un *wafer* uniquement rincé à l'isopropanol. Le *wafer* non soumis au bain piranha présente un angle de contact avec une goutte d'eau de $76 \pm 1^\circ$ avant silanisation et de $71 \pm 5^\circ$ après silanisation. La silanisation sur un tel

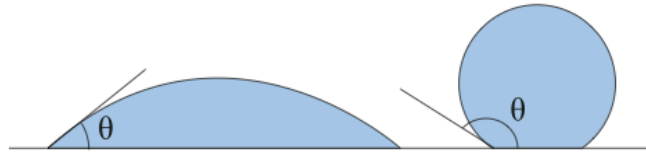


FIGURE 7.17 – Schéma représentant l'angle de contact formé entre une goutte d'un liquide et une surface solide pour un substrat hydrophile (à gauche) et un substrat hydrophobe (à droite).

substrat est donc inefficace. En revanche, le wafer préalablement nettoyé par un bain piranha présente un angle de contact avec une goutte d'eau de $18 \pm 5^\circ$ avant silanisation et de $55 \pm 5^\circ$ après silanisation (table 7.6). Ainsi, l'hydrophobie du substrat augmente après silanisation et témoigne de son efficacité. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature [Biggs et al., 2016]. L'absence d'efficacité de la silanisation sur un substrat non soumis à un bain piranha s'explique par le fait que le *wafer* puisse être contaminé par le dépôt de molécules organiques présentes dans l'air au cours de son stockage. Les groupements hydroxy du wafer sont alors masqués et non disponibles pour la réaction avec le silane.

	Avant silanisation		Après silanisation	
	Sans piranha	Avec piranha	Sans piranha	Avec piranha
Wafer	$76 \pm 1^\circ$	$18 \pm 5^\circ$	$71 \pm 5^\circ$	$55 \pm 5^\circ$
Résine	$68 \pm 2^\circ$		$100 \pm 5^\circ$	

TABLE 7.6 – Valeurs des angles de contact solide/liquide mesurés sur les différentes surfaces, avant et après silanisation.

Avant silanisation, la résine polymérisée présente un angle de contact avec une goutte d'eau de $68 \pm 2^\circ$. Après activation au plasma d'oxygène et silanisation, cet angle passe à $100 \pm 5^\circ$ (table 7.6). La résine silanisée est donc davantage hydrophobe. Les interactions avec le PDMS doivent donc être réduites.

Ces procédures ont donc été appliquées lors de la fabrication du moule suivant afin de s'assurer de leur efficacité sur nos structures. Nous avons également élargi les structures formant le piège afin de favoriser leur maintien et d'éviter qu'elles ne s'écroulent sur elles-mêmes. Ces structures ont été caractérisées par microscopie électronique à balayage. Des images de puces en PDMS sont présentées sur la figure 7.18. On y observe que les plots centraux et latéraux des pièges ne sont pas altérés par l'étape de démoulage du PDMS. De plus, le PDMS se décolle très facilement de la résine et celle-ci reste en place sur le wafer. Les traitements de surface mis en place sont donc efficaces sur la qualité de ces structures.

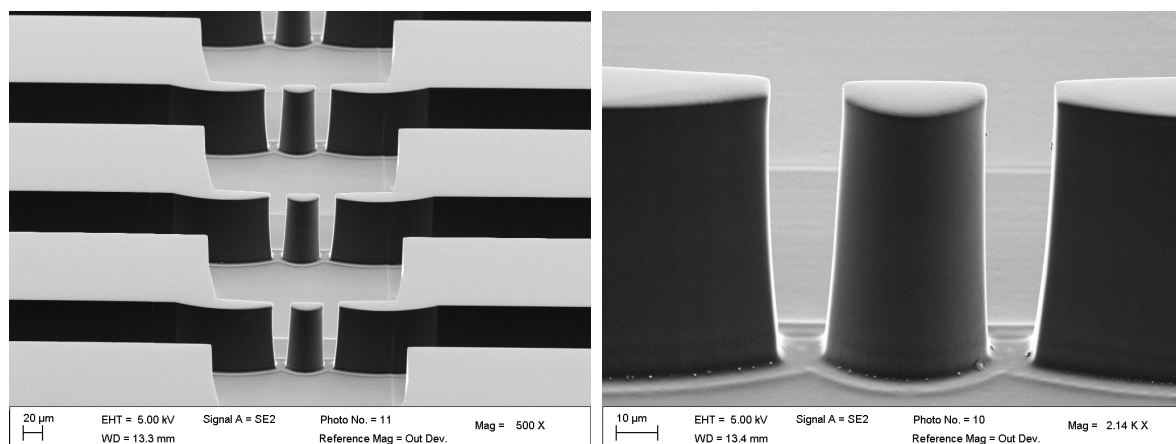


FIGURE 7.18 – Clichés icroscopie électronique à balayage de puces en PDMS dont le procédé de microfabrication par écriture directe inclus les étapes de traitements de surface décrites ci-dessus.

7.3.3 Discussion

Les puces microfluidiques ne présentant pas de défauts de fabrication ont donc été testées. La surpression imposée est de 1,3 mbar. Cette surpression est donc inférieure à la pression de Laplace requise pour éjecter une goutte de son piège ($\Delta P_L = 1,68$ mbar). Les gouttes sont piégées mais rapidement éjectées des pièges.

Bien que les surpressions autorisées afin de ne pas déformer et éjecter les gouttes de leur pièges soient faibles, il est étonnant de ne pas les maintenir davantage au sein des pièges. Le développement de surpressions locales dues à la présence de gouttes dans le canal de contournement pourrait expliquer ce comportement. Il serait alors intéressant d'évaluer plus en détail les surpressions exercées au sein de la puce. D'autre part, la fabrication et l'observation *in-situ* de gouttes est complexe. Les surpressions imposées doivent être suffisantes pour permettre la génération des gouttelettes mais doivent à la fois ne pas être supérieures aux pressions de Laplace au niveau des pièges. Il serait alors intéressant de décomposer notre système en deux. Nous pourrions avoir recours à une première puce pour générer les gouttes, les extraire et les rediriger vers un deuxième système comprenant les pièges. Les surpressions imposées pourraient alors être plus faibles au niveau des pièges.

7.4 Conclusion et perspectives

En conclusion, nous avons vu que la génération et le piégeage simultané de gouttes est un processus complexe. Nous avons adapté le système présenté par Nguyen *et al.* et soulevé les contraintes liées à un tel dispositif. L'évaluation de son dimensionnement nous a amenés à revoir notre procédé de microfabrication et des améliorations de celui-ci ont pu être validées. Bien que le principe du piégeage hydrodynamique direct convienne à notre problématique

et soit efficace dans notre système, nous ne parvenons pas à l'heure actuelle à maintenir les gouttes dans les pièges au-delà de cinq minutes. Des améliorations doivent donc être envisagées. L'évaluation des pressions en tout point de la puce pourrait nous permettre de comprendre les phénomènes observés. Pour cela, nous pourrions calculer les pressions en différents points de la puce grâce à l'analyse des vitesses locales de gouttes.

Une fois un tel système finalisé, nous envisageons d'intégrer des électrodes au dispositif. Nous pourrions, de la sorte, réaliser les mesures électriques et observer simultanément la translocation du peptide fluorescent à travers les bicouches. Cela conduira à l'obtention d'une plateforme performante pour le criblage de conditions expérimentales pour l'étude de la translocation des peptides vecteurs.

Conclusion générale

Ce travail de thèse a consisté en une étude de la translocation du peptide vecteur Pénétatine sur membranes modèles. Pour cela, nous nous sommes intéressés au rôle des lipides après liaison du peptide à la membrane et notamment sur l'implication du feuillet distal dans le processus de translocation. L'implication du potentiel en tant que force déstabilisante de la membrane a été évaluée par simulations numériques et mesures électriques sur bicouches. Nous nous sommes également attelés au développement d'un dispositif microfluidique pour la formation et le piégeage *in-situ* des émulsions inverses sous forme de paires.

Importance de la nature des partenaires membranaires

Le recrutement du peptide est une condition nécessaire mais non suffisante

L'étude de la translocation sur bicouches formées à l'interface de goutte a permis de mettre en exergue la distinction entre le recrutement du peptide à la surface de la membrane et sa translocation. Les interactions électrostatiques établies entre les lipides anioniques et le peptide sont essentielles à la translocation. Cependant, les expériences en présence de lipides anioniques à tête sérine ont montré que cette étape de recrutement n'est pas suffisante pour induire la traversée du peptide. Celle-ci a été observée uniquement en présence de lipides anioniques à tête glycérol sur le feuillet proximal.

Ces observations nous ont amenés à faire l'hypothèse que le peptide subisse un enfouissement différent selon la nature de la tête polaire. En effet, des interactions électrostatiques supplémentaires peuvent éventuellement s'établir entre le peptide et les têtes polaires sérines. Une hypothèse serait que ces interactions retiennent le peptide en surface, restreignent son insertion dans la bicouche et préviennent ainsi son internalisation. L'hypothèse inverse pour laquelle ces interactions n'entraveraient pas l'insertion du peptide mais le retiendraient dans la bicouche et empêcheraient sa translocation est également envisageable. Des simulations par modélisation moléculaire « gros grain » par champ de force MARTINI sont actuellement en cours afin d'évaluer l'insertion du peptide dans des bicouches de différentes natures. D'autres hypothèses que l'enfouissement du peptide dans la bicouche sont également envisageables comme par exemple, une plus grande propension de certains lipides à être déstabilisés ou à se lier au peptide pour l'entraîner vers l'intérieur de la bicouche.

Le feuillet distal est impliqué dans la translocation

Nous avons soulevé l'importance de l'asymétrie lipidique dans les processus membranaires et le peu d'études de peptides vecteurs prenant en compte cette spécificité de la membrane. Nous avons donc réalisé des expériences de translocation sur des bicouches asymétriques. Celles-ci ont révélé l'implication du feuillet distal dans la translocation de la Pénétratine. En l'absence de lipides anioniques sur ce feuillet, la translocation du peptide n'a pas lieu.

La translocation résulte d'un évènement coopératif et stochastique

Les cinétiques de translocation présentent un plateau après quelques dizaines de minutes d'expérience qui ne correspond pas à l'égalité de concentration en peptide de part et d'autre de la bicouche. De plus, la translocation du peptide n'est pas observée lorsque la concentration en peptide est réduite de $5 \mu M$ à $2 \mu M$. Ces deux observations témoignent d'un caractère coopératif de la translocation. Les peptides semblent agir collectivement à la déstabilisation de la membrane. Les expériences en présence de faibles proportions de lipides anioniques confirment ces observations. Nous avons vu que la translocation de la Pénétratine sur bicouches à l'interface de gouttes requiert un minimum de lipides anioniques pour concentrer suffisamment de peptides sur la membrane pour la déstabiliser. L'effet stochastique rapporté lors de nos expériences indique également un phénomène coopératif. En effet, la stabilisation d'une structure de perméation peut nécessiter un nombre minimum de peptides à proximité de ce site. Dans le cas inverse, la structure se referme et la translocation est inhibée.

Implications sur le mécanisme de translocation

Ces observations nous amènent à penser la translocation comme un processus en trois étapes : (i) diffusion du peptide vers le feuillet proximal et adsorption (ii) déstabilisation de la membrane (iii) traversée du peptide et passage sur le feuillet distal.

La diffusion du peptide vers la membrane est conduite par les interactions électrostatiques entre les charges positives du peptide et les charges négatives présentes à la surface de la membrane plasmique (sulfates, carboxylates, phosphates). L'insertion du peptide dans la bicouche de phospholipides est facilitée par la présence de résidus tryptophanes et dictée par les interactions électrostatiques établies avec les lipides.

La deuxième étape, la formation d'une structure de perméation, est la plus incertaine. La profondeur d'insertion du peptide et son effet déstabilisant sur la bicouche pourraient être des critères importants pour la formation de ces structures. La ré-organisation des lipides subséquente à la liaison du peptide est à l'origine de la structure de perméation. Le potentiel de membrane semble un élément important mais son implication reste mal comprise. Il apparaît comme un facteur mais pas nécessairement comme force motrice exclusive d'un tel phénomène.

Enfin, la traversée de la bicouche par le peptide et son passage sur le feuillet distal constituent la troisième et dernière étape de ce mécanisme. La traversée peut avoir lieu

dans le sens du potentiel ou par diffusion simple. S'ensuit alors la fermeture de la structure de perméation. Le peptide peut ensuite diffuser à la surface de la bicouche ou passer dans la phase aqueuse. Certaines compositions lipidiques pourraient également permettre la re-traversée du peptide en sens inverse.

Déstabilisation de la membrane

La déstabilisation de la membrane nécessite la ré-organisation des phospholipides à proximité du peptide. Les structures transitoires de perméation induites peuvent revêtir différentes formes, telles que des micelles inverses, des pores, ou des paires d'ions. La formation de telles structures requiert une source d'énergie. À ce titre, le potentiel de membrane a été présumé impliqué dans la diminution de la barrière énergétique d'entrée d'un peptide dans le coeur hydrophobe de la bicouche. Nous avons donc souhaité évaluer la contribution du peptide au potentiel de membrane. Nos simulations numériques, réalisées dans l'hypothèse d'une répartition uniforme du peptide sur la membrane, décrivent une différence de potentiel de 46 mV (en présence de cations divalents) et de 65 mV (en l'absence de cations divalents) aux abords d'une membrane recouverte de Pénétratine. Ces valeurs apparaissent trop faibles pour induire une déstabilisation suffisante de la bicouche. Cependant, nous avons vu que la translocation revet un caractère coopératif et il est alors aisé de supposer que la répartition du peptide n'est pas uniforme sur la bicouche et que sa répartition locale sous forme de zones enrichies induit des potentiels plus importants. Une meilleure connaissance de la répartition du peptide nous mènerait alors à une estimation plus réaliste du potentiel induit.

Vers une étude performante

Nous avons pu voir au cours de ces travaux que les expériences sur bicouches formées à l'interface de gouttes présentent un certain nombre d'avantages pour l'étude de la translocation des peptides de pénétration cellulaire sur membranes modèles (asymétrie lipidique, composition variée, suivi électrique, stabilité, etc.). Cependant, ces études sont longues et fastidieuses en raison de l'observation à l'échelle de la bicouche unique. Dans de rares expériences, la méthode manuelle permet le suivi de plusieurs paires de gouttes à la fois. Cependant, les mesures électriques se cantonnent à une seule expérience par manipulation. Ces méthodes sont donc couteuses en temps. De plus, nous avons vu que certaines compositions lipidiques présentent une faible stabilité en raison d'une cinétique lente de formation des monocouches de phospholipides. Pour toutes ces raisons, la microfluidique apparaît comme une technique pertinente pour la formation et l'observations de ces bicouches. Un tel outil permet notamment la parallélisation des expériences et donc un gain de temps considérable et la possibilité de réaliser une étude statistique sur un plus grand nombre d'expériences.

Cet outil devrait également être compatible avec la réalisation de mesures électriques sur bicouches par l'intégration de microélectrodes. Ainsi, le suivi de la translocation par microscopie de fluorescence pourra être corrélé avec les différentes mesures électriques réalisées

par la manipulation des gouttes sur micropipettes (mesure de la capacité, mesure du potentiel, application du potentiel, mesure du courant et de la conductance).

La plateforme microfluidique développée au cours de cette thèse nécessite des optimisations avant d'être efficace et d'envisager l'introduction d'électrodes. Elle sera alors un atout majeur pour l'étude de la translocation des peptides vecteurs.

Matériels et méthodes

A.1 Matériels et méthodes générales

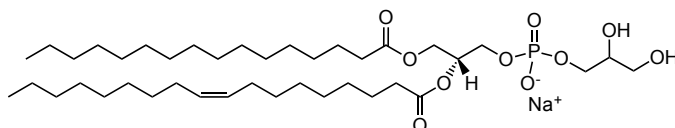
A.1.1 Matériels

Le squalène ((E) 2,6,10,15,19,23-Hexaméthyl-2,6,10,14,18,22-tétracosahexène) et le magnésium proviennent de chez Sigma Aldrich, le chloroforme de chez Carlot Erba et le PBS de chez Merck. Le polydimethylsiloxane (PDMS) Sylgard 184 provient de chez Dow Corning. Le dichlorodiméthylsilane (CAS 75-78-5) et le 3-(Triméthoxysilyl)propyl méthacrylate (CAS 2530-85-0) proviennent de chez Sigma-Aldrich.

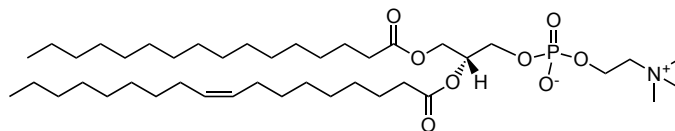
Lipides

Les phospholipides sous forme de poudre ou en solution dans le chloroforme proviennent de chez Avanti Polar Lipids et sont stockés à -20°C. Les solutions stocks sont préparées dans le chloroforme à une concentration de 25 mg/mL.

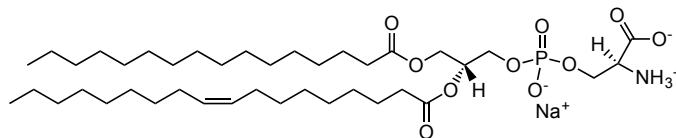
1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt) (POPG)



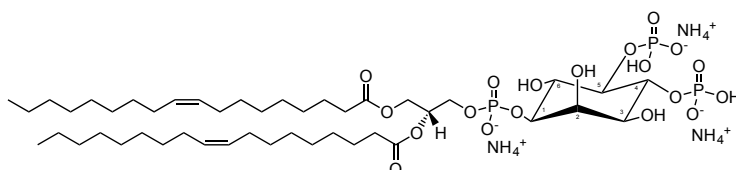
1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-phosphocholine (POPC)



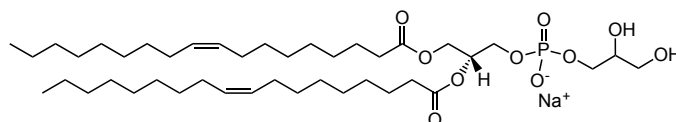
1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (sodium salt) (POPS)



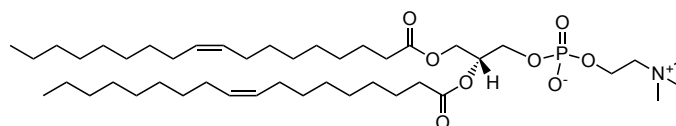
1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-myo-inositol-4',5'-bisphosphate) (ammonium salt) (PI(4,5)P2)



1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt) (DOPG)



1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (sodium salt) (DOPC)



Peptides et sondes fluorescentes

La pénétratine (RQIKIWFQNRRMKWKK) marquée par le fluorophore Alexa 488 à l'aide d'un lien maléimide sur une cystéine ajoutée en N-terminale du peptide provient de chez Polypeptide. Le peptide RL9 (RLLRRLRR) a été synthétisé au laboratoire, par Astrid Walrant, en stratégie Fmoc puis marqué à l'aide du fluorophore Alexa 488 par liaison maléimide réalisée entre une cystéine ajoutée en N-terminal du peptide et le fluorophore Alexa 488 (Life Technologies). Le peptide marqué est purifié par chromatographie en phase inverse et sa structure caractérisée par spectrométrie de masse. La Pénétratine non marquée utilisée pour les expériences de mesures électriques a été synthétisée et purifiée par Christophe Piesse sur la plateforme de synthèse peptidique de l'Institut de Biologie Paris Seine (Sorbonne Université).

A.1.2 Microscopie optique et épifluorescence

L'observation des gouttes s'effectue à l'aide d'un microscope inversé Olympus IX71 à l'aide d'objectifs 10x ou 20x. Les images de gouttes formées manuellement ou par microfluidique sont obtenues à l'aide d'une caméra MicroMax (Princeton Instrument). Les images d'épifluorescence sont réalisées à l'aide d'une lampe à vapeur de mercure et d'un filtre XF18-2 (Omega) centré à 494 nm pour l'émission et à 518 nm pour l'excitation pour le fluorophore Alexa 488. Les images de gouttes réalisées à l'aide des micropipettes sont acquises grâce à une camera IDS monté sur un microscope inversé Olympus IX71 muni d'un objectif x20.

A.1.3 Préparation des bicouches à l'interface de gouttes

Les émulsions inverses sont préparées à partir d'une phase aqueuse composée d'un tampon phosphate salin (150 mM NaCl, 40 mM phosphate à pH 7,4) supplémenté de 10 mM de chlorure de magnésium. Afin de préserver l'équilibre osmotique entre les gouttes d'émulsion, les peptides utilisés sont dilués dans cette phase aqueuse afin d'obtenir la concentration désirée de peptide. L'émulsification se fait dans une phase continue constituée d'une huile squalène dans laquelle les lipides sont ajoutés à 0,08% en masse (à partir de la solution stock à 25 mg/mL dans le chloroforme). Du chloroforme est ajouté à 15% en masse par rapport au squalène. Pour exemple, pour une préparation réalisée à partir de 200 μL de squalène (soit 171 mg), 5,5 μL de lipides à 25 mg/mL dans le chloroforme (soit 136 μg) sont ajoutés ainsi que de 30 μL de chloroforme. L'émulsification est obtenue par dispersion de la phase aqueuse (10% en volume total de préparation) dans la phase continue en agitant manuellement ou à l'aide d'un vortex, le tube eppendorf contenant le mélange. Les gouttelettes sont alors déposées sur une lame de verre recouverte d'une fine couche de PDMS afin d'éviter leur étalement sur le support. Les deux populations de gouttes, une population ne contenant que du tampon et la seconde contenant le peptide dans le tampon, sont ainsi déposées successivement l'une sur l'autre afin de former des paires par rencontre aléatoire des gouttelettes (figure A.1).

