



Étude des mécanismes de translocation des peptides pénétrateurs de cellules : approche en microfluidique, électrophysiologie et mesures de forces

Simon Kulifaj

► To cite this version:

Simon Kulifaj. Étude des mécanismes de translocation des peptides pénétrateurs de cellules : approche en microfluidique, électrophysiologie et mesures de forces. Biophysique. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS598 . tel-02477963

HAL Id: tel-02477963

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02477963>

Submitted on 13 Feb 2020

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

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

THÈSE DE DOCTORAT DE SORBONNE UNIVERSITÉ

Spécialité : BioPhysique

École doctorale n°388 : Chimie physique et chimie analytique de Paris Centre

réalisée

au Laboratoire des BioMolécules (LBM)
et au Laboratoire Interfaces Systèmes Electrochimiques (LISE)

sous la direction de Sophie Cribier & Nicolas Rodriguez (LBM),
Vincent Vivier & Kieu Ngo (LISE)

présentée par

Simon Kulifaj

pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE SORBONNE UNIVERSITÉ

Sujet de la thèse :

**Étude des mécanismes de translocation des Peptides
Pénétrateurs de Cellules**

approche en microfluidique, électrophysiologie et mesures de forces

soutenue le 18 Septembre 2018

devant le jury composé de :

Mme Isabel D. Alves	Rapporteure
M Carlos Marques	Rapporteur
Mme Sylvie Hénon	Examinatrice
Mme Stephanie Bonneau	Examinatrice
M Frédéric Pincet	Examineur
M Kieu Ngo	Directeur de thèse
M Nicolas Rodriguez	Invité (Co-encadrant)

*À mes parents qui m'ont accompagné et encouragé tout au long de
ma vie étudiante et sans qui je ne serais pas arrivé jusqu'ici ...*

Remerciements

J'aimerais dans ce préambule adresser tous mes remerciements aux nombreuses personnes qui ont participé de près ou de loin à cette thèse. Ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans votre aide et votre soutien. Sachez que je vous en suis profondément reconnaissant.

Tout d'abord j'adresserais un grand merci à mes directeurs de thèse. J'ai appris récemment qu'il était parfois difficile pour un doctorant d'avoir deux ou trois encadrants, sans doute à cause de problèmes de communication, je dois dire ici que je ne comprends pas pourquoi ! Peut-être qu'à partir de 4 les difficultés disparaissent ! Plus sérieusement merci pour la façon dont vous avez su encadrer ma thèse, je n'ai pas souvenir qu'il y ait eu un seul moment de tension entre nous ou des doutes quant au travail que j'ai pu (parfois) fournir, du moins vous êtes vous gardés de les partager avec moi. Sans doute que nos intermèdes gastronomiques ont participé à la cohésion du groupe... Pour être plus précis, merci Sophie pour ta rigueur scientifique (et linguistique), Vincent pour ta patience lorsqu'il a fallu combler certaines de mes lacunes en électrochimie, Kieu pour ta disponibilité (lorsque que tu ne fais pas un passage par l'Australie!!) et ton aide lorsqu'il a fallu s'adresser aux différents collaborateurs et Nico pour ta gentillesse qui n'a pas d'égale et surtout merci à vous quatre pour la bienveillance dont vous avez fait preuve envers moi, je crois que ce que vous m'avez apporté au cours de ces trois années va bien au delà du cadre professionnel.

Je remercie également les doctorants du LBM : Pierre, Mehdi, Fred, Seb, Claudia, Didier, Leïla, Pauline, Bingwei et Alex avec qui j'ai eu la chance de partager le bureau au 4^e étage. Merci à ceux du 5^e, partis au cours de ma thèse ou encore là pour quelques temps, et particulièrement à Damien qui m'a apporté le journal L'équipe tous les jours depuis plus d'un an (sauf les jeudis malheureusement puisque tu n'allais pas "à la salle" !), à Delphine qui m'a préparé patiemment des millions de cellules, à toute l'équipe 2 du LBM pour leurs remarques pertinentes au cours des différentes réunions et plus généralement l'ensemble du personnel du LBM qui a su m'apporter de l'aide, d'un point de vue scientifique ou administratif, chaque fois que j'en ai eu besoin. Un grand merci à l'ensemble des membres du LISE que j'ai eu moins l'occasion de rencontrer mais qui ont toujours su m'apporter leur aide à chacune de mes apparitions dans leur labo : Martine et Isabelle pour le côté administratif, Damien pour l'impression 3D et Mireille pour le temps que je t'ai fait perdre en te demandant des conseils, un produit par ci, une pipette par là... Merci à Simon et David ainsi qu'aux autres doctorants du LISE. Merci à l'ensemble des stagiaires qui ont fait un excellent travail au cours de ce projet ! Finalement, merci à Sandrine Sagan et Francois Huet, directeurs du LBM et du LISE, de m'avoir accueilli dans ces deux laboratoires d'exception et de m'avoir fait l'honneur de suivre mon projet en vous rendant disponible malgré un emploi du temps assurément chargé.

Ce travail n'a pas été réalisé seul, il est le fruit de plusieurs collaborations que j'aimerais remercier chaleureusement : Loïc Becerra de L'INSP pour la préparation des masques en

chrome, Guillaume Schelcher, Guillaume Lafitte, Olivier Lesage et Nawel Cherkaoui pour leurs conseils et la formation qu'ils m'ont apportés à l'IPGG lors de la préparation des puces microfluidiques. Un grand merci aux collaborateurs du laboratoire de physique statistique de l'ENS : Frédéric Pincet, Christine Gourier, Éric Pérez et Rachid Thiam pour l'aide apportée sur les techniques de BFP et de BIG ainsi que pour leur culture scientifique qu'ils ont partagé avec moi. J'aimerais ici profondément remercier Rachid de m'avoir poussé à aller voir Sophie et Nicolas dans le but de faire ma thèse avec eux à un moment où j'avais presque définitivement abandonné l'idée de faire une thèse : je serais, à coup sûr, passé à côté de 3 années formidables ...

Merci également aux membres de mon jury de thèse d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Pour conclure quant à ces remerciements, je crois sincèrement qu'il est impossible de réussir professionnellement, en particulier un travail de thèse, sans être épanoui dans sa vie personnelle. Pour cela je dois dire un IMMENSE merci à ma famille et à mes amis. Merci donc à mes parents qui m'ont toujours soutenu et accompagné et qui m'ont permis, par leurs attentions, leurs encouragements et leurs conseils, d'arriver jusqu'ici ! Vous êtes et serez toujours une source d'inspiration pour moi. Une pensée pour mon grand frère qui montre la voie, pour ma soeur qui me reprend lorsque mon accent m'échappe et pour Laure... Merci à Geneviève et Léo Binama d'avoir permis que j'ai un toit au dessus de la tête au début et à la fin de ma thèse lorsque je n'avais plus d'appartement. Merci à Claudia qui, par son attention envers moi et son exigence, me rend chaque fois un peu meilleur.

Merci à Fifou mon pote de toujours, Julien, Léo (tu me dois quelques cafés!!), mes colocs pour ces presque trois années de vie commune, les copains du rugby, "la famille" qui, on le sait, dirigera un jour l'économie mondiale une fois que Gab en aura fini avec sa dévotion sans limite pour ses potes et qu'il s'attellera enfin au site de famille. Plus généralement, merci à tous mes amis de PC et d'ailleurs que je ne citerais pas ici par peur d'en oublier, mais qui m'ont, à un moment ou à un autre, remonté le moral ou ont tout simplement partagé un moment de bonheur avec moi. Vous avez tous fait de moi quelqu'un d'épanoui.

Merci à tous

Table des matières

Introduction	1
I Les Peptides pénétrants, une voie d'entrée dans les cellules	3
I.1 La cellule et sa membrane	3
I.1.1 La cellule comme compartiment	3
I.1.2 La membrane cellulaire comme rempart imperméable ?	4
I.2 Découverte des CPPs et catalogue	6
I.2.1 Les CPP naturels	8
a) Tat	8
b) La Pénétratine	9
I.2.2 Les CPP synthétiques	11
a) Le Transportane	11
b) Pep-1	12
c) Les peptides polyarginines et R_xW_y	12
I.3 Voies d'entrées et mécanisme lors de l'internalisation des CPPs	13
I.3.1 L'endocytose	13
I.3.2 La translocation	14
I.3.3 Et pour les CPP : endocytose ou translocation ?	14
I.3.4 Les CPP, dans quel but ?	16
II Mesure de force et électrophysiologie en présence de peptides pénétrants	19
II.1 Mesure de force à l'échelle de la molécule unique : différentes techniques	19
II.1.1 Surface Force Apparatus (SFA)	19
II.1.2 Microscope à force atomique (AFM)	21
II.1.3 Pincettes Optiques et Magnétique	24
II.1.4 BioMembrane Force Probe (BFP)	26
II.2 Le BFP et les peptides pénétrants	26
II.2.1 Mise en place et protocole	26
a) Réduction du bruit mécanique	28
b) Montage et chambre d'expérimentation	29
c) Les pipettes	30
d) La Pénétratine	30
e) La sonde de force	31
f) Les cellules et vésicules	31
g) Mesures et acquisition des données	32

TABLE DES MATIÈRES

II.2.2	Résultats	34
II.3	L'électrophysiologie et le patch-clamp	35
II.3.1	Historique et principe de l'électrophysiologie	35
II.3.2	Électrophysiologie et CPP	37
II.4	Couplage des mesures de force et d'électrophysiologie	38
II.4.1	Mise en place et protocole	39
a)	Les pipettes	39
b)	Les milieux cellulaires	39
c)	Acquisition des mesures électriques	40
II.4.2	Les résultats	40
III	L'activité des CPPs sur des membranes modèles	45
III.1	Les membranes artificielles comme modèle	46
III.1.1	Les vésicules	46
a)	Les vésicules multilamellaires (MLV)	47
b)	Les petites vésicules (SUV)	47
c)	Les grandes vésicules (LUV)	47
d)	Les vésicules géantes (GUV)	48
e)	Les vésicules géantes de membrane plasmique (GPMV)	49
III.1.2	Les membranes supportées	49
III.1.3	Les membranes suspendues	50
III.1.4	Les nano-disques membranaires	51
III.1.5	Les bicouches à l'interface de goutte, BIG	52
III.2	Les Bicouches à l'interface de gouttes en présence de peptides pénétrants	56
III.2.1	Le principe	56
III.2.2	Mise en place et protocole	56
a)	La phase aqueuse	57
b)	La phase hydrophobe	57
c)	Les Peptides	57
d)	Le dépôt pour observation	58
e)	Mesures et acquisition des données	58
III.2.3	Le contrôle du potentiel membranaire	59
III.3	Caractérisations des BIGs	61
III.3.1	L'asymétrie des bicouches	61
III.3.2	Épaisseur et résistance des BIG	64
III.4	Étude de la translocation des CPP à l'aide des BIG	67
III.4.1	Impact de différents lipides sur la translocation	68
III.4.2	Impact de l'asymétrie sur la translocation	72
III.4.3	Conclusion et perspective	73
IV	Microfluidique et automatisation de la formation des BIG	77
IV.1	Microfabrication et développement de notre outil	77
IV.1.1	La lithographie molle ou "soft-lithography"	78
IV.1.2	L'impression 3D	80
IV.1.3	Former des gouttes en microfluidique	81
IV.2	Mise en place du système	84

TABLE DES MATIÈRES

IV.2.1 Détermination de la géométrie de notre système	84
IV.2.2 Matériel et méthode	85
a) Préparation des puces microfluidiques	85
b) Préparation des solutions	87
c) Le système FLUIGENT de contrôle des flux	87
IV.3 Résultats	88
IV.3.1 Formation des BIG à l'aide de différentes puces microfluidiques	88
IV.3.2 Étude de la tension interfaciale entre la phase aqueuse et la phase huile	95
Conclusion	100
A Communication orale "BPS2018"	103
B Programme Matlab pour le traitement des données du BFP	105
C Fichiers OpenScad	109
D Probabilité des événements d'adhésion	119
Bibliographie	121

TABLE DES MATIÈRES

Introduction

Les différents traitements thérapeutiques et les activités de diagnostic sont limités par la capacité que possèdent les molécules bioactives, les médicaments ou les agents de contraste à entrer dans les cellules. Ces molécules sont souvent introduites dans l'organisme en large excès afin qu'une infime fraction parvienne à atteindre sa cible, le reste étant dégradé par l'organisme sans atteindre sa cible. Depuis plus de vingt ans et la découverte des peptides pénétrants ou "Cell Penetrating Peptide" (CPP), une alternative à la délivrance de ces produits semble avoir été trouvée. En effet ces peptides ont la capacité de traverser la membrane cellulaire et d'entrer dans les cellules avec une cargaison, ouvrant une nouvelle voie pour la vectorisation. Du fait de leur découverte relativement récente, les mécanismes moléculaires de la traversée de la membrane cellulaire sont encore mal caractérisés. Une meilleure compréhension du fonctionnement de ces CPP permettrait une utilisation efficace de ces peptides dans un but thérapeutique.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ma thèse, réalisée en collaboration entre le Laboratoire des BioMolécules (LBM) et le Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques (LISE) sous la direction de Sophie Cribier, Nicolas Rodriguez, Vincent Vivier et Kieu Ngo. Nous avons suivi une approche biophysique et utilisé différentes techniques issues de la physique : la mesure de force, les mesures électriques et la microfluidique, appliquées à la biologie dans le but d'étudier les mécanismes d'internalisation des CPP. Ces mécanismes, sur lesquels nous reviendront, sont de deux types : l'endocytose et la translocation. Nous avons cherché à obtenir une description cinétique et énergétique des différentes étapes de la translocation des CPP : l'adhésion, l'insertion puis la traversée de la membrane. C'est pourquoi nous avons développé deux axes de travail : l'un consiste à mettre au point un outil couplant mesure de force et électrophysiologie pour faire des mesures directement sur des cellules vivantes et le second, utilisant la microscopie de fluorescence et la microfluidique, permet une approche du problème de l'internalisation des CPP sur système modèle.

Ce manuscrit se propose de retranscrire le travail effectué durant ces trois années de thèse. Il comporte quatre parties distinctes. Un premier chapitre est dédié à la présentation générale des peptides pénétrants et au positionnement du sujet de cette thèse par rapport à l'état des connaissances de la communauté scientifique. Le second chapitre présente le premier axe de travail de notre étude : le couplage des mesures de force et d'électrophysiologie. Le troisième s'attache à décrire les expériences sur système modèle. Finalement le quatrième chapitre est consacré au développement en microfluidique que nous avons réalisé pour l'automatisation de la formation de systèmes modèles pour l'étude de l'internalisation des peptides pénétrants. Chacun des chapitres est construit de façon à présenter la technique utilisée de façon générale ainsi que les matériels et méthodes spécifiques à cette partie avant d'exposer les résultats obtenus dans le cadre de notre étude.

TABLE DES MATIÈRES

I – Les Peptides pénétrants, une voie d'entrée dans les cellules

I.1 La cellule et sa membrane

I.1.1 La cellule comme compartiment

Si les peptides pénétrants ou "Cell Penetrating Peptide" (CPP) sont le sujet de cette thèse, la cellule est l'environnement dans lequel ils interagissent, leur terrain de jeu ! Une cellule est l'élément de base de tous les êtres vivants, elle représente la brique élémentaire du vivant. Elle permet de compartimenter et cloisonner des milieux réactionnels. L'apparition de cette compartimentation serait d'ailleurs une des étapes essentielles dans l'apparition du monde vivant. Une cellule est donc un milieu confiné, présentant un intérieur et un extérieur séparés par la membrane plasmique, avec une composition différente pour chacun des milieux. Nous nous concentrerons ici sur les cellules eucaryotes (figure I.1), constituant les organismes pluricellulaires et cibles des peptides pénétrants.

Cette compartimentation se retrouve également au sein même de la cellule où des sous-compartiments, appelés organites (ou organelles), sont présents dans un milieu aqueux, le cytosol (ou cytoplasme). Cette séparation en différents compartiments soulève la question de l'adressage des composants biologiques. En effet le bon fonctionnement d'une protéine impose une localisation précise or les protéines sont rarement produites sur leur lieu d'action. Cela implique de transporter ces composants biologiques vers leurs compartiments cibles au sein de la cellule qui peuvent être :

- **Les endosomes** qui sont des vésicules à l'intérieur des cellules. Il en existe plusieurs types et ils n'ont pas le même rôle. Les endosomes précoces ("early endosomes"), situés en périphérie du cytoplasme, vont permettre de dissocier et trier ligands et récepteurs où un pH légèrement acide (6 – 6,8) minimise les risques d'endommagement des protéines qu'il va être possible de réutiliser tandis que les endosomes tardifs ("late endosomes") et les lysosomes présentent un pH plus acide (~ 5) et sont responsables de la dégradation des composés biologiques en vue de leur recyclage.
- **Le noyau** est le lieu où se retrouve l'information génétique de la cellule et de l'organisme. Les brins d'ADN y sont transcrits et répliqués. Il permet de réguler l'expression des gènes.
- **Les mitochondries** sont les usines à énergie de la cellule. Elles fournissent l'énergie par le biais de réactions d'oxydo-réduction qui sont couplées à la production de l'adénosine triphosphate (ATP), source d'énergie des réactions en biologie. Ces réactions au sein de la mitochondrie constituent la respiration cellulaire.

CHAPITRE I. LES PEPTIDES PÉNÉTRANTS, UNE VOIE D'ENTRÉE DANS LES CELLULES

- Et d'autres encore pour lesquels nous ne rentrerons pas dans les détails tels que **le réticulum endoplasmique** ou **l'appareil de Golgi** qui servent notamment à la maturation des protéines, à synthétiser et trier les molécules biologiques de la cellule.

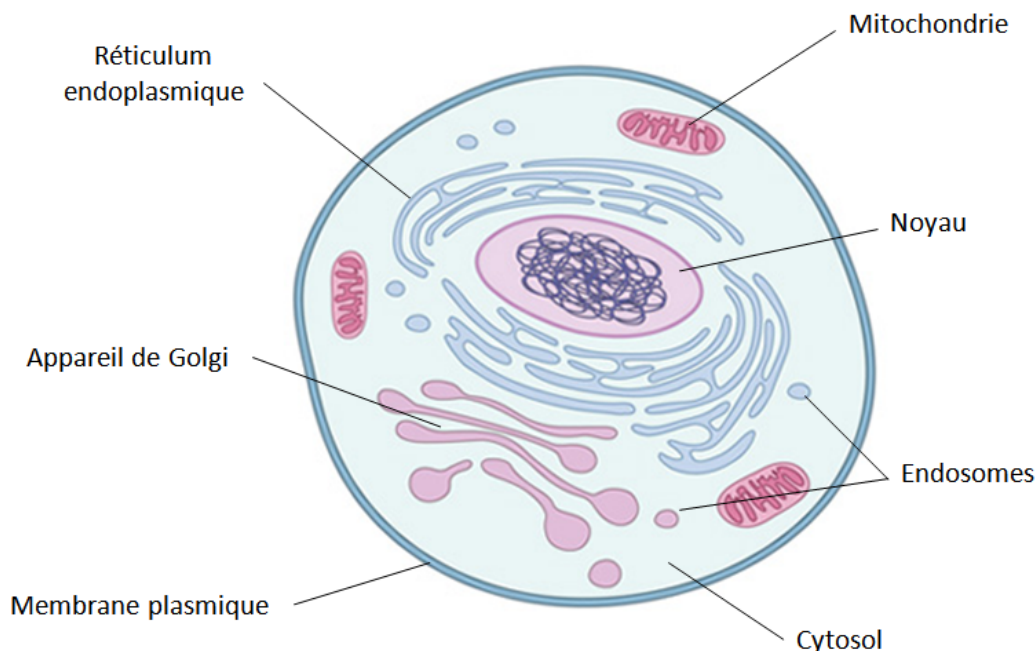


Fig. I.1 Schéma d'une cellule eucaryote et de ses différents constituants. ©2010 Nature Education.

Tout comme la cellule avec la membrane plasmique, les organites intracellulaires sont définis par un intérieur et un extérieur délimités par une membrane. Ces membranes ont chacune leurs spécificités mais sont principalement composées de deux constituants : des protéines et des lipides. L'objet de cette thèse est justement l'étude de molécules capables de traverser ces membranes pour transporter efficacement une cargaison vers ces différents compartiments. Dans la suite de ce chapitre nous nous concentrerons sur la membrane plasmique et les différentes façons de la traverser.

I.1.2 La membrane cellulaire comme rempart imperméable ?

