



HAL
open science

Synthèse et caractérisation de nouveaux amphipols, polymères amphiphiles dédiés à l'étude de protéines membranaires

Anais Marconnet

► To cite this version:

Anais Marconnet. Synthèse et caractérisation de nouveaux amphipols, polymères amphiphiles dédiés à l'étude de protéines membranaires. Biologie cellulaire. Université Paris Cité, 2019. Français. NNT : 2019UNIP7092 . tel-04749879

HAL Id: tel-04749879

<https://theses.hal.science/tel-04749879v1>

Submitted on 23 Oct 2024

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

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Paris

Ecole doctorale BioSPC n° 562

Laboratoire de biologie physico-chimique des protéines membranaires

Synthèse et caractérisation de nouveaux amphipols, polymères amphiphiles dédiés à l'étude de protéines membranaires

Par Anaïs Marconnet

Thèse de doctorat de biologie moléculaire

Dirigée par Manuela Zoonens

Présentée et soutenue à Paris le 01/10/2019

Devant un jury composé de :

Christine EBEL, Directeur de recherche, Institut de Biologie Structurale (UMR5075),
rapporteur

James Sturgis, Professeur, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires
(UMR7255), *rapporteur*

Andréea Pasc, Professeur, Laboratoire Lorrain de Chimie Moléculaire (UMR7053),
examineur

Cédric Orelle, Chargé de recherche, Institut de Biologie et Chimie des Protéines
(UMR5086), *examineur*

Manuela Zoonens, Chargée de recherche, Institut de Biologie Physico-Chimique
(UMR7099), *directeur de thèse*

Fabrice Giusti, Ingénieur de recherche, Institut de Chimie Séparative de Marcoule
(UMR5257), *membre invité*



Titre : synthèse et caractérisation de nouveaux amphipols, polymères amphiphiles dédiés à l'étude de protéines membranaires

Résumé :

Les protéines membranaires (PMs) jouent un rôle déterminant dans de nombreux processus biologiques essentiels au bon fonctionnement de l'organisme. Impliquées dans de nombreuses pathologies, elles constituent plus de 60 % des cibles thérapeutiques actuelles. Cependant, leur étude s'avérant très souvent délicate, elles représentent moins de 2 % des structures résolues et répertoriées dans la banque de données des protéines (PDB). En effet, les PMs sont conventionnellement extraites de leur milieu lipidique natif en présence de détergents commerciaux permettant leur maintien en phase aqueuse au sein de micelles mixtes mais ne garantissant pas pour autant leur stabilité sur des périodes prolongées. Cette instabilité résulte d'interactions défavorables s'établissant entre la PM et les détergents environnants pour conduire à la dénaturation (entraînant la perte d'activité biologique) et à l'agrégation (générant la précipitation) de la PM compromettant ainsi les études structurales et fonctionnelles. En conséquence, depuis les années 90, de nouveaux systèmes amphiphiles moléculaires (tensioactifs), macromoléculaires (polymères amphiphiles ou amphipols) et supramoléculaires (nanodisques, bicelles...) visant à garantir une meilleure stabilité des PMs extraites de leur membrane native ont été développés. Mon laboratoire d'accueil est le laboratoire pionnier des amphipols dont la version la plus connue est l'amphipol A8-35, dérivé de l'acide poly(acrylique) comportant des chaînes latérales octyle. Ce dernier s'est rapidement révélé comme étant une des alternatives les plus pertinentes aux détergents commerciaux, en formant après échange avec le détergent, de petits complexes PMs-APols stables et de taille bien définie. Plus d'une décennie se sera écoulée avant que certains copolymères du styrène et de l'acide maléique, les SMAs, ne soient connus pour permettre l'extraction et la stabilisation des PMs maintenues alors au sein de structures type lipodisque. Ainsi, dans une première partie de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'impact de la nature (linéaire ou cyclique) des chaînes latérales sur les propriétés physicochimiques et biochimiques des amphipols. Nous avons synthétisé de nouveaux amphipols analogues de l'A8-35 comportant des chaînes latérales cycliques aliphatiques (pour obtenir des CyclAPols) ou aromatiques (pour obtenir des ArylAPols). La comparaison de leurs propriétés avec celles des SMAs et l'A8-35, a montré que ces nouveaux composés solubilisaient efficacement différents types de membranes biologiques et stabilisaient les PMs modèles testées. Dans la continuité de la recherche et développement

de nouvelles structures, nous nous sommes intéressés à l'impact de la nature (cyclique ou linéaire) des parties polaires sur les propriétés d'un amphipol non chargé. Nous avons pris modèle sur un amphipol neutre (NAPol) dérivant du tris-(hydroxyméthyl)acrylamidométhane (THAM) préalablement existant et développé en collaboration avec un laboratoire partenaire. L'hydrosolubilité de ce NAPol étant conférée par la présence de groupement glucose, nous avons envisagé la possibilité de remplacer avantageusement les groupements sucres par des chaînes tétra(éthylène)glycol. Dans la deuxième partie de cette thèse nous avons rapporté tout le travail d'investigation et de synthèse concernant l'élaboration d'un nouvel amphipol (PEGAPol) neutre comportant des groupements polaires linéaires de type poly(éthylène) glycol (PEG). En raison des délais imposés, une seule structure a pu être obtenue. Elle dérive d'une forme polymérisable d'un détergent commercial, le C₈E₄. L'optimisation de la synthèse de ce PEGAPol ainsi que l'étude de ses propriétés physicochimiques et biochimiques restent des domaines à explorer.

Mots clefs : polymères amphiphiles, amphipols, CyclAPols, ArylAPols, PEGAPols, protéines membranaires, membranes, solubilisation, stabilisation

Title : synthesis and characterization of new amphipols, amphiphilic polymers for membrane protein study

Abstract :

Membrane proteins (PMs) play an essential role in several biological processes vital to proper functioning of the organism. Involved in many pathologies, they constitute more than 60% of current therapeutic targets. However, their study is often very tricky, therefore they represent less than 2% of overall structures solved and listed in the Protein Data Bank (PDB). Indeed, the PMs are conventionally extracted from their native lipid environment in the presence of commercially available detergents and kept soluble in the aqueous solution within mixed micelles whereas their stability were not guaranteed for extended periods. This instability results from unfavorable interactions between PM and surrounding detergents that lead to denaturation (resulting in loss of biological activity) and aggregation (generating precipitation) of PM thereby compromising structural and functional studies. Since the 1990s, new amphiphilic molecular (surfactants), macromolecular (amphiphilic polymers or amphipols) and supramolecular (nanodiscs, bicelles ...) systems aiming at improving the stability of the PMs

extracted from their native membrane have been developed. My host laboratory is a pioneer in the development of amphipols whose a best characterized version is the A8-35 amphipol, derived from poly(acrylic) acid endowed with octyl side chains. The latter was quickly found to be one of the most relevant alternatives to commercial detergents, by forming, after exchange with the detergent, small stable PMs-APols complexes of well-defined size. More than a decade later, styrene and maleic acid copolymers (SMAs) were used to extract and stabilize the PMs within structures like lipodiscs. Thus, in a first part of this thesis, we were interested in the impact of the nature (linear or cyclic) side chains on the physicochemical and biochemical properties of amphipols. We have synthesized some new A8-35-like amphipols with cyclic aliphatic (yielding CyclAPols) or aromatic (yielding ArylAPols) side chains. Comparison of their properties with those of SMAs and A8-35, showed that these new polymers solubilized efficiently different types of biological membranes and stabilized the tested model PMs. Within the context of research and development of new structures, we were also interested in the impact of the nature (cyclic or linear) of the polar moieties on the properties of an uncharged amphipol. We tried to design this new polymer according to a previously existing neutral amphipol (NAPol) model that derived from tris (hydroxymethyl) acrylamidomethane (THAM) and which has been developed in collaboration with a partner laboratory: we chose to substitute the glucose groups that ensure NAPol water solubility with tetra(ethylene) glycol chains. In the second part of this thesis, we reported all the investigations and synthesis work concerning the development of this new neutral amphipol (PEGAPol) comprising linear polar groups of poly(ethylene) glycol (PEG). Due to the imposed deadlines, we could yield only one structure that derived from a polymerizable form of a commercially available detergent, the C₈E₄. The optimization of the PEGAPol synthesis as well as the study of its physicochemical and biochemical properties remain to be investigated.

Keywords : amphiphilic polymers, amphipols, CyclAPols, ArylAPols, PEGAPols, membrane proteins, membranes, solubilization, stabilization

"Je ne perds jamais. Soit je gagne, soit j'apprends "

Nelson Mandela

1 Remerciements

Ces trois années de thèse ont été une merveilleuse aventure tant sur le plan professionnel que sur le plan personnel, et cela n'aurait pas été possible sans l'implication de nombreuses personnes à qui je témoigne toute ma sympathie.

Je tiens en premier lieu à remercier les membres du jury pour l'attention et le temps passé à la lecture de ce manuscrit et plus particulièrement les rapporteurs, qui ont accepté de juger mon travail de thèse.

Je voudrais ensuite remercier chaleureusement Bruno Miroux, directeur de l'Institut de Biologie Physico-chimique et de l'UMR7099, ainsi que Manuela Zoonens, ma directrice de thèse, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse dans le cadre du Laboratoire d'Excellence (Labex) DYNAMO dont le sujet me tenait particulièrement à cœur. Je la remercie également de m'avoir fait confiance en me laissant beaucoup de liberté dans le développement des divers travaux présentés dans ce manuscrit.

J'exprime toute ma gratitude à Fabrice Giusti, ingénieur de recherche en chimie, qui m'a encadrée pour la partie synthèse et accompagnée avec bienveillance tout au long de ma thèse (même après son départ de l'unité). Il m'a été d'une aide précieuse et d'un soutien sans faille dans les bons moments comme dans les moins bons qui ont jalonné ces trois années. Ma reconnaissance va également à Christel Le Bon, ingénieure au laboratoire, pour ses conseils avisés, sa bonne humeur et ses ravitaillements à toute heure de la journée, POC et petits en-cas en tout genre (même si mes kilos ne te remercient pas !). Je les remercie tous les deux pour leur disponibilité et leur patience à toute épreuve.

Mes remerciements vont également à nos collaborateurs, Jutta Rieger, chargée de recherche au sein de l'équipe chimie des polymères à Jussieu, qui m'a initiée aux joies de la polymérisation, Christophe Tribet, directeur de recherche à l'ENS, et Julien Dupré de Baubigny post-doctorant au sein du même établissement, avec qui nous avons pu longuement échanger autour des phénomènes de solubilisation.

Merci à Martin Picard, directeur de recherche, d'avoir, avec une bienveillante pédagogie, accepté de partager avec moi ses connaissances en biochimie, domaine dans lequel j'étais plutôt novice. J'ai une pensée toute particulière pour Françoise Bonneté, chargée de recherche, qui m'a suivie (au sens figuré comme au sens propre !) durant la majeure partie de mon parcours universitaire. Je garde un excellent souvenir de tous les bons moments passés ensemble, qu'ils soient dans le cadre professionnel (sur la ligne SAXS à Grenoble) ou personnel.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de l'unité pour cette ambiance très chaleureuse et amicale ainsi que pour leur accueil. Je remercie particulièrement Edith, la meilleure gestionnaire, pour sa disponibilité et sa gentillesse, Alexandre, pour nos discussions parfois « houleuses » qui ont données naissance à des réflexions pertinentes ; Sandrine, avec qui on ne compte plus les fous rires à la cantine et enfin Oana qui a sans doute été ma plus belle rencontre au laboratoire. Je la remercie pour ses conseils bienveillants, son oreille attentive et son soutien dans les épreuves traversées...

Pour finir, j'ai une pensée pour toutes les personnes qui m'ont apporté leur soutien, m'ont donné confiance en moi et en mes capacités de réussir, sans elles toute cette aventure n'aurait pas été possible. Parmi elles, je citerai Brigitte Vray, mon enseignante en physique-chimie au lycée qui n'a épargné ni son temps ni son énergie pour m'encourager. Un peu plus tard, mon chemin à croisé celui de Christine Pépin, maître de conférence, mais aussi mon enseignante en L3 et M1 à l'université d'Avignon, sa gentillesse et son soutien sans faille m'ont permis de progresser.

Je n'oublie pas mes amis, qui malgré mes nouvelles peu fréquentes, sont restés à mes côtés. Merci à Alexandra, avec qui j'ai partagé et partage encore de très bons moments.

Ces remerciements seraient incomplets si je n'y incluais pas mes proches qui m'ont épaulée bien avant que je ne débute ma thèse, et qui ont su me faire confiance malgré mes choix parfois « risqués ». Mes remerciements vont plus particulièrement à ma mère, mon père, mon frère et mes grands-parents, qui sont au cœur de cette réussite aujourd'hui avec moi. Enfin, je te remercie, Léo, pour l'amour, la confiance et le soutien que tu m'as apporté jour après jour. Sans oublier pour ce merveilleux cadeau que nous offre la vie.

A la mémoire de mon grand-père,

A ma fille.

Table des matières

1.	INTRODUCTION	16
1.1	Les membranes biologiques : rôles et composition	16
1.2	Les protéines membranaires (PMs)	17
1.2.1	Structures et fonctions	17
1.2.2	Intérêt de l'étude des PMs	18
1.3	Outils développés pour le maintien en solution des PMs	19
1.3.1	L'approche conventionnelle : l'utilisation de détergents.....	19
1.3.2	Détergents non conventionnels.....	22
1.3.3	Nanodisques.....	24
1.3.4	Bicelles	25
1.3.5	Peptides amphiphiles	26
1.3.6	Tensioactifs fluorés.....	26
1.3.7	Polymères	28
1.4	Objectif de la thèse.....	37
1.5	Protéines membranaires utilisées comme modèles.....	40
1.5.1	Bactériorhodopsine	40
1.5.2	YidC-GFP	41
1.5.3	Mac B	41
1.5.4	SERCA 1a.....	42
2	MATERIELS ET METHODES	43
2.1	Matériel	43
2.2	Méthode	45
2.2.1	Synthèse et caractérisation de nouveaux amphipols dérivés de l'A8-35.....	45
2.2.2	PEGAPols.....	58
2.2.3	Protocole de solubilisation.....	64
2.2.4	Protocole de piégeage de la BR.....	67
2.2.5	Stabilité des protéines	68
2.2.6	Chromatographie d'exclusion stérique (SEC).....	69
2.2.7	Diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	72
2.2.8	La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).....	74
3	RESULTATS.....	76

3.1	CHAPITRE 1 : les Amphipols porteurs de groupements latéraux cycliques	76
3.1.1	Synthèses et caractérisations des nouvelles classes de polymères	76
3.1.2	Caractérisations biochimiques et physico-chimiques.....	88
3.1.3	Discussion.....	125
3.1.4	Conclusion.....	131
3.2	CHAPITRE 2 : développement de nouveaux amphipols neutres porteurs de groupements poly(oxy-éthynélique) : PEGAPols.....	131
3.2.1	Vers un nouveau design de polymères amphiphiles neutres	131
3.2.2	Elaboration de voies de synthèse.....	135
3.2.3	Tentative de synthèse de PEGAPols	137
3.2.1	Discussion.....	148
3.2.2	Conclusions et perspectives.....	152
4	CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	153
5	BIBLIOGRAPHIE.....	155
6	ANNEXE 1 : Spectres RMN des composés 1 à 6	170
7	ANNEXE 2 : SAXS	176

Table des illustrations

Figure 1. Différents modèles de membranes.....	17
Figure 2. Représentation des différents types de protéines membranaires	17
Figure 3. Représentation schématisée d'un monomère de détergent.	19
Figure 4. Description du paramètre d'empilement	20
Figure 5. Différentes familles de tensioactifs.....	21
Figure 6. Mécanismes possibles d'inactivation des PMs.....	22
Figure 7. Structures chimiques de nouveaux détergents dérivés du DDM	23
Figure 8. Description des étapes à réaliser pour incorporer une PM dans des NDs	24
Figure 9. Mécanisme de formation des bicelles.....	25
Figure 10. Structures chimiques de plusieurs molécules de tensioactifs fluorés.	28
Figure 11. Voie de synthèse schématisée de l'A8-35	29
Figure 12. Structure chimique des amphipols fonctionnalisés dérivant de l'A8-35	30
Figure 13. Structures chimiques de plusieurs polymères amphiphiles chargés insensibles au pH.	32
Figure 14. Structure chimique des SMAs	33
Figure 15. Structure chimique des DIBMAs.....	34
Figure 16. Voies de synthèses des différentes générations de NAPols.....	35
Figure 17. Protocole de piégeage en APols de la BR solubilisée en OTG.....	67
Figure 18. Courbe de calibration de la colonne SUPEROSE 12 10/300 GL	71
Figure 19. Représentation des fluctuations d'intensité et d'une fonction d'autocorrélation.....	73
Figure 20. Courbes SAXS de polymères présentant différents comportements en solution	75
Figure 21. Formule générale des APols	76
Figure 22. Schéma général de synthèse de l'APol de référence, l'A8-35 et des nouveaux APols.	78
Figure 23. Mécanisme de formation de la liaison amide entre le PAA et une amine primaire.....	78
Figure 24. Transposition de l'intermédiaire <i>O</i> -acylurée en <i>N</i> -acylurée.....	79
Figure 25. Structures générales des CyclAPols et ArylAPols	80
Figure 26. Structures générales des autres APols	81
Figure 27. Analyse RMN ¹ H du CyclAPol C ₆ -C ₁ -50-15	82
Figure 28. Analyse RMN ¹ H de l'ArylAPol Ph-50- ⁴ Et-15.....	83
Figure 29. Analyse RMN ¹³ C du CyclAPol C ₆ -C ₁ -50-15	84
Figure 30. Analyse RMN ¹³ C de l'ArylAPol Ph-50- ⁴ Et-15.....	85
Figure 31. Profils SEC obtenus après élution et détection à 220 nm des polymères	87
Figure 32. Cinétiques de solubilisation des liposomes de DMPC avec différents polymères	90
Figure 33. Exemple de quantification de la fluorescence sur gel SDS-PAGE par image J	91
Figure 34. Exemple pour décrire l'efficacité de solubilisation de Mac B par les APols	92
Figure 35. Extraction de YidC-GFP par différents polymères.....	94
Figure 36. Gels révélant la fluorescence de la GFP fusionnée à YidC	95
Figure 37. Cinétique de solubilisation de YidC-GFP par les polymères les plus pertinents	96
Figure 38. Gel SDS-PAGE montrant l'efficacité de solubilisation des différents APols testés	97
Figure 39. Description de la notation pour évaluer la solubilisation des membranes de RS	98
Figure 40. Cinétiques de solubilisation de la membrane du RS.....	99
Figure 41. Photo des tubes de centrifugation après une solubilisation de la membrane pourpre.	100
Figure 42. Solubilisation de la membrane pourpre fusionnée à la DMPC.....	101
Figure 43. Cinétiques de solubilisation suivies pas DLS de la membrane pourpre fusionnée.....	103
Figure 44. Proportions de BR native obtenue après échange de l'OTG	108
Figure 45. Courbes de thermostabilité et températures de dénaturation (T _m) de la BR après piégeage	110
Figure 46. Stabilité de la BR après solubilisation de la membrane pourpre fusionnée.....	111
Figure 47. Dosage d'une activité ATPasique par enzymes couplées.....	113
Figure 48. Suivi de l'absorbance du NADH à 340 nm en fonction de la concentration en APol	115

Figure 49. Profils d'élution enregistrés à 220 nm des particules DMPC / polymères	117
Figure 50. Courbes SAXS des particules DMPC / polymères	120
Figure 51. Profils SEC à 220, 280 et 554 nm des particules BR / lipides / polymères	122
Figure 52. Profils d'élution des complexes YidC-GFP / polymères	124
Figure 53. Hypothèses sur les comportements possibles des polymères en solution aqueuse.....	134
Figure 54. Différentes stratégies de synthèse envisagées pour l'obtention des PEGAPols	135
Figure 55. Réaction du C ₈ E ₄ avec le chlorure d'acryloyle pour obtenir le monomère 1.	137
Figure 56. Polymérisation de l'acrylate de C ₈ E ₄	137
Figure 57. Copolymérisation de l'acrylate de C ₈ E ₄ avec le <i>N,N</i> -diméthylacrylamide.....	138
Figure 58. Différentes voies de synthèse envisagées pour l'obtention du monomère 6.	139
Figure 59. Synthèse du TEGOTHP (1).....	139
Figure 60. Mécanisme de formation et de déprotection du TEGOTHP (1).....	140
Figure 61. Synthèse du THPOTEGOMs (2).....	140
Figure 62. Mécanisme de formation du THPOTEGOMs.	140
Figure 63. Substitution du MsOTEGOTHP par un amidure supposée générer le composé 6.	141
Figure 64. Synthèse du THPOTEGN ₃ (3).....	141
Figure 65. Mécanisme de substitution du mésylate par un azoture.....	142
Figure 66. Synthèse du THPOTEGNH ₂ (4).....	142
Figure 67. Mécanisme de la réaction de Staudinger et de formation du composé 4.....	142
Figure 68. Synthèse du composé (5) par <i>N</i> -acryloylation du composé (4).	142
Figure 69. Synthèse du composé 6 via la voie a par <i>N</i> -alkylation.	143
Figure 70. Synthèse du composé 8.....	143
Figure 71. Mécanisme de l'amination réductive permettant l'obtention du composé 8	144
Figure 72. Description des étapes de synthèse de la voie d devant conduire au composé 8.....	144
Figure 73. CRP effectuée par RAFT d'un monomère M.....	145
Figure 74. Spectre ¹ H RMN (300 MHz, CDCl ₃) du brut réactionnel du monomère 6.....	146
Figure 75. Profils SEC obtenus après injection du polymère obtenu à partir du monomère 6	147
Figure 76. Comparaison des log p de différents monomères.....	153

Table des tableaux

Tableau 1. Signaux caractéristiques des groupements latéraux exploités en RMN ^1H	54
Tableau 2. Signaux caractéristiques des groupements latéraux exploités en RMN ^{13}C	56
Tableau 3. Masses moléculaires (MM) et rayons hydrodynamiques (R_H) des standards	71
Tableau 4. Caractérisation des principaux CyclAPols synthétisés	80
Tableau 5. Caractérisation des principaux ArylAPols synthétisés.....	81
Tableau 6. Caractérisation des autres APols synthétisés	81
Tableau 7. Tableau récapitulatif des rayons hydrodynamiques	87
Tableau 8. Efficacité de solubilisation de Mac B par différents polymères greffés à 25 %	92
Tableau 9. Efficacité de solubilisation de Mac B par différents polymères greffés à 50 %	93
Tableau 10. Efficacité de solubilisation de YidC-GFP par différents polymères greffés à 50 %..	95
Tableau 11. Ensemble des résultats de solubilisation de la membrane pourpre fusionnée.....	102
Tableau 12. Efficacité de solubilisation des nouveaux polymères	105
Tableau 13. Récapitulatif des données de piégeage et de maintien en solution après piégeage..	108
Tableau 14. Résultats de stabilisation de la BR.....	112
Tableau 15. Pourcentages d'activité ATPasique restituée après ajout de C_{12}E_8	116
Tableau 16. Tableau récapitulatif des données extraites des profils SEC de particules de polymères seuls et des particules de polymères / DMPC	118
Tableau 17. Rayons, déterminés par DLS, obtenus par deux traitements différents	119
Tableau 18. Données SAXS reportant les rayons de giration, diamètres maximum et I_0 par particule	121
Tableau 19. Tableau récapitulatif des données extraites des SEC à 220 nm de particules BR / lipides / polymères	122
Tableau 20. Rayons, déterminés par DLS, obtenus par deux traitements différents	123
Tableau 21. Tableau récapitulatif des données de fluorescence extraites des SEC	124

Liste des abréviations

AcOEt : acétate d'éthyle

ADP : adénosine diphosphate

AIBN : azobisisobutyronitrile

APol : amphipol

ArylAPol : amphipols greffés avec des cycles aromatiques

ATP : adénosine triphosphate

BR : bactériorhodopsine

CAC : concentration d'agrégation critique

CCM : chromatographie sur couche mince

C_mE_n : monoalkyléther de poly(éthylène glycol)

C₈E₄ : mono-octyléther de tétraéthylène glycol

C₁₂E₈ : monododecyléther d'octaéthylène glycol

CMC : concentration micellaire critique

CyclAPols : amphipols greffés avec des cycles saturés

Cyclo : cyclohexane

DCE : 1,2-dichloroéthane

DCM : dichlorométhane

DDM : n-dodecyl- α - (or β -) D-maltopyranoside

DIBMA : diisobutylene maleic acid

DLS : diffusion dynamique de la lumière (dynamic light scattering)

DMF : *N,N*-diméthylformamide

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

EtOH : éthanol

GFP : protéine fluorescente verte (green fluorescent protein)

MeOH : méthanol

NAD : nicotinamide adénine dinucléotide

NAPol : amphipol non-ionique

NDs : nanodisques

OTG : n-octyl- β -D-thioglucopyranoside

PCC-mal : trans-4-(trans-4'-propylcyclohexyl)cyclohexyl- α -D-maltoside

PEP : phosphoenolpyruvate

Pi : phosphate inorganique

PMs : protéines membranaires

RAFT : polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (reversible addition-fragmentation chain transfer)

RS : réticulum sarcoplasmique

RMN : résonance magnétique nucléaire

SAXS : diffusion des rayons X aux petits angles (small angle X-rays scattering)

SDS : sodium dodécylsulfate

SEC : chromatographie d'exclusion de taille (size exclusion chromatography)

SMA : copolymère de styrène et d'acide maléique (styrene maleic acid copolymer)

TX-100 : Triton X-100

1. INTRODUCTION

L'étude des protéines membranaires (PMs) est un parcours semé d'embûches. Ces protéines, particulièrement fragiles, sont en effet difficiles à produire et à manipuler. Malgré leur intérêt majeur, puisqu'elles représentent 70 % des cibles thérapeutiques actuelles, seulement ~ 2 % d'entre elles font l'objet de structures résolues et répertoriées dans la banque de données de protéines (Protein Data Bank). Cette introduction a pour objectif de présenter les PMs et l'intérêt de leur étude, puis de rappeler les principaux outils existants pour améliorer leur maintien en solution aqueuse sans altérer leur conformation native.

1.1 Les membranes biologiques : rôles et composition

Le rôle premier d'une membrane biologique est de délimiter des compartiments. La membrane cellulaire, également appelée membrane plasmique, illustre bien ce rôle en séparant le milieu intracellulaire, appelé cytoplasme, du milieu extracellulaire. C'est aussi le rôle des membranes des organelles situées à l'intérieur du cytoplasme des cellules eucaryotes. Toutefois, en fonction de leur composition, les membranes biologiques peuvent être le siège d'une fonction particulière comme, par exemple, dans les chloroplastes la membrane des thylakoïdes spécialisée dans la photosynthèse.

Les membranes biologiques sont composées de lipides et de protéines. Les lipides sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire qui possèdent une partie hydrophile, appelée tête polaire, et une partie hydrophobe, dite queue apolaire. Ces derniers ont la faculté de s'auto-assembler sous forme d'une bicouche lipidique dans laquelle les têtes polaires hydrophiles sont orientées vers le milieu extérieur et les chaînes hydrophobes vers l'intérieur de la membrane. Les protéines associées à la membrane sont dites protéines membranaires. Elles jouent des rôles essentiels au sein de la bicouche lipidique en servant notamment au transport de molécules à travers la membrane plasmique, à la réception et à la transmission de signaux, à l'adhérence cellulaire ou encore à la catalyse enzymatique. A titre d'exemple de la proportion des différents composants, la membrane cytoplasmique est constituée, en poids sec de membrane, de 50 % de lipides, principalement de phospholipides, et de 50 % de protéines (Cooper, 2000). L'épaisseur d'une membrane est d'environ 7,5 nm. Son architecture a longtemps été qualifiée de mosaïque fluide, liquide à deux dimensions dans laquelle les molécules sont distribuées de manière aléatoire (Singer and Nicolson, 1972). Ce modèle a été enrichi en 2005 en tenant compte des

disparités de compositions et d'épaisseur de la bicouche lipidique ainsi que du taux d'occupation des protéines (Engelman, 2005) (*cf. Figure 1*).

Elément sous droit, diffusion non autorisée

Figure 1. Différents modèles de membranes. Panneau A : modèle de la mosaïque fluide proposé par Singer et Nicolson. Panneau B : modèle enrichi en 2005 par Engelman.

1.2 Les protéines membranaires (PMs)

1.2.1 Structures et fonctions

Les PMs présentent une très grande diversité structurale et fonctionnelle. Comme toutes protéines, ce sont des polymères d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques (liaisons amide). En fonction de leur mode d'association à la bicouche lipidique, il existe deux catégories de PMs dites intrinsèques et extrinsèques (*cf. Figure 2*).

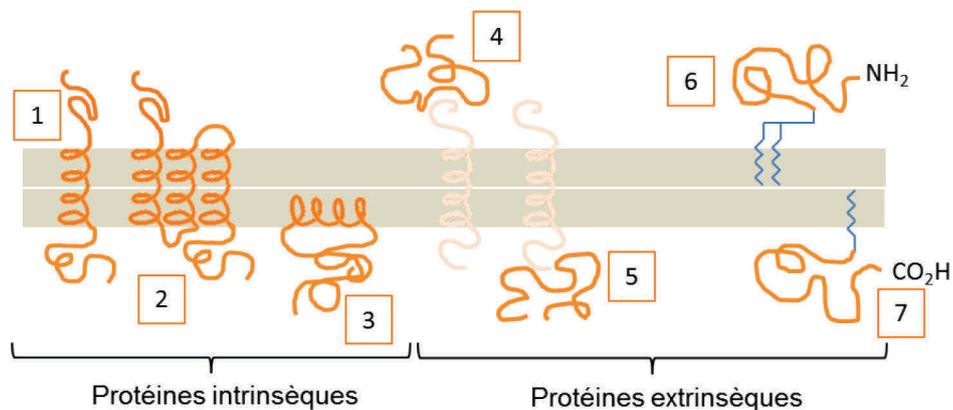


Figure 2. Représentation des différents types de protéines membranaires (adapté de (Alberts et al., 2015)).

Les PMs intrinsèques, aussi appelées transmembranaires ou encore intégrales, interagissent avec la bicouche lipidique de la membrane. La chaîne polypeptidique de ces protéines peut traverser les deux feuillets de la membrane une ou plusieurs fois (segments transmembranaires) (*cf. Figure 2 exemples 1 et 2*) ou être associée à un seul des deux feuillets de la membrane (*cf. Figure 2 exemple 3*). Les domaines transmembranaires peuvent former un faisceau d'hélices α , des tonneaux de brins- β , ou encore un ensemble des deux dans le cas des complexes protéiques formés de plusieurs sous-unités. Ces protéines ont des propriétés amphiphiles ; elles comportent

une partie hydrophobe capable d'interagir avec les chaînes aliphatiques des phospholipides et une partie hydrophile qui interagit avec l'environnement aqueux sur les deux faces des membranes.

Les protéines extrinsèques, dites également périphériques, n'interagissent pas avec la partie hydrophobe de la membrane, mais avec la partie polaire des lipides de la bicouche ou d'une PM intégrale par l'intermédiaire de liaisons faibles de type hydrogènes ou Van der Waals) avec les extrémités hydrophiles des phospholipides ou des protéines intégrales (*cf. Figure 2 exemples 4 et 5*). Elles peuvent également posséder une ancre hydrophobe en liant de façon covalente un glyco-phosphatidyl-inositol sur la face extracellulaire de la membrane (*cf. Figure 2 exemple 6*) ou un acide gras (acide myristique et palmitique) sur la face intracellulaire de la membrane plasmique (*cf. Figure 2 exemple 7*). Dans le cas des exemples 4 et 5, ces protéines peuvent facilement être détachées de la membrane en utilisant des moyens physico-chimiques doux (pH, concentration en sel...).

1.2.2 Intérêt de l'étude des PMs

La quantité de gènes codant pour l'expression des PMs est estimée entre 25 % et 30 % du génome (Chamberlain et al., 2004). Ce nombre reflète la diversité de cette catégorie de protéines, qui jouent un rôle clé dans le bon fonctionnement de la cellule et donc de l'organisme dans son intégralité. Chez l'homme, de nombreuses pathologies (Sanders and Nagy, 2000), telles que certains cancers, maladies neuro-dégénératives, maladies génétiques, immunitaires ou encore inflammatoires sont liés à un dysfonctionnement de PMs. Face à leur intérêt thérapeutique grandissant, les laboratoires pharmaceutiques cherchent à développer des médicaments ciblant ces PMs. Depuis la première structure de PM obtenue en 1985, seulement 917 structures uniques (dénombrée à partir de la base de Steve White, <https://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/>) ont été résolues et répertoriées dans la banque de données de protéines. Malgré plusieurs révolutions technologiques en biologie structurale (microscopie électronique, nanocristallisation, modélisation moléculaire), il faudra certainement encore de nombreuses années pour déterminer l'ensemble des structures restant à découvrir. La caractérisation structurale et la compréhension du fonctionnement de ces cibles sont donc devenues un enjeu majeur afin de permettre la conception des médicaments de demain. Une des limitations principales dans ce domaine de recherche est alors de produire et

de purifier ces PMs en solution dans leur état natif et homogène, correspondant à celui adopté *in vivo*. Les paragraphes suivants ont pour objectifs de présenter les principaux outils déjà existants pour la solubilisation et la stabilisation des PMs en solution.

1.3 Outils développés pour le maintien en solution des PMs

1.3.1 L'approche conventionnelle : l'utilisation de détergents

La solubilisation ainsi que le maintien en solution des PMs sous leur forme native requièrent l'utilisation de tensioactifs. En effet, en raison de leur caractère hydrophobe, les PMs sont difficiles à solubiliser et tendent à agréger en solution aqueuse. L'approche conventionnelle implique l'utilisation de détergents (Helenius and Simons, 1975; Tanford and Reynolds, 1976). Les détergents sont définis comme des molécules amphiphiles, avec une partie hydrophile et une partie hydrophobe, capable de dissoudre les graisses (*cf. Figure 3*).

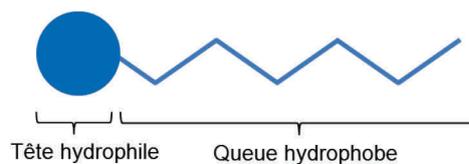


Figure 3. Représentation schématique d'un monomère de détergent.

Ces molécules ont la propriété de s'auto-associer en milieu aqueux pour former des assemblages, afin de minimiser les contacts chaînes hydrophobes-eau. Ce phénomène se produit au-delà d'une certaine concentration dite concentration micellaire critique (CMC). La CMC dépend de la structure du détergent mais aussi des conditions physico-chimiques de la solution (température, pH, force ionique, etc.). La forme des assemblages (micellaire, cylindrique, lamellaire,...) formés par les détergents en milieu aqueux peut être anticipé à partir d'un paramètre appelé le paramètre d'empilement, déterminé par l'équation (1), qui tient compte du rapport des volumes des parties hydrophobes et hydrophiles d'un monomère (Israelachvili et al., 1977; Neugebauer, 1990) (*cf. Figure 4*).

$$P = \frac{V}{a \cdot l} \quad (1)$$

Avec :

V : volume de la chaîne du détergent

a : aire de la section à l'interface

l : longueur de la chaîne

Elément sous droit, diffusion non autorisée

Figure 4. Description du paramètre d'empilement (Israelachvili, 1992).

Jusqu'à la fin des années 80, les biologistes devaient se contenter de détergents naturels (sels biliaires) ou fournis par l'industrie (Triton, Tween, Lubrol...). Même si certains d'entre eux restent encore utilisés de nos jours, la plupart présente des inconvénients pour une utilisation en biochimie (absorbance UV, hétérogénéité, formation de micelles de taille importante...). Ces inconvénients ont amorcé le développement de nombreux détergents qui peuvent être répartis en trois catégories selon la nature de leur tête polaire (*cf. Figure 5*) :

- ioniques (cationiques ou anioniques). Ces détergents chargés sont reconnus pour leur capacité d'extraction, mais cet avantage est contrasté par leur tendance à dénaturer les PMs. Un exemple très connu est le sodium dodecylsulfate (SDS) très utilisé comme agent de dénaturation pour la séparation des protéines par électrophorèse sur gel d'acrylamide (Laemmli, 1970).

- zwitterioniques. Ces détergents chargés sont électriquement neutres. Ils sont moins agressifs vis-à-vis des PMs que les détergents portant une charge nette.

- non-ioniques ou neutres. Cette catégorie de détergents est la plus fréquemment utilisée dans le cadre d'études structurales en raison de leur caractère « doux » non dénaturant vis-à-vis des PMs (Long et al., 2005; Lund et al., 1989; VanAken et al., 1986). Un exemple très connu est le n-dodecyl- β -D-maltopyranoside (DDM).

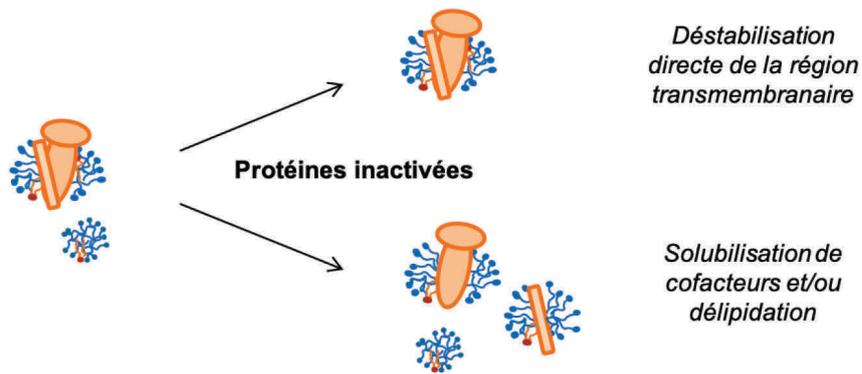


Figure 6. Mécanismes possibles d'inactivation des PMs par intrusion des chaînes alkyles des détergents dans la région transmembranaire et par délipidation ou dissociation d'un cofacteur dans la phase micellaire.

1.3.2 Détergents non conventionnels

Depuis les années 2000, de nouveaux détergents non conventionnels moins agressifs, dérivés du DDM (ou dérivés de saccharides) ont été développés dans le but d'extraire, de stabiliser et de permettre les études structurales des PMs soit par cristallisation, RMN ou microscopie électronique. Parmi eux on retrouve les tensioactifs suivants (*cf. Figure 7*).

- Les dérivés du maltose-neopentyl glycol (MNG)

Suite au développement des tripodes amphiphiles (Yu et al., 2000), le groupe de Gellman a synthétisé des tensioactifs de type neopentyl glycol (Chae et al., 2010). Ces composés possèdent un carbone quaternaire central permettant de lier deux têtes hydrophiles glucosides ou maltosides à deux chaînes hydrophobes. Comparativement à certains détergents classiques dont le DDM, les composés MNG ont montré une grande capacité à stabiliser plusieurs PMs. De plus, le MNG-3 a permis la cristallisation du cytochrome *b₆f* avec une résolution comparable à celle des cristaux formés en présence de DDM (Chae et al., 2010). Ce tensioactif a également rendu possible la cristallisation en phase cubique de la protéine de fusion du récepteur adrénergique humain β 2-T4-lysozyme, qui n'avait pas pu être réalisée avec le DDM (Thorsen et al., 2014).

- Les Cymals

Ces composés (commercialisés par Anatrace) dérivent eux aussi du DDM. Ils comportent une partie hydrophobe avec un groupement cyclohexyle en bout de chaîne. Il est à noter que le

cyclohexyl-hexyl- β -D-maltoside (cymal-6) a ainsi été utilisé avec succès pour la cristallisation de sous unités du cytochrome c oxydase (Ostermeier et al., 1997).

- **Les PCC-mal**

Afin de générer peu de contacts dénaturants à l'interface protéine/tensioactif, le groupe de Wolfram Welt a imaginé des tensioactifs dont la partie hydrophobe est encore moins flexible que celle des cymals, les PCC-mal. Leurs têtes polaires sont constituées de maltose, connu pour ses effets non dénaturants, leurs parties hydrophobes composées de deux groupements cyclohexyle, pour gagner en rigidité et leurs propyle terminal permettant d'améliorer l'affinité du tensioactif avec la surface hydrophobe de la protéine font des PCC-mal des molécules amphiphiles prometteuses (Hovers et al., 2011).

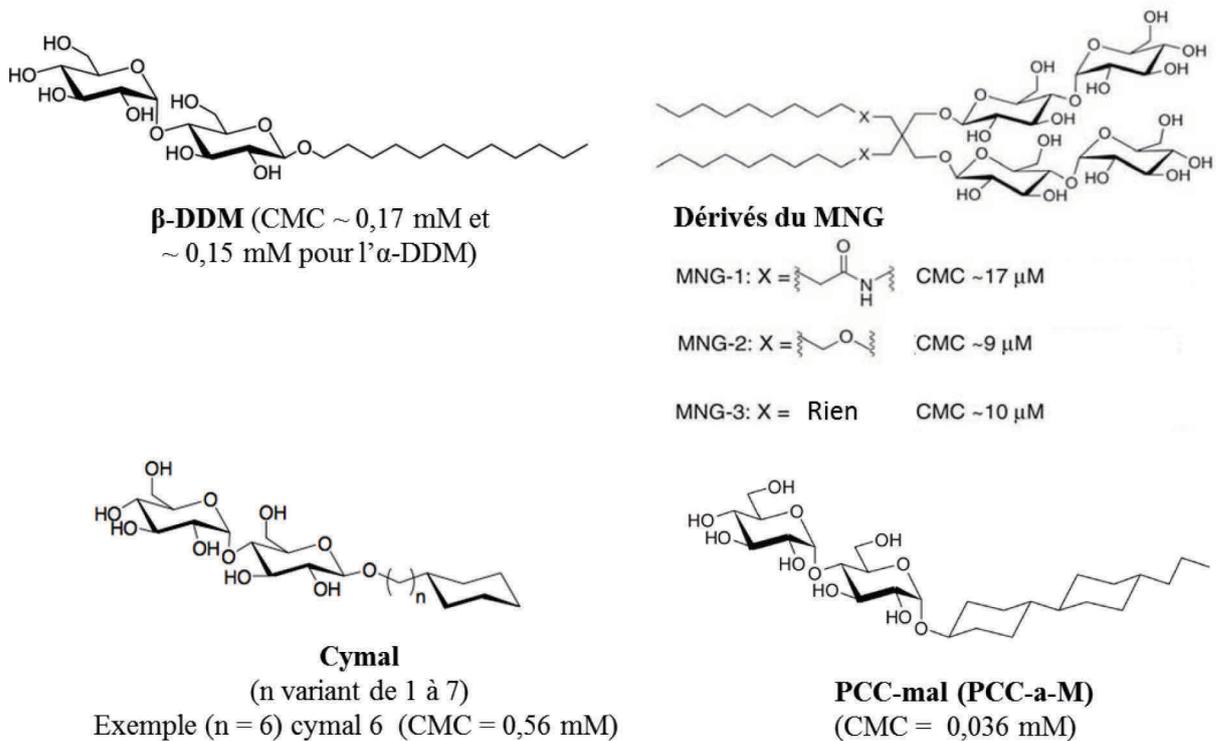


Figure 7. Structures chimiques de nouveaux détergents dérivés du DDM.

1.3.3 Nanodisques

Depuis leur conception à la fin des années 90, l'utilisation des nanodisques (NDs) dans le cadre de l'étude des PMs a fait l'objet d'un nombre considérable de publications et sont décrits dans de nombreuses revues (Bayburt and Sligar, 2010; Borch and Hamann, 2009; Denisov and Sligar, 2016; Malhotra and Alder, 2014; Nath et al., 2007; Popot, 2010; Ritchie et al., 2009). Cette technologie, considérée comme l'une des plus importantes de ces 20 dernières années, a été développée par Steven Sligar (Université de l'Illinois) et ses collaborateurs. Elle consiste à transférer des PMs, préalablement solubilisées en détergent, au sein d'une bicouche lipidique entourée par une protéine d'assemblage (Bayburt et al., 2002).

L'incorporation d'une PM dans des NDs requière plusieurs étapes (*cf. Figure 8*). Dans la procédure initiale, décrite en 1998 (Bayburt et al., 1998), l'apolipoprotéine A1 humaine était la protéine utilisée pour stabiliser les disques lipidiques. Aujourd'hui, parmi les nombreuses apolipoprotéines existantes, la protéine MSP1 (Membrane Scaffold Protein, ou protéine d'assemblage), protéine chimérique dérivée de l'apolipoprotéine A1, est la plus couramment utilisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Figure 8. Description des étapes à réaliser pour incorporer une PM dans des NDs (adapté de (Denisov and Sligar, 2017)). Pour former les NDs, il faut dans un premier temps, mélanger les protéines d'assemblage, les lipides et la PM dans une solution de détergent. Il est à souligner que la PM doit être stable dans le détergent utilisé et que le rapport protéine d'assemblage / lipides est primordial pour l'obtention de préparations homogènes et de tailles désirées de NDs. Le détergent est ensuite éliminé par dialyse ou par addition de billes de polystyrène (Bio-beads). La préparation ainsi obtenue contient généralement un mélange de NDs dans lesquels sont insérés les PMs et d'autres NDs vides, c'est pourquoi, une étape de chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est ensuite réalisée pour les séparer. Dans certains cas, cette étape s'avère insuffisamment efficace, il est alors possible de purifier l'échantillon par chromatographie d'affinité, si la PM porte une étiquette d'affinité.

Les avantages des NDs sont multiples. En effet, la présence d'un environnement lipidique permet de mimer l'environnement natif des PMs, bénéfique pour stabiliser ces dernières. De plus, leur petite taille par rapport à des vésicules lipidiques les rend compatibles avec de nombreuses techniques biophysiques. Néanmoins, cette technologie n'est pas sans certains inconvénients comme par exemple l'extraction des PMs par des détergents ce qui peut être à

l'origine de déstabilisation transitoire de la protéine, ou encore le diamètre des NDs qui limite la taille des protéines à insérer. Il semblerait que les protéines d'assemblage soient l'élément prédominant pour la formation des NDs puisque qu'elles peuvent s'associer avec le domaine transmembranaire d'une PM et la stabiliser même en quasi-absence de lipides (Salvador et al., 2019).

1.3.4 Bicelles

Le nom « bicelles » provient de la contraction des mots « micelles » et « bicouches » (Sanders et Landis, 1995). Les bicelles et les NDs sont conceptuellement liés. En effet, dans les deux cas, l'objectif est de fournir aux PMs un environnement lipidique sous forme de bicouche tout en formant des particules nanométriques. Ces dernières sont des particules discoïdales composées de phospholipides à chaîne longue qui forment la région plane et de détergent ou phospholipides à chaîne courte qui composent les rebords latéraux (*cf. Figure 9*). La taille des bicelles peut être modulée en ajustant le rapport lipide / détergent. Ces assemblages ont l'avantage d'être beaucoup plus petites et stables que les liposomes, le nombre de fusions entre bicelles étant réduit. Les bicelles sont particulièrement attractives en RMN du solide (De Angelis et al., 2006; Park et al., 2006) mais elles peuvent aussi être utilisées en cristallographie des rayons X (Faham and Bowie, 2002; Wang et al., 2012).

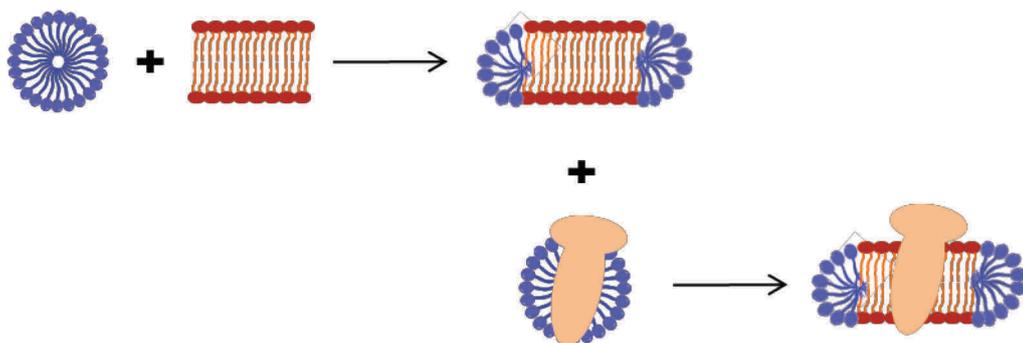


Figure 9. Mécanisme de formation des bicelles.

1.3.5 Peptides amphiphiles

L'utilisation des peptides amphiphiles en tant que substituts aux détergents pour stabiliser les PMs en solution aqueuse a été lancée au début des années 90 (Dempsey and Sternberg, 1991; Schafmeister et al., 1993). Il existe différents peptides de longueur variable (peptides courts de 6 à 8 résidus (Santoso et al. 2002, Vauthey et al. 2002), et peptides longs de 20 à 25 résidus appelés peptitergents (Schafmeister et al. 1993) ou détergents lipopeptidiques (McGregor et al. 2003)). D'autres oligopeptides ayant la capacité de s'assembler avec des lipides dans des structures ressemblant aux NDs existent. Néanmoins, ces approches restent faiblement caractérisées et utilisées actuellement.

1.3.6 Tensioactifs fluorés

Les tensioactifs fluorés ont sensiblement la même structure que les tensioactifs dits « classiques », hormis la présence d'atomes de fluor portés par leurs queues hydrophobes. Cette particularité leur confère un comportement plus doux vis-à-vis des PMs que les détergents classiques pour deux raisons 1) les lipides, sous-unités protéiques et cofacteurs hydrophobes des PMs ne sont pas ou peu dissous dans les micelles de tensioactifs fluorés en raison de la faible miscibilité des alcanes et alcanes perfluorés (Kirsch, 2004; Kissa, 1994; Mukerjee, 1994; Nakano et al., 2002), 2) les chaînes alkyles fluorées, étant plus rigides et plus volumineuses que leurs homologues hydrocarbonés, elles sont moins intrusives donc moins déstabilisantes vis-à-vis des PMs.

Depuis plus de 25 ans, l'équipe "Chimie Bioorganique et Systèmes Amphiphiles" (CBSA) de l'université d'Avignon est investie dans la mise au point de tensioactifs fluorés et hémifluorés. La première série de molécules a été la série des F-TAC (*cf. Figure 10*), constitués d'une tête polaire oligomérique polyhydroxylique dérivée du Tris-(hydroxyméthyl)aminométhane (THAM) et d'une chaîne hydrophobe perfluorée (Breyton et al., 2004; Chabaud et al., 1998). Si ces tensioactifs ne sont pas capables d'extraire les protéines des membranes et ne présentent aucun pouvoir détergent vis-à-vis de celles-ci, ils peuvent néanmoins maintenir en solution les PMs sans aucune dénaturation (Chabaud et al., 1998) mais avec un maintien en solution restreint en raison d'une trop faible affinité entre la chaîne fluorée lipophile et le domaine transmembranaire de la protéine. Par conséquent, une nouvelle série

de tensioactifs hémifluorés a été imaginée, les HF-TAC (Barthélémy et al., 1999) pour accroître cette affinité, (*cf. Figure 10*). L'extrémité éthyle hydrocarbonée a permis d'augmenter significativement la stabilité des complexes HF-TAC/protéine pour arriver à des résultats comparables au DDM (Barthélémy et al., 2002; Breyton et al., 2004). L'inconvénient de ces premières structures reste toutefois leur polydispersité.

Afin de s'affranchir de ce problème, de nombreux autres tensioactifs fluorés sont apparus dans la littérature, notamment des tensioactifs à tête polaires de type aminoxyde (Chaudier et al., 2002), PEG de longueur contrôlée (Breyton et al., 2009) ou encore saccharidiques dérivés du galactose (Chabaud et al., 1998) (*cf. Figure 10*), du lactose (HF-Lac) (Lebaupain et al., 2006) ou du maltose (HF-Malt) (Polidori et al., 2006). Malgré la capacité de ces molécules à maintenir en solution et à stabiliser les PMs, leur inconvénient majeur est l'hétérogénéité de leur assemblage avec et sans PMs.

La forme des micelles étant dépendante de la géométrie du monomère, de nouvelles stratégies visant à jouer sur le paramètre d'empilement ont été mises au point : augmenter le volume de la tête polaire par rapport à la partie hydrophobe particulièrement volumineuse, ou diminuer la chaîne fluorée. L'étude des composés avec des têtes polaires di et trisubstitués forment comme attendu avec des chaînes en F_6 , de micelles de petites tailles bien définies. Les composés disubstitués tels que le F_6 -Diglu et le H_2F_6 -Diglu se sont révélés être les plus efficaces pour le maintien de l'intégrité des PMs (Breyton et al., 2009). Les propriétés et applications pour ces tensioactifs totalement ou partiellement fluorés sont nombreuses et largement décrites (Breyton et al., 2010; Popot, 2010). Pour les composés à tête maltoside, des micelles de plus petites tailles que les HF-Malts ont pu être obtenus avec des chaînes fluorées en F_2 ou F_4 (Polidori et al., 2016).

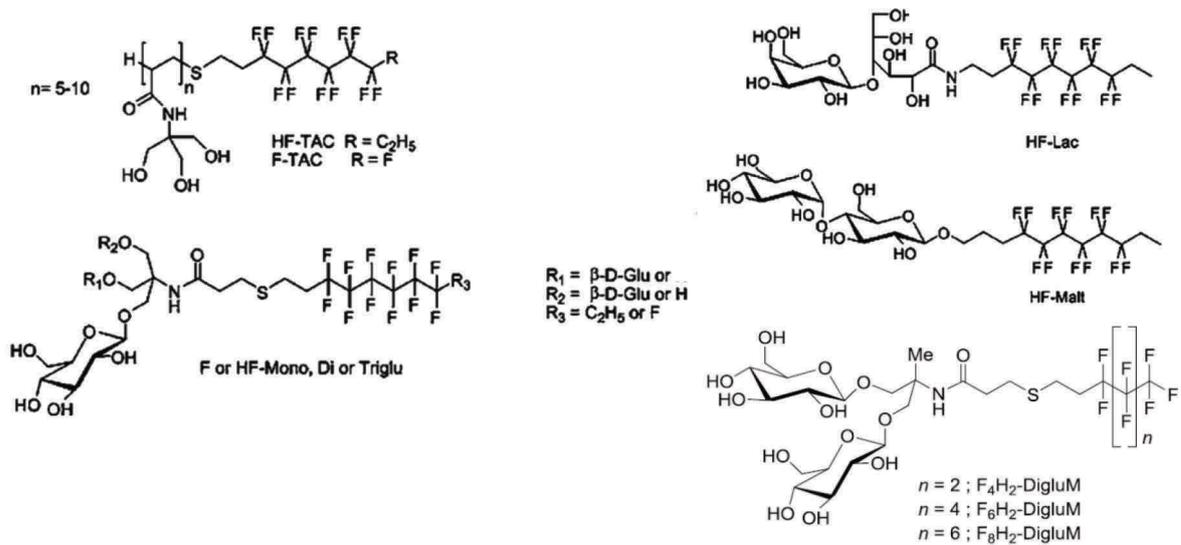


Figure 10. Structures chimiques de plusieurs molécules de tensioactifs fluorés.

Depuis, de nombreux autres tensioactifs fluorés et hémifluorés ont été développés les FASBs (Starita-Geribaldi et al., 2007; Thebault et al., 2007), HF-MNG (Cho et al., 2013), FHdiGlu (Boussambe et al., 2018) en vue stabiliser mais également de solubiliser les PMs.

1.3.7 Polymères

1.3.7.1 Les Amphipols

Les Amphipols (APols) ont été inventés par deux polyméristes, Roland Audebert et Christophe Tribet et un biologiste Jean-Luc Popot dans les années 90. Les APols sont définis comme des polymères amphiphiles capables de maintenir en solution des PMs natives sous forme de petits complexes (Popot et al., 2011). Le concept des APols repose sur l'attachement multipoints des chaînes hydrophobes aux parties transmembranaires des PMs créant ainsi une forte affinité du tensioactif pour la protéine et diminuant les phénomènes de désorption spontanée des polymères.

Les premiers APols, décrits dans la littérature sont l'A8-35, l'A8-75, l'A34-35 et l'A34-75 (Tribet et al., 1996). Le plus connu et étudié est l'A8-35 (noté 5-25C₈-40C₃ dans certains articles (Ladavière et al., 2002) et commercialisé par Anatrace). Ce nom est utilisé pour décrire son caractère anionique « A », sa masse moléculaire moyenne en poids, « 8 » kDa, et son pourcentage de carboxylates libres, soit « 35 ». Plus récemment, cette masse moléculaire a été

ré-estimée en nombre en tenant compte du DP_n moyen, noté X_n , de l'acide polyacrylique (PAA) commercial, évalué à 35, après modifications hydrophobes aléatoires avec les octylamines (25 %) et les isopropylamines (40 %), donnant une valeur de 4,3 kDa pour une molécule d'A8-35 (Giusti et al., 2014) (*cf. Figure 11*). L'hydrosolubilité élevée de l'A8-35, pouvant être supérieure à 320 g/L (Gohon et al., 2006), est assurée par les groupes carboxylates (35 %).

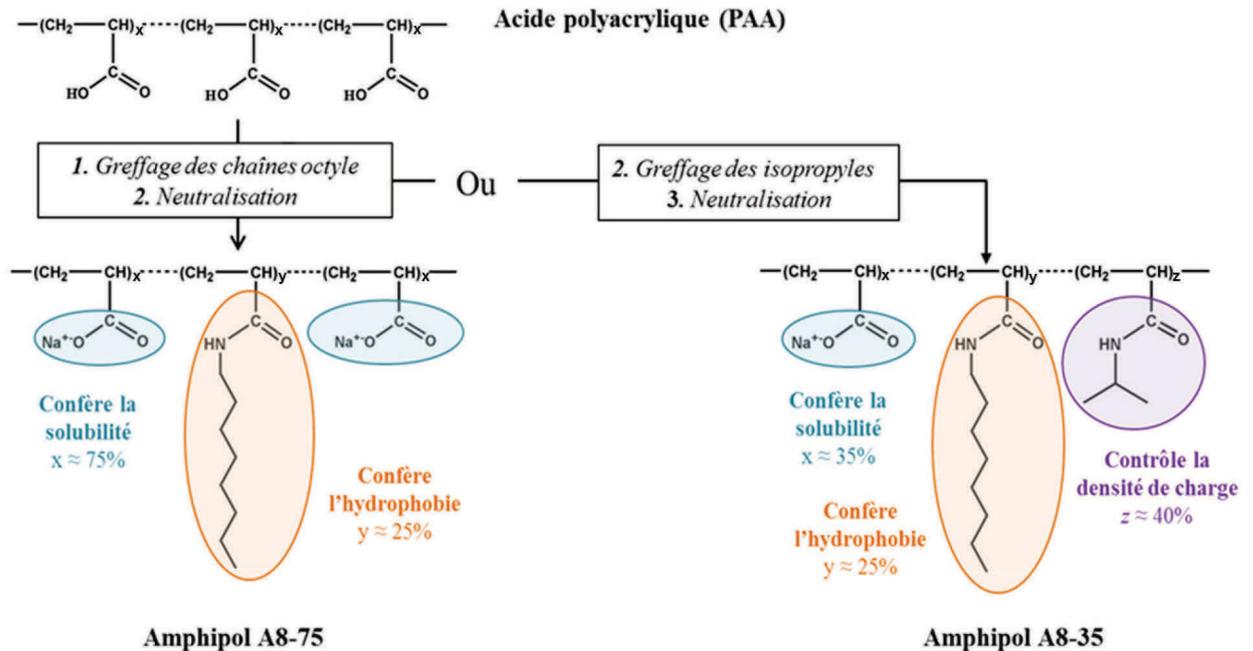


Figure 11. Voie de synthèse schématisée de l'A8-35. La première modification consiste en un greffage de 25 % d'octylamine et permet l'obtention de l'A8-75, un intermédiaire de synthèse de l'A8-35. La seconde modification introduit des isopropylamines à hauteur de 40 %, permettant le contrôle de la densité de charge qui, lorsqu'elle est trop importante, semble affecter la stabilité des protéines. Par conséquent, il reste 35 % de carboxylates non greffés pour assurer la solubilité du polymère.

En solution aqueuse, l'A8-35 s'auto-associe, sous forme de particules quasiment sphériques et homogènes de 40 kDa (Gohon et al., 2006), à partir d'une certaine concentration appelée concentration d'agrégation critique (CAC). Cette concentration a été déterminée à $\sim 0,002$ g/L par transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET) et tensiométrie de surface (Giusti et al., 2012). A titre comparatif, la CMC du DDM, qui est l'un des principaux détergents utilisés en biochimie, est de soit 0,083 g/L (0,17 mM) dans l'eau. Cette valeur est 40 fois plus élevée que la CAC de l'A8-35.

L'un des atouts des APols est qu'ils peuvent être facilement fonctionnalisés (*cf. Figure 12*), soit lors de la synthèse à partir d'un groupe fonctionnel porteur d'une amine primaire pouvant réagir avec l'acide acrylique, soit en greffant sur l'A8-35 porteur d'un bras aminé un

groupe porteur d'une fonction ester de N-hydroxysuccinimide. Le type de fonctionnalisation est varié et dépend de l'application biochimique visée (Le Bon et al., 2014a) :

- des amphipols fluorescents (sonde : naphthalène (Vial et al., 2005), fluorescéine (Opačić et al., 2014), rhodamine (Giusti et al., 2012), Alexa-647 (Fernandez et al., 2014)),
- des amphipols porteurs d'étiquettes pour l'immobilisation sur support solide ou marquage (biotine (Charvolin et al., 2009), oligonucléotide (Le Bon et al., 2014b), imidazole (non publié), hexa-histidine (Giusti et al., 2015)),
- des amphipols porteurs d'adjuvants pour la vaccination (peptide EP67 (Tifrea et al., 2018)), Resiquimod (Tifrea et al., en préparation),
- des amphipols partiellement ou totalement deutérés (Catoire et al., 2010a; Giusti et al., 2014; Zoonens et al., 2005).

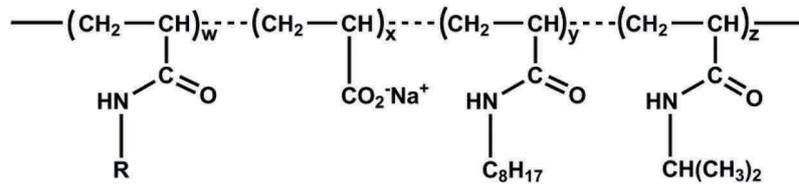


Figure 12. Structure chimique des amphipols fonctionnalisés dérivant de l'A8-35. R1, octylamine; R2, isopropylamine; R3 peut être un fluorophore, une étiquette pour l'immobilisation, un adjuvant (figure extraite de (Le Bon et al., 2018)).

Greffés à faibles pourcentages, les fonctionnalisations n'affectent pas les propriétés en solution de l'A8-35 (Giusti et al., 2012; Opačić et al., 2014; Zoonens et al., 2007).

La plupart du temps les APols sont utilisés comme agent stabilisant après une étape préalable de solubilisation des PMs sous leur forme native par des détergents (cas du piégeage). Sur la période 1996-2016, près d'une centaine de PMs a été piégée en APols (A8-35, A8-75, PC-APol, NAPols et SAPols) (Popot, 2018) qu'elles soient en hélices α ou en feuillets β , monomériques ou oligomériques, et de taille très variée comprise entre ~ 3 kDa (Stangl et al., 2014) et $\sim 1,7$ MDa (Althoff et al., 2011). Des données structurales d'une trentaine de PMs piégées en APols et répertoriées à la PDB ont été obtenues avec une résolution quasi-atomique par cryo microscopie (Althoff et al., 2011; Tsutsumi et al., 2019).