Les bicouches asymétriques sont obtenues selon la même procédure. Cependant, une phase huile est préparée pour chaque composition lipidique. Les émulsions sont réalisées dans la phase huile correspondante et les deux populations de gouttes sont déposées l'une sur l'autre afin de former des paires de gouttes (figure A.1).

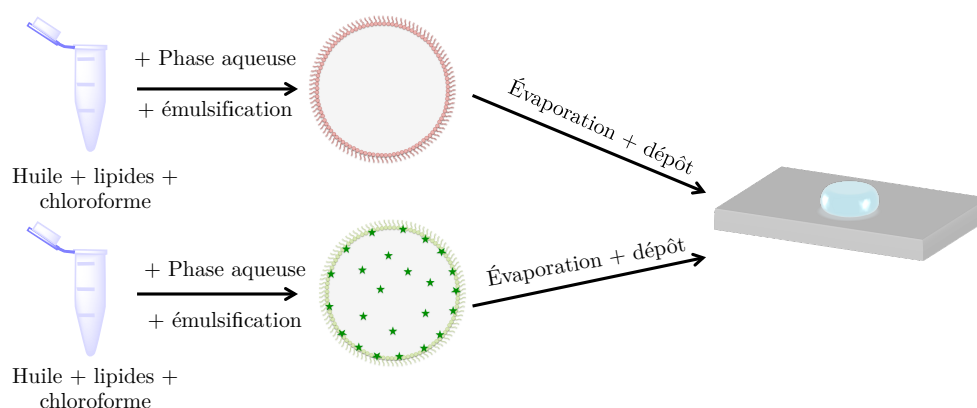


FIGURE A.1 – Protocole de formation et de dépôt des émulsions.

A.1.4 Quantification de la translocation

Les images obtenues sont traitées à l'aide du logiciel ImageJ afin de mesurer les diamètres des gouttelettes et les intensités de fluorescence correspondantes. Cette dernière est mesurée au centre des gouttelettes et la fluorescence du fond est soustraite lorsque cela est nécessaire. Les intensités de fluorescence des deux gouttes issues de la paire sont mesurées au cours du temps sur 30 minutes. Les intensités de fluorescence de la goutte contenant initialement le peptide (goutte *cis*) et de la goutte ne contenant initialement pas de peptide (goutte *trans*) sont comparées à l'aide du ratio I_{trans}/I_{cis} après 30 minutes d'expérience. Le photoblanchiment est négligeable car nous considérons le rapport de fluorescence des deux gouttes soumises au photoblanchiment dans les mêmes proportions.

Les différentes conditions (une condition équivaut à un couple peptide-fluorescent/ composition lipidique) par un test de Mann-Whitney. Ainsi, les médianes des deux échantillons sont comparées et la *p-value* associée (pour un indice de confiance de 95 %) permet de discriminer si les deux groupes de données sont issus d'une même population (c'est-à-dire si elles ont le même comportement). Lorsque cette *p-value* est supérieure à 0,05 les deux groupes de données ne sont pas significativement distinguables.

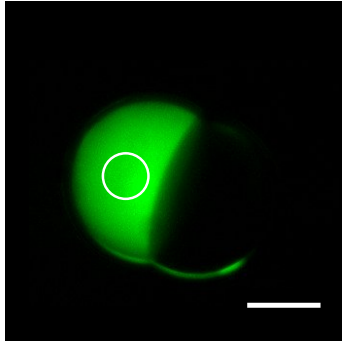
A.2 Estimation du potentiel de membrane

A.2.1 Taux de recouvrement de la membrane

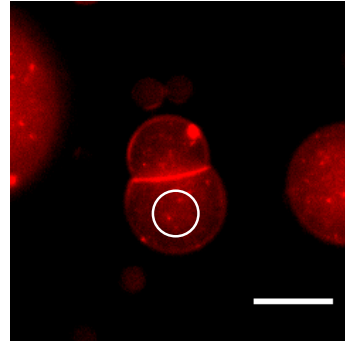
Le taux de recouvrement de la surface de gouttes par la Pénétratine introduite à $5 \mu M$ est estimé dans une première approche par l'analyse de fluorescence de gouttes en présence du peptide (marqué par la sonde Alexa-488) par comparaison à la fluorescence de gouttes comprenant une fraction connue de lipides fluorescents (sonde Rhodamine). La méthode d'étalonnage de la fluorescence afin d'être en mesure de comparer les deux sondes fluorescentes est présentée ici.

Étalonnage de la fluorescence

Afin d'étalonner la fluorescence observée sur les bords de gouttes couvertes de Pénétratine, nous avons réalisé des gouttes par la méthode « lipid-in » à partir d'un mélange de lipides POPG non marqués et marqués par la sonde fluorescente Rhodamine. Les lipides sont introduits dans la phase aqueuse sous forme de vésicules multilamellaires qui s'étalent sur les interfaces eau/huile pour former des monocouches de phospholipides. Les lipides sont introduits à une concentration de $200 \mu M$ dont 2% marqués en fluorescence. La concentration en lipides fluorescents est ensuite déduite à partir de la taille des gouttes ($C_{Rhodamine}$).



(a) Goutte Pen-A488 (POPC)



(b) Goutte Rhodamine (POPG)

FIGURE A.2 – Mesure des intensités de fluorescence en volume. (a) pour une goutte composée de Pen-A488 (I_{Alexa}) de concentration C_{Alexa} et (b) pour une goutte composée de Rhodamine ($I_{Rhodamine}$) de concentration $C_{Rhodamine}$. Le cercle indique la zone où la fluorescence est mesurée. La barre d'échelle représente $20 \mu m$.

Afin d'obtenir l'intensité de fluorescence (i_{Alexa}) correspondant à une goutte contenant une concentration connue de Pénétratine-A488, la fluorescence de gouttes de POPC contenant la Pénétratine ($C_{Alexa} = 5 \mu M$) est mesurée (figure A.2.a). Dans ce cas, la fluorescence obtenue correspond bien à la fluorescence du peptide marqué à concentration connue car il se répartit de façon homogène dans les gouttes composées de POPC pour laquelle il n'a pas d'affinité. Un facteur de normalisation est alors calculé à partir de ces concentrations et fluorescences connues (c'est-à-dire présentes en volume) (figure A.2.a et b.) afin de normaliser la fluorescence de l'Alexa-488 (i_{Alexa}) par rapport à la fluorescence de la sonde Rhodamine ($i_{Rhodamine}$) :

$$i_{Alexa} = i_{Rhodamine} \times \frac{C_{Rhodamine}}{C_{Alexa}} \times \frac{I_{Alexa}}{I_{Rhodamine}}$$

$$\text{Soit : } i_{Alexa} = 0,19 i_{Rhodamine}$$

avec i_{Alexa} et $i_{Rhodamine}$ les intensités de fluorescence par molécule d'Alexa et de Rhodamine respectivement, $C_{Rhodamine}$ la concentration en lipides marqués par la Rhodamine, C_{Alexa} la concentration en peptides marqués à l'Alexa-A88, et $I_{Rhodamine}$ et I_{Alexa} les intensités de fluorescence de l'Alexa et de la Rhodamine mesurées en volume de gouttes (figure A.2.a et b.).

Normalisation de la fluorescence de l'Alexa-488

L'intensité de fluorescence de monocouches (ou de bicouches, auquel cas la fluorescence est divisée par deux) recouvertes de Pénétratine-A488 est mesurée pour différentes expériences (figure A.2.a). Cette intensité de fluorescence est normalisée ($I_{Alexa \text{ normalisée}}$) pour être comparée à l'intensité de la Rhodamine grâce au facteur de normalisation $i_{Alexa} = 0,19 i_{Rhodamine}$ obtenu à partir de l'équation A.2.1.

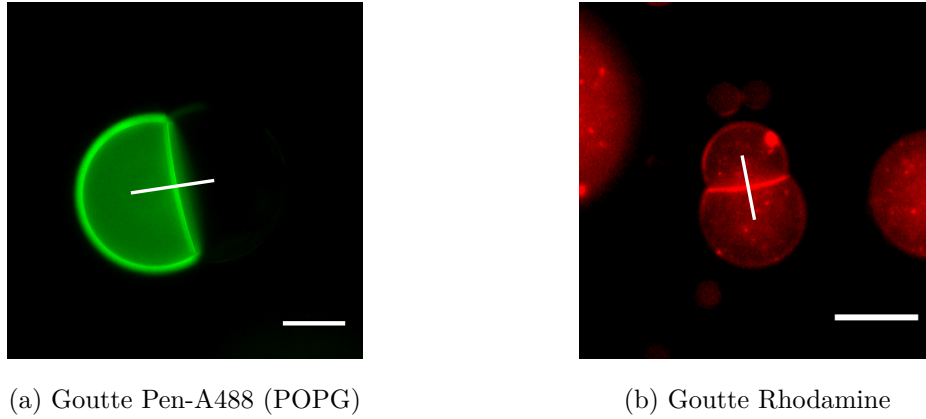


FIGURE A.3 – Mesure des intensités de fluorescence au niveau des bicouches (à l'intersection avec la ligne blanche). (a) pour une goutte composée de Pen-A488 (I_{Alexa}) et (b) pour une goutte composée de Rhodamine ($I_{Rhodamine}$). Dans ce cas, la fluorescence mesurée au niveau de la bicouche est divisée par deux. Elle peut aussi être mesurée au niveau des monocouches. La barre d'échelle représente $20 \mu m$.

L'intensité de fluorescence de monocouches ou de bicouches de gouttes formées à partir de lipides fluorescents est ensuite mesurée ($I_{Rhodamine}$) (figure A.3.b). On en déduit le ratio α :

$$\alpha = \frac{I_{Rhodamine}}{I_{Alexa \text{ normalisée}}} = 0,44$$

La quantité de lipides fluorescents par unité de surface (d_{lip}) est calculée à partir du pourcentage de lipides fluorescents choisi initialement à 2% :

$$d_{lip} = \frac{0,02}{S_{lip}}$$

avec S_{lip} la surface d'un lipide, estimée à $0,7 \text{ nm}^2$. On en déduit alors la densité de peptide marqué par unité de surface d_{pen} :

$$d_{pen} = \frac{d_{lip}}{\alpha}$$

Le taux de recouvrement correspond alors à la densité de Pénétratine marquée d_{pen} multipliée par la surface d'une Pénétratine. Celle-ci est estimée à $3,7 \text{ nm}^2$ lorsqu'elle est repliée en hélice alpha.

A.2.2 Simulation numérique du potentiel induit par la Pénétratine

Cette modélisation repose sur l'utilisation de l'équation de Poisson-Boltzmann pour un système composé d'une surface chargée (par la présence de la Pénétratine) et d'électrolytes en solution. La couche de Pénétratine est considérée comme infiniment fine et elle est confondue avec la surface extérieure de la membrane placée en $x=0^+$. Le schéma de ce modèle est représenté sur la figure A.4.

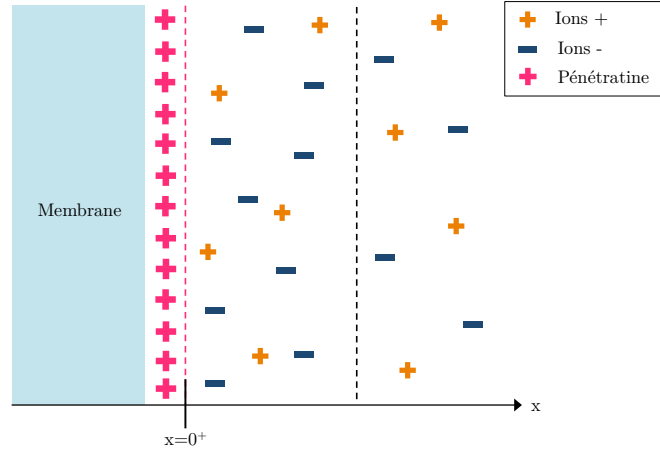


FIGURE A.4 – Schéma du modèle utilisé pour la modélisation du potentiel aux abords d'une membrane recouverte de Pénétratine. Seule la partie extérieur à la membrane est représentée. x représente la distance à la membrane.

L'équation de Poisson décrit le champ électrique créée ($\Delta\psi$) par les charges des électrolytes (A.5) :

$$\Delta\psi = -\frac{\rho}{\varepsilon_0\varepsilon_{H_2O}} \quad (\text{A.5})$$

avec ρ la densité de charge des ions, ε_0 la permittivité du vide et ε_{H_2O} le permittivité diélectrique relative de l'eau.

L'équation de Boltzmann (A.6) décrit quant à elle la répartition de n types d'ions de charge q_i , c'est-à-dire leur densité de charge $\rho(x)$:

$$\rho(x) = \sum_{i=1}^n q_i C_i \left(\exp \frac{-q_i \psi(x)}{k_B T} \right) \quad (\text{A.6})$$

valable lorsque $x \rightarrow \infty, \psi \rightarrow 0$, avec C_i la concentration d'électrolytes en solution (quand $x \rightarrow \infty$), $q_i = ze$ avec e la charge élémentaire électrique et z la charge de l'ion, k_B la constante de Boltzmann, et la température $T = 300K$.

L'équation de Poisson-Boltzmann s'obtient en rassemblant les équations (A.5) et (A.6) :

$$\Delta\psi = -\frac{\rho}{\varepsilon_0\varepsilon_{H_2O}} \sum_{i=1}^n q_i C_i \left(\exp \frac{-q_i\psi(x)}{k_B T} \right) \quad (\text{A.7})$$

En milieu aqueux, le potentiel et le champ électrique s'annulent à l'infini par électroneutralité de la solution au-delà de la distance d'écrantage. Il faut calculer les valeurs du potentiel et du champ électrique à la membrane comme condition limite de l'équation différentielle (A.7).

Le champ électrique en $x = 0^+$ (c'est-à-dire juste après la Pénétratine) peut être calculé grâce à l'équation de Maxwell-Gauss :

$$E(x = 0^+) = \frac{\sigma}{\varepsilon_0\varepsilon_{H_2O}} = X\% \frac{7e}{S\varepsilon_0\varepsilon_{H_2O}} = -\frac{d\psi}{dx}(x = 0^+) \quad (\text{A.8})$$

avec σ la densité surfacique de charge, S la surface d'un peptide et $X\%$ le taux de recouvrement de la membrane par le peptide.

La dérivée du potentiel électrique $d\psi/dx$ en $x = 0^+$ est calculée grâce à l'équation (A.8). La valeur du potentiel en $x = 0^+$ n'est pas connue et est déterminée en testant différentes valeurs et en conservant celle qui permet d'atteindre le comportement souhaité à l'infini, c'est-à-dire un potentiel qui tend vers 0. La recherche du potentiel est représentée sur la figure A.5 pour un système composé de PBS et MgCl_2 (10 mM) et un système composé de 100 mM de NaCl.

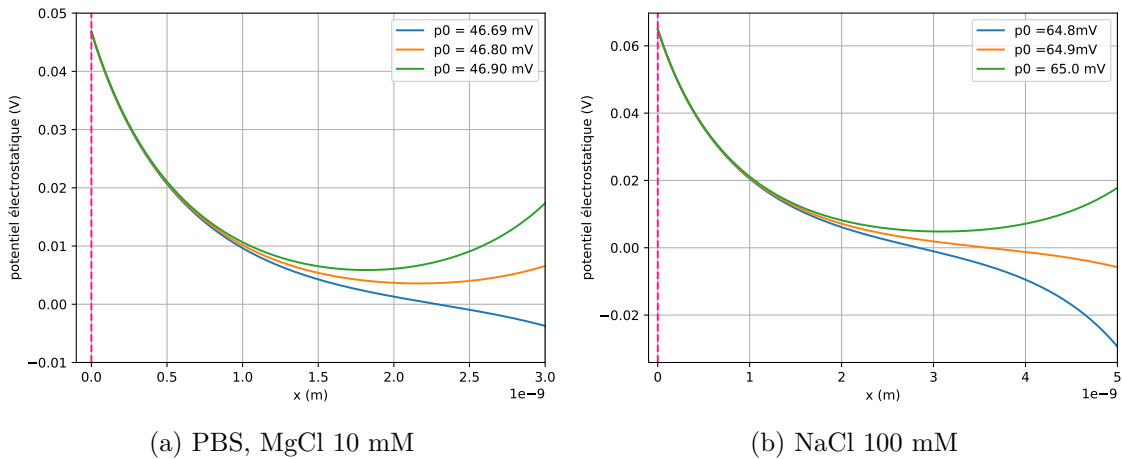


FIGURE A.5 – Recherche du potentiel électrique surfacique (à $x=0^+$) d'une membrane recouverte à 20% de Pénétratine pour deux systèmes de composition ionique distincte (a) et (b). Les échelles sont différentes entre les deux figures.

A.3 Mesures électriques sur bicouches à l'interface de gouttes

A.3.1 Mise en place de l'expérience

Dispositif expérimental et préparation de l'expérience

Les électrodes sont préparées à partir d'un fil d'argent trempé dans l'eau de javel durant quelques heures afin d'obtenir un revêtement Ag/AgCl. Elles sont insérées dans des micropipettes obtenues à partir de capillaires de borosilicate (Harvard Apparatus, diamètre externe : OD : 1mm, ID : 0.5mm et de longueur 10mm). Ces capillaires sont étirés à l'aide d'une étireuse P200 (Sutter Instrument) grâce aux paramètres suivants : Plaser : 450, Mode de balayage : 4, Vitesse d'étirement : 50, Délai : 200, Force : 25. Les pipettes obtenues possèdent des pointes d'environ $2 \mu\text{m}$ de diamètre. Avant chaque expérience, les pipettes sont remplies de phase aqueuse (electrolyte) et sont rendues hydrophobes afin d'éviter le mouillage des gouttes qui pourraient entraîner leur décrochement des pointes et empêcher la continuité électrique. Pour cela, les pointes de pipettes sont immergées pendant 7 minutes dans une solution de dimethyldichlorosilane à 10% dans l'éthanol. Cette étape est précédée et suivie d'un rinçage dans l'éthanol absolu par quelques aller-retour des pipettes dans la solution. Les pipettes sont maintenues et manipulées par des micromanipulateurs MP225 et MP285 (Sutter Instrument) et reliées à un amplificateur Axopatch 200B (Molecular Device) et à un système d'acquisition de données Digidata 1440A (Molecular Device). Une pipette est reliée à l'amplificateur et la seconde à la masse.

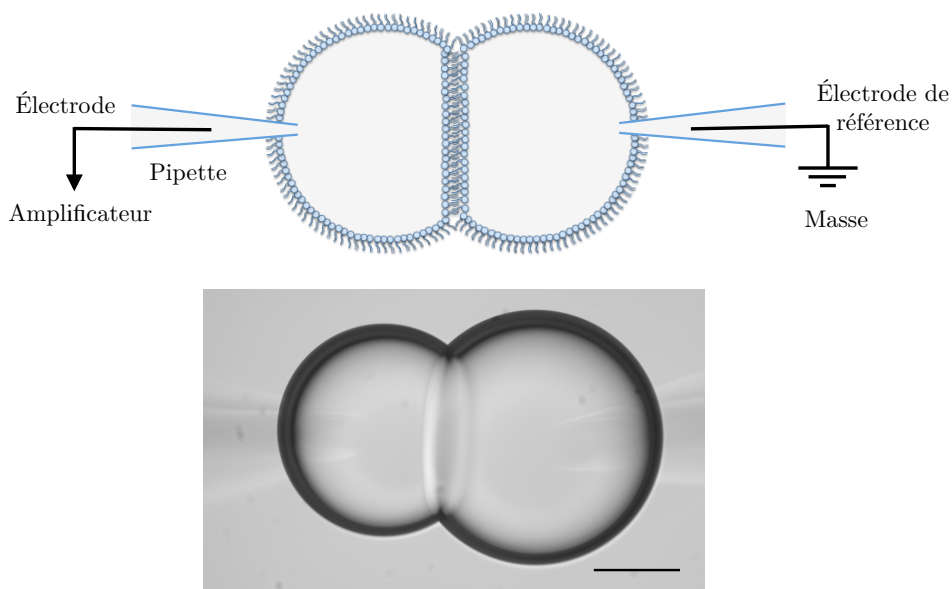


FIGURE A.6 – Schéma du dispositif expérimental : les gouttes sont gonflées dans l'huile à la pointe de pipettes contenant des électrodes et remplies de phase aqueuse. La barre d'échelle représente $100 \mu\text{m}$.

Formation des bicouches

Les pipettes traitées sont immergées dans la phase continue. Après avoir soufflé des gouttelettes à l'extrémité de chaque micropipette en exerçant une légère suppression, quelques minutes sont attendues pour permettre la formation d'une monocouche de phospholipides à l'interface eau-huile. Les deux gouttelettes sont ensuite mises en contact en déplaçant les micropipettes afin de permettre la formation de la bicouche à leur interface.