La membrane plasmique est donc un rempart plus ou moins imperméable (comme nous le verrons par la suite, cf. I.3) isolant l'intérieur de la cellule de l'extérieur. Ce rôle de barrière est assuré par les lipides qui s'organisent en bicouche. Les lipides sont des molécules amphiphiles constituées d'une tête polaire hydrophile (souvent chargée ou zwitterionique), et d'une partie apolaire hydrophobe (des chaînes carbonées). Dans la bicouche les têtes polaires sont tournées vers l'extérieur et les chaînes carbonées constituent le cœur qui représente un environnement hydrophobe défavorable pour les molécules hydrophiles et en particulier les ions. Au sein de ces lipides se retrouvent les protéines membranaires, insérées dans la bicouche, ainsi qu'un ensemble de glucides assemblés en chaîne d'oligosaccharides chargés négativement, liés covalamment aux lipides (les glycolipides) ou aux protéines (les glycoprotéines) et

qui pointent vers l'extérieur de la cellule. Ces modifications des lipides et protéines, appelées glycosylation, sont post-traductionnelles et se produisent dans l'appareil de Golgi. Ce "manteau" à la surface des cellules est appelé glycocalyx. Ces différents constituants forment un ensemble "fluide" dans lequel les lipides et les protéines diffusent en permanence. C'est le modèle de la mosaïque fluide proposé par Singer et Nicolson [Singer and Nicolson, 1972] (figure I.2).

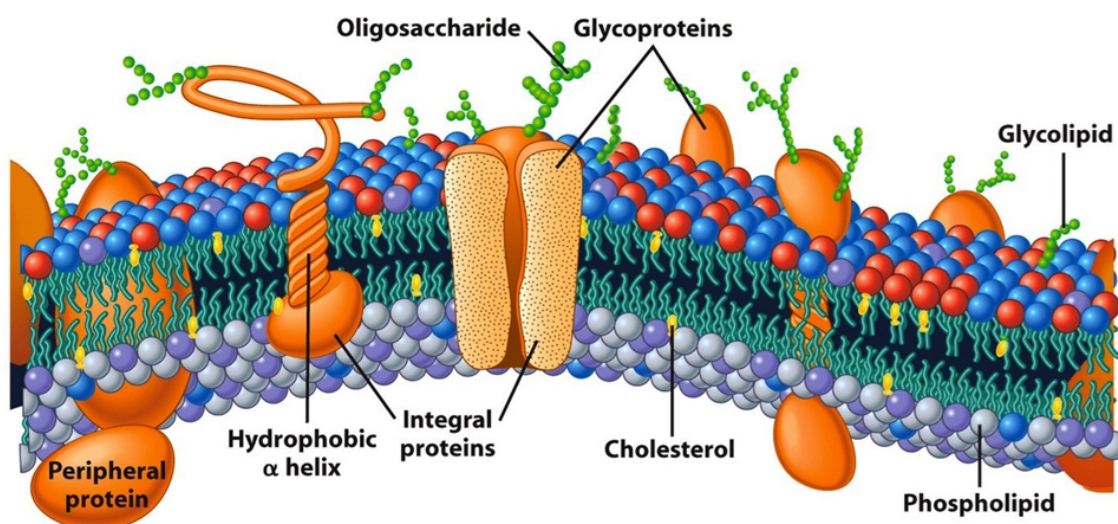


Fig. I.2 Schéma d'une membrane plasmique d'une cellule eucaryote. ©2008 Jonh Wiley & Sons.

Les oligosaccharides du glycocalyx ont un rôle structurant en rigidifiant et augmentant l'adhérence de la cellule, et sont également les premiers partenaires lors d'une interaction à la surface de la cellule. Comme nous le verrons plus loin, certains de ces polysaccharides, aussi appelés glycosaminoglycanes (GAG) semblent jouer un rôle important dans l'interaction des CPP avec les cellules. Ils sont essentiellement de deux types, les sulfates d'héparane (HS) et les chondroïtines sulfates (CS) (figure I.3).

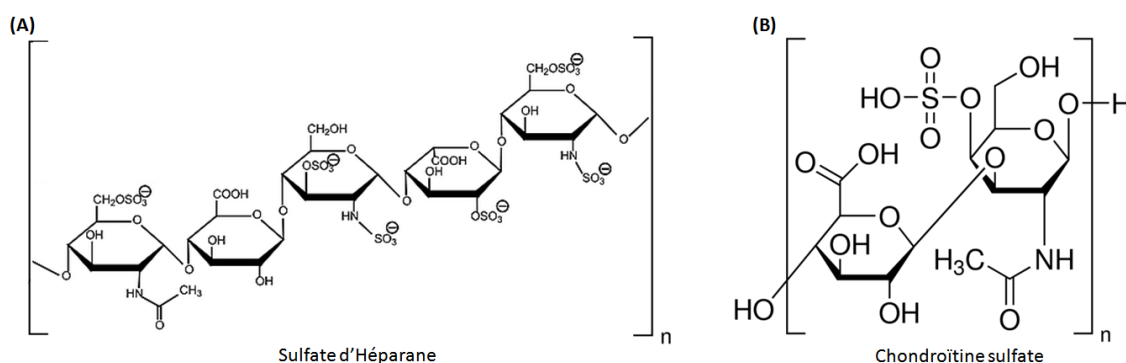


Fig. I.3 Formules semi-développées des sulfates d'héparane (A) et des chondroïtines sulfates (B). D'après le site internet de la compagnie Sigma-Aldrich <https://www.sigmaaldrich.com/>.

CHAPITRE I. LES PEPTIDES PÉNÉTRANTS, UNE VOIE D'ENTRÉE DANS LES CELLULES

Les protéines membranaires jouent plusieurs rôles. Elles peuvent avoir un rôle de production d'énergie (notamment au niveau de la membrane des mitochondries pour la respiration cellulaire), un rôle de transporteur de matière (en formant des canaux d'entrée ou de sortie) ou un rôle de transfert d'information (en fixant des hormones, des facteurs de croissance ou des neurotransmetteurs dans les neurones par exemple). Elles forment des liaisons non covalentes avec les lipides : des interactions polaires avec les têtes des lipides et des interactions apolaires avec le cœur de la membrane formant un ensemble dynamique.

Finalement les lipides sont à la base de la structure membranaire. Ils diffusent au sein de la membrane, couvrant jusqu'à $10 \mu m^2$ par seconde [Thompson et al., 2007] et sont répartis de façon non homogènes. Au sein d'un même feuillet, il semble que des domaines lipidiques puissent se former avec une composition en lipide différente d'un domaine à un autre. Des domaines lipidiques de taille micrométrique (appelés radeaux) ont été abondamment décrits sur des vésicules artificielles (telles que les GUV [Bagatoli and Gratton, 2000] et les GPMV [Baumgart et al., 2007] dont nous parlons au chapitre III.1.1). Dans le cas des membranes cellulaires, les protéines membranaires pourraient recruter certains lipides spécifiquement entraînant une hétérogénéité de répartition lipidique et des domaines de quelques dizaines de nanomètres et transitoires seraient aussi présents [Harder et al., 1998]. Il existe également une asymétrie de composition entre les deux feuillets. La composition en lipides du feuillet externe n'est pas la même que celle du feuillet interne. Cela a été suggéré pour la première fois par Bretscher [Bretscher, 1972]. Cette asymétrie de composition entraîne une asymétrie de charge, les lipides chargés négativement se trouvant plutôt dans le feuillet interne de la membrane, participant au potentiel de repos des cellules.

La membrane est donc une barrière complexe protégeant et confinant l'intérieur de la cellule. En effet, des gaz (oxygène, dioxyde de carbone), de petites molécules telles que les molécules d'eau et d'éthanol ou certains composés hydrophobes tels que les hormones stéroïdes peuvent diffuser lentement à travers la bicouche mais ce n'est pas le cas des molécules plus grosses comme la plupart des composés organiques polaires (tels que le glucose par exemple, ou les différents acides aminés) et des ions inorganiques (K^+ , Ca^{2+} , Na^+ ...) et des molécules hydrophiles plus généralement. Cependant la membrane n'est pas imperméable, la communication et les échanges avec le milieu extérieur sont en effet essentiels à la survie cellulaire. Différents moyens vont alors être mis en place par la cellule pour assurer ces échanges. Par exemple, des protéines membranaires vont permettre le passage de petites molécules comme les ions de façon sélective ou non en formant des canaux ioniques qui vont s'ouvrir ou se fermer dans des conditions particulières : par interaction avec un ligand, par la mise en place d'un gradient chimique ou d'un potentiel électrique. L'endocytose, mécanisme d'internalisation sur lequel nous reviendront plus loin, constitue également une voie d'entrée dans la cellule. Ainsi il est possible pour certaines molécules de traverser la membrane, c'est également le cas, de façon étonnante, pour des peptides pénétrants ou "cell penetrating peptides" (CPP). Ces peptides sont de "grosses" molécules chargées et ont en effet cette capacité d'entrer dans les cellules en traversant la bicouche lipidique.

I.2 Découverte des CPPs et catalogue

La découverte des peptides pénétrants ou CPP (ou encore peptides "troyens") remonte à la fin des années 1980, début des années 1990 avec l'étude de la protéine Tat issue du vi-

I.2. DÉCOUVERTE DES CPPS ET CATALOGUE

rus VIH [Frankel and Pabo, 1988] et l'homéodomaine de la protéine Antennapedia (pAntp), un facteur de transcription de la *Drosophila melanogaster* [Joliot et al., 1991]. Il est alors découvert que ces protéines ont la capacité de franchir la barrière membranaire et d'entrer dans les cellules vivantes. Par la suite, la séquence minimale d'acides aminés issus de Tat et de pAntp (alors nommée Pénétratine) pour assurer l'internalisation dans les cellules a été déterminée et d'autres nombreux CPP ont été découverts. Il est possible de les classer en deux catégories, ceux issus de protéines, les CPP "naturels" (tels que Tat et la Pénétratine) et ceux "synthétiques", créés en laboratoire (tableau I.1). Les CPP sont de petites protéines qui sont rarement constituées de plus d'une trentaine d'acides aminés. Ce sont des molécules chargées positivement pour la plupart qui sont capables de traverser la membrane cellulaire et qui conservent cette propriété lorsqu'ils sont couplés (de façon covalente ou non) à une cargaison telle qu'un brin d'ADN, une autre protéine, des nanoparticules ou des vésicules. Ils sont capables d'entrer dans les cellules par l'intermédiaire de mécanismes dépendants ou non de l'ATP sans nécessairement de reconnaissance par des récepteurs comme nous le verrons au chapitre I.3 suivant.

Les CPP sont donc constitués en partie de résidus basiques chargés positivement permettant ainsi une première interaction électrostatique avec la membrane et le glycocalyx qui présente des charges négatives dues aux polysaccharides comme nous l'avons vu précédemment. Notamment, l'arginine, acide aminé chargé négativement (figure I.4 (A)), semble être crucial pour le caractère pénétrant d'un peptide (ce point est rediscuté plus loin dans ce chapitre, cf b)). Futaki *et al.* [Futaki et al., 2001] ont pu noter que les peptides pénétrants les plus efficacement internalisés sont riches en arginine. De plus, un caractère amphiphile est également souvent présent chez les CPP, une partie de leur séquence présente ainsi des acides aminés hydrophobes. Ainsi le tryptophane, acide aminé hydrophobe (figure I.4 (B)) semble également être un acide aminé important chez les CPP. Bechara *et al.* [Bechara et al., 2013] ont pu déterminer que l'affinité des CPP pour les chondroïtines sulfate et les héparanes sulfate augmente avec le nombre de tryptophanes et que de plus, l'internalisation est plus efficace lorsque les tryptophanes sont plus nombreux dans la séquence des peptides pénétrants.

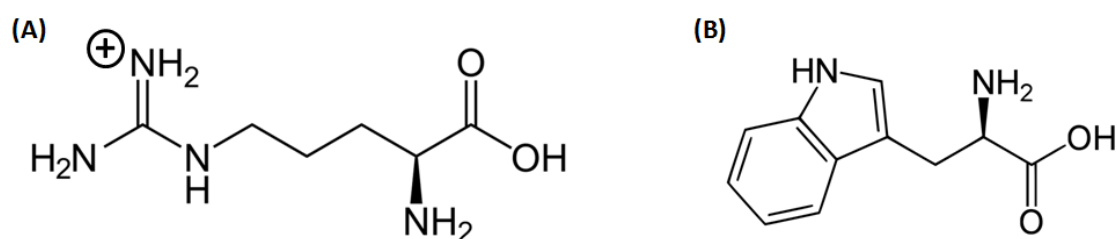


Fig. I.4 Formules semi-développées de l'arginine (A) et du tryptophane (B).

Nous rappelons dans le tableau I.1 certains CPP auxquels nous avons été confrontés au cours de cette thèse.

Nom du peptide	Séquence en acides aminés	Références
Les CPP naturels		
Tat	GRKKRRQRRRPPQC	[Vives et al., 1997]
Pénétratine	RQIKIWFQNRRMKWKK	[Derossi et al., 1994]
Les CPP synthétiques		
Transportan (T10)	GWTLSAGYLLGKINLKA-LAALAKKIL	[Pooga et al., 2017]
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPK-KKRKV	[Morris et al., 2001]
R_9	RRRRRRRRR	[Futaki et al., 2001]
R_6W_3	RRWRRWRR	[Delaroche et al., 2007]
$R_{10}W_6$	RRWRRWRRWRRWRR	[Williams et al., 1997]

Table I.1 Divers CPP auxquels nous avons été confrontés au cours de cette thèse.

I.2.1 Les CPP naturels

a) Tat

Le peptide pénétrant Tat est, comme nous l'avons dit, un dérivé d'une protéine du virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1). Il s'agit des résidus 48 à 60 de la protéine Tat complète comprenant 86 acides aminés qui est impliquée dans le processus de réplication du VIH. Elle permet notamment d'activer l'expression des gènes viraux dans la cellule hôte. Frankel et Pabo ont été les premiers à observer l'internalisation de la protéine entière dans des cellules [Frankel and Pabo, 1988]. Ils ont en effet eu la surprise d'observer que Tat (à une concentration aussi faible que 1 nM) était capable de traverser la membrane cellulaire sans aucun traitement physique ou chimique des cellules. L'utilisation de la chloroquine en présence de Tat marqué radioactivement à ^{125}I a permis de montrer une augmentation de l'internalisation de la protéine et son accumulation au niveau du noyau. Or la chloroquine est une substance qui inhibe l'acidification des endosomes et donc la dégradation des protéines dans les lysosomes. N'étant plus dégradée dans les endosomes, Tat a pu s'accumuler dans le noyau, il s'agit donc d'une preuve indirecte que l'entrée dans la cellule se fait en partie par endocytose. Son caractère de peptide pénétrant a été testé par Fawell *et al.* sur les séquences en résidu 1 à 72 et 37 à 72 de la protéine Tat complète [Fawell et al., 1994]. Ils ont observé l'internalisation de diverses cargaisons couplées à Tat après injection par intraveineuse dans une souris (la β -galactosidase, la horseradish peroxidase, la RNase A et d'une exotoxine de *Pseudomonas*). La séquence présentée dans le tableau I.1 est la plus courte séquence présentant des capacités d'internalisation issue de la protéine entière [Vives et al., 1997]. Tat est un des CPP parmi les plus utilisés aussi bien pour l'étude des mécanismes d'internalisation que pour son usage thérapeutique en temps qu'agent de vectorisation.

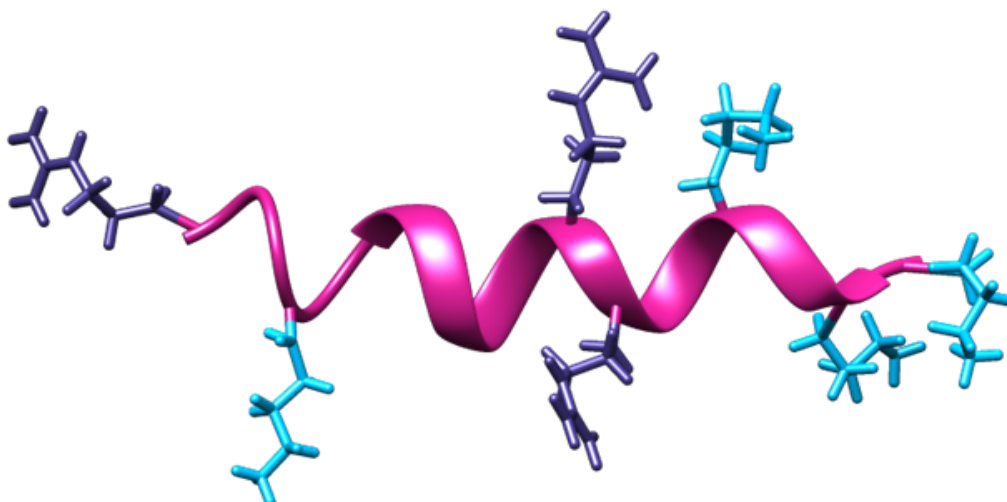


Fig. I.5 Représentation tridimensionnelle à l'aide du logiciel Chimera de la Pénétratine structurée en hélice α , structure qu'elle acquiert au voisinage d'une bicouche lipidique. La structure des résidus chargés (lysine en bleu clair et arginine en bleu foncé) est détaillée. Figure réalisée à partir du logiciel Chimera par Pauline Géhan.

b) La Pénétratine

La Pénétratine est une séquence de 16 acides aminés issue de la troisième hélice de l'homéodomaine d'Antennapedia. Antennapedia est un facteur de transcription qui régule donc l'expression des gènes, l'homéodomaine correspondant à la partie de la protéine (généralement une soixantaine de résidus) structurée en hélices alpha qui est capable de se lier à l'ADN.

C'est en 1991 que Joliot *et al.* observent que l'homéodomaine d'Antennapedia qu'ils ont synthétisé, pAntp, est internalisé efficacement et spontanément par des neurones en culture n'ayant subi aucune préparation particulière (telle que la "trituration") [Joliot *et al.*, 1991]. Ils constatent que pour 2×10^4 neurones et 0,25 à 2 μg de pAntp (une quantité supérieure étant toxique) la protéine est internalisée et s'accumule dans le noyau provoquant la croissance des neurites. Par la suite, Derossi *et al.* ont déterminé la séquence minimale de la Pénétratine permettant son internalisation [Derossi *et al.*, 1994] (tableau I.1). Ils ont observé que la Pénétratine, tout comme pAntp, pouvait être internalisée par les cellules à 4°C, température à laquelle l'endocytose est inhibée, suggérant ainsi qu'il devait exister un autre mécanisme. La séquence de la Pénétratine contient 7 charges positives dues aux résidus arginines et lysines qui la composent mais également deux tryptophanes (en position 6 et 14) qui lui confèrent également un caractère hydrophobe. Cependant l'internalisation de ce peptide ne peut pas être expliquée par le seul caractère hydrophobe des tryptophanes car Derossi *et al.* ont prouvé que la substitution de ces deux acides aminés par deux phénylalanines (également hydrophobes) supprime la capacité d'internalisation de la Pénétratine dans les cellules. La Pénétratine est un CPP non structuré en solution mais qui va former une structure secondaire en hélice alpha (figure I.5) lors de son interaction avec les membranes notamment lorsque celles-ci présentent des lipides chargés négativement ([Maniti *et al.*, 2010]).

CHAPITRE I. LES PEPTIDES PÉNÉTRANTS, UNE VOIE D'ENTRÉE DANS LES CELLULES

Cette conformation et sa séquence en acides aminés lui confèrent un caractère amphiphile : les charges se retrouvant majoritairement sur une face de l'hélice et les résidus hydrophobes (tryptophanes) sur l'autre (figure I.6). Il est probable que ce repliement de la Pénétratine au contact des membranes joue un rôle majeur dans les mécanismes d'internalisation de ce CPP.

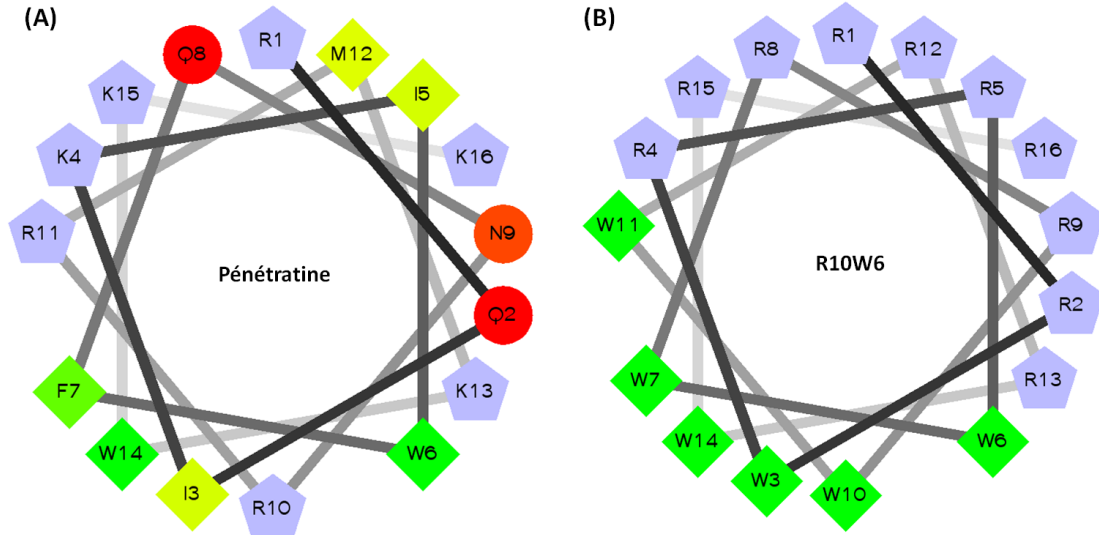


Fig. I.6 Représentation en projection de la structure en hélice alpha de la Pénétratine et de R10W6 parfois appelé Pénétratine synthétique. Les résidus en vert et jaune sont les acides aminés hydrophobes (respectivement fortement et faiblement hydrophobe), les résidus en rouge sont les acides aminés hydrophiles et les pentagones bleus représentent des résidus potentiellement chargés positivement. (A) Pour la Pénétratine on remarque que la partie inférieure de l'hélice présente un caractère hydrophobe et la supérieure un caractère hydrophile. (B) Ce caractère est encore plus marqué avec R10W6. Figure réalisée à partir du site <http://r2lab.ucr.edu/>.