- L'une des limitations de l'A8-35 et de ses dérivés est qu'ils doivent leur solubilité à des carboxylates sensibles à certains facteurs comme le pH ou encore la présence de cations divalents. A pH acide, les carboxylates se protonnent, ce qui diminue la solubilité du polymère (Gohon et al., 2006) tout comme la complexation par les ions Ca^{2+} et, dans

une bien moindre mesure, les ions Mg^{2+} (Picard et al., 2006). La sensibilité au pH des groupements carboxylates est gênante notamment pour les expériences par RMN impliquant les protons de liaisons peptidiques. En effet, l'observation des protons amides est plus facile à un pH légèrement acide pour lequel leur échange avec ceux de l'eau est ralenti (Catoire et al., 2010b; Zoonens et al., 2005). Ceci a mené rapidement à imaginer d'autres structures d'APols qui seraient insensibles aux variations de pH ainsi qu'à la présence d'ions Ca^{2+} . Ces structures sont au nombre de trois. Il s'agit dans un premier cas d'une version zwitterionique de l'A8-35 (Tribet et al., 2009) développée par une équipe externe au laboratoire, puis a suivi une version sulfonaté du même amphipol (Dahmane et al., 2011) et, parallèlement à ces travaux, des amphipols neutres dérivés du tris ont été développés dans le cadre d'un partenariat impliquant le laboratoire.

- Les APols non ioniques. Ces derniers étant décrits au paragraphe 1.3.7.4, il sera présenté ci-après uniquement les APols ioniques et zwitterioniques.
- Les APols ioniques sulfonates, **SAPols**, sont une variante des APols où l'isopropylamine est remplacée par de la taurine. Le taux de charges, carboxylates et sulfonates confondus, est de 75 % (*cf. Figure 13*). Etant donné que le SAPol ne précipite pas en milieu acide, la purification de ce polymère est plus laborieuse que celle de l'A8-35 (Dahmane et al., 2011), et se fait par chromatographie d'exclusion stérique à grande échelle. A faible pH ou en présence d'ions calcium, les carboxylates du SAPol sont en partie ou totalement neutralisés mais la présence de taurine permet de maintenir le polymère soluble jusqu'à pH 0 (Dahmane et al., 2011).
- Les APols zwitterioniques, appelés **PC-APols**, sont une variante d'APols où les carboxylates sont remplacés par des groupes phosphorylcholine portant un groupe zwitterionique (*cf. Figure 13*). Les PC-APols ont été validés pour piéger les MPs (Diab et al., 2007). Bien que plus denses, les particules de PC-APols ont des tailles comparables à celles observées pour l'A8-35 en diffusion dynamique de la lumière (DLS) (Diab et al., 2007).

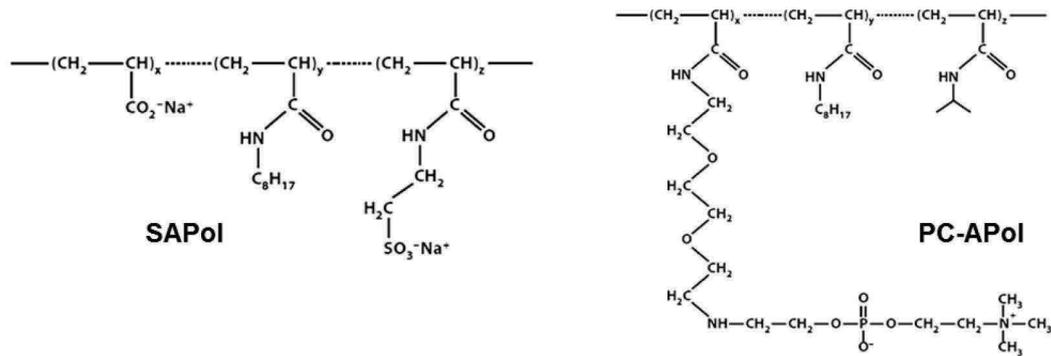


Figure 13. Structures chimiques de plusieurs polymères amphiphiles chargés insensibles au pH.

1.3.7.2 Les SMAs

Historiquement, les SMAs sont des polymères utilisés à des fins industrielles notamment en tant qu'inhibiteur de corrosion (Müller and Schmelich, 1995). Ce n'est qu'en 2009 que Knowles et collègues les ont introduits pour l'étude des PMs (Knowles et al., 2009) alors que l'effet des SMAs sur les membranes lipidiques est connu depuis 1998 (Tonge and Tighe, 2001). Les SMAs, copolymères de styrène et d'anhydride maléique, ont été exploités pour extraire directement les PMs des vésicules lipidiques ou des membranes naturelles sans l'intervention préalable de détergents (*cf. Figure 14*). La principale différence entre les SMAs et les APols classiques de type A8-35, réside donc dans leur utilisation puisque l'A8-35 est utilisé après une étape préalable de solubilisation des membranes par des détergents. Les particules résultantes forment des objets de forme discoïdale avec au centre, la PM entourée de lipides et sur les bords les polymères. Ces objets sont appelés « SMALPs » pour « SMA lipid particles » (également nommées commercialement lipodisques). Le mécanisme de formation des SMALPs est discuté dans divers articles (Dominguez Pardo et al., 2017; Dörr et al., 2016; Scheidelaar et al., 2015; Vargas et al., 2015; Zhang et al., 2015) et quelques études qualitatives, mentionnent une composition lipidique des particules formées similaire à celle de la membrane (Long et al., 2013; Swainsbury et al., 2014).

Les SMAs sont obtenus par copolymérisation du styrène avec l'anhydride maléique. Les copolymères obtenus présentent une certaine disparité en longueur de chaîne macromoléculaire (dispersité moléculaire $\bar{D} \sim 2,5$ (Dörr et al., 2016)). Il existe plusieurs variantes de SMAs avec des ratios styrène / anhydride maléique différents dont dépend la distribution des deux monomères le long de la chaîne macromoléculaire. Dans le cas d'un ratio 1:1, le copolymère est alterné tandis que la répartition est moins régulière pour les SMAs (2:1) et (3:1). En

biochimie, les SMAs (2:1) et (3:1) sont les plus utilisés, c'est pourquoi ils ont été choisis comme références dans ce travail de thèse (cf. Figure 14).

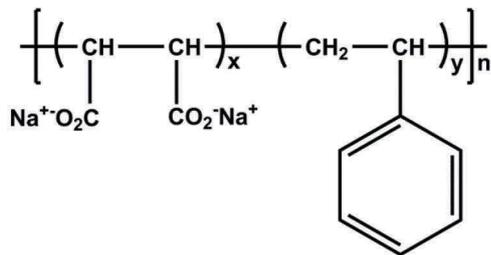


Figure 14. Structure chimique des SMAs. Dans le cas des SMAs (2 :1), $x = 1$ et $y = 2$; pour les SMAs (3 :1), $x = 1$ et $y = 3$.

Probablement en raison de leurs courtes chaînes hydrophobes et de leur forte densité de charge, les SMAs purs en solution aqueuse ne s'auto-associent pas pour former des particules (Dörr et al., 2016; Sauvage et al., 2004). En revanche, ils s'adsorbent sur les membranes et provoquent leur fragmentation sous forme de SMALPs dont la taille dépend du ratio SMAs/lipides utilisé (Carazo et al., 2015; Dörr et al., 2016; Grimaldo et al., 2015; Zhang et al., 2015). La taille des SMALPs a été déterminée par différentes techniques, telles que la diffusion des neutrons aux petits angles (SANS) (Dörr et al., 2016; Jamshad et al., 2015), la DLS et la microscopie électronique à coloration négative montrant une distribution bimodale, un minima de $11,1 \pm 3,3$ nm et un maxima de $16,0 \pm 3,0$ nm de diamètre.

Pour les SMAs, certains types de membranes sont plus difficiles à solubiliser, c'est le cas des membranes ayant une proportion en lipide faible par rapport à la quantité de PMs (Dörr et al., 2016). Dans ce cas, il est connu que l'ajout de lipides exogènes comme la DMPC facilite l'extraction des PMs (Knowles et al., 2009; Orwick-Rydmark et al., 2012). L'ajout complémentaire de lipides peut néanmoins être critiqué.

Tout comme les APols, les SMAs sont sensibles au pH et à la présence de cations divalents (Dörr et al., 2016; Gulati et al., 2014). De plus, les SMAs absorbent dans l'UV à cause de la présence de cycles aromatiques dans leur structure chimique. Cela limite leur panel d'utilisation en les rendant incompatibles avec les méthodes spectroscopiques reposant sur l'absorption UV (Dörr et al., 2016; Lee, 2011; Morrison et al., 2016).

1.3.7.3 Les DIBMAs

Les DIBMAs sont des copolymères alternés de diisobutylène et d'acide maléique (ratio 1:1) pouvant s'apparenter à une version des SMAs où les styrènes ont été remplacés par des diisobutènes (*cf. Figure 15*). Ils sont commercialisés par Anatrace sous le nom Sokalan CP9. Ces copolymères de masse molaire en poids de 12 kDa possèdent une solubilité dans l'eau supérieure à 100 g/L et sont capables de s'auto-associer en présence de lipides en formant des disques de lipides et protéines de tailles nanométriques appelés DIBMALPs. Le remplacement des cycles aromatiques constitutifs des SMAs par des chaînes aliphatiques permet de s'affranchir des problèmes d'absorption dans l'UV. En effet, l'absorbance à 280 nm d'une solution à 1 % de DIBMA est inférieure à 0,3.

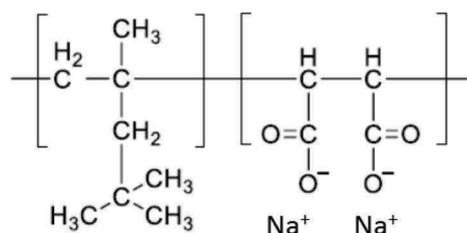


Figure 15. Structure chimique des DIBMAs.

Ainsi les DIBMAs semblent être une meilleure alternative que les SMAs pour plusieurs raisons. En effet, en plus de conserver les propriétés solubilisantes des SMAs, ils sont compatibles avec des études spectroscopiques et possèdent une meilleure tolérance vis-à-vis des cations divalents (20 mM Ca²⁺, 25 mM Mg²⁺). Néanmoins, les problèmes d'agrégation à pH acide rencontrés avec les polymères précédemment décrits, devraient également intervenir avec ces polymères.

1.3.7.4 Les Amphipols neutres (NAPols)

Les polymères neutres présentent plusieurs avantages par rapport aux polymères chargés. Tout d'abord, ils permettent de s'affranchir des problèmes d'insolubilité rencontrés à pH inférieur à 7 ou/et en présence de cations divalents. Ainsi, l'étude des complexes PM/polymère peut être plus facilement réalisée par certaines méthodes analytiques, telles que la RMN en solution. L'absence de charge représente aussi un avantage pour la stabilité de certaines PMs et

permet de réduire les interactions non spécifiques dans le cadre d'étude de la liaison d'un ligand (Bazzacco et al., 2012; Mary et al., 2014; Rahmeh et al., 2012). Enfin, les polymères neutres sont compatibles avec des systèmes d'expression acellulaire (Bazzacco et al., 2012).

La principale difficulté inhérente à la synthèse des amphipols neutres (NAPols) était d'identifier des groupements non ioniques suffisamment hydrophiles pour assurer l'hydrosolubilité de petits polymères comportant un taux de groupements hydrophobes élevé (~ 25 %). S'inspirant de ses propres résultats obtenus avec les tensioactifs dérivés du tris (hydroxyméthyl) acrylamidométhane (THAM), une équipe avignonnaise collaboratrice a développé au début années 2000, la première génération de NAPols, dérivée du THAM (Prata et al., 2000).

Ces premiers NAPols avaient été obtenus par cotélomérisation (copolymérisation effectuée en présence d'un agent de transfert) d'un monomère hydrophobe (THAM modifié doté d'une longue chaîne alkyle) et d'un monomère hydrophile (THAM ou THAM galactosylé).

Si ces premiers NAPols se sont révélés capables de maintenir soluble en solution aqueuse sous leur forme native des PMs telles que la BR et le cytochrome *b₆f* en absence de détergent (Prata et al., 2000), l'hydrosolubilité de ces polymères était encore trop faible (inférieure à 50 g/L) pour pouvoir envisager leur utilisation étendue en biochimie.

Une seconde génération de NAPols porteurs de têtes polaires de type glucose, a donc été développée. Cette seconde génération se subdivisait elle-même en trois catégories différentes de polymères obtenus suivant des modes de synthèse différents (*cf. Figure 16*).

Elément sous droit, diffusion non autorisée

Figure 16. Voies de synthèses des différentes générations de NAPols.

La première série a été obtenue suivant une méthode de synthèse très similaire à celle utilisée pour le développement des NAPols de première génération, c'est-à-dire par cotélomérisation de deux comonomères dérivant du THAM. La différence ayant été ici essentiellement que l'un des monomères était hydrophile (THAM glucosylé) et l'autre amphiphile (THAM comportant à la fois un motif glucose et une chaîne grasse) (Sharma et al., 2008). La seconde a été obtenue par hydrophobisation d'un homopolymère hydrophile du THAM monoglucosylé (Bazzacco et al., 2009). Enfin, la dernière a été obtenue par

homopolymérisation d'un monomère amphiphile comportant deux motifs glucose (Sharma 2012). Les NAPols issus de cette voie de synthèse se sont avérés être hautement solubles dans l'eau (> 100 g/L) et capables de s'auto-associer en petites particules compactes. Les propriétés de cette dernière génération de polymères ont été largement étudiées en biophysique et biochimie (Bazzacco et al., 2012; Sharma et al., 2012). Les particules de NAPols caractérisées par SEC, DLS, SANS, ultracentrifugation analytique (AUC) et densitométrie sont plus petites, impliquant l'association de deux chaînes macromoléculaires, mais plus denses (50 kDa) que celles observées avec l'A8-35 (Sharma et al., 2012). Toutefois, le nombre de chaînes alkyle au sein des particules de NAPols et d'A8-35 est similaire (autour de 75-80).

1.4 Objectif de la thèse

Mon projet doctoral se situe à l'interface de deux disciplines principales, la chimie et la biochimie et s'inscrit dans le développement de nouvelles molécules pour la solubilisation et la stabilisation de PMs. Les objectifs de ma thèse sont, d'une part, d'améliorer les propriétés de l'amphipol A8-35 en synthétisant de nouveaux polymères à chaînes cycliques et, d'autre part, de développer de nouveaux polymères amphiphiles neutres destinés à l'étude des PMs.

Le premier objectif trouve son origine dans l'émergence dans la littérature de détergents cycliques dérivés du DDM (Hovers et al., 2011; Sousa et al., 2016) qui ont montré un intérêt pour l'étude des PMs.

L'intérêt principal de ces travaux réside en ce qu'ils ont permis de prouver que lorsque la chaîne alkyle d'un détergent de type alkylglycoside était remplacée par une structure cyclique saturée de même formule brute, sur trois PMs testées, le complexe PM-détergent gagnait en stabilité. Ceci s'expliquant par le fait qu'en rigidifiant la partie apolaire du détergent, son activité (contact et fluctuations) à la surface transmembranaire était réduite, ce qui diminuait les probabilités d'interactions propices à la dénaturation de la PM.

Les mêmes travaux ont aussi permis de montrer que lorsque la partie lipophile comportait un cycle aromatique, le gain de stabilité devenu plus PM-dépendant n'avait été vérifié que pour une seule des PMs testés.

Ces résultats sont vérifiés sur un échantillon restreint de PMs et ne présagent en rien de ce qu'ils deviendraient pour des tests effectués sur un nombre beaucoup plus important de protéines modèles.

En prenant en considération l'émergence des SMAs et leur utilisation en biochimie, notre attention s'est plutôt portée certes sur la dualité cycles saturés/cycles aromatiques mais en se focalisant de préférence sur l'effet de la saturation ou de l'aromaticité des cycles, à l'échelle d'un polymère, sur l'aptitude à solubiliser les membranes phospholipidiques.

L'intérêt que nous portons à ces propriétés de solubilisation est aussi lié d'une part à une première observation reportant l'effet solubilisant des A8-35 sur certains cas isolés de membrane d'*E. coli* (Popot et al., 2003) et motivé aussi par l'important travail effectué par C. Tribet et ses collaborateurs caractérisant l'interaction des amphipols dérivant des poly(acrylates) avec les membranes artificielles (Ladavière et al., 2001, 2002; Luccardini et al., 2006; Vial et al., 2005, 2007, 2009).

Nous avons donc tenté de répondre à la plupart des questions pouvant découler de l'ensemble de ces observations, et dans cette optique, deux nouvelles classes d'APols dérivés de l'A8-35, les CyclAPols et les ArylAPols porteurs respectivement de chaînes cycliques saturées et aromatiques, ont été développés. Leurs propriétés biochimiques ont été testées sur quatre PMs modèles et comparées avec celle de l'amphipol de référence, l'A8-35.

L'analogie structurale de certains des polymères développés (ArylAPols) avec la structure des SMAs nous a conduits à inclure ces derniers aussi comme référence dans notre étude ; ceci en gardant à l'esprit que si les SMAs et les amphipols sont des copolymères amphiphiles dont l'hydrosolubilité leur est conférée par des groupes carboxylates, en revanche, ils se distinguent par la nature de leurs groupements hydrophobes et leur microstructure. Les SMAs sont des copolymères alternés de l'acide maléique et du styrène (comonomère hydrophobe aromatique), dont l'alternance est plus ou moins régulière selon le ratio entre les deux groupes, tandis que les amphipols sont des co- ou des terpolymères à distribution aléatoire comportant des chaînes latérales octyle et isopropyle (groupements hydrophobes aliphatiques) et dérivant de l'acide poly(acrylique) atactique (Chang et al., 1985).

En suivant cette démarche, nous avons aussi caractérisé et comparé les propriétés des nouveaux amphipols (CyclAPols et ArylAPols) avec celles des SMAs et de l'A8-35 vis-à-vis des membranes phospholipidiques.

Ce projet constitue la majeure partie de mon travail doctoral et est aujourd'hui le projet le plus abouti. Une vingtaine de polymères ont été synthétisés et analysés. Leur étude physico-chimique a consisté en une caractérisation de leur comportement en solution (détermination de la taille des particules formées et leur homogénéité par DLS, SEC, et SAXS) et de leur comportement vis-à-vis des vésicules artificielles et des membranes biologiques naturelles. Ce comportement a été évalué sous deux angles, la vitesse de dispersion des vésicules et d'extraction de différentes PMs modèles (décrites dans le paragraphe suivant) à partir des membranes et leur faculté à stabiliser les PMs d'intérêt. La finalité de cette étude étant de parvenir à savoir s'il est possible de dépasser les frontières de l'antagonisme en disposant d'un amphipol permettant l'extraction directe d'une PM (effet détergent) et son maintien prolongé en phase aqueuse (effet stabilisant).

L'ensemble des protocoles, méthodes développés et résultats obtenus dans le cadre de ces travaux sont décrits et reportés dans le premier chapitre de cette thèse s'ouvrant avec une présentation des différents systèmes biologiques utilisés et se subdivisant par la suite en deux

parties (solubilisation des PMs d'une part et stabilité des PMs d'autre part) chacune d'elle se terminant par une discussion et une conclusion.

Le second projet consiste en la synthèse de nouveaux polymères neutres dont la structure chimique est radicalement différente de celle des NAPols déjà existants (présentés en introduction). Bien que les propriétés de ces derniers apparaissent intéressantes à plusieurs niveaux, leur synthèse fastidieuse et onéreuse a longtemps représenté un obstacle considérable aux tentatives d'adaptation des protocoles à la production à grande échelle, motivant ainsi ce travail de thèse. Les nouveaux polymères imaginés découlent de l'homo- ou la copolymérisation de tensioactifs de type polyoxyéthylénique (de formule C_nE_m) connus pour leur efficacité lorsqu'utilisés en tant que détergents et / ou agents stabilisants des PMs. Ces nouveaux polymères neutres à base de têtes polaires PEGylées sont appelés PEGAPols. La validité des PEGAPols devra répondre à plusieurs critères. Ils devront être plus aisément produits (bons rendements), leur synthèse devra pouvoir être transposable à grande échelle et ils devront présenter des propriétés au moins aussi intéressantes que celles des NAPols actuels en terme de solubilité (supérieure ou égale à 100 g/L) et de capacité à maintenir en solution et stabiliser les PMs. Plusieurs voies de synthèses (décrites dans le chapitre 2) ont été explorées pour obtenir le polymère avec la structure chimique la plus pertinente.

Ce travail d'investigation et de synthèse est reporté dans le second chapitre de cette thèse s'ouvrant par une partie introductive explicitant et justifiant les choix de structure et démarches envisagées sensées nous permettre de disposer du nouvel amphipol neutre ciblé. Les premiers résultats obtenus sont amplement et objectivement discutés dans l'avant dernière partie de ce chapitre se fermant sur une conclusion amenant de nouvelles perspectives.

1.5 Protéines membranaires utilisées comme modèles

1.5.1 Bactériorhodopsine

La bactériorhodopsine (BR) est une protéine de petite masse moléculaire (26,8 kDa) organisée en homotrimère. Elle est présente chez les halobactéries qui se développent en milieu saturé ou quasi saturé en sel tels que les marais salants. La BR, présente dans la membrane pourpre de l'archée halophile *Halobacterium salinarum*, est particulièrement célèbre car c'est la première PM dont la structure tridimensionnelle a été résolue à haute résolution en 1985 (Henderson and Unwin, 1975). La membrane pourpre est une membrane très riche en BR (66 % en poids), les 33 % restants correspondant à la masse de lipides. Ces derniers sont répartis selon les pourcentages suivants : 10 % de lipides apolaires (majoritairement des squalènes) et 90 % de lipides polaires dérivés du sn-2,3-di-*O*-phytanylglycerol, plus couramment appelé « l'archéol » (Belrhali et al., 1999). Chaque monomère de BR est composé d'un faisceau de 7 hélices α transmembranaires et lie un chromophore, le rétinol, de façon covalente au résidu lysine 216 par une base de Schiff protonée. Cette liaison est hydrolysable, rendant ainsi la liaison du rétinol réversible. Le maximum d'absorption du rétinol sous sa forme liée à la protéine est de 570 nm, ou ~555 nm selon que la BR est insérée dans sa membrane native ou solubilisée en solution aqueuse par un tensioactif. Cette absorption confère à la BR sa couleur violette caractéristique. La BR fonctionne comme une pompe à protons en utilisant l'énergie lumineuse pour générer un gradient de protons à travers la membrane, nécessaire à la synthèse de l'ATP par l'ATP synthase (Brown and Ernst, 2017; Lange et al., 2001; Lanyi, 2004). Cependant, sa fonction reste discutée car certains la considère comme étant une pompe à ions hydroxydes (Luecke, 2000). Bien qu'étant un homotrimère, il est à noter que la BR est également fonctionnelle sous sa forme monomérique.

Les propriétés particulières de la BR décrites précédemment, la facilité de sa production (plusieurs centaines de milligrammes pour 10 litres de culture) et l'ensemble des connaissances accumulées font de cette protéine une protéine modèle très souvent utilisée en biochimie, c'est pourquoi, elle a été sélectionnée dans le cadre de mon projet doctoral.

1.5.2 YidC-GFP

YidC est une PM polytopique de 62 kDa très conservée chez les bactéries. Elle est présente dans la membrane plasmique des bactéries et intervient au niveau de l'insertion mais aussi du repliement de protéines intégrales de la membrane en interagissant avec le translocon Sec (Dalbey et al., 2014). Les structures cristallographiques à haute résolution de YidC issue de bactéries Gram positives comme *Bacillus halodurans* (Kumazaki et al., 2014a) et de bactéries Gram négatives comme *E. coli* (Kumazaki et al., 2014b) ont été déterminées. La structure de YidC de *Bacillus halodurans* a révélé la présence des cinq hélices transmembranaires formant un sillon hydrophile essentiel pour son rôle de chaperone et d'insertase. La protéine présente dans les bactéries Gram négatives contient une sixième hélice transmembranaire (TM1) qui fonctionne comme une séquence signale, ainsi qu'une importante région périplasmique.

Dans le cadre de notre étude, une version de YidC fusionnée en position C-terminale à la GFP, une protéine soluble fluorescente de 27 kDa, a été utilisée pour faciliter sa détection après solubilisation. Cette protéine de fusion a été surexprimée dans *E. coli* dont la composition lipidique est essentiellement constituée de lipides à tête polaire zwitterionique phosphatidyléthanolamine (75 %), de lipides à tête polaire anionique phosphatidylglycérol (20 %) et de cardiolipines (5 %) (Raetz and Dowhan, 1990).

1.5.3 Mac B

Mac B est une protéine bactérienne de 70 kDa appartenant à la famille des transporteurs ABC. Mac B, sous sa forme dimérique, interagit avec un partenaire périplasmique, MacA organisé en hexamère, et un canal de la membrane externe, TolC organisé en trimère, pour former le système d'efflux tripartite MacAB-TolC présent chez les bactéries Gram négatives. Le complexe MacA-MacB-TolC contribue à la détoxification cellulaire et, de ce fait, à la résistance aux antibiotiques. Récemment la structure en cryo microscopie électronique de la pompe d'efflux MacAB-TolC issue d'*E. coli* a été résolue (Fitzpatrick et al., 2017).

Le domaine transmembranaire de Mac B est très compact et est constitué de 4 hélices. Mac B possède également un domaine de liaison aux nucléotides, et utilise l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie au transport des molécules à expulser. L'interface entre les dimères et l'ouverture au niveau de la région périplasmique, permettant l'entrée du substrat, fait du dimère de Mac B un ABC transporteur atypique. Cette protéine a été surexprimée dans *E. coli* dont la composition lipidique a été citée précédemment.

1.5.4 SERCA 1a

SERCA 1a est une protéine monomérique de 110 kDa, responsable du transport actif de calcium dans le réticulum sarcoplasmique (RS) du muscle à contraction rapide chez les vertébrés supérieurs. La membrane de RS contient 70 % de phosphatidylcholine (PC), 20 % de phosphatidyléthanolamine (PE) et 10 % d'autres lipides. Il a été montré expérimentalement que le transport de deux ions calcium (contre leur gradient de concentration) était réalisé grâce à l'énergie dégagée par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP aboutissant à la formation d'un intermédiaire phosphorylé (Martonosi et al., 1974). Le passage par un état auto-phosphorylé, de haute énergie, fait de SERCA1a un membre de la famille des ATPase de "type P". De nombreuses données expérimentales ont permis de proposer un modèle de fonctionnement où deux états conformationnels de l'ATPase, appelés E1 et E2, sont ouverts respectivement du côté cytosolique ou du côté de la lumière du RS. Les structures tridimensionnelles à haute résolution de l'ATPase ont été déterminées dans la conformation E1 en 2000 (Toyoshima et al., 2000) et dans la conformation E2 en 2002 (Toyoshima and Nomura, 2002). Depuis, la détermination structurale des différents intermédiaires réactionnels adoptés au cours de son cycle catalytique a permis la compréhension détaillée du fonctionnement de la pompe avec une résolution atomique. Cette protéine est ainsi constituée de 10 hélices transmembranaires et de 3 domaines cytosoliques. Le cycle fonctionnel de cette protéine implique des changements conformationnels de grandes amplitudes pour permettre le passage des ions calcium du cytosol vers la lumière du RS.

2 MATERIELS ET METHODES

2.1 Matériel

Les solvants (VWR) ont été utilisés tels que reçus quand utilisés comme phases d'extraction ou comme éluants pour la chromatographie liquide, exception faite pour la *N*-méthyl-2-pyrrolidone (NMP), ils ont été préalablement repurifiés par distillation lorsqu'ils ont été utilisés comme milieu réactionnel. Le méthanol (MeOH) a été distillé sur sodium, le toluène et le 1,4-dioxane ont été distillés sur sodium en présence de benzophénone, l'acétonitrile et le dichlorométhane (DCM) ont été distillés sur hydrure de calcium (CaH₂), le 1,2-dichloroéthane a été distillé sur pentoxyde de phosphore et le *N,N*-diméthylformamide (DMF) (préalablement séché sur drierite puis filtré) a été redistillé sous pression réduite (20 mbar).

Le copolymère styrène-alt-anhydre maléïque (SMA) de type (2:1) (SMA21S) a été fourni par ProFoldin, le SMA (3:1) (XIRAN SL25010 P20) par Polyscope et le copolymère diisobutylène-alt-anhydre maléïque (DIBMA ou Sokalan CP9) par Anatrace.

Les purifications par flash-chromatographie ont été effectuées sur cartouches de silice ou d'alumine basique (Grace) connectées à un système de purification flash Reveleris X-2 (Grace). Les composés bruts ont été chargés sur les cartouches soit par injection liquide (produit en solution organique à des concentrations de 1 à 2 g.mL⁻¹) ou par dépôt solide (bruts adsorbés sur un excès de silice). L'élution des composés a été effectuée, suivant le cas, en mode isocratique ou par gradient et a été suivie en simple (diffusion de la lumière) ou double détection (absorption UV-VIS et diffusion de la lumière).

Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur plaques de silice TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) ou sur plaque d'alumine Alugram Alox N/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel). Les révélations des plaques CCM ont été effectuées en soumettant celles-ci à un spray de révélateur (solution d'acide phosphomolybdique à 10 % m/v dans l'éthanol (EtOH) pour les composés **1** à **3** et une solution de ninhydrine dans l'EtOH à 2 % m/v pour les composés **4** à **8**, plus particulièrement après un premier chauffage à 150°C des plaques préalablement aspergées avec une solution d'acide sulfurique à 5 % v/v dans l'EtOH pour les composés **5**, **6** et **7** avant chauffage à 150°C.

L'ensemble des analyses RMN a été réalisé à 25 °C sur un spectromètre Bruker Avance III HD 400 MHz équipé d'une sonde 5 mm multinoyaux gradient-Z ou sur un spectromètre Bruker Avance NEO 500 MHz équipé d'une sonde 5 mm multinoyaux gradient selon les expériences. Les spectres RMN obtenus ont été traités avec le logiciel d'analyse

MestReNova. La multiplicité des signaux a été exprimée comme suit : s pour singulet, t pour triplet et dd pour doublet de doublet et m pour multiplet.

Les mesures d'absorbance UV-Visible ont été réalisées avec un spectromètre UV-Visible Hewlett Packard 8453.

Les liposomes de DMPC ont été extrudés par passages à travers une membrane en polycarbonate possédant des pores de 100 nm de diamètre fourni par Whatman Nuclepore track etch membrane, Schleicher & Schuell à l'aide un mini-extrudeur provenant d'Avanti polar lipids, Inc.

Les ultracentrifugations ont été réalisées avec une ultracentrifugeuse Beckman Coulter, Optima MAX-XP

Les expériences d'électrophorèse sur gels de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) ont été effectuées sur gels à 12 % d'acrylamide réalisés au laboratoire. 12 μ L d'échantillon ont été mélangés à 3 μ L de bleu de charge et 10 μ L du mélange ont été déposés dans les puits. La migration a été faite dans du tampon Tris-glycine pH 8,3 pendant 1H en appliquant un courant de 100 V et 20 mA par gel. La calibration des gels a été effectuée avec des marqueurs de poids moléculaires Spectra multicolor broad range protein ladder fourni par Thermo Scientific. Les gels ont été colorés soit au bleu de Coomassie, soit à l'argent suivant le protocole du kit de coloration SilverQuest d'Invitrogen. Les photos des gels ont été prises à l'aide d'un système ChemiDoc XRS+ (BioRad). Dans le cas des mesures de fluorescence détectée sur gels avant leur coloration au bleu de Coomassie, les photos ont été prises à l'aide d'un scanner laser de type Typhoon TLA 9500 de chez GE Healthcare ($\lambda_{\text{excitation}} = 495 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{émission}} = 519 \text{ nm}$).

Les expériences de diffusion dynamique de la lumière (DLS) ont été réalisées à l'aide d'un système Brookhaven BI200-SM et du corrélateur BrookHaven BI-9000AT, en utilisant une diode laser de 30 mW fonctionnant à une longueur d'onde de 637 nm. L'intensité de la lumière diffusée par des solutions de particules a été enregistrée à un angle de diffusion de 90 ° C, à une température de 25 °C. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Brookhaven 9kDLSW32.

L'analyse des complexes polymères / lipides par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) a été effectuée après 24 heures d'incubation à température ambiante sur la ligne BioSAXS BM29 au synchrotron de l'ESRF à Grenoble.

Les expériences de suivi de solubilisation des membranes de RS par turbidité ont été réalisées à l'aide d'un lecteur de plaques CLARIOstar fourni par BMG LABTECH en utilisant la détection UV à 550 nm.

2.2 Méthode

2.2.1 Synthèse et caractérisation de nouveaux amphipols dérivés de l'A8-35

2.2.1.1 Synthèses chimiques

Retraitement de l'acide poly(acrylique) (PAA) précurseur

Dans un erlenmeyer, préalablement placé dans un bain de glace, 20 g d'une solution aqueuse commerciale à 50 % w:w de PAA (Acros) sont dilués dans 80 mL d'eau MQ sous agitation vigoureuse. 6,56 g (1éq.) d'hydroxyde de sodium sont ajoutés par portion à la solution et l'agitation est poursuivie jusqu'à dissolution complète de la soude. La solution basique obtenue est ensuite ramenée à température ambiante puis additionnée goutte à goutte via une ampoule à brome à 10 volumes éq. (soit 1L) d'éthanol absolu placé dans un erlenmeyer sous vive agitation. Le polymère précipité est ensuite filtré sur fritté de porosité 4. Une fois isolé, le polymère est repris dans l'eau de façon à obtenir une solution à environ 100 g/L. Le milieu est alors filtré sur des filtres d'acétate de cellulose à 0,2 μm pour obtenir une solution légèrement jaune et limpide de PAA. Le polymère est récupéré sous forme acide après dépôt (chargement maximum de 3 grammes soit 33 mL de solution) sur colonne DOWEX échangeuse d'ions (acide fort) et élution par l'eau milliQ. La résine (~500 mL) a été préalablement rincée avec 200 mL de méthanol puis 200 mL d'HCl 3N, et équilibrée avec de l'eau purifiée et déionisée (milliQ) jusqu'à atteindre un pH de sortie de colonne autour de 6. Le PAA est récupéré en sortie de colonne lorsque le pH devient acide (aux alentours de 2-3). Deux autres cycles supplémentaires régénération colonne (HCl 3 N), rinçage colonne (eau mQ) et élution PAA (eau mQ) permettent d'obtenir après concentration des fractions sous pression réduite (évaporateur rotatif) et lyophilisation 7,75 g ($\eta = 77,5 \%$) de PAA sous forme de poudre blanche.

Détermination du taux d'hydratation du PAA par pH-métrie

Afin de déterminer le taux d'hydratation du PAA avant d'être utilisé en synthèse, un dosage acido-basique est réalisé. Pour cela, 50 mg de PAA (sous forme de poudre) est dissout dans de l'eau mQ avant d'être dosé avec une solution de soude à 0,1 M.

Modification du PAA

Amphipol A8-35

Dans un ballon bicol de 100 mL, 1,00 g d'acide polyacrylique (13,89 mmol de fonctions carboxyliques, 1 éq.) est dissous dans 20 mL de *N*-Méthyl-2-pyrrolidone (NMP). Le milieu est placé sous agitation à 60°C pendant 4 heures. 0,440 g d'octylamine (3,47 mmol, 0,25 éq. par rapport aux fonctions acide carboxylique) sont dissous dans 2 mL de NMP et la solution obtenue est additionnée goutte à goutte au milieu réactionnel sous agitation. Après addition complète de l'amine, l'agitation est poursuivie pendant 10 min puis 0,745 g de *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (3,61 mmol, 0,26 éq. par rapport aux fonctions acide carboxylique) préalablement dissous dans 4 mL de NMP sont ajoutés goutte à goutte au milieu réactionnel. Une fois la totalité du réactif ajoutée, le milieu réactionnel est maintenu sous agitation à 60°C pendant 1 heure, puis l'agitation est poursuivie sans chauffage pendant 4 heures. Le mélange est filtré sur fritté (porosité 4) afin d'éliminer la *N,N'*-dicyclohexylurée (DCU) ayant précipité. Le filtrat est repris dans un ballon bicol de 100 mL et chauffé à 50°C sous agitation puis 1,86 g d'hydroxybenzotriazole (HOBT) (13,8 mmol, 1 éq. par rapport aux fonctions acide carboxylique) sont introduits dans le milieu réactionnel. 0,33 g d'isopropylamine (5,56 mmol, 0,40 éq. par rapport aux fonctions acide carboxylique) dilué dans 2 mL de NMP est ensuite additionné goutte à goutte au mélange. Après 10 minutes d'agitation, 1,15 g de DCC (6,25 mmol, 0,45 éq. par rapport aux fonctions acide carboxylique) préalablement dissous dans 2,5 mL de NMP est additionné goutte à goutte. Après addition totale du réactif, le milieu réactionnel est chauffé à 50°C pendant 1 heure puis ramené à température ambiante et laissé sous agitation durant 3 h. Le précipité (DCU) est éliminé après filtration sur fritté (porosité 4) puis 1,5 g de méthanolate de sodium (27,78 mmol, 2 éq. par rapport aux fonctions acide carboxylique) sont ajoutés au filtrat. L'agitation est poursuivie pendant environ 15 minutes. Le milieu réactionnel est ensuite versé dans 260 mL (10 volumes équivalents) d'eau purifiée et déionisée (MilliQ) et le pH est ajusté à 10 (papier pH) avec de la soude 11 N. La solution est maintenue sous vive agitation pendant une trentaine de minutes puis filtrée sur fritté (porosité 4). Le filtrat obtenu est ajouté manuellement goutte-à-goutte à 21 mL d'acide chlorhydrique 2 N (42 mmol, 3 éq.) sous vive agitation. L'addition est effectuée *via* une seringue dont l'embout est connecté à un système de filtres Millipore (préfiltre PES 0,45 µm et filtre acétate de cellulose 0,2 µm en série). Une fois l'addition terminée, la suspension obtenue est filtrée sur fritté (porosité 4) et le précipité est dissous dans 50 mL d'eau milliQ après addition de 1,9 mL de soude 11 N (21 mmol, 1,5 éq. par rapport aux fonctions acide carboxylique). Ce

cycle de précipitation / solubilisation est réitéré quatre fois, puis la solution basique finalement obtenue est dialysée (membrane Spectrapore avec seuil de coupure à 8000 g.mol^{-1}) pendant 24 heures contre une solution de soude $4,5.10^{-3} \text{ N}$ puis lyophilisée. 1,49 g (86 %) d'APol sont obtenus sous forme de poudre blanche.

APol A8-50

La synthèse de l'APol A8-50 a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment en modifiant 1,00 g de PAA précurseur avec 0,898 g (6,94 mmol) d'octylamine en présence de 1,58 g (7,64 mmol) de DCC dans 26 mL de NMP. Après purification, 0,99 g (52 %) d'APol ont été obtenus.

CyclAPol C₆-C₀-25

La synthèse du CyclAPol C₆-C₀-25 a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment en modifiant 1,00 g de PAA précurseur avec 0,344 g (3,47 mmol) de cyclohexylamine en présence de 0,745 g (3,61 mmol) de DCC dans 26 mL de NMP. Après purification, 0,665 g (44 %) de ont été obtenus.

CyclAPol C₆-C₀-50

La synthèse du CyclAPol C₆-C₀-50 a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment en modifiant 1,00 g de PAA précurseur avec 0,729 g (7,35 mmol) de cyclohexylamine en présence de 1,58 g (7,64 mmol) de DCC dans 26 mL de NMP. Après purification, 1,14 g (66 %) de CyclAPol ont été obtenus.

CyclAPol C₆-C₀-50^{4-Et}

La synthèse du CyclAPol C₆-C₀-50^{4-Et} a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment en modifiant 0,126 g de PAA précurseur avec 0,100 g (0,79 mmol) de 4-éthylcyclohexanamine en présence de 0,178 g (0,87 mmol) de DCC dans 3 mL de NMP. Après purification, 0,195 g (90 %) de CyclAPol ont été obtenus.

CyclAPol C₆-C₁-25

La synthèse du CyclAPol C₆-C₁-25 a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment en modifiant 1,00 g de PAA précurseur avec 0,393 g (3,47 mmol) de cyclohexylmethylamine en présence de 0,745 g (3,61 mmol) de DCC dans 26 mL de NMP. Après purification, 1,28 g (82 %) de CyclAPol ont été obtenus.

CyclAPol C₆-C₁-25-40

La synthèse du CyclAPol C₆-C₁-25-40 a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment en modifiant 1,00 g de PAA précurseur avec 0,393 g (3,47 mmol) de cyclohexylmethylamine en présence de 0,745 g (3,61 mmol) de DCC et 0,328 g (5,56 mmol) d'isopropylamine en présence de 1,29 g (6,25 mmol) de DCC et 1,88 g (13,89 mmol) de HOBt dans 26 mL de NMP. Après purification, 1,27 g (76 %) de CyclAPol ont été obtenus.

CyclAPol C₆-C₁-50

La synthèse du CyclAPol C₆-C₁-50 a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment en modifiant 1,00 g de PAA précurseur avec 0,786 g (6,94 mmol) de cyclohexylmethylamine en présence de 1,58 g (7,64 mmol) de DCC dans 26 mL de NMP. Après purification, 1,37 g (76 %) de CyclAPol ont été obtenus.

CyclAPol C₆-C₁-50-15

La synthèse du CyclAPol C₆-C₁-50-15 a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment en modifiant 1,00 g de PAA précurseur avec 0,786 g (6,94 mmol) de cyclohexylmethylamine en présence de 1,58 g (7,64 mmol) de DCC et 0,123 g (2,08 mmol) d'isopropylamine en présence de 0,459 g (2,22 mmol) de DCC et 1,88 g (13,89 mmol) de HOBt dans 26 mL de NMP. Après purification, 1,48 g (80 %) de CyclAPol ont été obtenus.

CyclAPol C₆-C₂-25

La synthèse du CyclAPol C₆-C₂-25 a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment en modifiant 1,00 g de PAA précurseur avec 0,442 g (3,47 mmol) de 2-cyclohexyl-éthylamine en présence de 0,745 g (3,61 mmol) de DCC dans 26 mL de NMP. Après purification, 1,19 g (74 %) de CyclAPol ont été obtenus.

CyclAPol C₆-C₂-50

La synthèse du CyclAPol C₆-C₂-50 a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment en modifiant 1,00 g de PAA précurseur avec 0,884 g (6,94 mmol) de 2-cyclohexyl-éthylamine en présence de 1,58 g (7,64 mmol) de DCC dans 26 mL de NMP. Après purification, 1,9 g (98 %) de CyclAPol ont été obtenus.

CyclAPol C₇-C₀-50

La synthèse du CyclAPol C₇-C₀-50 a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment en modifiant 1,00 g de PAA précurseur avec 0,786 g (6,94 mmol) de cycloheptylamine en présence de 1,58 g (7,64 mmol) de DCC dans 26 mL de NMP. Après purification, 1,34 g (74 %) de CyclAPol ont été obtenus.

CyclAPol C₈-C₀-50

La synthèse du CyclAPol C₈-C₀-50 a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment en modifiant 1,00 g de PAA précurseur avec 0,884 g (6,94 mmol) de cyclooctylamine en présence de 1,58 g (7,64 mmol) de DCC dans 26 mL de NMP. Après purification, 1,82 g (96 %) de CyclAPol ont été obtenus.

CyclAPol C₈-C₀-25-40

La synthèse du CyclAPol C₈-C₀-25-40 a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment en modifiant 1,00 g de PAA précurseur avec 0,442 g (3,47 mmol) de cyclooctylamine en présence de 0,745 g (3,61 mmol) de DCC et 0,328 g (5,56 mmol) d'isopropylamine en présence de 1,29 g (6,25 mmol) de DCC et 1,88 g (13,89 mmol) de HOBt dans 26 mL de NMP. Après purification, 1,36 g (79 %) de CyclAPol ont été obtenus.

CyclAPol C₈-C₀-50-15

La synthèse du CyclAPol C₈-C₀-50-15 a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment en modifiant 1,00 g de PAA précurseur avec 0,884 g (6,94 mmol) de cyclooctylamine en présence de 1,58 g (7,64 mmol) de DCC et 0,123 g (2,08 mmol) d'isopropylamine en présence de 0,459 g (2,22 mmol) de DCC et 1,88 g (13,89 mmol) de HOBt dans 26 mL de NMP. Après purification, 0,78 g (40 %) de CyclAPol ont été obtenus.

ArylAPol Ph-25

La synthèse de l'ArylAPol Ph-25 a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment en modifiant 1,00 g de PAA précurseur avec 0,323 g (3,47 mmol) d'aniline en présence de 0,745 g (3,61 mmol) de DCC dans 26 mL de NMP. Après purification, 0,618 g (42 %) d'ArylAPol ont été obtenus.

ArylAPol Ph-50

La synthèse de l'ArylAPol Ph-50 a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment en modifiant 1,00 g de PAA précurseur avec 0,918 g (9,86 mmol) d'aniline en présence de 1,58 g (7,64 mmol) de DCC dans 26 mL de NMP. Après purification, 1,28 g (76 %) d'ArylAPol ont été obtenus.

ArylAPol Ph-50-^{4-Me}

La synthèse de l'ArylAPol Ph-50-^{4-Me} a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment en modifiant 1,00 g de PAA précurseur avec 0,744 g (6,94 mmol) de 4-méthylaniline en présence de 1,58 g (7,64 mmol) de DCC dans 26 mL de NMP. Après purification, 1,04 g (58 %) d'ArylAPol ont été obtenus.

ArylAPol Ph-50-^{4-Et}

La synthèse de l'ArylAPol Ph-50-^{4-Et} a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment en modifiant 1,00 g de PAA précurseur avec 0,842 g (6,94 mmol) de 4-éthylaniline en présence de 1,58 g (7,64 mmol) de DCC dans 26 mL de NMP. Après purification, 0,780 g (42 %) d'ArylAPol ont été obtenus.

ArylAPol Ph-50-^{4-Et}-15

La synthèse de l'ArylAPol Ph-50-^{4-Et}-15 a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment en modifiant 1,00 g de PAA précurseur avec 0,842 g (6,94 mmol) de 4-éthylaniline en présence de 1,58 g (7,64 mmol) de DCC et 0,123 g (2,08 mmol) d'isopropylamine en présence de 0,459 g (2,22 mmol) de DCC et 1,88 g (13,89 mmol) de HOBt dans 26 mL de NMP. Après purification, 1,12 g (69 %) d'ArylAPol ont été obtenus.

ArylAPol Bn-25

La synthèse de l'ArylAPol Bn-25 a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment en modifiant 1,00 g de PAA précurseur avec 0,372 g (3,47 mmol) de benzylamine en présence de 0,745 g (3,61 mmol) de DCC dans 26 mL de NMP. Après purification, 1,13 g (73 %) d'ArylAPol ont été obtenus.

ArylAPol Bn-25-40

La synthèse de l'ArylAPol Bn-25-40 a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment en modifiant 1,00 g de PAA précurseur avec 0,372 g (3,47 mmol) de benzylamine en présence de 0,745 g (3,61 mmol) de DCC et 0,328 g (5,56 mmol) d'isopropylamine en présence de 1,29 g (6,25 mmol) de DCC et 1,88 g (13,89 mmol) de HOBt dans 26 mL de NMP. Après purification, 1,29 g (78 %) d'ArylAPol ont été obtenus.

ArylAPol Bn-50

La synthèse de l'ArylAPol Bn-50 a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment en modifiant 1,00 g de PAA précurseur avec 0,744 g (6,94 mmol) de benzylamine en présence de 1,58 g (7,64 mmol) de DCC dans 26 mL de NMP. Après purification, 1,64 g (93 %) d'ArylAPol ont été obtenus.

ArylAPol Bn-50-15

La synthèse de l'ArylAPol Bn-50-15 a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment en modifiant 1,00 g de PAA précurseur avec 0,744 g (6,94 mmol) de benzylamine en présence de 1,58 g (7,64 mmol) de DCC et 0,123 g (2,08 mmol) d'isopropylamine en présence de 0,459 g (2,22 mmol) de DCC et 1,88 g (13,89 mmol) de HOBt dans 26 mL de NMP. Après purification, 1,51 g (83 %) d'ArylAPol ont été obtenus.

ArylAPol St-25

La synthèse de l'ArylAPol St-25 a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment en modifiant 1,00 g de PAA précurseur avec 0,421 g (3,47 mmol) de phényléthylamine en

présence de 0,745 g (3,61 mmol) de DCC dans 26 mL de NMP. Après purification, 1,24 g (78 %) d'ArylAPol ont été obtenus.

ArylAPol St-50

La synthèse de l'ArylAPol St-50 a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment en modifiant 1,00 g de PAA précurseur avec 0,841 g (6,94 mmol) de phényléthylamine en présence de 1,58 g (7,64 mmol) de DCC dans 26 mL de NMP. Après purification, 1,64 g (88 %) d'ArylAPol ont été obtenus.

ArylAPol St-50-15

La synthèse de l'ArylAPol St-50 a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment en modifiant 1,00 g de PAA précurseur avec 0,841 g (6,94 mmol) de phényléthylamine en présence de 1,58 g (7,64 mmol) de DCC et 0,123 g (2,08 mmol) d'isopropylamine en présence de 0,459 g (2,22 mmol) de DCC et 1,88 g (13,89 mmol) de HOBt dans 26 mL de NMP. Après purification, 1,55 g (83 %) d'ArylAPol ont été obtenus.

APol Hybride

La synthèse de l'APol hybride a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment en modifiant 1,00 g de PAA précurseur avec 0,323 g (3,47 mmol) d'aniline en présence de 0,745 g (3,61 mmol) de DCC et 0,393 g (3,47 mmol) de cyclohexylmethylamine en présence de 0,745 g (3,61 mmol) de DCC et 1,88 g (13,89 mmol) de HOBt dans 26 mL de NMP. Après purification, 1,41 g (81 %) d'ArylAPol ont été obtenus.

2.2.1.2 Caractérisation de la composition chimique des APols par spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et pH-métrie

La composition chimique des polymères est déterminée par une analyse RMN du proton ^1H (*cf. Tableau 1*) et du carbone ^{13}C (*cf. Tableau 2*), complétée par un dosage pH-métrique.

Analyse des polymères par RMN :

Les échantillons destinés à l'analyse RMN ont été préparés en dissolvant 100 mg de polymère dans 0,7 mL de méthanol deutéré (CD_3OD) pur ou en mélange avec de l'eau deutérée

(D₂O) en des proportions variables mais toujours minoritaires suivant la solubilité de l'APol analysé.

Détermination de la composition chimique des APols par RMN ¹H

La composition chimique des APols a été estimée en se basant sur l'intégration I_{CM} du signal du méthine de la chaîne macromoléculaire entre 2 et 2,5 ppm :

$$I_{CM} \propto DP \cdot C_p \quad (1)$$

Avec DP le degré de polymérisation moyen en nombre du polymère et C_p sa concentration.

Si I_A est l'intégration d'un des signaux caractéristiques des protons portés par l'amine greffée en proportion p sur la chaîne macromoléculaire, alors :

$$I_A \propto \frac{p}{100} \cdot DP \cdot C_p \cdot n_H \quad (2)$$

Avec n_H = nombre de protons participant au signal.

D'où :

$$p = \frac{I_A}{n_H \cdot I_{CM}} \times 100 \quad (3)$$

Cette expression peut être encore simplifiée après normalisation des intégrations en imposant $I_{CM} = 1$ pour obtenir :

$$p = \frac{I_A}{n_H} \times 100 \quad (4)$$

Si x est la proportion de fonctions carboxylate non modifiées et quel que soit le nombre i de greffons différents portés par le polymère alors :

$$x = 100 - \sum_i p_i \quad (5)$$

Lorsqu'un des signaux de la chaîne latérale se superpose à celui du méthine de la chaîne macromoléculaire, alors la relation 4 n'est plus vérifiée et il faut extraire I_{CM} par le calcul de l'intégration totale mesurée I_T pour valider la relation 3.

Soit :

$$I_T = I_{CM} + I_A' \quad (6)$$

Avec I_A' = intégration du signal des n_H' protons portés par l'amine greffée en proportion p et contribuant au signal se superposant à celui de la chaîne macromoléculaire et :

$$I_A' \propto \frac{p}{100} \cdot DP \cdot C_p \cdot n_H' \quad (7)$$

D'où :

$$\frac{I_T}{I_A} = \frac{I_{CM} + I_A'}{I_A} = \frac{I_{CM}}{I_A} + \frac{I_A'}{I_A} = \frac{1}{p} + \frac{n_H'}{n_H} \quad (8)$$

D'où

$$p = \frac{1}{\frac{I_T}{I_A} \frac{n_H'}{n_H}} \quad (9)$$

Lorsque les calculs basés sur les intégrations de différents signaux exploitables des protons d'un même groupement latéral ont conduit à des valeurs différentes p_i de greffage, une moyenne pondérée $\langle p \rangle$ a été estimée suivant la relation :

$$\langle p \rangle = \frac{\sum_i n_{H_i} p_i}{\sum_i n_{H_i}} \quad (10)$$

Dans le tableau 1 suivant ont été répertoriés les signaux caractéristiques des groupements latéraux exploités en RMN ^1H .

Groupements latéraux	Signaux caractéristiques	Nombre de protons impliqués (n_H)	Zone de déplacement chimique (ppm)
Isopropylamine	-NHCH(CH ₃) ₂	1	3,8-4,1
Isopropylamine	-NHCH(CH ₃) ₂	6	1,2
Cyclohexylamine (C ₆ -C ₀)	-NHCH ₂ C ₅ H ₁₀	1	3,3-3,6
Cyclohexyméthylamine (C ₆ -C ₁)	-NHCH ₂ C ₆ H ₁₁	2	2,8-3,3
2-Cyclohexyl-éthylamine (C ₆ -C ₂)	-NHCH ₂ C ₆ H ₁₁	2	2,8-3,4
Cycloheptylamine (C ₇ -C ₀)	-NHCH ₂ C ₆ H ₁₂	1	3,7-4,0
Cyclooctylamine (C ₈ -C ₀)	-NHCH ₂ C ₇ H ₁₄	1	3,7-4,0
Aniline (Ph)	-NHC ₆ H ₅	5	6,5-8,0
p-méthylaniline (Ph- ⁴ Me)	-NHC ₆ H ₄ CH ₃	4	6,5-8,0
4-Ethylaniline (Ph- ⁴ Et)	-NHC ₆ H ₄ CH ₂ CH ₃	4	6,5-8,0
Benzylamine (Bn)	-NHCH ₂ C ₆ H ₅	2	4,0-4,7
	-NHCH ₂ C ₆ H ₅	5	7,0-7,5
Phényléthylamine (St)	-NHCH ₂ CH ₂ C ₆ H ₅	2	2,6-3,2
	-NHCH ₂ CH ₂ C ₆ H ₅	2	3,2-3,7
	-NHCH ₂ CH ₂ C ₆ H ₅	5	6,7-7,5

Tableau 1. Signaux caractéristiques des groupements latéraux exploités en RMN ^1H .

Détermination de la composition chimique des APols par RMN ^{13}C

La composition chimique des amphipols est dans ce cas déterminée en se basant sur les intégrations I_{COO} et I_{CONH} respectivement attribuables aux signaux des carboxylates (à 185 ppm) et des carboxamides (à 175 ppm) du polymère.

La somme des deux aires intègre pour 100 % de la chaîne macromoléculaire. Le pourcentage global de greffage est donc donné par la relation suivante :

$$\sum_i p_i = \frac{I_{CONH}}{(I_{COO} + I_{CONH})} \times 100 \quad (11)$$

Le pourcentage de carboxylate libre est :

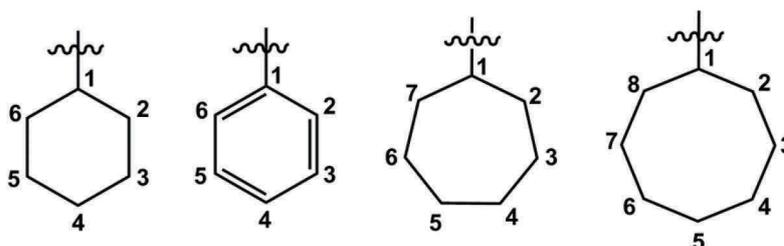
$$x = 1 - \sum_i p_i = \frac{I_{COO}}{(I_{COO} + I_{CONH})} \times 100 \quad (12)$$

Si I_B est l'intégration d'un des signaux caractéristiques des carbones portés par l'amine greffée en proportion p sur la chaîne macromoléculaire, alors :

$$p = \frac{I_B}{n_C \times (I_{COO} + I_{CONH})} \times 100 \quad (13)$$

Avec :

n_C = nombre de carbones participant au signal correspondant



Groupements latéraux	Signaux caractéristiques	Nombre de carbones impliqués	Zone de déplacement chimique (ppm)
Isopropylamine	-NHCH(<u>C</u> H ₃) ₂	2	22-27
Cyclohexylamine (C ₆ -C ₀)	C ₂ et C ₆	2	32-34
	C ₃ , C ₄ et C ₅	3	25-27
Cyclohexyméthylamine (C ₆ -C ₁)	C ₂ et C ₆	2	32-34
	C ₃ , C ₄ et C ₅	3	25-27
2-cyclohexyl-éthylamine (C ₆ -C ₂)	C ₂ et C ₆	2	32-34
	C ₃ , C ₄ et C ₅	3	25-27
Cycloheptylamine (C ₇ -C ₀)	C ₃ et C ₆	2	25-26
	C ₄ et C ₅	2	29-30
	C ₂ et C ₇	2	35-36
	C ₁	1	48-49
Cyclooctylamine	C ₃ et C ₇	2	24-25

(C ₈ -C ₀)	C ₄ , C ₅ , C ₆	3	28-29
	C ₂ , C ₈	2	33-34
	C ₁	1	49-50
Aniline (Ph)	-NH <u>C</u> ₆ H ₅	1	138-140
	C ₂ et C ₆	2	122-123
	C ₃ et C ₅	2	129-130
	C ₄	1	124-126
p-méthylaniline (Ph- ⁴ -Me)	-NH <u>C</u> ₆ H ₄ CH ₃	1	136
	C ₂ et C ₆	2	122
	C ₃ et C ₅	2	130
	C ₄	1	135
	-NHC ₆ H ₄ <u>C</u> H ₃	1	21
4-Ethylaniline (Ph- ⁴ -Et)	-NH <u>C</u> ₆ H ₄ CH ₂ CH ₃	1	141
	C ₂ et C ₆	2	122
	C ₃ et C ₅	2	129
	C ₄	1	137
	-NHC ₆ H ₄ <u>C</u> H ₂ CH ₃	1	26
	-NHC ₆ H ₄ CH ₂ <u>C</u> H ₃	1	16
Benzylamine (Bn)	-NH <u>C</u> H ₂ C ₆ H ₅	1	44
	C ₁ , C ₂ , C ₃ , C ₄ , C ₅ , C ₆	5	128-130
	-NHCH ₂ <u>C</u> ₆ H ₅	6	139-140
Phényléthylamine (St)	-NHCH ₂ <u>C</u> H ₂ C ₆ H ₅	1	36-37
	-NH <u>C</u> H ₂ CH ₂ C ₆ H ₅	1	42-43
	C ₄	1	127-128
	C ₂ , C ₆ , C ₅ , C ₃ ,	4	129-130
	-NHCH ₂ CH ₂ <u>C</u> ₆ H ₅	1	140-141

Tableau 2. Signaux caractéristiques des groupements latéraux exploités en RMN ¹³C.

Analyse de la composition chimique des polymères par dosage pH-métrique

Le but du dosage acido-basique des polymères obtenus est de déterminer la quantité de carboxylates libres en solution et ainsi d'en déduire leur pourcentage de greffage.

Seuls en solution

La solution à titrer est obtenue en solubilisant 100 mg de polymère lyophilisé dans un mélange EtOH/eau (80/20, v/v). La solution est placée sous agitation puis dosée par une solution d'acide chlorhydrique dans un mélange EtOH / Eau 80/20 (v/v) dont la concentration est calculée en fonction du pourcentage théorique de carboxylates et varie de $3 \cdot 10^{-2}$ M à $7 \cdot 10^{-2}$ M. Les dosages ont été réalisés à $20 \text{ °C} \pm 4 \text{ °C}$ à l'aide d'un pH-mètre de laboratoire 766-calimatic (Knick) muni d'une électrode Bioblock Scientific. Le point d'équivalence est obtenu en dérivant les courbes $\text{pH} = f(V_{\text{HCl}})$.

Détermination des taux de greffage

Dans le cas des polymères ne comportant pas d'isopropylamine, les taux de greffage sont déterminés en utilisant l'équation ci-après :

$$x = \frac{\frac{n_B}{m} \times M_y}{1 - \frac{n_B}{m} \times (94 - M_y)} \times 100 \quad (14)$$

Où :

x = pourcentage de fonctions carboxylates

n_B = nombre de moles de fonctions carboxylates dosées

m = masse de polymère dosé

M_y = masse molaire du monomère hydrophobe

Dans le cas où les polymères subissent un greffage d'isopropylamine, l'équation (2) obtenue à deux inconnues est difficilement solvable (dans le sens où elle admet une infinité de solution avec un domaine de validité restreint à $x + y + z = 100$) :

$$x = \frac{\frac{n_B}{m} \times M_y}{1 - \frac{n_B}{m} \times (94 - (M_y - z \times M_y + z \times M_z))} \times 100 \quad (15)$$

Avec :

M_z = masse molaire du *N*-isopropylacrylamide

z = taux de greffage en isopropylamine

De ce fait, z est fixé à la valeur estimée par RMN.

2.2.2 PEGAPols

2.2.2.1 Synthèses organiques

11-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy-3,6,9-trioxaundécane-1-ol (TEG-OTHP) (1)

Dans un ballon de 500 mL, 10,00 g (51,55 mmol) de tétraéthylène glycol (TEG) et 4,77 g (56,86 mmol) de 2,3-dihydro-2H-pyrane (DHP) sont dissous dans 200 mL de DCM. La température du milieu réactionnel est maintenue à 0°C (eau + glace + sel) et 1,96 g (10,45 mmol) d'acide *para*-toluène sulfonique (APTS) est ajouté au mélange qui est alors laissé sous agitation à 0°C pendant 10 min. Le bain de glace est ensuite retiré et le milieu réactionnel est laissé sous agitation durant 2 h à température ambiante. 20 mL d'une solution saturée de NaHCO₃ sont ensuite ajoutés au milieu réactionnel qui est alors transvasé dans une ampoule à décanter de 1 L. La phase aqueuse est extraite avec 2 x 50 mL de DCM. Les phases organiques sont jointes, lavées avec 1 x 100 mL d'eau et 2 x 50 mL d'une solution saturée en chlorure de sodium NaCl, puis séchées sur du Na₂SO₄. Après filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le brut résiduel d'aspect huileux est ensuite séché sous vide, avant d'être purifié par injection liquide sur flash-chromatographie avec une cartouche de silice (120 g) avec une élution par gradient cyclohexane/acétate d'éthyle/méthanol (Cy/AcOEt/MeOH 100/0/0 à 0/90/10). Après concentration des différentes fractions collectées et séchage sous vide, le composé **1** (3,48 g, 24 %) est obtenu sous forme d'une huile incolore. Sur plaque de silice, R_f (AcOEt/MeOH 95/5) = 0,32.