A.3.2 Caractérisation des bicouches

La caractérisation des bicouches est réalisée en mode *Voltage-clamp* c'est-à-dire en imposant une tension et en mesurant la réponse en courant. L'analyse des enregistrements électriques est réalisée à l'aide d'un programme écrit sur Python 3.7 et par l'utilisation du module pyABF¹

Mesure de la résistance des pipettes

La mesure des résistances des pipettes est nécessaire à la détermination de la capacité de la bicouche. Elle est réalisée en insérant les deux micropipettes dans la même goutte et en mesurant la réponse en courant obtenue lorsqu'elle est soumise à une marche de tension de 20 mV pendant 300 ms. La résistance est déduite de la différence de courant avant et après la marche de tension comme représenté sur la figure A.7. Elle est calculée à partir de :

$$\Delta I = \frac{\Delta U}{R_1 + R_2}$$

avec $\Delta U = 20 \text{ mV}$, la tension imposée et ΔI la réponse en courant mesurée. Les valeurs typiques de résistances de pipettes sont comprises entre 10 et 20 M Ω

Capacité et épaisseur des bicouches

Lorsque deux gouttes sont mises en contact, le courant transitoire observé est dû à la charge et à la décharge de la bicouche en réponse à une marche de tension de 20 mV. Ce courant prend la forme d'une exponentielle décroissante dont la modélisation permet de calculer le temps caractéristique τ . Un exemple typique d'enregistrement et de modélisation de la bicouche est représenté sur la figure A.8.

Le temps caractéristique τ issu de la modélisation de la décroissance permet de calculer la capacité C_b de la bicouche grâce à la relation : $\tau = (R_1 + R_2) \times C_b$. Afin de comparer les expériences entre elles, la capacité spécifique de la bicouche C_M est calculée à partir d'images des paires de gouttes et de la mesure de leur diamètre : $C_M = C_b/S$ avec S la surface de la bicouche. La surface de la bicouche est assimilée à un disque tel que $S = R_b^2$ avec R_b le rayon de la bicouche.

1. Harden, SW (2020). pyABF 2.2.3 [en ligne]. Disponible à : <https://pypi.org/project/pyabf/>

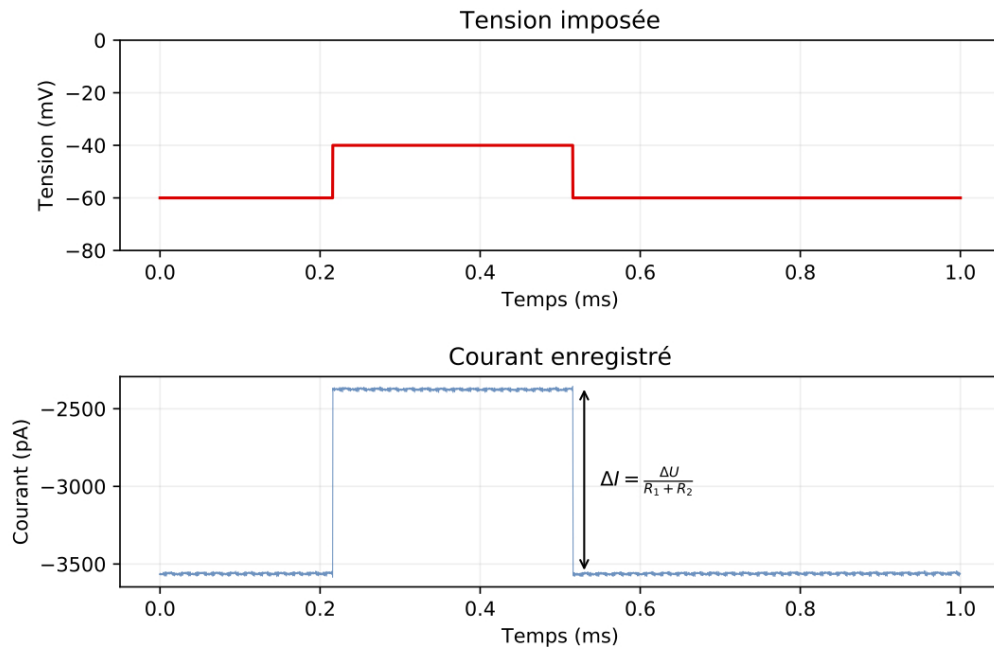


FIGURE A.7 – Réponse en courant à une tension imposée à 20 mV lorsque les deux pipettes sont insérées dans la même goutte.

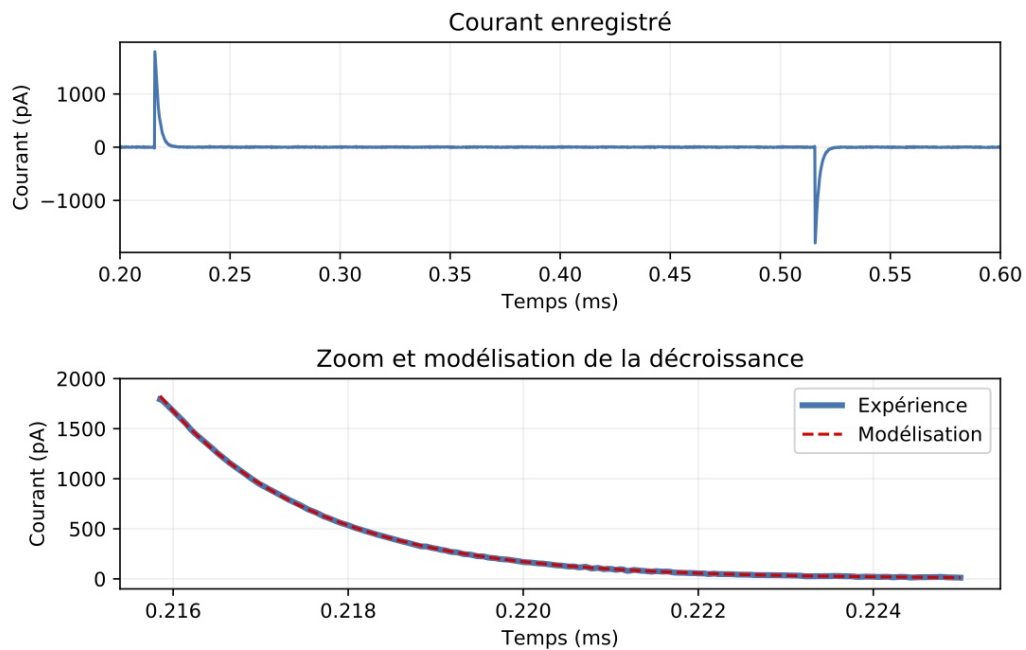


FIGURE A.8 – Réponse en courant de la bicouche lorsqu'elle est soumise à une marche de tension de 20 mV et ajustement de la décroissance par une exponentielle.

La bicouche étant considérée comme un matériau diélectrique, son épaisseur e est reliée à sa capacité spécifique C_M par l'expression :

$$C_M = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0}{e}$$

avec $\varepsilon_0 = 8,85 \cdot 10^{-12} F.m^{-1}$ la permittivité du vide et $\varepsilon_r = 2,8^2$ la constante diélectrique relative de la bicouche, c'est-à-dire des chaînes hydrophobes des lipides. L'épaisseur moyenne est alors déduite des enregistrements ayant permis de calculer la capacité de la bicouche.

Mesure du potentiel

La mesure du potentiel en présence de peptide est réalisée en mode *Current-clamp*. Pour cela, un courant égal à zéro est imposé et la réponse en tension est mesurée correspondant à la différence de potentiel présente entre l'électrode de mesure et l'électrode de référence (reliée à la masse). Le décalage entre l'amplificateur et les électrodes est compensé en effectuant une mesure de référence avant de réaliser les mesures sur bicouches. Pour cela, les deux pipettes sont insérées dans la même goutte et la compensation (*pipette offset*) est réglée de sorte à obtenir une tension de 0 mV.

Une pipette est remplie de la phase aqueuse (PBS, Mg^{2+} 10 mM) contenant la Pénétratine (5 μM) et elle est reliée à l'amplificateur. La seconde pipette est remplie uniquement de phase aqueuse et reliée à la masse.

A.4 Microfluidique

A.4.1 Conception

La fabrication du masque chrome-verre a été réalisée à l'Institut des NanoSciences de Paris (INSP) par Loïc Becerra par écriture laser UV (DWL 66FS Heidelberg) au chrome sur des masques de verre 3 pouces (CIPEC) à partir de motifs réalisés sur CleWin 5 (WieWeb Software). Pour l'écriture directe, les motifs sont conçus sur OpenSCAD et exportés au format stl.

A.4.2 Lithographie

La résine photosensible est déposée sur un wafer de silicium (7 pouces, épaisseur 700 μm). Ce wafer peut préalablement être soumis à un bain piranha et à une silanisation afin d'améliorer son adhésion avec la résine (voir ci-dessous).

Préparation du wafer

Afin de nettoyer le wafer de potentiels groupements organiques ayant pu s'y greffer, il est immergé dans un bain piranha composé d'un mélange d'acide sulfurique à 98% et de peroxyde

2. G. Valincius *et al.* *Biophysical Journal* (2008) 95(10) : 4845-4861

d'hydrogène à 30% à un ratio 3:1 (v/v). Après 20 minutes, le wafer est rincé dans un bain d'eau déionisée quelques minutes puis séché sous léger flux d'azote.

Préparation par enduction centrifuge

La préparation par enduction centrifuge d'un moule repose sur l'utilisation d'une résine liquide. Celle-ci est choisie en fonction de l'épaisseur désirée. Chaque référence de résine implique des conditions d'enduction centrifuge et d'insolation différentes. Ces informations sont fournies par le fabricant pour chaque type de résine. Dans notre cas, nous avons employé la résine SU-8 (MichroChem).

Dans un premier temps, le wafer est chauffé à 200°C afin d'éliminer les résidus d'eau. Une noisette de résine (2-4 mL) est déposée sur le wafer et l'enduction centrifuge est réalisée selon les paramètres fournis par le fabricant et/ou adaptés. Les paramètres utilisés dans nos expériences sont résumés table A.7. Le wafer ainsi recouvert de résine est ensuite soumis à une étape de recuit (*soft-bake*) à 65°C puis 95°C. L'insolation est réalisée à l'aide de l'UV-Kub2 (Kloé) à 365 nm. La dose d'exposition est choisie selon le type de résine et la durée d'exposition est calculée en fonction de la puissance de la lampe UV de l'appareil. Le masque est déposé sur le wafer et recouvert d'une plaque de quartz. La résine ainsi réticulée est ensuite soumise à un recuit (*post exposure bake*, PEB) à 65°C puis à 95°C durant lequel les motifs apparaissent clairement dans la résine. Le développement de la résine non polymérisée est réalisé en immergeant le wafer dans un bain développeur (Propylène glycol monométhyl éther acétate, PGMEA) sous agitation moyenne. Le moule est ensuite rincé à l'isopropanol et séché à l'air comprimé. Un dernier recuit (*hard-Bake*) est alors effectué à 200°C.

Préparation par laminage de film sec

Le film sec de résine SU-8 (SU-8 SU-8 DJDevCorp) est déposé sur le wafer en silicium puis étalé à l'aide d'un lamineur pré-chauffé à 65°C et suivi d'un recuit à 65°C. La résine ainsi déposée est ensuite soumise à insolation UV selon la même procédure que pour la résine liquide. Le moule est ensuite soumis à un recuit (PEB) à 65°C puis 85°C. La résine non exposée est éliminée par immersion dans un bain développeur (PGMEA) sous agitation moyenne. Le moule est ensuite nettoyé à l'isopropanol puis séché à l'air comprimé avant d'être soumis à un dernier recuit à 200°C. Les paramètres utilisés sont résumés table A.7. La dernière ligne correspond aux conditions optimales obtenues pour les moules réalisés avec des épaisseurs de 100 μm .

Résine	Dépôt (ét.2)	Soft-Bake	Dose UV (mJ/cm ²)	PEB	Développement (min)
100 μm SU-8 2050	1900 rpm, 300 rpm, 30s	5' 65°C 10' 95°C	215	2' 65°C 8' 95°C	7
100 μm SU-8 2035	1500 rpm, 200 rpm, 30s	5' 65°C 10' 95°C	210	2' 65°C 8' 95°C	17
100 μm SU-8 SUEX	Laminage 65°C	2' 85°C	900	5' 65°C 10' 95°C	30
100 μm SU-8 SUEX	Laminage 65°C	2' 85°C	936	5' 65°C 10' 95°C	30
100 μm SU-8 SUEX	Laminage 65°C	2' 85°C	843	5' 65°C 10' 95°C	50

TABLE A.7 – Paramètres utilisés pour la réalisation de moules à l'aide de résine SU-8 (liquide SU-8 20xx ou film sec SU-8 SUEX 100 μm). La résine liquide (SU-8 20xx) est déposée par enduction centrifuge (étape 1 : 500 rpm, accélération 100 rpm, durée 10s ; étape 2 résumée dans le tableau). Les films secs sont déposés par laminage.

A.4.3 Écriture directe

Silanisation du wafer

Le wafer, préalablement nettoyé par bain piranha, est silanisé afin d'améliorer l'adhésion de la résine. Pour cela, le wafer est rincé à l'isopropanol puis immergé dans une solution composée de 12,5 mL d'éthanol absolu contenant 2-3 gouttes de 3-(Triméthoxysilyl)propyl méthacrylate (TMSPMA) contenue dans une boîte de Pétri. La boîte est fermée à l'aide de Parafilm, le substrat est immergé pendant 2h puis rincé à l'éthanol et à l'eau avant d'être séché sous flux d'azote.

Silanisation de la résine

Après développement, le moule est rincé à l'isopropanol et séché à l'étuve avant d'être soumis à une activation par plasma d'oxygène pendant 30 secondes à 30W. Le wafer est ensuite placé dans une boîte Pétri et recouvert d'une solution de dichlorodiméthylsilane (à 5% en masse dans l'éthanol absolu). La boîte est fermée à l'aide de Parafilm et le substrat est immergé pendant 1h. Le moule est rincé à l'éthanol puis à l'eau déionisée et séché à l'étuve.

Impression

L'impression directe de moule est réalisée par polymérisation à deux photons (Photonic Professional GT2, Nanoscribe) à partir d'une résine négative photosensible (IP-S, Nanoscribe) en mode DiLL (Dip-In Laser Lithography), c'est-à-dire par immersion de l'objectif (25x) dans la résine. L'exposition est réalisée à l'aide d'un laser à fibre dopé à l'Erbium (780 nm), pulsé pendant 100 fs, à 25 mW, pour une vitesse d'impression de 10 000 $\mu\text{m}/\text{s}$. Les structures sont développées par immersion dans le PGMEA pendant 30 minutes puis dans l'isopropanol pendant 5 minutes et séchées sous très léger flux d'azote. Le moule est soumis à un recuit sous lampe UV (365 nm) pendant 2 minutes.

A.4.4 *Soft-lithography*

Les répliqués sont obtenus par lithographie molle dans du polydiméthylsiloxane (PDMS). Le monomère est mélangé au réticulant à un ratio 10:1 (monomère:réticulant) et coulé sur le moule puis dégazé quelques minutes. Le tout est placé à l'étuve à 80°C pendant 2h afin d'accélérer la réticulation du PDMS. Celui-ci est ensuite décollé du moule et les puces sont découpées et percées en entrées et en sorties. Elles sont ensuite nettoyées à l'isopropanol, séchées sous flux d'azote et collées sur une lame de verre recouverte d'une fine couche de PDMS. Le collage s'effectue par activation des surfaces par plasma d'oxygène qui permet d'ioniser le PDMS afin de former des liaisons covalentes entre les surfaces par mise en contact. Les puces ainsi collées sur les lames sont finalement placées à l'étuve à 80°C pendant deux heures afin de restituer le caractère hydrophobe au PDMS.

A.4.5 Mesures d'angle de contact

Afin de tester les différentes fonctionnalisations des supports (silanisation du wafer, silanisation de la résine), l'angle de contact d'une goutte d'eau sur les différents substrats est mesuré à l'aide du Drop Shape Analyzer DSA100 (Krüss). La mesure d'angle de contact statique s'effectue par le dépôt d'une goutte d'eau (2 μL) sur le substrat à l'aide d'une aiguille. La mesure est réalisée une fois que la goutte est posée et stabilisée (environ 60 sec). Les valeurs pour chaque condition correspondent à la moyenne de plusieurs mesures sur 6 gouttes distinctes.

A.4.6 Contrôleur de flux

Les expériences sont réalisées à l'aide d'un contrôleur de flux MFCS-EZ-4C (Fluigent) contrôlé à l'aide du logiciel MAESFLO (v 3.3). Les surpressions imposables pour les voies de phase aqueuse sont de 1 à 70 mbar et de 1 à 150 mbar pour la phase huile. La phase aqueuse est reliée à la puce par un tube en PTFE de diamètre interne 250 μm et de diamètre externe 760 μm pour la phase huile.

A.5 Mesures de la tension de surface

Par aspiration de gouttes par micropipettes

Les micropipettes sont préparées à partir de capillaires de borosilicate (Harvard Apparatus, diamètre externe : OD : 1mm, ID : 0.5mm et de longueur 10 mm) étirés à l'aide d'une étireuse P200 (Sutter Instrument) pour obtenir des pointes de diamètres internes de l'ordre du μm par utilisation des paramètres suivants : Plaser : 450, Mode de balyage : 4, Vitesse d'étirement : 50, Délai : 200, Force : 25. Les pipettes sont ensuite coupées à l'aide d'une microforge de sorte à obtenir des diamètres internes d'environ $5 \mu\text{m}$. Elles sont remplies de phase aqueuse (PBS, Mg^{2+}) et installées sur un porte pipette relié à un réservoir d'eau par un tube rempli d'eau servant de contrôleur de pression. Le déplacement du réservoir d'eau à la verticale permet d'aspirer avec une précision d'environ 10 Pa (équivalent au déplacement du réservoir d'un mm). Les pipettes sont traitées par une solution de dichlorodiméthylsilane dans l'éthanol (à 10%) pendant 10 minutes. Pour cela, environ $50 \mu\text{L}$ de solution sont déposées sur une lame de verre recouverte de PDMS et la pointe de la pipette est immergée. Une légère aspiration est imposée afin de traiter également l'intérieur de la pipette. Elle est ensuite rincée dans l'éthanol et immergée dans la phase huile contenant l'émulsion. De l'huile pénètre alors à l'intérieur de l'extrémité de la pipette. La goutte est aspirée jusqu'à la formation d'une langue de diamètre égal au diamètre de la pipette. La pression à laquelle ce diamètre est atteint permet alors d'estimer la différence de pression entre la goutte et la micropipette. À partir du rayon de la pipette (R_p), du rayon de la goutte (R_g) et de la différence de pression (ΔP), la tension de surface de la goutte est estimée par :

$$\Delta P = 2\gamma\left(\frac{1}{R_p} - \frac{1}{R_g}\right)$$

Bibliographie

- Aghdaei, S., Sandison, M. E., Zagnoni, M., Green, N. G., and Morgan, H. (2008). Formation of artificial lipid bilayers using droplet dielectrophoresis. *Lab Chip*, 8 :1617–1620. 65
- Alberts, B., editor (1994). *Molecular biology of the cell*. Garland Pub, New York, 3rd ed edition. 18
- Alhakamy, N. A., Elandalousi, I., Ghazvini, S., Berkland, C. J., and Dhar, P. (2015). Effect of lipid headgroup charge and ph on the stability and membrane insertion potential of calcium condensed gene complexes. *Langmuir*, 31(14) :4232–4245. 84
- Alves, I., Goasdoue, N., Correia, I., Aubry, S., Galanth, C., Sagan, S., Lavielle, S., and Chassaing, G. (2008). Membrane interaction and perturbation mechanisms induced by two cationic cell penetrating peptides with distinct charge distribution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1780(7-8) :948–959. 27, 34, 37, 74, 77, 84
- Alves, I. D., Bechara, C., Walrant, A., Zaltsman, Y., Jiao, C.-Y., and Sagan, S. (2011). Relationships between Membrane Binding, Affinity and Cell Internalization Efficacy of a Cell-Penetrating Peptide : Penetratin as a Case Study. *PLoS ONE*, 6(9) :e24096. 31, 32
- Angelova, M., Soléau, S., and Bothorel, P. (1992). Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. kinetics and applications. *Prog. Colloid Polym. Sci.*, 89 :161–176. 43
- Anna, S. L., Bontoux, N., and Stone, H. A. (2003). Formation of dispersions using “flow focusing” in microchannels. *Applied Physics Letters*, 82(3) :364–366. 119, 120
- Aronson, M. P. and Princen, H. M. (1980). Contact angles associated with thin liquid films in emulsions. *Nature*, 286(5771) :370–372. 52, 54
- Barlow, N. E., Smpokou, E., Friddin, M. S., Macey, R., Gould, I. R., Turnbull, C., Flemming, A. J., Brooks, N. J., Ces, O., and Barter, L. M. C. (2017). Engineering plant membranes using droplet interface bilayers. *Biomicrofluidics*, 11(2) :024107. 62
- Baumgart, T., Hammond, A. T., Sengupta, P., Hess, S. T., Holowka, D. A., Baird, B. A., and Webb, W. W. (2007). Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(9) :3165–3170. 43
- Baumgärtner, P., Geiger, M., Zieseniss, S., Malleier, J., Huntington, J. A., Hochrainer, K., Bielek, E., Stoeckelhuber, M., Lauber, K., Scherfeld, D., Schwille, P., Wäldele, K., Beyer, K., and Engelmann, B. (2007). Phosphatidylethanolamine critically supports internalization of cell-penetrating protein C inhibitor. *Journal of Cell Biology*, 179(4) :793–804. 32