L'importance des résidus arginines dans les séquences des peptides pénétrants a également été démontrée en utilisant la Pénétratine [Amand et al., 2008]. Amand *et al.* mesurent la quantité de peptide internalisé dans des cellules CHO-K1 et comparent la Pénétratine avec penArg (**RQIRIWFQNRRMRWRR**, où les lysines sont remplacées par des arginines) et penLys (**KQIKIWFQNKKMKWKK**, où les arginines sont remplacées par des lysines). L'internalisation est observée pour des concentrations de peptide à 1 μM , 5 μM et 10 μM . Pour chacune des concentrations, les auteurs de l'étude constatent qu'un taux élevé en arginine dans la séquence des peptides favorise l'internalisation : penArg est le peptide le plus internalisé puis la pénétratine puis penLys, avec environ un ordre de grandeur entre penLys et penArg (figure I.7). Cela signifie que la charge seule et l'interaction électrostatique ne sont pas le seul critère pour la traversée de la membrane plasmique mais que l'interaction spécifique de l'arginine avec la membrane est également importante.

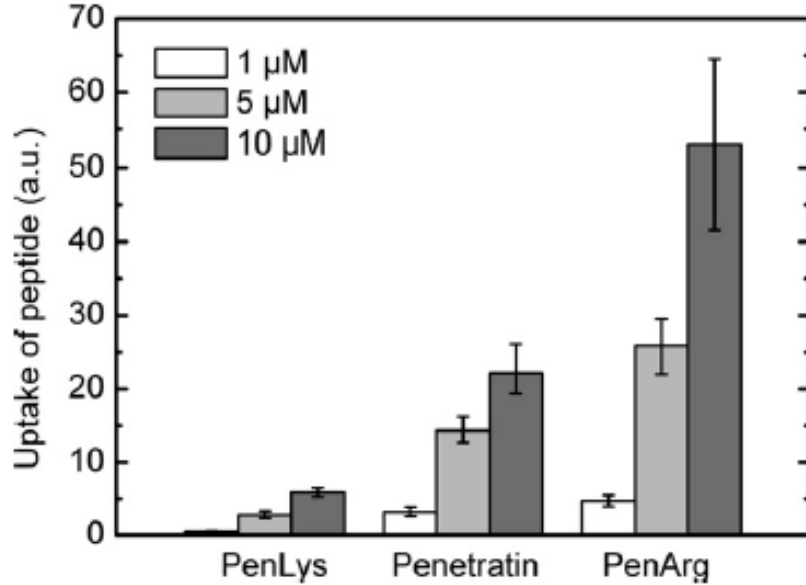


Fig. I.7 Quantité de *penLys*, *Pénétratine* et *penArg* internalisée dans des cellules *CHO-K1* pour une heure d'incubation à 37°C. Les colonnes représentent la moyenne de neuf expériences réalisées en triplicata [Åmand *et al.*, 2008].

I.2.2 Les CPP synthétiques

Les CPP synthétiques, ou qui ne sont pas issus de protéines naturelles, sont de deux types. Le premier type, chimérique, résulte du couplage covalent entre deux protéines (ou deux morceaux de protéines) et le second type, tels que les polyarginines ou les R_xW_y , sont des purs produits de laboratoire. Ils sont le fruit d'une réflexion sur les caractéristiques minimales pour faire d'un peptide un CPP.

a) Le Transportane

Le Transportane est donc un peptide chimérique issu du galaparane couplant via une lysine (K) la galanine et le mastoparane qui forme un peptide de 27 résidus (**GWTLNSAGYL** **LG-K-INLKALAALAKKIL**, la séquence en gras est issue de la galanine et celle en italique du mastoparane). La galanine (30 acides aminés, GWTLNSAGYLLGPHAVGNHRFS SDKN-GLTS) affecte le système nerveux et est impliquée dans le relargage de l'insuline. Le mastoparane (14 acides aminés, INLKALAALAKKIL) est une toxine issue du venin de guêpe, c'est un peptide amphiphile qui inhibe l'activité de $Na^+, K^+ - ATPase$. Le peptide chimérique galaparan possède lui une forte affinité pour les récepteurs à la galanine, stimule l'activité de $Na^+, K^+ - ATPase$ [Langel *et al.*, 1996] et possède étonnamment la capacité de s'internaliser dans les cellules. L'internalisation du galaparane, renommé Transportane par Pooga *et al.* s'observe aussi bien à 37°C qu'à 4°C et en présence d'inhibiteur de l'endocytose [Pooga *et al.*, 2017] ce qui amène à la conclusion que son entrée dans la cellule ne se fait probablement pas par un mécanisme d'endocytose. Pooga *et al.* ont constaté que son internalisation est maximale au bout de 20 minutes à 37°C et qu'elle ne semble pas dépendre

CHAPITRE I. LES PEPTIDES PÉNÉTRANTS, UNE VOIE D'ENTRÉE DANS LES CELLULES

du type cellulaire.

b) Pep-1

Le peptide Pep-1 (21 acides aminés, KETWWETWWTEWSQPKKKRKV) est également un peptide chimérique constitué par trois séquences aux origines et fonctions différentes. La première partie (KETWWETWWTEW) est une séquence hydrophobe et riche en tryptophanes qui interagit de façon hydrophobe avec les protéines. La deuxième partie (KKKRKV) est une séquence riche en lysine et donc hydrophile, elle provient de l'antigène T du virus SV40 (simian virus 40) qui permet d'augmenter la solubilité du peptide vecteur et son entrée dans la cellule. Enfin la dernière partie (SQP) fait le lien entre les deux précédentes, c'est une séquence "espaceur" qui donne une certaine flexibilité aux domaines hydrophile et hydrophobe [Morris et al., 2001]. Pep-1 se retrouve rapidement internalisé (en moins de 10 minutes) dans des cellules HS68 aussi bien à 37° qu'à 4°C. La toxicité cellulaire de Pep-1 a été déterminée comme étant supérieure à 100 μM .

c) Les peptides polyarginines et R_xW_y

Comme nous l'avons déjà vu, il semble que l'arginine ainsi que le tryptophane jouent un rôle prépondérant dans l'internalisation des CPP. Des mutations spécifiques de ces acides aminés sur les peptides naturels entraînent souvent une perte du caractère pénétrant. Des peptides synthétiques dont la séquence ne contient que ces deux seuls résidus ont donc été étudiés et leur caractère pénétrant a été observé.

Les peptides polyarginines sont ceux qui s'internalisent le plus efficacement dans la liste des peptides polycationiques (polylysines, polyhistidine et polyornithine). Parmi eux, les polyarginines à 7, 8 et 9 résidus sont efficacement internalisés avec un maximum d'internalisation pour le nonamère de D-arginine, R_9 [Mitchell et al., 2000]. Ces peptides s'internalisent aussi bien à 37° qu'à 4°C, ce qui amène à la conclusion que l'endocytose n'est pas le seul mécanisme associé à la traversée de la membrane plasmique.

Williams *et al.* ont eu l'idée d'utiliser une séquence (RRWRRWRRWRRWRR) inspirée de la Pénétratine mais en utilisant seulement les résidus arginines et tryptophane considérés comme des acides aminés essentiels pour assurer le caractère pénétrant des CPP [Williams et al., 1997]. Ils ont couplé ce peptide ($R_{10}W_6$) à un facteur de croissance et ont constaté que l'ensemble pouvait pénétrer dans des cellules et que le facteur de croissance gardait son activité. La projection de l'hélice alpha de ce peptide dérivé de la Pénétratine est présenté à la figure I.6 et révèle un caractère amphiphile encore plus marqué que pour la Pénétratine. Cela pourrait expliquer le "caractère CPP" de $R_{10}W_6$ et être relié à son mécanisme d'internalisation.

Delaroche *et al.* ont décrit en 2007 les propriétés d'un nonapeptide R_6W_3 (RRWRRWRR) présentant un "caractère CPP" [Delaroche et al., 2007]. Par une technique de quantification en spectrométrie de masse (MALDI-TOF) ils ont pu observer que ce peptide pénétrait de façon plus efficace que d'autres CPP (tat, R_9 et Pénétratine) dans des cellules CHO-K1, qu'il n'était pas toxique pour les cellules et que sa voie de dégradation ne transitait pas par les lysosomes ce qui impliquerait que l'endocytose ne soit pas sa seule voie d'internalisation. Cette étude confirme que les résidus arginine et tryptophane sont suffisants pour promouvoir un caractère pénétrant.

I.3 Voies d'entrées et mécanisme lors de l'internalisation des CPPs

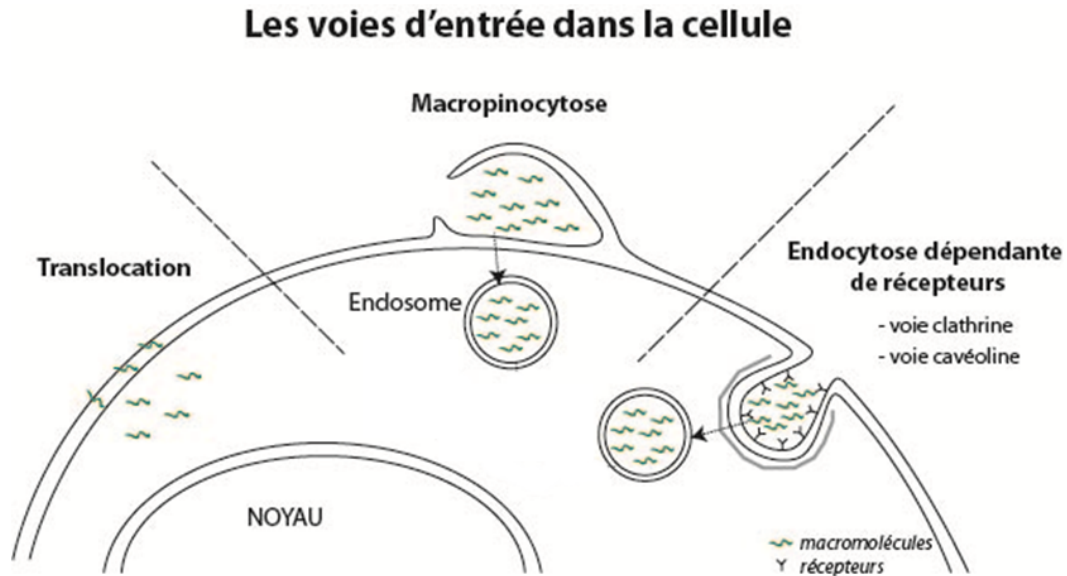


Fig. I.8 Les différentes voies d'entrée dans la cellule.

Comme nous l'avons vu, la membrane plasmique isole l'intérieur de la cellule du milieu extracellulaire mais il est vital qu'il y ait des échanges, c'est pourquoi c'est en réalité une barrière de perméabilité sélective et contrôlée. La cellule a développé différents mécanismes pour internaliser les molécules essentielles à son bon fonctionnement. Ces mécanismes sont nombreux, il peut s'agir de transferts passifs (l'osmose, la diffusion libre des molécules hydrophobes au travers la membrane, les canaux ionique, la translocation...) ou des transports actifs, consommant de l'énergie sous forme d'ATP (l'endocytose, les pompes à sodium, à protons...). Nous nous intéresserons dans ce qui suit aux mécanismes qui concernent l'internalisation des CPP : l'endocytose et la translocation.

I.3.1 L'endocytose

L'endocytose est un des moyens pour la cellule d'incorporer des molécules (protéines, sucres...). Il s'agit d'une déformation de la membrane (invagination, protrusion...) qui a pour but d'entourer la cible et de finalement l'internaliser dans un endosome. Elle se retrouve alors isolée du cytoplasme par une bicouche lipidique. Il existe plusieurs types d'endocytose : certaines se font en présence de récepteurs (voie clathrine, voie cavéolines...) et d'autres sans (la pinocytose). L'endocytose en présence de récepteur s'effectue à l'aide de protéines manteaux, avec un assemblage par exemple de clathrines du côté cytoplasmique qui va provoquer un bourgeonnement de la membrane et une accumulation de la molécule à internaliser par interaction avec des récepteurs spécifiques et enfin le détachement de la vésicule vers l'intérieur de la cellule à l'aide de diverses protéines (comme la dynamine) (figure I.8 *Endocytose dépendante de récepteurs*). Il y aura ensuite un adressage de la vésicule vers les différents compartiments de la cellule ou une dégradation des molécules internalisées par acidification de l'endosome et sa fusion avec un lysosome. L'endocytose sans récepteur s'effectue à l'aide

CHAPITRE I. LES PEPTIDES PÉNÉTRANTS, UNE VOIE D'ENTRÉE DANS LES CELLULES

de protrusions, ou déformation localisée de la membrane sous l'effet de la polymérisation de filaments d'actine, qui se forment pour entourer les molécules à internaliser. La membrane va bourgeonner vers le cytoplasme et la vésicule va aussi se décrocher vers l'intérieur de la cellule (figure I.8 *Macropinocytose*).

Ces mécanismes ne sont pas passifs, ils sont dépendants du métabolisme de la cellule et consomment de l'ATP. Il est donc possible d'inhiber l'endocytose de diverses manières. Se placer à basse température (souvent à 4°C) va, par exemple, provoquer un ralentissement du métabolisme cellulaire. L'endocytose sera donc inhibée. Il est aussi possible d'exercer une inhibition chimique. Alexandre Benmerah et Christophe Lamaze présentent dans leur revue de 2002 divers moyens et composés chimiques pour inhiber les voies d'endocytose dépendantes de la clathrine (acidification du cytosol, la déplétion potassique, l'utilisation d'un milieu hypertonique, SH3 amphiphysine, SH3 intersectine), de la cavéoline, qui est une autre protéine manteau impliquée dans l'endocytose (cyclodextrine, filipine) ou de la macropinocytose (amiloride) [Benmerah and Lamaze, 2002]. Lorsque l'endocytose est inhibée, la translocation qui est un autre mécanisme d'internalisation des CPP, est plus facilement observable.

I.3.2 La translocation

La translocation consiste en une traversée directe de la membrane plasmique sans recours à l'énergie métabolique de la cellule. Ce mécanisme spécifique des CPP est encore mal connu, bien que diverses hypothèses aient été faites. Elles s'appuient sur le caractère chargé et souvent amphiphile des peptides pénétrants. Bechara *et al.* rappellent les trois mécanismes différents envisagés [Bechara and Sagan, 2013]. Une première possibilité est que le peptide s'internalise en formant des micelles inverses (figure I.9 A). Dans ce modèle les résidus basiques interagissent avec les phospholipides chargés négativement et les résidus hydrophobes déstabilisent la membrane plasmique qui s'invagine, entourant progressivement les peptides formant une micelle inverse au sein de la bicouche lorsque les lipides voisins se réorganisent. Elle s'ouvre ensuite vers l'intérieur de la cellule relargant les CPP dans le cytoplasme. Le second mécanisme consiste en la formation de pores (figure I.9 B). Les peptides pénétrants s'accumulant à la surface de la membrane par interaction électrostatique induisent une déstabilisation de la bicouche localement et les charges des lipides du feuillet distal permettent la formation d'un canal transitoire dans la membrane permettant la diffusion passive du CPP et de sa cargaison vers l'intérieur de la cellule. Enfin une dernière possibilité consiste en la traversée directe du cœur hydrophobe de la membrane (figure I.9 C). Les charges du CPP seraient écrantées par des phospholipides chargés négativement, cela atténue la polarité du peptide et permet sa diffusion dans la bicouche. Le potentiel de membrane permettrait finalement la traversée.

I.3.3 Et pour les CPP : endocytose ou translocation ?

Historiquement, la communauté scientifique pensait que les CPP s'internalisaient par translocation. Des expériences menées sur différents types cellulaires montraient que les peptides pénétrant Tat et Pénétratine pouvaient traverser la membrane plasmique et entrer dans la cellule aussi bien à 37°C qu'à 4°C ainsi qu'en présence d'inhibiteur de l'endocytose. De plus des études montraient que l'internalisation était aussi efficace en utilisant des résidus de conformation L ou D dans la séquence primaire des CPP ce qui implique qu'elle se fait sans récepteur spécifique. Cela amena à conclure que l'internalisation était indépendante

I.3. VOIES D'ENTRÉES ET MÉCANISME LORS DE L'INTERNALISATION DES CPPS

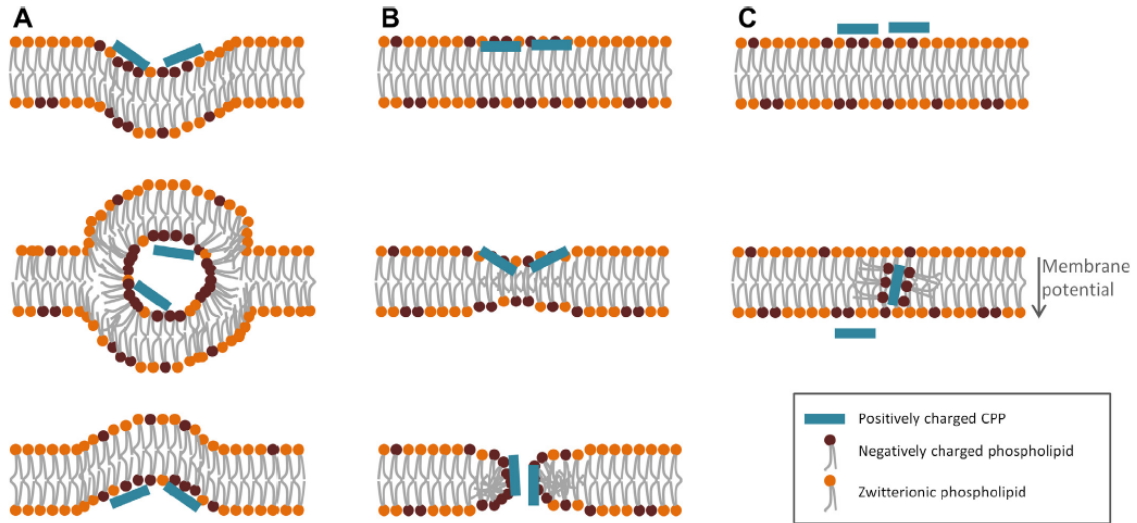


Fig. I.9 Schéma des différents mécanismes de translocation envisagés pour les CPP. Les CPP sont représentés par des rectangle bleus, les phospholipides chargés ont des têtes hydrophiles symbolisées par des disques marrons et les phospholipides neutre par des disques orange [Bechara and Sagan, 2013].

de la machinerie cellulaire et ne se faisait donc pas par endocytose. Cependant une partie de ces résultats sont la conséquence d'un artéfact dû à la façon dont les cellules sont préparées pour l'observation. Richard *et al.* ont présenté en 2003 une étude de cet artéfact [Richard et al., 2003]. Ils démontrent que la fixation des cellules, même en condition douce, impacte l'internalisation des CPP dans la cellule. La fixation des cellules sert à stabiliser les structures cellulaires pour une meilleure qualité d'image, elle se fait avec du formaldéhyde et entraîne des perturbations au niveau de la membrane plasmique. En utilisant la microscopie à fluorescence ils ont mené une étude comparative sur des cellules vivantes fixées et non fixées. Ils observent Tat et R_9 colocalisant avec un marqueur fluorescent des endosomes lors de leur internalisation, *a contrario* ces peptides ne colocalisent pas avec le marqueur sur des cellules fixées. Ils utilisent la technique de cytométrie de flux (FACS) pour mesurer l'internalisation des peptides à 37° et 4°C. À basse température ils observent que l'internalisation est beaucoup plus faible qu'à 37°C voire inexistante. Ils concluent que le mécanisme d'internalisation des CPP doit être réévalué et que l'endocytose est une des voies d'entrée pour les CPP.