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ = 4,62 (dd, J = 4,1 Hz, 1H, -CHOO) 3,90 – 3,82 (m, 2H, -CH₂O THP) 3,77 – 3,44 (m, 16H, -CH₂O TEG), 2,77 (s, 2H OH TEG + HOD), 1,90 – 1,44 (m, 6H, -CH₂ THP)

RMN ¹³C (CDCl₃, 500 MHz): δ = 99,01 (-CHOO), 72,65 70,68 70,64 70,60 70,58 70,36 66,68 (-CH₂O TEG), 62,30 (-CH₂O THP), 61,77 (-CH₂OH), 30,56 (-CH₂CHOO- THP), 25,46 et 19,50 (-CH₂ THP)

Méthanesulfonate de 11-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy-3,6,9-trioxaundécane-1-yle (MsO-TEG-OTHP) (2)

Dans un ballon monocol de 150 mL, muni d'une ampoule à brome équilibrée surplombée par une garde à chlorure, 4,70 g (16,89 mmol) de composé **1** et 3,42 g (33,78 mmol) de triéthylamine (TEA) sont dissous sous agitation dans 29 mL de DCM anhydre et refroidis à 0°C (eau + glace + NaCl). Dans l'ampoule à brome, 3,87 g (33,78 mmol) de chlorure de mésyle

(MsCl) est dilué dans 27 mL de DCM anhydre. Ce réactif est ensuite ajouté goutte à goutte au milieu réactionnel toujours maintenu à froid. Après addition totale du réactif, le milieu réactionnel est laissé sous agitation à 0°C pendant 2 heures. Après retour à température ambiante et contrôle par CCM (AcOEt/Cy 80/20), le milieu réactionnel est versé dans 140 mL de glace sous forte agitation auquel sont ajoutés 110 mL de diéthyléther (Et₂O). Une fois la glace fondue, la solution biphasique est transvasée dans une ampoule à décanter et après séparation, la phase aqueuse est extraite avec 40 mL d'Et₂O. Les phases organiques sont jointes, lavées avec 4 x 33 mL d'eau saturée en NaCl puis séchée sur Na₂SO₄. Après filtration sur coton et évaporation du solvant sous pression réduite, l'huile résiduelle est placée sous vide durant 24 h. 5,8 g ($\eta = 96\%$) de composé **2** sont ainsi obtenus sous forme d'une huile et sont utilisés sans étape préalable de purification. Sur plaque de silice, Rf (AcOEt/Cy 80/20) = 0,35

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): $\delta = 4,61$ (dd, $J = 4,2$ Hz, 1H, -CHOO), 4,40 – 4,33 (m, 2H, CH₂OMs), 3,93 – 3,82 (m, 2H, -CH₂O THP) 3,81 – 3,73 (m, 2H, -CH₂OCH₂CH₂OMs), 3,69 – 3,44 (m, 13H, -CH₂O TEG), 3,07 (s, 3H, -CH₃ mésylate), 1,97–1,45 (m, 7H, -CH₂ THP)

RMN ¹³C (CDCl₃, 500 MHz): $\delta = 99,06$ (-CHOO), 70,70 70,66 70,64 70,59 69,35 69,07 66,69 (-CH₂O TEG), 62,37 (-CH₂O THP), 37,78 (-CH₃ mésylate), 30,62 (CH₂CHOO- THP), 25,46 et 19,58 (-CH₂ THP).

Azoture de 1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy-3,6,9-trioxaundécane-11-yle (N₃-TEG-OTHP) **(3)**

Dans un ballon de 100 mL, 5,79 g du composé **2** (1 éq., 16,26 mmol) sont dilués dans 32 mL de diméthylformamide (DMF). 1,59 g (1,5 éq., 24,39 mmol) d'azoture de sodium est ajouté à la solution et le milieu réactionnel est chauffé à 40 °C durant 12 h. Le milieu réactionnel est ensuite ramené à température ambiante et versé dans 320 mL d'eau. La phase aqueuse est extraite avec 3 x 190 mL d'un mélange Et₂O/Cy 80/20. Les phases organiques sont jointes et lavées avec 3 x 190 mL de solution saturée en NaCl. Après séchage de la phase organique sur MgSO₄ puis filtration et évaporation du solvant sous pression réduite, l'huile résiduelle obtenue est purifiée par dépôt solide sur flash-chromatographie avec une cartouche de 80 g de silice (élution par gradient Cy/AcOEt 100/0 à 40/60). Le composé **3** (3,5 g, 70 %) est obtenu sous forme d'une huile incolore. Sur plaque de silice, Rf (AcOEt/Cy 50/50) = 0,33.

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): $\delta = 4,62$ (dd, $J = 4,4$ Hz, $J = 3,0$ Hz, 1H, -CHOO) 3,93 – 3,82 (m, 2H, -CH₂O THP) 3,73 – 3,43 (m, 14H, -CH₂O TEG) 3,37 (t, $J = 5,1$ Hz, 2H, CH₂N₃), 1,98–1,88 (non identifiée) 1,89 – 1,43 (m, 6H, -CH₂ THP)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta = 98,99$ (-CHO), 70,76 70,71 70,66 70,58 70,08 66,70 (- CH_2O TEG), 62,26 (- CH_2O THP), 50,73 (CH_2N_3), 30,61 (CH_2CH), 25,48 et 19,53 (- CH_2 THP)

1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy-3,6,9-trioxaundécane-11-amine (NH₂-TEG-OTHP) (4)

Dans un ballon de 100 mL surmonté d'un réfrigérant muni d'une garde à chlorure, 1,68 g du composé **3** (5,54 mmol, 1 éq.) est dilué dans 54 mL de MeOH distillé. 2,17 g de triphénylphosphine (1,5 éq., 8,31 mmol) sont additionnés à la solution d'azoture et le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 1 heure. La disparition de l'azoture au profit de la formation de l'amine est visualisée par CCM (éluant AcOEt/Cy 80/20). Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis séché sous vide (pompe à palettes) pendant 3 h. Le brut obtenu a été mis en réaction sans purification au préalable. Sur plaque d'alumine, R_f (AcOEt/MeOH 85/15) = 0,11.

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta = 4,60$ (dd, $J = 4,2$ Hz, 1H, -CHO) 3,98 – 3,81 (m, 2H, - CH_2O THP), 3,73 – 3,43 (m, 14H, - CH_2O TEG) 2,87-2,75 (t, $J = 5,3$ Hz, 2H, - CH_2NH_2), 1,89 – 1,43 (m, 8H, - CH_2 THP et - NH_2)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta = 98,98$ (-CHO), 73,52 70,76 70,66 70,62 70,57 70,39 70,34 66,68 (- CH_2O TEG + contaminant), 62,26 (- CH_2O THP), 49,29 (contaminant), 41,84 (- CH_2NH_2), 30,59 (CH_2CH), 25,45 et 19,51 (- CH_2 THP)

N-[1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy-3,6,9-trioxaundécane-11-yl]acrylamide (CH₂CHCONH-TEG-OTHP) (5)

Dans un ballon monocol de 100 mL sont dissous 2,55 g du composé **4** (1 éq., 9,18 mmol), 2,30 mL soit 1,67 g de TEA (1,8 éq., 16,53 mmol) et 900 μL d'une solution à 1 mg/mL d'hydroquinone dans l'acétonitrile distillé. Ensuite, 831,2 mg de chlorure d'acryloyle (1 éq., 9,18 mmol) sont ajoutés goutte à goutte (sur 20 min environ) au milieu réactionnel. La réaction est laissée sous argon, à température ambiante et sous agitation pendant 24 heures. Le milieu réactionnel est ensuite filtré sur fritté de porosité 4, concentré sous pression réduite et séché à la pompe à palettes et purifié par dépôt solide sur flash-chromatographie avec une colonne 120 g de silice (élution par gradient Cy/AcOEt/MeOH 100/0/0 à 0/90/10). Le composé **5** (1,5 g, 49 %) est obtenu sous forme d'une huile incolore. Sur plaque de silice, R_f (AcOEt) = 0,12.

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta = 7,77$ – 7,65 (m, 0,29H, H_{para} PPh_3O) 7,57 – 7,40 (m, 0,44H, H_{ortho} et $\text{H}_{\text{méta}}$ PPh_3O), 6,74 – 6,48 (m, 1H, NH) 6,35 – 6,20 (m, 1H, -COCH=CH₂), 6,20 – 6,05 (m, 1H, -COCH=CH₂ H_{trans}), 5,61 – 5,55 (m, 1H, -COCH=CH₂ H_{cis}), 4,61 (dd, $J = 4,2$ Hz, 1H, -CHO), 3,91 – 3,80 (m, 2H, - CH_2O THP) 3,73 – 3,40 (m, 16H, - CH_2O TEG) 3,14

(s, contaminant) 3,02 (s, contaminant) 2,48 (s, contaminant) 2,07 – 1,97 (m, contaminant) 1,89 – 1,41 (m, 6H -CH₂ THP)

RMN ¹³C (CDCl₃, 500 MHz): δ = 165,65 (-NHCO), 131,09 (-COCH), 126,16 (-CHCH₂) 99,07 (-CHOO), 70,62 70,58 70,27 69,85 66,67 (-CH₂O TEG), 62,38, 62,30 (-CH₂O THP + contaminant), 39,35 (-CH₂NH) 30,58 (CH₂CH), 25,44 et 19,56 (-CH₂ THP).

N-octyl-N-[1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy-3,6,9-trioxaundécane-11-yl]acrylamide
(CH₂CHCONC₈H₁₇-TEG-OTHP) (6)

voie a

0,052 g de NaH (2,04 mmol, 1,2 éq.) sont versés dans un ballon bicol de 25 mL placé sous argon, surmonté d'un réfrigérant muni d'une garde à chlorure. 1,60 mL de DMF anhydre sont ajoutés et le milieu est placé à froid (0°C) sous vive agitation. 0,564 g (1,7 mmol, 1,0 éq.) du composé **5** sont dissous dans 1,6 mL de DMF distillé et additionnés goutte à goutte au milieu réactionnel. De la même manière, 0,395 g (2,04 mmol, 1,2 éq.) de bromooctane sont dissous dans 1,6 mL de DMF distillé puis ajoutés au milieu. Une fois l'ensemble des réactifs additionnés, le milieu réactionnel est remis à température ambiante puis chauffé à 70 °C pendant 2 heures. Le milieu réactionnel est alors versé dans 50 mL de glace puis transvasé dans une ampoule à décanter. La phase aqueuse est extraite une première fois avec 3 x 25 mL d'Et₂O. Les phases organiques sont jointes puis lavées avec 2 x 25 mL d'une solution saturée en NaCl. La phase organique est ensuite séchée avec du Na₂SO₄ anhydre puis filtrée sur coton avant d'être évaporée sous pression réduite. Le brut résiduel est purifié par dépôt solide en flash chromatographie sur une colonne de 40 g de gel de silice (élution par gradient Cy/AcOEt 100/0 à 30/70). Le composé **6** (0,070 g, 9 %) est obtenu sous forme d'une huile incolore. Sur plaque de silice, R_f (AcOEt) = 0,20.

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ = 6,69 – 6,48 (m, 1H, -COCH=CH₂), 6,35 (dd, 1H, -COCH=CH₂, H_{trans}), 5,64 (dd, 1H, -COCH=CH₂, H_{cis}), 4,61 (dd, J = 4,1 Hz, 1H, -CHOO), 3,93 – 3,80 (m, 2H, -CH₂O THP), 3,71 – 3,42 (m, 17H, -CH₂O TEG + contaminant), 3,42 – 3,32 (m, 2H, -NCH₂C₇H₁₅) 1,94 – 1,45 (m, 9H, -CH₂ THP et CH₂C₆H₁₃), 1,27 (s, 11H, CH₂ chaîne octyle), 0,86 (t, 3H, CH₃)

RMN ¹³C (CDCl₃, 500 MHz): δ = 166,41 166,24 (-COCH + contaminant), 128,26 127,83 (COCH + contaminant) 127,74, 127,59 (COCHCH₂ + contaminant), 99,03 (-CHOO), 70,98 70,78 70,69 70,61 70,51 69,66 69,47 66,71 (-CH₂O TEG + contaminant) 62,31 62,20 (-CH₂O THP + contaminant), 49,53 47,59 47,16 46,72 (CH₂N + contaminant), 31,82 30,64 29,63 29,48

29,39 29,29 27,80 27,11 26,84 25,50 22,69 19,56 (-CH₂ chaîne octyle + -CH₂- THP + contaminant), 14,15 (-CH₃)

voie b : essai 1

1,00 g (2,81 mmol, 1 éq.) de composé **2** et 0,623 g (3,37 mmol, 1,2 éq.) de *N*-octylacrylamide sont dissous à température ambiante dans 20 mL de THF anhydre. 0,378 g (1,25 eq.) de *tertio*Butylate de potassium sont introduits dans le milieu réactionnel qui est laissé sous agitation et chauffé à 70°C pendant 1 h, puis à température ambiante sur la nuit. La réaction est suivie en CCM (éluant = AcOEt/Cy 80/20). Le milieu réactionnel est traité par ajout de 20 mL d'eau MQ puis transvasé dans une ampoule à décanter de 150 mL. Après addition de 20 mL d'une solution de NaCl saturée la phase aqueuse est extraite une première fois avec 3 x 20 mL d'Et₂O. Les phases organiques sont jointes et lavées avec 3 x 15 mL d'une solution saturée en NaCl. La phase organique est ensuite séchée avec du Na₂SO₄ anhydre, le solvant est évaporé sous pression réduite puis le brut résiduel est séché à la pompe avant d'être purifié par flash chromatographie sur colonne de 40 g de gel de silice. Après purification, (élution par gradient Cy/AcOEt/MeOH 100/0/0 à 0/90/10) seuls les deux réactifs de départ sont isolés.

voie b essai 2

0,985 g (2,46 mmol, 1,2 eq.) de NaH (60 %) sont introduits dans un ballon tricol de 25 mL placé sous argon, surmonté d'une ampoule à brome et d'un réfrigérant muni d'une garde à chlorure. 2 mL de DMF sont ajoutés et le milieu est placé à froid (0°C) sous vive agitation. 0,452 g (2,46 mmol, 1,2 éq.) de *N*-octylacrylamide sont dissout dans 2 mL de DMF et additionnés goutte à goutte au milieu réactionnel (milieu très mousseux). De la même manière, 0,074 g (2,05 mmol, 1 éq.) de composé **2** sont dissous dans 2 mL de DMF puis ajoutés au milieu. Une fois l'ensemble des réactifs additionnés, le milieu réactionnel est remis à température ambiante puis chauffé à 70 °C pendant 2 heures. Le milieu réactionnel est ensuite versé dans 60 mL de glace puis transvasé dans une ampoule à décanter de 250 mL. Après addition de 10 mL de NaCl saturé, la phase aqueuse est extraite avec 2 x 35 mL d'Et₂O. Les phases organiques sont jointes puis lavées avec 3 x 30 mL d'une solution saturée en NaCl. La phase organique est ensuite séchée avec du Na₂SO₄ anhydre, le solvant est évaporé sous pression réduite et le brut résiduel est séché à la pompe. Après purification par flash-chromatographie sur colonne de 24 g de gel de silice (élution par gradient Cy/AcOEt 100/0 à 0/100). Les deux réactifs de départ sont retrouvés majoritairement alors que 0,025 g d'un mélange composé du produit **6** et d'un produit secondaire non identifié a été obtenu ($\eta < 3$ %).

N-[1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy-3,6,9-trioxaundecan-11-yl]octanamide (7)

Dans un ballon, sont dissous 0,26 g d'acide octanoïque (1,80 mmol, 1 éq.), 1,24 g de composé **4** (1,80 mmol, 1 éq.) et 0,183 g (1,80 mmol, 1 éq.) de TEA dans 4,8 mL de dichlorométhane distillé. A cette solution est ensuite ajouté 0,409 g de DCC (1,98 mmol, 1,1 éq.) et 0,61 g de HOBT. Le milieu réactionnel est fermé hermétiquement et laissé sous agitation pendant 12 heures. Une fois la réaction terminée, le milieu est concentré sous pression réduite et séché à la pompe à palettes avant d'être purifié en dépôt solide par flash-chromatographie sur une colonne de 80 g de silice (élution par gradient Cy/AcOEt/MeOH 100/0/0 à 0/95/5). Le composé **7** (0,14 g, 19 %) est obtenu sous forme d'une huile incolore. Sur plaque de silice, Rf (AcOEt) = 0,30.

N-Octyl-1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy-3,6,9-trioxaundécane-11-amine (8)

voie c essai 1

Dans un ballon de 25 ml muni d'une garde à chlorure, la totalité du composé **4** (1,2 éq., 1,15 mmol) est dilué dans 5 mL de MeOH anhydre. Le milieu est placé sous agitation et 0,123 g (0,96 mmol, 1 éq.) d'octanal sont injectés dans la solution méthanolique, puis 184 mg (3,04 éq., 2,92 mmol) d'une solution 1,33 M de NaBH₃CN dans MeOH) est ajoutée goutte à goutte au milieu réactionnel. Après complète addition de l'agent réducteur, l'agitation est poursuivie pendant 48 heures à température ambiante. Le mélange est ensuite versé dans 20 mL de glace et le pH est ensuite approximativement (papier pH) amené à 10 à l'aide d'une solution de soude à 0,2 M. La solution est alors versée dans une ampoule à décanter et la phase aqueuse est extraite avec 3 x 15 mL d'éther diéthylique. Les phases étherées sont jointes et la phase organique est lavée avec 3 x 15 mL d'une solution de chlorure de sodium saturée. Après séchage sur Na₂SO₄ anhydre, filtration sur coton et évaporation du solvant sous pression réduite, l'huile résiduelle obtenue est purifiée par flash-chromatographie sur colonne de 25 g d'alumine basique (élution par gradient Cy/DCM/AcOEt 100/0/0 à 0/0/100). 19,5 mg (η = 4 %) de composé **8** sont récupérés.

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ = 4,61 (dd, J = 4,2 Hz, 1H, -CHOO), 3,91 – 3,80 (m, 2H, -CH₂O THP), 3,73 – 3,42 (m, 1H, -CH₂O TEG, 15H 1H en trop), 2,73 – 2,57 (dt, 2H, CH₂NH), 2,51 – 2,35 (m, 3H, NHCH₂ chaîne octyle + contaminant), 1,89 – 1,34 (m, 9H, -CH₂ THP et CH₂C₆H₁₃), 1,26 (s, 14H, -CH₂ chaîne octyle + contaminant), 0,86 (t, 4H, CH₃ + contaminant)

RMN ¹³C (CDCl₃, 500 MHz): δ = 99,01 (-CHOO), 70,71 70,69 70,62 70,51 69,83 66,72 (-CH₂O TEG), 62,29 (-CH₂O THP), 55,65 54,05 (CH₂N), 31,93 30,64 29,64 29,40 27,54 27,11 25,51 22,74 19,56 (-CH₂ chaîne octyle + contaminant), 14,19 (-CH₃)

voie c essai 2

Dans un ballon de 25 ml muni d'une ampoule d'addition à solide (addipoudre) surmonté d'une garde à chlorure, 0,282 g (1,02 mmol, 1,1 éq.) du composé **4** est dilué dans 4 mL de 1,2-dichloroéthane anhydre. Le milieu est placé sous agitation, puis 0,119 g (0,93 mmol, 1 éq.) d'octanal et 0,275 g (1,30 mmol, 1,4 éq. .) de NaBH(OAc)₃ sont ajoutés successivement au milieu réactionnel qui est alors laissé sous agitation à température ambiante pendant 1 h 30. Le mélange est ensuite versé dans 20 mL de glace puis le pH est ajusté à environ 10 à l'aide d'une solution de soude à 0,2 M et la solution est versée dans une ampoule à décanter. Après traitement des phases aqueuses et organiques tel que décrit précédemment pour l'essai 1, le brut est purifié par flash-chromatographie sur colonne de 50 g d'alumine basique (élution par gradient Cy/DCM/AcOEt 100/0/0 à 0/0/100). 26,6 mg de composé **8** ($\eta = 7\%$) ont ainsi été obtenus.

2.2.2.2 Polymérisation par RAFT et suivi de la cinétique

146,1 mg d'une solution 19,3 mM de cyanométhyl dodecyl trithiocarbonate dans le DMF est placée dans un réacteur contenant 0,086 g (pur à 77 %) (1,5.10⁻¹ mmol) du composé **6**. 145,7 mg d'une solution composée de 9,49 mg (5,8.10⁻² mmol) d'AIBN et de 30,52 mg (0,34 mmol) de trioxane pour 10 grammes de DMF sont ensuite introduits dans le réacteur avec deux mini barreaux aimantés. Le réacteur est bouché hermétiquement avec un septum adapté et refroidi dans un bain de glace. Après bullage d'argon durant 30 min dans le milieu réactionnel, le réacteur est placé dans un bain d'huile à 70°C, sous agitation. Des prélèvements du milieu réactionnel sont effectués à intervalle de temps connus et sont analysés en RMN. A chaque instant, le taux de conversion $\alpha_{(t)}$ du monomère peut être déduit de la relation suivante :

$$\alpha_{(t)} = \frac{[M]_0 - [M]_t}{[M]_0} = \frac{I_M}{I_{THP}} = \frac{6 \cdot I_M}{I_T} \cdot \frac{[T]}{[M]_0} \quad (16)$$

Où $[M]_0$ est la concentration initiale en monomère, $[M]_t$ est la concentration instantanée en monomère, $[T]$ est la concentration en trioxane, I_M est l'intégration d'un des trois signaux des protons vinyliques du monomère (5,41, 6,04 et 6,38 ppm), I_{THP} est l'intégration du signal du proton acétalique du THP (4,38 ppm) et I_T est l'intégration des protons du trioxane (singulet à 4,90 ppm).

2.2.3 Protocole de solubilisation

2.2.3.1 Liposomes de DMPC

Une solution de DMPC à 50 mg/mL a été réalisée dans un tampon 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl pH 8,0 pour les expériences de solubilisation des liposomes par les polymères et dans un tampon 20 mM phosphate de sodium, 100 mM NaCl pH 7,0 pour les expériences de la solubilisation de la membrane pourpre fusionnée à la DMPC. Cette solution a ensuite été extrudée à 100 nm après 20 passages à travers une membrane puis diluée à 4 mg/mL. 125 μ L de liposomes sont mélangés avec un volume équivalent de polymère à 5 mg/mL dans le même tampon. La solubilisation a été suivie à 25 °C par DLS.

2.2.3.2 Membrane d'*Escherichia coli*

La culture cellulaire de la souche *E. coli* C41 ou C43 (DE3) surexprimant YidC-GFP, C45 pour Mac B, et la purification des membranes ont été réalisées comme reporté dans (Angius et al., 2018).

Chaque solubilisation est réalisée dans un volume final de 250 μ L. Un volume de 71,4 μ L de membranes à une concentration en protéines totales de 7 mg/mL est dilué avec du tampon 20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl pH 8,0 pour obtenir une concentration finale en protéines de 2 mg/mL. Puis une solution de polymère à 100 g/L dissout dans le même tampon est ajoutée afin d'obtenir des concentrations finales en polymère de 1, 2, 5, 10, 20 et 25 mg/mL, ce qui équivaut à des ratios massiques protéines/polymères de 1:0,5 ; 1:1 ; 1:2,5 ; 1:5 ; 1:10 ; 1:12,5 pour YidC-GFP. Dans le cas de la solubilisation de MacB, les polymères ont été ajoutés à des concentrations finales de 10 mg/mL et 25 mg/mL, correspondant respectivement à des ratios massiques protéines/polymères de 1:5 et 1:12,5. Les échantillons sont ensuite laissés à 4 °C pendant 1 heure sur plaque agitatrice. Ils sont récupérés puis ultracentrifugés à 100 000 xg pendant 30 min. Les culots sont séparés des surnageants avant d'être resuspendus dans le volume initial de solubilisation avec un tampon 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 8,0 + 5 % SDS. A ces échantillons est ajouté le bleu de charge compatible avec une mesure de fluorescence sur gel (bleu de charge préparé suivant le protocole décrit dans (Drew et al., 2008))* puis ils sont déposés sur gels d'acrylamide (12 %) coulés manuellement. La migration des gels se fait à 21 mA et 100 V par gel. Une fois la migration terminée, le gel est placé dans de l'eau MilliQ et une photo de fluorescence du gel, prise grâce à un scanner laser ($\lambda_{\text{excitation}} = 495 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{émission}} = 519 \text{ nm}$), permet de mesurer la fluorescence de la GFP. Le logiciel Image J permet d'intégrer les aires de chaque bande pour quantifier la fluorescence. Les gels ont ensuite

été révélés au bleu de Coomassie. Dans le cas de Mac B, seule la coloration au bleu de Coomassie a été réalisée.

Le surnageant obtenu suite à une solubilisation avec 1 % DDM a été choisi comme référence pour définir le maximum de solubilisation (*i.e.* 100 % d'extraction) dans l'ensemble des expériences.

Dans le cadre des expériences de cinétique de solubilisation de YidC-GFP, les membranes ont été incubées avec les polymères à un ratio massique fixé à 1:1. Un aliquot de l'échantillon a été prélevé tous les quart d'heure, puis ultracentrifugé à 250 000 xg pendant 10 min. Les échantillons ont ensuite été déposés sur gel d'acrylamide comme indiqué ci-dessus.

**Composition du bleu de charge compatible avec une mesure de fluorescence sur gel d'acrylamide : 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 5% glycérol, 5 mM EDTA (pH 8,0), 0,02% bleu de bromophénol, conservé en aliquots de 700 µl à -20 °C. Avant utilisation, ajouter 200 µl de SDS 20% et 100 µl de DDT à 0,5 M. La solution peut être conservé à température ambiante pendant 1 mois.*

2.2.3.3 Vésicules du réticulum sarcoplasmique

Les vésicules du réticulum sarcoplasmique (RS) de lapin sont préparées à partir de tissus musculaires selon le protocole décrit dans (Champeil et al., 1985). Ces membranes sont très riches en SERCA 1a.

La solubilisation des vésicules du RS a été analysée de deux manières différentes, par gel et par mesure de turbidité. Les membranes de RS diluées à une concentration en protéines de 0,06 mg/mL sont solubilisées avec 0,6 mg/mL de polymère dans du tampon 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl pH 8,0 pendant 1 heure sous agitation sur roue (20-30 rpm / min) à 4 °C. Après une ultracentrifugation de 30 min à 100 000 xg, les culots sont séparés des surnageants avant d'être ressuspendus dans le volume initial de solubilisation avec du tampon. Les échantillons correspondant aux surnageants et aux culots sont analysés après migration sur gels d'acrylamide (12 %) contenant 1 mM de CaCl₂.

Les mesures de turbidité ont été réalisées à température ambiante dans un tampon 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl pH 8,0. La concentration finale en polymère est de 10 mg/mL et 5 mg/mL de membrane, soit un ratio [membrane/polymère] de 1:2.

2.2.3.4 Membrane pourpre de *Halobacterium salinarum*

- Protocole de fusion de la membrane pourpre avec des liposomes de DMPC

Les liposomes de DMPC préparés comme décrits précédemment (100 μ L à 50 mg/mL) et la membrane pourpre (200 μ L à \sim 5 mg/mL en BR) sont mélangés de façon à obtenir un ratio massique BR/DMPC de 1:5. L'échantillon est dilué dans un tampon 20 mM phosphate de sodium, 100 mM NaCl, pH 7,0 (typiquement, 1,7 mL de tampon est ajouté pour obtenir une concentration finale de BR de 0,5 mg/mL). L'échantillon est incubé dans l'obscurité pendant 30 min dans un bain à sonication VWR selon le protocole déjà décrit par (Knowles et al., 2009; Orwick-Rydmark et al., 2012), avant d'être aliquoté et congelé à -80°C jusqu'à son utilisation

- Solubilisation de la membrane pourpre fusionnée avec des lipides exogènes

L'étape de solubilisation de la membrane pourpre fusionnée avec des liposomes de DMPC est initiée par l'ajout de polymères à un ratio massique BR / polymère de 1 : 6,25. Après 24 heures d'incubation dans l'obscurité à température ambiante, les échantillons sont ultracentrifugés à 4°C , à 200 000 xg pendant 20 min. Les surnageants sont séparés des culots et leur absorbance à 554 nm est mesurée avec un spectromètre UV-Visible. Une solubilisation, réalisée dans l'obscurité pendant une heure à 4°C en présence de 100 mM d'OTG constitue le contrôle positif de cette expérience. L'efficacité de solubilisation est déterminée en divisant la valeur d'absorbance du surnageant mesurée après ultracentrifugation par celle obtenue avant.

2.2.4 Protocole de piégeage de la BR

La formation de complexes BR/polymère a été effectuée selon le protocole de piégeage qui consiste en une solubilisation de la membrane à l'aide de détergent, puis un remplacement du détergent par le polymère en incubant l'échantillon avec des bio-beads (*cf. Figure 17*).

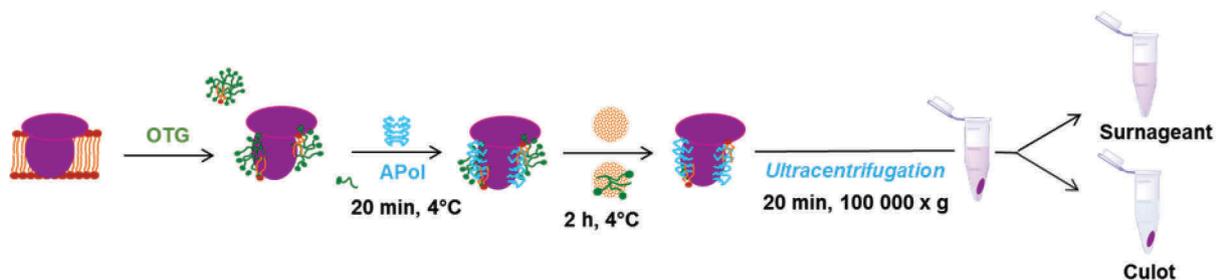


Figure 17. Protocole de piégeage en APols de la BR solubilisée en OTG.

La solubilisation de la membrane pourpre est réalisée à 100 mM de n-Octyl beta-D-thioglucoopyranoside (OTG) à 4 °C pendant 40 heures à l'abri de la lumière. Cette étape est suivie d'une ultracentrifugation de 20 minutes à 200 000 xg à 4 °C (rotor TLA-100), le surnageant est enfin dilué pour obtenir une concentration finale de 18 mM en OTG. La BR en présence de 18 mM d'OTG est incubée pendant 20 min en présence de polymères à un ratio massique BR/polymère de 1:5. Des billes de polystyrène, appelées Bio Beads (BioRad SM-2), sont ajoutées au mélange dans un ratio massique Bio Beads/OTG de 20:1 et incubées pendant 2 heures à 4°C sous agitation. Après élimination de Bio Beads, l'absorbance à 554 nm de chaque échantillon a été mesurée avant et après centrifugation à 100 000 xg pendant 20 min (rotor TLA-100). Le pourcentage de BR est calculé en référence à l'absorbance mesurée en OTG avant centrifugation.

2.2.5 Stabilité des protéines

2.2.5.1 Thermostabilité de la BR après piégeage

Les échantillons BR/polymères obtenus après piégeage ont été incubés à une température comprise entre 30 et 80 °C, pendant 30 min, puis refroidis sur glace avant mesure de l'absorbance à 554 nm. Concernant les échantillons de BR en détergent (OTG), une étape de centrifugation (5 min à 16 000 xg, 4 °C temps, centrifugeuse eppendorf 5415R) a été effectuée pour supprimer les agrégats de protéine. L'absorbance des échantillons à 554 nm est mesurée avec un spectromètre UV-Visible.

2.2.5.2 Thermostabilité de la BR après solubilisation directe

Après solubilisation de la membrane pourpre fusionnée à des lipides exogènes (DMPC), les échantillons sont incubés à 50 °C sous agitation dans un thermomixer et à l'abri de la lumière pendant 6 heures, refroidis dans la glace et centrifugés à 4 °C, 16000 x g pendant 3 min sur une centrifugeuse de paillasse (centrifugeuse eppendorf 5415R) avant de mesurer l'absorbance à

554 nm. Les valeurs d'absorbance ont été normalisées sur la valeur de l'absorbance initiale mesurée avant ultracentrifugation.

2.2.5.3 Test d'activité de SERCA 1a

L'activité ATPasique de SERCA1a a été mesurée de façon indirecte en couplant plusieurs réactions enzymatiques. Le dosage a été fait en présence de pyruvate kinase (0,1 mg/mL) et de lactate déshydrogénase (0,1 mg/mL) afin, d'une part, de maintenir constante la concentration d'ATP dans l'échantillon (la pyruvate kinase régénérant l'ATP en transférant le phosphate du phosphoénolpyruvate sur l'ADP) et, d'autre part, de suivre la consommation d'ATP en mesurant la diminution de l'absorbance à 340 nm du NADH au cours du temps. Le tampon de l'échantillon contient du KCl 100 mM, Mg^{2+} 1 mM, Ca^{2+} 0,1 mM, MOPS 50 mM (pH 7,5 à 20°C) et 1-5 mM d'ATP. Pour réaliser le dosage, le milieu réactionnel contient également du phosphoénolpyruvate 1 mM et du NADH 0,15 mM.

2.2.6 Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

La chromatographie d'exclusion stérique est une méthode analytique de chromatographie en phase liquide qui permet de séparer les macromolécules en fonction de leur volume hydrodynamique. Les conditions dans lesquelles elle aura été effectuée vont dépendre de la finalité de l'expérience. La SEC effectuée en phase aqueuse sur système FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) a permis d'obtenir des informations sur la taille et l'homogénéité des particules formées par les polymères seuls en solution aqueuse ou sur celle des complexes protéine/polymère. La SEC effectuée en phase organique sur système HPLC a permis de caractériser les masses molaires moyennes en nombre, $\langle M_n \rangle$, et en masse, $\langle M_w \rangle$, du PEGAPol ainsi que de déterminer la dispersité D ($D = \langle M_w \rangle / \langle M_n \rangle$) caractérisant l'hétérogénéité de longueur de chaîne macromoléculaire du polymère.

Analyse SEC des CyclAPols et ArylAPols seuls, en association avec des lipides et / ou de PMs :

Pour les CyclAPols et ArylAPols ainsi que pour les complexes BR/polymère, les chromatographies d'exclusion stérique sont réalisées à température ambiante sur un système FPLC Akta purifier 10. La détection UV-Visible est réalisée à trois longueurs d'onde différentes, 220, 280 et 554 nm dans le cas des complexes BR / polymère et deux longueurs d'onde 220 et 280 nm pour les polymères seuls et les complexes polymères / lipides. Pour les complexes YidC-GFP / polymère, le protocole est similaire mais la détection UV-Visible à 220 nm et 280 nm est couplée à une détection par fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}} = 488 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 512 \text{ nm}$) pour visualiser la fluorescence de la GFP. Le volume d'injection est de 80 μL et le débit de 0,5 mL/min. La colonne utilisée est une superose 12 10/300 GL de 20 mL dont la gamme de séparation s'étend de 10 à 300 kDa. Avant toute injection, un protocole de rinçage avec 100 mL d'eau MilliQ est réalisé afin de remplacer le mélange 8/2 (v/v) EtOH / eau dans lequel la colonne est généralement conservée. Cette étape de rinçage est suivie d'une étape d'équilibration avec 100 mL de tampon d'analyse. Le tampon utilisé dans le cas de l'étude des polymères seuls et des complexes YidC-GFP / polymères est un tampon 20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl pH 8,0. Pour les complexes BR / polymères, le tampon est 20 mM phosphate de sodium, 100 mM NaCl pH 7,0.

Avant chaque série d'injection, la colonne est calibrée à l'aide de quatre injections de solutions étalons, composées de 2 à 3 standards chacun, dont la composition est développée ci-après : (Harlan et al., 1995)

Solution étalon 1 : bleu dextran à 2 mg/mL et acétone à 5 mg/mL

Solution étalon 2 : ferritine à 0,2 mg/mL, conalbumine et aprotinine à 2 mg/mL

Solution étalon 3 : thyroglobuline, ovalbumine et ribonucléase A à 2 mg/mL

Solution étalon 4 : aldolase et l'anhydrase carbonique à 2 mg/mL

La solution étalon 1 informe sur la gamme de séparation de la colonne en fournissant le volume exclu, V_0 et le volume total, V_T . Les trois autres étalons sont constitués de protéines globulaires de masses moléculaires et de rayons hydrodynamiques (R_H) bien définis (cf. *Tableau 3*).

Marqueurs	MM (kDa)	R _H (nm)
Bleu dextran	-	-
Thyroglobuline (œuf)	669,0	8,50
Ferritine	440,0	6,10
Aldolase	158,0	4,60
Conalbumine	75,0	4,00
Ovalbumine	43,0	3,05
Carbonic anhydrase	29,0	2,55
Ribonucléase A	13,7	1,64
Aprotinine	6,5	1,48
Acétone	0,056	-

Tableau 3. Masses moléculaires (MM) et rayons hydrodynamiques (R_H) des standards injectés dans le cadre d’une calibration de colonne chromatographique.

Les k_D de chaque protéine sont déterminés à l’aide de l’équation (17) ci-après :

$$k_D = \frac{V_P - V_0}{V_T - V_0} \quad (17)$$

Avec :

V_P : le volume d’élution des particules ou protéines analysées

V_0 : le volume d’élution du bleu dextran

V_T : le volume d’élution de l’acétone

La courbe de calibration, reportant les k_D en fonction des volumes d’élution des protéines (cf. Figure 18) permet d’établir l’équation (18), équation polynomiale de degré 4 comme suit :

$$k_D = a + bR_H + cR_H^2 + dR_H^3 + eR_H^4 \quad (18)$$

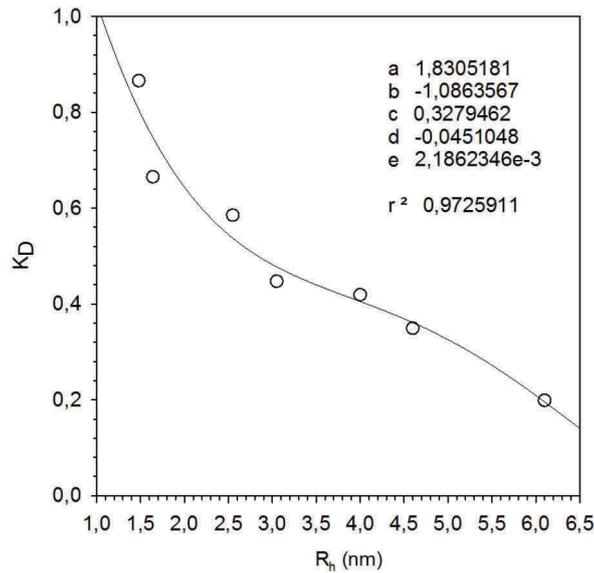


Figure 18. Courbe de calibration de la colonne SUPEROSE 12 10/300 GL utilisée dans ce travail de thèse.

Les valeurs de a, b, c, d et e sont déterminées par l'équation de la courbe de calibration. Pour l'étude d'objets en solution, l'équation (1) détermine le k_D pour la particule considérée puis l'équation (2) permet ensuite de remonter au rayon hydrodynamique de cette dernière.

Détermination de la masse moléculaire moyenne du PEGAPol par analyse SEC :

La caractérisation de la masse moléculaire moyenne du polymère neutre par SEC a été effectuée sur le système chromatographique comprenant un bloc Viscotek GPCmax constitué d'un dégazeur, d'une pompe fonctionnant à un débit de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ et d'un injecteur automatique. L'élution est réalisée en THF sur trois colonnes montées en série (PL Gel Mixte C, $7,5 \text{ mm} \times 300 \text{ mm}$, diamètre des pores : $5 \text{ }\mu\text{m}$, gamme de séparation : $200 - 2 \times 10^6 \text{ Da}$) et thermostatées à $40 \text{ }^\circ\text{C}$. $200 \text{ }\mu\text{L}$ d'échantillon ont été injectés à $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ après filtration sur $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ et l'élution a été suivie par réfractométrie (réfractomètre différentiel R.I. (Viscotek, LDC analytical Refracto Monitor IV)) et par absorption UV à 309 nm (détecteur UV Waters). La calibration a été effectuée avec des standards poly(méthacrylate de méthyle) fournis par Polymer Laboratories. Le toluène a été choisi comme étalon interne. Les chromatogrammes obtenus ont été traités par le logiciel *OmniSEC* (version 4.6.2) commercialisé par Viscotek est utilisé pour traiter les chromatogrammes.

2.2.7 Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La DLS est une méthode d'analyse spectroscopique non invasive permettant d'accéder à la distribution des particules en fonction de leur rayon hydrodynamique, noté R_H . Ce rayon est déterminé par l'étude des fluctuations d'intensité diffusée (dus au mouvement brownien des particules en solution). En effet l'analyse des fluctuations d'intensité fournit une courbe d'auto-corrélation, $G(\tau)$ définie suivant l'expression ci-dessous et représentée sur la figure 19.

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (19)$$

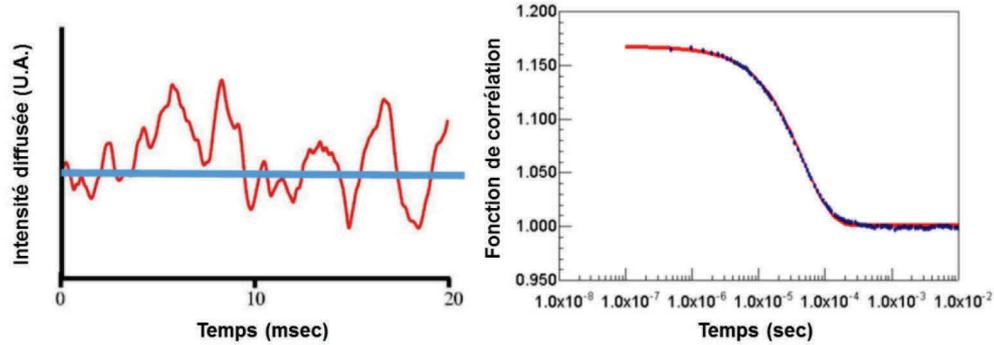


Figure 19. Représentation des fluctuations d'intensité (à gauche) et d'une fonction d'autocorrélation (à droite).

Cette fonction d'auto-corrélation que l'on peut exprimer sous forme d'une exponentielle décroissante, $G(\tau) = \exp(-D_t q^2 \tau)$, nous permet de déterminer un coefficient de diffusion des particules en solution, D_t , permettant d'en déduire, via la relation Stokes-Einstein (équation (20)), un rayon hydrodynamique de la particule, ce rayon correspondant au rayon de la sphère ayant le même coefficient de diffusion. Par contre ce rayon obtenu par DLS ne nous informe pas sur la forme de la molécule. Il nous faudrait utiliser une autre technique telle que la diffusion des rayons X aux petits angles.

$$D_t = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (20)$$

Avec :

- D_t : coefficient de diffusion ($m^2 \cdot s^{-1}$)
- k_B : constante de Boltzmann ($1,38 \cdot 10^{-23}$ J/K)
- R_H : rayon hydrodynamique (m)
- T : température (K)
- η : viscosité du solvant (Pa.s)

Dans le cadre de ce travail, la DLS a été utilisée pour mesurer des tailles de particules de polymères en solution, de complexes DMPC/polymère, BR/polymère mais également pour suivre des cinétiques de solubilisation de liposomes de DMPC et de BR fusionnée à des liposomes de DMPC par différents polymères.

Le rayon hydrodynamique et la polydispersité des liposomes ont été calculés en ajustant la fonction de corrélation avec la méthode d'analyse des cumulants. Dans le cas des échantillons de complexes BR/polymère, la méthode d'ajustement par une double exponentielle a été choisie et les mesures ont été réalisées sur des temps longs afin de ne pas inclure dans la détermination du rayon hydrodynamique une contribution de gros objets résiduels.

Pour les cinétiques de solubilisation des liposomes de DMPC par les polymères, 500 μ L de liposomes à 1 mg/mL en solution dans du tampon 20 mM phosphate de sodium, 100 mM NaCl

pH 7,0 ont été mélangés volume à volume avec une solution aqueuse de polymère à 1,25 mg/mL. La cinétique consiste en une mesure d'intensité de la lumière diffusée toutes les secondes pendant 5 min.

2.2.8 La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)

La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) est une technique analytique permettant de déterminer les différences de densité électronique au sein d'un échantillon et ainsi d'en étudier les propriétés structurales à l'échelle nanométrique. C'est une technique basse résolution qui nécessite un échantillon pur et homogène. Cette technique est bien documentée dans de nombreux ouvrages (O. Glatter, O. Kratky, Small Angle X-ray Scattering, in, Academic Press, 1982. A. Guinier, G. Fournet, Small angle scattering of X-rays, Wiley, New York, 1955) et de nombreuses revues. Certaines caractéristiques des particules formés en solution peuvent être déterminées en fonction du traitement appliqué à la courbe de diffusion (*cf. Figure 20* panneau A) tels que :

- Le graphique de Guinier, qui consiste à tracer $\ln I(q)$ en fonction de q^2 , fournit des informations sur le rayon de giration, R_G (calculé à partir de la pente) et la masse des objets analysés (par calcul de la valeur de $I(q)$ extrapolé à $q=0$) en se basant sur l'approximation de Guinier (Guinier and Fournet, 1955) (*cf. Figure 20* panneau B).
- Le graphique de Kratky, $I(q) * q^2$ en fonction de q , est informatif pour vérifier la globularité et la flexibilité des objets en solution (*cf. Figure 20* panneau C).
- Il est également possible de représenter la fonction de distribution des distances intraparticulaires, $P(r)$, obtenu par Transformée de Fourier Inverse de l'intensité, permettant d'estimer la forme et les inhomogénéités de densités électroniques de la particule et d'en déterminer la distance maximale (*cf. Figure 20* panneau D).

Les échantillons de polymères seuls à 10 mg/mL ont été préparés dans un tampon composé de 20 mM phosphate de sodium, 100 mM NaCl, pH 7,0. Dans le cadre de l'étude des polymères avec les liposomes de DMPC, les concentrations en polymère et en DMPC sont respectivement de 10 mg/mL de 8 mg/mL, soit un ratio massique polymère/lipide de 1 :1,25. Les échantillons ont été analysés après 24 heures d'incubation à température ambiante.

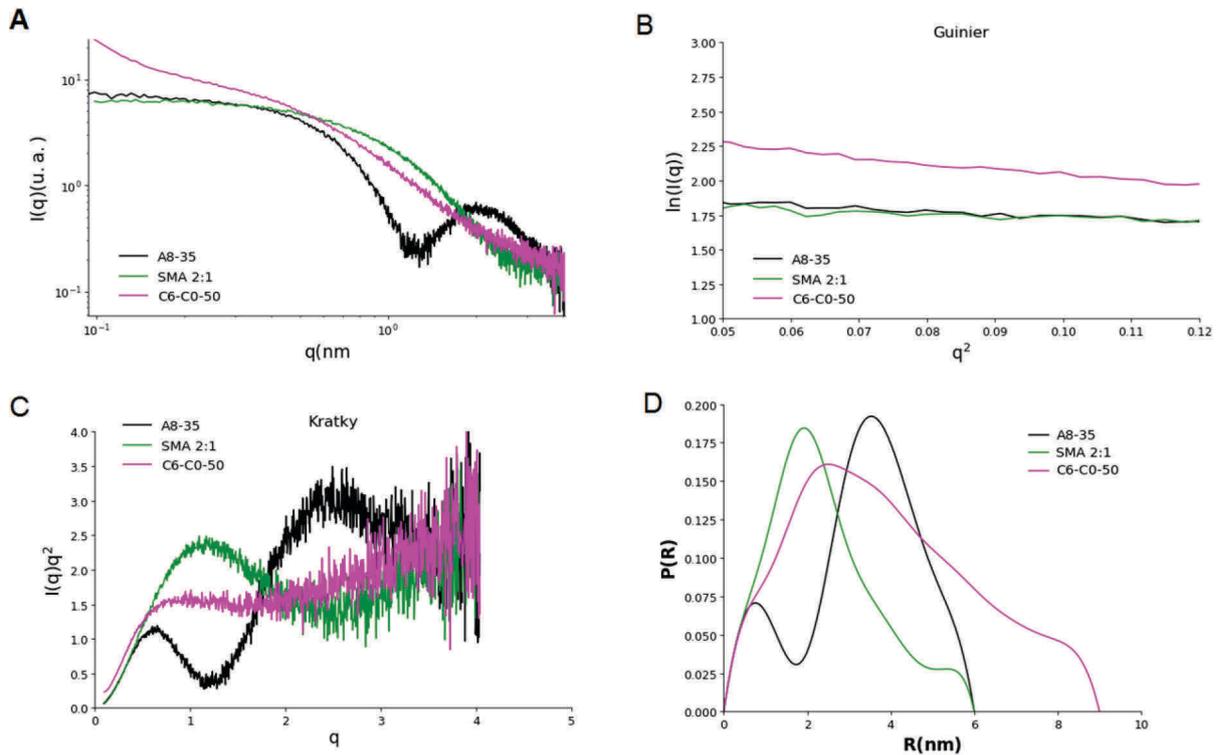


Figure 20. Courbes SAXS de polymères présentant différents comportements en solution. Panneau A : courbe de diffusion obtenue par SAXS. Panneau B : graphique de Guinier. Panneau C : graphique de Kratky. Panneau D : $P(r)$.

Les assemblages de polymères avec ou sans liposomes de DMPC ajoutés ont été caractérisés par diffusion de rayons X aux petits angles sur la ligne de lumière synchrotron bioSAXS BM29 de l'ESRF (Grenoble). La distance entre l'échantillon et le détecteur était de 2,849 m et la longueur d'onde des rayons X, $\lambda = 0,09919$ nm, menant à une plage de vecteurs de diffusion q entre 0,034 à 4,95 nm⁻¹. La ligne BM29 était équipée d'un détecteur 2D (Pilatus 1M) et d'un passeur d'échantillons automatisé. Les températures de stockage et de mesure des échantillons ont été fixées à 20°C. Pour éviter les dommages d'irradiation lors des expériences de diffusion, les données ont été recueillies par 10 images successives de 0,5 s et la solution a été déplacée dans le capillaire pendant l'exposition. Toutes les manipulations de données (acquisition et analyse) ont été effectuées à l'aide de procédures automatiques et standard via l'interface ISPyB (De et al., 2015) et le logiciel PRIMUS (Konarev et al., 2003) ou BioXTAS RAW (Hopkins et al., 2017).

3 RESULTATS

3.1 CHAPITRE 1 : les Amphipols porteurs de groupements latéraux cycliques

Les résultats sur ces nouveaux amphipols, CyclAPols et ArylAPols, vont se décliner en plusieurs parties : 1) une analyse des synthèses et une caractérisation des polymères seuls ; 2) des tests de solubilisation des polymères sur différents systèmes lipidiques (vésicules de DMPC) et membranaires ; 3) des études de stabilité et d'activité de différentes protéines membranaires ; 4) une caractérisation des assemblages lipide et protéine-lipide avec les polymères.

3.1.1 Synthèses et caractérisations des nouvelles classes de polymères

3.1.1.1 Nomenclature des amphipols porteur de groupement latéraux cycliques

La nomenclature des nouveaux APols est différente suivant qu'il s'agisse de polymères comportant des cycles aliphatiques ou aromatiques et les amphipols résultants seront alors dénommés respectivement CyclAPols ou ArylAPols.

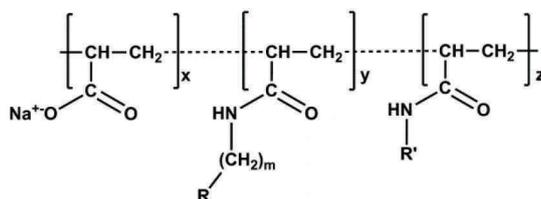


Figure 21. Formule générale des APols ; avec R = cycle saturé (substitué ou non en position 4) dans le cas des CyclAPols et R = cycle aromatique (substitué ou non en position para) dans le cas des ArylAPols, avec m ($0 \leq m \leq 2$) déterminant la longueur du bras espaceur, x ($x = 25, 35$ ou 50%) le pourcentage de carboxylates libres, y ($y = 25$ ou 50%) le pourcentage de chaînes hydrophobes, et z ($z = 0, 15$ ou 40%) pourcentage de R'.

En se basant sur la structure décrite ci-dessus (*cf. Figure 21*), les CyclAPols seront identifiés par la nomenclature C_n-C_m-y-z lorsque le cycle aliphatique sera non substitué et où :

- C représente l'élément carbone
- n le nombre de carbones constituant le cycle aliphatique porté par le polymère
- m le nombre de carbones constituant le bras espaceur séparant ce cycle de la liaison amide
- y est le pourcentage de greffage de ce groupement cyclique sur le polymère

- z est le pourcentage d'isopropyles ($R' = iPr$) greffés sur ce même polymère

La nomenclature $C_n-C_m-y^{p-R''}-z$ désignera un CyclAPol dont les cycles latéraux sont substitués en position relative p par le groupement R'' , ce dernier étant défini suivant la nomenclature IUPAC en vigueur.

Dans le cas des ArylAPols, le nombre de carbones constituant la partie cyclique a été fixé à six et la nature du greffon aromatique va donc dépendre du nombre de carbones m constituant le bras espaceur. Les ArylAPols seront donc désignés par la nomenclature $R-y-z$ où :

- $R = Ph$ (pour phényle) si $m = 0$, $R = Bn$ (pour benzyle) si $m = 1$, $R = St$ (pour styrényle) si $m = 2$
- y et z sont définis tels que précédemment

Les ArylAPols porteurs de cycles substitués seront désignés par $R-y^{p-R''}-z$ où p et R'' sont tels que définis précédemment.

3.1.1.2 Synthèses chimiques

Les nouveaux APols synthétisés ont pour précurseur un acide polyacrylique (PAA) commercial. Leur synthèse est donc très similaire à celle de l'A8-35 décrite par Gohon *et al.* (Gohon *et al.*, 2004, 2006). Elle consiste à hydrophobiser aléatoirement le PAA, *via* la formation de liaisons amide entre une amine primaire portée par les groupements à greffer et une fraction définie de carboxylates portés par le PAA. Avant de procéder à la modification de ce PAA commercialisé sous une forme partiellement sodée en solution aqueuse à 50 % en poids, il est indispensable de le retraiter (cf. partie expérimentale) pour pouvoir le récupérer sous une forme purement acide et parfaitement soluble dans le solvant de réaction. Le taux d'hydratation du PAA doit être déterminé (pH-métrie) de façon à ne pas induire d'erreur et de surestimation de la masse d'amine nécessaire à la modification du polymère.

La réaction de modification se fait dans de la *N*-méthylpyrrolidone (NMP) en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCC).

Lorsque le précurseur doit être modifié par différentes amines, leur greffage est réalisé de façon séquentielle, et lorsque la synthèse implique la modification de plus de 50 % des unités carboxyliques, il devient indispensable (en raison de la perte graduelle de réactivité des

fonctions acide) de procéder à l'activation de celle-ci en introduisant un réactif supplémentaire, le 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) (*cf. Figure 22*).

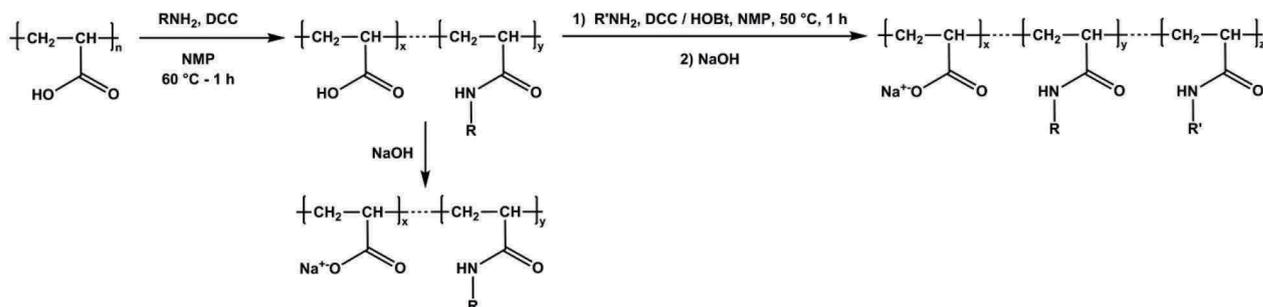


Figure 22. Schéma général de synthèse de l'APol de référence, l'A8-35 et des nouveaux APols.

Ce réactif réagit avec l'intermédiaire réactionnel (anhydride ou *O*-acylurée) issu de la réaction des fonctions carboxyliques pour former un ester actif plus stable et générant moins de produits secondaires (*N*-acylurée) (El-Faham and Albericio, 2011; Selinger and Lapidot, 1966) (*cf. Figure 23*).

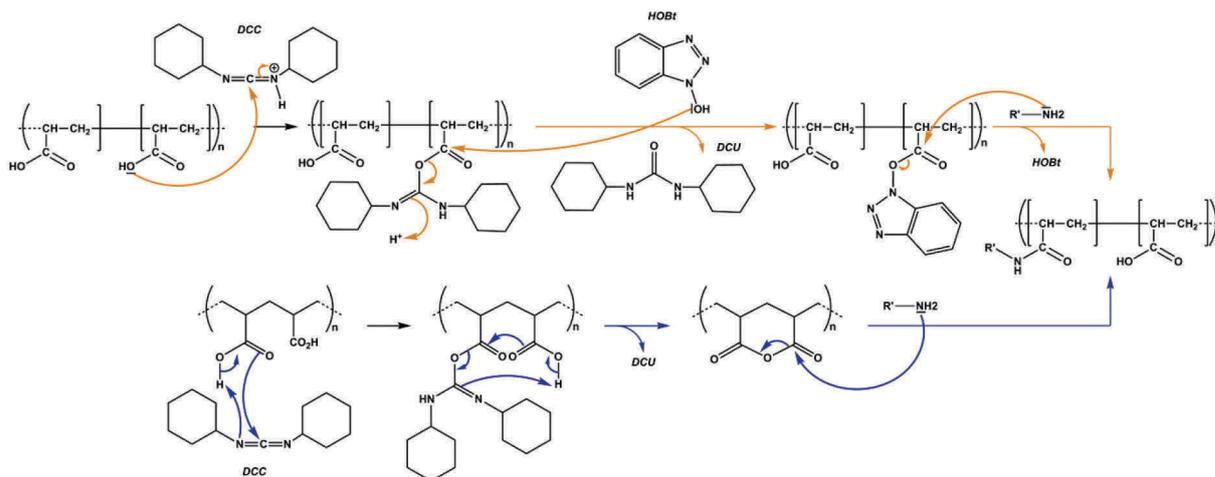


Figure 23. Mécanisme de formation de la liaison amide entre le PAA et une amine primaire en présence du couple DCC/HOBt (flèches oranges) (Selinger and Lapidot, 1966) ou en présence de DCC seule (flèches bleues) (Williams and Ibrahim, 1981).

La transposition de l'intermédiaire *O*-acylurée en *N*-acylurée est d'ailleurs un des problèmes récurrents intervenant lorsqu'un excès trop important (typiquement supérieur à 10 % molaire) de DCC est introduit initialement dans le milieu réactionnel (*cf. Figure 24*). Un signal supplémentaire comparable à celui caractéristique des méthines des cyclohexyles de la DCU est alors généralement observé à 3,5 ppm sur le spectre RMN ^1H du polymère (Gohon et al., 2004, 2006); la forme élargie de ce signal traduisant la présence du produit contaminant sur la chaîne macromoléculaire. Bien que ce contaminant n'ait jamais été formellement identifié, il

est considéré depuis plus d'une décennie (Gohon et al., 2006), et sur la base de différentes informations recueillies dans la littérature (Khorana, 1953; Kurzer and Douraghi-Zadeh, 1967), que ce greffon parasite est issu de la transposition du *O*-acylurée intermédiaire en *N*-acylurée (cf. Figure 24).

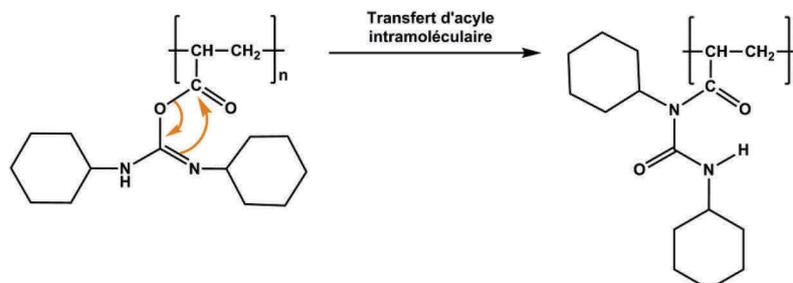


Figure 24. Transposition de l'intermédiaire *O*-acylurée en *N*-acylurée.

Cette réaction parasite est d'autant plus probable qu'elle est connue pour être très rapide dans des solvants de type DMF (El-Faham and Albericio, 2011) et donc très certainement aussi dans la NMP (substitut moins toxique du DMF).

Ses conséquences sont dramatiques car, en plus de ne pas conduire à la modification attendue, une partie des fonctions carboxyliques sera irréversiblement masquée par un greffon particulièrement hydrophobe (deux cyclohexyles). C'est pourquoi l'excès de DCC utilisé reste limité à 10 % au maximum.

A l'issue des étapes de modification, l'amphipol obtenu sous sa forme acide, est purifié en solution aqueuse en soumettant le polymère à trois cycles de précipitation (pH < 2) / solubilisation (pH > 8). La solution basique de polymère obtenue à l'issue de la dernière solubilisation est filtrée sur millipore (0,22 μm) puis dialysée contre de l'eau déionisée pendant 24 heures, et enfin lyophilisée pour permettre de récupérer les différents APols sous forme de poudre. Les rendements ont varié de 40 à 90 % suivant le type et la proportion de greffons utilisés (cf. Tableau 4 et Tableau 6)

Chaque poudre a ensuite été soumise à analyse afin de déterminer la composition chimique et les propriétés physicochimiques des APols obtenus.

3.1.1.3 Caractérisation de la composition chimique des polymères

La composition chimique des polymères a été déterminée suivant deux méthodes que sont la résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton et du carbone 13 et le dosage pH-métrique. Les tableaux 4 à 6 respectivement associés aux figures 25 et 26, donnent la description des différentes structures obtenues ainsi que les taux de greffage et les rendements de leur synthèse.

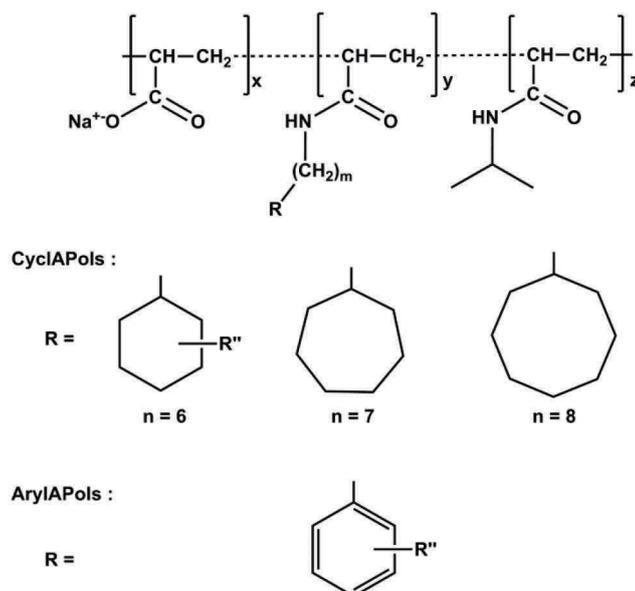


Figure 25. Structures générales des CyclAPols et ArylAPols développés dans le cadre de cette thèse.