- Bayley, H., Cronin, B., Heron, A., Holden, M. A., Hwang, W. L., Syeda, R., Thompson, J., and Wallace, M. (2008). Droplet interface bilayers. *Molecular BioSystems*, 4(12) :1191. 65
- Beber, A., Alqabandi, M., Prévost, C., Viars, F., Lévy, D., Bassereau, P., Bertin, A., and Mangenot, S. (2019). Septin-based readout of PI(4,5)P₂ incorporation into membranes of giant unilamellar vesicles. *Cytoskeleton*, 76(1) :92–103. 91
- Bechtella, L. (2019). *Molecular analysis of the interactions of the cell-penetrating peptide Penetratin and lipid membranes. Contributions of the lipid PIP₂, biophysical approaches and benzophenone photoreactivity in model membranes*. PhD thesis, Sorbonne Université. 89
- Berry, J. D., Neeson, M. J., Dagastine, R. R., Chan, D. Y., and Tabor, R. F. (2015). Measurement of surface and interfacial tension using pendant drop tensiometry. *Journal of Colloid and Interface Science*, 454 :226–237. 54
- Biggs, C. I., Walker, M., and Gibson, M. I. (2016). “Grafting to” of RAFTed Responsive Polymers to Glass Substrates by Thiol–Ene and Critical Comparison to Thiol–Gold Coupling. *Biomacromolecules*, 17(8) :2626–2633. 150
- Binder, H. and Gawrisch, K. (2001). Effect of unsaturated lipid chains on dimensions, molecular order and hydration of membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(49) :12378–12390. 72, 99
- Binder, H. and Lindblom, G. (2003). Charge-Dependent Translocation of the Trojan Peptide Penetratin across Lipid Membranes. *Biophysical Journal*, 85(2) :982–995. 38, 71
- Bishop, W. and Bell, R. (1985). Assembly of the endoplasmic reticulum phospholipid bilayer : the phosphatidylcholine transporter. *Cell*, 42(1) :51–60. 12
- Bithi, S. S. and Vanapalli, S. A. (2010). Behavior of a train of droplets in a fluidic network with hydrodynamic traps. *Biomicrofluidics*, 4(4) :044110. 117
- Booth, M., Restrepo Schild, V., Downs, F., and Bayley, J. (2019). *Droplet networks, from Lipid bilayers to synthetic tissues*. Encyclopedia of Biophysics. Springer. 65
- Booth, M. J., Restrepo Schild, V., Downs, F. G., and Bayley, H. (2017). Functional aqueous droplet networks. *Mol. BioSyst.*, 13 :1658–1691. 54
- Brian, A. A. and McConnell, H. M. (1984). Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(19) :6159–6163. 43
- Brown, D. A. and London, E. (1997). Structure of Detergent-Resistant Membrane Domains : Does Phase Separation Occur in Biological Membranes? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 240(1) :1–7. 14
- Burn, P. and Dalle Carbonare, B. H. (1997). *Chapter 3 Lipid-protein interactions in biological membranes*, volume 7. Elsevier. 15
- Cahill, K. (2010). Molecular electroporation and the transduction of oligoarginines. *Physical Biology*, 7(1) :016001. 101
- Carvalho, K., Ramos, L., Roy, C., and Picart, C. (2008). Giant unilamellar vesicles containing phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate : Characterization and functionality. *Biophysical Journal*, 95(9) :4348 – 4360. 90

- Charlier, L., Louet, M., Chaloin, L., Fuchs, P., Martinez, J., Muriaux, D., Favard, C., and Floquet, N. (2014). Coarse-Grained Simulations of the HIV-1 Matrix Protein Anchoring : Revisiting Its Assembly on Membrane Domains. *Biophysical Journal*, 106(3) :577–585. 33, 88
- Chen, X. and Ren, C. L. (2017). A microfluidic chip integrated with droplet generation, pairing, trapping, merging, mixing and releasing. *RSC Advances*, 7(27) :16738–16750. 131
- Cheng, H.-T., Megha, and London, E. (2009). Preparation and properties of asymmetric vesicles that mimic cell membranes : effect upon raft formation and transmembrane helix orientation. *Journal of Biological Chemistry*, 284(10) :6079–6092. 47
- Chiantia, S., Schwille, P., Klymchenko, A. S., and London, E. (2011). Asymmetric GUVs prepared by MBetaCD-mediated lipid exchange : An fcs study. *Biophysical Journal*, 100(1) :L1–L3. 47
- Christianson, H. C. and Belting, M. (2014). Heparan sulfate proteoglycan as a cell-surface endocytosis receptor. *Matrix Biology*, 35 :51–55. 31, 91
- Coluccio, M. L., Perozziello, G., Malara, N., Parrotta, E., Zhang, P., Gentile, F., Limongi, T., Raj, P. M., Cuda, G., Candeloro, P., and Di Fabrizio, E. (2019). Microfluidic platforms for cell cultures and investigations. *Microelectronic Engineering*, 208 :14–28. 115
- Cramer, C., Fischer, P., and Windhab, E. J. (2004). Drop formation in a co-flowing ambient fluid. *Chemical Engineering Science*, 59(15) :3045–3058. 119
- Daleke, D. L. (2003). Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *Journal of Lipid Research*, 44(2) :233–242. 12, 13
- de Kruijff, B. and Baken, P. (1978). Rapid transbilayer movement of phospholipids induced by an asymmetrical perturbation of the bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 507(1) :38–47. 45
- Delaroche, D., Aussedat, B., Aubry, S., Chassaing, G., Burlina, F., Clodic, G., Bolbach, G., Lavielle, S., and Sagan, S. (2007). Tracking a New Cell-Penetrating (W/R) Nonapeptide, through an Enzyme-Stable Mass Spectrometry Reporter Tag. *Analytical Chemistry*, 79(5) :1932–1938. 27
- Delaroche, D., Cantrelle, F.-X., Subra, F., Van Heijenoort, C., Guittet, E., Jiao, C.-Y., Blanchoin, L., Chassaing, G., Lavielle, S., Auclair, C., and Sagan, S. (2010). Cell-penetrating Peptides with Intracellular Actin-remodeling Activity in Malignant Fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 285(10) :7712–7721. 27
- Denkins, Y. M. and Schroit, A. J. (1986). Phosphatidylserine decarboxylase : generation of asymmetric vesicles and determination of the transbilayer distribution of fluorescent phosphatidylserine in model membrane systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 862(2) :343–351. 45
- Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1996). Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *Journal of Biological Chemistry*, 271(30) :18188–18193. 24, 25, 36
- Derossi, D., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1998). Trojan peptides : the penetratin system for intracellular delivery. *Trends in Cell Biology*, 8(2) :84–87. 26, 27

- Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269(14) :10444–10450. 25
- Devaux, P. F., Fellmann, P., and Herve, P. (2002). Investigation on lipid asymmetry using lipid probes. Comparison between spin-labeled lipids and fluorescent lipids. *Chemistry and Physics of Lipids*, page 20. 62
- Diederich, A., Bähr, G., and Winterhalter, M. (1998). Influence of Polylysine on the Rupture of Negatively Charged Membranes. *Langmuir*, 14(16) :4597–4605. 38
- Dittrich, P. S. and Manz, A. (2006). Lab-on-a-chip : microfluidics in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(3) :210–218. 115
- Doktorova, M., Heberle, F. A., Eicher, B., Standaert, R. F., Katsaras, J., London, E., Pabst, G., and Marquardt, D. (2018). Preparation of asymmetric phospholipid vesicles for use as cell membrane models. *Nature Protocols*, 13(9) :2086–2101. 47, 48
- Drin, G., Mazel, M., Clair, P., Mathieu, D., Kaczorek, M., and Temsamani, J. (2001). Physico-chemical requirements for cellular uptake of pAntp peptide : Role of lipid-binding affinity. *European journal of biochemistry*, 268(5) :1304–1314. 27, 86
- Duchardt, F., Fotin-Mleczek, M., Schwarz, H., Fischer, R., and Brock, R. (2007). A Comprehensive Model for the Cellular Uptake of Cationic Cell-penetrating Peptides. *Traffic*, 8(7) :848–866. 29
- Dupont, E., Prochiantz, A., and Joliot, A. (2007). Identification of a Signal Peptide for Unconventional Secretion. *J. Biol. Chem.*, 282(12) :8994–9000. 71
- Eeman, M. and Deleu, M. (2009). From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 14(4) :719–736. 44
- Erwig, L.-P. and Henson, P. M. (2008). Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death & Differentiation*, 15(2) :243–250. 12, 13
- Esbjörner, E. K., Lincoln, P., and Nordén, B. (2007). Counterion-mediated membrane penetration : Cationic cell-penetrating peptides overcome born energy barrier by ion-pairing with phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(6) :1550 – 1558. 88
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Frasch, S. C., Warner, M. L., and Henson, P. M. (1998). The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death and Differentiation*, 5(7) :551–562. 12, 45
- Farsari, M. and Chichkov, B. N. (2009). Two-photon fabrication. *Nature Photonics*, 3(8) :450–452. 125
- Fetah, K., Tebon, P., Goudie, M. J., Eichenbaum, J., Ren, L., Barros, N., Nasiri, R., Ahadian, S., Ashammakhi, N., Dokmeci, M. R., and Khademhosseini, A. (2019). The emergence of 3D bioprinting in organ-on-chip systems. *Progress in Biomedical Engineering*, 1(1) :012001. 125
- Fischer, P. M., Zhelev, N. Z., Wang, S., Melville, J. E., F\`a ahraeus, R., and Lane, D. P. (2000). Structure–activity relationship of truncated and substituted analogues of the intracellular delivery vector Penetratin. *The Journal of peptide research*, 55(2) :163–172. 27

- Frankel, A. D. and Pabo, C. O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 55(6) :1189–1193. 25
- Fujiwara, H., Fujihara, M., and Ishiwata, T. (2003). Dynamics of the spontaneous formation of a planar phospholipid bilayer : A new approach by simultaneous electrical and optical measurements. *The Journal of Chemical Physics*, 119 :6768–6775. 99
- Funakoshi, K., Suzuki, H., and Takeuchi, S. (2006). Lipid bilayer formation by contacting monolayers in a microfluidic device for membrane protein analysis. *Analytical Chemistry*, 78(24) :8169–8174. 61
- Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., and Sugiura, Y. (2001). Arginine-rich Peptides : an abundant source of membrane membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *Journal of Biological Chemistry*, 276(8) :5836–5840. 25
- Gabev, E., Kasianowicz, J., Abbott, T., and McLaughlin, S. (1989). Binding of neomycin to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 979(1) :105–112. 33
- Gallo, M., Defaus, S., and Andreu, D. (2019). 1988–2018 : Thirty years of drug smuggling at the nano scale. Challenges and opportunities of cell-penetrating peptides in biomedical research. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 661 :74–86. 23
- Gambhir, A., Hangyás-Mihályiné, G., Zaitseva, I., Cafiso, D. S., Wang, J., Murray, D., Pentylala, S. N., Smith, S. O., and McLaughlin, S. (2004). Electrostatic Sequestration of PIP₂ on Phospholipid Membranes by Basic/Aromatic Regions of Proteins. *Biophysical Journal*, 86(4) :2188–2207. 32, 88
- Gañán-Calvo, A. M. (1998). Generation of Steady Liquid Microthreads and Micron-Sized Monodisperse Sprays in Gas Streams. *Physical Review Letters*, 80(2) :285–288. 119
- Gao, X., Hong, S., Liu, Z., Yue, T., Dobnikar, J., and Zhang, X. (2019). Membrane potential drives direct translocation of cell-penetrating peptides. *Nanoscale*, 11 :1949–1958. 101, 106
- Garstecki, P., Fuerstman, M. J., Stone, H. A., and Whitesides, G. M. (2006). Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction—scaling and mechanism of break-up. *Lab on a Chip*, 6(3) :437. 120
- Gehan, P., Kulifaj, S., Soule, P., Bodin, J., Amoura, M., Walrant, A., Sagan, S., Thiam, A., Ngo, K., Vivier, V., Cribier, S., and Rodriguez, N. (2020). Penetratin translocation mechanism through asymmetric droplet interface bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1862(11) :183415. 73, 76, 79
- Gentet, L. J., Stuart, G. J., and Clements, J. D. (2000). Direct Measurement of Specific Membrane Capacitance in Neurons. *Biophysical Journal*, 79(1) :314–320. 59, 60
- Gerelli, Y., Porcar, L., Lombardi, L., and Fragneto, G. (2013). Lipid Exchange and Flip-Flop in Solid Supported Bilayers. *Langmuir*, 29(41) :12762–12769. 44
- Gestin, M., Dowaidar, M., and Langel, Ü. (2017). Uptake Mechanism of Cell-Penetrating Peptides. In *Peptides and Peptide-based Biomaterials and their Biomedical Applications*, volume 1030, pages 255–264. Springer International Publishing. 35

- Glass, N. R., Tjeung, R., Chan, P., Yeo, L. Y., and Friend, J. R. (2011). Organosilane deposition for microfluidic applications. *Biomicrofluidics*, 5(3) :036501. 147
- Goldup, A., Ohki, S., and Danielli, J. (1970). Black lipid films. *Recent Progress in Surface Science*, 3 :193–260. 59
- Golebiewska, U., Gambhir, A., Hangyás-Mihályiné, G., Zaitseva, I., Rädler, J., and McLaughlin, S. (2006). Membrane-Bound Basic Peptides Sequester Multivalent (PIP2), but Not Monovalent (PS), Acidic Lipids. *Biophysical Journal*, 91(2) :588–599. 32, 88
- Goñi, F. M. (2002). Non-permanent proteins in membranes : when proteins come as visitors (Review). *Molecular Membrane Biology*, 19(4) :237–245. 15
- Gross, L. C. M., Heron, A. J., Baca, S. C., and Wallace, M. I. (2011). Determining Membrane Capacitance by Dynamic Control of Droplet Interface Bilayer Area. *Langmuir*, 27(23) :14335–14342. 60, 99
- Gurtovenko, A. A. and Vattulainen, I. (2005). Pore Formation Coupled to Ion Transport through Lipid Membranes as Induced by Transmembrane Ionic Charge Imbalance : Atomistic Molecular Dynamics Study. *Journal of the American Chemical Society*, 127(50) :17570–17571. 38
- Hakomori, S.-i. and Igarashi, Y. (1995). Functional Role of Glycosphingolipids in Cell Recognition and Signaling. *The Journal of Biochemistry*, 118(6) :1091–1103. 8
- He, B. (2020). *Synergy of the interactions between GAGs and lipid bilayers in the internalization mechanisms of peptides targeting GAGs - Development of a delivery system based on CPPs*. PhD thesis, Université Paris Sciences et Lettres. 92
- Helm, C. A., Israelachvili, J. N., and McGuiggan, P. M. (1992). Role of hydrophobic forces in bilayer adhesion and fusion. *Biochemistry*, 31(6) :1794–1805. 52, 58
- Herce, H., Garcia, A., Litt, J., Kane, R., Martin, P., Enrique, N., Rebolledo, A., and Milesi, V. (2009). Arginine-Rich Peptides Destabilize the Plasma Membrane, Consistent with a Pore Formation Translocation Mechanism of Cell-Penetrating Peptides. *Biophysical Journal*, 97(7) :1917–1925. 35, 101
- Herce, H. D. and Garcia, A. E. (2007). Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(52) :20805–20810. 35, 36
- Hope, M. J., Redelmeier, T. E., Wong, K. F., Rodriguez, W., and Cullis, P. R. (1989). Phospholipid asymmetry in large unilamellar vesicles induced by transmembrane pH gradients. *Biochemistry*, 28(10) :4181–4187. 46
- Hu, P. C., Li, S., and Malmstadt, N. (2011). Microfluidic Fabrication of Asymmetric Giant Lipid Vesicles. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 3(5) :1434–1440. 49, 50
- Huang, J., Lein, M., Gunderson, C., and Holden, M. A. (2011). Direct Quantitation of Peptide-Mediated Protein Transport across a Droplet-Interface Bilayer. *Journal of the American Chemical Society*, 133(40) :15818–15821. 63, 65
- Hwang, W. L., Chen, M., Cronin, B., Holden, M. A., and Bayley, H. (2008). Asymmetric Droplet Interface Bilayers. *Journal of the American Chemical Society*, 130(18) :5878–5879. 53, 61, 62, 64, 73

- Israelachvili, J. N., Marčelja, S., and Horn, R. G. (1980). Physical principles of membrane organization. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 13(2) :121–200. 10
- Järver, P., Mäger, I., and Langel, Ü. (2010). In vivo biodistribution and efficacy of peptide mediated delivery. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(11) :528–535. 30
- Jean-François, F., Elezgaray, J., Berson, P., Vacher, P., and Dufourc, E. J. (2008). Pore Formation Induced by an Antimicrobial Peptide : Electrostatic Effects. *Biophysical Journal*, 95(12) :5748–5756. 38
- Jiao, C.-Y., Delaroche, D., Burlina, F., Alves, I. D., Chassaing, G., and Sagan, S. (2009). Translocation and Endocytosis for Cell-penetrating Peptide Internalization. *Journal of Biological Chemistry*, 284(49) :33957–33965. 27, 29, 31, 33, 88
- Jobin, M.-L., Blanchet, M., Henry, S., Chaignepain, S., Manigand, C., Castano, S., Lecomte, S., Burlina, F., Sagan, S., and Alves, I. D. (2015). The role of tryptophans on the cellular uptake and membrane interaction of arginine-rich cell penetrating peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848(2) :593–602. 28
- Jobin, M.-L., Bonnafous, P., Tamsamani, H., Dole, F., Grélard, A., Dufourc, E. J., and Alves, I. D. (2013). The enhanced membrane interaction and perturbation of a cell penetrating peptide in the presence of anionic lipids : Toward an understanding of its selectivity for cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1828(6) :1457 – 1470. 84
- Johnson, W., Hughes, M. E., and Zilversmit, D. B. (1975). Use of phospholipid exchange protein to measure inside-outside transposition in phosphatidylcholine liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 375 :176–185. 45
- Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H., and Prochiantz, A. (1991). Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(5) :1864–1868. 24
- Kabalnov, A. and Wennerström, H. (1996). Macroemulsion Stability : The Oriented Wedge Theory Revisited. *Langmuir*, 12(2) :276–292. 56, 58
- Kawamoto, S., Takasu, M., Miyakawa, T., Morikawa, R., Oda, T., Futaki, S., and Nagao, H. (2011). Inverted micelle formation of cell-penetrating peptide studied by coarse-grained simulation : Importance of attractive force between cell-penetrating peptides and lipid head group. *The Journal of Chemical Physics*, 134(9) :095103. 37
- Killian, J., Timmermans, J. W., Keur, S., and de Kruijff, B. (1985). The tryptophans of gramicidin are essential for the lipid structure modulating effect of the peptide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 820(1) :154–156. 25, 36
- Kučerka, N., Holland, B. W., Gray, C. G., Tomberli, B., and Katsaras, J. (2012). Scattering density profile model of popg bilayers as determined by molecular dynamics simulations and small-angle neutron and x-ray scattering experiments. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(1) :232–239. 72
- Kulifaj, S. (2018). *Étude des mécanismes de translocation des peptides pénétrateurs de cellules*. PhD thesis, Sorbonne Université. 69, 73, 139

- Lamazière, A., Burlina, F., Wolf, C., Chassaing, G., Trugnan, G., and Ayala-Sanmartin, J. (2007). Non-Metabolic Membrane Tubulation and Permeability Induced by Bioactive Peptides. *PLoS ONE*, 2(2) :e201. 36
- Leal-Calderon, F., Schmitt, V., and Bibette, J. (2007). *Emulsion science*. Springer, New York, 2nd ed edition. 55
- Lee, W., Walker, L. M., and Anna, S. L. (2009). Role of geometry and fluid properties in droplet and thread formation processes in planar flow focusing. *Physics of Fluids*, 21(3). 120
- Li, X., Huang, J., Holden, M. A., and Chen, M. (2017). Peptide-Mediated Membrane Transport of Macromolecular Cargo Driven by Membrane Asymmetry. *Analytical Chemistry*, 89(22) :12369–12374. 63, 85
- Lu, L., Schertzer, J. W., and Chiarot, P. R. (2015). Continuous microfluidic fabrication of synthetic asymmetric vesicles. *Lab on a Chip*, 15(17) :3591–3599. 49
- Ma, Y., Poole, K., Goyette, J., and Gaus, K. (2017). Introducing membrane charge and membrane potential to t cell signaling. *Frontiers in Immunology*, 8 :1513. 90
- Magzoub, M. and Gräslund, A. (2004). Cell-penetrating peptides : small from inception to application. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 37(2) :147–195. 34
- Maniti, O., Blanchard, E., Trugnan, G., Lamazière, A., and Ayala-Sanmartin, J. (2012). Metabolic energy-independent mechanism of internalization for the cell penetrating peptide penetratin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(6) :869–875. 43
- Marrink, S. J., Risselada, H. J., Yefimov, S., Tieleman, D. P., and de Vries, A. H. (2007). The martini force field : Coarse grained model for biomolecular simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(27) :7812–7824. 85
- Maruo, S., Nakamura, O., and Kawata, S. (1997). Three-dimensional microfabrication with two-photon-absorbed photopolymerization. *Optics Letters*, 22(2) :132–134. 125
- Matosevic, S. and Paegel, B. M. (2013). Layer-by-layer cell membrane assembly. *Nature Chemistry*, 5(11) :958–963. 49, 50
- Mayer, L., Hope, M., and Cullis, P. (1986). Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 858(1) :161–168. 43
- Mayor, S. and Pagano, R. E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(8) :603–612. 20
- McDonald, J. C., Duffy, D. C., Anderson, J. R., Chiu, D. T., Wu, H., Schueller, O. J. A., and Whitesides, G. M. (2000). Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis*, 21(1) :27–40. 115
- McLaughlin, S. and Murray, D. (2005). Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature*, 438(7068) :605–611. 88
- Miliana, P. J., Muzzio, M., Denver, J., Cawley, G., and Lee, S. (2015). Water permeability across symmetric and asymmetric Droplet Interface Bilayers. *Langmuir*, 31(44) :12187–12196. 60, 62