Depuis il a été confirmé que l'endocytose et la translocation sont deux mécanismes possibles pour l'internalisation des CPP dans la cellule. Jiao *et al.* mettent clairement en évidence ces deux voies d'entrée possibles pour les CPP et présentent dans leur étude de 2009, les voies majoritaires suivies par certains CPP (figure I.10) [Jiao et al., 2009]. Pour quantifier le peptide internalisé dans les cellules ils utilisent la spectrométrie de masse et ajoutent dans le lysat cellulaire à analyser un CPP étalon deutéré ce qui rend la technique quantitative. Les expériences sont menées à 37° et 4°C sur des cellules de type sauvage ou déficiente en héparanes et chondroïtines sulfate. Leurs expériences semblent montrer que les deux mécanismes d'internalisation sont impliqués dans des proportions diverses selon la charge et l'amphipath-

CHAPITRE I. LES PEPTIDES PÉNÉTRANTS, UNE VOIE D'ENTRÉE DANS LES CELLULES

ticité des CPP. Cette étude démontre également que les GAG sont plutôt impliqués dans la voie d'endocytose.

Extracellular [CPP] (number of + charges)	Wild type CHO-K1 cells		Heparan sulfate and chondroitin sulfate-deficient CHO cells	
	Translocation	Endocytosis	Translocation	Endocytosis
	%		%	
2 μM (R/W)9 (+7)	15	85	15	85
5 μM Antp (+7)	30	70	60	40
5 μM P1 (+7)	20	80	75	25
7.5 μM Tat (+8)	75	25	100	0
5 μM R9 (+9)	50	50	100	0

Fig. I.10 Tableau des voies d'internalisation (en pourcentage) pour les CPP Pénétratine, tat, P1 (analogue de la Pénétratine), R_6W_3 et R_9 . Les pourcentages sont calculés sachant qu'à 37°C translocation et endocytose se produisent et qu'à 4°C seule la translocation peut se produire [Jiao et al., 2009].

Pour conclure, il semble donc que les GAG soient les principaux partenaires pour la voie d'endocytose des CPP. Les peptides s'accumulent au niveau des GAG, déclenchant leur endocytose. Concernant la translocation, qui peut s'effectuer à de plus faibles concentrations en peptide que l'endocytose, les partenaires lipidiques ou glycolipidiques sont encore mal connus même si les lipides anioniques [Alves et al., 2008][Joanne et al., 2009] et les groupements phosphates des têtes polaires des lipides [Wender et al., 2008][Kawamoto et al., 2011], pouvant former des liaisons hydrogènes avec les groupements guanadinium des CPP, ont été présentés comme de possibles acteurs. Précisons ici que les différentes voies d'internalisation sont également modulées par la nature de la cargaison, du lien entre le CPP et sa charge, le type de cellule cible...

I.3.4 Les CPP, dans quel but ?

Les CPP présentent un intérêt certain pour la vectorisation, méthode consistant à faire entrer dans les cellules des macromolécules. Conjuguer un agent thérapeutique avec un CPP pourrait alors devenir une stratégie de choix pour améliorer les propriétés pharmacologiques de ces agents et rendre plus efficace leur relargage dans les cellules. La grande majorité des désordres physiologiques a en effet pour origine un dysfonctionnement de la machinerie cellulaire. L'utilisation des CPP permet alors une internalisation efficace d'un médicament (molécules exogènes, protéines, matériel génétique...) dont la cible se trouve à l'intérieur d'un compartiment cellulaire. Il revient alors à définir quelle voie doit être suivie selon le CPP utilisé. Dans le cas de la translocation la molécule est directement disponible dans le cytoplasme, dans le cas de l'endocytose une étape supplémentaire voit le CPP et à sa cargaison sortir de l'endosome dans lequel ils sont piégés lors de l'internalisation avant l'acidification et la dégradation du complexe.

Schwarze et al. ont ainsi prouvé en 1999 que les CPP et leurs cargaisons étaient capables

I.3. VOIES D'ENTRÉES ET MÉCANISME LORS DE L'INTERNALISATION DES CPPS

de franchir la barrière hémato-encéphalique [Schwarze et al., 1999]. Après injection intrapéritonéale chez une souris de β -galactosidase couplée au CPP tat, ils ont pu observer que ce complexe avaient été internalisé dans tous les tissus de la souris, y compris les cellules du cerveau. Cela a ouvert de nouvelles possibilités pour des traitements thérapeutiques, notamment celle de relarguer dans des organismes vivants des molécules plus grosses comme des protéines. Ainsi en 2008, Olson *et al.* ont synthétisé des CPP activables composés d'un CPP relié de façon clivable à un inhibiteur de la metalloproteinase-2, protéine surexprimée dans des cellules cancéreuses [Olson et al., 2009]. Ces complexes ont ensuite été utilisés dans des modèles *in vivo* pour cibler des cellules cancéreuses surexprimant la metalloproteinase-2. Nakase *et al.* ont également utilisé des CPP dans un but thérapeutique sur des modèles vivants. Sur des souris, ils ont injecté un complexe CPP-doxorubicin pour efficacement cibler et traiter la prolifération de tumeurs cancéreuses [Nakase et al., 2012].

Le potentiel des CPP, notamment dans une visée thérapeutique, est certain. Cependant les mécanismes d'internalisation, bien qu'identifiés ne sont pas complètement décrits et compris. C'est pourquoi, au cours de cette thèse, nous avons essayer de mettre en place diverses méthodes et techniques pour d'étudier plus en détails et d'améliorer notre compréhension de ce phénomène. Quels sont les partenaires lipidiques lors de la translocation des CPP ? Quelles sont les descriptions cinétique et énergétique de l'internalisation ? Quels sont les différentes étapes du mécanisme d'internalisation ? sont autant de questions auxquelles nous avons cherché à apporter des réponses.

*CHAPITRE I. LES PEPTIDES PÉNÉTRANTS, UNE VOIE D'ENTRÉE DANS LES
CELLULES*

II – Mesure de force et électrophysiologie en présence de peptides pénétrants

Ce chapitre présente de façon non-exhaustive des techniques et des études biophysiques à l'échelle de la molécule unique. Cette approche doit nous permettre de comprendre dans le détail les différentes étapes mises en jeu durant la translocation d'un CPP. Cependant ce changement d'échelle implique l'utilisation d'outils spécifiques, de grande précision, capables de mesurer des courants électriques et des forces induits par un seul peptide. Nous présenterons dans ce chapitre différents moyens de répondre à ce défi.

II.1 Mesure de force à l'échelle de la molécule unique : différentes techniques

Il existe plusieurs outils à notre disposition pour mesurer des forces à l'échelle de la molécule unique. Ils utilisent tous le principe du ressort et de sa raideur qui permet d'associer force et déplacement. Ces outils sont donc de deux types : ceux à déplacement imposé (le SFA, l'AFM, le piège optique, le BFP) et ceux à force imposée (le piège magnétique).

II.1.1 Surface Force Apparatus (SFA)

L'appareil à forces de surface a été développé par Israelachvili en 1978 : son schéma de principe est présenté sur la figure II.1. Il fut un des premiers outils pour la mesure de forces d'objets biologiques interagissant à des distances de l'ordre du nanomètre. Il permet de mesurer la force d'interaction entre molécules adsorbées (lipides, protéines, polymères...) sur deux surfaces de mica face à face et distantes de quelques nanomètres. Les lames de mica sont collées sur deux cylindres placés de façon orthogonale de telle sorte que le contact est de type sphère-plan. La distance entre les deux surfaces est mesurée par interférométrie, avec une précision de l'ordre de $0,1 \text{ nm}$. Le cylindre inférieur est relié à un ressort de raideur connue ($\sim 100 \text{ N.m}^{-1}$) ce qui permet de déduire la force exercée entre les deux surfaces d'après la loi de Hooke ($\text{Force} = \text{Raideur} \times \text{Déplacement}$). Le positionnement des cylindres est assuré par des céramiques piézoélectriques dont l'élongation est contrôlé avec une précision de $0,1 \text{ nm}$. La précision sur la mesure de force est de $0,1 \mu\text{N}$ [Perez et al., 2008]. Le calcul par intégration des forces intermoléculaires dans la géométrie sphère-plan avec l'approximation de Derjaguin, permet de déduire l'énergie libre entre deux surfaces selon leur distance D :

CHAPITRE II. MESURE DE FORCE ET ÉLECTROPHYSIOLOGIE EN PRÉSENCE DE PEPTIDES PÉNÉTRANTS

$\frac{F(D)}{R} = 2\pi \times E(D)$, où R est le rayon de courbure des surfaces cylindriques. Le SFA est une technique très exigeante : les lames de mica doivent être parfaitement propres et planes et les produits chimiques ultra purs pour éviter toutes poussières et contaminants sur les surfaces qui empêcheraient une mesure correcte. L'appareil doit être placé dans un environnement dont les vibrations et la température sont contrôlées pour éviter les bruits mécaniques et thermiques sur les mesures.

Il est possible d'utiliser le SFA avec des lames de mica supportant des bicouches lipidiques et de mesurer leur énergie d'interaction. Par la suite les bicouches supportées ont été modifiées, par exemple en fonctionnalisant la tête hydrophobe des lipides ou en incorporant des protéines dans la bicouche. Cela a permis de mesurer des énergies d'interaction, ou des changements de conformation entre protéines. Pérez *et al.* présentent par exemple deux études d'interactions mesurées par le SFA [Perez et al., 2008]. Ils mesurent l'adhésion entre surfaces recouvertes par des nucléotides : l'adénosine (A) et la thymidine (T) en remplaçant, dans la bicouche lipidique déposée sur les lames de mica, les têtes polaires des lipides de la monocouche extérieure par les nucléotides (Figure II.1 (B)). Ils mesurent ainsi l'énergie d'interaction entre les bases A et T. Cette énergie est plus de deux fois supérieure à celle A/A ou T/T. Ils parviennent également à déterminer l'énergie d'une liaison A/T, $E_{A/T} = 4,0 k_B T$ ($2,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$). Ils s'intéressent également à l'association de protéines SNARE, impliquées dans les processus de fusion membranaire. Elles sont insérées dans les bicouches supportées et les deux surfaces sont mises en contact de façon répétées (Figure II.1 (C)). Lorsque deux protéines interagissent ensemble, une énergie d'association de l'ordre de $35 k_B T$ est mesurée (étude issue de [Li et al., 2007]).

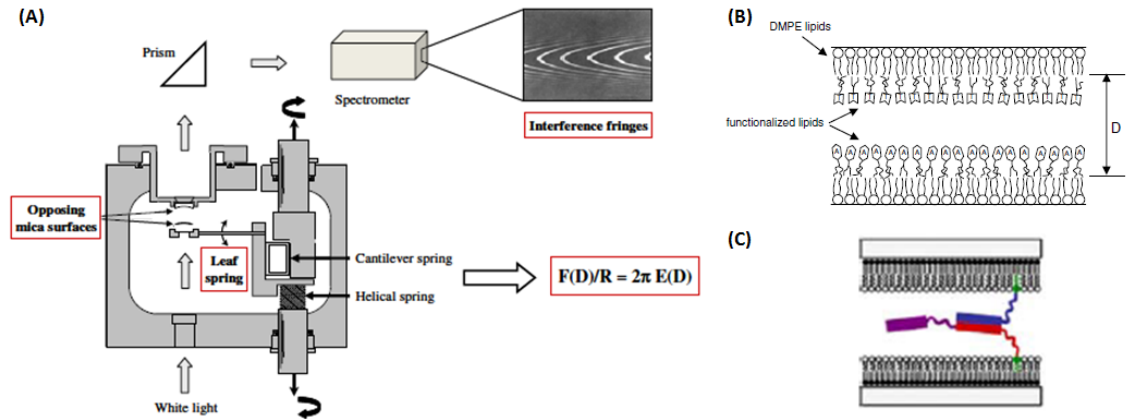


Fig. II.1 (A) Schéma de principe du Surface Force Apparatus. (B) Schéma des bicouches supportées fonctionnalisées par les nucléotides adénosine et thymidine. (C) Schéma des bicouches supportées dans lesquelles sont insérées les protéines SNARE (en couleurs) [Perez et al., 2008].

L'utilisation du SFA implique une grande rigueur dans la préparation des échantillons. La mise en place de ce système est longue et fastidieuse. De plus cet outil ne permet pas de travailler directement avec des cellules et des membranes naturelles. L'étude de protéines membranaires est, comme nous l'avons vu, possible mais nous nous intéressons à un phénomène de transport à travers les membranes. L'utilisation du SFA pour l'étude de la

II.1. MESURE DE FORCE À L'ÉCHELLE DE LA MOLÉCULE UNIQUE : DIFFÉRENTES TECHNIQUES

translocation des peptides pénétrants sur membrane modèle pourrait cependant être intéressante dans le cadre des premières étapes de l'internalisation : l'adhésion à la membrane et le début de l'insertion.

II.1.2 Microscope à force atomique (AFM)

Le microscope à force atomique (ou "Atomic Force Microscope", AFM) trouve son origine dans le microscope à effet tunnel ("Scanning Tunneling Microscopy", STM) qui valut à ses inventeurs Ernst Ruska, Gerd Binnig et Heinrich Rohrer le prix Nobel de physique en 1986 [Binnig and Rohrer, 1982]. L'idée du STM est d'utiliser comme première électrode de la jonction tunnel une fine pointe conductrice en métal (initialement du Tungstène ou du Molybdène) comme sonde. Cette pointe est placée, dans le vide, quelques angströms au-dessus d'une surface (seconde électrode) et une différence de potentiel est maintenue entre les deux électrodes. Il est possible de mesurer un courant de quelques nanoampères entre les deux électrodes bien qu'elles ne soient pas en contact, c'est l'effet tunnel. Ce courant J_T mesuré est relié à la distance s entre les deux électrodes $J_T \propto V_T \times \exp(-A\Phi^{1/2} \times s)$, où Φ est la barrière de potentiel avec $A \sim 1$ si Φ est de l'ordre de l'eV et s de l'Å. Le déplacement de la pointe dans les trois directions de l'espace est assuré par des céramiques piézoélectriques avec une précision de 0,2 Å, une boucle d'asservissement permet de maintenir un courant tunnel constant en repositionnant en permanence la sonde. Cette technique permet alors d'imager des surfaces avec une précision atomique, une protéine et jusqu'à une molécule contenant quelques dizaines d'atomes (figure II.2). Le STM n'utilisant pas la lumière pour imager les surfaces, on s'affranchit de la limite de diffraction qui impose une résolution de l'ordre de la longueur d'onde de la source lumineuse.

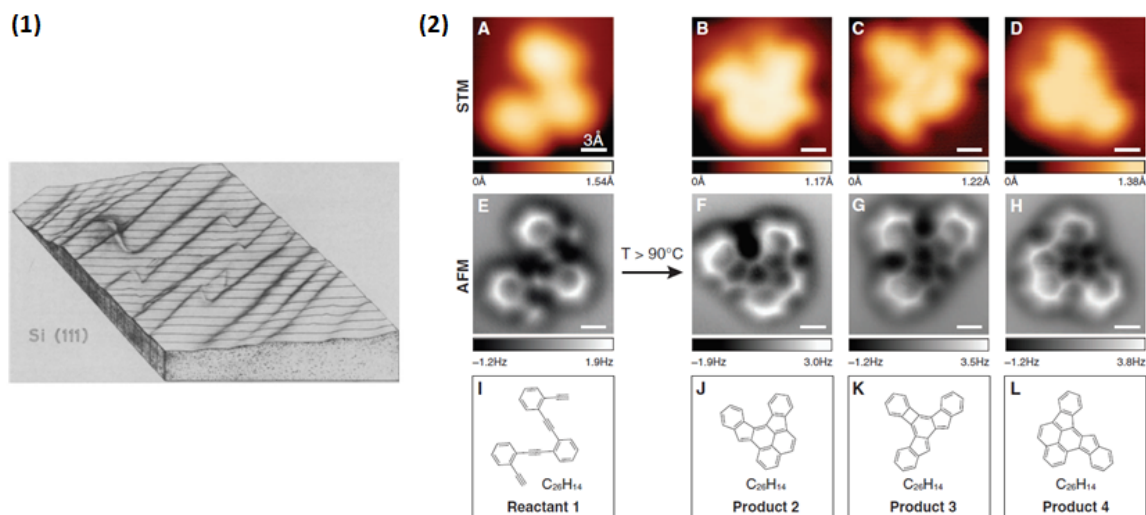


Fig. II.2 (1) Topographie d'une surface de silicium. Les marches d'une hauteur de 3 angströms entre les plans d'atomes différents sont visibles [Binnig and Rohrer, 1982]. (2) Images par STM et AFM de différentes molécules lors de l'étude d'une réaction chimique. L'AFM est utilisé en mode "modulation de fréquence" pour la pointe [Oteyza et al., 2014].

C'est en utilisant le STM que G. Binnig, F. Quate et Ch. Gerber proposent de mesurer des

CHAPITRE II. MESURE DE FORCE ET ÉLECTROPHYSIOLOGIE EN PRÉSENCE DE PEPTIDES PÉNÉTRANTS

forces entre atomes de l'ordre de 10^{-18} N [Binnig and Quate, 1986]. Pour l'AFM, la pointe est solidaire d'une fine poutre cantilever dont la raideur est connue, elle sert de ressort pour mesurer des forces d'après la loi de Hooke comme le produit de la déflexion de la poutre (Δz) par la raideur (k) : $F = k \times \Delta z$. Il n'est plus alors nécessaire que les deux électrodes soient conductrices ni d'imposer une différence de potentiel.

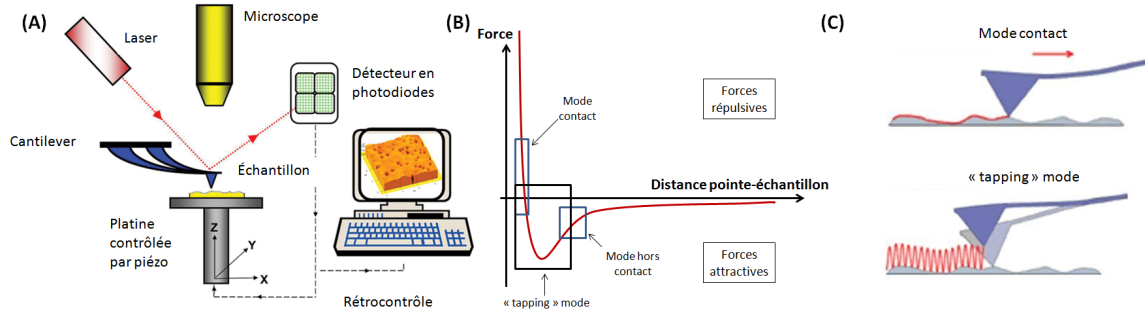


Fig. II.3 (A) Principe de la détection de la déflexion du cantilever. La déviation d'un faisceau laser réfléchi sur le cantilever permet d'enregistrer son déplacement. (B) Courbe de force entre la pointe de l'AFM et l'échantillon selon la distance entre les deux. (C) Position de la pointe lors de deux modes différents d'utilisation de l'AFM : le mode contact et le "tapping mode". Figures (A) et (B) issues de <https://slideplayer.com/slide/9702681/>.

L'interaction entre la pointe et l'échantillon dépend notamment de la géométrie de la pointe et de l'échantillon, de leur nature (leurs charges, leur affinité chimique), de leur rigidité, de l'environnement (liquide, air, vide). Classiquement les cantilevers font de 50 à 100 microns de long, présentent une raideur de 5 à 100 $pN.m^{-1}$, la résolution verticale sur la position est inférieure à 0,1 nm et la résolution latérale inférieure à 1 nm. La position du cantilever est mesurée à l'aide d'un laser et de photo-diodes (figure II.3 (A)). Un AFM peut être utilisé en de nombreux modes tels que le mode contact (la pointe touche l'échantillon), le "tapping mode" (avec excitation du cantilever à sa fréquence de résonance) et d'autres modes encore (mode à modulation de fréquence de l'excitation du cantilever, *etc.*). Le "tapping mode" permet de minimiser la sensibilité au bruit des vibrations en imposant une oscillation haute fréquence au cantilever. La viscosité de l'échantillon notamment (ou sa friction) pourra se déduire du retard de phase entre le signal d'excitation du cantilever et le signal oscillant enregistré pour la déflexion. Cela permet d'utiliser l'AFM dans les milieux liquides. De plus, pour une force donnée, il est souhaitable que le cantilever ait une déflexion maximale (et donc une raideur la plus faible possible) pour une mesure plus précise mais la fréquence de résonance, que l'on souhaite la plus élevée possible dépend elle aussi de la raideur avec $f_0 = \frac{\pi}{2} \times (\frac{k}{m_0})^2$, où m_0 est la masse du ressort. Il faut donc également jouer sur la masse m_0 pour garder le rapport $\frac{k}{m_0}$ le plus élevé possible. Cependant les AFM conventionnels sont relativement lents avec une fréquence de résonance du cantilever qui n'est pas assez élevée (100 Hz, [Binnig and Quate, 1986]) nécessitant plusieurs minutes pour acquérir une image. Récemment, il a été proposé des AFM ultra rapides, présentant des fréquences de résonance de plusieurs centaines de kHz tout en gardant des constantes de raideur suffisamment faibles (150 – 280 $pN.m^{-1}$) [Ando et al., 2001]. Dès lors il est devenu possible d'observer des phénomènes biologiques dont les temps caractéristiques sont inférieurs à la

II.1. MESURE DE FORCE À L'ÉCHELLE DE LA MOLÉCULE UNIQUE : DIFFÉRENTES TECHNIQUES

seconde.