CyclAPol	n	m	p- R''	$x_0 / x_{exp} / x'_{exp}$ (%)	$y_0 / y_{exp} / y'_{exp}$ (%)	$z_0 / z_{exp} / z'_{exp}$ (%)	\bar{M}_n (kg.mol ⁻¹)	Rendement (%)
C ₆ -C ₀ -25	6	0	-	75 / 72 / 67	25 / 28 / 33	0 / 0 / 0	3,920	44
C ₆ -C ₀ -50	6	0	-	50 / 48 / 44	50 / 52 / 56	0 / 0 / 0	4,405	66
C ₆ -C ₀ -50- ⁴ -Et	6	0	4-Et	50 / 45 / nd	50 / 55 / nd	0 / 0 / 0	4,965	90
C ₆ -C ₁ -25	6	1	-	75 / 74 / 67	25 / 26 / 33	0 / 0 / 0	3,044	82
C ₆ -C ₁ -50	6	1	-	50 / 52 / 47	50 / 48 / 53	0 / 0 / 0	4,580	76
C ₆ -C ₁ -25-40	6	1	-	35 / 43 / nd	25 / 26 / 29	40 / 31 / nd	4,248	76
C ₆ -C ₁ -50-15	6	1	-	35 / 37 / nd	50 / 50 / 50	15 / 13 / nd	4,654	80
C ₆ -C ₂ -25	6	2	-	75 / 78 / 73	25 / 22 / 27	0 / 0 / 0	4,036	74
C ₆ -C ₂ -50	6	2	-	50 / 47 / 46	50 / 53 / 54	0 / 0 / 0	4,919	98
C ₇ -C ₀ -50	7	0	-	50 / 53 / 46	50 / 47 / 54	0 / 0 / 0	4,580	74
C ₈ -C ₀ -50	8	0	-	50 / 52 / 46	50 / 48 / 54	0 / 0 / 0	4,843	96
C ₈ -C ₀ -25-40	8	0	-	35 / 47 / nd	25 / 20 / nd	40 / 33 / nd	4,118	79
C ₈ -C ₀ -50-15	8	0	-	35 / 44 / nd	50 / 46 / nd	15 / 10 / nd	4,757	40

Tableau 4. Caractérisation des principaux CyclAPols synthésés dans le cadre de ce travail doctoral avec x_0 , y_0 , z_0 et x_{exp}/x'_{exp} , y_{exp}/y'_{exp} , z_{exp}/z'_{exp} , les compositions chimiques en pourcentage, respectivement, théoriques (attendus) et obtenus (déterminés expérimentalement par RMN/pH-métrie). Les masses molaires moyennes ont été déterminées à partir des résultats moyennés des deux méthodes d'analyse, le DPn est de 35. La déviation standard est dans chaque cas de l'ordre de $\pm 10\%$.

ArylAPol	<i>n</i>	<i>m</i>	p-R''	$x_0 / x_{exp} / x'_{exp}$ (%)	$y_0 / y_{exp} / y'_{exp}$ (%)	$z_0 / z_{exp} / z'_{exp}$ (%)	\bar{M}_n (kg.mol ⁻¹)	Rendement (%)
Ph-25	6	0	-	75 / 78 / 75	25 / 22 / 25	0 / 0 / 0	3,726	42
Ph-50	6	0	-	50 / 56 / 49	50 / 44 / 51	0 / 0 / 0	4,171	76
Ph-50- ⁴ -Me	6	0	4-Me	50 / 52 / 55	50 / 48 / 45	0 / 0 / 0	4,380	58
Ph-50- ⁴ -Et	6	0	4-Et	50 / 51 / 55	50 / 49 / 45	0 / 0 / 0	4,622	42
Ph-50- ⁴ -Et-15	6	0	4-Et	35 / 37 / nd	50 / 48 / 58	15 / 15 / nd	5,057	69
Bn-25	6	1	-	75 / 76 / 77	25 / 24 / 23	0 / 0 / 0	3,841	73
Bn-50	6	1	-	50 / 55 / 46	50 / 45 / 54	0 / 0 / 0	4,451	93
Bn-25-40	6	1	-	35 / 42 / nd	25 / 27 / 31	40 / 26 / nd	4,044	78
Bn-50-15	6	1	-	35 / 40 / nd	50 / 47 / 48	15 / 13 / nd	4,507	83
St-25	6	2	-	75 / 73 / 70	25 / 27 / 30	0 / 0 / 0	4,098	78
St-50	6	2	-	50 / 50 / 49	50 / 50 / 51	0 / 0 / 0	4,722	88
St-50-15	6	2	-	35 / 46 / nd	50 / 44 / 53	15 / 10 / nd	4,880	83

Tableau 5. Caractérisation des principaux ArylAPols synthésés dans le cadre de ce travail doctoral avec x_0 , y_0 , z_0 et x_{exp}/x'_{exp} , y_{exp}/y'_{exp} , z_{exp}/z'_{exp} , les compositions chimiques en pourcentage, respectivement, théoriques (attendus) et obtenus (déterminés expérimentalement par RMN/pH-métrie). Les masses molaires moyennes ont été déterminées à partir des résultats moyennés des deux méthodes d'analyse, le DPn est de 35. La déviation standard est dans chaque cas de l'ordre de $\pm 10\%$.

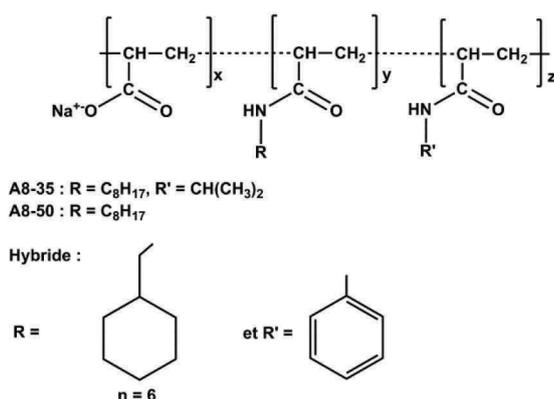


Figure 26. Structures générales des autres APols développés dans le cadre de cette thèse.

Autres polymères	<i>n</i>	<i>m</i>	p-R''	$x_0 / x_{exp} / x'_{exp}$ (%)	$y_0 / y_{exp} / y'_{exp}$ (%)	$z_0 / z_{exp} / z'_{exp}$ (%)	\bar{M}_n (kg.mol ⁻¹)	Rendement (%)
Hybride	-	-	-	50 / 60 / nd	25 / 24 / nd	25 / 16 / nd	4,200	81
A8-50	8	-	-	50 / 47 / 40	50 / 53 / 60	0 / 0 / 0	5,010	52
A8-35	8	-	-	35 / 34 / nd	25 / 28 / 18	40 / 43 / nd	4,276	86

Tableau 6. Caractérisation des autres APols synthésés dans le cadre de ce travail doctoral avec x_0 , y_0 , z_0 et x_{exp}/x'_{exp} , y_{exp}/y'_{exp} , z_{exp}/z'_{exp} , les compositions chimiques en pourcentage, respectivement, théoriques (attendus) et obtenus (déterminés expérimentalement par RMN/pH-métrie). Les masses molaires moyennes ont été déterminées à partir des résultats moyennés des deux méthodes d'analyse, le DPn est de 35. La déviation standard est dans chaque cas de l'ordre de $\pm 10\%$.

Les compositions chimiques des polymères déterminées par analyse RMN, sont les valeurs moyennées des valeurs estimées pour chaque type de RMN.

Dans le cas de la RMN ^1H (cf. *Figure 27* et *Figure 28*), les taux de greffage sont déterminés dans les cas les plus simples en normalisant à 1 l'intégration du signal élargi (2,05-2,5 ppm) des protons des méthines en α des carboxylates de la chaîne macromoléculaire (cf. *Figure 27*). Dans ce cas, les rapports entre les aires de chaque signal caractéristique des groupements latéraux et le nombre de protons impliqués dans le signal donnent directement le pourcentage de greffage pour chaque type de groupement. Lorsque, pour le même groupement, différents signaux et différentes valeurs de greffages sont accessibles, le pourcentage global estimé est une moyenne pondérée des différentes valeurs trouvées (les calculs et équations sont détaillés dans la partie expérimentale).

Dans les cas plus complexes où les signaux de la chaîne macromoléculaire se superposent à une partie de ceux des groupements latéraux (cf. *Figure 28*), la normalisation n'est plus possible et il faut soustraire la contribution des signaux des cycles latéraux à l'aire totale des signaux se trouvant dans la région 2,05-2,5 ppm. Le rapport entre les aires des signaux caractéristiques et l'aire de référence donne une valeur qu'il faut diviser par le nombre de protons impliqués pour obtenir le pourcentage de greffage du groupement concerné (les calculs et équations sont détaillés dans la partie expérimentale).

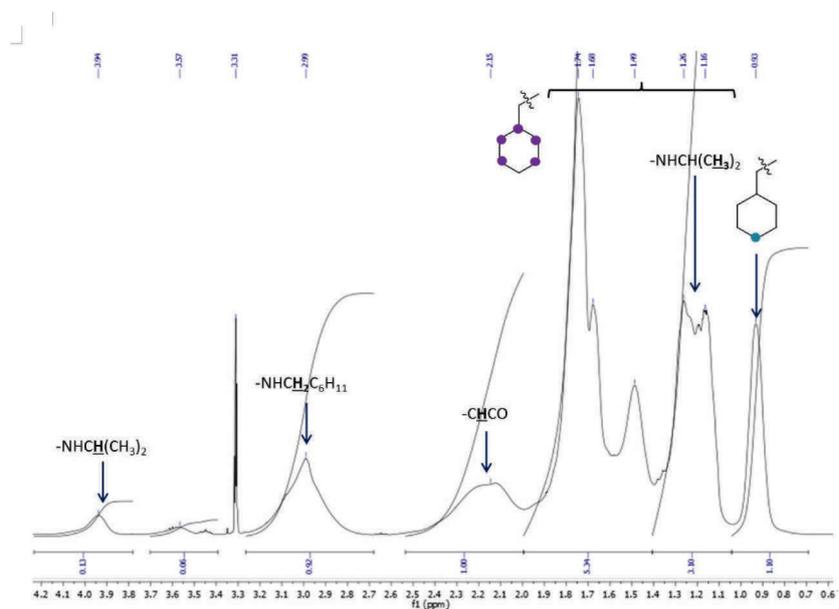


Figure 27. Analyse RMN ^1H du CyclAPol C₆-C₁-50-15. Une simple normalisation à 1 de l'intégration du signal du proton lié au carbone portant les carboxylates (2,05-2,5 ppm) permet d'accéder au taux d'amine greffée, ici la cyclohexylméthylamine. Considérant le signal du méthylène en α de l'amine à 3,02 ppm, l'intégration donne 0,92 pour 2 protons d'où 0,46 pour un proton correspondant donc à un pourcentage de greffage de 46 % en amine. De même, en considérant le signal à 0,9 ppm des protons du méthylène en position 4 du cycle, un taux de greffage dans ce cas de 55 % est déduit de l'intégration valant 1,10. Le taux de greffage moyen obtenu est dans ce cas de 50 %. En suivant un raisonnement similaire et en se basant sur l'intégration du signal à 3,95 ppm du proton lié au méthine des isopropylamines, le pourcentage de greffage en isopropylamine sur le polymère a été estimé à 13 %.

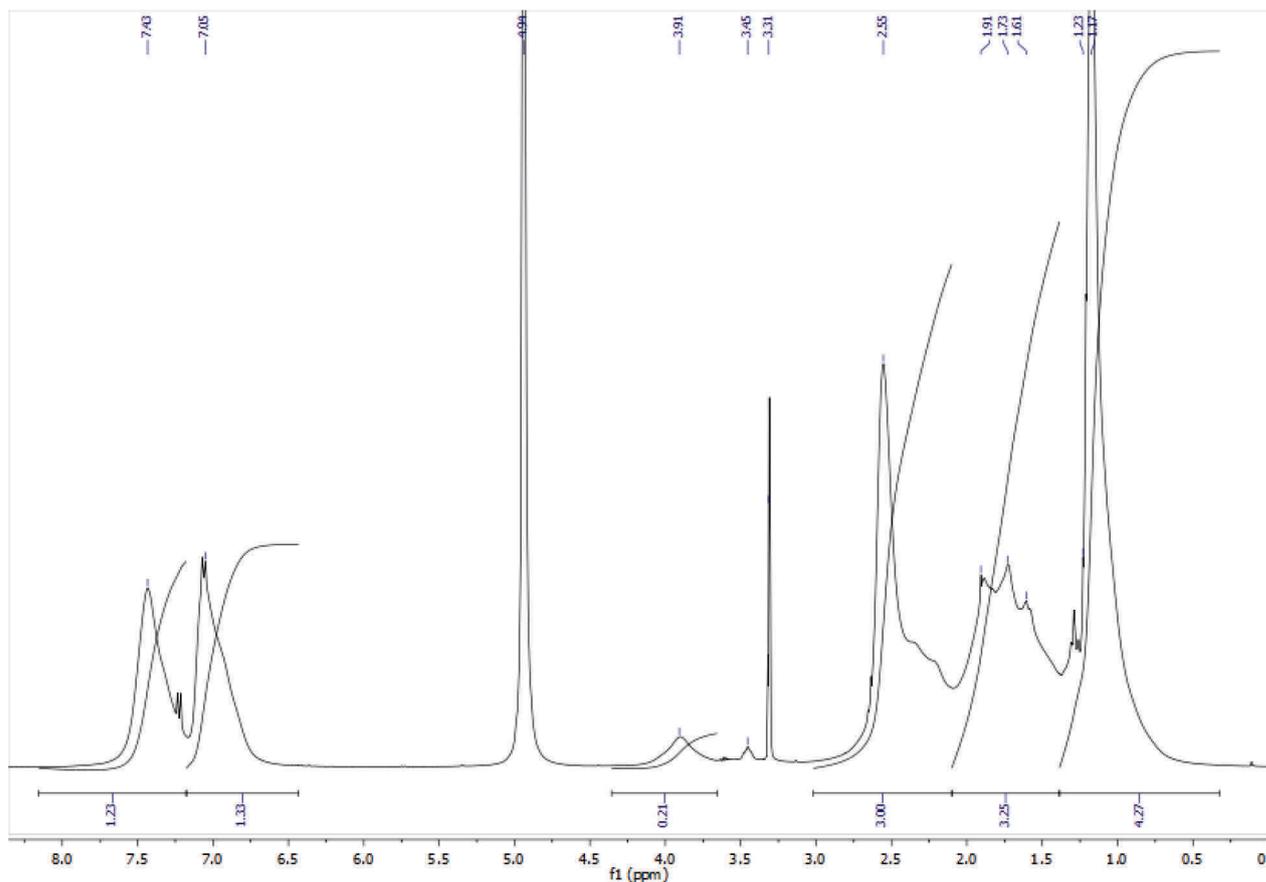


Figure 28. Analyse RMN ^1H de l'ArylAPol Ph-50- ^4Et -15. L'intégration du signal entre 2 et 2,5 ppm correspond au recouvrement des signaux de l'éthyle (2 protons) en para du cycle et des méthines de la chaîne macromoléculaire. Considérant les signaux des protons aromatiques situés à 7,05 et 7,43 ppm, il est alors possible d'extraire la valeur du taux de greffage d'hydrophobe y de 37 %. En suivant un raisonnement similaire et en se basant sur l'intégration du signal à 3,91 ppm du proton lié au méthines des isopropylamines, le pourcentage de greffage d'isopropylamine est estimé à 12 %.

L'analyse RMN du ^{13}C permet d'accéder directement aux taux de carboxylates libres et aux taux global de carboxamides (correspondant donc au taux global de greffage) en comparant les intégrations de leurs signaux caractéristiques repérables, respectivement, aux alentours de 183 et 177 ppm (*cf. Figure 30*). En normalisant à 1 la somme des aires de ces signaux, le pourcentage de greffage pour chaque groupement latéral est obtenu en divisant la valeur des intégrations des signaux caractéristiques de ces groupements par le nombre de carbones impliqués dans le signal (*cf. Figure 31*).

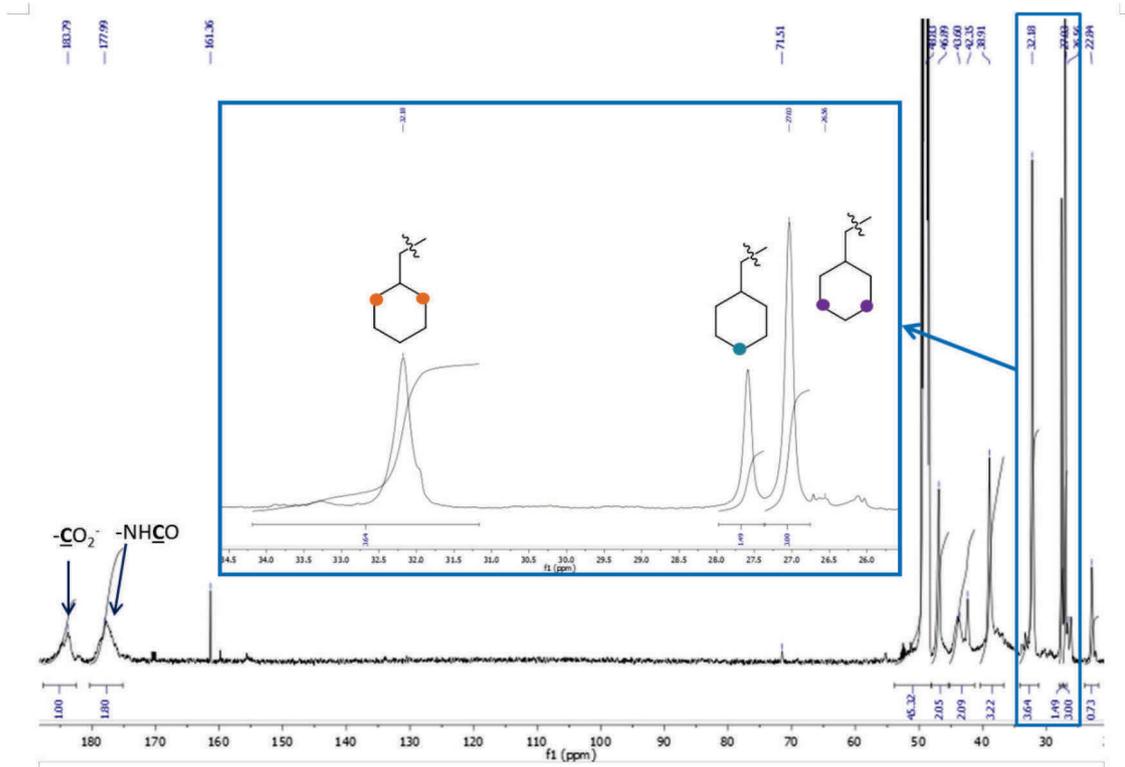


Figure 29. Analyse RMN ^{13}C du CyclAPol C₆-C₁-50-15 : L'intégration est normalisée à 1 sur le carbone des carboxylates. L'intégration du signal du carbone de la liaison amide divisée par la somme des intégrations des signaux amide (177,99 ppm) et carboxylate (183,79 ppm) donne une information sur le greffage total du polymère (isopropylamine et cyclohexylmethylamine). Dans ce cas, 64 % des carboxylates du PAA ont réagis. Les signaux caractéristiques des méthylènes du cyclohexyle à 27,03, 27,99 et 32,18 ppm permettent de déterminer le pourcentage de cycles greffés, à savoir 53 % ou 55 % soit 54 % en moyenne. La différence entre le taux de greffage global et le taux de cyclohexylmethylamine correspond au taux de greffage en isopropylamine, soit 10 % dans le cas présent. Le taux de greffage des isopropyles est donné par l'intégration du signal à 23 ppm en comparaison avec le taux de greffage global déduit du rapport des carboxamides sur la somme des carboxamides et carboxylates. Le taux de greffage total du polymère est donc de 67 %, ce qui est cohérent avec la valeur 64 % directement déduite de l'intégration du signal des carboxamides.

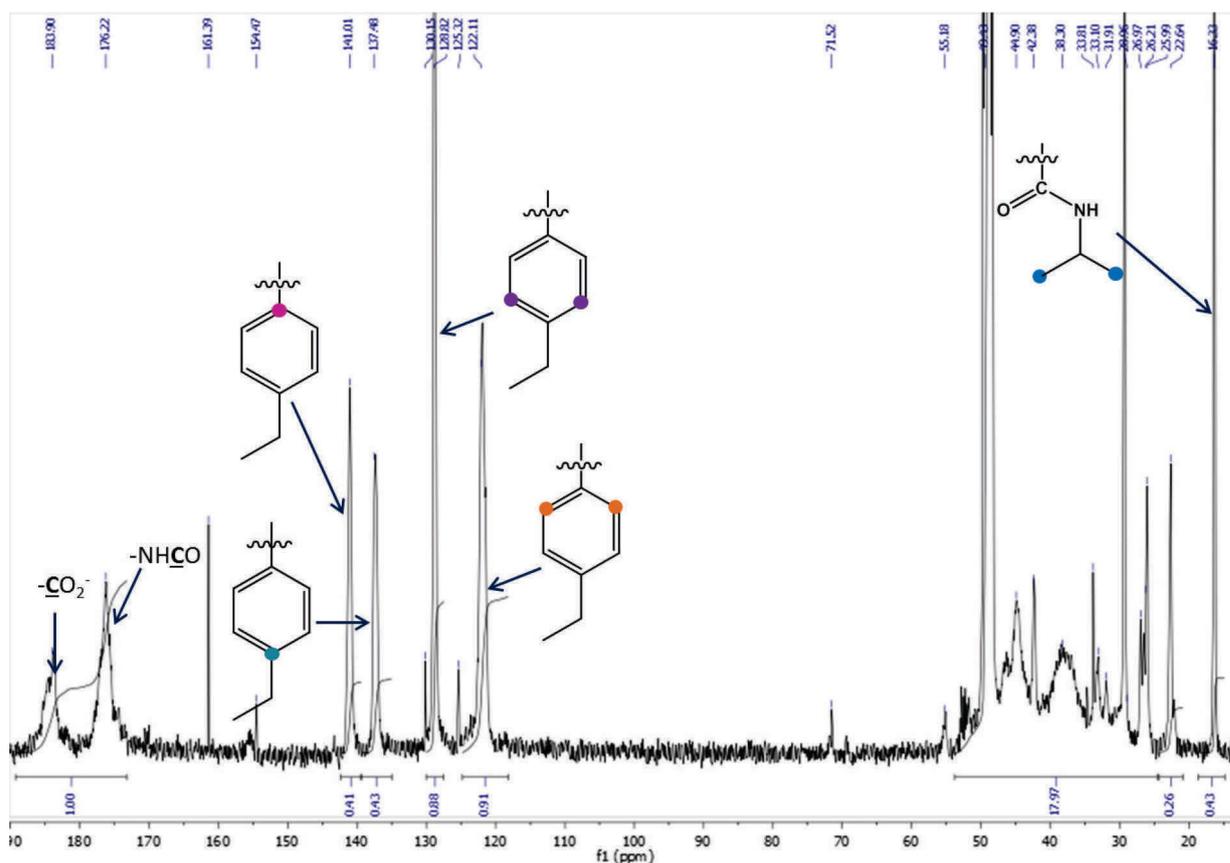


Figure 30. Analyse RMN ^{13}C de l'ArylAPol Ph-50-4Et-15. La somme des aires des signaux des carboxylates et des amides a été normalisée à 1. Les intégrations des nombreux signaux caractéristiques des cycles aromatiques permettent de déterminer facilement leur pourcentage de greffage. En se basant sur les intégrations des signaux à 122,11, 128,82, 137,48 et à 141,01 ppm, il est possible de déduire 4 valeurs (45, 44, 43 et 41 % respectivement) dont a été déduit un taux de greffage moyen estimé à 43 %. L'intégration du signal des deux méthyles de l'isopropyle centré à 18 ppm permet de déterminer un taux de greffage de 21,5 % pour ces groupements. Le taux de greffage total du polymère est donc de 64,5 %, ce qui est cohérent avec la valeur 62 % directement déduite de l'intégration du signal des carboxamides.

Les analyses RMN ^1H et ^{13}C ont été complétées par des dosages pH-métriques acido-basique. Cette technique permet de déterminer la quantité de carboxylates libres en solution et donne donc accès à une valeur supplémentaire pour x . Les mesures ont été effectuées dans un mélange EtOH/eau 80/20 v/v. Dans ce mélange, les interactions hydrophobes interviennent très peu (Yaacobi and Ben-Naim, 1973) (le polymère subsiste donc sous une forme « dépliée » et ne précipite pas une fois acidifié) et il est encore possible d'effectuer des mesures fiables du pH avec une électrode classique (Subirats et al., 2007).

De manière générale, les taux de greffage déterminés par RMN sont proches des taux théoriques et les différences observées avec les taux obtenus par dosage pH-métrique étant faibles confirme la fiabilité de nos méthodes de synthèse et d'analyse de la composition

chimique de nos polymères. De ce fait, dans les sections suivantes, les nomenclatures des amhipols obtenus seront données sur la base des taux de greffage théoriques.

3.1.1.4 Caractérisation par SEC des polymères en phase aqueuse

La caractérisation du comportement en solution aqueuse des polymères synthétisés a été effectuée par SEC à l'instar de l'A8-35 (Gohon et al., 2004, 2006). Cette technique permet d'obtenir rapidement des informations sur la taille et l'homogénéité (ou hétérogénéité) des particules formées par les polymères.

Les profils SEC obtenus après injection des CyclAPols et ArylAPols en solution à la concentration de 10 g.L^{-1} , présentent tous un pic principal centré aux environs de 12 mL et caractérisé par une importante largeur à mi-hauteur. Ceci traduit l'existence d'une population de particules très hétérogènes en taille. La calibration de la colonne (*cf. Paragraphe 2.2.6 du matériel et méthodes*) permet de relier le rayon hydrodynamique (R_H) des particules à leur volume d'élution (V_e). Les résultats de l'ensemble de polymères sont consignés dans le tableau 7, les profils SEC de certains d'entre eux sont représentés en figure 31.

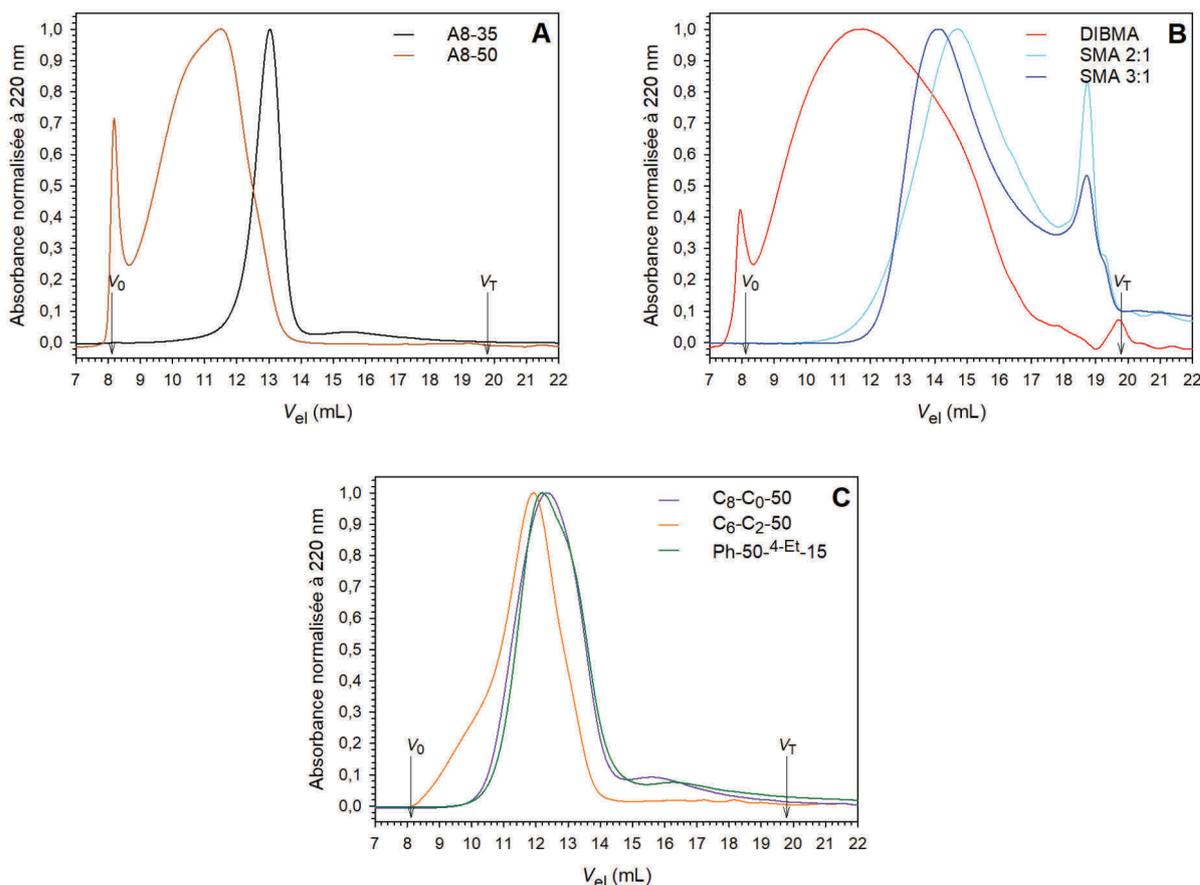


Figure 31. Profils SEC obtenus après élution et détection à 220 nm des polymères présentant les propriétés les plus intéressantes en tampon 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl pH 8,0. Panneau **A** : superposition des profils SEC de l'A8-35 (amphipol de référence) et de l'A8-50 synthétisés au laboratoire. Panneau **B** : superposition des profils SEC des trois copolymères de l'acide maléique (références commerciales). Panneau **C** : superposition des profils SEC des CyclAPols et ArylAPol les plus intéressants.

Amphipol	Volume d'élution (mL)	Largeur à mi-hauteur (mL)	Rayon hydrodynamique (nm)	Agrégats (volume mort)
A8-35	13,0	0,9	3,7	non
A8-50	11,5	3,0	5,3	oui
C ₆ -C ₀ -50	13,7	3,6	3,1	non
C ₆ -C ₁ -50	13,3	1,7	3,4	non
C ₆ -C ₂ -50	11,9	2,0	5,0	non
C ₇ -C ₀ -50	13,2	2,3	3,6	non
C ₈ -C ₀ -50	12,3	2,3	4,6	non
Bn-50	14,0	3,8	2,8	oui
St-50	13,7	1,7	3,0	non
Ph-50	14,3	3,7	2,6	non
Ph-50- ⁴ Me	13,9	1,8	2,9	non
Ph-50- ⁴ Et	13,4	1,2	3,3	non
Ph-50- ⁴ Et-15	12,2	2,3	4,7	non
DIBMA	11,8	6,2	5,1	oui
SMA (2:1)	14,7	3,5	2,4	non
SMA (3:1)	14,1	3,1	2,7	non

Tableau 7. Tableau récapitulatif des rayons hydrodynamiques, déterminés à l'aide de la courbe de calibration en paragraphe 2.2.6, des particules formées en solution tampon 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl pH 8,0 et des largeurs à mi-hauteur de leur pic chromatographique caractéristique obtenus pour les principaux polymères étudiés dans ce travail doctoral. Les rayons hydrodynamiques ont été calculés à partir des volumes d'élution déterminés au maximum des pics.

D'après le tableau 7, les rayons hydrodynamiques moyens des particules formées par les polymères en solution sont compris entre 2,4 nm et 5,3 nm. Ces valeurs ont été calculées à partir du volume d'élution pris au maximum des pics. Toutefois, l'ensemble des nouveaux APols synthétisés (CyclAPols et ArylAPols) présentent des profils SEC plus larges que celui de l'A8-35, traduisant des populations assez hétérogènes ; la population la plus hétérogène étant celle observée pour le DIBMA. En effet, la largeur à mi-hauteur de son pic d'élution est particulièrement importante (6,2 mL). Les R_H des polymères amphiphiles ont été déterminés à partir des R_H de protéines globulaires utilisées pour calibrer la colonne. Bien que cette méthode d'analyse suppose une approximation sur la forme des objets à caractériser, les différences de R_H obtenus pour le DIBMA montrent une grande dispersité en taille (les R_H estimés à mi-hauteur du pic d'élution sont compris entre 2,1 nm et 6,45 nm). L'étalement du pic d'élution de ce polymère pourrait aussi résulter d'un défaut d'assemblage des molécules en raison de ses courts groupements latéraux, lesquels sont les moins hydrophobes par rapport à ceux des autres polymères. Il est à noter que les SMAs sont les seuls polymères possédant deux populations très distinctes traduit par la présence de deux pics (un premier à un volume d'élution de 14 mL et un second autour de 19 mL). La présence du second pic, correspondant à des objets de très petites tailles, révèle certainement une contamination par une impureté. Une autre hypothèse peut également être émise, les particules formées par des polymères à partie hydrophobe cyclique peuvent présenter des défauts d'assemblage pouvant aussi contribuer à cette hétérogénéité. De plus, comme dans le cas du DIBMA, certains des polymères ne s'auto-assemblent peut-être pas. Cela pourrait également être le cas du Ph-50 ou du C₆-C₀-50. Il est à noter que la présence d'un substituant en position para des cycles aromatiques améliore la distribution en taille ce qui confirme ce qui avait été démontré dans le cadre de l'étude d'Hovers et al. (Hovers et al., 2011). Des caractérisations effectuées par SAXS (*cf. paragraphe 3.1.2.3*) apporteront des informations complémentaires sur ces assemblages de polymères en solution hors colonne SEC.

3.1.2 Caractérisations biochimiques et physico-chimiques

Par souci de clarté, chaque partie abordant les aspects de solubilisation, est présentée avec une figure dans laquelle les résultats obtenus avec les polymères les plus pertinents (toujours les mêmes) sont présentés, suivi d'un tableau récapitulatif des résultats obtenus avec les autres

polymères. En effet, les observations reportées dans les tableaux sont souvent les mêmes, telles que l'hydrophobie en lien avec l'efficacité de solubilisation. C'est pourquoi, à la fin de la partie solubilisation, trois tableaux récapitulatifs avec tous ces effets ont été reportés afin d'avoir une vision plus générale. Il est important de rappeler que les taux de greffage insérés dans le nom des polymères correspondent aux taux de greffage théoriques, les taux de greffage expérimentalement déterminés étant indiqués dans le paragraphe 2.2.1.2.

3.1.2.1 Effet solubilisant des nouveaux APols

La capacité des polymères à solubiliser les membranes a été étudiée dans des environnements artificiels, tel que des liposomes de DMPC, et naturels purifiés à partir de différents organismes. Trois types de membranes naturelles ont été testés, à savoir les membranes d'*E. coli* surexprimant différentes PMs, la membrane du réticulum sarcoplasmique (RS) et la membrane pourpre (deux membranes spécialisées exprimant abondamment des PMs modèles utilisées en routine au laboratoire).

3.1.2.1.1 Liposomes de DMPC

Des essais de solubilisation ont été réalisés sur un modèle simple, à savoir des liposomes de DMPC, d'un diamètre de 100 nm, obtenus par extrusion. Ce lipide a été choisi sur la base des nombreuses études reportées dans la littérature. En effet, des travaux ont été menés sur ce système pour décrire l'efficacité de solubilisation des SMAs (Scheidelaar et al., 2015) (Jamshad et al., 2015; Scheidelaar et al., 2015). En faisant le choix de ce système, nous partions donc avec des éléments connus sur le comportement des SMAs dans certaines conditions expérimentales, à savoir un ratio massique lipide / polymère défini. Après avoir préparé une suspension de liposomes, les polymères ont ensuite été mis en contact dans un ratio massique lipide / polymère de 1 pour 1,25 et les cinétiques de solubilisation ont été suivies par diffusion dynamique de la lumière (DLS) pendant plusieurs minutes. Les résultats obtenus ont été présentés dans la figure 32.

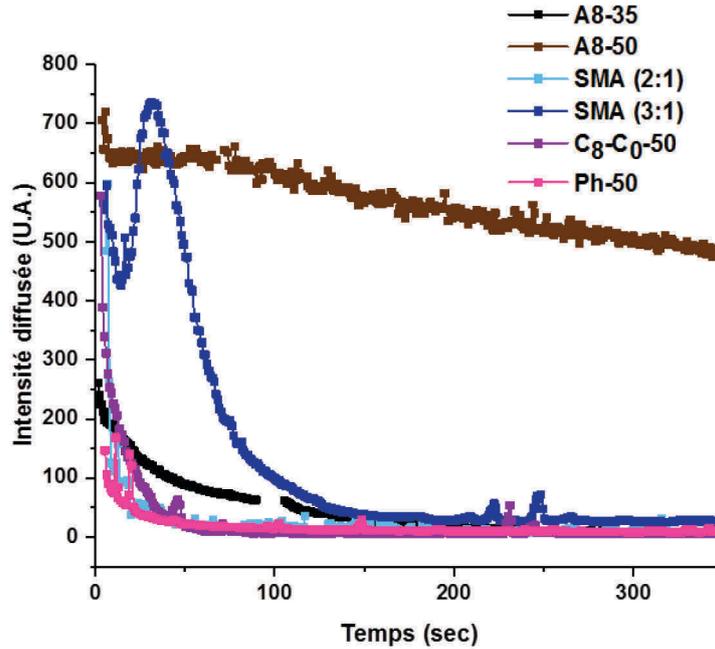


Figure 32. Cinétiques de solubilisation des liposomes de DMPC avec différents polymères. Les mesures ont été faites par DLS à 25 °C avec un ratio massique lipide / polymère de 1 pour 1,25 dans un tampon 20 mM phosphate de sodium, 100 mM NaCl, pH 7,0.

En DLS, l'intensité diffusée étudiée est liée, entre autre, à la taille des objets en solution. Par conséquent, la diminution de l'intensité reflète la présence de populations de particules en solution globalement plus petites correspondant à un phénomène de solubilisation des liposomes.

Les polymères testés présentent des comportements différents. Trois polymères à savoir, le C₈-C₀-50, le Ph-50 et le SMA (2:1), montrent des cinétiques de solubilisation rapides. En effet, l'intensité diffusée a diminué de près de 95 % en moins d'une minute. Le profil de solubilisation obtenu avec le SMA (3:1) est très différent des précédents car il présente une augmentation significative de plus de 35 % de l'intensité diffusée, correspondant à une augmentation des tailles des particules en solution en début de cinétique. Le SMA (3:1) induirait une agrégation massive et/ou une fusion transitoire des liposomes avant une complète dissolution. Cette phase est suivie d'une dispersion quasi-totale après 3 min. Sur l'échelle de temps observée, l'A8-50 semble ne pas solubiliser les liposomes de DMPC, car l'intensité diffusée ne diminue que faiblement et reste proche de celle diffusée initialement.

3.1.2.1.2 Les membranes d'*Escherichia coli*

La bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) est un organisme largement utilisé en laboratoire pour surexprimer des PMs recombinantes (Dilworth et al., 2018), c'est pourquoi ce type de

membrane a été sélectionné. Deux PMs ont été étudiées, à savoir Mac B, une protéine de 70 kDa qui sous sa forme dimérique est partenaire de Mac A et TolC pour former une pompe à efflux tripartite et YidC, une protéine de 62 kDa impliquée dans l'insertion d'autres PMs au sein de la membrane bactérienne. Une version de YidC fusionnée à la GFP, une protéine fluorescente soluble de 27 kDa insérée en position C-terminal, a été surexprimée afin de faciliter sa détection. Selon la protéine d'intérêt, la procédure de quantification de la protéine extraite par les polymères a été différente. Dans le cas de l'étude de la solubilisation de YidC-GFP, une quantification sur gel SDS-PAGE de la fluorescence émise par la protéine solubilisée présente dans le surnageant après ultracentrifugation est réalisée à l'aide du logiciel ImageJ. La référence utilisée dans ce cas est la quantité de protéine solubilisée en présence de DDM à 1 %, car un maximum de solubilisation était atteint pour cette concentration en détergent (*cf. Figure 33*).

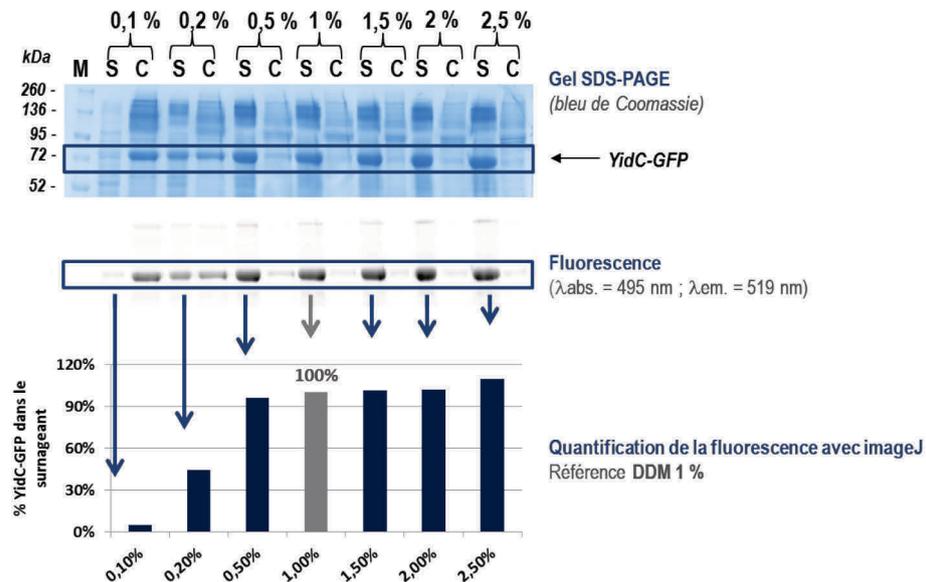


Figure 33. Exemple de quantification de la fluorescence sur gel SDS-PAGE par image J dans le cadre de l'étude de la solubilisation de la protéine YidC-GFP par le DDM à différentes concentrations comprises entre 0,1 et 2,5 %. Les solubilisations ont été réalisées à 4 °C pendant 1 heure, après ultracentrifugation pendant 30 minutes à 100 000 *xg*, les surnageants (S) et culots (C) ont été récupérés et déposés sur gel SDS-PAGE pour être quantifiés. (M : marqueurs de poids moléculaire).

Dans le cas de Mac B, les gels ont été révélés seulement au bleu de Coomassie et n'ont fait l'objet d'une quantification précise. Par conséquent, l'intensité des bandes de la protéine étudiée présente dans les fractions solubilisées a été quantifiée par simple évaluation visuelle (*cf. Figure 34*). Le C₁₂E₈ à 2,5 % est ici utilisé comme référence.

Une notation avec les signes «--», «-», «+» et «++» a été réalisée afin de comparer les différents polymères entre eux, ils correspondent à des taux de solubilisation inférieurs à 25 %, compris entre 25 % et 50 %, compris entre 50 % et 75 % et supérieurs à 75 % respectivement.

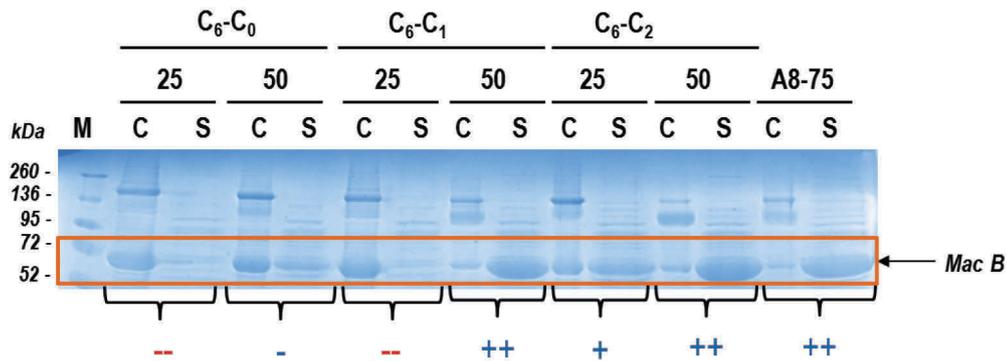


Figure 34. Exemple pour décrire l’efficacité de solubilisation de Mac B par les différents APols. Les nombres 25 et 50 indiqués correspondent aux pourcentages théoriques de greffage d’hydrophobes des différents polymères. (C : culot, S : surnageant, M : marqueurs de poids moléculaire) après une incubation de 4h à 4 °C à une concentration finale en polymère de 2,5 % et une concentration totale en protéines membranaires de 2 mg/mL.

Le tableau 8 ci-après reporte les résultats obtenus avec les premiers APols testés greffés à 25 % d’hydrophobes. Ces derniers comportent un taux de charges de 75 % ou 35 % dans le cas où 40 % d’isopropyle ont été également greffés). Tous ces polymères s’avèrent être peu ou pas efficaces pour solubiliser les membranes d’*E.coli* et en extraire Mac B.

	Nombre de carbones	[polymère] = 1% [polymère] = 2,5%	
C ₆ -C ₀ -25	6	nd	--
C ₆ -C ₁ -25	7	nd	--
C ₆ -C ₁ -25-40	7	--	nd
C ₆ -C ₂ -25	8	nd	+
Ph-25	6	nd	--
Bn-25	7	nd	--
St-25	8	nd	--

Tableau 8. Efficacité de solubilisation de Mac B par différents polymères greffés à 25 % d’hydrophobes. (nd : non déterminé)

Une seconde série de solubilisation a alors été réalisée avec des polymères présentant des taux de greffage deux fois plus importants. Les résultats obtenus avec ces polymères greffés à 50 % d’hydrophobes sont reportés dans le tableau 9.

	Nombre de carbones dans la partie hydrophobe		
		[polymère] = 1%	[polymère] = 2,5%
A8-35	8	++	++
SMA (3:1)	6	++	++
C ₆ -C ₀ -50	6	-	-
C ₆ -C ₁ -50	7	++	++
C ₆ -C ₁ -50-15	7	++	nd
C ₇ -C ₀ -50	7	++	++
C ₆ -C ₂ -50	8	++	++
C ₈ -C ₀ -50	8	++	++
C ₆ -C ₀ -50- ⁴ Et	8	nd	nd
Ph-50	6	nd	nd
Bn-50	7	+	+
Ph-50- ⁴ Me	7	nd	nd
St-50	8	+	++
Ph-50- ⁴ Et	8	nd	nd
St-50-15	8	+	nd

Tableau 9. Efficacité de solubilisation de Mac B par différents polymères greffés à 50 % d'hydrophobes (*nd* : non déterminé).

L'ensemble des polymères comportant 50 % de chaînes grasses, à l'exception du C₆-C₀-50, sont capables d'extraire au moins 50 % de Mac B des membranes d'*E. coli*. Cette première comparaison entre polymères indique qu'un nombre minimal de 7 carbones dans la partie hydrophobe est nécessaire pour observer une bonne solubilisation. A une concentration finale de polymères à 1 %, il apparaît que les ArylAPols sont moins efficaces que les CyclAPols pour extraire MacB, de plus, ces derniers présentant l'inconvénient d'absorber dans l'UV, ils ont été moins caractérisés par la suite. Le Ph-50 étant l'ArylAPol le plus comparable au SMA (2:1) en terme de taux de greffage d'hydrophobes et de taux de charges, nous avons choisi d'étudier plus en détail son comportement.

Pour la suite des expériences de solubilisation, les polymères greffés à 25 % n'ont pas été testés sur les autres systèmes biologiques. Dans le cadre de la solubilisation de YidC-GFP, seuls les comportements de certains polymères greffés à 50 % ont été étudiés. Ces polymères, au nombre plus restreint, ont pu faire l'objet d'une étude de l'impact de la concentration en polymère et de la durée de solubilisation sur l'efficacité d'extraction de YidC-GFP. Les résultats de solubilisation obtenus pour quatre des CyclAPols (C₆-C₀-50, C₆-C₁-50, C₆-C₂-50, C₈-C₀-50), un ArylAPol (Ph-50) et les références (DDM, A8-35, A8-50, DIBMA, SMA (2:1) et (3:1)) ont été regroupés dans le tableau 10 et des histogrammes ont été réalisés pour les polymères les plus pertinents (*cf. Figure 35*).

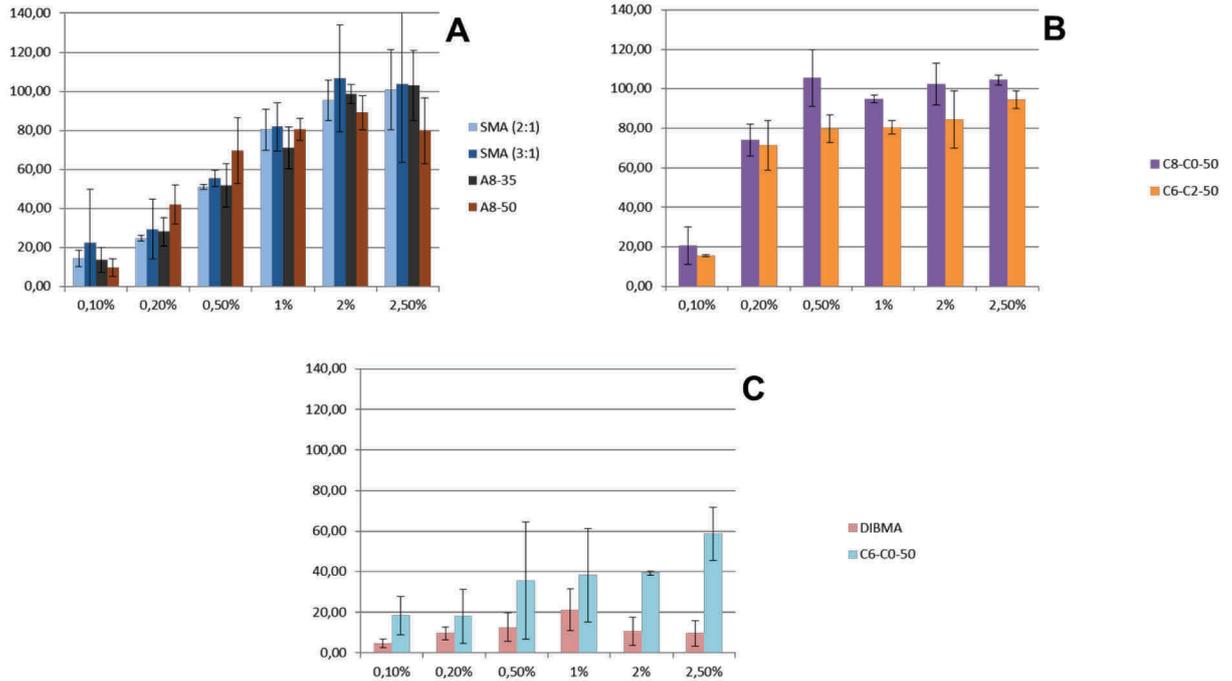


Figure 35. Extraction de YidC-GFP par différents polymères à des concentrations variant de 0,1 % à 2,5 %. Panneau A : solubilisation par les références utilisées dans ce travail. Panneau B : solubilisation par les polymères les plus performants. Panneau C : solubilisation par les polymères les moins efficaces.

L’histogramme en panneau A de la figure 35 ci-dessus indique pour l’A8-35, l’A8-50 et les deux SMA suivent une évolution progressive et similaire de l’efficacité de solubilisation permettant de récupérer de 15 à 100 % de la protéine d’intérêt pour des concentrations en polymères variant de 0,1 à 2,5 %. Le DIBMA, représenté dans le panneau C de la même figure, présente des pourcentages de solubilisation très faibles, et ce, même à 2,5 % de polymère. Le C₆-C₀-50, polymère le moins hydrophobe de cette série, fait également partie des polymères les moins solubilisants, malgré une efficacité de solubilisation de 60 % à une concentration en polymère de 2,5 %. Les meilleures solubilisations sont obtenues avec le C₈-C₀-50 et le C₆-C₂-50, qui présentent, dès 0,2 % de concentration, des taux de solubilisation d’au minimum 70 % (panneau B). Leurs profils de solubilisation étant très proches, il semblerait que l’arrangement des carbones au sein de la partie hydrophobe n’ait pas d’impact significatif dans ce cas.

		[polymère] = 0,1 %	[polymère] = 0,2 %	[polymère] = 0,5 %	[polymère] = 1 %	[polymère] = 2 %	[polymère] = 2,5 %
Détergent référence	DDM	-- (5)	- (44)	++ (96)	++ (100)	++ (102)	++ (109)
Références commerciales	A8-35	-- (14 +/- 7)	- (28 +/- 7)	+ (52 +/- 11)	+ (71 +/- 11)	++ (99 +/- 5)	++ (103 +/- 18)
	SMA (2:1)	-- (14 +/- 4)	-- (25 +/- 2)	+ (51 +/- 1)	++ (80 +/- 10)	++ (95 +/- 10)	++ (101 +/- 20)
	SMA (3:1)	-- (22 +/- 27)	- (29 +/- 15)	+ (55 +/- 4)	++ (82 +/- 12)	++ (107 +/- 28)	++ (104 +/- 40)
	DIBMA	-- (5 +/- 2)	-- (10 +/- 3)	-- (13 +/- 7)	-- (21 +/- 10)	-- (11 +/- 7)	-- (10 +/- 6)
Références synthétisées	A8-50	-- (10 +/- 4)	- (42 +/- 10)	+ (70 +/- 17)	++ (80 +/- 6)	++ (89 +/- 9)	++ (80 +/- 17)
Polymères testés	C ₆ -C ₀ -50	-- (18 +/- 10)	-- (18 +/- 13)	- (36 +/- 29)	- (38 +/- 23)	- (39 +/- 1)	+ (59 +/- 13)
	C ₆ -C ₁ -50	- (31 +/- 5)	+ (59 +/- 6)	+ (59 +/- 3)	++ (88 +/- 8)	++ (78 +/- 12)	++ (90 +/- 21)
	C ₆ -C ₂ -50	-- (16 +/- 1)	+ (72 +/- 13)	++ (80 +/- 7)	++ (81 +/- 4)	++ (85 +/- 15)	++ (95 +/- 5)
	C ₈ -C ₀ -50	-- (21 +/- 10)	++ (74 +/- 8)	++ (106 +/- 15)	++ (95 +/- 2)	++ (103 +/- 11)	++ (105 +/- 3)
	Ph-50	- (25 +/- 21)	-- (15 +/- 7)	- (30 +/- 12)	+ (51 +/- 16)	++ (90 +/- 8)	++ (99 +/- 20)

Tableau 10. Efficacité de solubilisation de YidC-GFP par différents polymères greffés à 50 % d'hydrophobes.

Afin de caractériser l'efficacité d'extraction de YidC-GFP, des cinétiques de solubilisation ont également été réalisées avec les polymères le plus pertinents à savoir l'A8-35, les SMAs (2:1) et (3:1) ainsi que les CyclAPols C₆-C₂-50 et le C₈-C₀-50. Les cinétiques ont été initiées au moment du mélange des polymères avec les membranes et des aliquots ont été prélevés à 15, 30, 45 minutes, 1 heure, 1 heure et demie et 2 heures en comparaison avec le DDM. Les gels révélés en fluorescence montrent les proportions respectives de YidC-GFP présent dans les culots et les surnageants obtenus après ultracentrifugation (*cf. Figure 36*). La bande présente dans les surnageants, correspondant à la protéine d'intérêt, a été quantifiée avec ImageJ pour chaque condition. Les résultats ont été exprimés en pourcentages en prenant comme référence la condition où l'extraction de YidC-GFP est totale, c'est à dire après une heure de solubilisation en présence de 1 % de DDM (*cf. Figure 37*).

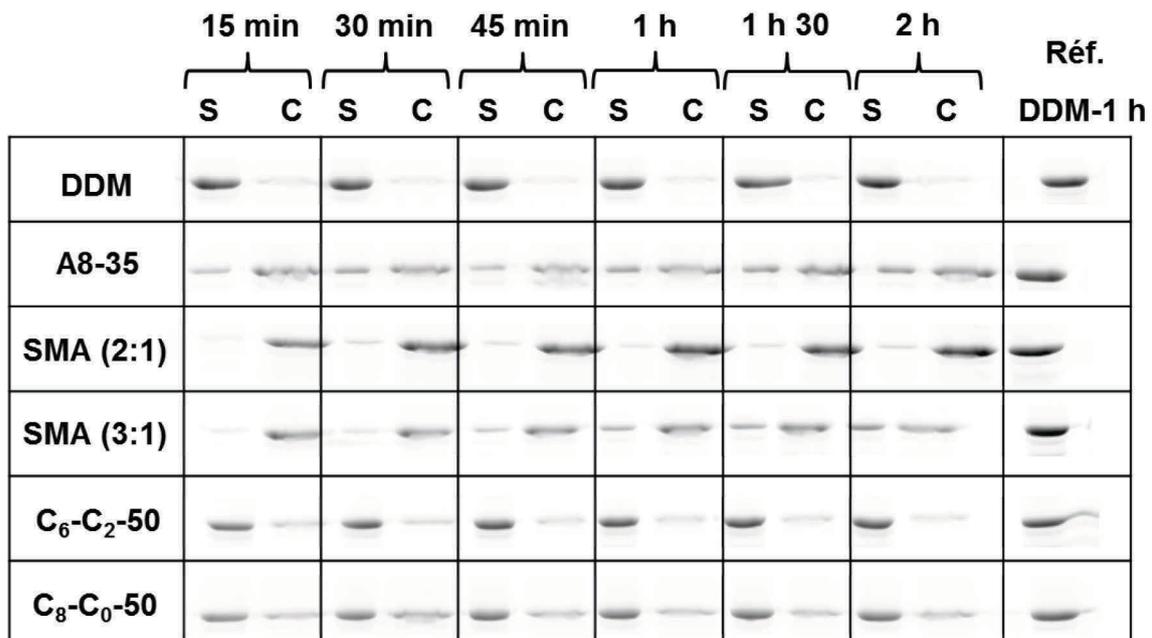


Figure 36. Gels révélant la fluorescence de la GFP fusionnée à YidC (*C* : culot, *S* : surnageant). La cinétique de solubilisation a été réalisée sur une échelle de temps de solubilisation : de 2 h à 4 °C en présence de 0,2 % de

polymère et 2 mg/mL de protéines membranaires totales, soit un ratio massique [polymère : membrane] de [1:1]. La condition de solubilisation en détergent a été réalisée en présence de 1 % DDM.

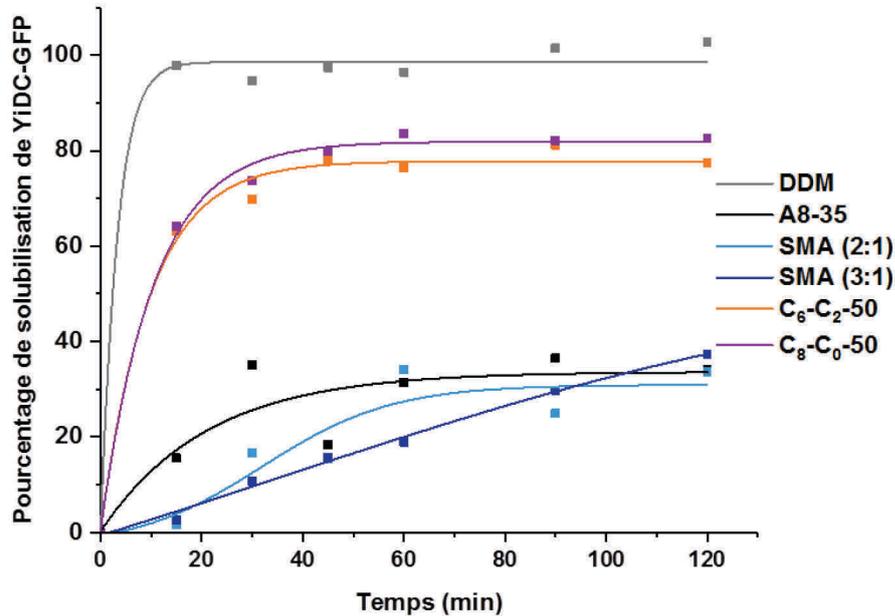


Figure 37. Cinétique de solubilisation de YidC-GFP par les polymères les plus pertinents avec un ratio [protéine : polymère] = 1 : 1 (les courbes représentées sont un simple guide visuel).

D'après les cinétiques exposées en figure 37, les deux CyclAPols, le C₆-C₂-50 et le C₈-C₀-50, confirment leur capacité accrue à extraire YidC-GFP et cela dans des temps particulièrement courts par rapport aux autres polymères. Avec ces CyclAPols, plus de 60 % de YidC-GFP est solubilisée après 15 min d'incubation et un plateau de solubilisation est atteint à environ 80 % après 45 min. Les allures de profils de solubilisation du DDM et des CyclAPols sont assez proches. En revanche, l'A8-35, les SMAs (2:1) et (3:1) solubilisent moins de 35 % de la protéine YidC-GFP, et ce même après 2 heures de solubilisation. Dans le cas du SMA (3:1), le phénomène de solubilisation semble être plus progressif que dans les autres cas, en suivant une évolution linéaire.

3.1.2.1.3 Les membranes de réticulum sarcoplasmique

Les membranes du réticulum sarcoplasmique (RS) ont été étudiées en raison de la surexpression naturelle de la protéine SERCA 1a, une PM de 110 kDa impliquée dans le transport des ions calcium du cytosol à la lumière du réticulum sarcoplasmique. La solubilisation de cette membrane a été étudiée de deux manières différentes. La première consiste à estimer visuellement sur un gel SDS-PAGE l'intensité de la bande correspondant à

la protéine d'intérêt, alors que la seconde consiste à suivre l'évolution de la turbidité, liée à la taille des particules en solution, au cours du temps. Cette dernière méthode permet ainsi de suivre le phénomène de solubilisation de l'ensemble de la membrane.

Sur le gel SDS-PAGE, reporté en figure 38, des aliquots des surnageants et des culots ressuspendus, ont été déposés. En raison des faibles quantités de matériel déposées sur ce gel, une révélation à l'argent, plus sensible que le bleu de Coomassie, a été préférée.

Dans cette expérience, l'A8-35 a été choisi comme polymère de référence. Malgré la saturation de la coloration du gel et la difficulté à identifier la bande correspondant à SERCA 1a des autres bandes, ce gel informe sur l'inefficacité de l'A8-35 à solubiliser la membrane de RS tandis que le C₆-C₁-50 et le C₆-C₂-50 présentent une capacité accrue à extraire SERCA 1a, retrouvée dans les surnageants en totalité ou en quasi-totalité. Le C₆-C₀-50 et le C₆-C₂-25 extraient la protéine avec des efficacités intermédiaires entre les polymères précédemment cités et les C₆-C₀-25, C₆-C₁-25 pour lesquels SERCA 1a ne semble pas être solubilisée. En effet, pour ces deux derniers polymères, la totalité de la protéine étudiée est retrouvée dans le culot ressuspendu.

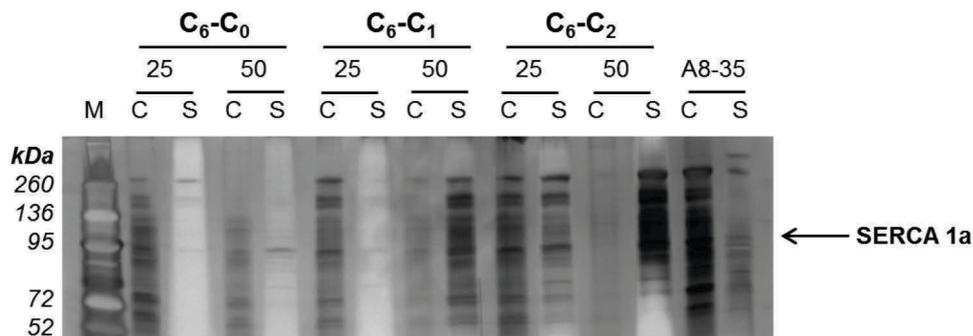


Figure 38. Gel SDS-PAGE révélé à l'argent montrant l'efficacité de solubilisation des différents APols testés avec un ratio [protéine : polymère] = 1 :10 (*C* : culot, *S* : surnageant, *M* : marqueurs de poids moléculaire).

Les cinétiques de solubilisation suivies par mesure de turbidité ont été réalisées en microplaques 96 puits comme détaillé dans le paragraphe 2.2.3.3 du matériel et méthodes et reportées en figure 39.