- Mitchell, D. J., Steinman, L., Kim, D. T., Fathman, C. G., and Rothbard, J. B. (2000). Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *The Journal of Peptide Research*, 56(5) :318–325. 26
- Montal, M. and Mueller, P. (1972). Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(12) :3561–3566. 98, 100
- Mueller, J., Kretzschmar, I., Volkmer, R., and Boisguerin, P. (2008). Comparison of Cellular Uptake Using 22 CPPs in 4 Different Cell Lines. *Bioconjugate Chemistry*, 19(12) :2363–2374. 29
- Murphy, S. V. and Atala, A. (2014). 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, 32(8) :773–785. 125
- Nguyen, M.-A., Srijanto, B., Collier, C. P., Retterer, S. T., and Sarles, S. A. (2016). Hydrodynamic trapping for rapid assembly and in situ electrical characterization of droplet interface bilayer arrays. *Lab on a Chip*, 16(18) :3576–3588. 133, 134, 136, 137
- Osborn, T. D. and Yager, P. (1995). Formation of planar solvent-free phospholipid bilayers by langmuir-blodgett transfer of monolayers to micromachined apertures in silicon. *Langmuir*, 11(1) :8–12. 43
- Palm, C., Netzereab, S., and Hällbrink, M. (2006). Quantitatively determined uptake of cell-penetrating peptides in non-mammalian cells with an evaluation of degradation and antimicrobial effects. *Peptides*, 27(7) :1710–1716. 34
- Palm-Apergi, C., Lorents, A., Padari, K., and Pooga, M. (2009). The membrane repair response masks membrane disturbances caused by cell-penetrating peptide uptake. *The FASEB Journal*, 23(1) :214–223. 35
- Pan, J., Marquardt, D., Heberle, F. A., Kučerka, N., and Katsaras, J. (2014). Revisiting the bilayer structures of fluid phase phosphatidylglycerol lipids : Accounting for exchangeable hydrogens. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1838(11) :2966 – 2969. 72
- Pautot, S., Frisken, B. J., and Weitz, D. A. (2003). Engineering asymmetric vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(19) :10718–10721. 48, 49
- Persson, D., Thorén, P. E. G., Herner, M., Lincoln, P., and Nordén, B. (2003). Application of a Novel Analysis To Measure the Binding of the Membrane-Translocating Peptide Penetratin to Negatively Charged Liposomes. *Biochemistry*, 42(2) :421–429. 32, 43
- Peyret, A., Zhao, H., and Lecommandoux, S. (2018). Preparation and properties of asymmetric synthetic membranes based on lipid and polymer self-assembly. *Langmuir*, 34(11) :3376–3385. PMID : 29486556. 47
- Pinho, S. S. and Reis, C. A. (2015). Glycosylation in cancer : mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer*, 15(9) :540–555. 17
- Poulin, P. and Bibette, J. (1998). Adhesion of Water Droplets in Organic Solvent. *Langmuir*, 14(22) :6341–6343. 52, 54, 57, 58

- Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L. V., and Lebleu, B. (2003). Cell-penetrating Peptides : A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1) :585–590. 29
- Rothbard, J., Jessop, T., and Wender, P. (2005). Adaptive translocation : the role of hydrogen bonding and membrane potential in the uptake of guanidinium-rich transporters into cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(4) :495–504. 28
- Rothbard, J. B., Jessop, T. C., Lewis, R. S., Murray, B. A., and Wender, P. A. (2004). Role of Membrane Potential and Hydrogen Bonding in the Mechanism of Translocation of Guanidinium-Rich Peptides into Cells. *Journal of the American Chemical Society*, 126(31) :9506–9507. 28, 37
- Säälik, P., Niinep, A., Pae, J., Hansen, M., Lubenets, D., Langel, Ü., and Pooga, M. (2011). Penetration without cells : Membrane translocation of cell-penetrating peptides in the model giant plasma membrane vesicles. *Journal of Controlled Release*, 153(2) :117–125. 43
- Sackmann, E. K., Fulton, A. L., and Beebe, D. J. (2014). The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature*, 507(7491) :181–189. 115
- Seigneuret, M. and Devaux, P. F. (1984). ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane : relation to shape changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(12) :3751–3755. 13
- Sia, S. K. and Whitesides, G. M. (2003). Microfluidic devices fabricated in Poly(dimethylsiloxane) for biological studies. *Electrophoresis*, 24(21) :3563–3576. 115
- Simons, K. and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. 387 :4. 14
- Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972). The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science*, 175(4023) :720–731. 5
- Slotte, J. P. and Ramstedt, B. (2007). The functional role of sphingomyelin in cell membranes. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(10) :977–981. 8
- Sonawane, M. D. and Nimse, S. B. (2016). Surface Modification Chemistries of Materials Used in Diagnostic Platforms with Biomolecules. *Journal of Chemistry*, 2016 :1–19. 147
- Sonneville-Aubrun, O., Bergeron, V., Gulik-Krzywicki, T., Jönsson, B., Wennerström, H., Lindner, P., and Cabane, B. (2000). Surfactant films in biliquid foams. *Langmuir*, 16(4) :1566–1579. 56
- Soule, P. (2015). *Étude des mécanismes de translocation des peptides pénétrateurs de cellules à l'aide de techniques biophysiques*. PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie. 69, 72, 103
- Squires, T. M. and Quake, S. R. (2005). Microfluidics : Fluid physics at the nanoliter scale. *Reviews of Modern Physics*, 77(3) :977–1026. 115
- Steck, T. L. and Lange, Y. (2018). Transverse distribution of plasma membrane bilayer cholesterol : Picking sides. *Traffic*, 19(10) :750–760. 11
- Swiecicki, J.-M., Bartsch, A., Tailhades, J., Di Pisa, M., Heller, B., Chassaing, G., Mansuy, C., Burlina, F., and Lavielle, S. (2014). The Efficacies of Cell-Penetrating Peptides in Accumulating in Large Unilamellar Vesicles Depend on their Ability To Form Inverted Micelles. *ChemBioChem*, 15(6) :884–891. 32

- Syeda, R., Holden, M. A., Hwang, W. L., and Bayley, H. (2008). Screening blockers against a potassium channel with a Droplet Interface Bilayer Array. *Journal of the American Chemical Society*, 130(46) :15543–15548. 61
- Takaoka, R., Kurosaki, H., Nakao, H., Ikeda, K., and Nakano, M. (2018). Formation of asymmetric vesicles via phospholipase D-mediated transphosphatidylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1860(2) :245–249. 45
- Taylor, G. J., Heberle, F. A., Seinfeld, J. S., Katsaras, J., Collier, C. P., and Sarles, S. A. (2017). Capacitive Detection of Low-Enthalpy, Higher-Order Phase Transitions in Synthetic and Natural Composition Lipid Membranes. *Langmuir*, 33(38) :10016–10026. 60
- Taylor, G. J., Venkatesan, G. A., Collier, C. P., and Sarles, S. A. (2015). Direct in situ measurement of specific capacitance, monolayer tension, and bilayer tension in a droplet interface bilayer. *Soft Matter*, 11(38) :7592–7605. 60, 72, 99
- Terrone, D., Sang, S. L. W., Roudaia, L., and Silvius, J. R. (2003). Penetratin and related cell-penetrating cationic peptides can translocate across lipid bilayers in the presence of a transbilayer potential. *Biochemistry*, 42(47) :13787–13799. 74, 87
- Thiam, A. R., Bremond, N., and Bibette, J. (2012). From Stability to Permeability of Adhesive Emulsion Bilayers. *Langmuir*, 28(15) :6291–6298. 57, 58
- Thorén, P. E., Persson, D., Karlsson, M., and Nordén, B. (2000). The Antennapedia peptide penetratin translocates across lipid bilayers - the first direct observation. *FEBS Letters*, 482(3) :265–268. 31, 32, 34, 71, 74
- Thorsen, T., Roberts, R. W., Arnold, F. H., and Quake, S. R. (2001). Dynamic Pattern Formation in a Vesicle-Generating Microfluidic Device. *Physical Review Letters*, 86(18) :4163–4166. 120
- Thutupalli, S., Fleury, J.-B., Steinberger, A., Herminghaus, S., and Seemann, R. (2013). Why can artificial membranes be fabricated so rapidly in microfluidics? *Chemical Communications*, 49(14) :1443. 113, 130
- Tieleman, D. P. (2004). The molecular basis of electroporation. *BMC Biochemistry*, 5(1) :10. 37, 38
- Tieleman, D. P., Leontiadou, H., Mark, A. E., and Marrink, S.-J. (2003). Simulation of Pore Formation in Lipid Bilayers by Mechanical Stress and Electric Fields. *Journal of the American Chemical Society*, 125(21) :6382–6383. 37, 38
- Umbanhowar, P. B., Prasad, V., and Weitz, D. A. (2000). Monodisperse Emulsion Generation via Drop Break Off in a Coflowing Stream. *Langmuir*, 16(2) :347–351. 119
- Valincius, G., Heinrich, F., Budvytyte, R., Vanderah, D. J., McGillivray, D. J., Sokolov, Y., Hall, J. E., and Lösche, M. (2008). Soluble amyloid beta-oligomers affect dielectric membrane properties by bilayer insertion and domain formation. *Biophysical Journal*, 95(10) :4845–4861. 60, 99
- Vasconcelos, L., Lehto, T., Madani, F., Radoi, V., Hällbrink, M., Vukojević, V., and Langel, Ü. (2018). Simultaneous membrane interaction of amphipathic peptide monomers, self-aggregates and cargo complexes detected by fluorescence correlation spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1860(2) :491 – 504. 110

- Venkatesan, G. A., Taylor, G. J., Basham, C. M., Brady, N. G., Collier, C. P., and Sarles, S. A. (2018). Evaporation-induced monolayer compression improves droplet interface bilayer formation using unsaturated lipids. *Biomicrofluidics*, 12(2) :024101. 56, 100
- Vereb, G., Szöllösi, J., Matkó, J., Nagy, P., Farkas, T., Vígh, L., Mátyus, L., Waldmann, T. A., and Damjanovich, S. (2003). Dynamic, yet structured : The cell membrane three decades after the Singer–Nicolson model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14) :8053–8058. 5
- Via, M. A., Klug, J., Wilke, N., Mayorga, L. S., and Del Pópolo, M. G. (2018). The interfacial electrostatic potential modulates the insertion of cell-penetrating peptides into lipid bilayers. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 20 :5180–5189. 109
- Visco, I., Chiantia, S., and Schwille, P. (2014). Asymmetric supported lipid bilayer formation via Methyl-Beta-Cyclodextrin mediated lipid exchange : Influence of asymmetry on lipid dynamics and phase behavior. *Langmuir*, 30(25) :7475–7484. 47
- Vives, E., Brodin, P., and Lebleu, B. (1997). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *Journal of Biological Chemistry*, 272(25) :16010–16017. 25, 26
- Walde, P., Cosentino, K., Engel, H., and Stano, P. (2010). Giant vesicles : Preparations and applications. *ChemBioChem*, 11(7) :848–865. 96
- Walrant, A., Bauzá, A., Girardet, C., Alves, I. D., Lecomte, S., Illien, F., Cardon, S., Chaianantakul, N., Pallerla, M., Burlina, F., Frontera, A., and Sagan, S. (2020). Ionpair-pi interactions favor cell penetration of arginine/tryptophan-rich cell-penetrating peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1862(2) :183098. 28
- Walrant, A., Cardon, S., Burlina, F., and Sagan, S. (2017). Membrane Crossing and Membranotropic Activity of Cell-Penetrating Peptides : *Dangerous Liaisons?* *Accounts of Chemical Research*, 50(12) :2968–2975. 29, 30, 31, 33, 91
- Walrant, A., Correia, I., Jiao, C.-Y., Lequin, O., Bent, E. H., Goasdoué, N., Lacombe, C., Chassaing, G., Sagan, S., and Alves, I. D. (2011). Different membrane behaviour and cellular uptake of three basic arginine-rich peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1808(1) :382–393. 27, 43, 71, 75, 80, 84
- Walrant, A., Matheron, L., Cribier, S., Chaignepain, S., Jobin, M.-L., Sagan, S., and Alves, I. D. (2013). Direct translocation of cell-penetrating peptides in liposomes : A combined mass spectrometry quantification and fluorescence detection study. *Analytical Biochemistry*, 438(1) :1–10. 32, 74, 80
- Walrant, A., Vogel, A., Correia, I., Lequin, O., Olausson, B. E., Desbat, B., Sagan, S., and Alves, I. D. (2012). Membrane interactions of two arginine-rich peptides with different cell internalization capacities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818(7) :1755–1763. 84
- Warschawski, D. E., Arnold, A. A., and Marcotte, I. (2018). A new method of assessing lipid mixtures by 31p magic-angle spinning nmr. *Biophysical Journal*, 114(6) :1368 – 1376. 85
- Watanabe, H. and Kawano, R. (2016). Channel current analysis for pore-forming properties of an Antimicrobial peptide, Magainin 1, using the droplet contact method. *Analytical Sciences*, 32(1) :57–60. 64

- Wegener, M. (2017). *3D Optical Laser Lithography*, chapter 3D Optical Laser Lithography, pages 143–148. NATO Science for Peace and Security Series B : Physics and Biophysics. Springer Netherlands, Dordrecht. 126
- Weinberg, J. and Drubin, D. G. (2012). Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast. *Trends in Cell Biology*, 22(1) :1–13. 45
- Wender, P. A., Mitchell, D. J., Pattabiraman, K., Pelkey, E. T., Steinman, L., and Rothbard, J. B. (2000). The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake : Peptoid molecular transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(24) :13003–13008. 26
- Wheaten, S. A., Ablan, F. D. O., Spaller, B. L., Trieu, J. M., and Almeida, P. F. (2013). Translocation of Cationic Amphipathic Peptides across the Membranes of Pure Phospholipid Giant Vesicles. *Journal of the American Chemical Society*, 135(44) :16517–16525. 32, 74
- Wheeler, A. R., Thronset, W. R., Whelan, R. J., Leach, A. M., Zare, R. N., Liao, Y. H., Farrell, K., Manger, I. D., and Daridon, A. (2003). Microfluidic Device for Single-Cell Analysis. *Analytical Chemistry*, 75(14) :3581–3586. 115
- Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101) :368–373. 115
- Xia, Y. and Whitesides, G. M. (1998). Soft Lithography. *Angew. Chem. Int. Ed.*, page 26. 122, 126
- Yan, X., Noël, F., Marcotte, I., DeWolf, C. E., Warschawski, D. E., and Boisselier, E. (2020). Ahnak c-terminal peptide membrane binding—interactions between the residues 5654–5673 of ahnak and phospholipid monolayers and bilayers. *Langmuir*, 36(1) :362–369. PMID : 31825630. 85
- Yanagisawa, M., Yoshida, T.-a., Furuta, M., Nakata, S., and Tokita, M. (2013). Adhesive force between paired microdroplets coated with lipid monolayers. *Soft Matter*, 9 :5891–5897. 56
- Yang, S. F., Freer, S., and Benson, A. A. (1967). Transphosphatidylolation by Phospholipase D. *Journal of Biological Chemistry*, 242(3) :477–484. 45
- Yeom, S. and Lee, S. Y. (2011). Size prediction of drops formed by dripping at a micro T-junction in liquid–liquid mixing. *Experimental Thermal and Fluid Science*, 35(2) :387–394. 121
- Yesylevskyy, S., Marrink, S.-J., and Mark, A. E. (2009). Alternative mechanisms for the interaction of the cell-penetrating peptides penetratin and the tat peptide with lipid bilayers. *Biophysical Journal*, 97(1) :40 – 49. 39
- Yeung, A., Dabros, T., and Masliyah, J. (1998). Does Equilibrium Interfacial Tension Depend on Method of Measurement? *Journal of Colloid and Interface Science*, 208(1) :241–247. 143
- Yeung, A., Dabros, T., Masliyah, J., and Czarnecki, J. (2000). Micropipette : a new technique in emulsion research. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 174(1-2) :169–181. 54

- Zachowski, A. (1993). Phospholipids in animal eukaryotic membranes : transverse asymmetry and movement. *Biochemical Journal*, 294(1) :1–14. 12, 13
- Zhang, W. and Smith, S. O. (2005). Mechanism of penetration of antp(43–58) into membrane bilayers. *Biochemistry*, 44(30) :10110–10118. 86, 87
- Zhao, Y., Chen, D., Yue, H., French, J. B., Rufo, J., Benkovic, S. J., and Huang, T. J. (2013). Lab-on-a-chip technologies for single-molecule studies. *Lab on a Chip*, 13(12) :2183. 115
- Ziegler, A. and Seelig, J. (2008). Binding and Clustering of Glycosaminoglycans : A Common Property of Mono- and Multivalent Cell-Penetrating Compounds. *Biophysical Journal*, 94(6) :2142–2149. 30, 91

Publications

Publications relatives à la thèse :

Gehan, P., Kulifaj, S., Soule, P., Bodin, J., Amoura, M., Walrant, A., Sagan, S., Thiam, A., Ngo, K., Vivier, V., Cribier, S., and Rodriguez, N. Penetratin translocation mechanism through asymmetric droplet interface bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 11, 1862 (2020)

Publications issues de travaux dans le cadre de collaborations :

Caillon, L., Nieto, V., Gehan, P. et al. Triacylglycerols sequester monotopic membrane proteins to lipid droplets. *Nature Communication*, 11, 3944 (2020)

A. Voegele, M. Sadi, D. P O'Brien, P. Gehan, D. Raoux-Barbot, M. Davi, S. Hoos, S. Brûlé, B. Raynal, P. Weber, A. Mechaly, A. Haouz, N. Rodriguez, P. Vachette, D. Durand, S. Brier, D. Ladant, A. Chenal. A high-affinity calmodulin-binding site in the CyaA toxin translocation domain is essential for invasion into eukaryotic cells, *Advanced Science*, *in press*, preprint bioRxiv 2020.09.14.296129, disponible à : <https://doi.org/10.1101/2020.09.14.296129>



Penetratin translocation mechanism through asymmetric droplet interface bilayers



P. Gehan^{a,1}, S. Kulifaj^{a,1}, P. Soule^a, J.B. Bodin^a, M. Amoura^a, A. Walrant^a, S. Sagan^a, A.R. Thiam^b, K. Ngo^c, V. Vivier^c, S. Cribier^a, N. Rodriguez^{a,*}

^a Sorbonne Université, Ecole Normale Supérieure, PSL University, CNRS, Laboratoire des biomolécules, LBM, 75005 Paris, France

^b Laboratoire de Physique de l'École Normale Supérieure, ENS, Université PSL, CNRS, Sorbonne Université, Université de Paris, F-75005 Paris, France

^c Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques, LISE, F-75005, Paris, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Cell penetrating peptides
Droplet interface bilayer
Model membrane
Penetratin
Translocation mechanism

ABSTRACT

Penetratin is a cell penetrating peptide (CPP) that can enter cells by direct translocation through the plasma membrane. The molecular mechanism of this translocation still remains poorly understood. Here we provide insights on this mechanism by studying the direct translocation of the peptide across model membranes based on Droplet Interface Bilayers (DIBs), which are bilayers at the interface between two adhering aqueous-in-oil droplets. We first showed with symmetric bilayers made of a mix of 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (POPG) and 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) that the translocation of penetratin required the presence of at least 40% of POPG on both leaflets. Interestingly when replacing POPG with another anionic lipid 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (POPS), translocation was inefficient. To elucidate the lipid partners required at each step of the CPP translocation process, we then investigated the crossing of asymmetric bilayers. We found that POPG on the proximal leaflet and POPS on the distal leaflet allowed penetratin translocation. Translocation was not observed when POPS was on the proximal leaflet and POPG on the distal leaflet or if POPS on the distal leaflet was replaced with POPC. These observations led us to propose a three-step translocation mechanism: (i) peptide recruitment by anionic lipids, (ii) formation of a transient peptide-lipid structure leading to the initiation of translocation which required specifically POPG on the proximal leaflet, (iii) termination of the translocation process favored by a driving force provided by anionic lipids in the distal leaflet.