Au cours de ces dernières années, de nombreuses études utilisant l'AFM en biologie sont parues. Cet outil est aussi bien utilisé sur membrane modèle que sur cellules vivantes, pour faire de l'imagerie souvent mais également pour mesurer directement des forces d'interaction ou de repliement de protéines. Les forces détectées sont de l'ordre de $10 - 1000 \text{ pN}$ selon la raideur du cantilever utilisé. L'AFM fonctionne alors en mode mesure de force : une protéine s'adsorbe de façon non spécifique sur la pointe en nitrure de silicium (ou fonctionnalisée pour un attachement spécifique) et il est ensuite possible de la déplier en éloignant la surface en or sur laquelle l'autre extrémité de la protéine est également adsorbée via un pont di-sulfure [Rounsevell et al., 2004]. La protéine, déposée en concentration appropriée pour s'assurer qu'une seule s'adsorbe sur la pointe à la fois, va alors se déplier par à coup selon la façon dont elle est repliée et sa structure secondaire et tertiaire (figure II.4). En faisant varier la vitesse à laquelle la pointe est éloignée de la surface il est possible d'étudier le repliement et le dépliement des protéines.

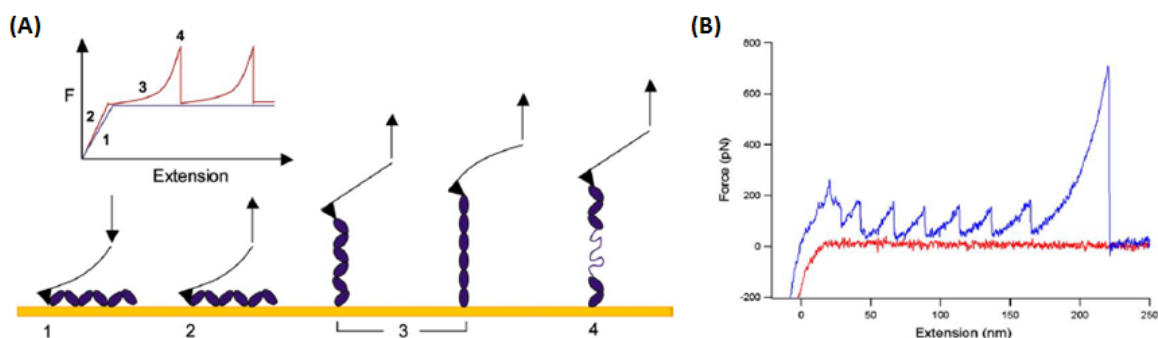


Fig. II.4 (A) Dépliement d'une protéine par la technique AFM. (1) Le cantilever est abaissé au contact de la surface où sont adsorbées les protéines à étirer. (2) Une extrémité d'une protéine est adsorbée à la pointe du cantilever et celui-ci est remonté. (3) La protéine est progressivement étirée jusqu'à sa tension maximale. (4) Un domaine de la protéine est dénaturé, la structure tertiaire n'est plus conservée et la protéine peut à nouveau être étirée. (B) Mesures de forces enregistrées avec en rouge, la force exercée sur le cantilever lorsqu'aucune protéine n'est accrochée à la pointe et qu'il est abaissé jusqu'au contact avec la surface (courbe aller) et en bleu, lorsqu'il y a une protéine adsorbée et que le cantilever est éloigné (courbe retour) [Rounsevell et al., 2004]

Enfin, l'AFM est un outil qui a déjà été utilisé pour étudier les CPP [Plénat et al., 2005]. Dans leur étude, Plénat *et al.* observent par AFM l'interaction entre un peptide pénétrant $P_{(\alpha)}$ (GALFLAFLAAALSLMGLWSQPKKKRKV) qui présente une structure permanente en hélice alpha, et des membranes modèles supportées composées de DPPC ou d'un mélange DPPC/DOPC. Ils observent une modification de la topographie de la bicouche, avec l'apparition de longs filaments déposés à la surface mais également de régions enrichies en peptides où la bicouche s'affine avec une insertion du peptide dans le coeur hydrophobe de la membrane.

II.1.3 Pinces Optiques et Magnétique

Les pinces optiques et magnétiques sont des outils qui déplacent des billes micrométriques et mesurent les forces qui peuvent être exercées sur celles-ci. Ces billes sont manipulées par un faisceau laser dans le cadre de pinces optiques ou par un champ magnétique pour les pinces magnétiques. Les billes servent de point d'ancrage aux protéines d'intérêt qui suivent alors le mouvement de la bille sur laquelle elles sont attachées de façon covalente généralement.

Les pinces optiques consistent en un faisceau laser très fortement focalisé qui va exercer sur un objet diélectrique (une bille) une pression de radiation. Elle comporte une force de diffusion qui va repousser la bille dans la direction de la lumière proportionnellement à l'intensité de la source incidente et une force issue du gradient d'intensité lumineuse qui va attirer la bille vers le centre focalisé du faisceau. L'indice optique de la bille doit être pour cela plus élevé que celui du milieu et sa taille très supérieure à la longueur d'onde du laser. Dans ces conditions et avec un laser suffisamment puissant (par exemple 10mW dans [Finer et al., 1994], 500mW dans [Bennink et al., 2001]), la force de gradient est plus importante que la force de diffusion et la bille se retrouve piégée autour du point où est focalisé le laser (figure II.5).

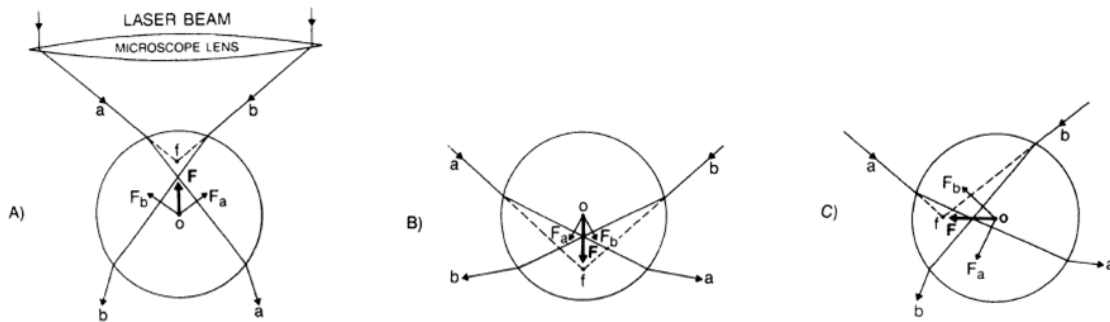


Fig. II.5 Les pinces optiques sont utilisées dans le régime de la diffusion de Mie avec la taille de la bille $\gg \lambda$. La diffraction est alors négligeable et la représentation de la lumière par des rayons est correcte. La force due à la pression de radiation va alors tirer la bille vers le point focalisé du laser et permettre de piéger la bille de façon stable. Dans les trois situations ci-dessus les forces exercées par les rayons a et b de résultante F rapprochent la bille du point focal f [Ashkin and Dziedzic, 1989]

En biologie, les pinces optiques sont utilisées dans de nombreuses études pour manipuler directement des objets tels que des cellules ou des organelles à l'intérieur de cellules qui peuvent être déplacées de la même façon qu'une bille. Elles sont aussi utilisées pour manipuler et étudier des biomolécules à l'échelle de la molécule unique, tels que des brins d'ADN [Bennink et al., 2001], des moteurs moléculaires (de type myosine) [Finer et al., 1994] ou des ARN polymérases lors de la transcription [Yin et al., 1995]... Dans l'étude de Bennink *et al.* [Bennink et al., 2001] un brin d'ADN compacté avec des histones et attaché à un support fixe à l'une de ses extrémités et à une bille pour l'autre est étiré à l'aide d'une pince optique. Les auteurs mesurent des forces de quelques dizaines de piconewtons correspondant à la décompaction par à-coups de la chromatine précédemment formée (ADN et histones). Finer *et al.* [Finer et al., 1994] utilisent un système de pinces optiques pour mesurer des forces de

II.1. MESURE DE FORCE À L'ÉCHELLE DE LA MOLÉCULE UNIQUE : DIFFÉRENTES TECHNIQUES

3 – 4 pN exercées par une myosine lors de pas de 11 nm sur un filament d'actine.

Les pinces magnétiques fonctionnent selon le même principe général que les pinces optiques. La bille doit maintenant être un dipôle magnétique pour pouvoir être piégée dans un champ magnétique. La force générée sur la bille est orthogonale au champ magnétique, il faut donc un champ magnétique horizontal pour exercer une force verticale qui va s'opposer à la pesanteur (figure II.6 (A)). Pour corriger la position de la bille par rétroaction dans le plan horizontal, six bobines de cuivre sont utilisées alimentées par un courant ajustable et placées au dessus de l'échantillon (figure II.6 (B)). Les pôles nord et sud du champ magnétique seront ainsi ajustables en modifiant les courants traversant les bobines (figure II.6 (C)) et la force résultante sur la bille permettra de la maintenir à la position souhaitée. Dans le cas des pinces magnétiques une force est imposée à la bille et son déplacement est mesuré contrairement aux pinces optiques où le déplacement est imposé et la force mesurée. Les

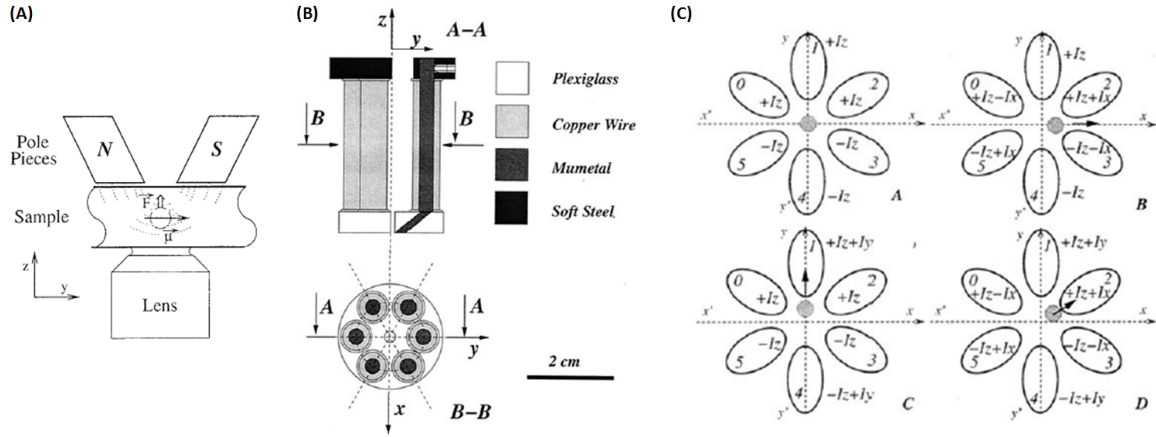


Fig. II.6 (A) Schéma de principe d'une pince magnétique. La force qui déplace la bille est une force électromagnétique orthogonale au champ magnétique entre deux pôles nord et sud. (B) Le champ magnétique est imposé par six bobines de cuivre au dessus de l'échantillon et disposées comme sur le schéma ci-dessus. (C) Les ellipses représentent les six bobines différentes. I_z , I_x et I_y sont les courants traversant ces bobines qui vont induire un champ magnétique. La bille magnétique est représentée en gris clair. La modulation du courant électrique dans ces bobines va générer des pôles nord ou sud à leur extrémité et un champ magnétique d'une intensité proportionnelle au courant. Cela permettra de rendre le piège stable en opérant un rétrocontrôle de l'intensité du courant selon la position de la bille [Gosse and Croquette, 2002]

pièges magnétiques peuvent ainsi être utilisés pour étudier des molécules biologiques de la même façon que les pinces optiques. Gosse *et al.* appliquent et mesurent des forces verticales de 50 fN à 20 pN et des forces horizontales de 5 pN [Gosse and Croquette, 2002]. Un des avantages des pinces magnétiques est qu'il est possible d'appliquer des forces de torsion contrairement aux pinces optiques. Les gammes de forces mesurables correspondent à celle des mécanismes d'interaction avec la membrane lors de la translocation de CPP mais nous n'avons pas, à ce jour, connaissance d'études sur les CPP utilisant ce type d'outil de mesure de force.

II.1.4 BioMembrane Force Probe (BFP)

Le Biomembrane Force Probe (BFP) est un outil de mesure de force. Il a été mis au point en 1995 par E. Evans *et al.* qui s'intéressaient à mesurer des forces d'interaction non spécifiques (Van der Waals) [Evans et al., 1995]. Cet outil permet de mesurer des forces de l'ordre de 0,01 – 1000 pN. Le principe est également de mesurer une force à partir de la déformation d'un ressort de raideur connue. Le ressort est ici une membrane biologique : un globule rouge, présentant une raideur ajustable. Sur ce "ressort" une bille micrométrique est collée par le biais de liaisons covalentes (liaisons biotine-streptavidine le plus souvent). La bille peut alors être fonctionnalisée par une autre molécule dont on veut étudier l'adhésion à une surface (figure II.7) ou directement à une cellule. Cette sonde est fabriquée à l'aide de pipettes micrométriques déplacées par des céramiques piézoélectriques. Le ressort et la bille sont aspirés par des pipettes distinctes puis collés par simple mise en contact. La liaison entre le globule rouge et la bille (plusieurs liaisons covalentes) est alors plus forte que la force d'adhésion que l'on souhaite mesurer. L'aspiration de la pipette va définir la raideur du ressort telle que :

$$k = \frac{\pi \times R_p \times \Delta P}{(1 - \frac{R_p}{R_g}) \times (\ln(\frac{2 \times R_g}{R_p}) + \ln(\frac{2 \times R_g}{r_{contact}}))},$$

avec R_p le rayon de la pipette, R_g le rayon du globule rouge et $r_{contact}$ le rayon de contact entre la bille et le globule rouge. La déformation du ressort est mesurée comme étant la différence entre la consigne de déplacement de la céramique piézoélectrique et la position réelle de la sonde, connue en observant la position de la bille. Lors de son déplacement la sonde peut être sans contrainte (figure II.7 (3), le mouvement de la sonde est le même que celui de la céramique piézoélectrique), comprimée ou détendue (figure II.7 (1) et (2) la céramique piézoélectrique continue son élongation mais la bille ne bouge plus). Toujours en utilisant la loi de Hooke, cela permet de déduire la force exercée sur la bille.

Un des avantages de cet outil est la raideur facilement ajustable de la sonde utilisée, par simple modification de la pression avec laquelle le globule rouge est aspiré. Il peut donc être choisi une raideur appropriée pour que la force que l'on souhaite mesurer donne une déformation adaptée du globule rouge. Un ressort de faible raideur entraînera une déformation plus importante de la sonde pour une force donnée mais sera plus sensible au bruit sur la mesure.

Les différents outils de mesure de forces en molécule unique présentés ci-avant semblent adaptés à la mesure des forces d'interaction que l'on retrouve dans les mécanismes d'internalisation des CPP : les interactions non covalentes de type Van der Waals ou liaisons hydrogènes (comprise dans la gamme 10 – 100 pN) ou les liaisons covalentes et ioniques (~ 1000 pN) [Evans et al., 1995]. Cependant le savoir-faire du laboratoire avec le BFP et la possibilité d'utiliser ce système pour étudier l'interaction entre une cellule entière et un peptide nous ont naturellement conduit à choisir ce système pour notre étude.

II.2 Le BFP et les peptides pénétrants

II.2.1 Mise en place et protocole

L'un des enjeux de ce travail de thèse était la mise en place au LBM d'un montage capable de réaliser des mesures de forces grâce à la technique de BFP couplée à des mesures

II.2. LE BFP ET LES PEPTIDES PÉNÉTRANTS

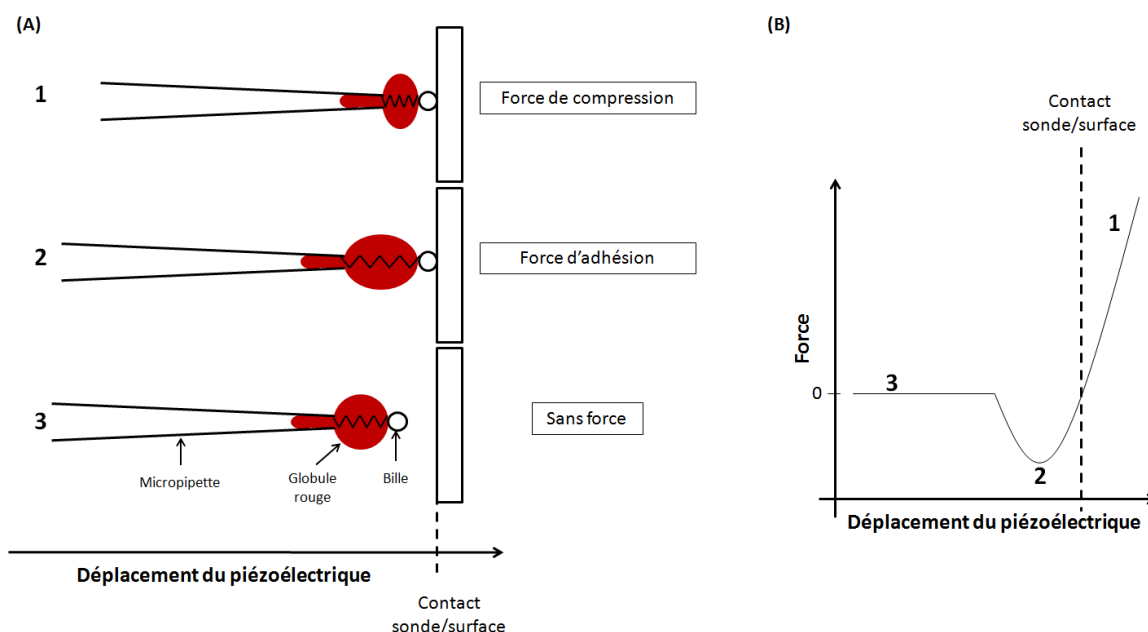


Fig. II.7 (A) Représentation de la sonde de force (composée d'une pipette maintenant un globule rouge par aspiration sur lequel est collé une bille de verre) du biomembrane force probe. Le globule rouge est l'équivalent d'un ressort, il peut être sans contrainte (1), comprimé (2) ou détendu (3). (B) Courbe de force théoriquement obtenue avec le BFP. Initialement la sonde est comprimée (1), si la pipette est progressivement déplacée vers la gauche et que la bille interagit avec la surface il faudra tirer plus fort (2) pour décrocher la sonde qui se déplacera ensuite sans contrainte (3).

électriques (cf. la section suivante pour la partie concernant l'électrophysiologie). Une grande partie de la première année de ma thèse a été consacrée à cette tâche. Il s'agissait donc dans un premier temps de développer un montage capable de réaliser des mesures de BFP. Le bon fonctionnement du nouveau montage a pu être vérifié en confirmant et complétant les résultats que Pierre Soule avait obtenu en utilisant le BFP du Laboratoire de Physique Statistique (LPS), à l'École Normale Supérieure [Soule, 2015]. Le protocole utilisé pour la préparation et la mesure de force est celui que l'on peut retrouver dans sa thèse (Chapitre II, Partie B Matériels & méthodes 2^e section [Soule, 2015]).