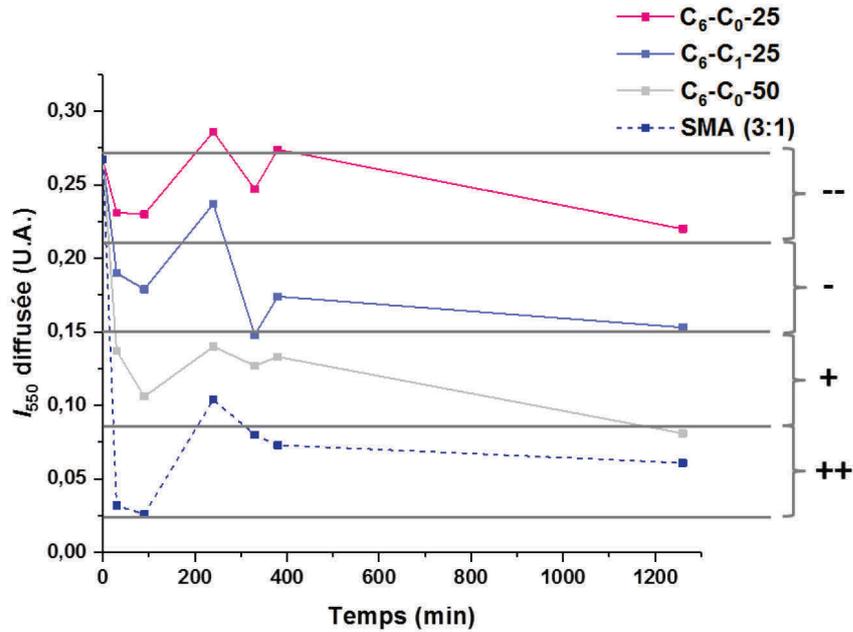


Figure 39. Description de la notation pour évaluer l'efficacité de solubilisation des membranes de RS par différents APols. Comme décrit précédemment, une notation avec les signes «--», «-», «+» et «++» a été réalisée afin de comparer les différents polymères entre eux, ils correspondent à des solubilisations inférieures à 25 %, comprises entre 25 % et 50 %, comprises entre 50 % et 75 % et supérieures à 75 % respectivement.

Tout comme pour les membranes d'*E. coli* surexprimant MacB, les polymères comportant 25 % de chaînes grasses sont moins efficaces à solubiliser les membranes du RS. En effet, la turbidité de l'échantillon en présence de C₆-C₀-25 a peu évolué sur une durée de 20 h, alors qu'elle a très nettement diminué en présence de C₆-C₀-50. De même, le passage de 6 à 7 carbones dans le greffon hydrophobe permet d'améliorer l'efficacité du polymère à solubiliser les membranes.

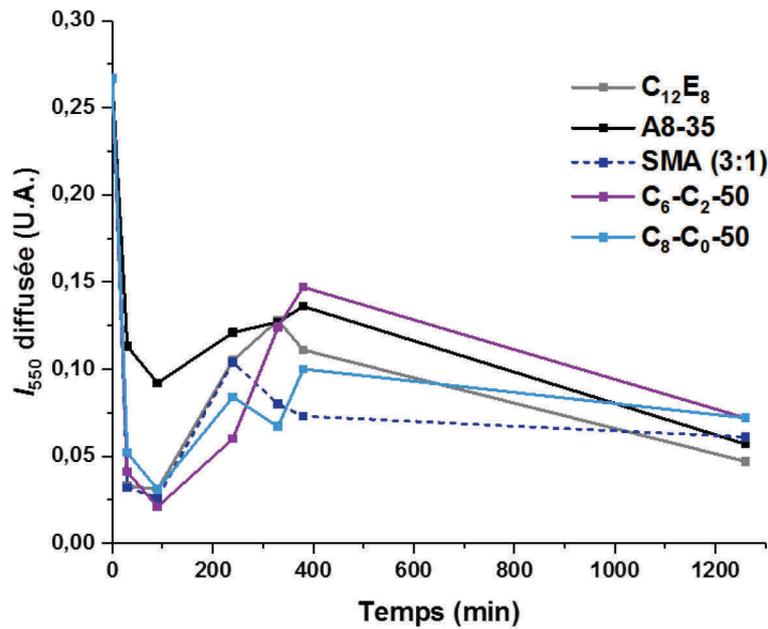


Figure 40. Cinétiques de solubilisation de la membrane du RS à 5 mg/mL par différents polymères à 10 mg/mL. Les cinétiques ont été réalisées par mesure de la turbidité des échantillons à 550 nm et à température ambiante dans un tampon 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl pH 8,0. Les courbes ont été normalisées sur la valeur de l'intensité initiale.

D'après la figure 40, l'ensemble des polymères testés semblent solubiliser la membrane du RS avec une efficacité du même ordre que celle observée avec le détergent de référence, le C₁₂E₈ après 20 heures de solubilisation. Ces cinétiques décrivent deux phases. La première, comprise entre le temps zéro et une heure et demi d'incubation, est très rapide et peut être associée à une fragmentation des vésicules du RS. La seconde phase beaucoup plus lente, décrivant une remontée puis une diminution du signal, pourrait être associée à une agrégation des objets formés avant une totale dissolution. L'allure de ces courbes rappelle celle observée lors de la solubilisation des liposomes de DMPC par le SMA (3:1) (cf. Figure 32). Dans les temps courts (inférieurs à 3 heures), l'A8-35 semble être moins efficace que les autres polymères testés.

3.1.2.1.4 La membrane pourpre

La membrane pourpre est une membrane contenant pour unique protéine la bactériorhodopsine (BR) qui présente, grâce à la liaison d'un cofacteur, le rétinal, un maximum d'absorption à 570 nm en membrane et ~ 554 nm en solution détergente non dénaturante. La solution contenant la protéine présente alors une couleur violette caractéristique. Cette propriété est un atout permettant de suivre facilement l'efficacité de la solubilisation par la présence ou

non de la couleur violette dans le surnageant. Dans le cadre de ces expériences, le n-octyl- β -D-thioglucoopyranoside (OTG) est le détergent de référence choisi comme contrôle positif.

La solubilisation de la membrane pourpre a été réalisée avec trois polymères de référence, à savoir, l'A8-35, l'A8-75, le SMA (3:1), un CyclAPol, le C₆-C₁-50, et son homologue aromatique, le Bn-50. Aucun des polymères testés n'a d'effet solubilisant notable sur cette membrane. En effet, quel que soit le polymère utilisé, les tubes présentent après solubilisation et ultracentrifugation des culots violets signifiant que la BR est native mais non solubilisée (cf. *Figure 41*).

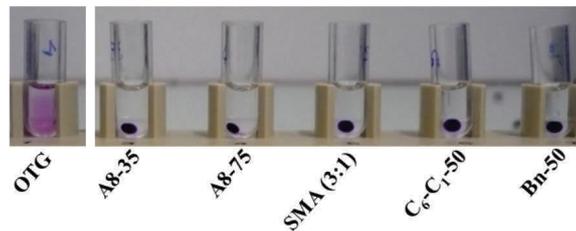


Figure 41. Photo des tubes de centrifugation après une solubilisation de 72 h à 4°C de la membrane pourpre. Les ratios massiques BR / polymères sont de 1 pour 6,26. La concentration finale en OTG est de 100 mM dans un tampon de 20 mM phosphate de sodium, pH 7,0. Les échantillons ont été ultracentrifugés à 100 000 xg pendant 20 min.

Les travaux publiés par (Knowles et al., 2009; Orwick et al., 2012) ont mis en évidence la solubilisation par les SMAs de la membrane pourpre après fusion avec des liposomes de DMPC et non de la membrane pourpre native. Afin de comparer les nouvelles classes d'APols aux SMAs, des conditions similaires ont été réalisées. Aussi, compte tenu des résultats obtenus dans le cadre de la solubilisation des membranes d'*E. coli*, les polymères les plus pertinents ont été testés sur la membrane pourpre après fusion de celle-ci avec des liposomes de DMPC.

Après solubilisation, des spectres UV-visible de chaque échantillon ont été mesurés avant et après ultracentrifugation. Les valeurs d'absorbance à 554 nm obtenues à partir de ces spectres ont permis de déterminer les pourcentages de BR extraite. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 11 et sous forme d'histogramme (cf. *Figure 42* panneau E).

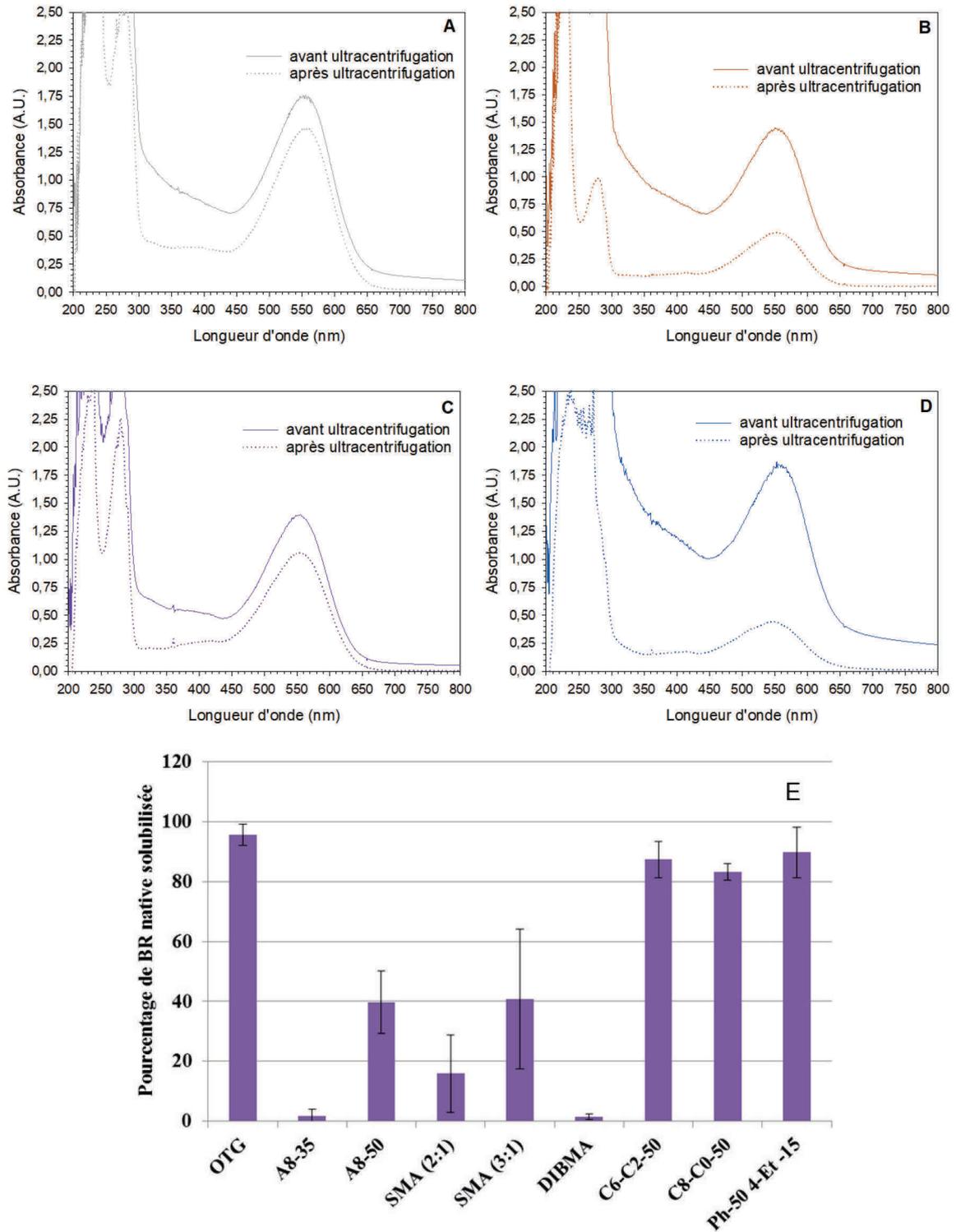


Figure 42. Solubilisation de la membrane pourpre fusionnée à la DMPC avec les polymères les plus pertinents. Spectres UV-visible avant et après centrifugation de la BR solubilisée en OTG (panneau A), en A8-50 (panneau B), en C₈-C₀-50 (panneau C), et en SMA (3 :1) (panneau D). Ratio des absorbances à 554 nm avant et après ultracentrifugation (n = 3) (panneau E).

APols	BR solubilisée (%)	Ecart-type	n
OTG	96	4	2
A8-35	2	2	4
A8-50	40	10	5
SMA (2:1)	16	13	5
SMA (3:1)	41	23	8
DIBMA	2	1	3
C ₆ -C ₀ -50	5	3	4
C ₆ -C ₁ -50	34	13	3
C ₆ -C ₁ -50-15	50	24	4
C ₆ -C ₂ -50	87	6	5
C ₇ -C ₀ -50	34	6	3
C ₈ -C ₀ -50	83	3	5
Ph-50	4	2	3
Ph-50- ⁴ Me	13	12	3
Ph-50- ⁴ Et	23	11	3
Ph-50- ⁴ Et-15	90	8	5
Bn-50	14	10	2
St-50	7	3	3
Hybride	3	1	3
C ₆ -C ₀ -50- ⁴ Et	12	3	3
C ₈ -C ₀ -25-40	3	1	2
C ₈ -C ₀ -50-15	70	3	3

Tableau 11. Ensemble des résultats de solubilisation de la membrane pourpre fusionnée à la DMPC par différents polymères.

Dans ces conditions, des variations de l'efficacité de solubilisation sont observées selon la nature du polymère considéré. Le contrôle positif en OTG, permet une solubilisation d'environ 100 %. L'A8-35 et le DIBMA sont quasiment inefficaces pour solubiliser la membrane pourpre fusionnée. Les autres polymères de référence, tels que l'A8-50 et les deux SMAs, solubilisent moins de la moitié de la BR présente initialement en membrane, c'est également le cas du C₆-C₁-50 et du C₇-C₀-50. Les CyclAPols les plus efficaces sont capables de solubiliser entre 80 et 90 % de la BR sous forme native ; il s'agit du C₈-C₀-50, du C₆-C₂-50. Un des ArylAPols, le Ph-50-⁴Et-15, présente également une capacité accrue, supérieure à 90 %, pour solubiliser la membrane pourpre fusionnée à la DMPC. Cependant, ce polymère présente deux inconvénients majeurs, de par sa nature aromatique, il absorbe dans l'UV ce qui limite son utilisation en biochimie ; de plus, c'est le seul APol synthétisé se présentant sous forme d'une poudre colorée, potentiellement due à la présence d'une impureté.

D'après le tableau 11, la solubilisation semble donc dépendre de l'hydrophobie du polymère. En effet, comme cela avait été observé dans le cas des membranes d'*E. coli*, à taux de charges comparables, ici 35 % de carboxylates libres, les deux CyclAPols en C₈ possédant 25 % et 50 % d'hydrophobes, *i.e.* le C₈-C₀-25-40 et le C₈-C₀-50-15, solubilisent respectivement 3 et 70 % de BR sous sa forme native. De plus, à taux de charges et taux de greffage d'hydrophobes comparables, ici 50 % de carboxylates libres et 50 % d'hydrophobes, l'efficacité de solubilisation semble dépendre du nombre de carbones dans le groupement hydrophobe

latéral. Par exemple, l'efficacité du C₆-C₁-50 est inférieure à celle du C₆-C₂-50, idem pour le C₇-C₀-50 et le C₈-C₀-50. Quel que soit l'arrangement des carbones dans la partie hydrophobe, qu'ils soient intégrés ou non au cycle, il ne semble pas avoir d'impact significatif dans le cas du C₆-C₁-50 vs C₇-C₀-50 ou encore pour le C₆-C₂-50 en comparaison avec le C₈-C₀-50. De même, l'effet de la diminution du taux de charge semble avoir des effets différents selon le polymère considéré. L'ajout de 15% d'isopropyl sur le C₆-C₁-50 permet en effet d'augmenter son efficacité de solubilisation de 34 % à 50 % tandis que pour le C₈-C₀-50, plus hydrophobe, cela entraîne une diminution de 83 % à 70 % de l'efficacité de solubilisation.

La cinétique de solubilisation de la membrane pourpre a été étudiée par DLS. Les cinétiques, suivies sur environ 4 heures, ont été réalisées avec deux CyclAPols (le C₈-C₀-50 et le C₆-C₂-50) en comparaison avec quatre polymères de référence à savoir, l'A8-35, l'A8-50 et le SMA (2:1) et (3:1) (*cf. Figure 43*).

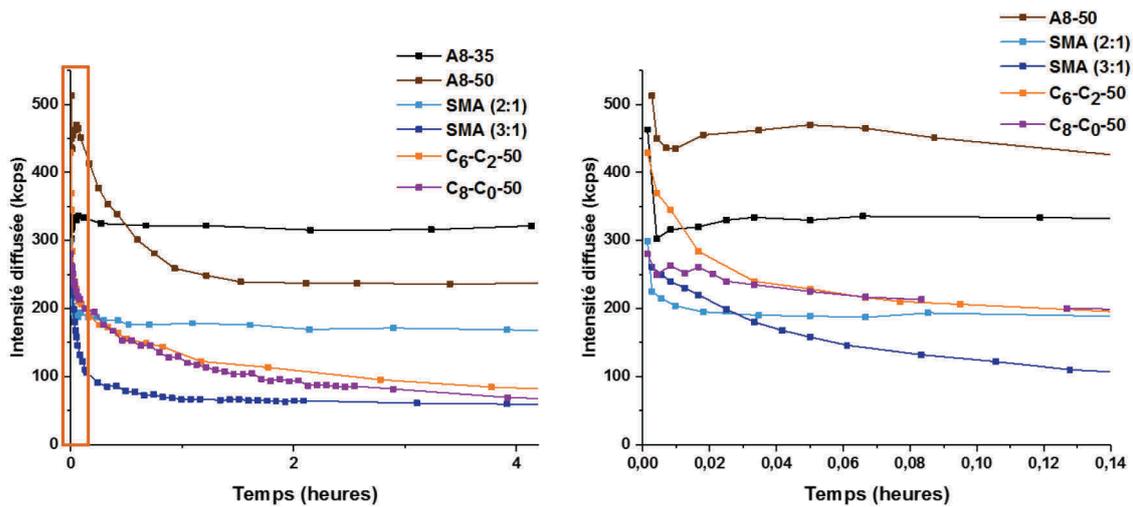


Figure 43. Cinétiques de solubilisation suivies par DLS de la membrane pourpre fusionnée avec la DMPC par les polymères les plus pertinents. Le panneau de droite est un zoom sur la partie encadrée en orange du panneau de gauche. La concentration finale en DMPC est de 1 g/L, en BR de 0,2 g/L et de 2,5 g/L pour le polymère. Ces cinétiques ont été réalisées dans un tampon 20 mM phosphate de sodium 100 mM NaCl pH 7,0 à 25 °C.

D'après les courbes de solubilisation ci-dessus, le SMA (3:1) est le premier, qui après 1 heure de solubilisation, atteint un plateau minimal d'intensité diffusée, correspondant à des particules de petites tailles. Son homologue greffé avec 50 % de styrène, le SMA (2:1), atteint lui aussi très vite un plateau d'intensité diffusée, néanmoins, la taille des particules restantes en fin de solubilisation semble être plus importante.

L'A8-35 et l'A8-50 semblent être les moins efficaces pour les solubilisations de la membrane pourpre fusionnée à la DMPC. Les deux CyclAPols testés, à savoir le C₆-C₂-50 et le C₈-C₀-50, se comportent de façon très similaire et présentent tous deux une cinétique de solubilisation plus lente que celle observée pour le SMA (3 :1), mais atteignent le même plateau d'intensité diffusée après 4 heures d'incubation.

Le zoom sur les premières minutes des cinétiques (*cf. Figure 43 panneau de droite*) montre une décroissance très rapide de l'intensité diffusée, suivie d'un plateau. Ce résultat peut être interprété de deux manières. La première est une fusion inhomogène des liposomes avec la membrane pourpre. Dans cette hypothèse, la décroissance rapide de l'intensité diffusée correspondrait à la cinétique de solubilisation des liposomes de DMPC qui, à l'exception de l'A8-50, est très rapide pour tous les polymères testés, s'en suivrait une solubilisation de la membrane pourpre plus ou moins efficace selon le polymère testé. La deuxième interprétation de ce résultat, qui suppose une fusion totale, indiquerait que seule une partie des polymères présents dans le réservoir de l'échantillon pourrait solubiliser la membrane pourpre fusionnée à la DMPC et cette fraction de polymères qualifiés « d'efficaces » à la solubilisation dépendrait de la nature du polymère. En effet, après 4 heures d'incubation, les échantillons ont été centrifugés et les surnageants analysés par DLS. La présence de petits objets dans les surnageants indique que l'intensité diffusée en fin de cinétique provenait essentiellement de gros objets non solubilisés. Des cinétiques de solubilisation en présence de différentes concentrations de polymères devraient permettre de confirmer ou d'éliminer cette seconde interprétation.

Le tableau 12 ci-après reprend les résultats obtenus avec l'ensemble des polymères et membranes testées en solubilisation. La notation décrite précédemment a été reprise ici. Les chiffres indiqués entre parenthèses correspondent aux pourcentages de protéines solubilisées déterminés de différentes manières selon le type de membrane testé.

Efficacité de solubilisation des détergents et polymères de référence					
A					
	<i>E. coli MacB</i> 2,5 %	<i>E. coli YidC</i> 1%	Membrane RS (0,5 %)	Membrane pourpre (0,3 %)	
A8-35	++	+ (71 +/- 11)	++	-- (2 +/- 2)	
A8-50	nd	++ (80 +/- 6)	nd	- (30 +/- 10)	
SMA (2:1)	nd	++ (80 +/- 10)	nd	- (15 +/- 12)	
SMA (3:1)	++	++ (82 +/- 12)	++	- (39 +/- 23)	
DIBMA	nd	-- (21 +/- 10)	nd	-- (0)	
OTG	nd	nd	nd	++ (99)	
DDM	++	++ (100)	nd	nd	
C ₁₂ E ₈	nd	nd	++	nd	
Triton X-100	nd	nd	nd	nd	

Efficacité de solubilisation des CyclAPols					
B	Nombre de carbones				
		<i>E. coli MacB</i> 2,5 %	<i>E. coli YidC</i> 1%	Membrane RS (0,5 %)	Membrane pourpre (0,3 %)
C ₆ -C ₀ -25	6	--	nd	--	nd
C ₆ -C ₁ -25	7	--	nd	-	nd
C ₆ -C ₂ -25	8	+	nd	+	nd
C ₆ -C ₀ -50	6	-	- (38 +/- 23)	+	-- (4 +/- 3)
C ₆ -C ₁ -50	7	++	++ (88 +/- 8)	++	- (34 +/- 13)
C ₇ -C ₀ -50	7	++	nd	++	- (34 +/- 6)
C ₆ -C ₂ -50	8	++	++ (81 +/- 4)	++	++ (87 +/- 8)
C ₈ -C ₀ -50	8	++	++ (95 +/- 2)	++	++ (82 +/- 2)
C ₆ -C ₀ -50- ^{4-Et}	8	nd	nd	nd	-- (12 +/- 3)

Efficacité de solubilisation des ArylAPols					
C	Nombre de carbones				
		<i>E. coli MacB</i> 2,5 %	<i>E. coli YidC</i> 1%	Membrane RS (0,5 %)	Membrane pourpre (0,3 %)
Ph-25	6	--	nd	--	nd
Bn-25	7	--	nd	--	nd
St-25	8	--	nd	--	nd
Ph-50	6	nd	+ (51 +/- 16)	nd	-- (2)
Bn-50	7	+	nd	+	nd
Ph-50- ^{4-Me}	7	nd	nd	nd	-- (13 +/- 78)
St-50	8	++	nd	++	-- (7 +/- 4)
Ph-50- ^{4-Et}	8	nd	nd	nd	-- (23 +/- 11)

Tableau 12. Efficacité de solubilisation des nouveaux polymères vis-à-vis de différents types de membranes biologiques en comparaison avec les détergents et polymères de référence. Les pourcentages entre parenthèses indiqués après les noms des différentes membranes correspondent aux concentrations de polymères utilisés. Les signes «-», «-», «+» et «++» correspondent respectivement à des solubilisations inférieures à 25 %, comprises entre 25 % et 50 %, comprises entre 50 % et 75 % et supérieures à 75 % (nd : non déterminé).

L'A8-35 s'avère particulièrement efficace pour solubiliser les membranes d'*E. coli* et celles du RS. En revanche, il est inefficace sur la membrane pourpre fusionnée à la DMPC malgré son efficacité à solubiliser les liposomes de DMPC seul. Le SMA (3:1) est tout aussi efficace que l'A8-35 sur les deux premiers types de membranes, il présente également une meilleure capacité à solubiliser la membrane pourpre, ce qui confère à ce polymère un plus large panel de membranes et/ou PMs à solubiliser par rapport à l'A8-35. Son analogue moins hydrophobe, le SMA (2:1), et l'A8-50 présentent des propriétés solubilisantes quasiment équivalentes. Le DIBMA ne présente que de faibles taux de solubilisation quelle que soit la membrane considérée. De manière générale, pour un CyclAPol ou un ArylAPol donné, l'efficacité de solubilisation est plus ou moins similaire quel que soit la membrane à solubiliser excepté dans le cas de la membrane pourpre pour laquelle il existe des différences de solubilisation significatives. Les polymères greffés avec seulement 25 % de groupes hydrophobes présentent généralement une moins bonne aptitude à solubiliser les membranes que leurs analogues greffés à 50 %. L'efficacité de solubilisation semble s'accroître avec l'augmentation du nombre de carbones composant la partie apolaire, autrement dit avec l'hydrophobie. Par exemple, le C₆-C₀-50 est moins solubilisant que le C₆-C₁-50, même constat pour leurs homologues aromatiques le Bn-50 et le St-50. Néanmoins, d'autres facteurs semblent entrer également en considération ; en effet, pour un nombre de carbones égal, l'arrangement de ces derniers semble avoir une importance dans certains cas. Par exemple, le C₆-C₀-50-^{4-Et}, composé de deux carbones en position 4 du cycle, est moins efficace que le C₆-C₂-50 qui possède deux carbones entre le cycle et la liaison amide. A contrario, le fait qu'un carbone soit inséré dans le cycle ou qu'il fasse partie du bras espaceur ne semble pas affecter significativement le comportement solubilisant des polymères. En effet, le C₈-C₀-50 et le C₆-C₂-50 présentent des comportements similaires, il en va de même pour le C₇-C₀-50 et le C₆-C₁-50. En revanche, la différence de comportement observée entre les APols à chaînes cyclique comportant 8 carbones et l'A8-50 porteur de chaînes linaires de 8 carbones est significative.

3.1.2.2 Effet stabilisant des nouveaux APols

Après avoir étudié la capacité des nouveaux polymères à solubiliser des membranes de différentes natures, leur aptitude à stabiliser les PMs a été évaluée. Pour cette étude, seules la BR et SERCA 1a ont été choisies. En effet, YidC ayant un rôle dans l'insertion des autres PMs au sein des membranes, son activité en solution aqueuse ne peut être mesurée. De même, Mac B, bien que possédant une activité de transport, celle-ci ne peut être mesurée en solution sans une réinsertion préalable dans des liposomes. Ainsi Mac B n'a pas fait l'objet de mesures d'activité en APols. En revanche, l'état conformationnel de la BR en solution peut être facilement évalué en fonction de la longueur d'onde d'absorption du rétinol. Lorsque la BR solubilisée est sous sa conformation native, le rétinol, alors lié à la protéine, absorbe à 554 nm tandis que sous sa conformation dénaturée, le rétinol est libre et absorbe fortement à 380 nm. Ce changement conformationnel faisant passer la BR de la forme holoprotéine de couleur violette à la forme apoprotéine de couleur jaune caractéristique renseigne sur la stabilité de la BR en solution. La simplicité de ce système fait donc de la BR une protéine de choix pour étudier l'effet des différents polymères sur la stabilité de cette PM. Concernant SERCA 1a, son activité ATPasique couplée à d'autres réactions enzymatiques peut être évaluée en solution et renseigner ainsi sur sa stabilité (Champeil, 2000).

3.1.2.2.1 Thermostabilité de la BR (*Halobacterium salinarum*)

La thermostabilité de la BR a été évaluée en présence d'APols en préparant les échantillons de deux manières différentes, soit après solubilisation directe de la membrane pourpre fusionnée avec de la DMPC, soit après piégeage en APols, c'est à dire après une étape de solubilisation préalable de la membrane pourpre (non fusionnée à la DMPC) par un détergent puis échange de ce dernier par les polymères.

3.1.2.2.1.1 Thermostabilité après solubilisation en détergent puis piégeage en APols

Le piégeage de la BR en APols consiste à échanger le détergent, ici l'OTG, par les APols en incubant les échantillons 2 h à 4°C en présence de bio-beads. Les spectres d'absorption des échantillons sont ensuite enregistrés avant et après une étape d'ultracentrifugation. Cette étape a pour but d'évaluer la capacité des APols à maintenir la BR en solution.

Deux paramètres peuvent donc être décrits lors de cette expérience. Le premier est la capacité du polymère à remplacer l'OTG sans altérer la conformation native de la BR (en déterminant le ratio des absorbances à 554 nm avant l'ajout de polymère et après le retrait du détergent). Le second est la capacité du polymère à maintenir la protéine en solution sous sa forme native (avec le ratio des absorbances à 554 nm avant et après ultracentrifugation). Les valeurs d'absorbance à 554 nm de la BR maintenue native en solution, normalisées par rapport à la condition en OTG, sont reportées dans le tableau 13 et l'histogramme rassemble les résultats obtenus pour les polymères les plus pertinents (*cf. Figure 44*).

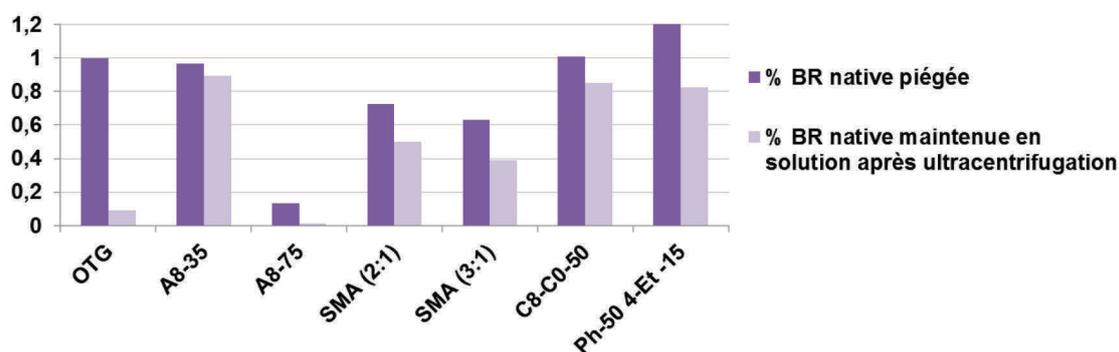


Figure 44. Proportions de BR native obtenue après échange de l'OTG pour différents polymères (violet foncé) et de BR native maintenue en solution après ultracentrifugation (violet clair).

APols	BR native piégée (%)	BR native maintenue en solution (%)
OTG	100	9
A8-35	96	89
A8-75	13	1
SMA (2:1)	73	50
SMA (3:1)	63	39
C ₆ -C ₀ -25	115	29
C ₆ -C ₀ -50	99	90
C ₆ -C ₁ -25	61	33
C ₆ -C ₁ -50	92	80
C ₆ -C ₁ -25-40	84	65
C ₆ -C ₁ -50-15	84	58
C ₇ -C ₀ -50	89	77
C ₆ -C ₂ -25	9	1
C ₈ -C ₀ -50	101	85
Ph-25	102	24
Ph-50- ⁴ Me	92	78
Ph-50- ⁴ Et	90	73
Ph-50- ⁴ Et-15	121	83
Bn-25	100	44
Bn-50	92	75
Bn-50-15	85	58
St-25	52	23
St-50	89	77
St-50-15	93	64

Tableau 13. Récapitulatif des données de piégeage et de maintien en solution après piégeage.

D'après les résultats obtenus, la plupart des polymères sont capables de remplacer l'OTG en préservant la structure native de la BR (plus de 80 % de BR maintenue native). Néanmoins, pour certains polymères tels que l'A8-75 et la C₆-C₂-25, l'échange détergent / polymère est délétère puisque près de 90 % de la BR est dénaturée. L'étape d'ultracentrifugation permet d'évaluer la proportion de BR maintenue en solution. Avec l'A8-75 et le C₆-C₂-25, étant donné qu'il y avait très peu de protéine native après piégeage, il n'est pas surprenant de constater que la BR n'est pas ou très peu maintenue en solution (< 10 %). L'A8-35 est l'un des plus efficaces, les SMAs quant à eux maintiennent moins de la moitié de la BR en solution. De manière générale, les polymères portant 50 % de groupements hydrophobes sont plus efficaces que leurs analogues avec 25 % d'hydrophobes pour maintenir la BR en solution sous forme native. Les polymères les plus pertinents ici sont l'A8-35, le C₆-C₀-50, le C₈-C₀-50 et le Ph-50-4^{Et}-15. En effet, ils sont capables de maintenir soluble plus de 80 % de BR. Le C₆-C₀-50, n'a volontairement pas été représenté sur la figure 44 en raison de sa plus faible capacité à solubiliser les membranes.

La fraction de BR native maintenue en solution avant le test de stabilité est donc variable selon le polymère utilisé. Toutefois, après l'étape de piégeage, tous les échantillons ont été incubés pendant 30 min à une température donnée, comprise entre 30 et 80 °C, puis refroidis dans la glace avant de mesurer leur spectre d'absorption. Les valeurs d'absorbance à 554 nm mesurées après incubation ont été normalisées par l'absorbance initiale de chaque échantillon à 4°C. Les courbes de thermostabilité ont été reportées dans la figure 45 ci-dessous et les températures de dénaturation sont reportées dans le tableau de droite.

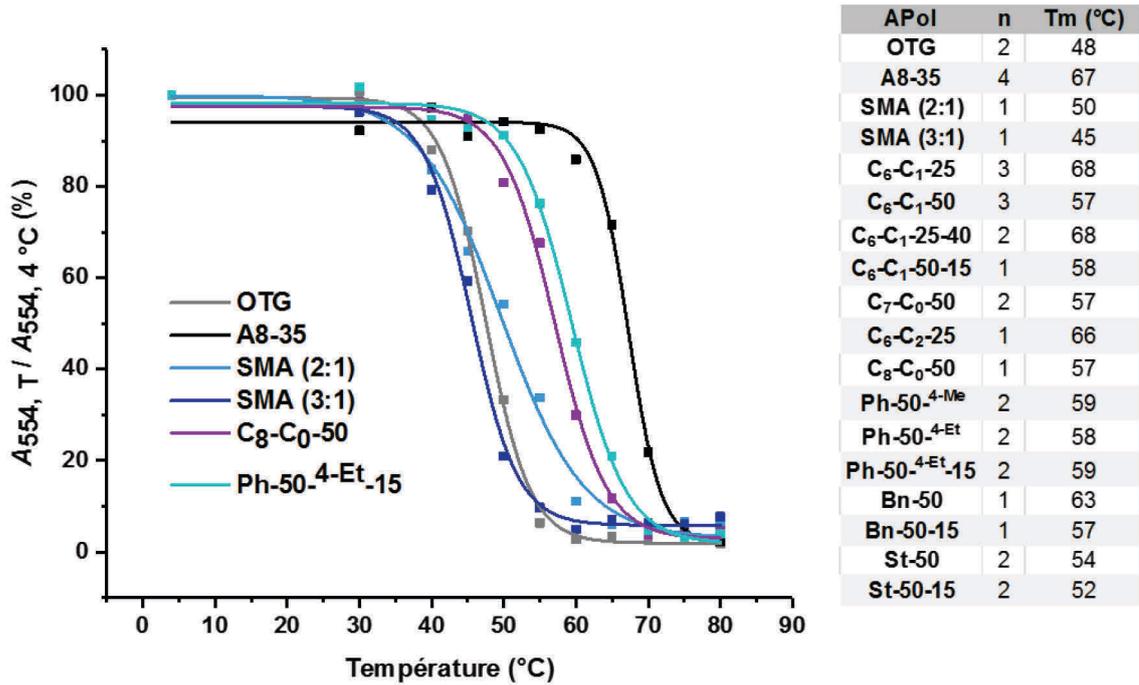


Figure 45. Courbes de thermostabilité et températures de dénaturation (Tm) de la BR après piégeage en présence de différents polymères.

Les courbes obtenues couplées aux températures de dénaturation rassemblées dans le tableau (*cf. Figure 45*) permettent une classification en trois catégories des polymères testés :

- Le SMA (2:1) et le SMA (3:1) présentent des températures de dénaturation proches de celle observée en présence d'OTG (Tm autour de 48 °C). La sigmoïde décrite par la dénaturation de la BR en présence de SMA (2:1) a une pente légèrement différente suggérant une hétérogénéité de dénaturation.
- L'ensemble des CyclAPols et l'ArylAPol testés, ont des allures de courbes assez similaires et des températures de dénaturation proches comprises entre 50 et 60 °C pour la grande majorité excepté pour le Bn-50, le C₆-C₁-25, le C₆-C₂-25 et le C₆-C₁-25-40 qui ont des Tm supérieures à 60 °C. Ces derniers polymères n'ont cependant pas été particulièrement étudiés par la suite en raison de leur faible pouvoir solubilisant.
- La BR piégée en A8-35 se révèle être particulièrement stable avec une température de dénaturation supérieure d'environ 10 °C par rapport aux nouveaux APols, et d'un peu moins de 20 °C en comparaison aux SMAs testés.

3.1.2.2.1.2 Thermostabilité après solubilisation directe par les APols de la membrane pourpre fusionnée avec de la DMPC

La première étape de solubilisation de la membrane pourpre fusionnée à la DMPC est décrite dans le paragraphe 4.1.4. Les fractions solubles, contenant la BR et les différents polymères testés, ont été incubées à 50 °C pendant 6 heures sous agitation. A la suite de cette étape, la proportion de BR native restante est déterminée par le ratio des absorbances à 554 nm avant et après incubation. Ces expériences ont été menées uniquement sur les polymères les plus pertinents pour leur efficacité de solubilisation (*cf. Figure 46 et Tableau 14*).

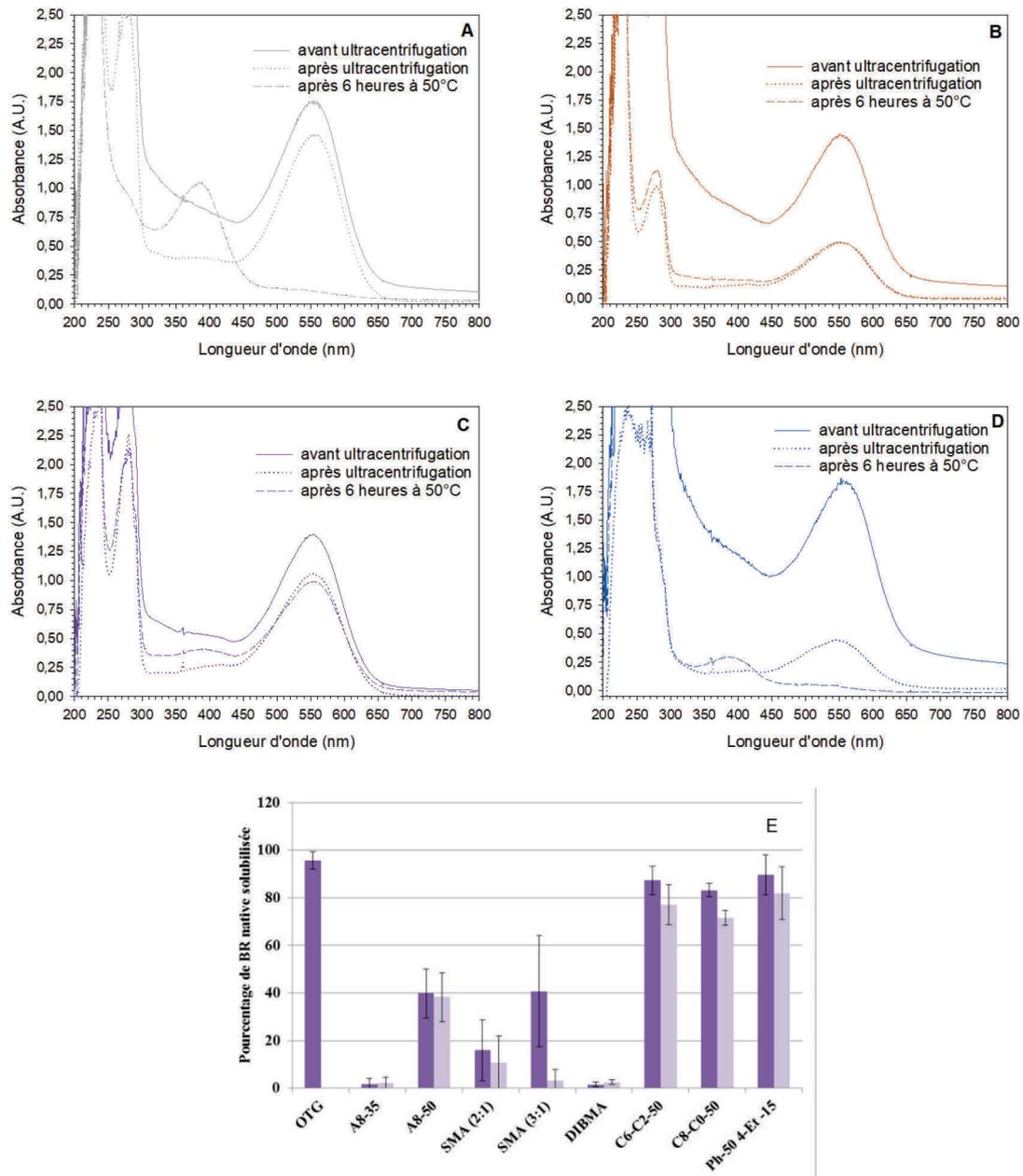


Figure 46. Stabilité de la BR après solubilisation de la membrane pourpre fusionnée à la DMPC avec les polymères les plus pertinents. Spectres UV-visible avant et après centrifugation, et après 6 h d'incubation à 50 °C

de la BR solubilisée en OTG (panneau A), en A8-50 (panneau B), en C₈-C₀-50 (panneau C) et en SMA (3:1) (panneau D). Ratios des absorbances à 554 nm avant et après ultracentrifugation (violet foncé) et ratios des absorbances à 554 nm avant ultracentrifugation et après incubation à 50 °C (panneau E). Les expériences ont été tripliquées (n = 3).

APols	BR solubilisée (%)	Ecart-type	n	BR stabilisée (%)	Ecart-type	n
OTG	96	4	2	0	0	6
A8-35	2	2	4	2	2	4
A8-50	40	10	5	38	10	5
SMA (2:1)	16	13	5	11	11	5
SMA (3:1)	41	23	8	3	4	6
DIBMA	2	1	3	3	1	3
C ₆ -C ₀ -50	4	3	4	4	3	3
C ₆ -C ₁ -50	34	13	3	30	11	3
C ₆ -C ₁ -50-15	50	24	4	33	18	4
C ₆ -C ₂ -50	87	6	5	77	9	4
C ₇ -C ₀ -50	34	6	3	25	6	3
C ₈ -C ₀ -50	83	3	5	72	3	4
Ph-50	4	2	3	4	0	4
Ph-50- ^{4-Me}	13	12	3	14	11	3
Ph-50- ^{4-Et}	23	11	3	24	10	3
Ph-50- ^{4-Et} -15	90	8	5	82	11	4
Bn-50	14	10	2	11	9	3
St-50	7	3	3	7	2	3
Hybride	3	1	3	4	0	3
C ₆ -C ₀ -50- ^{4-Et}	12	3	3	13	3	3
C ₈ -C ₀ -25-40	2	1	2	5	3	3
C ₈ -C ₀ -50-15	70	3	3	12	3	3

Tableau 14. Résultats de stabilisation de la BR après solubilisation de la membrane pourpre fusionnée à la DMPC par les différents polymères.

C'est en présence de SMA (2:1) et de SMA (3:1) que les pertes de BR native en solution sont les plus importantes. La BR semble plus stable en présence du Ph-50-^{4-Et}-15, du C₆-C₂-50 et du C₈-C₀-50 avec de faibles taux de dénaturation enregistrés (inférieurs à 15 %) après 6 heures à 50 °C. Cette stabilité accrue avec l'utilisation de ces polymères était également constatée dans les expériences de thermostabilité après piégeage.

3.1.2.2.2 Test d'activité de SERCA 1a

La protéine SERCA 1a a historiquement été une des premières PMs à avoir été étudiée de façon approfondie pour décrire l'effet stabilisateur de l'A8-35. D'après les structures cristallographiques de cette protéine dans ses différents états, il a été observé que l'activité de cette protéine, qui pompe les ions calcium de part et d'autre de la membrane du RS en utilisant comme source d'énergie l'hydrolyse de l'ATP, adopte de grands mouvements conformationnels de sa région transmembranaire lors de son cycle catalytique. L'étude de cette protéine en association avec l'A8-35 a révélé que l'activité ATPasique de SERCA 1a était

inhibée par l'APol mais de façon réversible, l'activité étant restaurée dès lors que le polymère était remplacé par du détergent par simple compétition (Champeil, 2000). De plus, il a été observé que l'A8-35 protégeait l'inactivation irréversible de la protéine. Les interprétations de ces deux observations ont été reliées avec les mouvements conformationnels de la protéine, lesquels étaient restreints par le polymère. Cet effet a été appelé l'effet Gulliver (Picard et al., 2006).

D'autre part, des analogues du DDM (les PCC-mal) dont les chaînes alkyles en C12 ont été remplacées par des chaînes cycliques, ont été développés pour leur propriétés stabilisantes vis à vis des PMs (Hovers et al., 2011). Il semble donc intéressant d'examiner si la substitution des chaînes octyles linéaires de l'A8-35 par des chaînes cycliques change l'activité et la stabilité de SERCA 1a.

Les polymères testés sur l'activité de SERCA 1a ont été le SMA (3:1), le C₈-C₀-50 et l'A8-50 en comparaison à l'A8-35. L'activité ATPasique de SERCA 1a a été mesurée de façon indirecte selon le schéma décrit en figure 47.

Elément sous droit, diffusion non autorisée

Figure 47. Dosage d'une activité ATPasique par enzymes couplées.

SERCA 1a permet l'hydrolyse de l'ATP en ADP et phosphate inorganique (Pi), qui peut être mesurée en couplant cette réaction à deux autres réactions enzymatiques :

- dans un premier temps, la pyruvate kinase permet la régénération de l'ADP, produit par SERCA 1a, en ATP en présence de phosphoenolpyruvate (PEP) avec formation de pyruvate.
- dans un second temps, la lactate déshydrogénase (LDH) intervient en réduisant le pyruvate en lactate et en oxydant le NADH présent en solution en NAD⁺.

La consommation de NADH est suivie par la diminution d'absorbance à 340 nm. A une molécule de NADH oxydée correspond une molécule d'ADP produite et donc à une molécule d'ATP hydrolysée. Il est ainsi possible d'estimer la vitesse d'hydrolyse d'ATP et de la rapporter à la quantité de protéines présentes, puis de l'exprimer en ($\mu\text{mol d'ATP hydrolysé}) \cdot (\text{mg de protéine})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Sur la figure 48 sont présentées les cinétiques de consommation du NADH (panneaux de gauche) et la proportion d'activité de l'enzyme restituée ou non après ajouts

successifs de détergent, ici le C₁₂E₈ (panneaux de droite). La première flèche reportée sur les cinétiques consiste à ajouter des vésicules du RS au milieu réactionnel. La diminution d'absorbance du NADH démontre que l'activité de SERCA 1a a bien débuté mais elle demeure néanmoins assez faible. En effet, l'accumulation de calcium à l'intérieur des vésicules crée une inhibition de la pompe. Pour retrouver l'activité, il faut permettre la libération du calcium en perméabilisant ces vésicules. Un ionophore (par exemple la calcymicine) ou, comme tel est le cas ici, un détergent non inhibiteur (généralement le C₁₂E₈) peut être utilisé. Après ajout du détergent, des concentrations croissantes d'APols sont additionnées à l'échantillon et une diminution plus ou moins drastique de l'absorbance à 340 nm, liée à un ralentissement de l'activité ATPasique, est observée. Tous les polymères amphiphiles testés ont une tendance à inhiber cette activité. L'inhibition la plus marquée est celle observée en présence du SMA (3:1) qui, dès son premier ajout à 0,1 mg/mL, inhibe totalement l'enzyme. L'ordre d'inhibition croissant est le suivant : A8-50 < A8-35 < C₆-C₁-50-15 < C₈-C₀-50 < SMA (3:1). Il a été reporté dans la littérature que l'inhibition de la protéine par les polymères pouvait être liée à sa stabilité. En effet, plus l'enzyme se trouve inhibée par l'APol, plus elle serait stable. Cette hypothèse a été avancée dans le travail de J-L Popot en 2011 et de Martin Picard en 2006 de sous le terme d'effet Gulliver (Picard et al., 2006; Popot et al., 2011). Cette inhibition est néanmoins réversible, car après ajout supplémentaire de détergent, SERCA 1a retrouve en partie son activité. Ce phénomène décrit pour la première fois par Champeil et collègues (Champeil et al. 2000), peut s'expliquer par la dissociation de l'APol pour partitionner dans les micelles de C₁₂E₈. La capacité de reprise de l'activité de l'enzyme est de 15 % en présence de SMA (3:1) tandis qu'elle est d'environ 40 % pour le C₈-C₀-50, l'A8-35 et l'A8-50. L'ajout de 5,1 mg/mL de C₁₂E₈ après additions croissantes de C₈-C₀-50 permet une restitution de 33 % de l'activité ATPasique de la pompe (*cf. Tableau 15*).

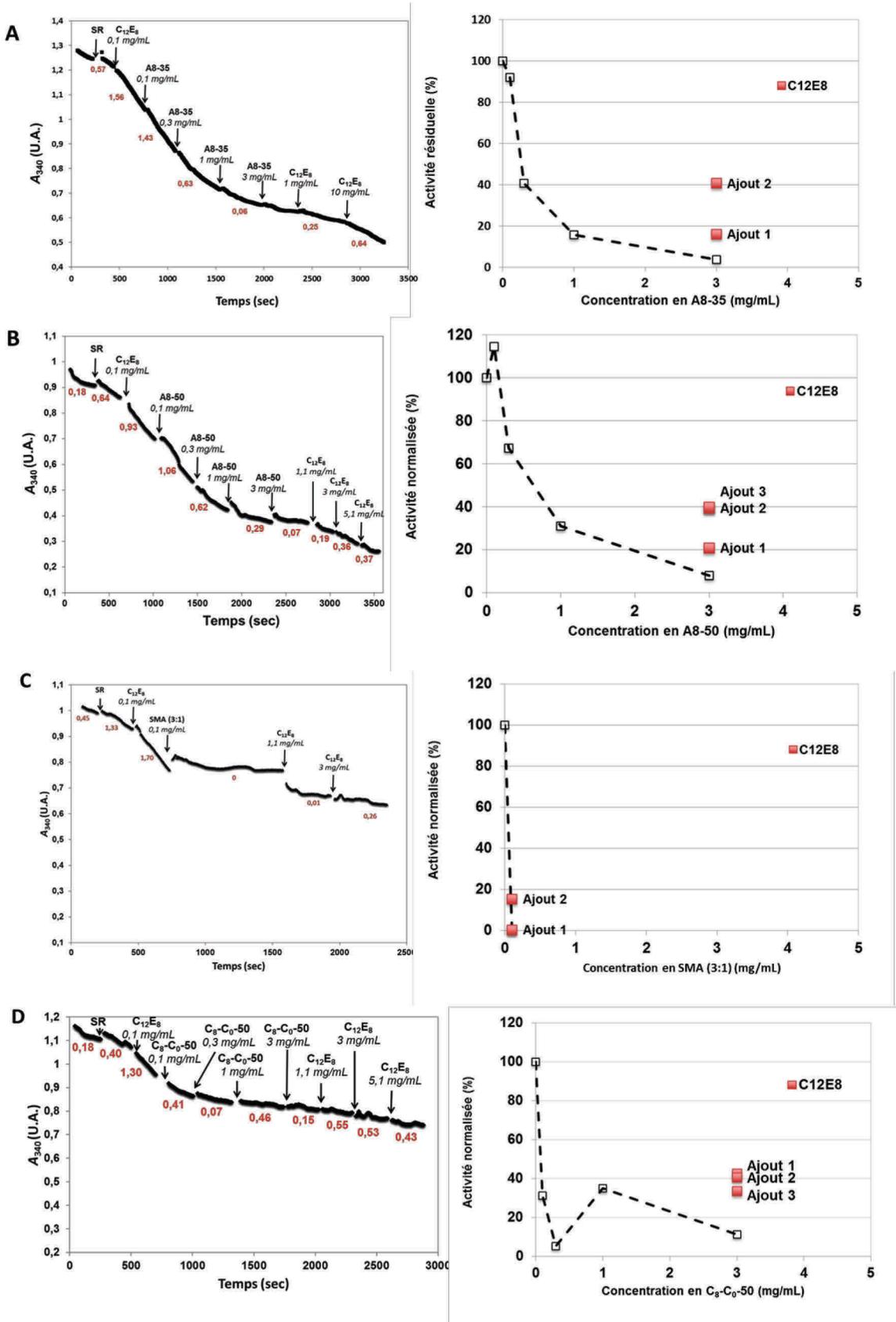


Figure 48. Suivi de l'absorbance du NADH à 340 nm en fonction de la concentration en A8-35 (panneau A), de l'A8-50 (panneau B), du SMA (3 :1) (panneau C) et du C_8-C_0-50 (panneau D). Les graphiques de droite représentent, quant à eux, l'activité résiduelle après ajout de $C_{12}E_8$. L'activité ATPasique est indiquée en chiffres rouges.

	Concentration C ₁₂ E ₈ (mg/mL)	% d'activité résiduelle
A8-35	1	16
	10	41
A8-50	1,1	20
	3	39
	5,1	40
SMA (3:1)	1,1	0
	3	15
C ₆ -C ₁ -50-15	1,1	34
	3	12,5
	5,1	15
C ₈ -C ₀ -50	1,1	42
	3	41
	5,1	33

Tableau 15. Pourcentages d'activité ATPasique restituée après ajout de C₁₂E₈ à différentes concentrations.

Le SMA (3:1) étant le plus inhibant avec une restauration de l'activité ATPasique deux fois moins importante que celle des autres polymères, pourrait être le moins stabilisant pour la protéine, comme cela avait été observé dans le cas de la BR. Le C₈-C₀-50 semble, une nouvelle fois, être le polymère le plus pertinent car il permet d'inhiber l'enzyme tout en conservant le caractère réversible de son inactivation (permettant une restauration de l'activité de SERCA 1a d'environ 40 %).

Afin de tenter de comprendre les propriétés solubilisantes et stabilisantes de ces nouveaux polymères vis-à-vis des membranes et des PMs, diverses études physico-chimiques pour caractériser les tailles et l'homogénéité des assemblages formés lors de ces processus ont été réalisées. Dans un premier sont étudiés les complexes formés par les polymères en présence de lipides puis, le système a été complexifié en utilisant des systèmes biologiques.

3.1.2.3 Caractérisation des complexes polymères / lipides

Les complexes formés avant et après solubilisation des liposomes de DMPC par les différents polymères ont également fait l'objet d'une caractérisation biophysique en utilisant plusieurs techniques, à savoir, la SEC, la DLS, et le SAXS. Certains des profils SEC ont été reportés sur la figure 49 et l'ensemble des résultats obtenus est consigné dans le tableau 16 ci-après.

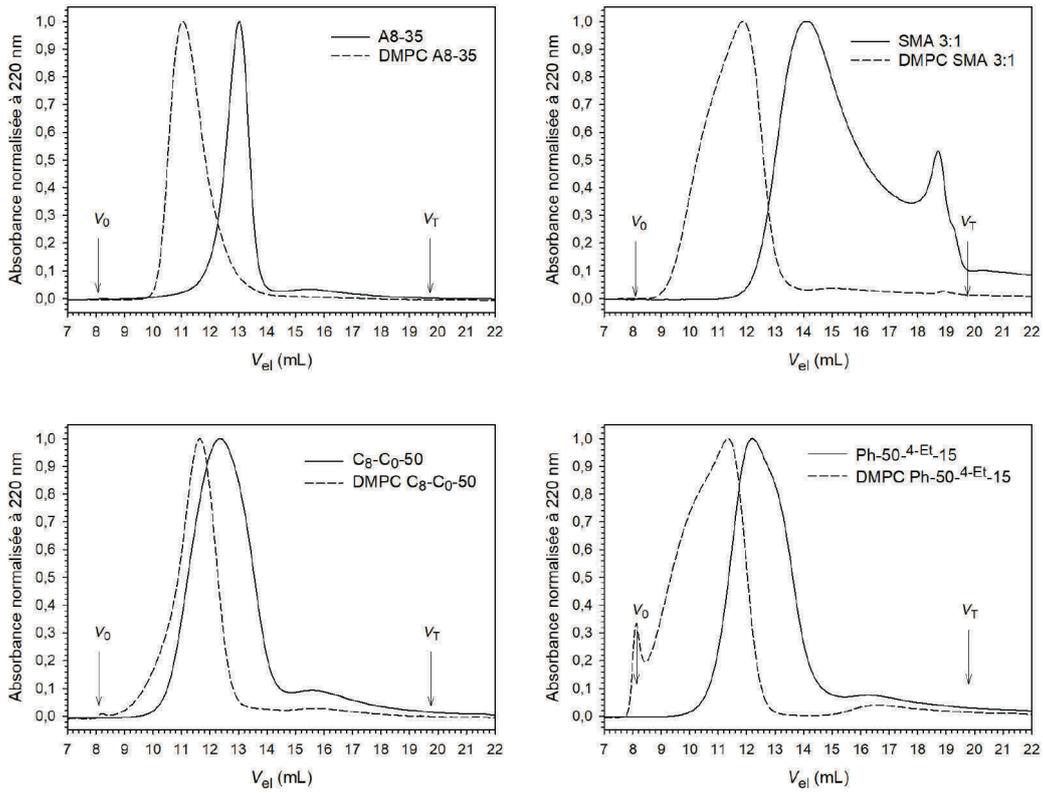


Figure 49. Profils d'éluion enregistrés à 220 nm des particules DMPC / polymères en comparaison avec les profils des polymères seuls. Les volumes d'exclusion (V_0) et total (V_T) de la colonne sont indiqués par des flèches.

Amphipol	Volume d'éluion (mL)	Largeur à mi-hauteur (mL)	Rayon hydrodynamique (nm)	Agrégats (volume mort)
A8-35	13,0	0,9	3,7	non
C ₆ -C ₀ -50	13,7	3,6	3,1	non
C ₆ -C ₁ -50	13,3	1,7	3,4	non
C ₆ -C ₂ -50	11,9	2,0	5,0	non
C ₇ -C ₀ -50	13,2	2,3	3,6	non
C ₈ -C ₀ -50	12,3	2,3	4,6	non
Ph-50	14,3	3,7	2,6	non
Ph-50- ^{4-ET} -15	12,2	2,3	4,7	non
DIBMA	11,8	6,2	5,1	oui
SMA (2:1)	14,7	3,5	2,4	non
SMA (3:1)	14,1	3,1	2,7	non

Amphipol	Volume d'éluion (mL)	Aire du pic (%)	Largeur à mi-hauteur (mL)	Rayon hydrodynamique (nm)	Agrégats (volume mort)
A8-35	11,0	100	1,3	5,7	non
C ₆ -C ₀ -50	9,5	78	2,5	6,7	non
C ₆ -C ₁ -50	11,3	100	1,3	5,5	non
C ₆ -C ₂ -50	11,6	92	1,7	5,3	oui
C ₇ -C ₀ -50	11,2	98	1,4	5,6	non
C ₈ -C ₀ -50	11,7	94	1,4	5,2	non
Ph-50	14,9	62	3,3	4,8	oui
Ph-50- ^{4-ET} -15	11,4	91	2,7	5,5	oui
DIBMA	12,6	62	5,9	4,3	oui
SMA (2:1)	11,2	58	1,2	5,6	non
SMA (3:1)	11,9	96	2,4	5,0	non

Tableau 16. Tableau récapitulatif des données extraites des profils SEC de particules de polymères seuls (tableau du haut) et des particules de polymères / DMPC (tableau du bas). Le R_H a été calculé en appliquant la méthode décrite dans le paragraphe 2.2.6, et en utilisant le volume d'éluion déterminé au maximum du pic.

La plupart des complexes polymères / DMPC présentent des rayons hydrodynamiques moyens variant de 5 à 6 nm, excepté le C₆-C₀-50 dont le rayon est supérieur à 6 nm. Le Ph-50 et le DIBMA se présentent, quant à eux, sous forme d'objets légèrement plus petits avec un rayon hydrodynamique autour de 4 nm. Excepté pour le DIBMA, l'ajout de DMPC aux polymères augmente sans surprise entre 6 et 116 % (respectivement pour le C₆-C₂-50 et le C₆-C₀-50) la taille des objets formés. De manière générale, l'association de polymères à des lipides a également pour conséquence d'homogénéiser les tailles des complexes formés. En effet, les profils des complexes polymères / DMPC sont souvent plus étroits que ceux des polymères seuls en solution. Dans l'ensemble, en absence de lipides, les polymères avec des chaînes cycliques ne forment pas des particules aussi bien définies que dans le cas de l'A8-35.

Les particules polymères / DMPC ont également été caractérisées par DLS et les résultats ont été reportés dans le tableau 17 et analysés par deux méthodes différentes en fonction du taux de polydispersité (PDI), la méthode des cumulants et la double exponentielle. La comparaison des rayons obtenus par ces deux analyses révèle, dans la plupart des cas, des populations hétérogènes. En effet, lorsque la polydispersité est supérieure à 20 % l'analyse des cumulants,

qui reflète la moyenne de l'ensemble des objets en solution, n'est plus fiable. Les particules formées en présence d'A8-50 présentent un rayon proche de celui de l'acide polyacrylique (PAA) et de celui des particules initialement formées (t_0 de la solubilisation) ce qui démontre une inefficacité de ces polymères à solubiliser les liposomes de DMPC. L'A8-35, le SMA (2:1), les CyclAPols C₆-C₀-50 et C₈-C₀-50 ainsi que le Ph-50 forment, en association avec les lipides, de petits objets, dont le rayon est inférieur à 7 nm, et plus homogènes.

APols	Temps de solubilisation (min)	R cumul. (nm)	R dbl exp. (nm) / proportions (%)	
PAA	90	93	46 / 40	210 / 60
A8-35	11	6	N/A	
A8-50	80	91	N/A / < 5	118 > 95
SMA (2:1)	75	6	N/A	
SMA (3:1)	68	26	15 / 45	54 / 55
C ₆ -C ₀ -50	11	4	N/A	
C ₈ -C ₀ -50	15	4	1 / < 5	8 > 95
Ph-50	84	7	N/A	

Tableau 17. Rayons, déterminés par DLS, obtenus par deux traitements différents, la méthode des cumulants (R cumul.) et la méthode du double exponentiel (R dbl exp.) des particules formées après solubilisation. Le rayon initial des liposomes est compris entre 90 et 100 nm. *N/A* : non applicable.

Les échantillons ont également fait l'objet d'études préliminaires par SAXS. Les courbes de diffusion des polymères les plus pertinents ont été présentées en figure 50 et l'ensemble des résultats a été reporté dans le tableau 18.