1. Introduction

1.1. CPP translocation through bilayers

Cell penetrating peptides (CPPs) are cationic peptides that possess the ability to enter into cells. They can be used to drag exogenous molecules such as proteins, nucleotides or drugs and are thus very promising for the field of vectorization [1–4]. In the literature, CPPs are demonstrated to enter cells by two different general mechanisms: endocytosis and direct translocation through the plasma membrane. The relative importance of these two pathways depends, among other factors, on the amino acid content of the CPP [5]. Even when direct translocation is not the major path of entry, its importance for vectorization is crucial because it allows the CPP and its cargos to end up directly into the cytoplasm. In this case, there is no need for the cargo to

escape endosomes to reach its targets in the cytoplasm.

The molecular mechanism of the direct translocation of CPPs is currently little understood. Intermediate peptide-lipid structures have been hypothesized as inverted micelles, pores or lipid-peptide complexes [6]. All these models propose an explanation for the unexpected ability of a rather hydrophilic CPP, soluble in aqueous media, to cross the hydrophobic core of the lipid bilayer. The present study tries to answer two classes of questions related to the comprehensive analysis of the direct translocation mechanism in model membranes as a prerequisite step to the study of cell membrane translocation: (i) Which are the lipid partners favoring direct translocation and do negatively charged lipids play a particular role in this mechanism due to favorable interactions with positively charged CPPs? (ii) What are the driving forces that lead the CPPs to adhere, locally destabilize and then cross the lipid bilayer? Can the negatively charged lipids be involved in this

* Corresponding author.

E-mail address: nicolas.rodriquez@upmc.fr (N. Rodriguez).

¹ These two authors contributed equally.

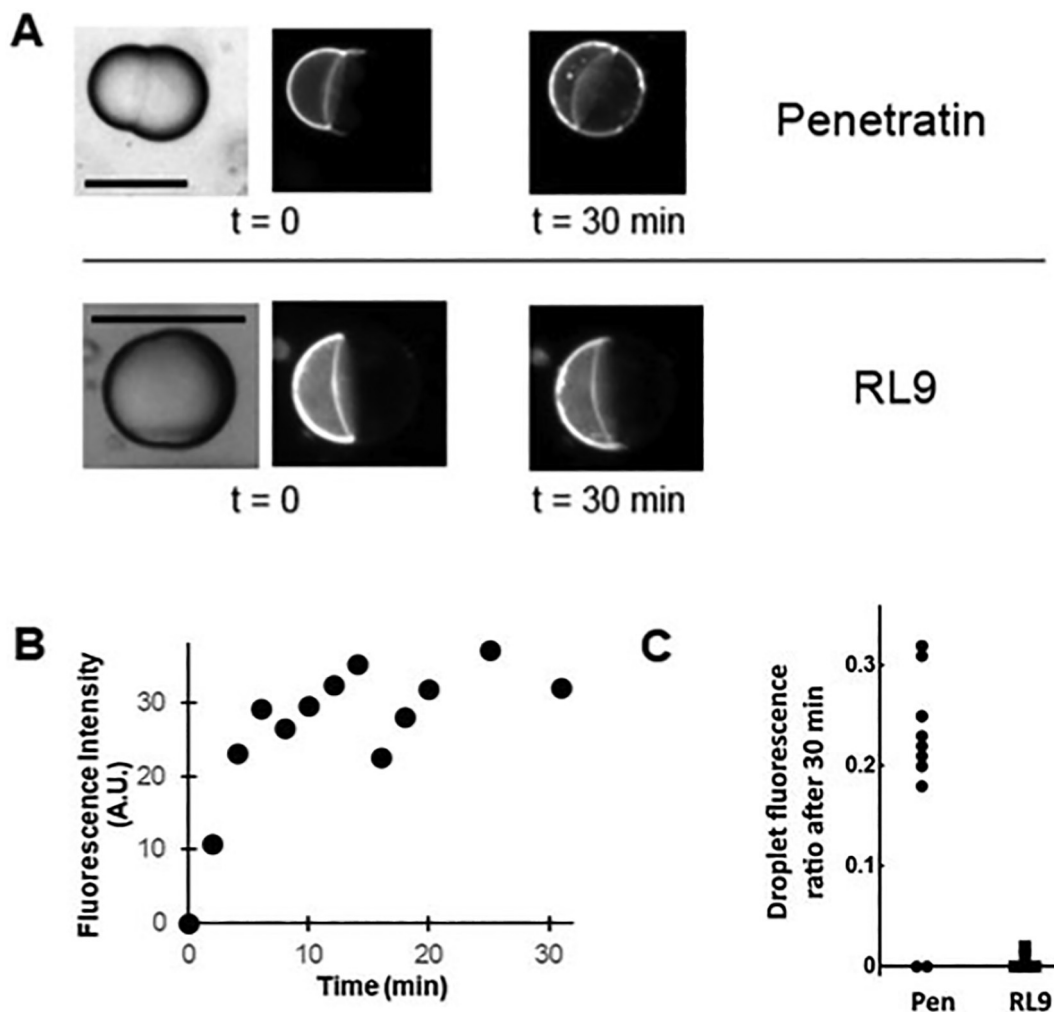


Fig. 1. Observation of the translocation of fluo-penetratin through a POPG DIB.
A: Bright field and fluorescence microscopy images of a pair of droplets with a POPG bilayer at their interface. At $t = 0$ fluo-penetratin is located in the left droplet only. After 30 min some of the fluo-penetratin has crossed the DIB. An increase of the contact area between the droplets is detected during the timecourse of the experiment. In the case of fluo-RL9 ($5 \mu\text{M}$), there is no measurable passage over a 30 min time scale. Scale bar lengths are $50 \mu\text{m}$.
B: Time course of the measured fluorescence intensity in the initially fluo-penetratin free droplet. The apparent drop of concentration at $t = 16$ min may be artifactual due to the occurrence of a bright spot inside the distal droplet. The raising of the fluorescence during the first 10 min of the experiment is the signature of the translocation of some fluo-penetratin through the POPG DIB towards the initially peptide free droplet.
C: Ratio of fluorescence intensities between the initially peptide free droplet and the peptide source droplet after 30 min. Each symbol corresponds to one experiment. “Pen” stands for fluo-penetratin and “RL9” for fluo-RL9.

driving force and does their localization on one or the other leaflet of the bilayer play a role in these driving forces?

1.2. Model membranes to study translocation

Different model membranes composed exclusively of lipids have been used to study the passive translocation mechanism since it is very likely to involve the crossing through the lipid bilayer of the plasma membrane.

Vesicles of various compositions have been used to determine the lipid partners that favor direct translocation [7–15]. Previously, Walrant et al. used an original mass spectrometry based protocol to quantify the internalization of CPPs inside liposomes and showed the importance of the negatively charged lipids to activate translocation. In addition Swiecicki et al. designed a protocol based on the quenching of fluorescently labeled CPPs outside of vesicles to determine the fraction of CPP able to translocate into vesicles. Using this method, they showed the importance of the negatively charged phosphatidylglycerol (PG) lipid to favor the translocation. Finally, Hecce et al. have used planar

suspended bilayers to study the translocation of CPPs [16]. In this latter work, the crossing of the CPP could not be detected but its impact on the membrane (formation of pores) was evidenced.

Droplet interface bilayer (DIB) is also used as a model membrane [17]. To form a DIB, two aqueous droplets in oil covered by a lipid monolayer are brought into contact and the interface of these two droplets constitutes a bilayer. Two main techniques exist to bring the lipids at the oil-water interface. With the “lipid in” technique [17], lipids are introduced in the form of vesicles in the aqueous phase that will collapse at the oil-water interface and bring the lipids. With the “lipid out” technique [18], lipids are introduced in the oil phase, their mixing being possibly favored by adding to the oil a good lipid solvent such as chloroform. Several methods are then available to form the individual droplets and bring two of them into contact to get a DIB at the interface: gentle mixing, use of a capillary micropipette, microfluidic devices, etc. Depending on various parameters such as lipid and solvent natures, lipid good solvent and oil ratio, lipid concentration, lipid in or lipid out method, evaporation conditions or droplet sizes the DIB stability can range from seconds to hours. This DIB model

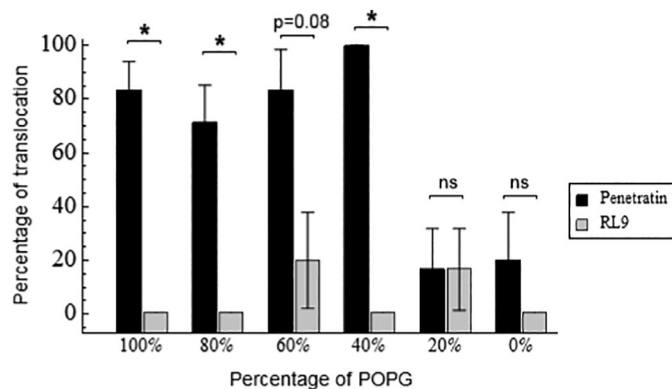


Fig. 2. Impact of the lipid composition on the translocation probability of fluo-penetratin.

The translocation is tested for different percentage of POPG mixed with POPC. For each composition the probability of the occurrence of translocation is compared between the penetratin and RL9 peptide. The percentage of translocation is the percentage of experiments for which a significant translocation is observed. The significance criterion is $p < 0.05$ with an exact fisher test. 5 to 12 experiments have been conducted for each condition (a condition corresponding to a type of peptide and a lipid composition).

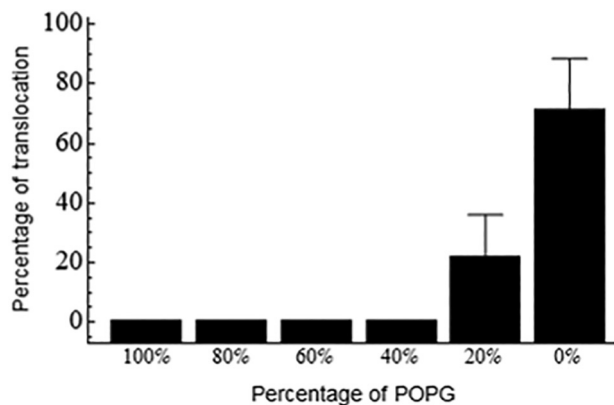


Fig. 3. Crossing of a soluble fluorescent probe FP488 through DIBs.

Crossing of bare FP 488 through POPC/POPG DIBs with different ratios. Crossing was consistently observed for 100% POPC DIBs. No such crossing was detected for DIBs with more than 40% POPG.

membrane can be used to study the transport of molecules through bilayers [19–21]. This model system has been used by Li et al. to evidence that the crossing of a bilayer by the CPP Pep1 is driven by the presence of negatively charged PG lipids on the distal leaflet (the leaflet which is not initially in contact with Pep1 as opposed to the proximal leaflet) [21]. Although negatively charged lipids are minor components of the outer leaflet of cell plasma membrane [22], it is currently assumed that negative charges (as found in the extracellular matrix) at the cell surface are crucial to attract/concentrate cationic peptides in the close vicinity of the lipid bilayer [6]. Thus, the negatively charged lipids we used herein also mimic the negative charge environment found at the cell surface.

1.3. The case of the CPP penetratin

Penetratin peptide is among the first discovered CPPs [23]. Its sequence is included in the sequence of the larger Antennapedia homeoprotein. Penetratin is a cationic peptide but with an amphipathic nature due to the presence of two hydrophobic tryptophans. In contact with a membrane it can adopt an alpha-helical or beta-strand secondary structure [24–26].

Penetratin is known to enter partly by direct translocation, for

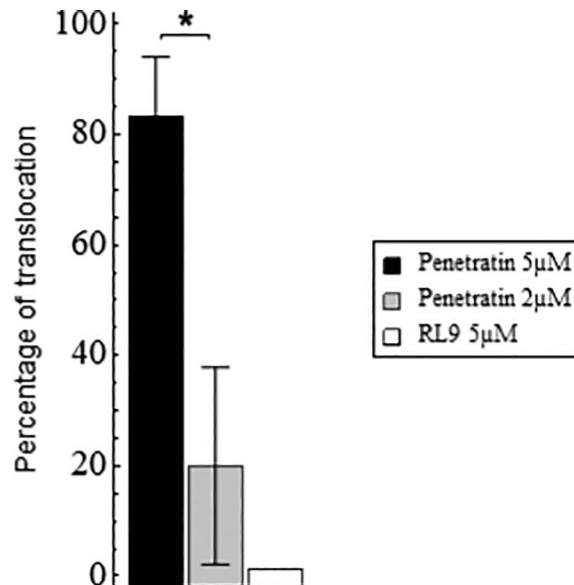


Fig. 4. Impact of the concentration of fluo-penetratin on its translocation probability.

The percentage of experiments for which translocation is observed is significantly reduced when fluo-penetratin concentration is lowered from 5 μM to 2 μM. $n = 5$ to 12 for each condition.

example into Chinese Hamster Ovary (CHO) cells [5]. After incubation of cells for 1 h with 5 μM penetratin, Jiao et al. estimated that 30% of the penetratin entered by direct translocation, whereas the remaining 70% used endocytosis pathways. It is thus interesting to focus on this peptide to determine the membrane lipid components and their localization on both leaflets that are crucial for translocation. Here, we have used DIB to investigate the membrane compositions favoring the translocation of penetratin. For this purpose, penetratin was labeled with a fluorophore cargo molecule, which allowed detection and tracking of the peptide.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Magnesium chloride ($MgCl_2$) and squalene were purchased from Sigma Aldrich. PBS was obtained from Merck. Chloroform was obtained from Carlo Erba. All chemicals were used as received without further purification.

2.2. Lipids

All the lipids, dissolved in chloroform to obtain a concentration of 25 mg/mL, were purchased from Avanti Polar Lipids: 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (POPG), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (POPS), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (DOPS).

2.3. Peptides and fluorophores

Two peptides have been used in this study: penetratin (RQIKIWF-QNRRMKWKK) and RL9 (RLLRRLRR) taken as a negative control of translocation [27]. Both were chemically labeled with a fluorophore on their N-terminal part. A green fluorophore has been used: Alexa488 maleimide (Life technologies) introduced on the side chain of an additional Cysteine on the N-terminus.

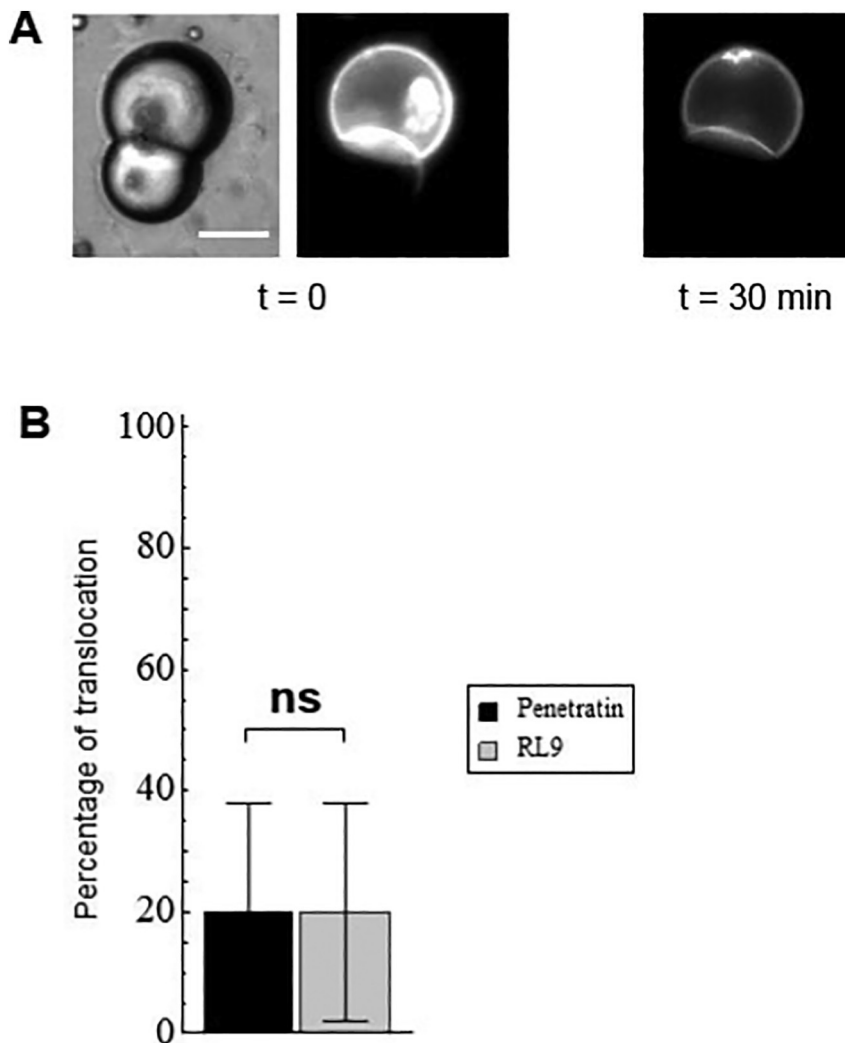


Fig. 5. No translocation of fluo-penetratin through POPS DIB is observed.

A: The DIB and monolayers surrounding the droplets are 100% POPS. Fluo-penetratin did not translocate. Scale bar length is 20 μ m.

B: In most experiments fluo-penetratin did not translocate. It showed no better cell-penetration ability than fluo-RL9.

Peptides were synthesized in our laboratory by solid-phase synthesis using the Boc (penetratin) or Fmoc (RL9) strategy. They were purified by RP-HPLC and their structure further checked by mass spectrometry.

FluoProbe FP488 was purchased from Interchim.

2.4. DIB formation

DIBs were formed at the interface between two aqueous droplets in oil. Two methods were used in this study in order to form DIB:

(i) Peptide translocation assay

Two populations of aqueous droplets in oil were mixed. Aqueous phases were prepared in PBS containing 10 mM $MgCl_2$ to favor DIB stability. One of the populations additionally contained 5 μ M of peptide in its aqueous phase. The oil phase was prepared with 15% (v/v) of chloroform and 8 $\text{g}/100\text{g}$ (w/w) of lipids in squalene. Each population of droplets was prepared with 2 μ L of aqueous phase mixed with 20 μ L of the oil phase. The sample was briefly shaken to produce the invert emulsion. Two populations of droplets were mixed on a glass slide covered by a thin layer of PDMS (used to avoid spreading of the droplets on the glass slide), thus leading to randomly formed pairs. An at most very low presence of oil in the DIB has been suggested by electrical measurements of Gross et al. [28]. This is different from what is

obtained with giant vesicles formed by the water in oil emulsion method [29]. The fluorescence signal was recorded over 30 min with a Princeton Instrument Micromax camera and an IX71 Olympus inverted microscope equipped with 10 \times or 20 \times Olympus objectives. The fluorescent observations were made using an HBO lamp and a fluorescence cube with an excitation filter Omega XF18-2 (457–487 nm).

(ii) Asymmetric bilayer stability assay

The DIBs were formed and observed similarly as in the peptide translocation assay, but in the absence of peptide in the aqueous phases of the two droplet populations. In that case, the aqueous phase of one population contained the fluorescently labeled (with fluo probe Alexa488) annexin V (from Life Technologies, reference A13201 diluted 10 times) and 2.5 mM $CaCl_2$.

2.5. Peptide detection

The epifluorescence images of a pair of adhering droplets could be used to detect the fluorescently labeled peptides in both droplets.

The quantification of fluorescence is made by averaging the fluorescence on a disk centered on the droplet (the diameter of the disk is roughly half the diameter of the droplet). This disk does not include the edges which are brighter in certain conditions. However, because our

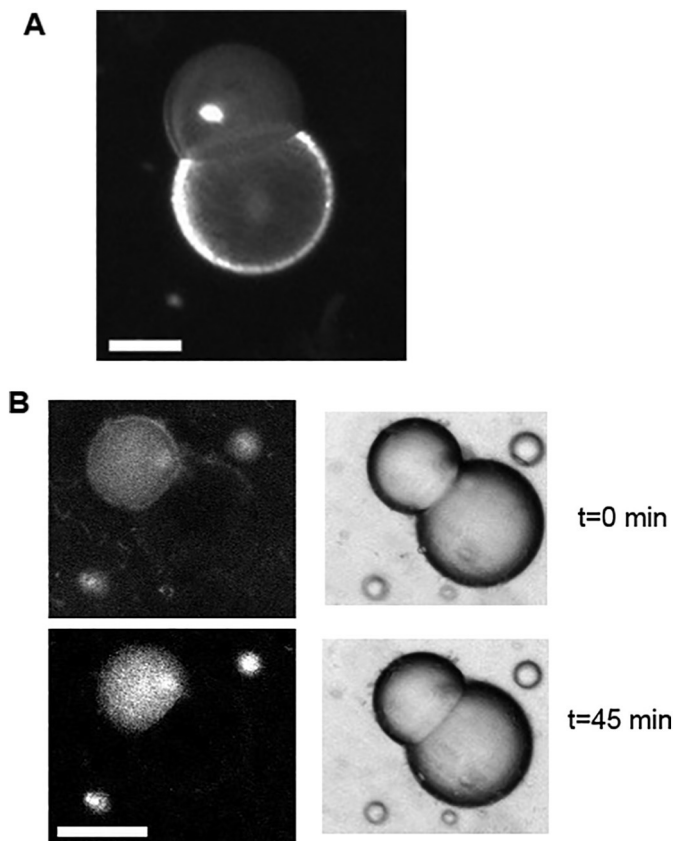


Fig. 6. The asymmetry of the DIB is maintained over ~ 45 min.
A: A pair of droplets covered with DOPC for the upper one and DOPS for the lower one. Both contain fluo-annexin V. The monolayer of the DOPC droplet is not visible whereas the monolayer of the DOPS droplet is clearly visible.
B: A pair of droplet was observed for 45 min. The upper droplet was initially surrounded by DOPC lipids and filled with fluo-annexin V. The lower droplet was initially surrounded by DOPS lipids and free from fluo-annexin V. A slight fluorescence visible on a part of the edge of the lower droplet is likely due to the presence of a bright droplet in its vicinity (because the lower droplet is free from fluo-annexin V). No transfer of DOPS from the lower to the upper droplet was detected within a 45 min time scale. To make sure to be able to detect a possible fluorescence of the edges of the upper droplet after 45 min, the contrast of the picture has been enhanced. Scale bar length is $50 \mu\text{m}$.

technique is epifluorescence microscopy, the fluorescence we measure in this disk integrates a contribution from peptides bound at the top and bottom edges of the droplet.