Un des défis majeurs fut d'assurer une stabilité mécanique suffisante du système pour mesurer des forces de l'ordre d'une dizaine de piconewtons. En effet, la force est mesurée par l'élongation du globule rouge qui joue un rôle de ressort ($F = k \times \Delta x$, avec k la raideur de la sonde de force et Δx l'élongation du globule rouge). Cette élongation est mesurée par différence entre la consigne, imposée par une céramique piézoélectrique (PHYSIK INSTRUMENT) qui contrôle le déplacement de la base de la sonde et la position mesurée de son extrémité opposée. Cette position est déterminée par la détection d'une bille de verre, un des constituants de la sonde de force (partie e)). La position de la sonde de force doit donc être connue de façon suffisamment précise. En effet il faut connaître la position de la bille à quelques nanomètres près. La détection de la bille est expliquée par la suite. Ainsi, la mesure de l'élongation de la sonde de force est essentielle pour la mesure de force en BFP et la

CHAPITRE II. MESURE DE FORCE ET ÉLECTROPHYSIOLOGIE EN PRÉSENCE DE PEPTIDES PÉNÉTRANTS

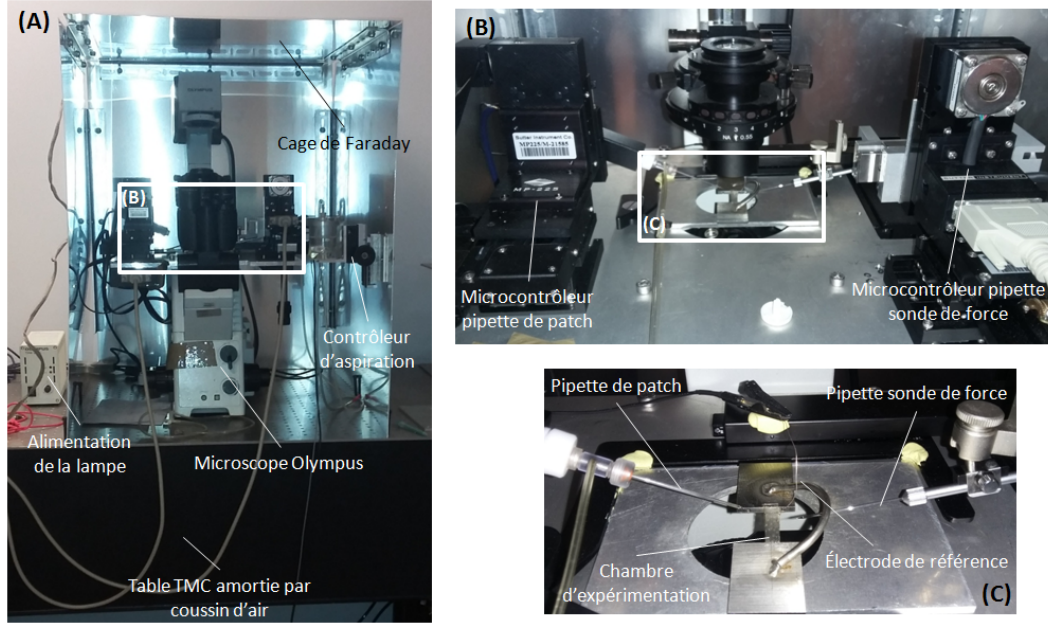


Fig. II.8 Photos du montage final couplant la mesure de force et les mesures électriques à différente échelle. (A) Aperçu global du montage. (B) Zoom sur la platine et les micromanipulateurs. (C) Zoom sur la chambre d'expérimentation.

principale incertitude provient de la vibration du système. Pour des forces de 10 pN et une raideur typique $k \sim 1 \text{ pN.nm}^{-1}$ pour un globule rouge sous tension :

$$\Delta x = \frac{F}{k} = \frac{10 \text{ pN}}{1 \text{ pN.nm}^{-1}} = 10 \text{ nm}$$

Pour mesurer des forces d'une dizaine de piconewtons, une élongation de 10 nm de la sonde doit être mesurable et donc la position doit être connue à quelques nanomètres près. Il nous faut donc limiter les vibrations de la sonde à quelques nanomètres.

a) Réduction du bruit mécanique

Un schéma du dispositif avec les différents composants, présentés dans ce qui suit, est visible au début de cette partie (figure II.8). Concernant le bruit mécanique, beaucoup de temps a été consacré à trouver des solutions pour l'amortissement de l'ensemble du dispositif expérimental dans le but de réduire les vibrations qui étaient initialement de quelques centaines de nanomètres pour l'extrémité des pipettes (ce qui représente des forces de quelques centaines de pN) et empêche toutes mesures de forces dans le cadre de notre étude. La fixation mal assurée de certains éléments, la position du dispositif expérimental sur une table lestée mais non amortie, la situation des locaux (5^e étage, passage du métro à proximité...) sont autant de sources de bruit qu'il a fallu atténuer et différentes stratégies ont été envisagées. L'ensemble du dispositif a, dans un premier temps, été posé sur une plaque de dural de 1 m² et 1 cm d'épaisseur, amortie par des balles de tennis. Le bruit dû aux vibrations restant trop important, nous avons essayé des amortisseurs pneumatiques passifs puis nous avons finalement choisi de placer l'ensemble du montage sur une table optique TMC amortie

II.2. LE BFP ET LES PEPTIDES PÉNÉTRANTS

par des pieds pneumatiques actifs (Gimbal Piston de chez TMC) ce qui nous a permis de réduire de façon efficace le bruit sur la mesure (figure II.9). Le support des micromanipulateurs (M225 et M285 de SUTTER INSTRUMENT) a été fait sur mesure. Après réflexion et différents essais, nous avons opté pour une platine suffisamment large sur laquelle les micromanipulateurs ont pu être fixés. Ce choix de rendre solidaire l'ensemble des pièces du BFP (le microscope inversé OLYMPUS, la caméra uEye de IDS, la chambre d'expérimentation et les micro-manipulateurs) a contribué à diminuer le bruit mécanique.

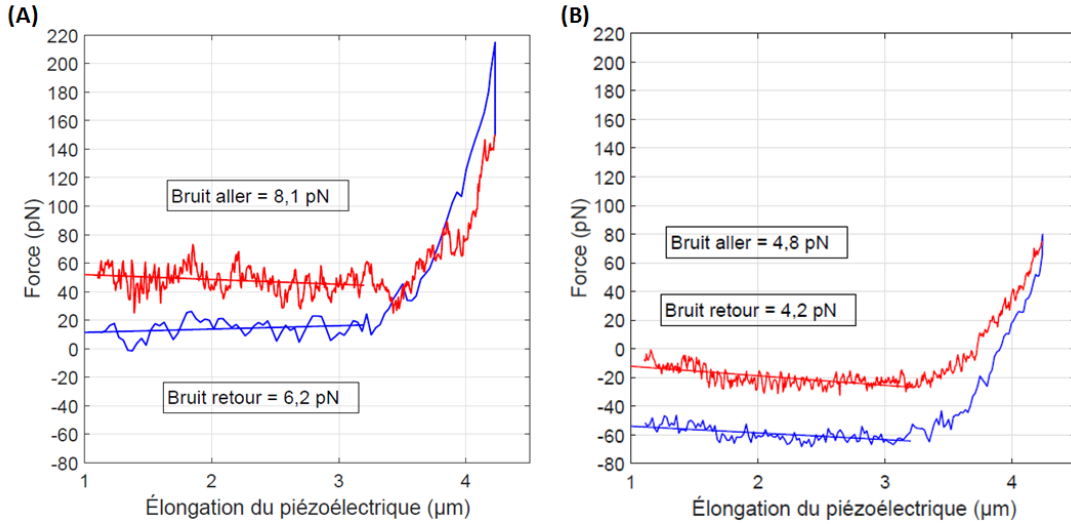


Fig. II.9 Courbes de force typiques obtenues avec le BFP avant (A) et après (B) l'installation du système d'amortissement Gimbal Piston. Les expériences sont réalisées sur deux cellules CHO-K1 différentes. L'écart quadratique moyen est calculé pour chaque courbe sur le plateau (hors contact avec la cellule) par rapport à la droite moyenne représentant une courbe sans bruit mécanique. Les mesures donnent un bruit de 4,8 pN contre 8,1 pN sur la courbe aller (en rouge) et 4,2 pN contre 6,2 pN sur la courbe retour (en bleu) avec et sans les amortisseurs pneumatiques actifs Gimbal Piston.

b) Montage et chambre d'expérimentation

La chambre d'expérimentation (figure II.8 (C)) est composée de deux lamelles de verre $5 \times 24 \text{ mm}^2$ découpées à l'aide d'une pointe de diamant dans des lamelles (CML FRANCE) préalablement lavées à l'alcool puis à l'eau distillée et séchées. Les lamelles de verre sont espacées de quelques millimètres par un support en acier isolé du reste de la platine par un morceau de parafilm. Une première étape consiste à traiter pendant environ 1h la chambre et les pipettes en verre à l'albumine de sérum de boeuf (BSA). Cela rend les surfaces en verre moins adhérentes aux différents éléments introduits dans la chambre. La chambre et les pipettes sont ensuite rincées plusieurs fois puis la chambre est remplie à nouveau par du PBS et sont successivement introduits les globules rouges et les billes (pour fabriquer la sonde de force), les cellules (sur lesquelles sont réalisées les mesures) et finalement les pipettes en verre.

CHAPITRE II. MESURE DE FORCE ET ÉLECTROPHYSIOLOGIE EN PRÉSENCE DE PEPTIDES PÉNÉTRANTS

c) Les pipettes

Les pipettes sont formées à partir de capillaires en borosilicate de diamètre intérieur 0,50 mm, de diamètre extérieur 1,0 mm et de 15 cm de long. Elles sont fabriquées par une étireuse (SUTTER INSTRUMENT CO) dont les paramètres sont notés dans le tableau II.1 et forgées à l'aide d'une microforge. Il s'agit d'un fil de platine sur lequel est déposé une goutte de verre. Le fil de platine est chauffé par effet Joule et fait fondre le verre. Par capillarité ce verre fondu peut s'introduire au niveau de la pointe de la pipette de taille inférieure à 2 μm . Le chauffage du fil de platine est alors brutalement arrêté et le verre liquide, différent du borosilicate constituant la pipette qui lui n'a pas fondu, se solidifie. Une cassure nette se forme alors au niveau de l'interface verre-air. La pipette ainsi forgée est prête pour utilisation et peut être remplie par du PBS.

Puissance du laser	Mode de balayage du laser	Vitesse d'étirement	Délai avant l'étirement	Force de l'étirement
350	4	50	150	200

Table II.1 *Réglage des différents paramètres pour l'étireuse SUTTER INSTRUMENT (les paramètres, sans dimensions, sont propres à la machine).*

Une fois les pipettes forgées et remplies de PBS elles sont connectées à un système de contrôle de pression qui va permettre d'aspirer ou souffler avec une précision de l'ordre de 10^3 Pa du côté de la cellule et 10 Pa du côté de la sonde de force en sortie de pipette. Du côté de la pipette tenant la cellule, ce système est constitué d'une simple seringue de 2 mL reliée à la pipette par un tube souple rempli d'air. Du côté de la pipette "sonde de force", le système est un réservoir d'eau dont le niveau peut être ajusté sur quelques centimètres avec une précision millimétrique et relié à la pipette par un tube souple rempli d'eau. Il est important qu'il n'y ait aucune bulle d'air dans ce système sinon l'aspiration ne sera pas précisément contrôlée en bout de pipette. Durant la phase de traitement à la BSA le zéro de pression est déterminé, c'est à dire la position du réservoir qui implique qu'il n'y ait aucune aspiration à la sortie de la pipette. Cela correspond à placer au même niveau la surface de l'eau du réservoir et le bout de la pipette. Pour cela, la surface du réservoir est d'abord placée grossièrement au niveau de la chambre. On cherche ensuite dans la chambre remplie à la BSA une poussière capable de rentrer dans la pipette (de taille inférieure à 2 μm) puis est ajustée finement la position du réservoir : cela correspond au moment où la poussière est en bout de pipette, immobile (ni aspirée ni soufflée). L'aspiration du globule rouge lors de la formation de la sonde de force pourra donc être contrôlée à la dizaine de pascals près. En effet, descendre le réservoir de 1 mm correspond à une dépression de 10 Pa en bout de pipette ($\Delta P = \rho \times g \times \Delta H$, avec ΔP la variation de pression, ΔH la variation de hauteur du réservoir, ρ la masse volumique de l'eau et g l'accélération de pesanteur).

d) La Pénétratine

La Pénétratine (RQIKIWFQNRRMKWKK) utilisée a été synthétisée par LIFE TECHNOLOGIES. Elle est couplée à de la biotine par l'intermédiaire d'un bras aminopentanoyl ou PEG4. Cette biotine permet d'accrocher la Pénétratine aux billes de verre greffées à la streptavidine. Les peptides sont purifiés par RP-HPLC (chromatographie en phase inverse)

II.2. LE BFP ET LES PEPTIDES PÉNÉTRANTS

et leur séquence contrôlée en spectroscopie de masse.

e) La sonde de force

La sonde de force est constituée d'un globule rouge et d'une bille de verre de 3 μm de diamètre. Le globule rouge est d'abord aspiré par la pipette de verre à 300 Pa. Cette pression permet de régler la raideur finale de la sonde selon la formule rappelée ici [Evans et al., 1995] :

$$k = \frac{\pi \times R_p \times \Delta P}{(1 - \frac{R_p}{R_g}) \times (\ln(\frac{2 \times R_g}{R_p}) + \ln(\frac{2 \times R_g}{r_{\text{contact}}}))},$$

On vient ensuite, à l'aide de la seconde pipette, coller la bille de verre fonctionnalisée sur le globule rouge. L'adhésion entre la bille et le globule rouge est assurée par des liaisons biotine-streptavidine qui sont très bien caractérisées [Pincet and Husson, 2005] et largement plus fortes que les forces mesurées (autour de 100 pN par liaison à notre taux de charge), il nous faut donc fonctionnaliser au préalable les globules rouges et les billes.

Les billes nous ont été fournies par Christine Gourier du LPS (ENS) déjà greffées à la streptavidine. Elles ont été préparées par Myriam Chalbi à partir d'un protocole préétabli par Evan Evans. Les étapes de cette préparation peuvent être retrouvées dans la thèse d'Antoine Jégou [Jégou, 2008]. Les billes sont également fonctionnalisées avec de la Pénétratine avec une quantité telle qu'une adhésion unique représente la majorité des événements d'adhésions. Cette quantité a pu être déterminée empiriquement par Pierre Soule au cours de sa thèse. Il s'agit d'incuber 10^6 billes dans une solution à 20 μM de Pénétratine biotinylée pendant trois fois 5 minutes. Les billes sont lavées au PBS. Dans ces conditions 84% des événements d'adhésions observés sont des adhésions uniques (Annexe D).

Les globules rouges sont récupérés à partir d'une goutte de sang et biotinylés. Pour cela, différentes solutions tampons sont préparées :

- Le PBS-290 (osmolarité de 290 mOsm) ou tampon phosphate salin ($\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$) à 0,01 M et pH 7,4 auquel est ajouté 150 mM de NaCl. Il est utilisé pour rincer les globules rouges. Il sert également de solution de stockage.
- Le TBS-316 (osmolarité de 316 mOsm) ou tampon Tris. Il est composé de 25 mM de Tris, 150 mM de NaCl et le pH est ajusté à 7,5 avec du HCl.
- Le CB-180 (osmolarité de 180 mOsm) ou tampon carbonate-bicarbonate ($\text{CO}_3^{2-} / \text{HCO}_3^-$) à 0,1 M et pH 8,5.

L'échantillon de sang est lavé plusieurs fois par ces différentes solutions et centrifugé à 3000 g pendant 2 minutes à chaque fois. On lave la goutte de sang deux fois au PBS-290 puis trois fois au CB-180. Les globules rouges sont ensuite incubés une heure sous faible agitation en présence de 2 mg.mL^{-1} de NHS-PEG3400-biotine en milieu CB-180. Ils sont ensuite rincés trois fois au TBS-316 puis incubés 30 minutes sous faible agitation en milieu TBS-316. Finalement les globules rouges sont lavés trois fois au PBS-290 et conservés à 4°C dans ce même tampon. Ils peuvent être utilisés pendant une semaine.

f) Les cellules et vésicules

Les cellules utilisées sont des cellules d'ovaire de hamster de type sauvage (CHO-K1) ou déficientes en acides sialiques (CHO-lec2). Elles ont été préparées au laboratoire par Delphine Ravault. Les cellules sont mises en culture à 37°C et en atmosphère humide contrôlée à 5 %

CHAPITRE II. MESURE DE FORCE ET ÉLECTROPHYSIOLOGIE EN PRÉSENCE DE PEPTIDES PÉNÉTRANTS

de CO_2 la veille pour le lendemain à une concentration de 100 000 cellules par millilitre en milieu DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium de chez GIBCO) et 10 % de sérum (Foetal Bovine Serum, FBS de chez GIBCO). Avant leur utilisation les cellules doivent être décollées pendant cinq minutes à $37^\circ C$ à l'aide de 1 mL d'une solution de PBS à 0,5 mM d'EDTA qui est un chélateur du calcium. 2 mL d'une solution de HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution de chez GIBCO) sont ajoutés pour arrêter l'action de l'EDTA puis les cellules sont centrifugées cinq minutes à 750 g et le surnageant est enlevé. Lors des expériences de BFP seules, les cellules sont utilisées directement après cette étape. Le traitement de la chambre à la BSA s'effectue durant la préparation des cellules.

Pour le traitement à l'héparinase III, après leur décollement, les cellules sont incubées une heure à $37^\circ C$ avec 40 nano-unités par cellule (traitement 1x) ou 200 nano-unités (traitement 5x) d'héparinase III issue de *Flavobacterium heparinum* (SIGMA ALDRICH) puis utilisées immédiatement.

Les vésicules utilisées sont des vésicules multilamellaires (MLV). Elles sont fabriquées à partir d'un film de lipides obtenu par évaporation sous vide d'une goutte à 25 g.L^{-1} déposée sur un support en téflon, puis recouvert d'une solution de 300 mM de sucrose et placées à $37^\circ C$ pour la nuit. Elles sont composées de 1,2-Dioleoyl-sn-glycéro-3-phosphocoline(DOPC) et de 3-O-sulfo- β -D-C17-galactosylceramide (figure II.10) en proportion 4 pour 1.

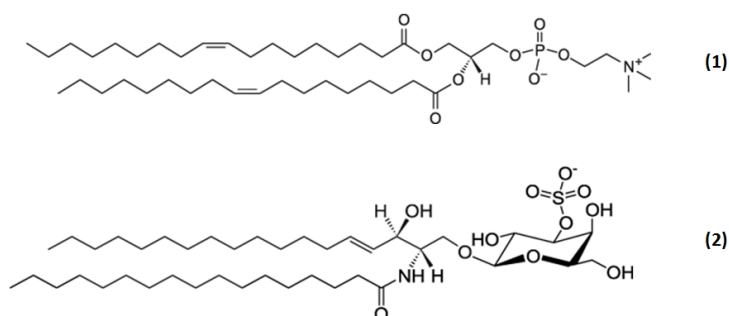


Fig. II.10 Formules semi-développées du 1,2-Dioleoyl-sn-glycéro-3-phosphocoline (1) et du 3-O-sulfo- β -D-C17-galactosylceramide (2).

g) Mesures et acquisition des données

Une fois la chambre préparée, les billes, les globules rouges et les cellules introduits la sonde de force est préparée et une cellule est placée en vis à vis de la sonde à quelques micromètres dans le même plan focal à l'aide des micromanipulateurs (figure II.11).

Une interface écrite en C++ sous le logiciel Visual Studio permet de contrôler la céramique piézoélectrique pour le déplacement de la sonde de force, contrôle l'acquisition de l'image et l'enregistrement de diverses données dans un fichier texte. Ce fichier comprend le calcul de la raideur de la sonde, la détection en temps réel de la bille à partir des images de la caméra, l'enregistrement de l'élongation de la céramique piézoélectrique, du temps... Il faut cependant renseigner les différents paramètres suivants :

- Le diamètre du globule rouge. Mesuré à chaque nouvelle sonde, il est proche de $6\text{ }\mu\text{m}$.
- Le diamètre de la pipette de sonde. Mesuré à chaque nouvelle pipette, il est de l'ordre de $2\text{ }\mu\text{m}$.

II.2. LE BFP ET LES PEPTIDES PÉNÉTRANTS

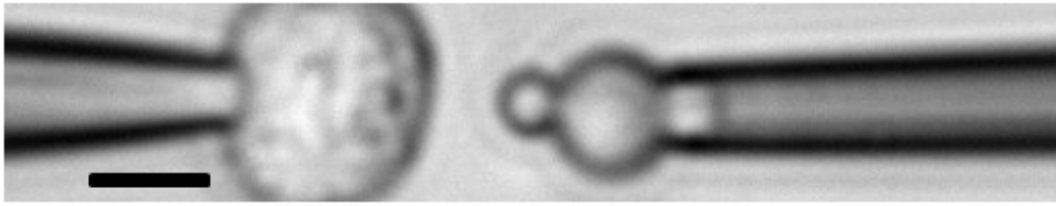


Fig. II.11 Situation observable au microscope avant le début des mesures en BFP. On trouve à gauche la cellule tenue par une pipette et à droite la sonde de force composée de la bille et du globule rouge légèrement aspiré par la pipette de droite. L'ensemble est volontairement défocalisé pour repérer plus précisément la position de la bille. La barre d'échelle correspond à $5\ \mu\text{m}$

- Le diamètre de contact globule rouge - bille. Il est de l'ordre de $2\ \mu\text{m}$. Ces trois premiers paramètres permettent de déterminer la raideur du globule rouge et donc de la sonde de force.
- L'aspiration du globule rouge. Elle est de 300 Pa.
- La force maximale de contact entre la sonde et la cellule. Dans son travail de thèse Pierre Soule a fixé cette valeur à 80 pN, dans mon cas j'ai pu faire varier cette valeur jusqu'à 250 pN.
- Le temps de contact entre la cellule et la sonde de force. Cette valeur a été fixée à 400 ms
- Le taux de charge. Il est proportionnel à la vitesse de rétractation de la céramique piézoélectrique lors du recul de la sonde. Il est fixé à $4800\ \text{pN.s}^{-1}$. Ce taux est utilisé pour des raisons historiques car il s'agit d'un bon compromis entre des forces détectées trop faibles (taux de charge faible) qui ne se distinguent pas du bruit mécanique et des forces plus importantes mais où les effets hydrodynamiques dus aux mouvements rapides de la sonde commencent à perturber les mesures.
- Le nombre d'aller-retour de la sonde, généralement fixé à 100.
- Le nom du fichier.
- La distance de latence après le début d'élongation de la céramique piézoélectrique. Il s'agit de la distance après laquelle les mesures sont prises en compte car durant le premier micromètre d'élongation de la céramique piézoélectrique les données de force sont incohérentes. Nous nous assurons donc à chaque expérience de placer la sonde de force suffisamment loin de la cellule pour que le contact ne soit pas établi pendant cette distance de latence.
- La correction linéaire de la force. Une dérive continue en force a été constatée lors des mesures. Elle est due à une différence entre la consigne d'élongation de la céramique piézoélectrique et le déplacement effectivement observé de la sonde. Ce paramètre permet donc de corriger ce problème. Généralement, il est fixé à $45\ \text{nm}.\mu\text{m}^{-1}$.