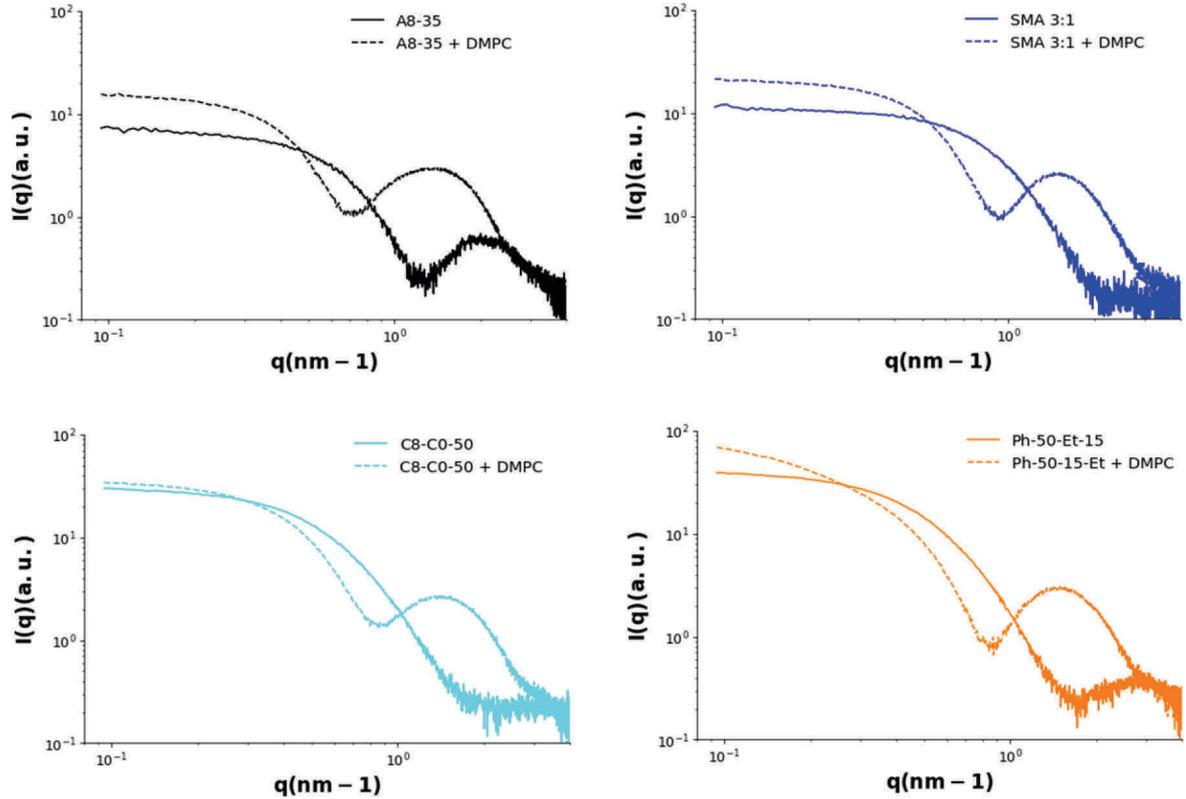


Figure 50. Courbes SAXS des particules DMPC / polymères en comparaison avec les courbes SAXS des polymères seuls en tampon 20 mM phosphate de sodium, 100 mM NaCl, pH 7,0. Dans le cas des polymères seuls, la concentration est de 10 g/L. Pour les complexes DMPC / polymères, les concentrations respectives utilisées sont de 8 g/L et 10 g/L, ces échantillons ont été analysés après 24 h d'incubation à température ambiante.

Pour l'ensemble des profils SAXS, l'ajout de DMPC induit une augmentation plus ou moins importante de l'intensité diffusée qui, extrapolée à angle nul, peut informer sur la masse molaire des particules (*cf. Tableau 18*). En présence de DMPC, certaines $P(r)$ montrent la présence d'interactions répulsives significatives pour plus de la moitié des polymères étudiés. L'ajout de lipides permet, dans certains cas présentés, de structurer davantage les particules, comme pour le Ph-50 ou le C₆-C₀-50. Cette structuration des complexes polymères / lipides en solution corrobore les observations faites par SEC dans le paragraphe précédent.

Amphipol	$I_0 \alpha$ MM	R_G (nm)	D_{max} (nm)	Répulsion	Amphipol	$I_0 \alpha$ MM	R_G (nm)	D_{max} (nm)	Répulsion
A8-35	7,03	2,52	6	non	A8-35 + DMPC	16,15	3,90	> 10	oui
A8-50	79,57	10,60	35	non	A8-50 + DMPC	70	11,40	61	non
SMA (2:1)	6,4	1,90	6	non	SMA (2:1) + DMPC	24	4,30	> 12	oui
SMA (3:1)	11,2	1,88	6	non	SMA (3:1) + DMPC	21,77	3,06	> 8	oui
C ₆ -C ₀ -50	11,64	3,50	9	non	C ₆ -C ₀ -50 + DMPC	41,2	6,54	19	non
C ₆ -C ₁ -50	14,6	2,43	8	non	C ₆ -C ₁ -50 + DMPC	25,88	3,46	> 10	oui
C ₇ -C ₀ -50	16,9	2,72	8	non	C ₇ -C ₀ -50 + DMPC	29,83	3,96	> 10	oui
C ₆ -C ₂ -50	43,8	4,25	14,0	non	C ₆ -C ₂ -50 + DMPC	46,3	5,24	20,0	non
C ₈ -C ₀ -50	30,1	3,12	10,0	non	C ₈ -C ₀ -50 + DMPC	35,5	3,96	11,0	non
Ph-50	9,3	2,47	12,0	non	Ph-50 + DMPC	39,8	4,58	> 12,5	oui
Ph-50- ^{4-Me}	10,2	2,07	6,0	non	Ph-50- ^{4-Me} + DMPC	34,8	3,88	> 10	oui
Ph-50- ^{4-Et}	17,0	2,22	7,0	non	Ph-50- ^{4-Et} + DMPC	34,0	3,34	> 9	oui
Ph-50- ^{4-Et} -15	39,8	3,58	12,0	non	Ph-50- ^{4-Et} -15 + DMPC	77,6	7,13	35,0	non
Bn-50	9,5	2,46	7,0	non	Bn-50 + DMPC	39,2	5,22	15,0	non
St-50	12,7	2,33	8,0	non	St-50 + DMPC	29,8	3,76	17	non

Tableau 18. Données SAXS reportant les rayons de giration, diamètres maximum et I_0 par particule. Le tableau de gauche présente les résultats obtenus pour les particules formées par les polymères seuls en solution. Le tableau de droite expose les valeurs obtenues pour les complexes DMPC / polymères formés après solubilisation.

Dans le cadre de cette étude SAXS, les analyses ont été faites en batch c'est-à-dire hors colonne, mais une étude plus approfondie pourrait être réalisée en purifiant les complexes polymères / lipides par SEC afin d'éliminer les agrégats présents dans certains cas. Il serait également pertinent de mesurer expérimentalement ou de calculer théoriquement (Durchschlag and Zipper, 1994) les volumes partiels spécifiques des polymères ainsi que ceux des mélanges polymère / DMPC afin d'en extraire de l'intensité I_0 les masses molaires des particules. A l'aide des facteurs de forme $I(q)$, il serait également possible de déduire des formes de particules et des modèles *ab-initio* basse résolution pour chaque particule (Brady et al., 2019). Néanmoins, ces modèles présentent certaines limites, notamment dans le cas où la densité des objets considérés est inhomogène, comme c'est le cas pour les complexes amphiphiles étudiés ici. D'autres modèles, numériques cette fois, existent et peuvent être plus adaptés pour ce type de particules (Bhadani et al., 2016).

3.1.2.4 Caractérisation des complexes PMs / lipides / polymères

Les complexes BR / lipides / polymères obtenus après solubilisation de la membrane pourpre fusionnée avec les liposomes de DMPC ont été étudiés par différentes techniques. Leur taille et leur homogénéité ont été caractérisés par SEC, par DLS et par microscopie électronique. Les complexes YidC-GFP / lipides / polymères ont uniquement été analysés par SEC.

Les profils SEC des complexes BR / lipides / polymères et les données extraites de ces profils sont présentés dans la figure 51 et le tableau 19, respectivement. Les complexes formés

à partir de quatre polymères ont été injectés sur la colonne de gel filtration, à savoir le SMA (3:1), l'ArylAPol Ph-50-^{4Et}-15, et les CyclAPols C₆-C₂-50 et C₈-C₀-50.

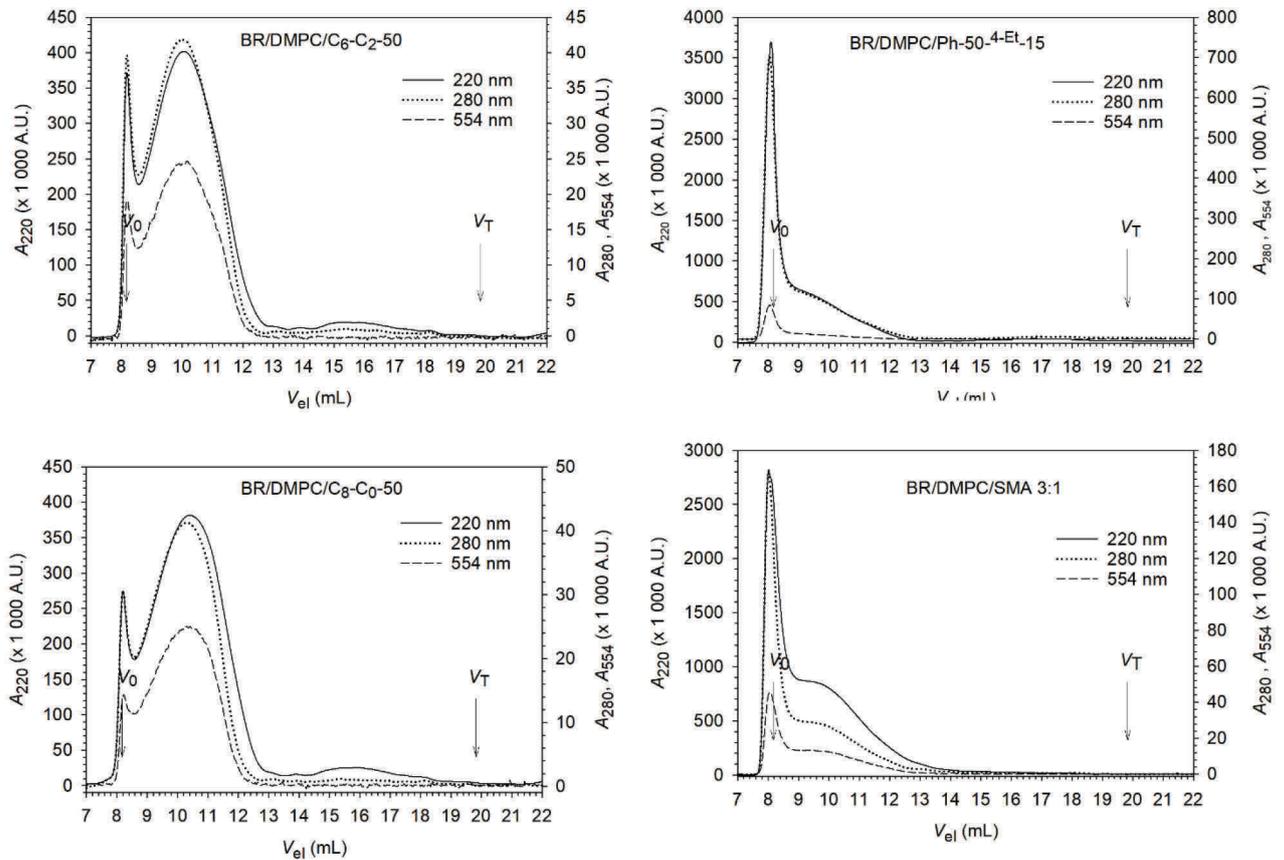


Figure 51. Profils SEC à 220, 280 et 554 nm des particules BR / lipides / polymères réalisés après solubilisation, de 24 heures à température ambiante à l’abri de la lumière dans du tampon 20 mM phosphate de sodium, 100 mM NaCl, pH 7,0, puis d’ultracentrifugation de 200 000 xg pendant 20 min. Le ratio BR / polymère utilisé est de 1 pour 6,25.

Amphipol	Volume d'éluion (mL)	Aire du pic majoritaire (%)	Largeur à mi-hauteur (mL)	Rayon hydrodynamique (nm)	Agrégats (volume mort)
C ₆ -C ₂ -50	10,1	82	2,9	6,3	oui
C ₈ -C ₀ -50	10,4	83	3,0	6,1	oui
Ph-50- ^{4Et} -15	8,1	96	-	Agrégats	oui
	9,5	4	-	Agrégats	oui
SMA (3:1)	8,0	48	-	Agrégats	oui
	9,4	52	-		

Tableau 19. Tableau récapitulatif des données extraites des SEC à 220 nm de particules BR / lipides / polymères.

Le Ph-50-^{4Et}-15 et le SMA (3:1) forment des agrégats de grande taille éluant dans le volume mort de la colonne, suivi d’un épaulement dont le maximum élué à environ 10 mL. Les deux CyclAPols testés, le C₈-C₀-50 et le C₆-C₂-50, présentent également une fraction de complexes

dans le volume mort, mais les intensités relatives de ces complexes de grande taille et du pic d'éluion de la BR à 10 mL indiquent que les agrégats sont beaucoup moins nombreux. Ainsi les complexes formés avec le C₈-C₀-50 et le C₆-C₂-50 sont plus homogènes et de plus petite taille que ceux formés avec le SMA (3:1).

Les complexes BR / lipides / polymères ont été analysés par DLS et les résultats ont été reportés dans le tableau 20. Les méthodes des cumulants et de double exponentiel décrites dans le paragraphe précédent ont également été appliquées ici.

APols	R cumul. (nm)	R dbl exp. (nm) / proportions (%)	
A8-35	101	N/A	
A8-50	60	47 / 76	432 / 24
SMA (2:1)	90	N/A	
SMA (3:1)	107	25 / 30	273 / 70
C₆-C₂-50	38	20 / 57	181 / 43
C₈-C₀-50	31	7 / 38	109 / 62
Ph-50	88	N/A	

Tableau 20. Rayons, déterminés par DLS, obtenus par deux traitements différents, la méthode des cumulants (R cumul.) et la méthode du double exponentiel (R dbl exp.) des particules formées après 25 heures de solubilisation. *N/A* : non applicable.

Comme pour ce qui est de leurs propriétés de solubilisation et de stabilisation des PMs, les CyclAPols C₈-C₀-50 et le C₆-C₂-50, ont une nouvelle fois des comportements très proches, en formant des particules de tailles proches. En exploitant les résultats obtenus par la méthode des cumulants, les trois polymères de référence (A8-35, SMA (2:1) et SMA (3:1)) présentent des rayons assez similaires d'une centaine de nanomètres.

Les complexes YidC-GFP / lipides / polymères ont fait l'objet d'une caractérisation par SEC. Grâce à la fusion de YidC avec la GFP, les échantillons obtenus après solubilisation des membranes d'*E. coli* ont été injectés sur une colonne de gel filtration connectée à un détecteur de fluorescence, permettant d'enregistrer le profil d'éluion de la protéine d'intérêt sans purification préalable de l'échantillon. Certains profils sont présentés en figure 52, l'ensemble des résultats est consigné dans le tableau 21.

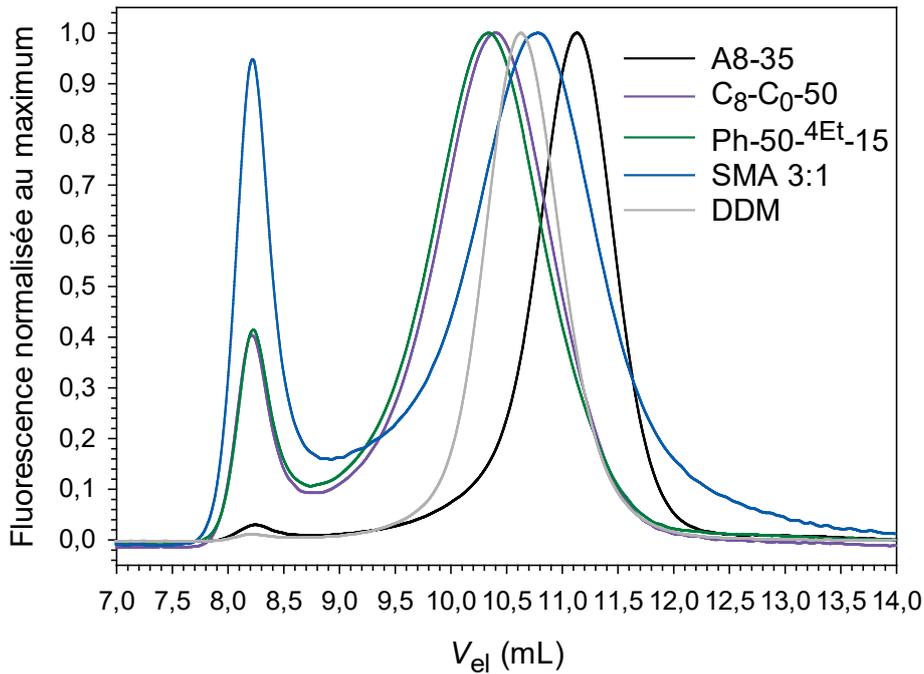


Figure 52. Profils d'éluion des complexes YidC-GFP / polymères normalisés sur la hauteur des pics réalisé après solubilisation, d'une heure à 4 °C dans du tampon 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8,0, puis d'ultracentrifugation de 100 000 xg pendant 30 min. Le ratio BR / polymère utilisé est de 1 pour 12,25.

Amphipol	Volume d'éluion (mL)	Aire du pic (%)	Largeur à mi-hauteur (mL)	Rayon hydrodynamique (nm)	Agrégats (volume mort)
DDM	10,6	99,5	0,8	6,0	non
A8-35	11,1	99	0,8	5,6	non
A8-50	10,0	92	1,5	6,4	oui
SMA 2:1	10,8	89	1,2	5,8	oui
SMA 3:1	10,8	76	1,3	5,8	oui
C ₈ -C ₂ -50	10,0	90	1,4	6,4	oui
C ₈ -C ₀ -50	10,4	88	1,2	6,1	oui
Ph-50	10,7	89	1,2	6,0	oui
Ph-50- ⁴ Et ^h -15	10,4	88	1,2	6,2	oui

Tableau 21. Tableau récapitulatif des données de fluorescence extraites des SEC (excitation à 488 nm et émission à 512 nm) de particules YidC-GFP / polymères.

D'après la largeur des pics à mi-hauteur, la protéine YidC-GFP extraite des membranes d'*E. coli* par l'A8-35 forme des complexes aussi homogènes que ceux obtenus en présence de DDM. De plus, il y a très peu d'agrégats (1 %) dans le volume mort. En revanche, la position du pic est décalée vers les grands volumes, indiquant des complexes plus petits. Toutefois, cette observation est à prendre avec précaution car des interactions électrostatiques des complexes YidC / A8-35 avec la résine ne sont pas exclues, décalant leur taille apparente. Par comparaison, le SMA (3:1) forme des complexes de tailles plus hétérogènes (la largeur du pic à mi-hauteur a

augmenté de 60 %) et près d'un quart de la protéine d'intérêt élue dans le volume mort de la colonne. Pour l'ensemble des nouveaux polymères, les largeurs des pic à mi-hauteur sont très semblables à celles obtenues avec les SMAs avec toutefois, deux fois moins de complexes présents sous forme d'agrégats. De façon générale, les APols testés présentent tous des profils dont les largeurs à mi-hauteur sont supérieures à celles observées pour le DDM et l'A8-35 indiquant une moins bonne homogénéité des particules formées.

3.1.3 Discussion

L'objectif de la première partie de mon travail de thèse a été de caractériser les différences entre le polymère amphiphile historique du laboratoire, l'APol A8-35, et des polymères développés plus récemment par d'autres laboratoires, les SMAs, notamment au niveau de leur capacité à solubiliser les membranes et à stabiliser les PMs. Dans le cadre de ce travail, nous avons développé de nouveaux polymères amphiphiles chargés qui se distinguent essentiellement au niveau de la structure de leur groupe hydrophobe et leur taux de greffage. En les comparant avec les deux polymères de référence précédemment cités, à savoir l'A8-35 et les SMAs, nous voulions tenter d'identifier les motifs chimiques pouvant être à l'origine des différences entre ces deux polymères. Pour entreprendre cette étude, des membranes synthétiques et biologiques ont été testées.

Dans la littérature, il avait déjà été reporté que l'A8-35 pouvait extraire le transporteur du maltose et le récepteur de l'insuline des membranes d'*E. coli* et de CHO respectivement (Popot et al., 2003). Par ailleurs, l'A8-35 pouvait solubiliser les liposomes (Vial et al., 2005). Ces observations ont toutefois été assez peu reprises en biochimie, à l'inverse des SMAs qui ont été particulièrement caractérisés pour leur pouvoir solubilisant (Knowles et al., 2009). La comparaison entre l'A8-35 et les SMAs réalisée au cours de ce travail a permis de montrer pour la première fois des comportements très similaires en terme de capacité à solubiliser les liposomes de DMPC ou encore les membranes d'*E. coli* surexprimant la protéine YidC. En revanche, leur capacité à solubiliser la membrane pourpre fusionnée à la DMPC s'est révélée être très différente. L'A8-35 présente des taux d'extraction de la BR sous sa forme native quasi nuls, tandis que le SMA (3:1) en extrait, en moyenne, plus de 40 %.

La solubilisation de cette membrane par les SMAs est toutefois assez variable d'une expérience à l'autre. Cette variabilité pourrait s'expliquer par le fait que l'étape de solubilisation a été réalisée à température ambiante, laquelle est proche de la température de transition de

phase de la DMPC (23°C). En effet, d'après des expériences de turbidité reportées dans la littérature, la cinétique de solubilisation des liposomes de DMPC par les SMAs est sensible à la température. La solubilisation des liposomes de DMPC se produit beaucoup plus rapidement lorsque la température de l'expérience est supérieure à celle du T_m et plus lente lorsque les lipides sont en phase gel (Scheidelaar et al., 2015). L'hypothèse proposée est la présence de défauts de surface lorsque la bicouche lipidique est sous sa forme liquide-cristalline permettant une meilleure insertion du polymère dans le cœur hydrophobe de la bicouche. Il n'est pas exclu qu'un autre facteur puisse intervenir, comme par exemple un effet de la température sur la solubilité du polymère lui-même qui modifierait ses propriétés de solubilisation. Pour tester l'impact de la température d'incubation sur la reproductibilité des taux de BR extraite par les SMAs, il serait intéressant de répéter ces expériences à température contrôlée de façon à être systématiquement au-dessus du T_m car, d'après les cinétiques de solubilisation réalisées par DLS à 25°C, la solubilisation la plus rapide et complète est celle observée avec le SMA (3:1).

Si les taux d'extraction de la BR par les SMAs peuvent être importants, il est à rappeler que ces polymères ne sont pas capables de solubiliser la membrane pourpre native. L'ajout de DMPC permettrait en quelque sorte de « diluer » la BR qui, initialement dans sa membrane, est particulièrement concentrée et forme un réseau cristallin bidimensionnel. La DMPC rendrait la membrane plus fluide et permettrait aux polymères de s'insérer plus aisément dans la membrane pour en extraire la BR. L'ajout de lipides pour améliorer les propriétés de solubilisation des SMAs a également été reporté pour d'autres types de membranes spécialisées, comme la membrane photosynthétique de *Rhodobacter sphaeroides* naturellement riche en centre réactionnel et antennes collectrices de lumière (Swainsbury et al., 2017). De plus, la présence de répulsions électrostatiques moins fortes dans le cas de la membrane pourpre fusionnée à la DMPC joue peut-être également un rôle en favorisant les interactions des polymères avec la membrane.

Pour expliquer les différences d'extraction de la BR observées entre SMAs et A8-35, des expériences complémentaires ont été réalisées récemment par Adèle Micouin, stagiaire au sein de notre unité, sous la direction de Manuela Zoonens. Les expériences ont été menées sur des membranes d'*E. coli* surexprimant la BR d'une autre archae halophile, *Haloquadratum walsbyi*, qui possède un peu plus de 50 % d'identité de séquence avec la BR d'*Halobacterium salinarum* présentée dans ce travail. Les résultats de ces expériences apportent deux informations. D'une part, ils convergent avec ceux décrits dans la littérature, à savoir l'amélioration du taux d'extraction de la BR par les SMAs à partir de la membrane d'*E. coli* fusionnée à la DMPC (Broecker et al., 2017) d'autre part, ils confirment l'incapacité de l'A8-35 à solubiliser la

protéine en présence ou en absence de lipides exogènes. La DMPC semble donc jouer un rôle important sur l'efficacité des SMAs à solubiliser la BR à partir de membranes naturellement pauvres en lipides à tête phosphocholine comme la membrane pourpre et la membrane d'*E. coli*. Pour évaluer l'impact de la DMPC, il serait intéressant de répéter ces expériences avec un échantillon de membrane fusionnée avec des lipides possédant une tête polaire de différente nature. Par ailleurs, dans les mêmes conditions, les membranes d'*E. coli* surexprimant YidC-GFP sont solubilisées de façon identique par les SMAs et l'A8-35. Cette observation semble donc indiquer que la nature de la protéine à extraire a davantage d'impact sur la solubilisation que la composition lipidique. Il est en effet connu que les PMs n'ont pas toutes la même facilité à être extraite d'une membrane. C'est sur cette propriété que de nombreux protocoles de solubilisation différentielle ont été établis. Des expériences supplémentaires réalisées par Adèle Micouin ont également confirmé le pouvoir solubilisant des SMAs par rapport à l'A8-35 sur d'autres types de membranes telles que les membranes riches en récepteur de l'acétylcholine nicotinique purifiées à partir de l'organe électrique de *Torpedo marmorata*.

L'ensemble des expériences de solubilisation réalisées sur ces différentes membranes biologiques a confirmé le caractère plus général des SMAs à solubiliser les membranes que l'A8-35.

Actuellement, nous ne disposons pas suffisamment d'éléments pour proposer un modèle mécanistique décrivant la façon dont les SMAs et l'A8-35 interagissent avec les membranes. Bien qu'il y ait dans la littérature de nombreuses études décrivant les interactions entre les groupes styrène des SMAs et les lipides (Jamshad et al., 2015) ou encore des simulations réalisées en dynamique moléculaire (Orekhov et al., 2019; Xue et al., 2018), très peu d'informations sont connues concernant l'association de l'A8-35 avec des lipides. Si l'A8-35, greffé à 25 % de chaînes octyles et 40 % de groupes isopropyles, s'auto-associe pour former des particules bien définies de 40 kDa, les SMAs, greffé à 60 % de groupes styrène, s'auto-assemblent mal à cause du manque d'hydrophobie et probablement aussi de la rigidité de leurs cycles aromatiques. Ce n'est qu'en présence de lipides que les différences de comportement en solution entre les deux polymères s'atténuent. En effet, les particules mixtes SMAs / lipides sont plus structurées et l'homogénéité des particules formées par les SMAs en association avec les lipides est bien meilleure que celle observée avec les polymères seuls. Cette observation semble indiquer que les groupes styrène des SMAs sont plus exposés à la solution et pourraient donc, lorsqu'ils sont en contact avec une membrane, s'y insérer plus facilement que les chaînes

hydrophobes de l'A8-35 confinées dans le cœur hydrophobe des particules qu'il forme. Cette hypothèse pourrait aussi expliquer pourquoi l'A8-50, un polymère greffé avec deux fois plus de chaînes octyle que l'A8-35, est totalement inefficace à solubiliser des liposomes de DMPC. Augmenter l'hydrophobie d'un polymère en augmentant le taux de greffage de ses chaînes hydrophobes ne conduit pas nécessairement à un tensioactif plus efficace en terme de solubilisation. A titre d'exemple, nous pouvons citer des travaux menés sur des polymères amphiphiles cationiques dont les activités antimicrobienne et hémolytique dépendent d'un complexe équilibre entre hydrophobie et hydrophilie (Kuroda et al., 2009). D'autre part, nous pouvons aussi évoquer l'influence de la microstructure des polymères sur leur comportement. En effet, des travaux antérieurs ont également reporté l'impact de cette propriété sur l'activité antimicrobienne et, par conséquent, la capacité de différents polymères amphiphiles à interagir avec une membrane (He et al., 2012).

Pour tenter de discriminer ces différents paramètres, nous avons conçus de nouveaux polymères. Deux séries de polymères porteurs, d'une part, de chaînes cycliques saturées, appelés CyclAPols, et, d'autre part, de chaînes cycliques insaturées, appelés ArylAPols, ont été synthétisés à partir du même précurseur que l'A8-35. L'impact des groupes hydrophobes cycliques, greffés à 25 % ou 50 %, a été évalué en comparant la capacité de ces nouveaux APols à solubiliser les membranes par rapport aux polymères de référence présentant les mêmes taux de charges et de chaînes hydrophobes linéaires, *i.e.* l'A8-75 et l'A8-50, respectivement. Les comparaisons ont également été faites avec l'APol standard A8-35, et les SMAs (2:1) et (3:1). Il est à noter que le SMA (2:1) possède les mêmes taux de charges et de cycles hydrophobes que les polymères greffés à 50 %. Néanmoins, il faut tenir compte du fait que les groupes carboxyliques des SMAs présentent deux pKa, l'un proche de 6 et le second à 8,6 (Dörr et al., 2016). Ceci implique qu'à pH = 8, 20 % des monomères maléiques sont chargés 2 fois et 80 % sont chargés 1 seule fois.

Les résultats des expériences de solubilisation ont indiqué que tous les polymères greffés à 25 % étaient peu efficaces. Ce n'est qu'avec les polymères greffés à 50 % d'hydrophobes que des effets significatifs sur leur capacité à solubiliser les membranes ont été observés. D'autre part, les CyclAPols se sont révélés être beaucoup plus efficaces pour extraire la BR de la membrane pourpre fusionnée à la DMPC que les ArylAPols. Cette observation indique qu'à taux de greffage comparable, il est plus avantageux d'avoir des cycles saturés plutôt qu'insaturés. Cela présente l'avantage supplémentaire que ces polymères n'absorbent pas dans

l'UV. La comparaison entre ArylAPols et SMA indique, à l'instar des polymères amphiphiles avec des propriétés antimicrobiennes (He et al., 2012), que la microstructure du polymère a une influence.

Parmi l'ensemble des CyclAPols synthétisés, le C₈-C₀-50 et le C₆-C₂-50 présentent les efficacités de solubilisation les plus importantes. Leur efficacité de solubilisation est supérieure à celles de l'A8-50 et l'A8-35 quel que soient les membranes testées, qu'elles soient artificielles ou biologiques. Les expériences menées sur les membranes artificielles ont révélé que le C₈-C₀-50 était capable de solubiliser en moins d'une minute les liposomes de DMPC alors que l'A8-50 ne présentait pas d'effet solubilisant significatif après 5 minutes. Les cinétiques de solubilisation d'*E. coli* avec le C₈-C₀-50 et le C₆-C₂-50 sont également plus rapides que celles observées avec l'A8-35 ou encore le SMA (3:1). De plus, à faibles concentrations, ils présentent de meilleures efficacités de solubilisation que les polymères de référence, dont le SMA (3:1). Dans le cadre des expériences menées sur la membrane pourpre fusionnée à la DMPC, ils font également partie des meilleurs candidats et extraient plus du double de BR native par rapport à l'A8-50 et au SMA, (3:1), le plus efficace. Les observations faites concernant la solubilisation, démontrent l'importance de la nature du groupement hydrophobe. On observe une quasi linéarité entre le nombre de carbones constituant le groupe hydrophobe et le taux de BR extraite. En effet, la présence d'un cycle en C₈ (ou C₆ avec 2 carbones en bras espaceur) confère au polymère une efficacité de solubilisation plus importante qu'un cycle en C₇ (ou C₆ avec 1 carbone en bras espaceur), qui lui-même confère une meilleure efficacité de solubilisation au polymère qu'un cycle en C₆. D'autre part, la présence d'un cycle en C₈ (ou C₆ avec 2 carbones en bras espaceur) à la place d'une chaîne linéaire à 8 carbones, confère au polymère des propriétés solubilisantes nettement plus importantes. Ainsi un nombre de 8 carbones composant la partie hydrophobe mais aussi la géométrie de leur agencement sous forme cyclique a permis de générer deux polymères efficaces en terme de solubilisation. Ce résultat plutôt inattendu suggère que la rigidité et/ou le volume d'occupation d'une chaîne hydrophobe joue un rôle important dans le processus de solubilisation. On peut imaginer qu'en s'insérant dans le feuillet externe de la membrane, les cycles vont augmenter la surface d'un des deux feuillets provoquant des tensions, qui, en se relaxant, favoriseraient la fragmentation de la membrane.

Néanmoins, les expériences de solubilisation réalisées par DLS sur des liposomes de DMPC montrent que le système est complexe. En effet, les polymères les plus efficaces à solubiliser les liposomes de DMPC sont, d'après des dosages pH-métrique en solution aqueuse en présence de DMPC, les moins hydrophobes tandis que les polymères les plus efficaces à solubiliser la

membrane pourpre fusionnée à la DMPC ne suivent pas l'ordre de classement selon l'hydrophobie. Il est primordial de garder à l'esprit la complexité des phénomènes de solubilisation lorsqu'il s'agit de polymères amphiphiles car de nombreux facteurs entrent en considération. Les connaissances sur les mécanismes de solubilisation des membranes en présence de détergents sont utiles mais pas suffisantes pour comprendre les mécanismes moléculaires avec les polymères. En effet, pour qu'un détergent solubilise une membrane, il faut généralement travailler à une concentration supérieure à sa CMC, tandis que pour un polymère comme l'A8-35, même à une concentration très supérieure à sa concentration d'agrégation critique, la solubilisation d'une membrane ne se produit pas nécessairement. Un facteur cinétique est à prendre en considération. Dans un premier temps, le polymère doit interagir et se lier à la membrane. Cette étape dépend bien entendu de la concentration du polymère, mais elle est modulée par des interactions électrostatiques entre polymères et également entre le polymère et la membrane. Le polymère s'insère ensuite plus profondément au sein de la membrane, avec plus ou moins de facilité en fonction de la présence de défauts de la membrane. Ces défauts sont sans doute les éléments clés permettant une solubilisation plus ou moins efficace. La formation de pores mais aussi l'extraction de lipides par protrusion peuvent alors se produire. Enfin, la solubilisation totale de la membrane mène à la formation d'objets comportant des lipides et des polymères. La forme discoïdale ou globulaire de ces objets dépend très vraisemblablement des ratios polymères / lipides. Ce mécanisme de solubilisation, principalement décrit dans le cas des SMAs, peut être étendu à l'ensemble des polymères amphiphiles mais chaque étape du mécanisme peut être limitante selon la nature du polymère.

Des expériences de QCM-d (microbalance à quartz avec contrôle de la dissipation) ont été réalisées sur des liposomes de DMPC et la membrane pourpre fusionnée à la DMPC. Cette approche permet de visualiser les phénomènes d'adsorption des polymères à la surface de la membrane. Les résultats ont révélé que la masse de polymère adsorbée sur la membrane était très faible, mais n'ont pas permis de pousser très loin l'interprétation des interactions entre polymères et membranes à cause, d'une part, de problèmes de reproductibilité des expériences et, d'autre part, de phénomène de désorption de la membrane par les polymères dès lors que la solubilisation se produisait.

En plus de leur importante propriété de solubilisation, les CyclAPols C₈-C₀-50 et C₆-C₂-50 possèdent des propriétés stabilisantes qui représentent un atout supplémentaire. En effet, la quasi-totalité de la BR, extraite par ces deux polymères de la membrane pourpre fusionnée à la

DMPC, est maintenue sous sa forme native après 6 heures d'incubation à 50 °C tandis que le SMA (3:1) en perd près de la totalité. Il est possible d'envisager que ces deux CyclAPols et les SMAs ne forment pas des particules identiques. Il serait intéressant d'analyser plus précisément, après purification, la composition lipidique de ces assemblages, notamment par chromatographie sur couche mince et / ou par spectrométrie de masse comme cela a été fait pour d'autres PMs (Schmidt and Sturgis, 2018). En revanche, en comparaison avec l'A8-50, la capacité de stabilisation des CyclAPols est du même ordre. La présence d'un cycle saturé dans la partie hydrophobe semble avoir davantage d'impact vis-à-vis de la solubilisation des membranes que de la stabilisation des PMs. Cette analyse nécessiterait tout de même d'être étendue à l'étude de la stabilité d'autres PMs pour avoir le recul suffisant.

3.1.4 Conclusion

Cette partie de mon travail doctoral a permis l'élaboration de nouvelles structures de polymères dérivées de l'A8-35 pour l'étude des PMs. Une vingtaine de polymères a été synthétisée dans le cadre du projet CyclAPols / ArylAPols. Beaucoup d'entre eux ont été caractérisés par des approches biochimiques et biophysiques pour étudier leur comportement vis à vis des membranes. L'ensemble des expériences réalisées a permis de faire ressortir deux CyclAPols, le C₆-C₂-50 et le C₈-C₀-50, particulièrement efficaces tant en terme de solubilisation des membranes biologiques qu'en terme de capacité à stabiliser les PMs étudiées. En comparaison avec l'A8-35, qui est l'amphipol le plus utilisé et le mieux caractérisé, le C₆-C₂-50 et le C₈-C₀-50 élargissent le panel de membranes à solubiliser en s'affranchissant, dans le cas de certaines membranes, d'une étape préalable et nécessaire de solubilisation par des détergents. Par rapport aux SMAs, ces nouveaux CyclAPols améliorent dans certains cas l'efficacité de solubilisation des membranes et permettent une stabilisation bien plus efficace des protéines cibles.

3.2 CHAPITRE 2 : développement de nouveaux amphipols neutres porteurs de groupements poly(oxy-éthynélique) : PEGAPols

3.2.1 Vers un nouveau design de polymères amphiphiles neutres

3.2.1.1 Choix de la composition chimique du nouvel amphipol neutre

Comme décrit en introduction, les APols neutres (NAPols) possèdent de nombreux avantages par rapport aux APols chargés telle que leur insensibilité au pH ainsi qu'à la présence de cations divalents. Ceci les rend compatibles avec les techniques qui nécessitent de travailler à un pH inférieur à 7,0 comme la RMN des solutions (Bazzacco et al., 2012), mais aussi l'électrophorèse bidimensionnelle où la migration des PMs dans la première direction se fait en fonction de leur point isoélectrique (Bazzacco, 2009). Leur tolérance à la présence de cations divalents élargit l'utilisation des NAPols à l'étude des PMs dont l'activité dépend de la présence d'ions Ca^{2+} . Il a également été observé que certaines applications telles que la synthèse acellulaire de PMs est possible en présence de NAPols alors qu'elle est inhibée en présence d'A8-35 (Park et al., 2011). Par ailleurs, les NAPols permettent de s'affranchir des problèmes d'interactions non spécifiques dans les expériences de liaison de ligands comme cela a été observé dans le cas de la liaison de la protéine G au récepteur à la ghréline GHS-R1a et l'activation de celui-ci par l'arrestine (Logez et al., 2016; Rahmeh et al., 2012). Enfin, la stabilité des PMs est renforcée en NAPols en comparaison avec l'A8-35.

Cependant, contrairement à l'A8-35, les NAPols sont peu compatibles avec la technique de spectrométrie de masse en condition native (Watkinson et al., 2015). Ceci peut être dû à la présence des groupes sucre qui, à l'instar des détergents à tête sucre comme le DDM, nécessite plus d'énergie d'activation pour désorber le tensioactif, altérant ainsi la conformation native des PMs dans la phase gazeuse (Konijnenberg et al., 2014; Reading et al., 2015). Un des objectifs a été de synthétiser un APol neutre PEGylé (PEGAPol) dont les propriétés physicochimiques et biochimiques soient au moins aussi intéressantes que celles des NAPols déjà existants et dont la synthèse soit simplifiée, moins coûteuse et transposable à grande échelle. Ce polymère devra également être un polymère de petite taille ($\text{DP}_n \sim 40$), flexible, soluble en milieu aqueux jusqu'à 10 % (100 g/L) et former, seul ou en association avec des PMs, des objets nanométriques (environ 3 nm de rayon pour des particules de polymères seuls) et homogènes.

Les parties hydrosolubles des NAPols développés jusqu'à présent, sont essentiellement des unités pyranose (du galactose et du glucose) (Bazzacco et al., 2012; Prata et al., 2000), mais les difficultés inhérentes à leur manipulation en synthèse ont conduit à trouver un groupement hydrosoluble alternatif. La structure de ce dernier découle d'une analogie aux détergents neutres classiques. Les têtes polaires les plus fréquemment rencontrées, sont des têtes dérivées de sucres (cf. intro) ou des têtes de type polyoxyéthyléniques. Dans ce dernier cas, les détergents sont des monoéthers d'alkyle de formule générale C_nE_m où n représente le nombre de carbones de la

chaîne alkyle et m le nombre d'unités éthylène glycol constituant la tête polaire. Les plus connus sont l'octaéthylène glycol monoéther de dodécyle ($C_{12}E_8$), le pentaéthylène glycol monoéther de décyle ($C_{10}E_5$), ou encore le tétraéthylène glycol monoéther d'octyle (C_8E_4). Ces détergents, développés par Rosenbush et collègues dans les années 80, ont largement été utilisés en cristallisation des porines.

La substitution d'un groupement polaire cyclique (sucre) par un autre groupement polaire linéaire de type poly(éthylène glycol) (PEG) laisse intuitivement envisager un gain considérable de flexibilité des parties polaires de l'APol (Pertici and Pieters, 2012). Cette flexibilité pourrait représenter un atout dans le cadre de certaines applications telles que la cristallisation des complexes PM/APol. Bien qu'une étude bibliographique ait reporté que le détergent le plus utilisé en cristallographie des PMs soit le DDM (Dilworth et al., 2018), il n'est pas impossible que dans le cas des APols, ce constat soit différent. Il est en effet reconnu que les PMs cristallisent via des contacts protéine/protéine mais aussi parfois via des contacts détergent/détergent au niveau de leur tête polaire (Nollert, 2005). Un plus grand degré de liberté au niveau des têtes PEG permettrait donc un meilleur arrangement de la couche d'APol lors de l'étape de cristallogénèse des complexes PM/APol. Par ailleurs, d'après la littérature, un gain de flexibilité au niveau des têtes polaires serait à l'origine d'une meilleure stabilisation des PMs (Tonnis et al., 2015), mais cela reste néanmoins à être vérifié.

3.2.1.2 *Choix d'une microstructure pour le nouvel amphipol neutre*

La répartition des têtes polaires hydrophiles de type PEG et des chaînes octyles hydrophobes le long de la chaîne macromoléculaire du polymère définit le type de microstructure. Deux principaux modes de distribution ont été retenus, celui caractérisant des structures aléatoires où les PEG et les octyles sont distribués indépendamment les uns par rapport aux autres le long de la chaîne macromoléculaire ; et le second caractérisant des structures de type polysavon où les parties polaires et apolaires sont solidaires et localisées en un même point de la chaîne macromoléculaire (*cf. Figure 53*).

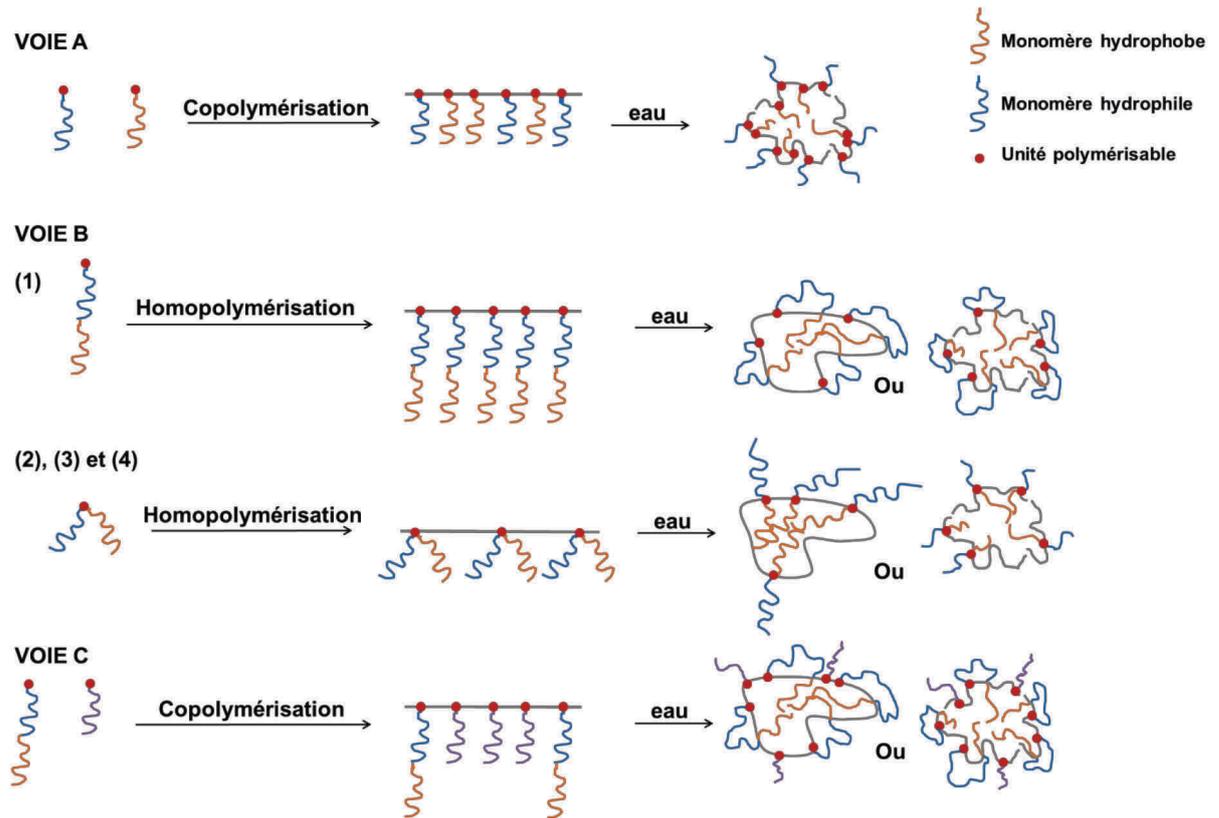


Figure 53. Hypothèses sur les comportements possibles des polymères en solution aqueuse en fonction de leur microstructure.

Par structure de type polysavon, est entendu une structure de type polydétergent sans pour autant chercher à qualifier ses propriétés physicochimiques qui peuvent justement ne pas correspondre à celle d'un polysavon (cet aspect est exposé de façon plus détaillée dans la partie discussion). A chaque type de microstructure peut correspondre des propriétés physicochimiques bien définies et très différentes. Toutefois, il est à noter que l'A8-35 est caractérisé par une distribution aléatoire des greffons alors que les NAPols présentent une structure type polysavon sans pour autant que leurs comportements en phase aqueuse et vis-à-vis des PMs soient très différents (Bazzacco et al., 2012; Sharma et al., 2012). L'avantage des structures de type polysavon est qu'elles résultent le plus souvent de l'homopolymérisation d'un tensioactif et leur synthèse s'en trouve extrêmement (en théorie) simplifiée car il devient possible de s'affranchir des problèmes liés à la copolymérisation (dérive de la composition en monomère due à une trop forte différence de réactivité des comonomères, perte du contrôle de la microstructure etc...). C'est cet aspect qui nous a conduits à nous intéresser en premier lieu à la synthèse de PEGAPols de type polysavon.

3.2.2 Elaboration de voies de synthèse

Différentes stratégies de synthèse permettant en théorie de conduire aux différentes structures précédemment établies ont été envisagées (cf. Figure 54).

La synthèse de PEGAPols à distribution aléatoire va consister en la copolymérisation d'un monomère hydrophobe avec un acrylate de PEG (cf. Figure 54 voie A).

Les PEGAPols de type polysavon pourront être obtenus par homopolymérisation d'un dérivé acrylique d'un tensioactif (surfmère) polyoxyéthylénique de type C_nE_m (cf. Figure 54 voie B).

En cas d'échec, *i. e.* problème d'insolubilité du PEGAPol en solution aqueuse, la copolymérisation de ce monomère amphiphile avec un monomère hydrophile neutre (acrylate de PEG, *N,N*-diméthylacrylamide...autre) pourra éventuellement conduire à une structure hybride où le surfmère serait réparti aléatoirement le long de la chaîne macromoléculaire (cf. Figure 54 voie C)

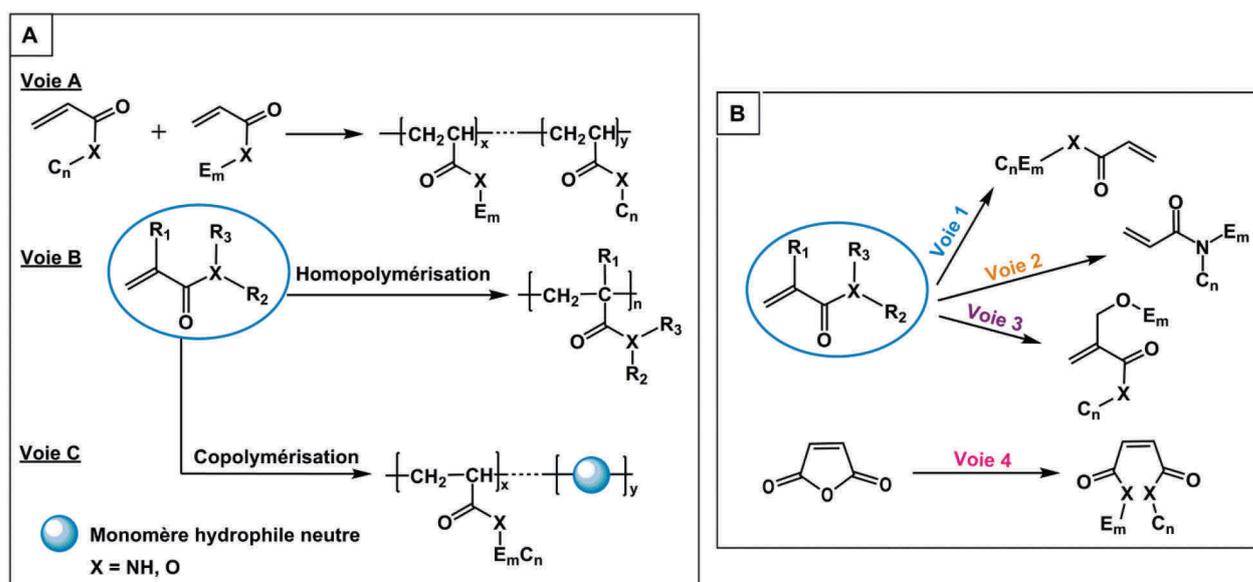


Figure 54. Différentes stratégies de synthèse envisagées pour l'obtention des PEGAPols A/ Synthèse de PEGAPols par : copolymérisation d'un monomère hydrophobe avec un monomère hydrophile (voie A), homopolymérisation d'un surfmère (voie B), copolymérisation d'un surfmère et d'un monomère hydrophile (voie C). B/ Synthèse de surfmère de type acrylique (voie 1 à 3) ou de type maléique (voie 4).

L'homopolymérisation d'un surfmère (mot anglais résultant de la contraction de « surfactant monomer » et désignant un monomère amphiphile polymérisable) dérivé de PEG (voie B) semblait être potentiellement la structure la plus intéressante car plus innovante d'un point de vue de la chimie. Ceci en se basant sur les observations suivantes :

- La voie A est très bien référencée et a été très étudiée (Hirai et al., 2016; Matsumoto et al., 2017). La suivre permettrait d'accéder rapidement à des structures intéressantes mais ces structures sont basées sur la chimie des esters (car les monomères sont commerciaux) et non des amides. Or les liaisons amides sont plus stables (et plus hydrophiles) que les liaisons esters et sont donc à privilégier dans le cadre des études biochimiques.
- La voie C est proposée en cas de problème d'hydrophilie insuffisante de l'homopolymère et/ou la nécessité d'augmenter la flexibilité la chaîne macromoléculaire du PEGAPol (introduction de séquences hydrophiles sur la chaîne macromoléculaires). Cependant, il faudra tenir compte du fait que l'intégration d'un comonomère fait intervenir la notion de distribution relative des comonomères. Si dans le cadre des études biochimiques réalisées le copolymère obtenu répond aux propriétés recherchées, il faudra caractériser cette distribution dont dépendent les propriétés du copolymère.

La synthèse du surfmère (voie B) peut elle-même être envisagée suivant 4 stratégies différentes, à savoir (*cf. Figure 54 panneau B*) :

- La conversion d'un détergent de type C_nE_m en dérivé acrylate (voie 1)
- La synthèse d'un acrylamide *N,N*-disubstitué, d'une part par une chaîne alkyle (C_n) et, d'autre part, par une tête polyoxyéthylénique (E_m) (voie 2)
- La synthèse d'un dérivé méthacrylique sur lequel il n'y a aucune continuité entre la chaîne alkyle et la tête PEG (voie 3)
- La synthèse d'un dérivé maléique où la tête PEG et la chaîne sont ici aussi séparées l'une de l'autre (voie 4).

Les voies 3 et 4 sont celles qui, *a priori*, vont permettre d'obtenir un monomère dont les différentes parties hydrophobes et hydrophiles de l'homopolymère résultant mis en solution aqueuse, vont s'organiser assez indépendamment pour former un cœur hydrophobe et une surface hydrophile respectivement. Les contraintes stériques imposées à la chaîne macromoléculaire lors de la réorganisation de l'homopolymère pourront certainement être moins importantes dans le cas de ces deux monomères que dans le cas de ceux issus des voies 1 et 2 (cette supposition restant à vérifier par des expériences de simulation en dynamique moléculaire effectuées sur le polymère en solvant). Néanmoins, la distribution hydrophobe/hydrophile des monomères issus de la voie 2 reste plus favorable que celle des

monomères issus de la voie 1 et présente des similitudes avec celle du monomère précurseur des NAPols, le THAM diglucosylé porteur d'une chaîne grasse.

La synthèse des monomères issus de la voie 1 est toutefois la plus accessible, justifiant pourquoi des essais ont été menés en suivant cette voie de synthèse. La synthèse des monomères issus des voies 3 (Morizur et al., 2007) et 4 (Klimenkovs et al., 2004; Mekki et al., 2010; Uzulina et al., 2002) sont très bien décrites mais plus complexes, c'est pourquoi elles n'ont donc pas été explorées. Rappelons aussi que les dérivés maléiques n'homopolymérisent pas, et ne peuvent être utilisés que dans le cadre de la synthèse de copolymères.

D'après nos connaissances et au moment où sont écrites ces lignes, la synthèse du monomère issu de la voie 2 n'a, à ce jour, pas encore été décrite. Les moteurs de recherche les plus performants (dont Science Finder) n'ont donné aucun résultat de structure exacte ou similaire. L'originalité de la structure visée a grandement contribué à ce que la voie 2 ait fait l'objet de la grande majorité du travail effectué.

3.2.3 Tentative de synthèse de PEGAPols

3.2.3.1 Exploration de la Voie 1

La synthèse du surfimère **1** est effectuée en mettant en réaction le C₈E₄ avec le chlorure d'acryloyle dans le toluène à température ambiante, sous atmosphère inerte, en présence de TEA (*cf.* Figure 55) comme préconisé par Noda *et al.* (Noda et al., 2000a). La polymérisation du composé obtenu est présentée en figure 56.

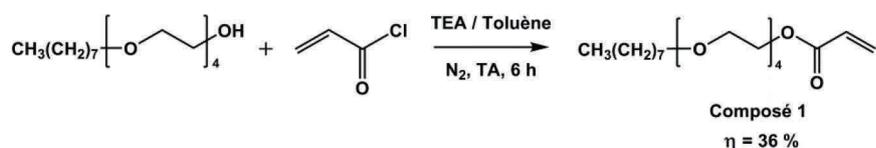


Figure 55. Réaction du C₈E₄ avec le chlorure d'acryloyle pour obtenir le monomère 1.

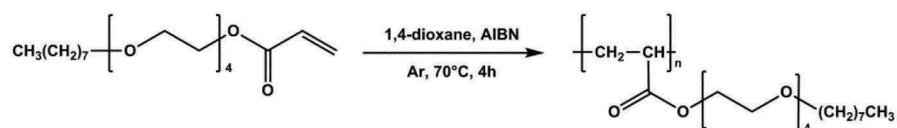


Figure 56. Polymérisation de l'acrylate de C₈E₄.

Le surfmère, obtenu avec un rendement de 36 %, est trop hydrophobe et donc insoluble dans l'eau. Une tentative d'homopolymérisation a malgré tout été réalisée qui, sans surprise, a conduit à un composé huileux également insoluble dans l'eau et les solvants polaires tels que l'éthanol ou le méthanol.

Afin de savoir s'il était vraiment possible d'obtenir un copolymère hydrosoluble de l'acrylate du C₈E₄, celui-ci a été copolymérisé dans le dioxane à 70 °C avec un monomère hydrophile neutre (*cf. Figure 57*). Le choix s'est porté sur le *N,N*-diméthylacrylamide, composé commercial, très hydrophile (LCST élevée ~100°C) connu pour copolymériser avec les acrylates de PEG pour donner des structures aléatoires (De and Sumerlin, 2013).

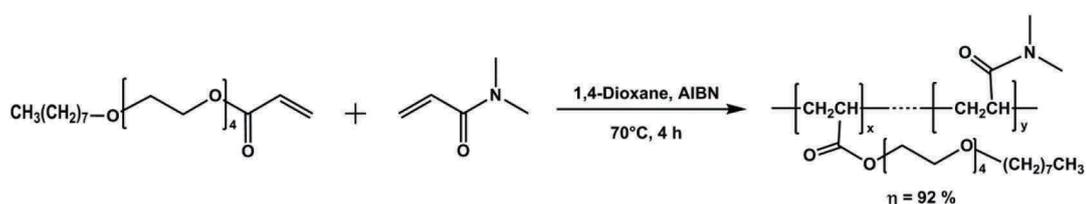


Figure 57. Copolymérisation de l'acrylate de C₈E₄ avec le *N,N*-diméthylacrylamide (avec $x = 25\%$ et $y = 75\%$).

Le copolymère, composé à 75 % de monomère hydrophile et 25 % de surfmère, a été obtenu avec un rendement de 92 % mais s'est avéré avoir une solubilité dans l'eau inférieure à 5 g/L. Ce résultat indique qu'il serait nécessaire d'utiliser un acrylate de PEG avec une partie PEG beaucoup plus longue que celle utilisée (4 unités éthylène glycol). Ceci justifie aussi pourquoi Noda *et al.* (Noda et al., 2000a) ont utilisé un acrylate de PEG comportant plus de 25 unités glycol.

Une telle longueur de PEG n'étant pas compatible avec nos applications (d'autant que pour cette longueur la dispersité devient supérieure à 1), nous avons abandonné cette première voie de synthèse et avons focalisé notre travail sur la voie 2.

4.2.4.2 Exploration de la Voie 2

Cette stratégie implique la synthèse du surfmère **6** dont la synthèse a été envisagée suivant quatre voies de synthèse différentes (*cf. Figure 58*).

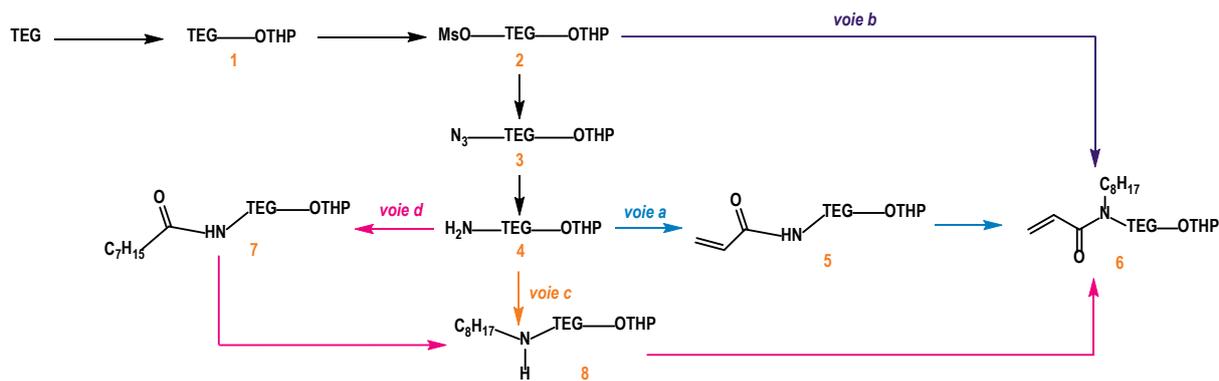


Figure 58. Différentes voies de synthèse envisagées pour l'obtention du monomère 6.

Ces différentes voies sont supposées résumer l'ensemble des principales alternatives permettant d'accéder au surfmère 6. La cohérence des différentes démarches proposées repose sur la possibilité d'obtenir un premier synthon, le composé 2, et plus spécifiquement, sur la possibilité de convertir celui-ci en un deuxième élément clé, le composé 4. Ces deux synthons devaient être obtenus après une série de transformation du tétraéthylène glycol (TEG), composé commercial peu onéreux. Chacune de ces voies de synthèse a été éprouvée et l'ensemble des résultats obtenus ont été reportés dans les paragraphes suivants.

3.2.3.1.1 Tentative de synthèse du composé 6 suivant la voie b

Une des fonctions hydroxyle du TEG est dans un premier temps protégée par un groupement 2-tétrahydropyranyle par réaction de l'alcool avec le dihydropyrane (DHP) dans le dichlorométhane à température ambiante en présence d'acide para toluène sulfonique (APTS) (*cf. Figure 59*).

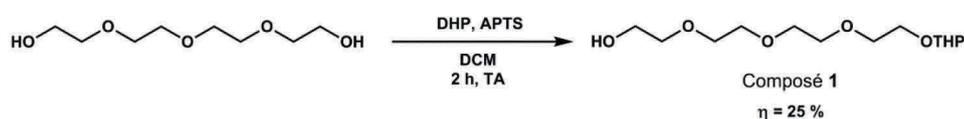


Figure 59. Synthèse du TEGOTHP (1).

Cette fonction hydroxyle ainsi protégée sous forme d'un acétal n'interviendra pas durant l'étape suivante où une seule des deux fonctions alcool réagira. La déprotection de l'alcool est effectuée par hydrolyse en milieu acide (*cf. Figure 60*).

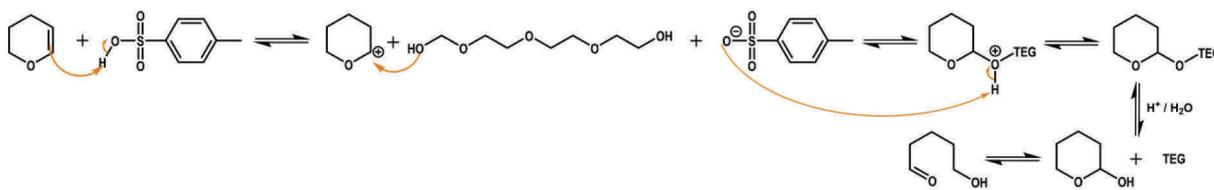


Figure 60. Mécanisme de formation et de déprotection du TEGOTHP (1).

Cette première étape est une étape limitante, en effet, le rendement de la protection du TEG par le THP ne dépasse pas 30 % malgré l'utilisation d'une méthode (Loiseau et al., 2004) en certifiant le double. D'autres décrites par les mêmes auteurs (Loiseau et al., 2004) sont connues pour être encore plus efficaces mais d'une part, tous les essais que nous avons entrepris jusqu'à présent en suivant ces protocoles se sont soldés par des échecs et, d'autre part, les méthodes décrites impliquant l'utilisation de métaux lourds (sels d'argent) ne sont peut-être pas transposables à la synthèse à grande échelle. Le principal produit secondaire de réaction est le dérivé di-OTHP (isolé et caractérisé par RMN) dont la formation en des proportions avoisinant les 30 % de conversion, témoigne de la non sélectivité de la méthode.

Cependant, la chromatographie sur gel de silice permettant de séparer très facilement le TEGOTHP du TEG de départ et du TEGdiOTHP, nous avons adopté ce protocole de synthèse en partant d'une grande quantité de TEG de départ nous permettant ainsi d'obtenir, en dépit d'un rendement médiocre, le composé **1** à l'échelle du multigramme.

Une fois obtenu, le composé **1** a été mis en réaction avec le chlorure de méthanesulfonyle dans le dichlorométhane à froid, en présence d'une base non nucléophile, la triéthylamine (TEA) (*cf.* Figure 61). Le mécanisme de cette réaction est développé en figure 62.