3. Results

3.1. Symmetric bilayers bearing enough POPG allow penetratin translocation

The ability of the fluorescently labeled penetratin (fluo-penetratin) to translocate through a strongly negatively charged bilayer made of 100% POPG lipids was first assessed. Fluo-penetratin at $5 \mu\text{M}$ was initially present in one of the two droplets forming a pair. The increase of fluorescence in the initially peptide-free droplet was followed for 30 min and was considered as the signature for the translocation of fluo-penetratin through the POPG DIB. Epifluorescence and bright field images of the droplets are shown in Fig. 1A. The initially dark droplet (initially containing no fluo-penetratin) became significantly fluorescent after a few minutes. The stronger fluorescence on the monolayer and DIB of the droplets was likely due to the favorable electrostatic interaction between fluo-penetratin and POPG favoring the adhesion of peptides on lipids. The dye of fluo-penetratin adhering on the

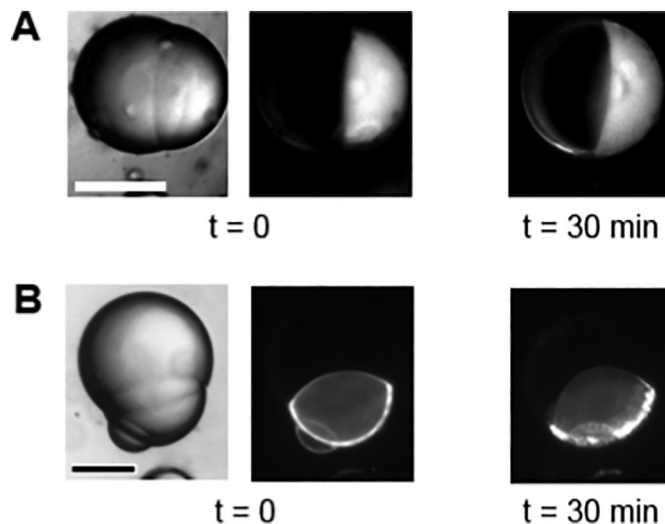


Fig. 7. No translocation of fluo-penetratin was observed through asymmetric POPG:POPC bilayers, whatever the initial side location of fluo-penetratin.
A: The left droplet was covered with POPG, the right one with POPC. The DIB was thus asymmetric. Fluo-penetratin ($5 \mu\text{M}$) was initially present in the POPC side of the DIB and did not translocate. Scale bar represents $300 \mu\text{m}$.
B: The lower droplet was covered with POPG, the upper one with POPC. The DIB was thus asymmetric. Penetratin ($5 \mu\text{M}$) was initially present in the POPG side of the DIB and did not translocate. Scale bar length is $50 \mu\text{m}$.

monolayer or the DIB may also become brighter due to a different surrounding, which may also explain partly this brightness of the rim. It is noteworthy that the equality of fluorescence intensities between the two droplets was not reached after 30 min. For longer experiments this equilibrium between the two droplets was never reached and a fluorescence plateau was often observed. Fig. 1B shows the kinetics of crossing measured in the experiments of Fig. 1A. The time for crossing is of the order of a few minutes. Sometimes we observed that the crossing started after a few minutes delay. A systematic analysis of the crossing kinetics of fluo-penetratin is presented in Supplementary Material, Fig. S1. In order to prove that the crossing of penetratin through the DIB that we monitored was related to the cell-penetration capacity of fluo-penetratin, the membrane-binding but non cell-penetrating RL9 peptide was tested as a negative control. The fluo-RL9 peptide is positively charged and rich in arginine residues as the fluo-penetratin, and has been shown to be a poor CPP which adheres to membranes but does hardly cross cell or vesicle membranes [11]. A typical experiment with $5 \mu\text{M}$ fluo-RL9 is shown in Fig. 1A. The adhesion of fluo-RL9 on the monolayer and DIB was also detected. After 30 min however no significant fluorescence appeared in the initially fluo-RL9 free droplet showing that fluo-RL9 did not translocate during this experiment.

These fluo-penetratin and fluo-RL9 translocation trials through 100% POPG symmetric DIBs were reproduced several times. Interestingly the final fluo-penetratin fluorescence intensities in the initially peptide free droplet after 30 min varied from one trial to the other and for 2 trials out of 12 no translocation at all was detected (Fig. 1C). Two populations of experiments are thus observed. These results showed that translocation is a stochastic phenomenon (which can occur or not), certainly dependent of the formation of one or several transient peptide-lipid permeation structures whose formation probability and lifetime seems to be stochastic. The implications of this stochasticity on the translocation mechanism are further discussed in the discussion section. This stochasticity leads us to describe these translocation experiments in probabilistic terms in order to try to characterize the probability of occurrence of the transient permeation structure. We thus set the criterion that translocation indeed occurred if we could detect a significant fluorescence of the droplet initially free of peptide within 30 min. This criterion can be expressed in terms of

Table 1
No translocation of fluo-penetratin is observed through asymmetric POPG:POPC or POPC:POPG bilayer.

DIB leaflet composition	Number of experiments with translocation of fluo-penetratin	Number of experiments with no translocation of fluo-penetratin	Number of experiments with translocation of fluo-RL9	Number of experiments with no translocation of fluo-RL9
POPC on the proximal leaflet, POPG on the other leaflet (distal)	0	6	0	5
POPG on the proximal leaflet, POPC on the other leaflet (distal)	1	5	1	5

fluorescence: we assumed that a significant translocation happened if the initially dark droplet had reached at least 10% of the fluorescence of the other droplet after 30 min. For all the following translocation experiments this criterion was used to determine the translocation probability namely the proportion of experiments for which a significant translocation was detected.

The negatively charged POPG seemed to play an important role in the translocation. In order to further address this role, different POPG:POPC ratios were used in the preparation of symmetric DIBs. We measured then the translocation probability of fluo-penetratin with various proportions of POPG in the POPG:POPC DIB as shown on Fig. 2. For a proportion of POPG in POPC equal to or above 40% of the total amount of lipids, a translocation probability above 75% was detected for fluo-penetratin. It was significantly different from the low translocation probability of RL9, found to be below 20%, thus showing that the observed crossing must be ascribed to the cell-penetrating ability of the fluo-penetratin. We thus concluded that a threshold level of 40% negatively charged POPG lipids in the DIB with which fluo-penetratin can interact, is necessary for the peptide to translocate through symmetric bilayers.

To determine whether this observed translocation of fluo-penetratin could be ascribed to certain characteristics of our model membrane, for example the occurrence of transient instabilities, we have also performed translocation tests of soluble fluorescent probe (FP488). These tests have been performed for different membrane compositions and the results are presented on Fig. 3. For a proportion of POPG in the POPG:POPC bilayer above 40%, translocation of FP488 was never observed. However, some permeation of FP488 through DIB containing enough POPC were detected. It is nevertheless important to notice that these instabilities of our model membranes occurred only for these lipid compositions for which no translocation of penetratin was detected and could thus not explain the membrane crossing behavior of penetratin through the DIBs. The systematic use of the RL9 negative control is another guarantee that the observed fluo-penetratin translocation events for certain lipid compositions are indeed due to penetratin cell penetrating ability and not due to transient bilayer instability.

3.2. Role of the fluo-penetratin concentration

We then checked for a possible effect of the fluo-penetratin concentration on the probability of the translocation process. For this purpose, experiments with 100% POPG DIBs and 2 μM fluo-penetratin in the droplet initially containing the peptides were designed. Results are shown on Fig. 4. The probability of occurrence of translocation of fluo-penetratin is strongly reduced at 2 μM as compared to the probability at 5 μM. This result is consistent with a concentration-dependent step during the translocation process of fluo-penetratin. This step is likely to imply several fluo-penetratins destabilizing collectively the bilayer. Indeed, if fluo-penetratin peptides would cross the DIB without interacting at any stage, this mechanism would lead to a translocated peptide amount at low concentration with a similar kinetics as at high concentration and a translocated amount proportional to the concentration. This is not what we have observed since in our conditions fluo-penetratin at low concentration does not translocate less but does not translocate at all (not significantly different from the negative control fluo-RL9).

3.3. Charge is not enough: the negatively charged POPS lipid does not enable penetratin translocation through symmetric POPG bilayer

Strong electrostatic interactions between POPG and penetratin may drive its adhesion and then translocation across the bilayer. Assuming that the interaction is purely electrostatic, it should be independent of the chemical nature of the lipid head group bearing the negative charge. To test this hypothesis, POPG was substituted with another anionic lipid: POPS. We first observed that the adhesion of the droplets

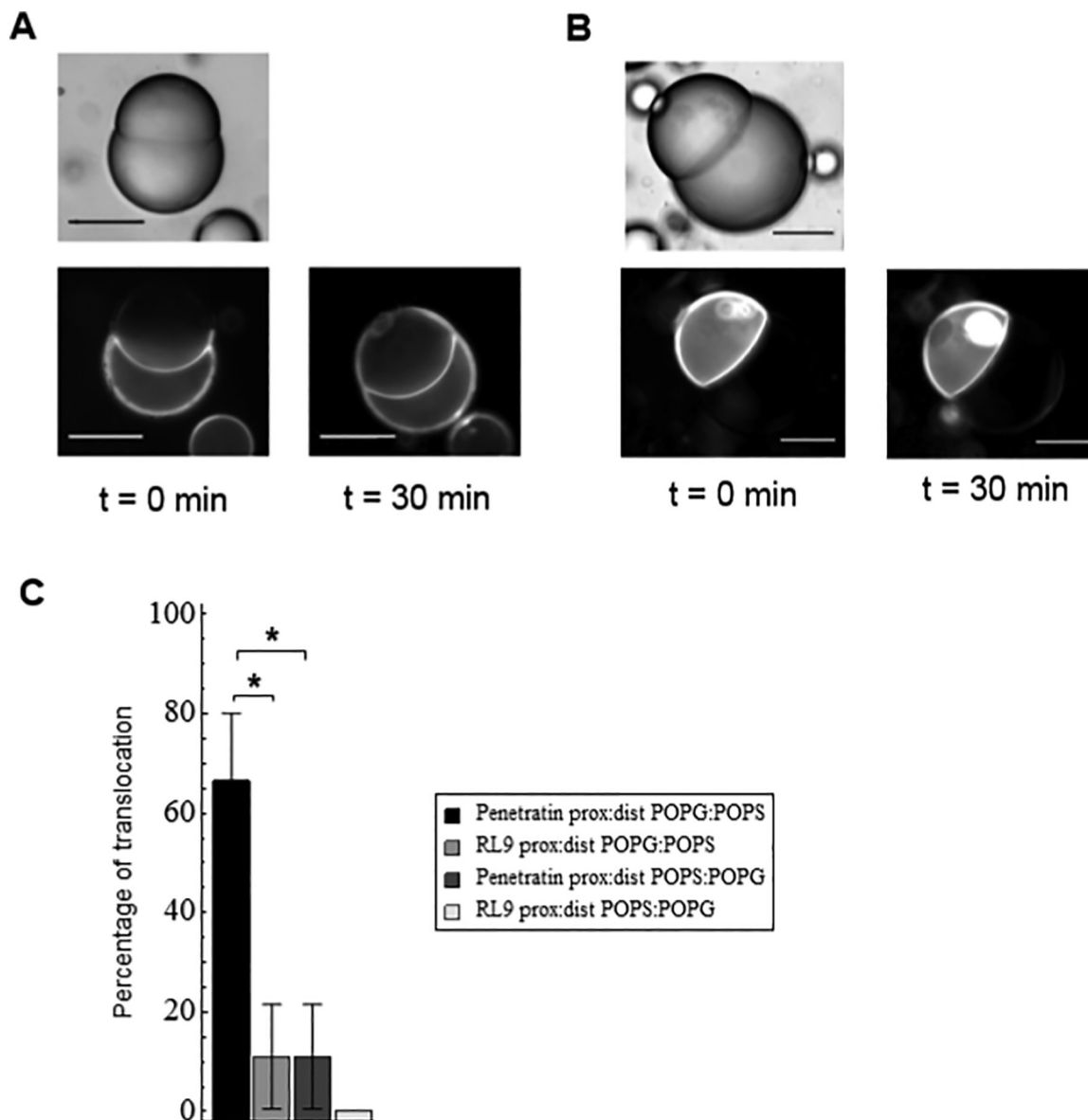


Fig. 8. Fluo-penetratin translocates through proximal:distal POPG:POPS DIBs but not through proximal:distal POPS:POPG DIBs. A: Translocation of fluo-penetratin (5 μ M) through a proximal:distal POPG:POPS DIB. Scale bar corresponds to 40 μ m. B: Absence of translocation of fluo-penetratin (5 μ M) through a proximal:distal POPS:POPG DIB. Scale bar corresponds to 40 μ m. C: Fluo-penetratin (5 μ M) translocates significantly through proximal:distal POPG:POPS DIBs ($n = 12$) as compared to fluo-RL9 ($n = 5$). This translocation of fluo-penetratin is significantly more frequent than the translocation of fluo-penetratin through proximal:distal POPS:POPG DIBs ($n = 9$).

was less favorable because the two droplets forming a pair did not flatten within tens of minutes to reach hemispherical shapes as was previously observed with POPG. This dependence of the shape of a pair of adhering droplets upon the nature of the lipids has already been described by Ben M'barek et al. [30]. The flattening of the two droplets is favored when the adhesion energy of two lipids monolayer in oil (with tails facing the oil) is higher and impaired when the water-oil interface covered by a monolayer of lipid has a higher surface tension [20]. These two parameters are likely to be different for POPG and POPS lipids and certainly explain the difference of shape of the POPG and POPS droplet pairs.

Regarding the translocation, we tested the fluo-penetratin translocation on five DIBs and only one experiment out of these five lead to the observation of a detectable translocation of fluo-penetratin through the 100% POPS bilayer (Fig. 5B): this proportion was different from the translocation probability through a 100% POPG bilayer and not significantly different from the translocation probability of fluo-RL9

through a 100% POPS bilayer. This absence of translocation cannot be ascribed to a lack of adhesion of the fluo-penetratin on the DIB as evidenced by the picture where the fluorescence of the DIB and monolayer of the droplet initially containing fluo-penetratin is clearly visible (Fig. 5A). It thus seemed that charge is not enough and that the nature of the interactions between the peptide and lipid, beside electrostatics, plays a role in favoring its translocation. It is also noticeable that these interactions take place in the presence of divalent magnesium cations (5 mM). The physicochemical properties of POPG and POPS are modified in the presence of magnesium [31,32] in a way that may impact their interactions with fluo-penetratin.

3.4. Characterization of the asymmetric DIBs: asymmetry can be maintained for 45 min

The biological bilayers are asymmetric with different lipid compositions in their two leaflets [33]. To go further to better mimic

biological bilayers and decompose the peptide translocation mechanism in steps corresponding to its interaction with each lipid leaflet of the bilayers we conducted translocation experiments on asymmetric DIBs. Asymmetric DIB have already been obtained by another method [34]. In our study, asymmetric DIBs could be obtained by mixing two populations of droplets with different lipid compositions. When two droplets from different populations adhered, the DIB was asymmetric with each leaflet having the lipid composition of its population. We had first to check whether this asymmetry is maintained with time since we cannot discard the possibility of events such as exchanges between the lipids in the droplets and the mixed lipids in the surrounding oil phase or flip-flop of the lipids in the DIB. To test these hypotheses, we investigated the possible appearance of DOPS lipids on a droplet surrounded by DOPC and adhering to a droplet surrounded by DOPS. We used fluorescently labeled annexin V (fluo-annexin V) in the presence of 2.5 mM CaCl_2 since annexin V is known to bind specifically to PS phospholipids. In this condition, the monolayer of the initially DOPC covered droplet can become fluorescent if enough DOPS access to the monolayer of this droplet (which means that asymmetry is partially lost). In a preliminary set of experiments, the sensitivity of this detection was investigated and it was shown that about 10% of DOPS was required to have a detectable fluorescent monolayer (see supplementary Fig. 2). We tracked four DOPC-DOPS pairs containing fluo-annexin V in the DOPC droplet for which no fluorescent monolayers could be observed over a 45 min time duration (Fig. 6). These experiments indicated that the asymmetry of the bilayer was stable for at least 45 min in our model system for a DOPC/DOPS asymmetric bilayer. We hypothesized that this was also true for POPC or POPS/POPG bilayers, which was confirmed by the observation of the adhesion or not of the peptide on the monolayers as explained below.

3.5. Fluo-penetratin does not cross proximal:distal POPG:POPC or POPC:POPG asymmetric bilayers

The possible translocation of fluo-penetratin through asymmetric bilayers formed by POPG in one leaflet and POPC in the other was tested with peptides initially either in the POPG or POPC side (the initial side of the peptide is named proximal, the other side distal). Typical experiments are shown in Fig. 7 and the results are summarized in Table 1. It is noticeable that when fluo-penetratin was present in the POPC droplet, the monolayer of the proximal droplet was not fluorescent, which confirmed that negatively charged lipids favor the recruitment of the peptides at the membrane. It is also noticeable that this absence of fluorescence was maintained over time when the POPC droplet adhered to a POPG droplet which is consistent with an absence of appearance of POPG on the monolayer of the POPC droplet: this further evidenced the conservation of the lipid asymmetry between leaflets in the bilayer in our model. Regarding the fluo-penetratin translocation, in both conditions (fluo-penetratin in the POPC or in the POPG droplet) no translocation of fluo-penetratin was observed. This result demonstrated that POPG on the proximal or distal leaflet was not enough for fluo-penetratin translocation.

3.6. Fluo-penetratin crossed proximal:distal POPG:POPS but not POPS:POPG asymmetric bilayers

The absence of translocation of fluo-penetratin through asymmetric proximal:distal POPG:POPC DIBs whereas the peptide crossed symmetric POPG DIBs may be ascribed to the absence of an anionic lipid on the distal leaflet to drive the peptide translocation towards the distal leaflet and then the free droplet. We showed indeed that fluo-penetratin translocated through proximal:distal POPG:POPS bilayers (Fig. 8) confirming that negatively charged lipids on the distal leaflet such as POPG (in the symmetric bilayer experiments) or POPS can drive the completion of the translocation process. On the other hand, fluo-penetratin did not translocate through proximal:distal POPS:POPG

asymmetric DIBs. This result showed the necessity of the specific presence of POPG on the proximal leaflet to drive the fluo-penetratin translocation: for this step of the translocation, which follows adhesion, charge is not enough and the specific chemical nature of POPG is required.

4. Discussion

4.1. The stochasticity of the translocation

We observed that for a given condition (lipid composition) we could observe different behaviors of fluo-penetratin as far as translocation is concerned: significant translocation (obtained when the initially dark droplet reaches at least 10% of the fluorescence signal of the fluo-peptide containing droplet after 30 min) could be observed or not. This stochastic nature of the translocation phenomenon is not what we would have expected from peptides individually interacting and crossing the membrane. Indeed it was expected that the behavior of the numerous peptides involved would have been averaged to a reproducible overall translocation rate. But we did not observe this average behavior and instead of determining a permeability coefficient for fluo-penetratin, we have searched to quantify a probability of translocation. We interpret this stochasticity of translocation as a dependence of this phenomenon on a specific event that can occur or not and trigger the translocation of some peptides. This event corresponds to the formation of a transient peptide-lipid structure that favors translocation. Different peptide-lipid structures have been proposed to explain the translocation of penetratin such as inverted micelles or pores [6,13,35,36]. The formation of this structure which lead to translocation is further suggested by the observed concentration dependence of the translocation process which is consistent with several peptides destabilizing the bilayer to enable the translocation.

4.2. A three step translocation mechanism for penetratin

Altogether, these results showed that in these experiments: (i) POPG or POPS on the proximal leaflet leads to an accumulation of fluo-penetratin on the bilayers as assessed by the observed fluorescence of the bilayer in the presence of these lipids (ii) negatively charged POPG lipids were always necessary on the proximal leaflet of the bilayer to favor fluo-penetratin translocation (iii) POPG or POPS on the distal leaflet could drive fluo-penetratin translocation. These conclusions lead us to propose a three-step mechanism for cationic peptide translocation. A first step consists in the accumulation of peptides on the membrane driven by recruitment of peptides by anionic lipids. A second step is the insertion/destabilization of the membrane that is initiated by the interaction of the fluo-penetratin with the lipids of the proximal leaflet. This step leads to the formation of a transient peptide-lipid structure that will enable the translocation. For this second step specific lipids are necessary as evidenced by the necessity of POPG as compared with POPS on the proximal leaflet. The third step is the completion of the crossing which needs a driving force that can be provided by the presence of anionic POPG or POPS on the distal leaflet.