La bille apparaît comme un point blanc plus lumineux que le reste de l'image grâce à la défocalisation, un "double clic" sur celle-ci permet d'initier la recherche de positionnement au cours du temps. Généralement un couple-sonde cellule nous permet d'acquérir 200 courbes. Une même sonde est utilisée pour 2 à 3 cellules et au moins 1000 courbes par condition sont nécessaires pour dégager un résultat statistiquement pertinent.

II.2.2 Résultats

L'étude en BFP sur l'interaction spécifique de la Pénétratine avec des partenaires de surfaces des cellules vise à démontrer que les glycosaminoglycanes jouent un rôle majeur dans l'internalisation de la Pénétratine. Dans cette étude nous nous intéressons au taux d'adhésion de la sonde à la surface d'une cellule. Il correspond, en pourcentage, au nombre de fois où la bille adhère à la cellule par rapport au nombre de contacts sonde-cellule. En effet les composés biologiques à la surface de la bille ne trouvent pas toujours de partenaire avec lesquels interagir sur la membrane car la bille est recouverte de peptide de telle façon que la majorité des adhésions soient uniques, la sonde n'adhère donc pas à chaque contact. Nous démontrons ainsi que le taux d'adhésion de la sonde est de 35 % en présence de Pénétratine contre 15 % sans (adhésion non spécifique). De plus un traitement des cellules à l'héparinase III, qui dégrade spécifiquement les sulfates d'héparane, ramène le pourcentage d'adhésion au niveau non spécifique. Des cellules déficientes en acide sialique (CHO Lec 2) sont également utilisées pour démontrer la présence d'un second partenaire. Rappelons que les mesures de Pierre Soule ont été effectuées sur le BFP de l'ENS.

Au cours de cette thèse nous avons pu contrôler le bon fonctionnement de notre montage BFP en confirmant certains taux d'adhésion et en effectuant deux séries de mesure de contrôles complémentaires. Le taux d'adhésion non spécifique (sans Pénétratine) a été mesuré sur des MLV et sur des CHO Lec2 traitées à l'héparinase III 5x, des conditions contrôles qui n'avaient pas été réalisées. Deux exemples de courbes de forces pour cette condition sont présentés sur la figure II.12. Les taux mesurés sont de 2,4 % (pour 1097 mesures) pour les MLVs et de 5,9 % (pour 1638 mesures) pour les CHO Lec2. Ces valeurs sont cohérentes avec des adhésions non spécifiques et le reste de l'étude. Cela nous amène à conclure que notre montage BFP est parfaitement fonctionnel.

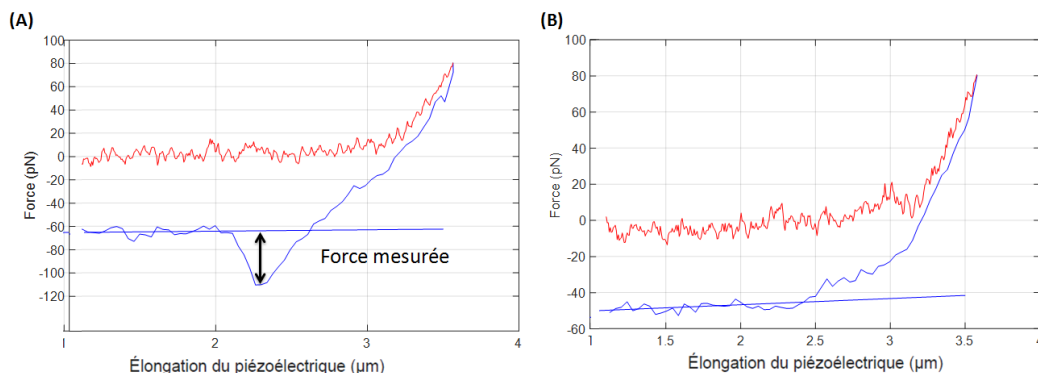


Fig. II.12 Courbes de force avec (A) et sans (B) adhésion de la sonde sans Pénétratine sur des cellules CHO Lec2.

Dans la continuité de cette étude qui s'intéresse à la première étape de l'internalisation des CPP, l'adhésion peptide-membrane, nous cherchons à déterminer de nouveaux partenaires d'interaction. Lors de l'insertion du peptide dans la membrane, certains lipides pourraient être directement impliqués dans l'adhésion de la Pénétratine à la cellule. Pour cela il faudra certainement adapter notre protocole. Dans le but de permettre à la Pénétratine de s'enfoncer plus profondément dans la membrane, il a été envisagé de rallonger le bras reliant la Pénétratine à la bille de verre. Lors de l'étude précédente nous avons utilisé un bras aminopentanoyl

II.3. L'ÉLECTROPHYSIOLOGIE ET LE PATCH-CLAMP

et nous envisageons à présent l'utilisation du PEG4 pour allonger ce bras (figure II.13 A). Il nous faudra également exercer une pression plus importante contre la membrane, des résultats préliminaires ont été obtenus dans ce sens. Nous pouvons remarquer que l'adhésion non spécifique ne semble pas corrélée à la force de contact entre la bille et la cellule (figure II.13 B)

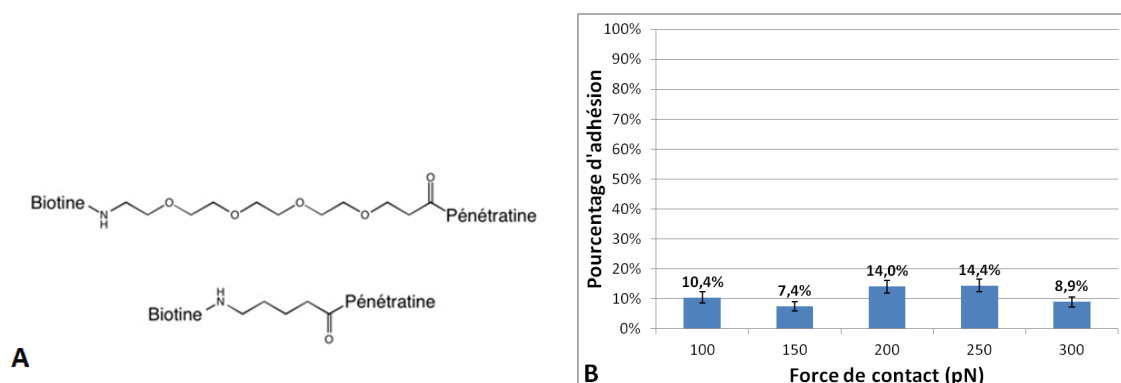


Fig. II.13 (A) Formules semi-développées des bras utilisés pour rattacher la Pénétratine à la bille de verre : le PEG4, plus long permet une insertion plus profonde dans la membrane que le groupement aminopentanoyl. (B) Évolution de l'adhésion non spécifique en fonction de la force maximale de contact sur le nouveau montage du LBM. L'adhésion non spécifique ne semble pas dépendre de la force de contact. Les résultats sont obtenus pour respectivement 288, 445, 401, 313 et 282 courbes.

II.3 L'électrophysiologie et le patch-clamp

II.3.1 Historique et principe de l'électrophysiologie

L'électrophysiologie est l'étude des phénomènes électriques qui se produisent dans les cellules et les tissus vivants. Elle a connu un véritable essor avec le développement de la technique de "patch-clamp" par Erwin Neher et Bert Sakmann [Neher and Sakmann, 1976] qui furent récompensés par le prix Nobel de Physiologie en 1991. La technique consiste à enregistrer des courants ioniques au travers d'une membrane cellulaire. Il est possible d'imposer une tension et de mesurer un courant à travers la membrane cellulaire (mode "voltage-clamp") ou au contraire de mesurer la tension en imposant le courant (mode "current-clamp"). Il existe quatre configurations possible d'utilisation du "patch-clamp" (figure II.14) :

- Configuration "Cell attached" : la pipette remplie d'une solution aqueuse et contenant une des deux électrodes est placée en contact avec la membrane cellulaire mais il n'y a pas d'aspiration ni d'arrachement du petit bout de membrane (figure II.14 (1)).
- Configuration "Whole cell" : la technique consiste à assurer une continuité électrique entre la phase aqueuse dans la cellule et l'intérieur de la pipette contenant l'électrodes. La pipette est placée en contact avec la cellule et, par aspiration d'un bout de membrane, la continuité électrique est assurée (figure II.14 (2)). Cela permet de mesurer le courant traversant l'intégralité de la membrane cellulaire.

CHAPITRE II. MESURE DE FORCE ET ÉLECTROPHYSIOLOGIE EN PRÉSENCE DE PEPTIDES PÉNÉTRANTS

- Configuration "Inside out" : un bout de membrane est directement arraché par la pipette. Le côté intérieur de la membrane cellulaire se retrouve à l'extérieur de la pipette. Cette configuration est généralement utilisée pour mesurer le courant à travers un seul canal ionique (figure II.14 (3)).
- Configuration "Outside out" : comme pour la configuration précédente, un bout de membrane est arraché, mais dans cette configuration l'extérieur de la membrane cellulaire se retrouve vers l'extérieur de la pipette (figure II.14 (4)).

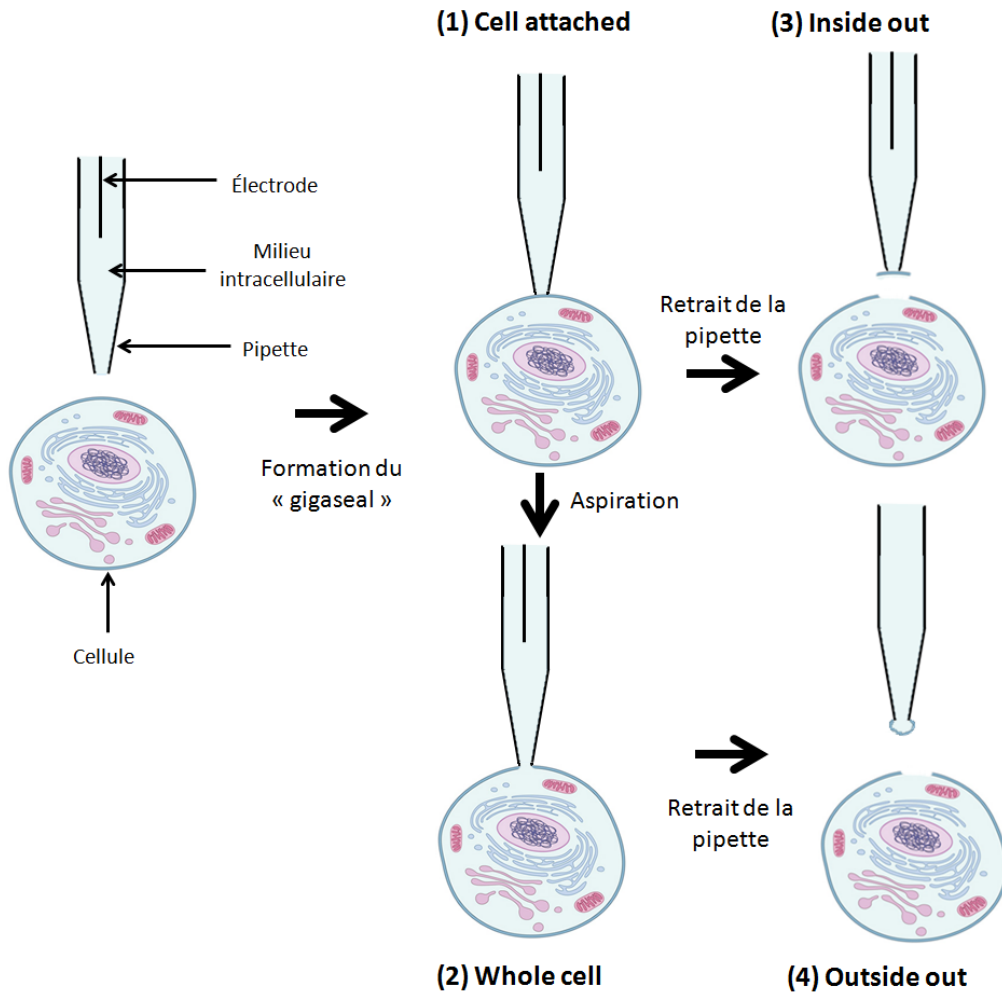


Fig. II.14 Les différentes configuration de "patch-clamp" : (1) Cell attached (2) Whole cell (3) Inside out (4) Outside out.

Il est important de noter que toutes les configurations de "patch-clamp" débutent par la même étape de mise en contact de la pipette contenant l'électrode avec la membrane cellulaire. Cette étape que nous appellerons dans la suite de ce chapitre "la formation du gigaseal" consiste à isoler parfaitement l'électrode à l'intérieur de la pipette du milieu extérieur, de sorte que les courants éventuellement mesurés traversent bien la membrane cellulaire et ne passent pas par les bords du scellement. Pour cela, une légère aspiration est imposée à la pipette lors de sa mise en contact avec la membrane qui va alors remonter dans la pipette et

II.3. L'ÉLECTROPHYSIOLOGIE ET LE PATCH-CLAMP

se coller à la paroi de verre. Cela conduit à une augmentation de la résistance électrique entre les deux électrodes. Lorsque la résistance dépasse le gigaohm, l'isolation entre les électrodes est parfaitement assurée par la membrane cellulaire et le "gigaseal" est formé.

Le "patch-clamp" est une technique très utilisée pour étudier les canaux ioniques. En effet, par cette technique très sensible il est possible, par stimulation chimique notamment, d'observer l'ouverture ou la fermeture d'un seul canal ionique qui induit la variation du courant à travers la membrane et de mesurer des courants dans la gamme du picoampère (figure II.15) [Neher and Sakmann, 1976].

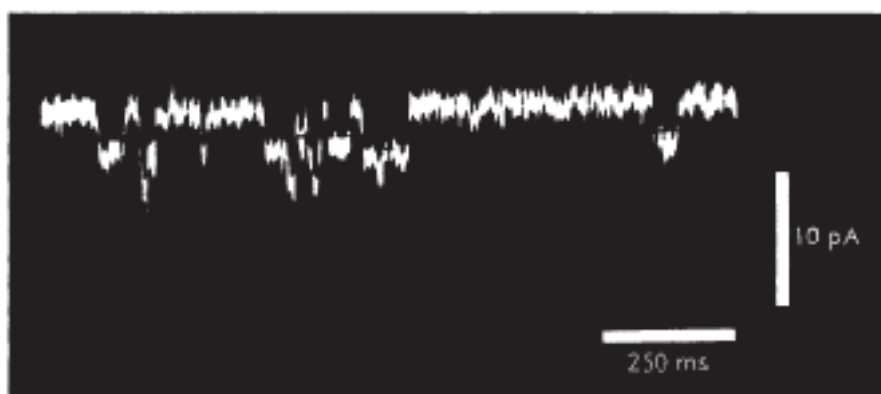


Fig. II.15 Enregistrement du courant par la technique de patch en mode "Whole cell" dans une cellule musculaire de grenouille. Les sauts de courant correspondent à l'ouverture d'un canal associé à l'acétylcholine [Neher and Sakmann, 1976].

II.3.2 Électrophysiologie et CPP

Les CPP modifient et réarrangent les lipides des membranes lors de leur entrée dans la cellule (*cf.* figure I.9 du chapitre 1). Ces modifications de la bicouche lipidique ont déjà pu être mesurées sur des bicouches suspendues (partie III.1.3 sur les membranes modèles) par Herce *et al.* [Herce *et al.*, 2009]. Les auteurs de cette étude ont constaté que des peptides riches en arginine déstabilisent la membrane plasmique et induisent des pores dont les effets sont mesurables par électrophysiologie. Pour confirmer cette hypothèse, Nicolas Rodriguez a réalisé des expériences préliminaires afin de mesurer les courants traversant la membrane cellulaire en présence de CPP (figure II.16).

Sur une cellule adhérente CHO "patchée" en mode "Whole cell" différents CPP (R9, R6W3 et R10W6) sont relargués à proximité de la cellule à des concentrations comprises entre 2 – 100 μM . Le courant électrique enregistré ne semble pas significativement varier en présence de R9 et R6W3 mais avec R10W6 un effet est cependant notable. Le courant traversant la membrane cellulaire diminue fortement, signe que des pores se forment (II.17). Il est donc possible de mesurer l'effet des CPP sur les cellules avec la technique de "patch-clamp". Pour aller plus loin dans cette étude, l'idée a alors été de coupler électrophysiologie et mesure de force en BFP pour associer l'action d'un CPP sur la membrane (mesure de force en BFP) avec son impact sur la réorganisation des lipides de la membrane (mesure de courant en patch). Le couplage des deux techniques permet de connaître dans le même

CHAPITRE II. MESURE DE FORCE ET ÉLECTROPHYSIOLOGIE EN PRÉSENCE DE PEPTIDES PÉNÉTRANTS

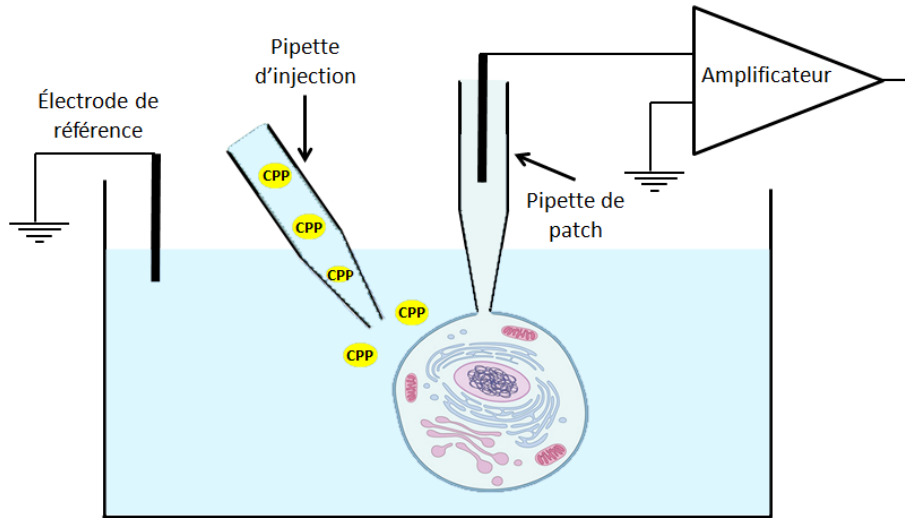


Fig. II.16 Schéma de principe de l'expérience d'électrophysiologie pour mesurer l'impact des CPP sur les membranes cellulaire.

temps si le CPP interagit avec la membrane et son impact sur la réorganisation des lipides de la bicouche.

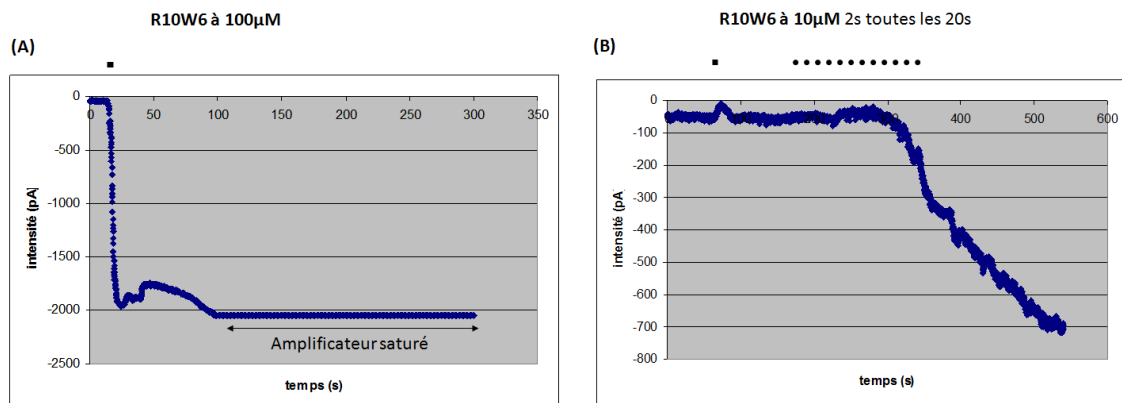


Fig. II.17 Courant électrique à travers la membrane de cellules CHO en présence de R10W6. Les points noirs au dessus des courbes correspondent au relargage du peptide à proximité de la cellule. Les effets sont notables que ce soit lorsqu'un seul relargage à 100 µM est effectué (A) ou plusieurs moins concentrés à 10 µM (B).