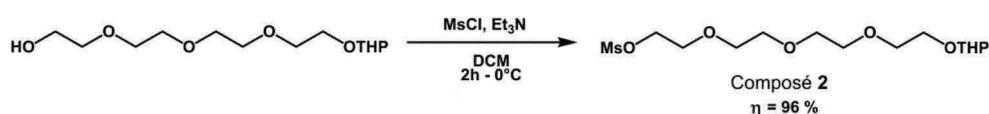


Figure 61. Synthèse du THPOTEGOMs (2).

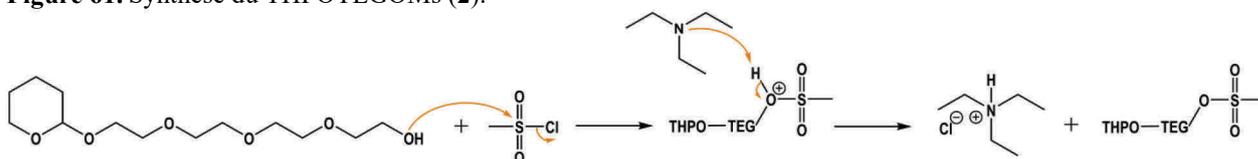


Figure 62. Mécanisme de formation du THPOTEGOMs.

Cette étape, dont le rendement est de 96 %, permet d'activer la fonction alcool qui, une fois convertie en mésylate, sera favorablement substituée par un nucléophile.

Ce nucléophile est ici l'ion amidure du *N*-octylacrylamide (produit initialement présent au laboratoire) obtenu après traitement par une base dont le pKa est supérieur à celui de l'amide (pKa~17-18). Deux tentatives ont été effectuées et se sont toutes deux soldées par un échec.

Dans la première a été utilisé le *tertio*Butylate de potassium ($pK_{a_{tBuOH}} = 20$) dans le THF (faiblement polaire) et dans la seconde l'hydrure de sodium ($pK_{a_{H_2}} = 35$), dans le DMF (polaire) (cf. Figure 63).

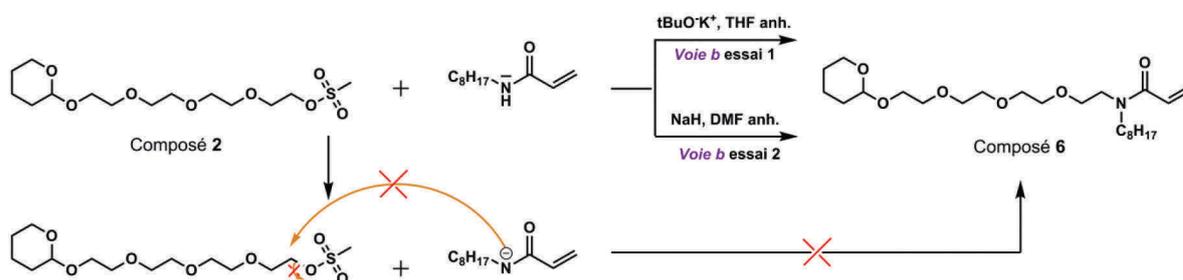


Figure 63. Substitution du MsOTEGOTHP par un amidure supposée pouvoir générer le composé 6.

Les raisons de cet échec n'ont pas été élucidées. Les deux réactifs de départ ont été, dans les deux cas, retrouvés en fin de réaction dans des quantités proches de celles initialement impliquées, ce qui traduit un manque total de réactivité. L'alkylation des amides dans les conditions où nous l'avons tentée, est pourtant connue pour conduire à des rendements acceptables lorsqu'elle n'est pas quantitative (Deguchi et al., 1999; Wei et al., 2001) (Deguchi et al., 1999) et n'est peut-être pas facilement applicable aux acrylamides (voir plus bas pour une discussion plus détaillée de cet aspect).

La voie b, qui était *a priori* la voie la plus directe permettant d'obtenir le surfmère souhaité, n'était donc pas la stratégie à suivre.

3.2.3.2 Tentative de synthèse du composé 6 suivant la voie a

Cette voie de synthèse implique de disposer du composé 4 obtenu en deux étapes. La première consiste à convertir le mésylate 2 en azoture 3. Cette opération est effectuée en suivant la procédure décrite par Harris et al. (Harris et al., 1982) consistant à faire réagir le composé 2 dans le DMF à 40 °C avec un excès d'azoture de sodium. Le composé 3 attendu a été obtenu avec un rendement de 70 % (cf. Figure 64). Le mécanisme de cette réaction est développé en figure 65.

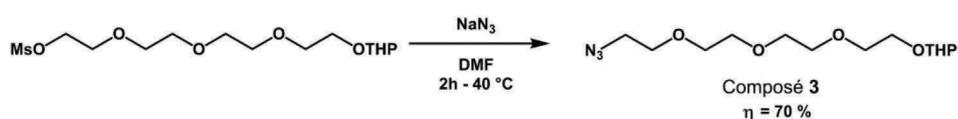


Figure 64. Synthèse du THPOTEGN₃ (3).

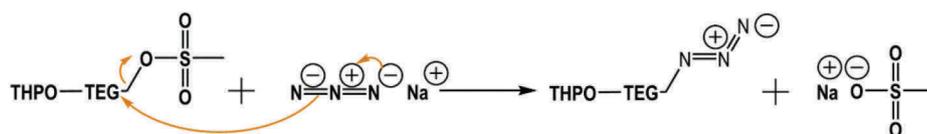


Figure 65. Mécanisme de substitution du mésylate par un azoture.

Le composé **3** est ensuite réduit par la méthode de Staudinger (Pal et al., 2004), réaction au cours de laquelle l'azoture réagit avec une phosphine pour former un iminophosphorane hydrolysé par la suite en amine primaire (cf. Figure 66). Dans le cas présent, cette réaction est réalisée avec la triphénylphosphine dans le méthanol à 80°C. Malgré un rendement quantitatif, l'inconvénient de cette technique est qu'il est particulièrement difficile d'éliminer le sous-produit de la réaction (oxyde de phosphine formé lors de la solvolyse). Le mécanisme de cette réaction est développé en figure 67.

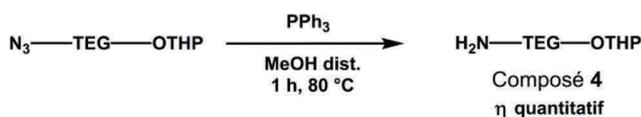


Figure 66. Synthèse du THPOTEGNH₂ (**4**).

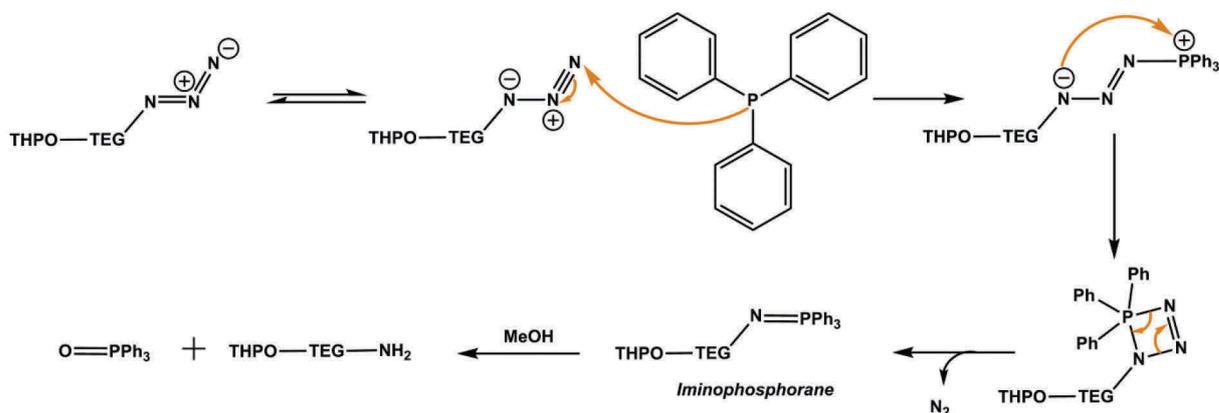


Figure 67. Mécanisme de la réaction de Staudinger et de formation du composé **4**.

L'amine **4** est ensuite mise en réaction pendant 24 heures dans l'acétonitrile avec le chlorure d'acryloyle pour former l'acrylamide **5**. Ce dernier a été obtenu avec un rendement de 49 % (cf. Figure 68).

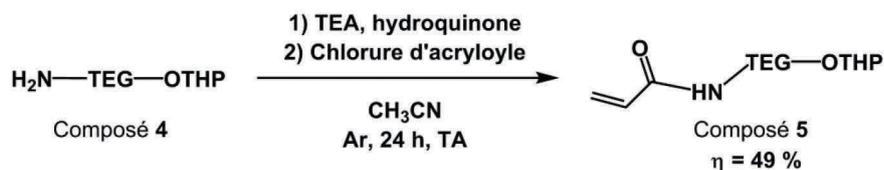


Figure 68. Synthèse du composé (**5**) par *N*-acryloylation du composé (**4**).

L'acrylamide **5** réagit avec le bromooctane en présence d'une base forte, l'hydrure de sodium, dans le DMF à 70 °C pendant 2 heures (*cf. Figure 69*).

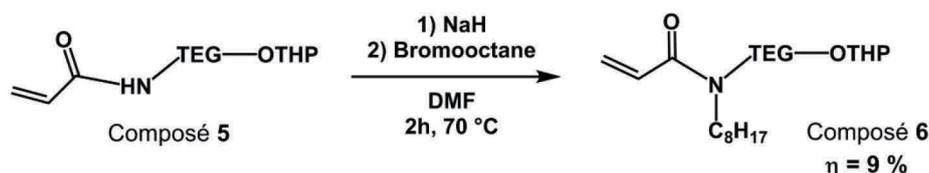


Figure 69. Synthèse du composé **6** via la voie a par *N*-alkylation.

Cette réaction de *N*-alkylation mène au composé **6** avec un faible rendement de 9 % pouvant s'expliquer finalement par des protocoles de synthèse apparemment non adaptés. Ces protocoles ont pourtant prouvé leur efficacité dans le cas, peut-être particulier, de la *N*-alkylation du THAM (Giusti et al., 2002).

Effectivement il faut croire que dans le cadre de ces travaux, la réussite de la méthode tiendrait plutôt à la structure type amide β -hydroxylé pour lequel la *N*-alkylation est grandement favorisée (Keusenkothen and Smith, 1992).

Nous avons alors procédé à une recherche bibliographique approfondie et sommes parvenus à identifier, tardivement, une méthode dédiée à la *N*-alkylation des acrylamides (Lele et al., 1999) qu'il faudra essayer d'adapter dans le cadre de travaux ultérieurs qui n'ont pas pu être abordés par manque de temps dans le contexte de cette thèse.

3.2.3.2.1 Tentative de synthèse du composé **6** suivant la voie c

Parmi les trois voies de synthèse imaginées découlant de celle du composé **4**, la voie c est celle faisant intervenir le moins d'étapes (*cf. Figure 70*).

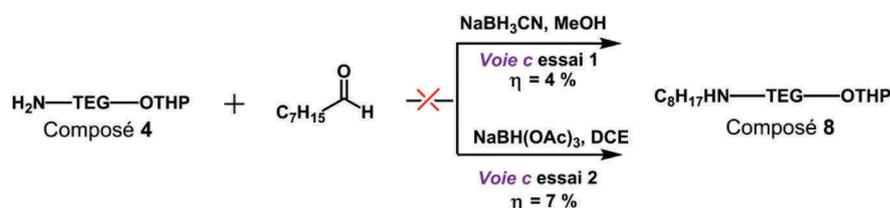


Figure 70. Synthèse du composé **8**.

Elle consiste en une amination réductive, réaction faisant intervenir une amine, le composé **4**, un composé carbonylé, l'octanal, et un agent réducteur, le cyanoborohydrure de sodium ou le triacétoxyborohydrure de sodium (Abdelmagid et al., 1996) dans notre cas (*cf. Figure 71*).

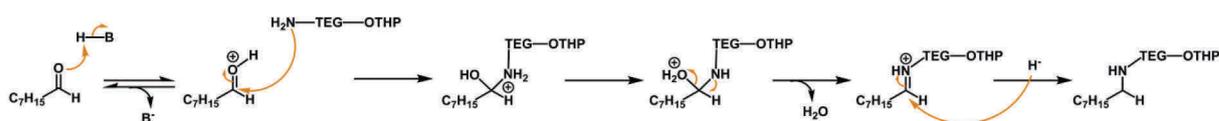


Figure 71. Mécanisme de l'amination réductive permettant l'obtention du composé **8**.

Le composé **8** est obtenu avec des rendements très faibles, de 4 à 7 % suivant la méthode de synthèse utilisée, c'est pourquoi cette voie a été abandonnée.

3.2.3.2.2 Tentative de synthèse du composé 6 suivant la voie d

Dans le cadre de la voie d, seule la réaction de formation de l'amide a été réalisée. Celle-ci mène au composé **7** avec un rendement de 19 % (cf. Figure 72).

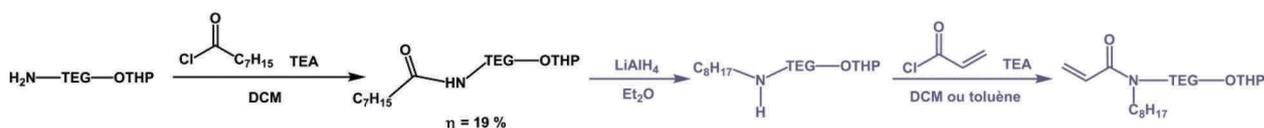


Figure 72. Description des étapes de synthèse de la voie d devant conduire au composé **8**.

La réduction de l'amide en amine par LiAlH_4 et la *N*-acryloylation, restent à tester.

En conclusion, la voie a est la seule ayant permis l'obtention du monomère protégé, le composé **6**. Pour cela, l'amine **4** réagit avec le chlorure d'acryloyle en présence de TEA, cette *N*-acryloylation conduit au composé **5** avec un rendement d'environ 50 %. Enfin, ce dernier subit une *N*-alkylation pour obtenir le composé **6** final. Le rendement de cette dernière étape est très limité (inférieur à 10 %) et des essais d'optimisation seront à réaliser. Le rendement global des six étapes menant jusqu'au monomère (voie a) est de 1 %.

3.2.3.3 Tentative de polymérisation du surfmère 6

L'homopolymérisation du surfmère **6** devait nous permettre d'obtenir le PEGAPol attendu et nous avons à ce niveau aussi certaines attentes, à savoir disposer d'une méthode de polymérisation permettant le contrôle de la taille et de la dispersité en taille des chaînes macromoléculaires.

Cette homopolymérisation a donc été effectuée par polymérisation radicalaire contrôlée (CRP) de type RAFT (Réversible Addition-Fragmentation Chain Transfer) (Chiefari et al.,

1998). Le choix de l'utilisation de cette méthode plutôt qu'une autre se justifie par le fait que parmi les méthodes de CRP connues à l'heure actuelle, la RAFT est celle de demeurant la mieux adaptée à la polymérisation de monomères de type acrylamide (Moad et al., 2012; Tominey et al., 2010), et la plus simple à mettre en œuvre.

La cinétique de la RAFT suit celle de la polymérisation classique conventionnelle et le principe du contrôle repose dans ce cas sur la présence dans le milieu réactionnel d'un agent de transfert s'échangeant réversiblement entre les différentes chaînes macromoléculaires en croissance (*cf. Figure 73*).

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Figure 73. CRP effectuée par RAFT d'un monomère M initiée par l'amorceur (Ini)₂ en présence de l'agent de transfert TA-Y. Rapide interconversion de deux différentes espèces se propageant par transfert de chaîne réversible de Y. L'échange peut intervenir à chaque étape de la polymérisation, limitant ainsi l'occurrence (flèche en pointillé) des réactions de terminaison. Parce que cet échange est thermodynamiquement neutre ($\Delta G^\circ \sim 0$), il a été qualifié de "dégénératif" (Greszta et al., 1994). k_p , k_{te} , k_{act} , et k_{deact} sont respectivement les constantes cinétiques des vitesses de, propagation, terminaison, activation, and désactivation. K_{ex} est la constante d'équilibre de l'échange.

Il en résulte la génération de chaînes macromoléculaires homogènes en taille (caractérisée généralement par une dispersité $D \sim 1,1-1,3$), cette taille augmentant linéairement avec le degré de conversion du monomère suivant la relation (1) :

$$\langle X_n \rangle = \frac{[M]_0}{[TA-Y]_0} \cdot \alpha \quad (1)$$

Avec $\langle X_n \rangle$ le degré de polymérisation, $[M]_0$ la concentration initiale en monomère, $[TA-Y]_0$ la concentration initiale en agent de transfert et α le degré de conversion.

Ce phénomène étant la signature caractéristique d'un processus contrôlé (Chiefari et al., 1998).

Bien que ne disposant que de peu de monomère de départ, un essai de polymérisation sur environ 80,0 mg de composé **6** a néanmoins pu être réalisé. Cet essai a été effectué, en présence d'AIBN comme amorceur et de cyanométhyl dodecyl trithiocarbonate en tant qu'agent de transfert dans le DMF (Rieger et al., 2010) avec un rapport initial $[M]_0/[TA-Y]_0 = 50,4$. Afin de contrôler l'avancement de la réaction, deux prélèvements du milieu réactionnel ont été réalisés

à des temps distincts de réaction. Le premier a été effectué après 4 h 30 de réaction et la composition du milieu prélevé a été analysée par RMN ^1H .

La comparaison des intégrations des signaux des protons acryliques (signaux à 5,41, 6,04 et 6,38 ppm) du monomère avec celle du signal à 4,38 ppm du proton acétalique du THP ou des 6 protons du trioxane (référence interne initialement introduit dans le milieu réactionnel à une concentration connue) permettent d'en déduire facilement un taux de conversion avec deux valeurs sensiblement différentes, soit respectivement 79 % et 69 % (cf. Figure 74).

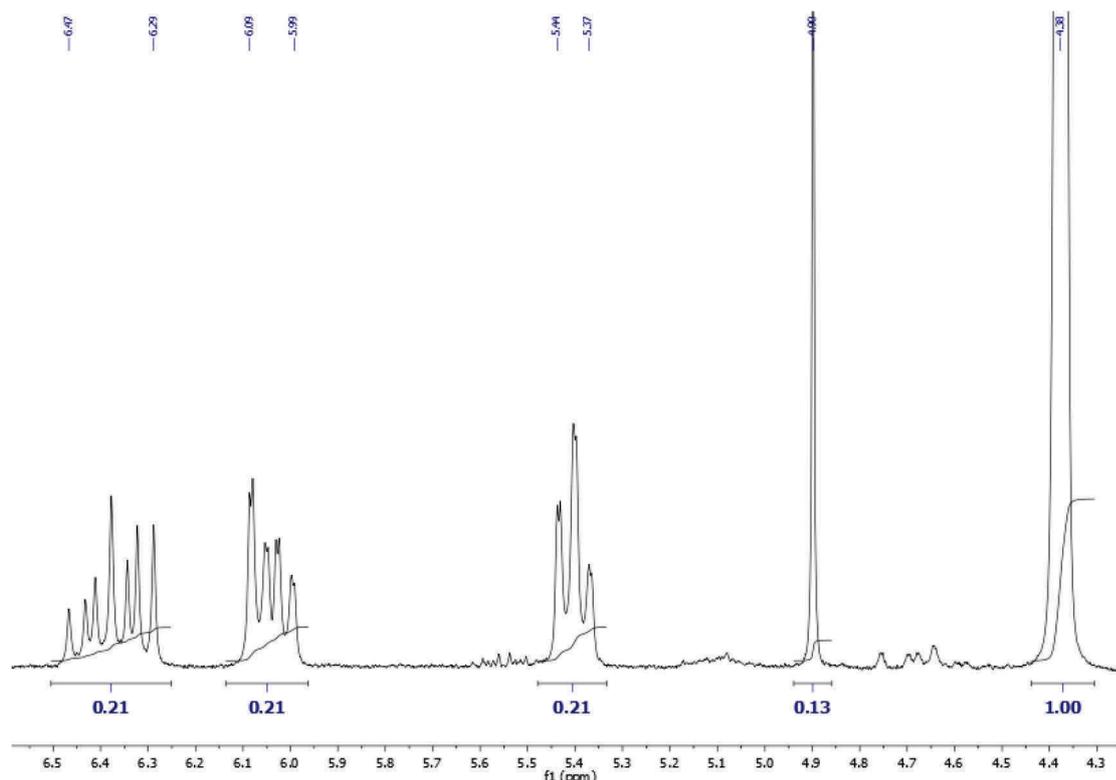


Figure 74. Spectre ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) du brut réactionnel du monomère **6** après 4 h 30 de réaction. Les intégrations ont été normalisées sur le signal du proton acétalique du THP à 4,38 ppm. Le rapport des aires des signaux des protons acryliques (signaux à 5,41, 6,04 et 6,38 ppm) à celle du proton acétal du THP donne la fraction molaire (21 %) de monomères n'ayant pas réagi. Les aires des signaux acryliques sont aussi comparées à celle des signaux des 6 protons méthyléniques du trioxane (pris comme référence interne) à 4,9 ppm pour obtenir une fraction molaire en monomère de 31 %.

L'écart trouvé entre les deux mesures peut s'expliquer par des différences de phasage et de dérive de ligne de base sur le spectre ou autre fait expérimental que nous n'avons pas identifié. Nous avons déduit un taux de conversion moyen de 74 ± 5 %.

Le second prélèvement a été effectué après un temps de réaction de 5 h 30 et l'analyse ^1H RMN de l'échantillon n'a pas montré d'évolution significative du milieu réactionnel nous a conduit à considérer que le taux de conversion à t_∞ est $\alpha_\infty \sim 74 \pm 5$ %.

Enfin, les expériences de SEC (*cf. Figure 75*) effectuées, en collaboration avec Jutta Rieger, avec le polymère ont permis de caractériser des masses moléculaires moyenne en nombre et en poids très différentes ($M_n = 36\,560$ g/mol et $M_w = 139\,306$ g/mol) de celles attendues (M_n attendue = $[M]_0/[TA-Y]_0 \cdot \alpha_{\infty} \cdot M_M = 16\,546$ g/mol, avec M_M , la masse molaire du monomère) et une dispersité en taille ($M_w/M_n = 3,810$) nettement supérieure à celle attendue, montrant ainsi le caractère non contrôlé de la réaction de polymérisation en dépit de la présence de l'agent RAFT dans le milieu réactionnel.

Disposer de plus de monomère de départ nous aurait permis d'effectuer une vraie cinétique produisant suffisamment de données pour pouvoir établir et connaître l'allure de la courbe reliant la masse molaire du polymère au degré de conversion du monomère afin de confirmer le caractère non contrôlé de la polymérisation. Nous n'avons pas cherché d'explication à cet échec et avons préféré attendre de pouvoir reproduire au moins deux fois la même expérience sur des quantités 10 fois plus importantes avant d'établir une quelconque hypothèse et de tester des nouvelles conditions de polymérisation en changeant le solvant ou encore l'agent RAFT.

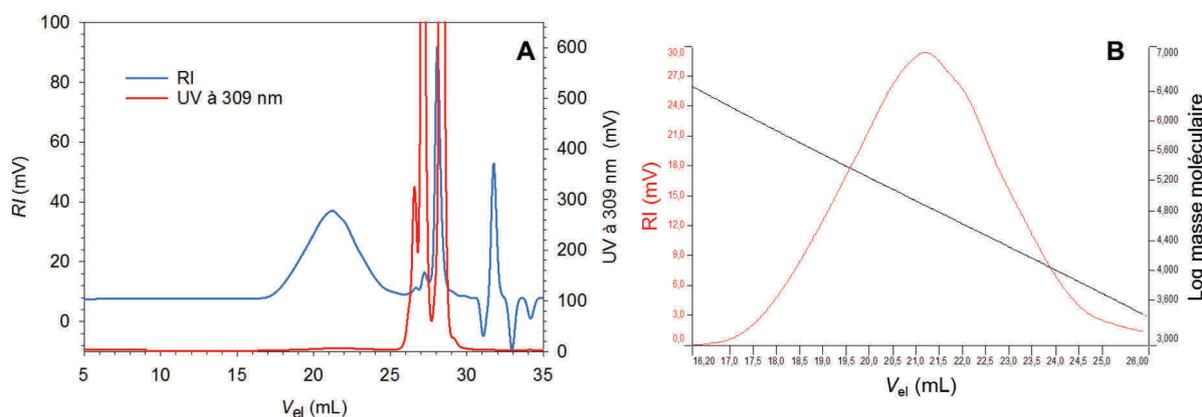


Figure 75. Profils SEC obtenus après injection du polymère obtenu à partir du monomère **6** dans le THF. A/Profil SEC global avec visualisation de la double détection UV/RI. B/ zoom du pic caractéristique du polymère en détection RI et visualisation de la droite $\text{Log}M_w = f(V_e)$. Le pic à 22 mL atteste que le polymère a été formé. Néanmoins, la largeur à mi-hauteur importante indique une population de polymères hétérogènes en taille. La polymérisation, bien qu'ayant eue lieu, n'a pas été contrôlée.

Les quantités de polymère obtenues ayant été jugées trop faibles, aucune tentative de purification n'a été réalisée. De même, il aurait été intéressant d'essayer d'obtenir la forme déprotégée du polymère en le soumettant à un traitement permettant d'hydrolyser les groupements THP protégeant les extrémités hydroxyle des PEGs afin de pouvoir tester la solubilité du polymère dans l'eau.

3.2.1 Discussion

Si le laboratoire doit sa renommée au développement de l'A8-35 et de ses nombreuses applications, il a connu aussi un certain succès, dans le cadre d'un partenariat impliquant un laboratoire de chimie de la faculté des Sciences d'Avignon, avec le développement des NAPols (Bazzacco et al., 2009, 2012; Sharma et al., 2012). Ces amphipols neutres dérivant du tris ont pu représenter une solide et très utile alternative aux amphipols chargés lorsque justement la nature polyelectrolyte de ces derniers rendait leur utilisation difficile ou inadaptée lorsque l'expérience envisagée requérait l'absence d'espèce chargée.

Suite aux différents fructueux résultats obtenus avec les NAPols, les deux laboratoires (Avignon et Paris) ont dû rapidement trouver une solution pour répondre efficacement à une demande particulièrement croissante en NAPols en s'impliquant dans une tentative de synthèse à grande échelle en vue d'une commercialisation. Ces expériences de synthèse à grande échelle ont été l'occasion de comprendre quels pouvaient être les aspects limitants (coût et haute toxicité des catalyseurs soumis à contraintes législatives), dans ce contexte, de la chimie des sucres, et éventuellement de pouvoir proposer une solution alternative permettant de contourner les différents problèmes posés par cette chimie.

Dans l'objectif de disposer d'un nouvel amphipol neutre susceptible de présenter des propriétés physico-chimiques et biochimiques équivalentes ou supérieures à celles des NAPols de dernière génération, un travail considérable de développement a été entrepris. La première étape a consisté à identifier quels pouvaient être les groupements de substitution qui remplaceraient les unités glucose du NAPol. En se basant sur la biochimie des détergents dérivés du poly(éthylène glycol) (PEG), il a été choisi d'utiliser la chimie des PEGs en comprenant que le passage de deux unités glucose à deux unités PEGs pouvait avoir des conséquences (bonnes ou mauvaises). Car la solution la plus immédiate semblait effectivement consister à synthétiser un nouveau monomère dérivant du THAM doté d'une chaîne grasse undécyle et de deux groupements PEG en lieu et place des deux unités glucose initiales. Cependant, des travaux antérieurs (non publiés) du même type ayant été entrepris par les partenaires du laboratoire d'Avignon et s'étant révélés particulièrement infructueux, il a été choisi de se focaliser sur le développement de structures différentes mais restant basées sur la chimie des PEGs.

Ne pouvant pas conserver la structure du monomère, il a été au moins tenté de concevoir un polymère construit sur le même modèle que les NAPols dérivés du THAM, c'est à dire un homopolymère généré par la polymérisation d'un tensioactif polymérisable ou surfmère. Ceci ne garantissant pas que le l'homopolymère attendu présente finalement les mêmes propriétés que le NAPol modèle mais restant une démarche cohérente. La structure particulière de ces homopolymères a été apparentée à un polymère type polysavon dans le but de bien la différencier avec celle d'un polymère à distribution aléatoire n'incorporant pas de monomère amphiphile et sans *a priori* sur les propriétés en solution du polymère. En effet, un polysavon est caractérisé par la présence obligatoire de groupements amphiphiles sur la chaîne macromoléculaire (mais aussi hydrophiles) et par l'aptitude à former des associations intramacromoléculaire dans l'eau, ces associations intra étant compromises dès lors que le pourcentage de comonomère hydrophile est devenu trop important (Borisov and Halperin, 1995, 1998). D'autre part, il est à rappeler que les NAPols ne se comportent pas eux-même comme des polysavons (Sharma et al., 2012). Ceci ayant été établi, la toute première difficulté a été de concevoir une structure simplifiée du monomère amphiphile en s'assurant de son hydrosolubilité.

En raison de ses propriétés et de son utilisation très répandue dans le domaine de la biochimie des PMs, le développement s'est porté sur un surfmère dérivant du détergent C₈E₄. A cette fin, différents types de stratégie pour introduire l'unité polymérisable ont été envisagés. Rapidement, l'influence que pouvait avoir le type de modification sur l'hydrosolubilité du monomère a été comprise, l'acrylate du C₈E₄ s'étant révélé insoluble dans l'eau. Ceci était peut-être prédictible. D'une part les copolymères amphiphiles dérivant des acrylates des détergents poly(oxyéthylénique) reportés dans la littérature présentent tous des motifs PEGs beaucoup plus longs (Noda et al., 2000a, 2000b) et, d'autre part, il existe une façon d'avoir une idée approximative de l'hydrosolubilité (non pas absolue mais relative) d'un composé, par la valeur de son coefficient de répartition entre une phase huile (*n*-octanol) et l'eau, le $\log p$. Cette valeur est négative lorsque le composé étudié est typiquement hydrophile. Elle est normalement déterminée expérimentalement mais pour les petites molécules de nombreux logiciels permettent de la calculer avec pour certains une bonne fiabilité (Anderson et al., 2017). De même que certains logiciels (Chemosophia par exemple) donnent des valeurs de l'hydrosolubilité absolue. Mais quelle que soit l'accessibilité de ces logiciels et leur facilité d'utilisation, l'interprétation de leur résultat réclame prudence et expertise.

Toutefois sur la base du calcul de $\log p$ de différents surfimères susceptibles de remplacer le THAMdiGluC₁₁, le monomère **6** reste notre proposition la plus cohérente (*cf. Figure 76*). L'introduction d'un amide plutôt qu'un ester renforce le caractère hydrophile du monomère ainsi que, comme les travaux de certains auteurs l'on déjà montré (Morishima et al., 1995; Noda and Morishima, 1999; Yamamoto et al., 2000), celui du polymère.

Enfin, la répartition des motifs hydrophobes et hydrophiles sur le monomère **6** est supposée être la plus proche de celle du THAMdiGluC₁₁. Ceci dans l'espoir que les contraintes imposées à la chaîne macromoléculaire de l'homopolymère hydraté puissent être (à défaut d'être similaires) du même type et générer des propriétés comparables à celles du NAPol de référence. A ce niveau, pour répondre à toute question, il devenait indispensable de disposer de compétences et d'outils spécifiques à la modélisation moléculaire indisponibles au laboratoire. Par outils sont compris les méthodes, l'équipement et l'expertise permettant d'optimiser et surtout interpréter le comportement d'une macromolécule amphiphile dans un espace aqueux.

Le travail de synthèse engagé a été essentiellement motivé par l'aspect original de ce projet et plusieurs stratégies de synthèse pour le composé **6** présentant des synthons communs ont été proposées. La voie la plus prometteuse, bien que restant à optimiser, a été identifiée. Le tétraéthylène glycol (TEG) a été sélectivement protégé sur une seule fonction hydroxyle pour permettre dans une seconde étape d'activer la deuxième fonction hydroxyle et de la substituer dans une troisième par l'ion azoture. L'azidoTEGOTHP (**3**) obtenu a ensuite été réduit en amine (**4**) lors d'une quatrième étape puis l'amine obtenue a subi dans la cinquième étape une *N*-acroylation pour conduire à l'acrylamidoTEGOTHP (**5**). Ce dernier intermédiaire a subi une *N*-alkylation pour conduire au composé **6** attendu avec un rendement final de 1 %. Ce rendement est trop faible et lié à l'aspect limitant de deux étapes clés qui ont posé des problèmes et auxquels ce travail n'a pas permis de répondre expérimentalement à l'heure actuelle, plusieurs éléments indiquent néanmoins qu'il sera possible de les résoudre.

Le premier facteur limitant dans cette synthèse est intervenu justement lors de la première étape de la synthèse. Les rendements de monoprotection sélective du TEG par le DHP n'ont jamais dépassé 30 % alors que Loiseau *et al.* sont parvenus dans les mêmes conditions à générer le même composé avec un rendement deux fois supérieur (Loiseau et al., 2004). Il est à préciser que d'autres auteurs préconisent l'utilisation d'un excès considérable de TEG (rapport TEG/DHP 6/1) avant de parvenir à des résultats comparables (Zhang et al., 2014). De même, Székely *et al.* reportent la monoprotection du TEG avec 95 % de rendement en traitant 10

équivalents de ce composé avec un seul de chlorure de 4,4-diméthoxytrityle (Székely et al., 2014). Quelle que soit la cause de cette différence de résultats, nous savons qu'il est possible, *a priori*, de procéder à l'activation sélective d'une seule des fonctions hydroxyle suivant un protocole développé encore par Loiseau *et al.* en 2004. Cette méthode particulière implique la préparation et l'utilisation d'un sel d'argent dans la réaction de tosylation du TEG. L'argent est ici un complexant qui désactive une seule des extrémités hydroxyle et un acide de Lewis qui catalyse la réaction de tosylation. Différents essais ont été effectués au laboratoire par le passé dans le but d'éprouver cette méthode et ils se sont tous soldés par un échec. Fait intéressant, si cette méthode est encore citée en référence dans le cadre de recherches récentes elle n'a été pour autant exploitée (Wawro et al., 2016). D'autres méthodes certainement plus prometteuses qui n'ont pu être testées dans le temps imparti ou qui restent à découvrir dans la littérature, représentent certainement autant de stratégies alternatives à envisager pouvant permettre d'accéder au dérivé du TEG sélectivement monoactivé ou monoprotégé avec des rendements quantitatifs. Il est possible, à titre d'exemple, de citer les travaux de French *et al.* reportant la synthèse du TEG monotritylé en une seule étape avec 85% de rendement en présence de résine amberlyst acide (French et al., 2009).

Le deuxième aspect limitant de la stratégie développée pour la synthèse du composé **6** consiste en la difficulté avec laquelle il a été possible de procéder à la *N*-alkylation de l'acrylamide précurseur. Dans la partie résultat, il a été proposé de s'intéresser à l'avenir à la méthode développée par Lele *et al.*, 1999. Cette méthode consiste à opérer non plus en milieu basique mais en milieu acide en utilisant un sel d'aluminium (acide de Lewis) qui va activer l'halogénure d'alkyle. Cette méthode permettra peut-être d'améliorer les rendements de *N*-alkylation sous réserve que le motif TEG n'interfère pas avec l'utilisation d'un acide de Lewis.

Aussi limité fut notre rendement global, nous avons eu la satisfaction de pouvoir disposer de la quantité minimale requise en monomère **6** pour procéder à un premier essai d'homopolymérisation. Le choix de procéder par polymérisation radicalaire contrôlée (CRP) a été guidé par le fait de s'assurer du contrôle de la taille des chaînes macromoléculaires et de leur homogénéité (ou plutôt hétérogénéité restreinte) en masse ; ceci non pas parce que ces paramètres ont une véritable influence sur les propriétés biochimiques (cet aspect n'aura été que rapidement abordé dans le laboratoire et les expériences inhérentes n'auront pas permis de définitivement conclure) mais plutôt dans le but de garantir aux biologistes une certaine reproductibilité des synthèses de lot à lot. La méthode CRP de choix pour polymériser les acrylamides reste la RAFT comme cela a été précisé dans la section précédente, les deux autres

grandes techniques de CRP sont la polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP) beaucoup moins adaptée dans ce cas et nécessitant des conditions très particulières (Chmielarz et al., 2015) et la polymérisation contrôlée par les nitroxides (NMP) (Nicolas et al., 2013) qui produisent des espèces radicalaires masquées (indésirables pour le moment). Cependant, le premier essai réalisé s'est soldé par un échec et il faudra réitérer deux ou trois fois la même expérience avant de pouvoir conclure quant au bien-fondé de l'utilisation de la RAFT.

Enfin et c'est actuellement la raison essentielle justifiant des essais supplémentaires, la déprotection et les tests d'hydrosolubilité de l'homopolymère final n'ont pas été menés à leur terme et ce sont bien les résultats des futurs tests d'hydrosolubilité qui valideront ou réorienteront les travaux de synthèse effectués jusqu'ici.

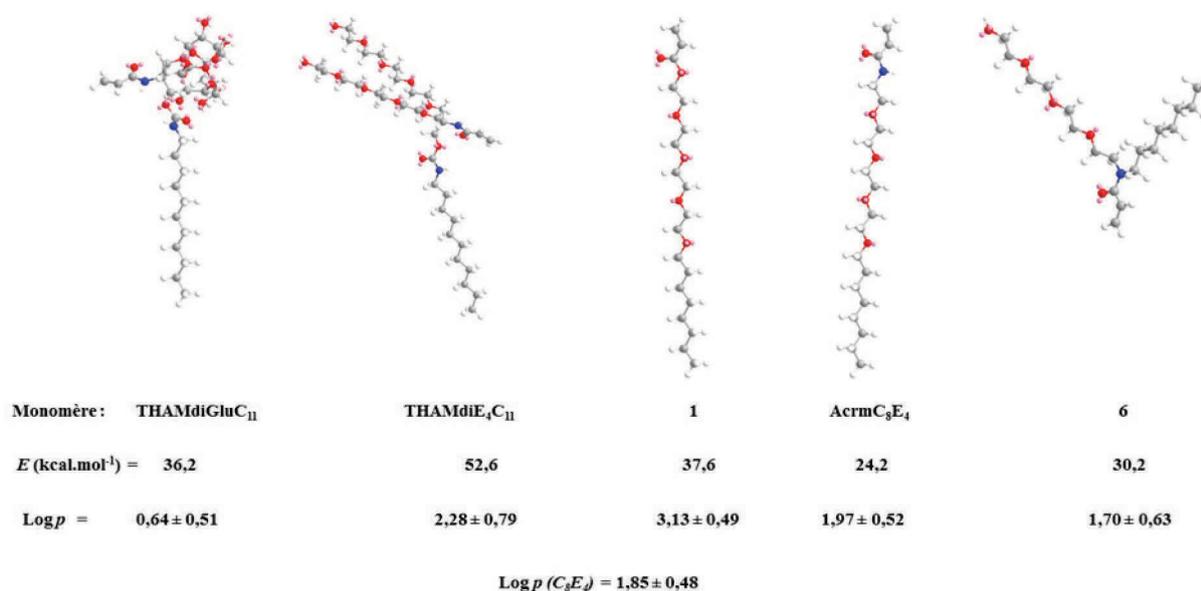


Figure 76. Comparaison des log p de différents monomères. Les structures chimiques ont été optimisées pour chacun des composés avec le logiciel Chem3D (version 16.0) en mécanique moléculaire (champs de force MM2). Les énergies de contrainte sont exprimées en kcal.mol⁻¹. Le log p de chacun des monomères a été déterminé à l'aide du logiciel Chemscketch. Des estimations complémentaires initialement programmées sur le logiciel ALOGPS (version 2.1) n'ont pu être effectuées en raison de l'inaccessibilité temporaire du site. Les monomères THAMdiE₄C₁₁ (THAM doté de deux motifs TEG et d'une chaîne en C₁₁) et AcrmC₈E₄ (acrylamide du C₈E₄) ont été inclus dans cette figure en raison des informations intéressantes qui peuvent en être déduites. Elle semble indiquer aussi que les propriétés de répartition du monomère **6** soient les plus proches de celle du détergent monomère de référence (le C₈E₄).

3.2.2 Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre, a été reporté la majeure partie d'un travail de développement dont l'objectif était d'imaginer et de synthétiser de nouvelles structures d'amphipols neutres. A l'issue de ce travail, plusieurs structures ont été imaginées et celle semblant la plus pertinente a fait l'objet d'un développement d'une synthèse multi-étapes. Cette pertinence a été déduite

d'observations simples qui n'ont pu être confrontées des schémas théoriques par manque de temps et de moyens. Cependant la cohérence de la démarche sur la base de laquelle différentes voies de synthèse susceptibles de mener au monomère ont été proposées et testées a été mise en avant. Une seule la voie (la voie a) a permis son obtention avec un rendement de 1 %. Ce rendement particulièrement faible s'explique par la présence de deux étapes limitantes que sont la protection sélective d'une des fonctions hydroxyles du TEG de départ par le tétrahydropyrane, pour laquelle le rendement ne dépasse pas 25 %, et la dernière étape qui consiste en une *N*-alkylation de l'acrylamide **5** dont le rendement est de 9 % seulement. Ce travail est une première approche permettant de s'assurer que toutes les étapes sont faisables et nécessite à présent d'être optimisé. Un essai de polymérisation a pu être effectué malgré les faibles quantités de monomère disponibles et un homopolymère a pu être obtenu, attestant de la réactivité par voie radicalaire (propriété essentielle requise) du monomère. Cependant, la polymérisation ne s'est pas effectuée suivant un processus contrôlé comme attendu, c'est pourquoi un travail important d'optimisation reste très certainement à fournir aussi à ce niveau de la synthèse.

4 CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Depuis les années 70, la biochimie des PMs a énormément progressé grâce à la compréhension, d'une part, de l'organisation des lipides et des PMs dans les membranes biologiques, et, d'autre part, des causes responsables de l'inactivation des PMs après leur extraction des membranes, conduisant au développement de tensioactifs innovants. Les détergents étaient historiquement les premiers tensioactifs utilisés pour maintenir en solution les PMs. Dans les années 90, les premiers polymères amphiphiles ont fait leur apparition dans la littérature comme alternatives aux détergents en montrant leur efficacité pour la stabilisation des PMs en solution sous forme de petits objets (Popot, 2018; Tribet et al., 1996). Pendant plus d'une douzaine d'années, les APols se sont développés mais sont restés assez peu attractifs pour les biochimistes en raison de l'image négative que renvoie l'utilisation de molécules polydisperses pouvant entraver les études structurales. De plus, les APols sont, à cette époque, considérés comme étant incapables de solubiliser directement les membranes nécessitant une étape préliminaire de solubilisation par des détergents. L'apparition des SMAs et la commercialisation de l'A8-35 en 2010 par Anatrace redonne une impulsion au développement de polymères amphiphiles et provoque un réel engouement pour ces composés. En effet, ces

nouveaux copolymères sont présentés comme pouvant solubiliser directement les membranes en extrayant des disques de lipides natifs en plus de stabiliser les PMs. Ce phénomène a d'autant plus été favorisé par le développement de nouvelles méthodes d'analyse structurale telle que la cryo-microscopie électronique. L'analyse du nombre de structures de PMs à partir de la base de données de Steve White montre l'essor de cette technique pour l'étude structurale des PMs. En effet, une nette augmentation du nombre de structures de PMs est visible depuis 2015. Par ailleurs, parmi l'ensemble de ces structures, près d'un quart d'entre elles ont été obtenues en présence d'APol (A8-35 et PMAL confondus). Le panel de polymères aujourd'hui disponible pour ce type d'application est très large et le travail réalisé durant ces trois années de thèse vient enrichir cette bibliothèque en proposant de nouveaux polymères combinant les meilleures propriétés de chacun des deux polymères les plus utilisés, l'A8-35 et les SMAs. Les nouvelles classes d'APols, CyclAPols et ArylAPols, développés dans ce travail font actuellement l'objet d'un dépôt brevet (N° EP18306606), en vue d'une potentielle commercialisation. D'autre part, le projet PEGAPol sera poursuivi et, espérons le, aboutira à l'obtention de molécules présentant des propriétés physico-chimiques et biochimiques intéressantes afin de leur permettre de suivre le même chemin que leurs analogues chargés.

5 BIBLIOGRAPHIE

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2015). *Molecular Biology of the Cell*. (New York & London: Garland Publishing, Inc.).

Althoff, T., Mills, D.J., Popot, J.-L., and Kühlbrandt, W. (2011). Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I₁III₂IV₁. *EMBO J.* *30*, 4652–4664.

Anderson, R.L., Bray, D.J., Ferrante, A.S., Noro, M.G., Stott, I.P., and Warren, P.B. (2017). Dissipative particle dynamics: Systematic parametrization using water-octanol partition coefficients. *J. Chem. Phys.* *147*, 094503.

Angius, F., Ilioaia, O., Amrani, A., Suisse, A., Rosset, L., Legrand, A., Abou-Hamdan, A., Uzan, M., Zito, F., and Miroux, B. (2018). A novel regulation mechanism of the T7 RNA polymerase based expression system improves overproduction and folding of membrane proteins. *Sci. Rep.* *8*, 8572.

Barthélémy, P., Ameduri, B., Chabaud, E., Popot, J.-L., and Pucci, B. (1999). Synthesis and Preliminary Assessments of Ethyl-Terminated Perfluoroalkyl Nonionic Surfactants Derived from Tris(hydroxymethyl)acrylamidomethane. *Org. Lett.* *1*, 1689–1692.

Barthélémy, P., Tomao, V., Selb, J., Chaudier, Y., and Pucci, B. (2002). Fluorocarbon–Hydrocarbon Nonionic Surfactants Mixtures: A Study of Their Miscibility. *Langmuir* *18*, 2557–2563.

Bayburt, T.H., and Sligar, S.G. (2010). Membrane protein assembly into Nanodiscs. *FEBS Lett.* *584*, 1721–1727.

Bayburt, T.H., Carlson, J.W., and Sligar, S.G. (1998). Reconstitution and imaging of a membrane protein in a nanometer-size phospholipid bilayer. *J. Struct. Biol.* *123*, 37–44.

Bayburt, T.H., Grinkova, Y.V., and Sligar, S.G. (2002). Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins. *Nano Lett.* *2*, 853–856.

Bazzacco, P., Sharma, K.S., Durand, G., Giusti, F., Ebel, C., Popot, J.-L., and Pucci, B. (2009). Trapping and stabilization of integral membrane proteins by hydrophobically grafted glucose-based telomers. *Biomacromolecules* *10*, 3317–3326.

Bazzacco, P., Billon-Denis, E., Sharma, K.S., Catoire, L.J., Mary, S., Le Bon, C., Point, E., Banères, J.-L., Durand, G., Zito, F., et al. (2012). Nonionic Homopolymeric Amphipols: Application to Membrane Protein Folding, Cell-Free Synthesis, and Solution Nuclear Magnetic Resonance. *Biochemistry* *51*, 1416–1430.

Bazzaco, P. (2009). Amphipols non-ioniques : nouveaux outils pour les études in vitro de protéines membranaires : Validation et développement des applications et biophysiques. Thèse. Université Paris Diderot - Paris 7.

Belrhali, H., Nollert, P., Royant, A., Menzel, C., Rosenbusch, J.P., Landau, E.M., and Pebay-Peyroula, E. (1999). Protein, lipid and water organization in bacteriorhodopsin crystals: a molecular view of the purple membrane at 1.9 Å resolution. *Structure* 7, 909–917.

Bhadani, A., Okano, T., Ogura, T., Misono, T., Sakai, K., Abe, M., and Sakai, H. (2016). Structural features and surfactant properties of core–shell type micellar aggregates formed by gemini piperidinium surfactants. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. C*, 147–155.

Borch, J., and Hamann, T. (2009). The nanodisc: a novel tool for membrane protein studies. *Biol. Chem.* 390, 805–814.

Borisov, O.V., and Halperin, A. (1995). Micelles of Polysoaps. *Langmuir* 11, 2911–2919.

Borisov, O.V., and Halperin, A. (1998). Self-assembly of polysoaps. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 3, 415–421.

Boussambe, G.N.M., Guillet, P., Mahler, F., Marconnet, A., Vargas, C., Cornut, D., Soulié, M., Ebel, C., Le Roy, A., Jawhari, A., et al. (2018). Fluorinated diglucose detergents for membrane-protein extraction. *Methods San Diego Calif* 147, 84–94.

Brady, N.G., Qian, S., and Bruce, B.D. (2019). Analysis of styrene maleic acid alternating copolymer supramolecular assemblies in solution by small angle X-ray scattering. *Eur. Polym. J.* 111, 178–184.

Breyton, C., Chabaud, E., Chaudier, Y., Pucci, B., and Popot, J.-L. (2004). Hemifluorinated surfactants: a non-dissociating environment for handling membrane proteins in aqueous solutions? *FEBS Lett.* 564, 312–318.

Breyton, C., Gabel, F., Abla, M., Pierre, Y., Lebaupain, F., Durand, G., Popot, J.-L., Ebel, C., and Pucci, B. (2009). Micellar and biochemical properties of (hemi)fluorinated surfactants are controlled by the size of the polar head. *Biophys. J.* 97, 1077–1086.

Breyton, C., Pucci, B., and Popot, J.-L. (2010). Amphipols and fluorinated surfactants: Two alternatives to detergents for studying membrane proteins in vitro. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 601, 219–245.

Broecker, J., Eger, B.T., and Ernst, O.P. (2017). Crystallography of Membrane Proteins Mediated by Polymer-Bounded Lipid Nanodiscs. *Struct. Lond. Engl.* 1993 25, 384–392.

Brown, L.S., and Ernst, O.P. (2017). Recent advances in biophysical studies of rhodopsins - Oligomerization, folding, and structure. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* 1865, 1512–1521.

Carazo, J.M., Sorzano, C.O.S., Otón, J., Marabini, R., and Vargas, J. (2015). Three-dimensional reconstruction methods in Single Particle Analysis from transmission electron microscopy data. *Arch. Biochem. Biophys.* 581, 39–48.

Catoire, L.J., Damian, M., Giusti, F., Martin, A., Heijenoort, C. van, Popot, J.-L., Guittet, É., and Banères, J.-L. (2010a). Structure of a GPCR Ligand in Its Receptor-Bound State: Leukotriene B4 Adopts a Highly Constrained Conformation When Associated to Human BLT2. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 9049–9057.

Catoire, L.J., Zoonens, M., van Heijenoort, C., Giusti, F., Guittet, É., and Popot, J.-L. (2010b). Solution NMR mapping of water-accessible residues in the transmembrane β -barrel of OmpX. *Eur. Biophys. J.* *39*, 623–630.

Chabaud, E., Barthélémy, P., Mora, N., Popot, J.L., and Pucci, B. (1998). Stabilization of integral membrane proteins in aqueous solution using fluorinated surfactants. *Biochimie* *80*, 515–530.

Chae, P.S., Rasmussen, S.G.F., Rana, R.R., Gotfryd, K., Chandra, R., Goren, M.A., Kruse, A.C., Nurva, S., Loland, C.J., Pierre, Y., et al. (2010). Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins. *Nat. Methods* *7*, 1003–1008.

Chamberlain, A.K., Lee, Y., Kim, S., and Bowie, J.U. (2004). Snorkeling Preferences Foster an Amino Acid Composition Bias in Transmembrane Helices. *J. Mol. Biol.* *339*, 471–479.

Champeil, P. (2000). Interaction of Amphipols with Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J. Biol. Chem.* *275*, 18623–18637.

Champeil, P., Guillain, F., Vénien, C., and Gingold, M.P. (1985). Interaction of magnesium and inorganic phosphate with calcium-deprived sarcoplasmic reticulum adenosinetriphosphatase as reflected by organic solvent induced perturbation. *Biochemistry* *24*, 69–81.

Chang, C., Muccio, D.D., and St. Pierre, T. (1985). Determination of the tacticity and analysis of the pH titration of poly(acrylic acid) by proton and carbon-13 NMR. *Macromolecules* *18*, 2154–2157.

Charvolin, D., Perez, J.-B., Rouviere, F., Giusti, F., Bazzacco, P., Abdine, A., Rappaport, F., Martinez, K.L., and Popot, J.-L. (2009). The use of amphipols as universal molecular adapters to immobilize membrane proteins onto solid supports. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 405–410.

Chaudier, Y., Zito, F., Barthélémy, P., Stroebel, D., Améduri, B., Popot, J.-L., and Pucci, B. (2002). Synthesis and preliminary biochemical assessment of ethyl-terminated perfluoroalkylamine oxide surfactants. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *12*, 1587–1590.

Chiefari, J., Chong, Y.K. (Bill), Ercole, F., Krstina, J., Jeffery, J., Le, T.P.T., Mayadunne, R.T.A., Meijs, G.F., Moad, C.L., Moad, G., et al. (1998). Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer: The RAFT Process. *Macromolecules* *31*, 5559–5562.

Chmielarz, P., Park, S., Simakova, A., and Matyjaszewski, K. (2015). Electrochemically mediated ATRP of acrylamides in water. *Polymer* *60*, 302–307.

Cho, K.H., Byrne, B., and Chae, P.S. (2013). Hemifluorinated Maltose-Neopentyl Glycol (HF-MNG) Amphiphiles for Membrane Protein Stabilisation. *ChemBioChem* *14*, 452–455.

Cooper, G.M. (2000). *Structure of the Plasma Membrane*. Cell Mol. Approach 2nd Ed.

Dahmane, T., Giusti, F., Catoire, L.J., and Popot, J.-L. (2011). Sulfonated amphipols: Synthesis, properties, and applications. *Biopolymers* *95*, 811–823.

Dalbey, R.E., Kuhn, A., Zhu, L., and Kiefer, D. (2014). The membrane insertase YidC. *Biochim. Biophys. Acta* *1843*, 1489–1496.

De, P., and Sumerlin, B.S. (2013). Precision Control of Temperature Response by Copolymerization of Di(Ethylene Glycol) Acrylate and an Acrylamide Comonomer. *Macromol. Chem. Phys.* *214*, 272–279.

De, A.M.A., Pernot, P., Brennich, M.E., Kieffer, J., Bowler, M.W., Delageniere, S., Ohlsson, S., Malbet, S.M., Ashton, A., Franke, D., et al. (2015). ISPyB for BioSAXS, the gateway to user autonomy in solution scattering experiments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *71*, 76–85.

De Angelis, A.A., Howell, S.C., Nevzorov, A.A., and Opella, S.J. (2006). Structure Determination of a Membrane Protein with Two Trans-membrane Helices in Aligned Phospholipid Bicelles by Solid-State NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* *128*, 12256–12267.

Deguchi, Y., Kurihara, A., and Pardridge, W.M. (1999). Retention of biologic activity of human epidermal growth factor following conjugation to a blood-brain barrier drug delivery vector via an extended poly(ethylene glycol) linker. *Bioconjug. Chem.* *10*, 32–37.

Dempsey, C.E., and Sternberg, B. (1991). Reversible disc-micellization of dimyristoylphosphatidylcholine bilayers induced by melittin and [Ala-14]melittin. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1061*, 175–184.

Denisov, I.G., and Sligar, S.G. (2016). Nanodiscs for structural and functional studies of membrane proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *23*, 481–486.

Denisov, I.G., and Sligar, S.G. (2017). Nanodiscs in Membrane Biochemistry and Biophysics. *Chem. Rev.* *117*, 4669–4713.

Diab, C., Tribet, C., Gohon, Y., Popot, J.-L., and Winnik, F.M. (2007). Complexation of integral membrane proteins by phosphorylcholine-based amphipols. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1768*, 2737–2747.

Dilworth, M.V., Piel, M.S., Bettaney, K.E., Ma, P., Luo, J., Sharples, D., Poyner, D.R., Gross, S.R., Moncoq, K., Henderson, P.J.F., et al. (2018). Microbial expression systems for membrane proteins. *Methods San Diego Calif* *147*, 3–39.

Dominguez Pardo, J.J., Dörr, J.M., Iyer, A., Cox, R.C., Scheidelaar, S., Koorengel, M.C., Subramaniam, V., and Killian, J.A. (2017). Solubilization of lipids and lipid phases by the styrene-maleic acid copolymer. *Eur. Biophys. J. EBJ* *46*, 91–101.

Dörr, J.M., Scheidelaar, S., Koorengel, M.C., Dominguez, J.J., Schäfer, M., van Walree, C.A., and Killian, J.A. (2016). The styrene–maleic acid copolymer: a versatile tool in membrane research. *Eur. Biophys. J.* *45*, 3–21.

Drew, D., Newstead, S., Sonoda, Y., Kim, H., von Heijne, G., and Iwata, S. (2008). GFP-based optimization scheme for the overexpression and purification of eukaryotic membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Protoc.* *3*, 784–798.

Durchschlag, H., and Zipper, P. (1994). Calculation of the partial volume of organic compounds and polymers. In *Ultracentrifugation*, M.D. Lechner, ed. (Steinkopff), pp. 20–39.

El-Faham, A., and Albericio, F. (2011). Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.* *111*, 6557–6602.

Engelman, D.M. (2005). Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* *438*, 578–580.

Faham, S., and Bowie, J.U. (2002). Bicelle crystallization: a new method for crystallizing membrane proteins yields a monomeric bacteriorhodopsin structure. *J. Mol. Biol.* *316*, 1–6.

Fernandez, A., Le Bon, C., Baumlin, N., Giusti, F., Crémel, G., Popot, J.-L., and Bagnard, D. (2014). In Vivo Characterization of the Biodistribution Profile of Amphipol A8–35. *J. Membr. Biol.* *247*, 1043–1051.

Fitzpatrick, A.W.P., Llabrés, S., Neuberger, A., Blaza, J.N., Bai, X.-C., Okada, U., Murakami, S., van Veen, H.W., Zachariae, U., Scheres, S.H.W., et al. (2017). Structure of the MacAB-TolC ABC-type tripartite multidrug efflux pump. *Nat. Microbiol.* *2*, 17070.

French, A.C., Thompson, A.L., and Davis, B.G. (2009). High-Purity Discrete PEG-Oligomer Crystals Allow Structural Insight. *Angew. Chem. Int. Ed.* *48*, 1248–1252.

Giusti, F., Mansis, S., and Pucci, B. (2002). Influence des interactions protiques sur les cinétiques de polymérisation du tris(hydroxyméthyl)acrylamidométhane (THAM) et de ses dérivés. *New J. Chem.* *26*, 1724–1732.

Giusti, F., Popot, J.-L., and Tribet, C. (2012). Well-Defined Critical Association Concentration and Rapid Adsorption at the Air/Water Interface of a Short Amphiphilic Polymer, Amphipol A8-35: A Study by Förster Resonance Energy Transfer and Dynamic Surface Tension Measurements. *Langmuir* *28*, 10372–10380.

Giusti, F., Rieger, J., Catoire, L.J., Qian, S., Calabrese, A.N., Watkinson, T.G., Casiraghi, M., Radford, S.E., Ashcroft, A.E., and Popot, J.-L. (2014). Synthesis, characterization and applications of a perdeuterated amphipol. *J. Membr. Biol.* *247*, 909–924.

Giusti, F., Kessler, P., Hansen, R.W., Della Pia, E.A., Le Bon, C., Mourier, G., Popot, J.-L., Martinez, K.L., and Zoonens, M. (2015). Synthesis of a Polyhistidine-bearing Amphipol and its Use for Immobilizing Membrane Proteins. *Biomacromolecules* *16*, 3751–3761.

Gohon, Y., Pavlov, G., Timmins, P., Tribet, C., Popot, J.-L., and Ebel, C. (2004). Partial specific volume and solvent interactions of amphipol A8-35. *Anal. Biochem.* *334*, 318–334.

Gohon, Y., Giusti, F., Prata, C., Charvolin, D., Timmins, P., Ebel, C., Tribet, C., and Popot, J.-L. (2006). Well-Defined Nanoparticles Formed by Hydrophobic Assembly of a Short and Polydisperse Random Terpolymer, Amphipol A8-35. *Langmuir* *22*, 1281–1290.

Greszta, D., Mardare, D., and Matyjaszewski, K. (1994). “Living” radical polymerization. 1. Possibilities and limitations. *Macromolecules* *27*, 638–644.

Grimaldo, M., Roosen-Runge, F., Hennig, M., Zanini, F., Zhang, F., Jalarvo, N., Zamponi, M., Schreiber, F., and Seydel, T. (2015). Hierarchical molecular dynamics of bovine serum

albumin in concentrated aqueous solution below and above thermal denaturation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* *PCCP* *17*, 4645–4655.

Guinier, A., and Fournet, G. (1955). *Small-angle scattering of X-rays* (New York: Wiley).

Gulati, S., Jamshad, M., Knowles, T.J., Morrison, K.A., Downing, R., Cant, N., Collins, R., Koenderink, J.B., Ford, R.C., Overduin, M., et al. (2014). Detergent-free purification of ABC (ATP-binding-cassette) transporters. *Biochem. J.* *461*, 269–278.

Harlan, J.E., Picot, D., Loll, P.J., and Garavito, R.M. (1995). Calibration of size-exclusion chromatography: use of a double Gaussian distribution function to describe pore sizes. *Anal. Biochem.* *224*, 557–563.

Harris, J.M., Hundley, N.H., Shannon, T.G., and Struck, E.C. (1982). Polyethylene glycols as soluble, recoverable, phase-transfer catalyts. *J. Org. Chem.* *47*, 4789–4791.

He, Y., Heine, E., Keusgen, N., Keul, H., and Möller, M. (2012). Synthesis and characterization of amphiphilic monodisperse compounds and poly(ethylene imine)s: influence of their microstructures on the antimicrobial properties. *Biomacromolecules* *13*, 612–623.

Helenius, A., and Simons, K. (1975). Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* *415*, 29–79.

Henderson, R., and Unwin, P.N. (1975). Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature* *257*, 28–32.

Hirai, Y., Terashima, T., Takenaka, M., and Sawamoto, M. (2016). Precision Self-Assembly of Amphiphilic Random Copolymers into Uniform and Self-Sorting Nanocompartments in Water. *Macromolecules* *49*, 5084–5091.

Hopkins, J.B., Gillilan, R.E., and Skou, S. (2017). BioXTAS RAW: improvements to a free open-source program for small-angle X-ray scattering data reduction and analysis. *J. Appl. Crystallogr.* *50*, 1545–1553.

Hovers, J., Potschies, M., Polidori, A., Pucci, B., Raynal, S., Bonneté, F., Serrano-Vega, M.J., Tate, C.G., Picot, D., Pierre, Y., et al. (2011). A class of mild surfactants that keep integral membrane proteins water-soluble for functional studies and crystallization. *Mol. Membr. Biol.* *28*, 171–181.

Israelachvili, J.N. (1992). *Intermolecular and surface forces* (London: Academic Press).

Israelachvili, J.N., Mitchell, D.J., and Ninham, B.W. (1977). Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* *470*, 185–201.

Jamshad, M., Grimard, V., Idini, I., Knowles, T.J., Dowle, M.R., Schofield, N., Sridhar, P., Lin, Y., Finka, R., Wheatley, M., et al. (2015). Structural analysis of a nanoparticle containing a lipid bilayer used for detergent-free extraction of membrane proteins. *Nano Res.* *8*, 774–789.

Keusenkothen, P.F., and Smith, M.B. (1992). Anchimeric Assistance in the N-Alkylation of 5-alkoxymethyl-2-pyrrolidinone Derivatives. *Synth. Commun.* *22*, 2935–2940.

Khorana, H.G. (1953). The Chemistry of Carbodiimides. *Chem. Rev.* *53*, 145–166.

Kirsch, P. (2004). *Modern fluoroorganic chemistry: synthesis, reactivity, applications* (Germany [1990-onward]: Wiley-VCH: John Wiley & Sons).

Kissa, E. (1994). *Fluorinated surfactants: synthesis, properties, applications* (New York: M. Dekker).