4.3. Different roles for POPS and POPG in the penetratin translocation process

We observed that for both the symmetric and asymmetric DIB POPG could not simply be replaced by POPS and that the latter was less favorable to fluo-penetratin translocation. It thus emphasized that charge is not enough. Additional differences may come from: (i) Peptide-lipid interactions are not simply related to the number of charges and the chemical nature of the chemical groups bearing these charges may matter by impacting the electrostatic interactions or even through more complicated kind of interactions (steric for example) (ii) the transient peptide-lipid structures formed to start the translocation process

depend from properties of the lipid different from its charge, for example its shape, that may favor or impair the formation of such structures.

5. Conclusion

With the DIB model that gives us access to asymmetric bilayers, we have evidenced that negatively charged lipids are not equivalent. Indeed, POPG lipids were necessary in the proximal leaflet of the bilayer to favor the translocation of penetratin and penetratin and lipids likely form transient peptide-lipid structures that enable this translocation. Anionic lipids in the proximal leaflet are likely to favor the accumulation of peptides, while anionic lipids in the distal leaflet appear to provide a driving force for the crossing of penetratin. Since biological cell membranes of mammals do not contain PG lipid but many other negatively charged lipids, further investigation is required to identify those recruited by penetratin to translocate.

Author contributions

SK, PG, PS, JBB, MA and AW performed the experiments. SK, PG, PS, JBB analyzed the data. SS, ART, KN, VV, SC and NR designed the research. SK, PG, SS, AW, ART, KN, VV, SC and NR wrote the manuscript.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work benefited from the assistance of four dedicated interns: N Pricoupenko, S Bekkali, J Lebert and S Diallo. This work has been funded by regular fundings from Sorbonne Université, Centre National de la Recherche Scientifique and Ecole Normale Supérieure.

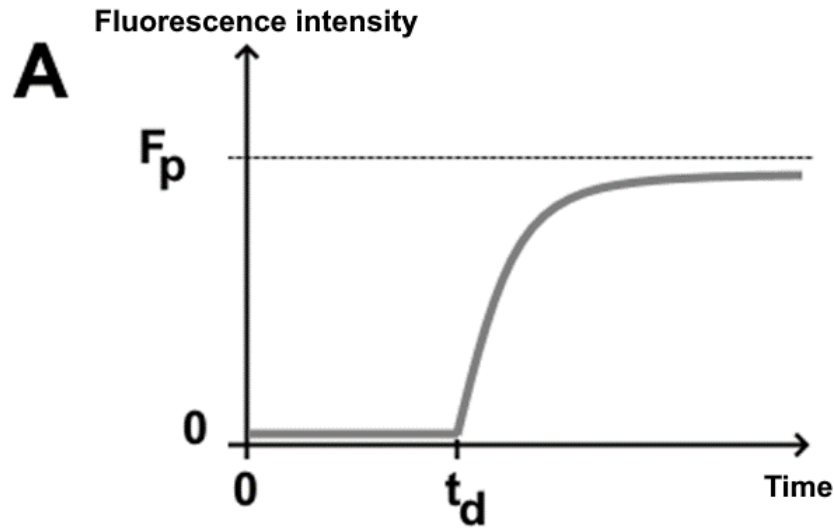
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2020.183415>.

References

- [1] S. Fawell, J. Seery, Y. Daikh, C. Moore, L.L. Chen, B. Pepinsky, J. Barsoum, Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 664–668.
- [2] M.C. Morris, L. Chaloin, F. Heitz, G. Divita, Translocating peptides and proteins and their use for gene delivery, *Curr. Opin. Biotechnol.* 11 (2000) 461–466.
- [3] V. Polyakov, V. Sharma, J.L. Dahlheimer, C.M. Pica, G.D. Luker, D. Piwnica-Worms, Novel tat-peptide chelates for direct transduction of technetium-99m and rhenium into human cells for imaging and radiotherapy, *Bioconj. Chem.* 11 (2000) 762–771.
- [4] V.P. Torchilin, R. Rammohan, V. Weissig, T.S. Levchenko, TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 8786–8791.
- [5] C.-Y. Jiao, D. Delaroché, F. Burlina, I.D. Alves, G. Chassaing, S. Sagan, Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 33957–33965.
- [6] C. Bechara, S. Sagan, Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett.* 587 (2013) 1693–1702.
- [7] H. Binder, G. Lindblom, Charge-dependent translocation of the Trojan peptide penetratin across lipid membranes, *Biophys. J.* 85 (2003) 982–995.
- [8] D. Persson, P.E.G. Thorén, M. Herner, P. Lincoln, B. Nordén, Application of a novel analysis to measure the binding of the membrane-translocating peptide penetratin to negatively charged liposomes, *Biochemistry* 42 (2003) 421–429.
- [9] P.E.G. Thorén, D. Persson, E.K. Esbjörner, M. Goksör, P. Lincoln, B. Nordén, Membrane binding and translocation of cell-penetrating peptides, *Biochemistry* 43 (2004) 3471–3489.
- [10] H.L. Amand, C.L. Boström, P. Lincoln, B. Nordén, E.K. Esbjörner, Binding of cell-penetrating penetratin peptides to plasma membrane vesicles correlates directly with cellular uptake, *Biochim. Biophys. Acta* 1808 (2011) 1860–1867.
- [11] A. Walrant, L. Matheron, S. Cribier, S. Chaignepain, M.-L. Jobin, S. Sagan, I.D. Alves, Direct translocation of cell-penetrating peptides in liposomes: a combined mass spectrometry quantification and fluorescence detection study, *Anal. Biochem.* 438 (2013) 1–10.
- [12] S.A. Wheaton, F.D.O. Ablan, B.L. Spaller, J.M. Trieu, P.F. Almeida, Translocation of cationic amphipathic peptides across the membranes of pure phospholipid giant vesicles, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 16517–16525.
- [13] J.-M. Swiecicki, A. Bartsch, J. Tailhades, M. Di Pisa, B. Heller, G. Chassaing, C. Mansuy, F. Burlina, S. Lavielle, The efficacies of cell-penetrating peptides in accumulating in large unilamellar vesicles depend on their ability to form inverted micelles, *Chembiochem, Eur. J. Chem. Biol.* 15 (2014) 884–891.
- [14] J.-M. Swiecicki, M. Di Pisa, F. Burlina, P. Lécorché, C. Mansuy, G. Chassaing, S. Lavielle, Accumulation of cell-penetrating peptides in large unilamellar vesicles: a straightforward screening assay for investigating the internalization mechanism, *Biopolymers* 104 (2015) 533–543.
- [15] M.Z. Islam, S. Sharmin, V. Levadnyy, S.U. Alam Shibly, M. Yamazaki, Effects of mechanical properties of lipid bilayers on the entry of cell-penetrating peptides into single vesicles, *Langmuir ACS J. Surf. Colloids.* 33 (2017) 2433–2443.
- [16] H.D. Herce, A.E. Garcia, J. Litt, R.S. Kane, P. Martin, N. Enrique, A. Rebollo, V. Milesi, Arginine-rich peptides destabilize the plasma membrane, consistent with a pore formation translocation mechanism of cell-penetrating peptides, *Biophys. J.* 97 (2009) 1917–1925.
- [17] H. Bayley, B. Cronin, A. Heron, M.A. Holden, W.L. Hwang, R. Syeda, J. Thompson, M. Wallace, Droplet interface bilayers, *Mol. Biosyst.* 4 (2008) 1191–1208.
- [18] K. Funakoshi, H. Suzuki, S. Takeuchi, Lipid bilayer formation by contacting monolayers in a microfluidic device for membrane protein analysis, *Anal. Chem.* 78 (2006) 8169–8174.
- [19] J. Huang, M. Lein, C. Gunderson, M.A. Holden, Direct quantitation of peptide-mediated protein transport across a droplet-interface bilayer, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 15818–15821.
- [20] A.R. Thiam, N. Bremond, J. Bibette, From stability to permeability of adhesive emulsion bilayers, *Langmuir ACS J. Surf. Colloids.* 28 (2012) 6291–6298.
- [21] X. Li, J. Huang, M.A. Holden, M. Chen, Peptide-mediated membrane transport of macromolecular cargo driven by membrane asymmetry, *Anal. Chem.* 89 (2017) 12369–12374.
- [22] G. van Meer, D.R. Voelker, G.W. Feigenson, Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 112–124.
- [23] D. Derossi, A.H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz, The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 10444–10450.
- [24] M. Magzoub, L.E.G. Eriksson, A. Gräslund, Conformational states of the cell-penetrating peptide penetratin when interacting with phospholipid vesicles: effects of surface charge and peptide concentration, *Biochim. Biophys. Acta* 1563 (2002) 53–63.
- [25] S. Balayssac, F. Burlina, O. Convert, G. Bolbach, G. Chassaing, O. Lequin, Comparison of penetratin and other homeodomain-derived cell-penetrating peptides: interaction in a membrane-mimicking environment and cellular uptake efficiency, *Biochemistry* 45 (2006) 1408–1420.
- [26] C.E.B. Caesar, E.K. Esbjörner, P. Lincoln, B. Nordén, Membrane interactions of cell-penetrating peptides probed by tryptophan fluorescence and dichroism techniques: correlations of structure to cellular uptake, *Biochemistry* 45 (2006) 7682–7692.
- [27] A. Walrant, I. Correia, C.-Y. Jiao, O. Lequin, E.H. Bent, N. Goasdoué, C. Lacombe, G. Chassaing, S. Sagan, I.D. Alves, Different membrane behaviour and cellular uptake of three basic arginine-rich peptides, *Biochim. Biophys. Acta* 1808 (2011) 382–393.
- [28] L.C.M. Gross, A.J. Heron, S.C. Baca, M.I. Wallace, Determining membrane capacitance by dynamic control of droplet interface bilayer area, *Langmuir ACS J. Surf. Colloids.* 27 (2011) 14335–14342.
- [29] P. Walde, K. Cosentino, H. Engel, P. Stano, Giant vesicles: preparations and applications, *Chembiochem, Eur. J. Chem. Biol.* 11 (2010) 848–865.
- [30] K. Ben M'barek, D. Ajjaji, A. Chorlay, S. Vanni, L. Forêt, A.R. Thiam, ER membrane phospholipids and surface tension control cellular lipid droplet formation, *Dev. Cell* 41 (2017) 591–604.e7.
- [31] H. Hauser, G.G. Shipley, Interactions of divalent cations with phosphatidylserine bilayer membranes, *Biochemistry* 23 (1984) 34–41.
- [32] Y. Mao, Y. Du, X. Cang, J. Wang, Z. Chen, H. Yang, H. Jiang, Binding competition to the POPG lipid bilayer of Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, and K⁺ in different ion mixtures and biological implication, *J. Phys. Chem. B* 117 (2013) 850–858.
- [33] P.F. Devaux, R. Morris, Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes, *Traffic Cph. Den.* 5 (2004) 241–246.
- [34] W.L. Hwang, M. Chen, B. Cronin, M.A. Holden, H. Bayley, Asymmetric droplet interface bilayers, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 5878–5879.
- [35] M. Di Pisa, G. Chassaing, J.-M. Swiecicki, Translocation mechanism(s) of cell-penetrating peptides: biophysical studies using artificial membrane bilayers, *Biochemistry* 54 (2015) 194–207.
- [36] W.B. Kauffman, T. Fuselier, J. He, W.C. Wimley, Mechanism matters: a taxonomy of cell penetrating peptides, *Trends Biochem. Sci.* 40 (2015) 749–764.

Supplementary figure S1: kinetics of fluo-penetratin translocation for different lipid DIB composition



B

DIB composition	t_d (minutes)			τ (minutes)			F_p/F_s		
	mean	min	max	mean	min	max	mean	min	max
Symmetric 100%POPG	3	0	19	7	1	17	0.23	0.20	0.25
Symmetric POPG/POPC 4/1	9	0	25	5	5	6	0.32	0.30	0.35
Symmetric POPG/POPC 3/2	0	0	0	1	1	2	0.31	0.25	0.38
Symmetric POPG/POPC 2/3	5	0	20	8	2	14	0.11	0.10	0.12
Asymmetric POPG(proximal): POPS(distal)	1	0	5	6	3	10	0.30	0.12	0.54

We have performed an analysis of the kinetics of the fluo-penetratin translocation for the 5 DIB compositions for which translocation was the predominant observed behavior. Half of these experiments could be well fitted with the following function for the fluorescence intensity of the initially peptide-free droplet (figure A):

$$F(t) = 0 \text{ if } t < t_d$$

$$F(t) = F_p(1 - \exp(-(t - t_d)/\tau)) \text{ if } t \geq t_d$$

t_d is the delay for the onset of translocation.

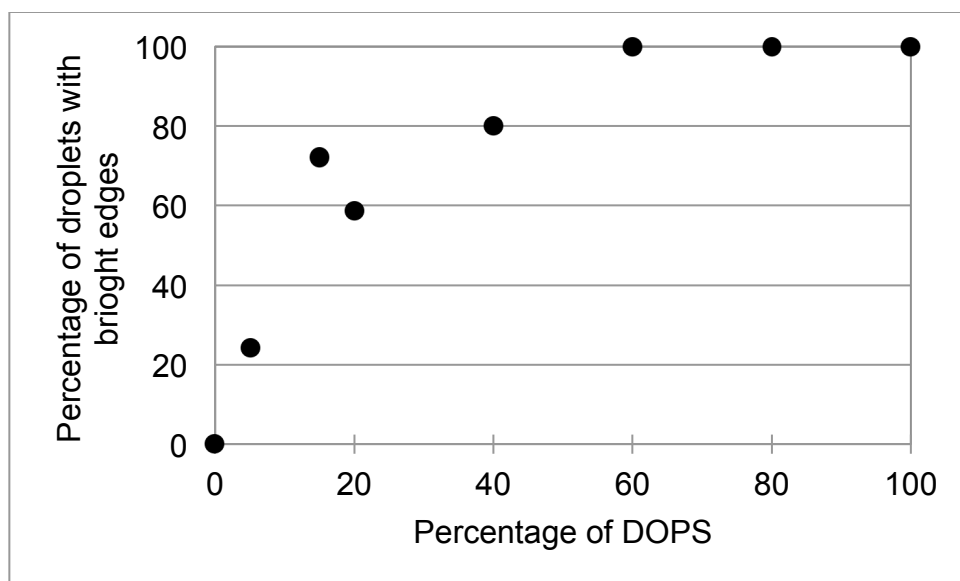
τ is the crossing characteristic time.

F_p is the fluorescence intensity at the plateau.

Half of the experiments could not be fitted with this function for one of these reasons: (i) Not enough data points had been gathered through time (ii) The plateau was not clearly reached at the end of the acquisition (iii) Translocation had slightly started before the first observation point which prevented to measure the full kinetics. The parameters obtained by fitting of the fluorescence intensity kinetics are summarized on figure B. For each parameter, the mean value obtained over all the experiments for this DIB composition is given. As an illustration of the variability of the fitted parameters the extreme values (minimum and maximum) obtained for each condition are also given.

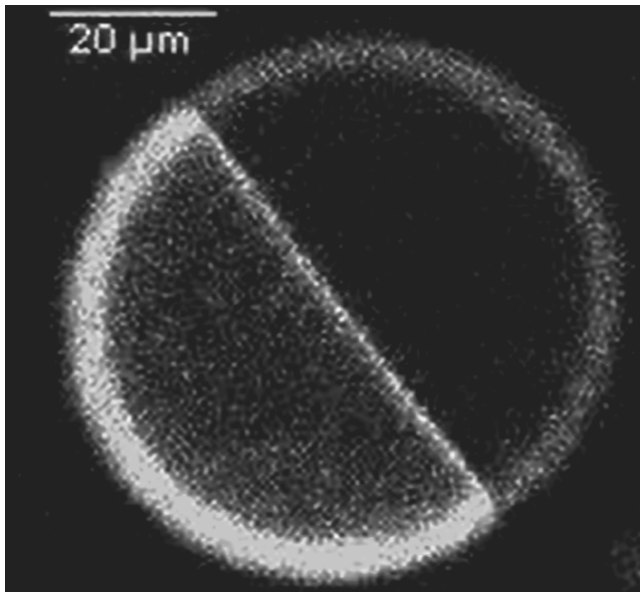
It is an interesting feature of these kinetics that a delay (quantified by t_d) is sometimes observed before the onset of the translocation. This may indicate a time necessary for the formation of a transient peptide-lipide structure that will drive the translocation. It is consistent with a stochastic formation of this structure. The characteristic time τ of the translocation process is always of the order of a few minutes for all DIB compositions but a great dispersion of its precise value is observed (ranging from 1 minute to 17 minutes). This may indicate a certain variability of the peptide-lipid structures that will lead to the translocation. The fluorescence plateau F_p is quantified relatively to the fluorescence intensity of the source droplet initially containing the fluo-penetratin F_s . It is noteworthy that despite a certain variability this plateau is generally observed at a ~ 0.2 ratio which indicates that the equilibrium between the source and the target droplet is not reached. Thus it appears that in our experimental conditions we also evidenced a transient behavior of the structure enabling translocation.

Supplementary figure S2: sensitivity of DOPS detection with fluo-annexin V



Different populations of droplets with various percentages of DOPS (in DOPC) containing fluo-annexin V were made. The percentage of droplets the monolayers of which were clearly brighter than the bulk was quantified. From this study it appears that fluo-annexin V is sensitive enough to detect ~10% of DOPS in a monolayer.

Supplementary figure S3: Repartition between edges and bulk of fluo-penetratin in a POPG pair of droplets



A confocal microscopy image of a pair of droplets with a symmetric POPG DIB is shown. The left droplet was initially free of fluo-penetratin. The image is taken at $t = 10$ min. It shows that both in the initially peptide free droplet and in the reservoir droplet a significant enrichment of fluo-penetratin is observed on the edges (monolayers and DIB) and that some peptides also remain in the aqueous bulk of the droplets.

Sujet : Étude des mécanismes de translocation du peptide vecteur Pénétratine sur membranes modèles formées à l'interface de gouttes

Résumé : Les peptides vecteurs se caractérisent par leur capacité à traverser les membranes cellulaires. Ils peuvent transporter des cargaisons au sein des cellules avec une faible cytotoxicité et présentent donc un intérêt particulier pour la délivrance de molécules bioactives. Leur internalisation a lieu par endocytose et translocation directe. Bien que des partenaires d'interaction de la membrane plasmique aient été identifiés, les mécanismes moléculaires de la translocation directe restent hypothétiques et les structures clés de ces mécanismes n'ont pu être clairement identifiées. Nous avons étudié la translocation du peptide vecteur Pénétratine sur un modèle original de membranes formées à l'interface de gouttes. Nos expériences ont montré que la translocation revêt un caractère coopératif et stochastique et est dépendante de la présence de lipides anioniques nécessaires au recrutement du peptide et à sa traversée. Cependant, la nature de la tête polaire des lipides anioniques a un impact sur la translocation et le recrutement du peptide par ces lipides est une condition nécessaire mais non suffisante à la translocation. Celle-ci est favorisée en présence de lipides POPG mais pas en présence de lipides POPS. Les expériences sur bicouches asymétriques ont également montré que le feuillet distal est impliqué dans ce processus. Le potentiel de membrane en présence de Pénétratine a été étudié afin de dégager des pistes de description de la déstabilisation de la bicouche. En parallèle, nous nous sommes penchés sur le développement d'une puce microfluidique pour la formation et le piégeage des membranes afin d'obtenir une plateforme performante pour l'étude des peptides vecteurs.

Mots clés : Peptides vecteurs, translocation, membranes modèles, asymétrie lipidique, microfluidique

Subject : Study of the translocation mechanisms of the cell-penetrating peptide Penetratin on droplet interface bilayers

Abstract: Cell-penetrating peptides can cross cell membranes and deliver biologically active molecules into cells with a limited cytotoxicity. They are internalized by endocytic pathways as well as by direct translocation. Although interaction partners of the plasma membrane have been identified, the molecular mechanisms of the direct translocation pathway remain hypothetical and the key structures of these mechanisms are not clearly identified. We studied the translocation of the cell-penetrating peptide Penetratin on membrane models formed at the droplets interface. Our experiments demonstrated a stochastic and cooperative character of the translocation process. The presence of anionic lipids is crucial for the recruitment of the peptide and its translocation. However, the nature of the anionic polar head group of lipids dictates the favourability of the bilayer crossing. Indeed, translocation was observed on POPG bilayers but not on POPS bilayers. Experiments on asymmetric bilayers showed that the composition of the distal leaflet is decisive for the translocation. Investigation on the membrane potential in the presence of Penetratin was studied in order to obtain insights into the bilayer destabilisation. Finally, a last approach consists in developing a microfluidic chip to obtain a high-performance platform for the study of cell-penetrating peptides.

Keywords : Cell-penetrating peptides, translocation, model membranes, lipid asymmetry, microfluidic