Klimenkovs, I., Zicmanis, A., Uzulina, I., Graillat, C., and Guyot, A. (2004). Reactions of Maleisomides with Alcohols. *J. Dispers. Sci. Technol.* *25*, 119–128.

Knowles, T.J., Finka, R., Smith, C., Lin, Y.-P., Dafforn, T., and Overduin, M. (2009). Membrane Proteins Solubilized Intact in Lipid Containing Nanoparticles Bounded by Styrene Maleic Acid Copolymer. *J. Am. Chem. Soc.* *131*, 7484–7485.

Konarev, P.V., Volkov, V.V., Sokolova, A.V., Koch, M.H.J., and Svergun, D.I. (2003). PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* *36*, 1277–1282.

Konijnenberg, A., Yilmaz, D., Ingólfsson, H.I., Dimitrova, A., Marrink, S.J., Li, Z., Vénien-Bryan, C., Sobott, F., and Koçer, A. (2014). Global structural changes of an ion channel during its gating are followed by ion mobility mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 17170–17175.

Kumazaki, K., Chiba, S., Takemoto, M., Furukawa, A., Nishiyama, K., Sugano, Y., Mori, T., Dohmae, N., Hirata, K., Nakada-Nakura, Y., et al. (2014a). Structural basis of Sec-independent membrane protein insertion by YidC. *Nature* *509*, 516–520.

Kumazaki, K., Kishimoto, T., Furukawa, A., Mori, H., Tanaka, Y., Dohmae, N., Ishitani, R., Tsukazaki, T., and Nureki, O. (2014b). Crystal structure of *Escherichia coli* YidC, a membrane protein chaperone and insertase. *Sci. Rep.* *4*.

Kuroda, K., Caputo, G.A., and DeGrado, W.F. (2009). The Role of Hydrophobicity in the Antimicrobial and Hemolytic Activities of Polymethacrylate Derivatives. *Chem. – Eur. J.* *15*, 1123–1133.

Kurzer, F., and Douraghi-Zadeh, K. (1967). *Advances in the Chemistry of Carbodiimides*. *Chem. Rev.* *67*, 107–152.

Ladavière, C., Toustou, M., Gulik-Krzywicki, T., and Tribet, C. (2001). Slow Reorganization of Small Phosphatidylcholine Vesicles upon Adsorption of Amphiphilic Polymers. *J. Colloid Interface Sci.* *241*, 178–187.

Ladavière, C., Tribet, C., and Cribier, S. (2002). Lateral Organization of Lipid Membranes Induced by Amphiphilic Polymer Inclusions. *Langmuir* *18*, 7320–7327.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680.

Lange, C., Nett, J.H., Trumpower, B.L., and Hunte, C. (2001). Specific roles of protein–phospholipid interactions in the yeast cytochrome bc₁ complex structure. *EMBO J.* *20*, 6591–6600.

Lanyi, J.K. (2004). Bacteriorhodopsin. *Annu. Rev. Physiol.* *66*, 665–688.

Le Bon, C., Popot, J.-L., and Giusti, F. (2014a). Labeling and functionalizing amphipols for biological applications. *J. Membr. Biol.* *247*, 797–814.

Le Bon, C., Della Pia, E.A., Giusti, F., Lloret, N., Zoonens, M., Martinez, K.L., and Popot, J.-L. (2014b). Synthesis of an oligonucleotide-derivatized amphipol and its use to trap and immobilize membrane proteins. *Nucleic Acids Res.* *42*, e83–e83.

Le Bon, C., Marconnet, A., Masscheleyn, S., Popot, J.-L., and Zoonens, M. (2018). Folding and stabilizing membrane proteins in amphipol A8-35. *Methods San Diego Calif* *147*, 95–105.

Lebaupain, F., Salvay, A.G., Olivier, B., Durand, G., Fabiano, A.-S., Michel, N., Popot, J.-L., Ebel, C., Breyton, C., and Pucci, B. (2006). Lactobionamide Surfactants with Hydrogenated, Perfluorinated or Hemifluorinated Tails: Physical-Chemical and Biochemical Characterization. *Langmuir* *22*, 8881–8890.

Lee, A.G. (2011). Lipid–protein interactions. *Biochem. Soc. Trans.* *39*, 761–766.

Lele, B.S., Gore, M.A., and Kulkarni, M.G. (1999). Friedel-craft N-alkylation and N-acylation of acrylamide: a novel approach for synthesis of alkylacrylamides. *J. Appl. Polym. Sci.* *73*, 1845–1850.

Logez, C., Damian, M., Legros, C., Dupré, C., Guéry, M., Mary, S., Wagner, R., M’Kadmi, C., Nosjean, O., Fould, B., et al. (2016). Detergent-free Isolation of Functional G Protein-Coupled Receptors into Nanometric Lipid Particles. *Biochemistry* *55*, 38–48.

Loiseau, F.A., Hii, K.K. (Mimi), and Hill, A.M. (2004). Multigram Synthesis of Well-Defined Extended Bifunctional Polyethylene Glycol (PEG) Chains. *J. Org. Chem.* *69*, 639–647.

Long, A.R., O’Brien, C.C., Malhotra, K., Schwall, C.T., Albert, A.D., Watts, A., and Alder, N.N. (2013). A detergent-free strategy for the reconstitution of active enzyme complexes from native biological membranes into nanoscale discs. *BMC Biotechnol.* *13*, 1.

Long, S.B., Campbell, E.B., and Mackinnon, R. (2005). Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* *309*, 897–903.

Luccardini, C., Tribet, C., Vial, F., Marchi-Artzner, V., and Dahan, M. (2006). Size, Charge, and Interactions with Giant Lipid Vesicles of Quantum Dots Coated with an Amphiphilic Macromolecule. *Langmuir* *22*, 2304–2310.

Luecke, H. (2000). Atomic resolution structures of bacteriorhodopsin photocycle intermediates: the role of discrete water molecules in the function of this light-driven ion pump. *Biochim. Biophys. Acta* *1460*, 133–156.

Lund, S., Orlowski, S., de Foresta, B., Champeil, P., le Maire, M., and Møller, J.V. (1989). Detergent structure and associated lipid as determinants in the stabilization of solubilized Ca²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *264*, 4907–4915.

Malhotra, K., and Alder, N.N. (2014). Advances in the use of nanoscale bilayers to study membrane protein structure and function. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* *30*, 79–93.

Martonosi, A., Lagwinska, E., and Oliver, M. (1974). Elementary processes in the hydrolysis of ATP by sarcoplasmic reticulum membranes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *227*, 549–567.

Mary, S., Damian, M., Rahmeh, R., Mouillac, B., Marie, J., Granier, S., and Banères, J.-L. (2014). Amphipols in G protein-coupled receptor pharmacology: what are they good for? *J. Membr. Biol.* *247*, 853–860.

Matsumoto, M., Terashima, T., Matsumoto, K., Takenaka, M., and Sawamoto, M. (2017). Compartmentalization Technologies via Self-Assembly and Cross-Linking of Amphiphilic Random Block Copolymers in Water. *J. Am. Chem. Soc.* *139*, 7164–7167.

Mekki, S., Saïdi-Besbes, S., Elaissari, A., Valour, J.-P., and Derdour, A. (2010). Novel polymerizable surfactants: synthesis and application in the emulsion polymerization of styrene. *Polym. J.* *42*, 401–405.

Moad, G., Rizzardo, E., and Thang, S.H. (2012). Living Radical Polymerization by the RAFT Process – A Third Update. *Aust. J. Chem.* *65*, 985–1076.

Morishima, Y., Nomura, S., Ikeda, T., Seki, M., and Kamachi, M. (1995). Characterization of Unimolecular Micelles of Random Copolymers of Sodium 2-(Acrylamido)-2-methylpropanesulfonate and Methacrylamides Bearing Bulky Hydrophobic Substituents. *Macromolecules* *28*, 2874–2881.

Morizur, J.-F., Irvine, D.J., Rawlins, J.J., and Mathias, L.J. (2007). Synthesis of New Acrylate-Based Nonionic Surfmers and Their Use in Heterophase Polymerization. *Macromolecules* *40*, 8938–8946.

Morrison, K.A., Akram, A., Mathews, A., Khan, Z.A., Patel, J.H., Zhou, C., Hardy, D.J., Moore-Kelly, C., Patel, R., Odiba, V., et al. (2016). Membrane protein extraction and purification using styrene-maleic acid (SMA) copolymer: effect of variations in polymer structure. *Biochem. J.* *473*, 4349–4360.

Mukerjee, P. (1994). Fluorocarbon—hydrocarbon interactions in micelles and other lipid assemblies, at interfaces, and in solutions. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* *84*, 1–10.

Müller, B., and Schmelich, T. (1995). High-molecular weight styrene-maleic acid copolymers as corrosion inhibitors for aluminium pigments. *Corros. Sci.* *37*, 877–883.

Nakano, T.-Y., Sugihara, G., Nakashima, T., and Yu, S.-C. (2002). Thermodynamic Study of Mixed Hydrocarbon/Fluorocarbon Surfactant System by Conductometric and Fluorimetric Techniques. *Langmuir* *18*, 8777–8785.

Nath, A., Atkins, W.M., and Sligar, S.G. (2007). Applications of phospholipid bilayer nanodiscs in the study of membranes and membrane proteins. *Biochemistry* *46*, 2059–2069.

Neugebauer, J.M. (1990). Detergents: an overview. *Methods Enzymol.* *182*, 239–253.

Nicolas, J., Guillaneuf, Y., Lefay, C., Bertin, D., Gignes, D., and Charleux, B. (2013). Nitroxide-mediated polymerization. *Prog. Polym. Sci.* *38*, 63–235.

Noda, T., and Morishima, Y. (1999). Hydrophobic Association of Random Copolymers of Sodium 2-(Acrylamido)-2-methylpropanesulfonate and Dodecyl Methacrylate in Water As Studied by Fluorescence and Dynamic Light Scattering. *Macromolecules* *32*, 4631–4640.

Noda, T., Hashidzume, A., and Morishima, Y. (2000a). Micelle Formation of Random Copolymers of Sodium 2-(Acrylamido)-2-methylpropanesulfonate and a Nonionic Surfactant Macromonomer in Water As Studied by Fluorescence and Dynamic Light Scattering. *Macromolecules* *33*, 3694–3704.

Noda, T., Hashidzume, A., and Morishima, Y. (2000b). Solution Properties of Micelle Networks Formed by Nonionic Surfactant Moieties Covalently Bound to a Polyelectrolyte: Salt Effects on Rheological Behavior. *Langmuir* *16*, 5324–5332.

Nollert, P. (2005). Membrane protein crystallization in amphiphile phases: practical and theoretical considerations. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *88*, 339–357.

Opačić, M., Giusti, F., Popot, J.-L., and Broos, J. (2014). Isolation of *Escherichia coli* mannitol permease, EIImtl, trapped in amphipol A8-35 and fluorescein-labeled A8-35. *J. Membr. Biol.* *247*, 1019–1030.

Orekhov, P.S., Bozdaganyan, M.E., Voskoboynikova, N., Mulkidjanian, A.Y., Steinhoff, H.-J., and Shaitan, K.V. (2019). Styrene/Maleic Acid Copolymers Form SMALPs by Pulling Lipid Patches out of the Lipid Bilayer. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* *35*, 3748–3758.

Orwick, M.C., Judge, P.J., Procek, J., Lindholm, L., Graziadei, A., Engel, A., Gröbner, G., and Watts, A. (2012). Detergent-free formation and physicochemical characterization of nanosized lipid-polymer complexes: Lipodisq. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *51*, 4653–4657.

Orwick-Rydmark, M., Lovett, J.E., Graziadei, A., Lindholm, L., Hicks, M.R., and Watts, A. (2012). Detergent-Free Incorporation of a Seven-Transmembrane Receptor Protein into Nanosized Bilayer Lipodisq Particles for Functional and Biophysical Studies. *Nano Lett.* *12*, 4687–4692.

Ostermeier, C., Harrenga, A., Ermler, U., and Michel, H. (1997). Structure at 2.7 Å resolution of the *Paracoccus denitrificans* two-subunit cytochrome c oxidase complexed with an antibody FV fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 10547–10553.

Pal, B., Jaisankar, P., and Giri, V.S. (2004). Versatile Reagent for Reduction of Azides to Amines. *Synth. Commun.* *34*, 1317–1323.

Park, K.-H., Billon-Denis, E., Dahmane, T., Lebaupain, F., Pucci, B., Breyton, C., and Zito, F. (2011). In the cauldron of cell-free synthesis of membrane proteins: playing with new surfactants. *New Biotechnol.* *28*, 255–261.

Park, S.H., Angelis, A.A.D., Nevzorov, A.A., Wu, C.H., and Opella, S.J. (2006). Three-Dimensional Structure of the Transmembrane Domain of Vpu from HIV-1 in Aligned Phospholipid Bicelles. *Biophys. J.* *91*, 3032–3042.

Pertici, F., and Pieters, R.J. (2012). Potent divalent inhibitors with rigid glucose click spacers for *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecA. *Chem. Commun.* *48*, 4008–4010.

Picard, M., Dahmane, T., Garrigos, M., Gauron, C., Giusti, F., le Maire, M., Popot, J.-L., and Champeil, P. (2006). Protective and Inhibitory Effects of Various Types of Amphipols on the Ca²⁺-ATPase from Sarcoplasmic Reticulum: A Comparative Study †. *Biochemistry* *45*, 1861–1869.

Polidori, A., Passet, M., Lebaupain, F., Ameduri, B., Popot, J.-L., Breyton, C., and Pucci, B. (2006). Fluorinated and hemifluorinated surfactants derived from maltose: synthesis and application to handling membrane proteins in aqueous solution. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *16*, 5827–5831.

Polidori, A., Raynal, S., Barret, L.-A., Dahani, M., Barrot-Ivolot, C., Jungas, C., Frotscher, E., Keller, S., Ebel, C., Breyton, C., et al. (2016). Sparingly fluorinated maltoside-based surfactants for membrane-protein stabilization. *New J. Chem.* *40*, 5364–5378.

Popot, J.-L. (2010). Amphipols, Nanodiscs, and Fluorinated Surfactants: Three Nonconventional Approaches to Studying Membrane Proteins in Aqueous Solutions. *Annu. Rev. Biochem.* *79*, 737–775.

Popot, J.-L. (2018). *Membrane Proteins in Aqueous Solutions: From Detergents to Amphipols* (Springer International Publishing).

Popot, J.-L., Berry, E.A., Charvolin, D., Creuzenet, C., Ebel, C., Engelman, D.M., Floetenmeyer, M., Giusti, F., Gohon, Y., Hervé, P., et al. (2003). Amphipols: polymeric surfactants for membrane biology research. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *60*, 1559–1574.

Popot, J.-L., Althoff, T., Bagnard, D., Banères, J.-L., Bazzacco, P., Billon-Denis, E., Catoire, L.J., Champeil, P., Charvolin, D., Cocco, M.J., et al. (2011). Amphipols from A to Z. *Annu. Rev. Biophys.* *40*, 379–408.

Prata, C., Giusti, F., Gohon, Y., Pucci, B., Popot, J.-L., and Tribet, C. (2000). Nonionic amphiphilic polymers derived from Tris (hydroxymethyl)-acrylamidomethane keep membrane proteins soluble and native in the absence of detergent. *Biopolymers* *56*, 77–84.

Raetz, C.R., and Dowhan, W. (1990). Biosynthesis and function of phospholipids in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *265*, 1235–1238.

Rahmeh, R., Damian, M., Cottet, M., Orcel, H., Mendre, C., Durroux, T., Sharma, K.S., Durand, G., Pucci, B., Trinquet, E., et al. (2012). Structural insights into biased G protein-coupled receptor signaling revealed by fluorescence spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 6733–6738.

Reading, E., Liko, I., Allison, T.M., Benesch, J.L.P., Laganowsky, A., and Robinson, C.V. (2015). The role of the detergent micelle in preserving the structure of membrane proteins in the gas phase. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *54*, 4577–4581.

Rieger, J., Zhang, W., Stoffelbach, F., and Charleux, B. (2010). Surfactant-Free RAFT Emulsion Polymerization Using Poly(N,N-dimethylacrylamide) Trithiocarbonate Macromolecular Chain Transfer Agents. *Macromolecules* *43*, 6302–6310.

Ritchie, T.K., Grinkova, Y.V., Bayburt, T.H., Denisov, I.G., Zolnerciks, J.K., Atkins, W.M., and Sligar, S.G. (2009). Chapter 11 - Reconstitution of membrane proteins in phospholipid bilayer nanodiscs. *Methods Enzymol.* *464*, 211–231.

Salvador, D., Glavier, M., Schoehn, G., Phan, G., Taveau, J.-C., Decossas, M., Lecomte, S., Mongrand, S., Garnier, C., Broutin, I., et al. (2019). Minimal nanodisc without exogenous lipids for stabilizing membrane proteins in detergent-free buffer. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* *1861*, 852–860.

Sanders, C.R., and Nagy, J.K. (2000). Misfolding of membrane proteins in health and disease: the lady or the tiger? *Curr. Opin. Struct. Biol.* *10*, 438–442.

Sauvage, E., Plucktaveesak, N., Colby, R.H., Amos, D.A., Antalek, B., Schroeder, K.M., and Tan, J.S. (2004). Amphiphilic maleic acid-containing alternating copolymers—2. Dilute solution characterization by light scattering, intrinsic viscosity, and PGSE NMR spectroscopy. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* *42*, 3584–3597.

Schafmeister, C.E., Miercke, L.J., and Stroud, R.M. (1993). Structure at 2.5 Å of a designed peptide that maintains solubility of membrane proteins. *Science* *262*, 734–738.

Scheidelaar, S., Koorengel, M.C., Pardo, J.D., Meeldijk, J.D., Breukink, E., and Killian, J.A. (2015). Molecular Model for the Solubilization of Membranes into Nanodisks by Styrene Maleic Acid Copolymers. *Biophys. J.* *108*, 279–290.

Schmidt, V., and Sturgis, J.N. (2018). Modifying styrene-maleic acid co-polymer for studying lipid nanodisks. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* *1860*, 777–783.

Selinger, Z., and Lapidot, Y. (1966). Synthesis of fatty acid anhydrides by reaction with dicyclohexylcarbodiimide. *J. Lipid Res.* *7*, 174–175.

Sharma, K.S., Durand, G., Giusti, F., Olivier, B., Fabiano, A.-S., Bazzacco, P., Dahmane, T., Ebel, C., Popot, J.-L., and Pucci, B. (2008). Glucose-Based Amphiphilic Telomers Designed to Keep Membrane Proteins Soluble in Aqueous Solutions: Synthesis and Physicochemical Characterization. *Langmuir* *24*, 13581–13590.

Sharma, K.S., Durand, G., Gabel, F., Bazzacco, P., Le Bon, C., Billon-Denis, E., Catoire, L.J., Popot, J.-L., Ebel, C., and Pucci, B. (2012). Non-ionic amphiphilic homopolymers: synthesis, solution properties, and biochemical validation. *Langmuir* *28*, 4625–4639.

Singer, S.J., and Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* *175*, 720–731.

Sousa, J.S., Mills, D.J., Vonck, J., and Kühlbrandt, W. (2016). Functional asymmetry and electron flow in the bovine respirasome. *ELife* *5*.

Stangl, M., Unger, S., Keller, S., and Schneider, D. (2014). Sequence-specific dimerization of a transmembrane helix in amphipol A8-35. *PloS One* *9*, e110970.

Starita-Geribaldi, M., Thebault, P., Givenchy, E.T. de, Guittard, F., and Geribaldi, S. (2007). 2-DE using hemi-fluorinated surfactants. *ELECTROPHORESIS* *28*, 2489–2497.

Subirats, X., Rosés, M., and Bosch, E. (2007). On the Effect of Organic Solvent Composition on the pH of Buffered HPLC Mobile Phases and the pK_a of Analytes—A Review. *Sep. Purif. Rev.* *36*, 231–255.

Swainsbury, D.J.K., Scheidelaar, S., van Grondelle, R., Killian, J.A., and Jones, M.R. (2014). Bacterial reaction centers purified with styrene maleic acid copolymer retain native membrane functional properties and display enhanced stability. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *53*, 11803–11807.

Swainsbury, D.J.K., Scheidelaar, S., Foster, N., van Grondelle, R., Killian, J.A., and Jones, M.R. (2017). The effectiveness of styrene-maleic acid (SMA) copolymers for solubilisation of integral membrane proteins from SMA-accessible and SMA-resistant membranes. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* *1859*, 2133–2143.

Székely, G., Schaepertoens, M., Gaffney, P.R.J., and Livingston, A.G. (2014). Beyond PEG2000: Synthesis and Functionalisation of Monodisperse PEGylated Homostars and Clickable Bivalent Polyethyleneglycols. *Chem. – Eur. J.* *20*, 10038–10051.

Tanford, C., and Reynolds, J.A. (1976). Characterization of membrane proteins in detergent solutions. *Biochim. Biophys. Acta* *457*, 133–170.

Thebault, P., Taffin de Givenchy, E., Starita-Geribaldi, M., Guittard, F., and Geribaldi, S. (2007). Synthesis and surface properties of new semi-fluorinated sulfobetaines potentially usable for 2D-electrophoresis. *J. Fluor. Chem.* *128*, 211–218.

Thorsen, T.S., Matt, R., Weis, W.I., and Kobilka, B.K. (2014). Modified T4 Lysozyme Fusion Proteins Facilitate G Protein-Coupled Receptor Crystallogenesis. *Struct. Lond. Engl.* *1993* *22*, 1657–1664.

Tifrea, D.F., Pal, S., Le Bon, C., Giusti, F., Popot, J.-L., Cocco, M.J., Zoonens, M., and de la Maza, L.M. (2018). Co-delivery of amphipol-conjugated adjuvant with antigen, and adjuvant combinations, enhance immune protection elicited by a membrane protein-based vaccine against a mucosal challenge with Chlamydia. *Vaccine* *36*, 6640–6649.

Tominey, A.F., Liese, J., Wei, S., Kowski, K., Schrader, T., and Kraft, A. (2010). RAFT polymers for protein recognition. *Beilstein J. Org. Chem.* *6*, 0–0.

Tonge, S.R., and Tighe, B.J. (2001). Responsive hydrophobically associating polymers: a review of structure and properties. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *53*, 109–122.

Tonnis, W.F., Mensink, M.A., de Jager, A., van der Voort Maarschalk, K., Frijlink, H.W., and Hinrichs, W.L.J. (2015). Size and molecular flexibility of sugars determine the storage stability of freeze-dried proteins. *Mol. Pharm.* *12*, 684–694.

Toyoshima, C., and Nomura, H. (2002). Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature* *418*, 605–611.

Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., and Ogawa, H. (2000). Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* *405*, 647–655.

Tribet, C., Audebert, R., and Popot, J.-L. (1996). Amphipols: polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *93*, 15047–15050.

Tribet, C., Diab, C., Dahmane, T., Zoonens, M., Popot, J.-L., and Winnik, F.M. (2009). Thermodynamic characterization of the exchange of detergents and amphipols at the surfaces of integral membrane proteins. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* *25*, 12623–12634.

Tsutsumi, K., Yonehara, R., Ishizaka-Ikeda, E., Miyazaki, N., Maeda, S., Iwasaki, K., Nakagawa, A., and Yamashita, E. (2019). Structures of the wild-type MexAB–OprM tripartite pump reveal its complex formation and drug efflux mechanism. *Nat. Commun.* *10*, 1520.

Uzulina, I., Zicmanis, A., Graillat, C., Claverie, J., and Guyot, A. (2002). Nonionic Maleic Surfmers. *J. Dispers. Sci. Technol.* *23*, 799–808.

VanAken, T., Foxall-VanAken, S., Castleman, S., and Ferguson-Miller, S. (1986). Alkyl glycoside detergents: synthesis and applications to the study of membrane proteins. *Methods Enzymol.* *125*, 27–35.

Vargas, C., Arenas, R.C., Frotscher, E., and Keller, S. (2015). Nanoparticle self-assembly in mixtures of phospholipids with styrene/maleic acid copolymers or fluorinated surfactants. *Nanoscale* *7*, 20685–20696.

Vial, F., Rabhi, S., and Tribet, C. (2005). Association of octyl-modified poly (acrylic acid) onto unilamellar vesicles of lipids and kinetics of vesicle disruption. *Langmuir* *21*, 853–862.

Vial, F., Ghani Oukhaled, A., Auvray, L., and Tribet, C. (2007). Long-living channels of well defined radius opened in lipid bilayers by polydisperse, hydrophobically-modified polyacrylic acids. *Soft Matter* *3*, 75–78.

Vial, F., Cousin, F., Bouteiller, L., and Tribet, C. (2009). Rate of Permeabilization of Giant Vesicles by Amphiphilic Polyacrylates Compared to the Adsorption of These Polymers onto Large Vesicles and Tethered Lipid Bilayers. *Langmuir* *25*, 7506–7513.

Wang, H., Elferich, J., and Gouaux, E. (2012). Structures of LeuT in bicelles define conformation and substrate binding in a membrane-like context. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 212–219.

Watkinson, T.G., Calabrese, A.N., Giusti, F., Zoonens, M., Radford, S.E., and Ashcroft, A.E. (2015). Systematic analysis of the use of amphipathic polymers for studies of outer membrane proteins using mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* *391*, 54–61.

Wawro, A.M., Muraoka, T., and Kinbara, K. (2016). Chromatography-free synthesis of monodisperse oligo(ethylene glycol) mono-p-toluenesulfonates and quantitative analysis of oligomer purity. *Polym. Chem.* *7*, 2389–2394.

Wei, L.L., Mulder, J.A., Xiong, H., Zifcsak, C.A., Douglas, C.J., and Hsung, R.P. (2001). Efficient preparations of novel n-amides and allenamides. *Tetrahedron* *57*, 459–466.

Williams, A., and Ibrahim, I.T. (1981). Carbodiimide chemistry: recent advances. *Chem. Rev.* *81*, 589–636.

Xue, M., Cheng, L., Faustino, I., Guo, W., and Marrink, S.J. (2018). Molecular Mechanism of Lipid Nanodisk Formation by Styrene-Maleic Acid Copolymers. *Biophys. J.* *115*, 494–502.

Yaacobi, M., and Ben-Naim, A. (1973). Hydrophobic interaction in water-ethanol mixtures. *J. Solut. Chem.* *2*, 425–443.

Yamamoto, H., Tomatsu, I., Hashidzume, A., and Morishima, Y. (2000). Associative Properties in Water of Copolymers of Sodium 2-(Acrylamido)-2-methylpropanesulfonate and Methacrylamides Substituted with Alkyl Groups of Varying Lengths. *Macromolecules* *33*, 7852–7861.

Yu, S.M., McQuade, D.T., Quinn, M.A., Hackenberger, C.P., Krebs, M.P., Polans, A.S., and Gellman, S.H. (2000). An improved tripod amphiphile for membrane protein solubilization. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *9*, 2518–2527.

Zhang, Q., Ren, H., and Baker, G.L. (2014). A practical and scalable process to selectively monofunctionalize water-soluble α,ω -diols. *Tetrahedron Lett.* *55*, 3384–3386.

Zhang, R., Sahu, I.D., Liu, L., Osatuke, A., Comer, R.G., Dabney-Smith, C., and Lorigan, G.A. (2015). Characterizing the structure of lipodisq nanoparticles for membrane protein spectroscopic studies. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1848*, 329–333.

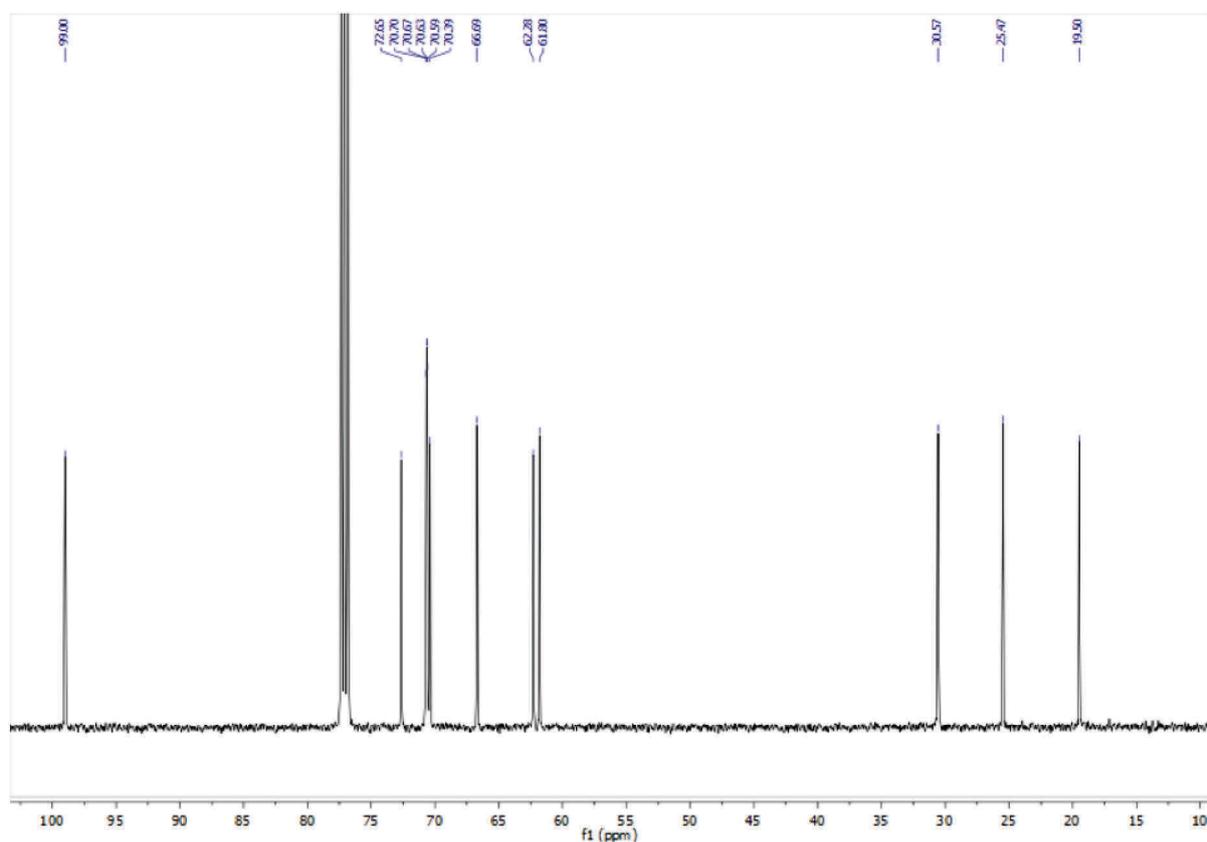
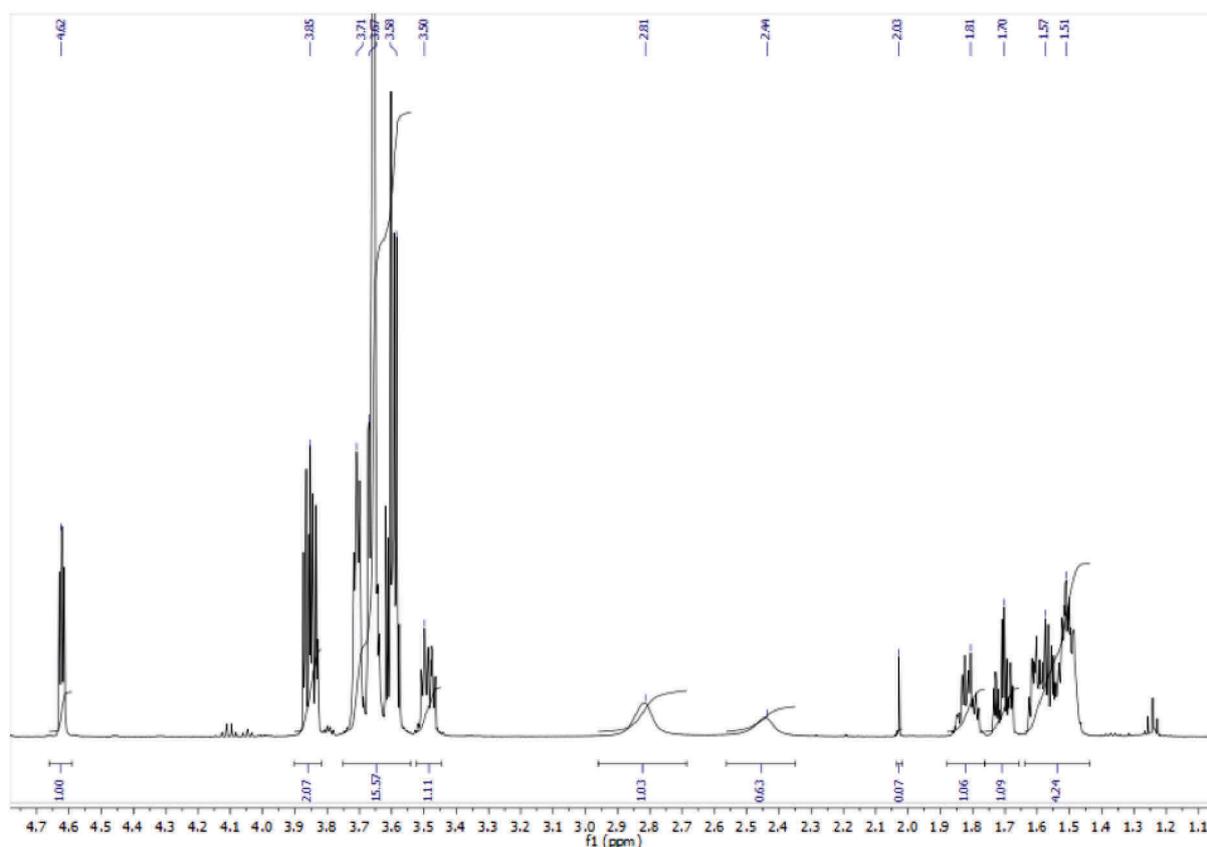
Zoonens, M., Catoire, L.J., Giusti, F., and Popot, J.-L. (2005). NMR study of a membrane protein in detergent-free aqueous solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 8893–8898.

Zoonens, M., Giusti, F., Zito, F., and Popot, J.-L. (2007). Dynamics of Membrane Protein/Amphipol Association Studied by Förster Resonance Energy Transfer: Implications for in Vitro Studies of Amphipol-Stabilized Membrane Proteins [†]. *Biochemistry* *46*, 10392–10404.

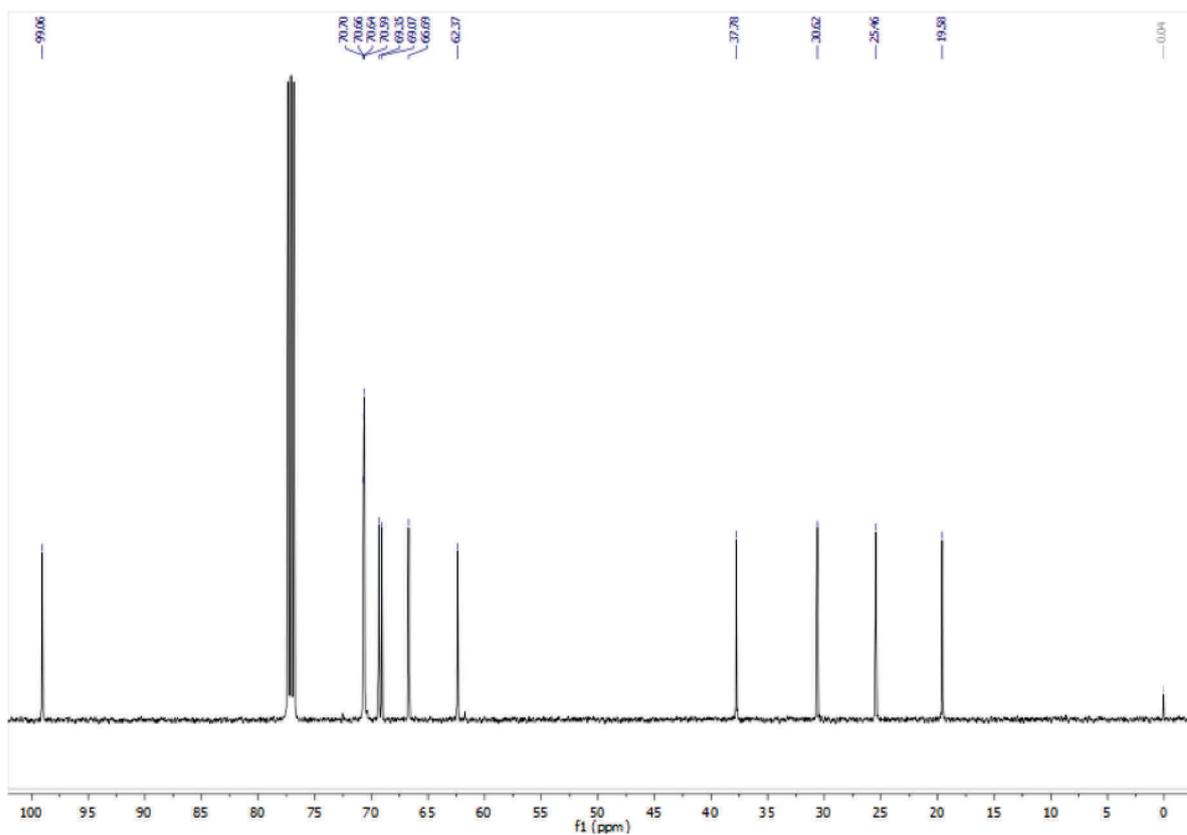
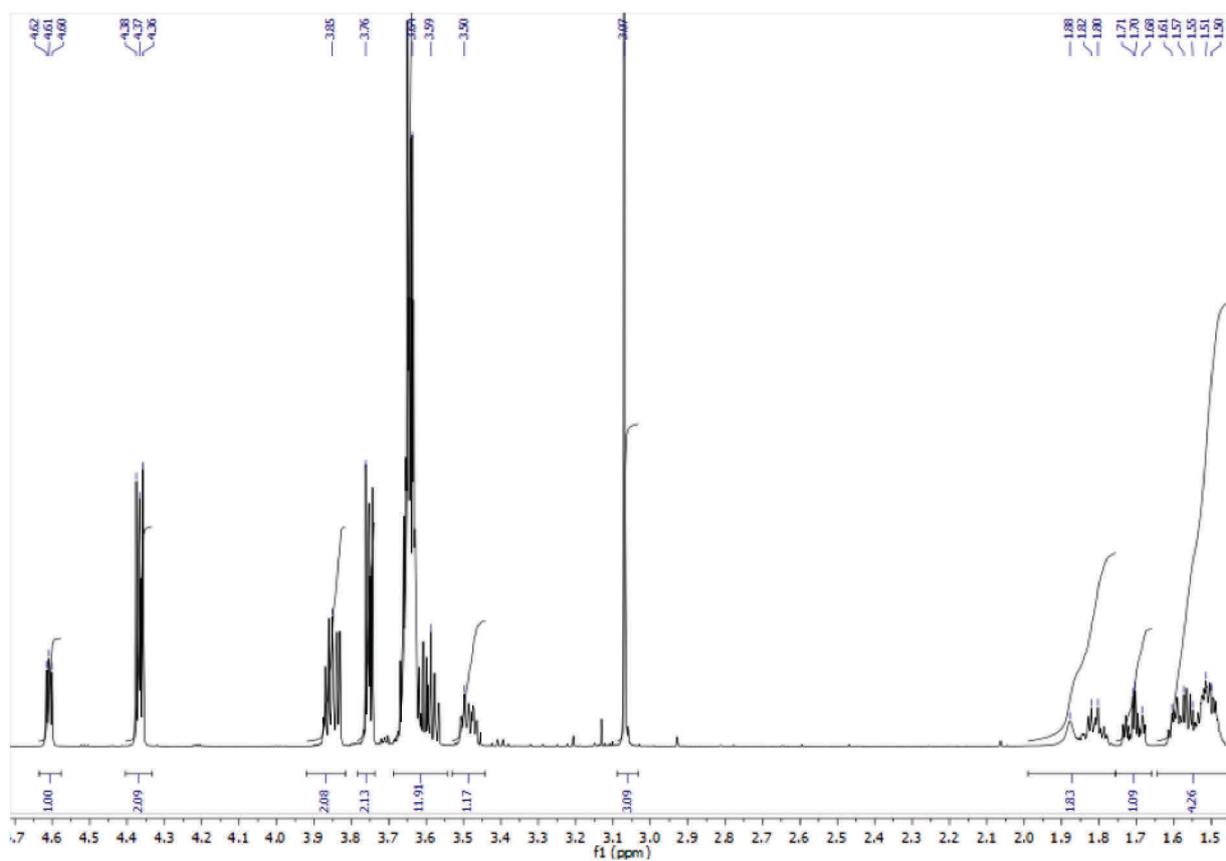
Handbook of Fluorous Chemistry.

6 ANNEXE 1 : Spectres RMN des composés 1 à 6

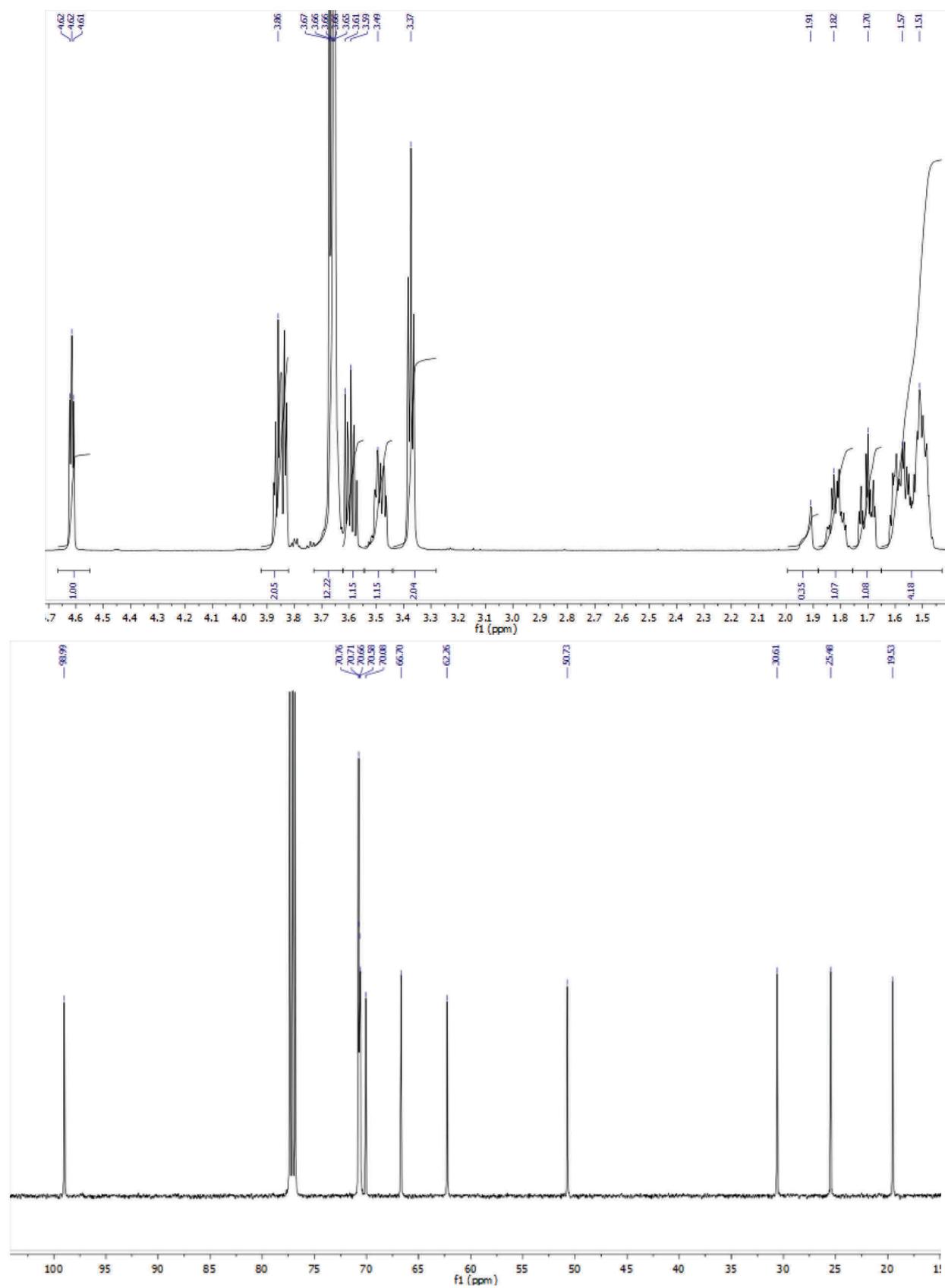
11-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy-3,6,9-trioxaundécane-1-ol (1)



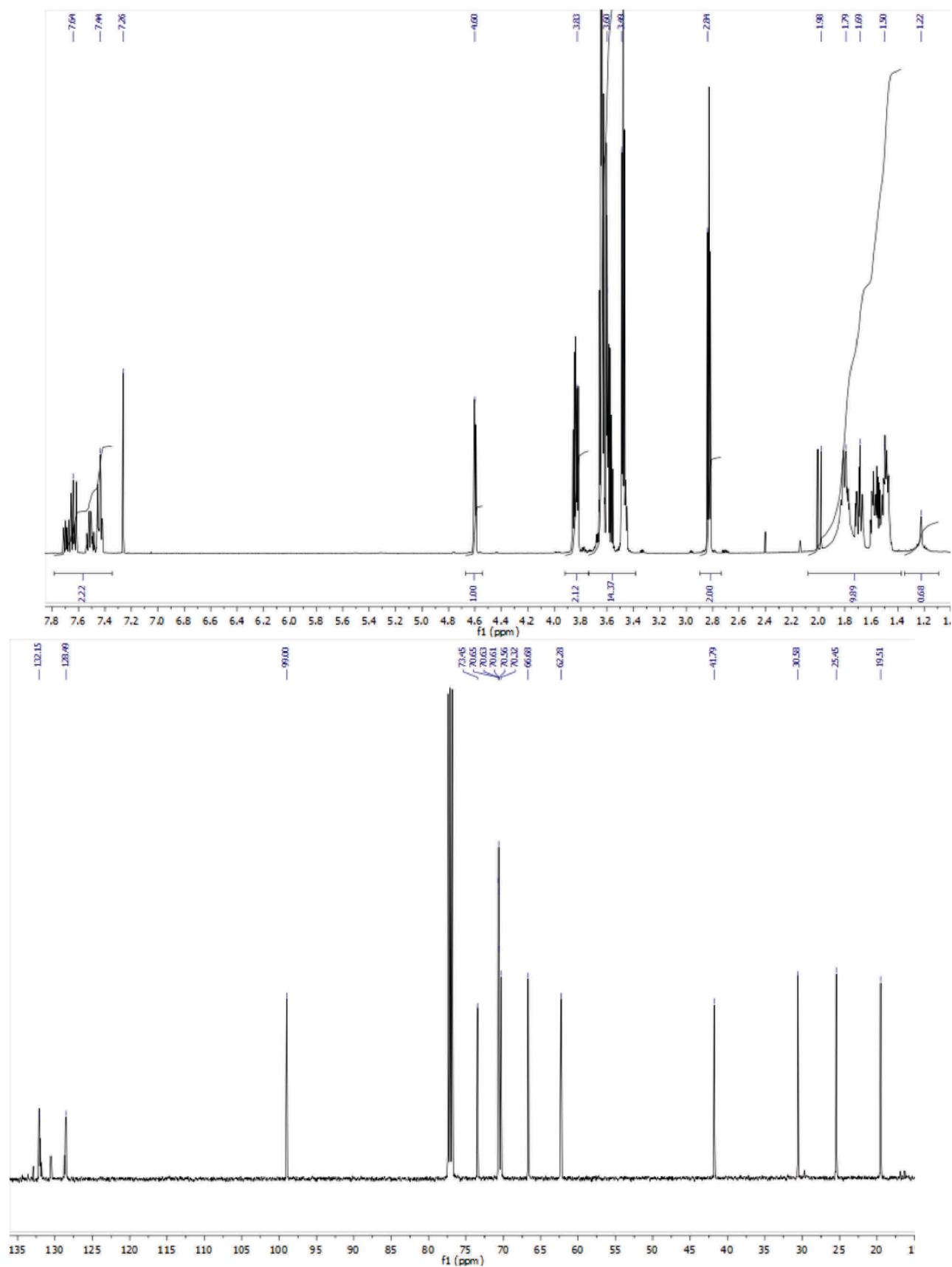
Méthanesulfonate de 11-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy-3,6,9-trioxaundécane-1-yle (2)



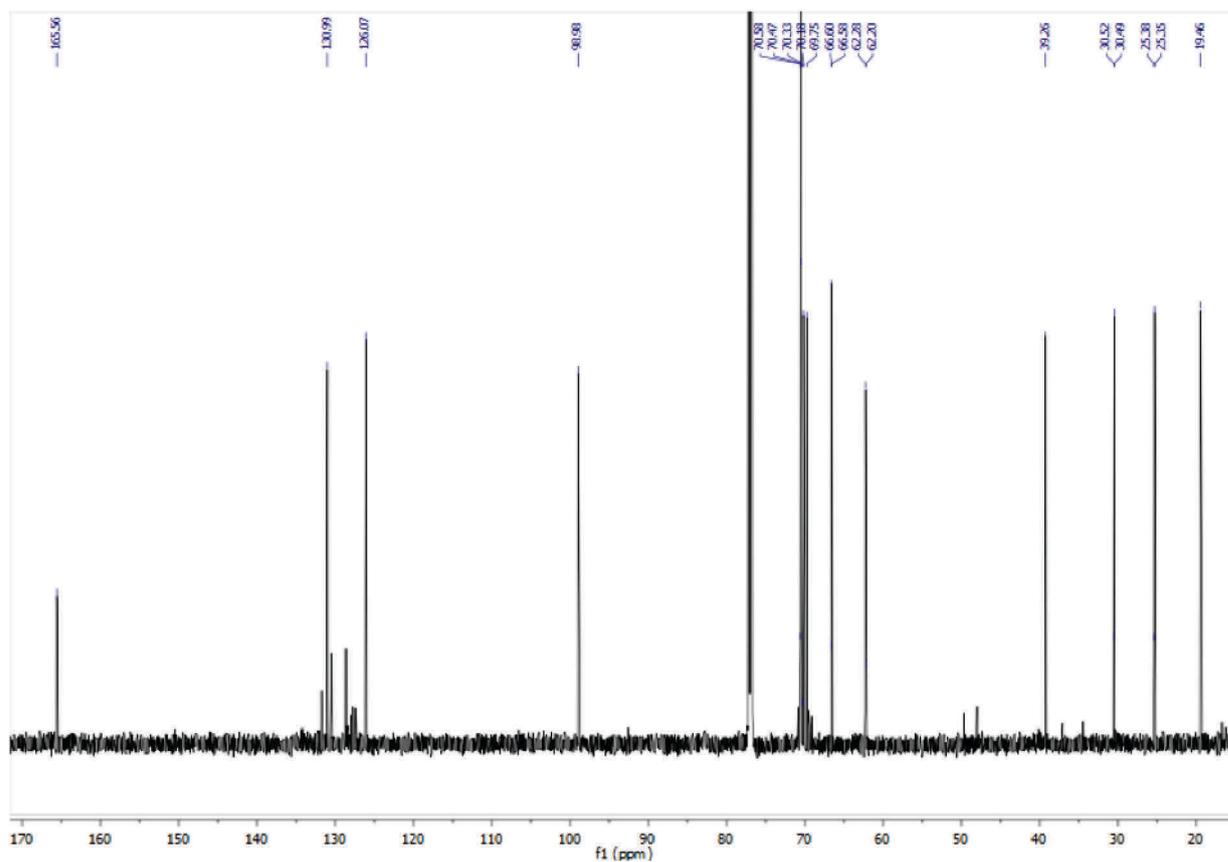
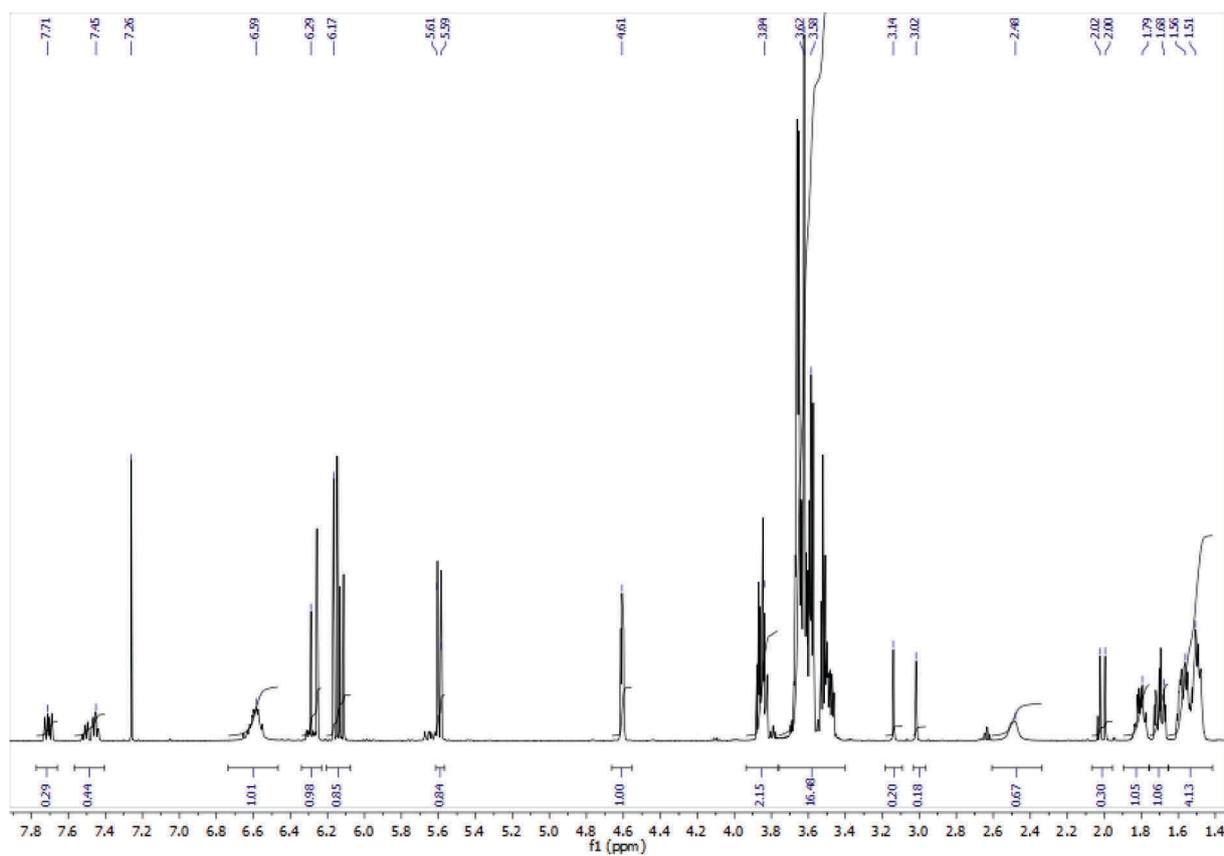
Azoture de 1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy-3,6,9-trioxaundécane-11-yle (3)



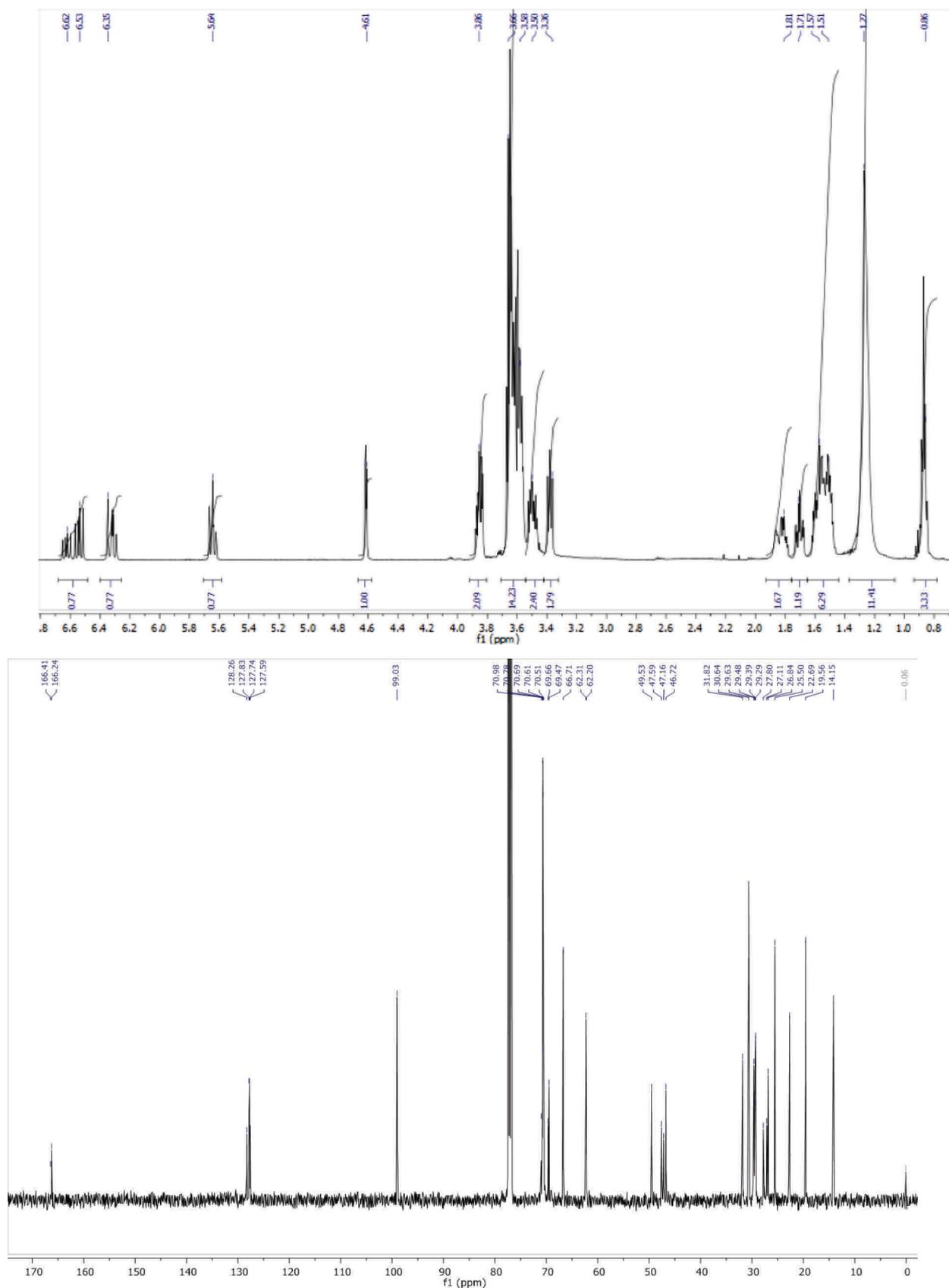
1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy-3,6,9-trioxadécane-11-amine (NH₂-TEG-OTHP) (4)



N-[1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy-3,6,9-trioxaundécane-11-yl]acrylamide (5)



N-octyl-*N*-[1-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy-3,6,9-trioxaundécane-11-yl]acrylamide (6)



7 ANNEXE 2 : SAXS

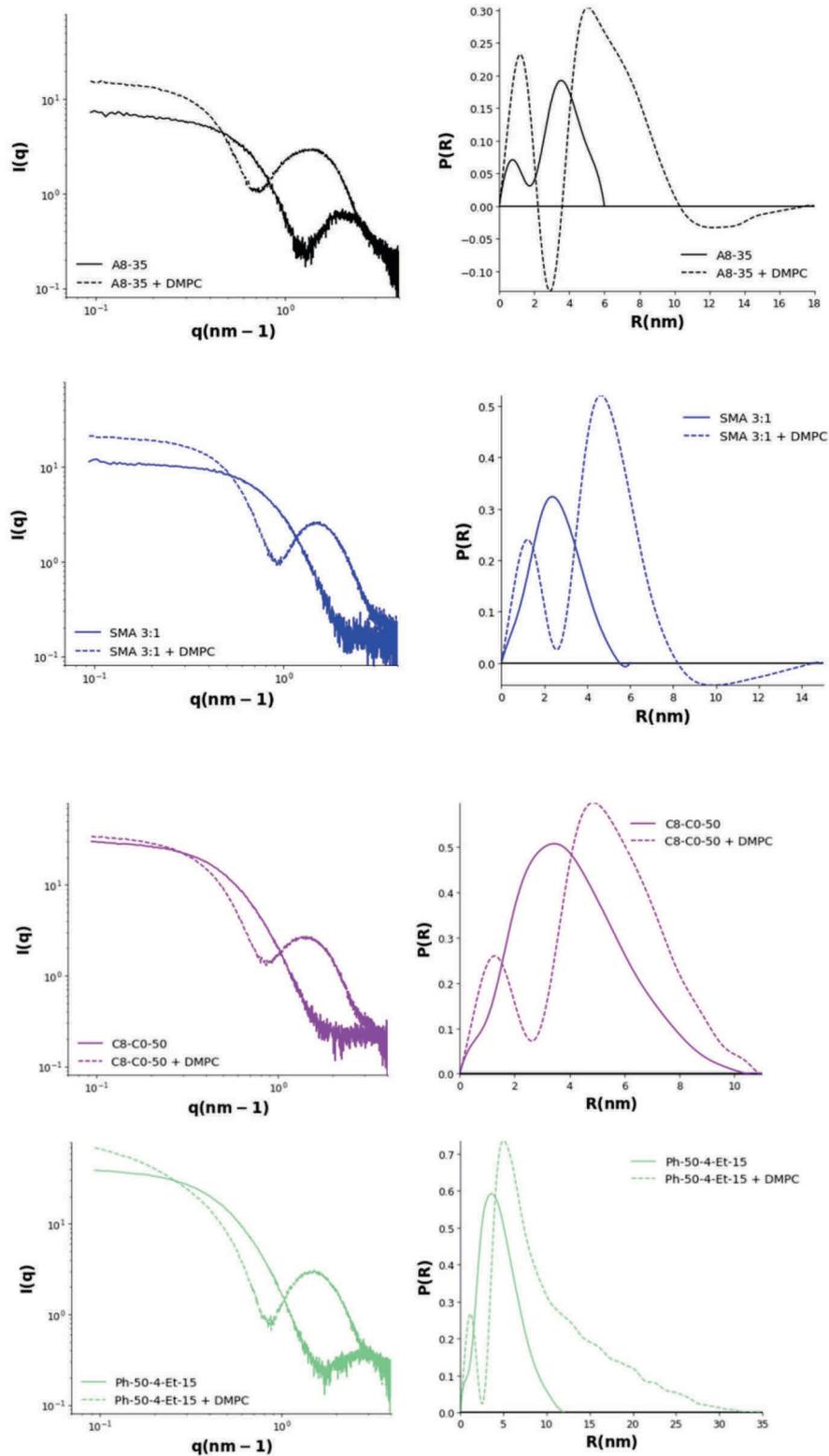


Figure 77. Courbes SAXS des particules DMPC / polymères en comparaison avec les courbes SAXS des polymères seuls en tampon 20 mM phosphate de sodium, 100 mM NaCl, pH 7,0 (panneaux de gauche) et $P(R)$ en fonction du rayon (panneaux de droite). Dans le cas des polymères seuls, la concentration est de 10 g/L. Pour les complexes DMPC / polymères, les concentrations respectives utilisées sont de 8 g/L et 10 g/L, ces échantillons ont été analysés après 24 h d'incubation à température ambiante.

Liste des éléments sous droits

N° figures	Légende	N° de page
1	Différents modèles de membranes	17
4	Description du paramètre d'empilement	20
8	Description des étapes à réaliser pour incorporer une PM dans des NDs	24
16	Voies de synthèses des différentes générations de NAPols.	35
47	Dosage d'une activité ATPasique par enzymes couplées	113
73	CRP effectuée par RAFT d'un monomère M	145