Dans notre cas nous avons choisi de travailler en mode "voltage-clamp" et en configuration "Whole cell".

II.4 Couplage des mesures de force et d'électrophysiologie

Nous avons ajouté par la suite un système de "patch-clamp" à notre montage pour coupler les mesures de BFP et d'électrophysiologie. Pour cela la pipette tenant la cellule en place dans

II.4. COUPLAGE DES MESURES DE FORCE ET D'ÉLECTROPHYSIOLOGIE

le montage BFP est remplacée par une pipette contenant une électrode reliée à l'amplificateur et capable d'effectuer la technique de "patch-clamp".

II.4.1 Mise en place et protocole

Nous avons pu voir dans la partie précédente que mesurer une force nécessite des vibrations mécaniques très faibles (*cf* partie II.9). Pour les mesures d'électrophysiologie il nous faut diminuer les différents bruits électriques (essentiellement du bruit à 50 Hz des prises et appareils électriques branchés au secteur). Nous avons donc placé notre montage (le microscope et les micro manipulateurs) dans une cage de Faraday. Il s'agit d'isoler électriquement l'intérieur d'une cage faite de panneaux de dural (alliage de cuivre et d'aluminium) d'un mètre carré et de 2 mm d'épaisseur. La cage et la table sont reliées à la masse du système. Nous avons constaté que le fait de garder la cage ouverte (une face sur six est enlevée) ne change pas significativement le bruit électrique. Nous avons tout de même gardé la possibilité de fermer la cage de Faraday à l'aide d'une face amovible conductrice (de type grillage ou couverture de survie). Le contrôleur des micro-manipulateurs (SUTTER INSTRUMENT), le contrôleur de la piézoélectrique, l'alimentation de la lampe du microscope et l'amplificateur de mesure (Axopatch 200B de MOLECULAR DEVICE) sont donc placés à l'extérieur de la cage. Le signal est enregistré à l'aide d'électrodes d'argent préalablement couvertes de chlorure d'argent par un bain d'au moins une heure dans de la JAVEL. Le bruit du signal électrique a ainsi été ramené à une quinzaine de picoampères (mesure de la déviation standard).

a) Les pipettes

Les pipettes de patch sont préparées légèrement différemment des pipettes de BFP. En effet, ces dernières ne permettaient pas d'obtenir le "Gigaseal". Elles ne sont pas micro-forgées et les paramètres de l'étireuse sont différents (tableau II.2). Ils ont été choisis de façon à afficher une "résistance de pipette" comprise entre 5 et 15 $M\Omega$ lorsque la pipette est remplie de "solution intracellulaire" présentée dans ce qui suit. Cette résistance correspond à la résistance électrique du milieu entre l'électrode de mesure (dans la pipette) et la contre électrode (dans la chambre). Elle est essentiellement déterminée par le rétrécissement de la pointe de pipette. Le diamètre interne de la pipette mesure entre 1 et 2 μm à la pointe. Les capillaires utilisés (SUTTER INSTRUMENT) présentent les caractéristiques suivantes :

- Diamètre externe (OD) : 1,0 mm, diamètre interne (ID) : 0,50 mm (1) ou
- Diamètre externe (OD) : 1,2 mm, diamètre interne (ID) : 0,69 mm (2)

b) Les milieux cellulaires

Le milieu extracellulaire est déposé dans la chambre d'expérimentation. Le pH est ajusté à 7,4 à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH). Le milieu est composé de :

- 130 mM de NaCl (masse molaire : 58,4 $g.mol^{-1}$)
- 4,7 mM de KCl (masse molaire : 74,6 $g.mol^{-1}$)
- 2,5 mM de $CaCl_2$ (masse molaire : 147 $g.mol^{-1}$)
- 5,0 mM de HEPES (masse molaire : 238,3 $g.mol^{-1}$)
- 6,0 mM de glucose (masse molaire : 180,2 $g.mol^{-1}$) préparé et ajouté au dernier moment

CHAPITRE II. MESURE DE FORCE ET ÉLECTROPHYSIOLOGIE EN PRÉSENCE DE PEPTIDES PÉNÉTRANTS

Puissance du laser	Mode de balayage du laser	Vitesse d'étirement	Délai avant l'étirement	Force de l'étirement	Type de pipette
350	4	50	200	0	1
400	4	50	200	0	1
473	4	50	200	0	1
455	4	50	200	0	2

Table II.2 Réglages des différents paramètres pour l'étireuse SUTTER INSTRUMENT (les paramètres, sans dimensions, sont propres à la machine). La première ligne de paramètres permet de faire des pipettes de $1\ \mu\text{m}$ et de $10\ \text{M}\Omega$. Les deux lignes suivantes donnent des pipettes de $15\ \text{M}\Omega$. La dernière ligne de paramètres permet de fabriquer des pipettes de $2\ \mu\text{m}$ et de $8\ \text{M}\Omega$. En diminuant la puissance du laser des pipettes plus grosses sont fabriquées, leur résistance est donc facilement ajustable.

Le milieu intracellulaire est introduit dans la pipette de patch à l'aide d'une seringue spéciale à l'aiguille assez fine pour rentrer dans le capillaire. Lors du remplissage de la pipette il faut s'assurer qu'aucune goutte d'air n'est piégée dans la pointe. Le milieu intracellulaire présente un pH ajusté à 7,3 par une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) et est constitué de :

- 130 mM de KCl (masse molaire : $74,6\ \text{g.mol}^{-1}$)
- 5 mM de Mg-ATP (masse molaire : $507\ \text{g.mol}^{-1}$)
- 1 mM de $\text{Mg} - \text{Cl}_2$ (masse molaire : $203,3\ \text{g.mol}^{-1}$)
- 0,1 mM de EGTA (masse molaire : $380,4\ \text{g.mol}^{-1}$)
- 5 mM de HEPES (masse molaire : $238,3\ \text{g.mol}^{-1}$)

c) Acquisition des mesures électriques

Les données sont acquises grâce au logiciel Clampex puis traitées avec le logiciel Clampfit. Le courant entre les électrodes est mesuré en réponse à une marche de tension de 20 mV entre -60 mV et -40 mV. La marche a une durée de 300 ms ou 1000 ms pour une durée totale respective de 1 s ou 3 s. Ce protocole se répète en boucle. La durée totale a été allongée à 3 secondes car cela correspondait à peu près à la durée de l'aller-retour de la sonde de force. Le gain de l'amplificateur est à 1 puis à 5 lorsque le gigaseal est formé. Le signal est filtré par un filtre passe bas à 10 kHz. L'échantillonnage se fait à 200 kHz en mode "voltage-clamp" et "Whole cell" ($\beta = 1$).

II.4.2 Les résultats

Dans la continuité de l'étude de Pierre Soule nous avons décidé d'utiliser les cellules CHO-K1 pour "les expériences d'électrophysiologie". Ce sont des cellules adhérentes ce qui n'est pas le type cellulaire classiquement utilisé avec la technique de "patch-clamp". Nous devons les décoller pour coupler la mesure électrique avec la mesure de force par BFP. Nous avons dû vérifier dans un premier temps qu'il était possible avec notre montage d'effectuer des expériences de patch-clamp avec des cellules suspendues. Nous avons obtenu sur une dizaine de cellules CHO-K1 le "Gigaseal" puis les avons percées. Il est donc possible de mettre en

II.4. COUPLAGE DES MESURES DE FORCE ET D'ÉLECTROPHYSIOLOGIE

place la technique de "patch-clamp" avec des cellules adhérentes de type CHO K1.

L'étape suivante a été de chercher à faire un "Gigaseal" sur une cellule CHO-K1 décollée mais le protocole développé pour les mesures en BFP s'est révélé inadapté pour l'électrophysiologie. Le calcium est essentiel à l'adhérence des cellules or l'EDTA est un chélateur du calcium, il permet donc de décoller la cellule et lui fait perdre sa capacité d'adhérence aux surfaces. Bien que le milieu extracellulaire contienne du calcium il semble que le recouvrement de l'adhérence ne soit pas instantané pour les cellules décollées qui sont dans l'incapacité d'adhérer au verre de la pipette et de former le "Gigaseal". Nous avons donc modifié le protocole en conséquence. Suite au décollement, les cellules sont suspendues dans 1 mL de milieu DMEM/F12 avec 10 % de sérum et placées à 37°C pendant deux heures sous agitation pour éviter qu'elles ne se déposent et adhèrent au tube. Elles sont finalement centrifugées cinq minutes à 750 g, le surnageant est évacué, puis resuspendues dans 100 à 200 μ L de milieu avant de pouvoir être utilisées. Cette méthode a permis d'obtenir dans certains cas le "Gigaseal" mais jamais de percer les cellules, un nouveau protocole a donc été élaboré. Les cellules ont été décollées manuellement avec un grattoir adapté en polyéthylène et stérile (COSTAR de chez CORNING INCORPORATED). Elles sont ensuite récupérées, centrifugées et utilisées immédiatement (figure II.18). Nous apportons ici une nouveauté en levant deux difficultés techniques majeures : coupler des mesures de courants et de forces dans un montage capable d'opérer à une dizaine de pN et à une dizaine de pA ainsi que réaliser des mesures d'électrophysiologie en "voltage-clamp" sur des cellules adhérentes décollées mécaniquement.

Des mesures couplées en BFP et électrophysiologie ont ainsi pu être réalisées avec ce type de préparation (figure II.19). Deux cellules ont fait l'objet de mesure avec une sonde non fonctionnalisée à la Pénétratine (la bille de verre ne présentait pas de Pénétratine à sa surface). Le taux d'adhésion est de 10 % (3 forces détectées sur 30 courbes exploitables). Dans le cadre des billes fonctionnalisées avec de la "biotine-aminipentanoyl-Pénétratine", nous avons réussi à obtenir 5 "gigaseal" mais c'est avec seulement deux cellules que nous avons pu aller jusqu'au bout des mesures (percer les cellules pour se placer en mode "whole cell"). La première cellule présente un taux d'adhésion de 9 % (2 sur 23), la seconde de 12 % (8 sur 67). L'analyse des mesures électriques n'a, à ce jour, rien révélé de notable mais est toujours en cours.

Nous avons donc réussi avec notre montage à réaliser une mesure de force en BFP sur une cellule CHO K1 décollée et une mesure électrique par la technique de "patch-clamp". Cependant il semble que les billes utilisées pour la sonde de force n'aient pas été correctement fonctionnalisées car le taux d'adhésion est proche du taux d'adhésion non spécifique. L'étape pendant laquelle la Pénétratine est déposée sur la bille n'a pas été correctement réalisée. De plus nous n'avons pas réussi à ce jour à synchroniser la mesure de force et l'enregistrement électrique, nous ne sommes donc pas capable d'associer une courbe de force avec l'enregistrement électrique correspondant. Sur les enregistrements électriques aucune modification notable du courant n'a été observée mais nous apportons ici la preuve de concept que ce couplage des techniques BFP et d'électrophysiologie est, en pratique, possible. De nouvelles expériences devraient être menées pour pousser plus loin cette étude mais n'ont pas, à ce jour, été réalisées. Ce projet devrait se poursuivre dans le cadre de la thèse de Nathalie Dhayer qui commencera en septembre 2018.

CHAPITRE II. MESURE DE FORCE ET ÉLECTROPHYSIOLOGIE EN PRÉSENCE DE PEPTIDES PÉNÉTRANTS

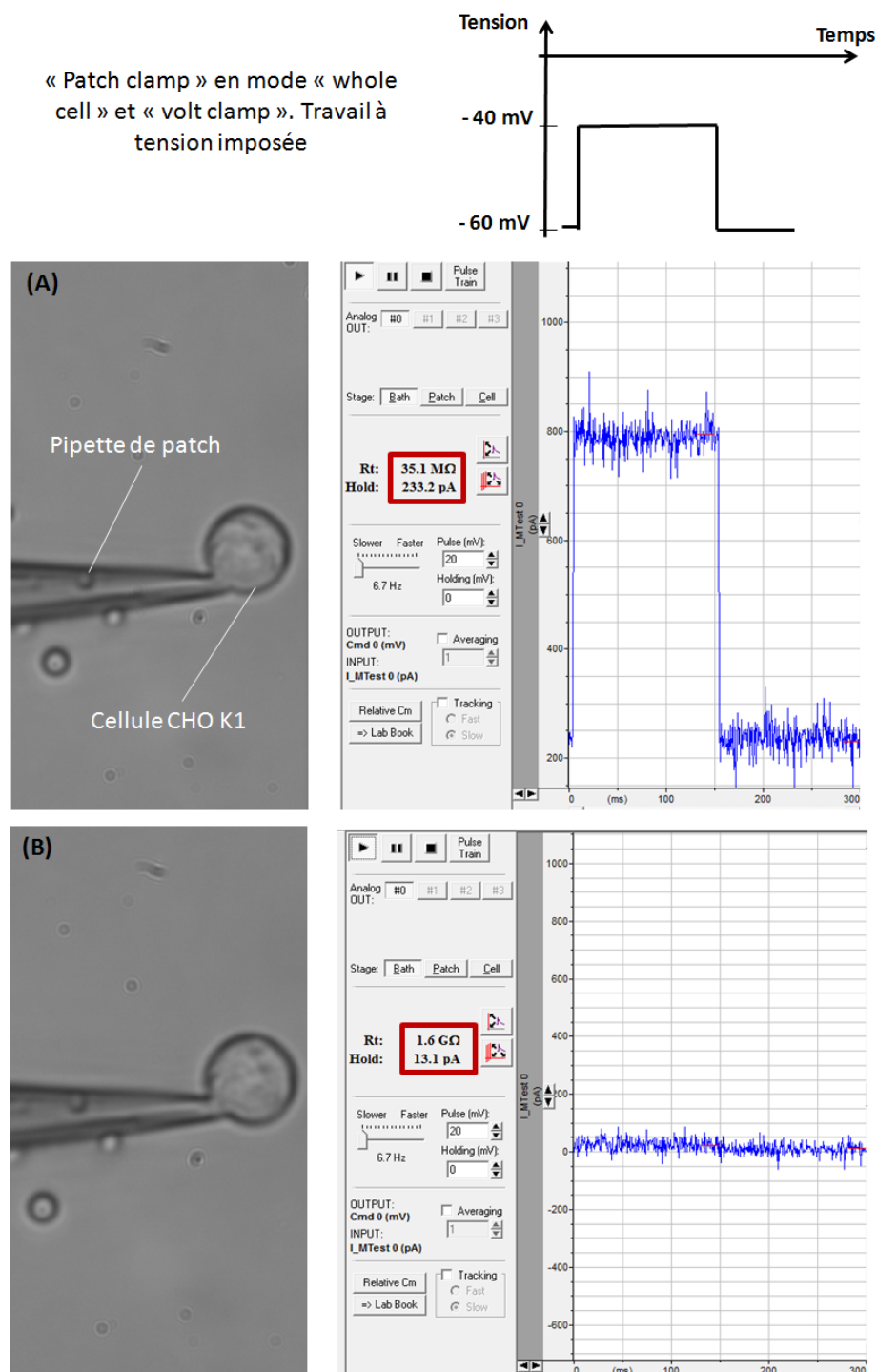


Fig. II.18 Photos d'une cellule CHO K1 décollée avant (A) et après (B) la formation du "gigaseal". Le courant électrique (en bleu) enregistré avec le logiciel clampex est également présenté. On peut observer (dans le carré rouge) la résistance passant de 35 MΩ à 1,6 GΩ.

II.4. COUPLAGE DES MESURES DE FORCE ET D'ÉLECTROPHYSIOLOGIE

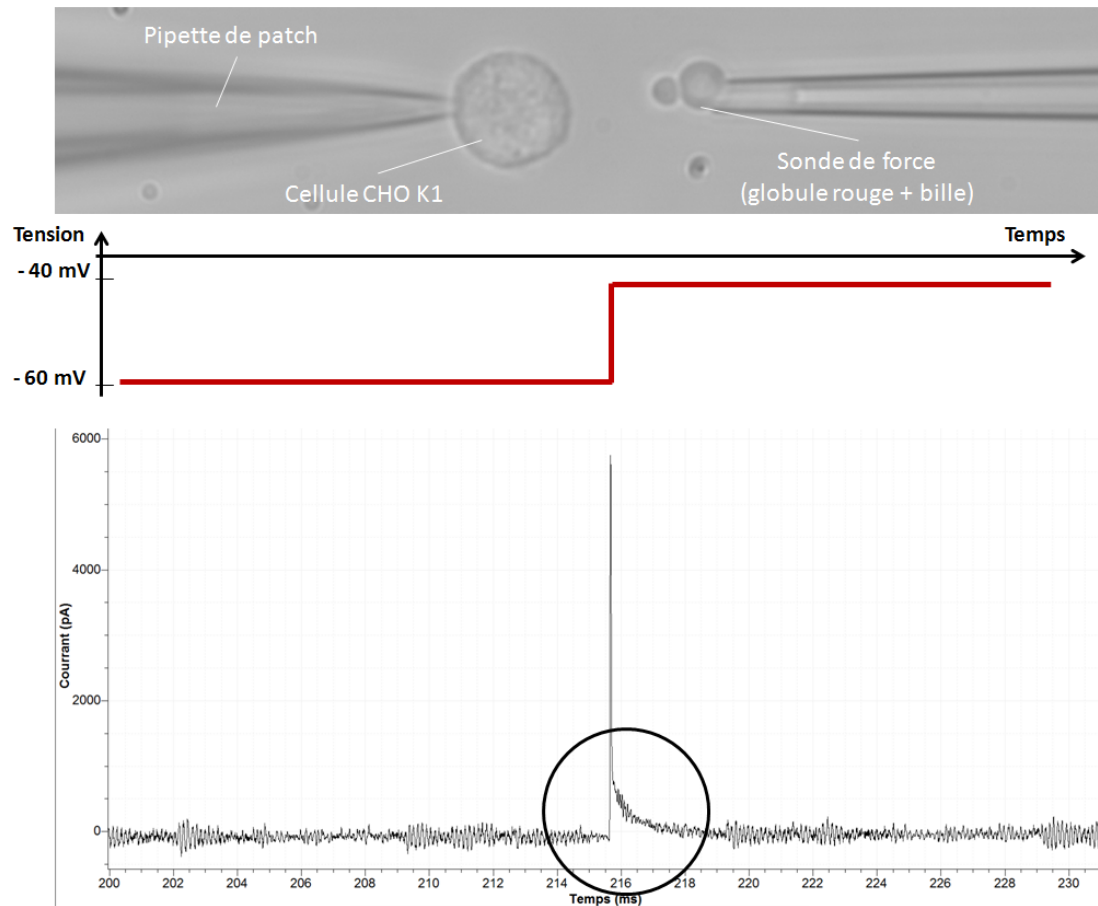


Fig. II.19 Photo du dispositif en place du couplage BFP et "électrophysiologie". L'enregistrement du courant électrique correspondant à la photo (gain de l'amplificateur $\times 5$) est présenté avec la présence des courants capacitifs typiques de la technique de "patch-clamp" (entouré en noir). De plus la résistance de pipette mesurée est supérieure au gigaohm (elle se déduit de la loi d'Ohm $U = R \times I$ avec I la différence de courant entre les deux plateaux de la courbe) donc le gigaseal est réalisé sans fuite de courant. Le "patch-clamp" est correctement en place. En rouge est représentée la tension imposée entre les deux électrodes.

*CHAPITRE II. MESURE DE FORCE ET ÉLECTROPHYSIOLOGIE EN PRÉSENCE
DE PEPTIDES PÉNÉTRANTS*

III – L'activité des CPPs sur des membranes modèles

Nous nous sommes intéressés dans ce travail thèse aux interactions entre peptides pénétrants et membranes. Cependant une membrane biologique constitue un environnement extrêmement complexe, avec des composants très nombreux et de natures différentes (des lipides, des protéines membranaires, le glycocalyx...). Bien sûr, il est possible de mesurer des interactions directement sur une membrane biologique naturelle, comme nous l'avons vu au chapitre précédent, mais il peut être intéressant d'utiliser un système modèle pour mieux appréhender les interactions protéines-lipides et en particulier l'interaction d'un peptide pénétrant avec la bicouche lipidique de la membrane plasmique. Une membrane modèle est une reproduction simplifiée d'une membrane naturelle dans lequel l'expérimentateur peut contrôler différents paramètres. Les systèmes modèles de membrane sont essentiels à la compréhension des mécanismes d'interactions entre protéines et membranes. Ils permettent notamment de contrôler les propriétés physicochimiques, de s'affranchir de la machinerie cellulaire et de contrôler la composition en lipides de la membrane. Une approche électrique est souvent utilisée pour décrire les membranes modèles, apportant ainsi des informations précises sur ses caractéristiques. Rappelons donc ici qu'une bicouche lipidique se comporte d'un point de vue électrique comme une résistance en parallèle avec une capacité (figure III.1).

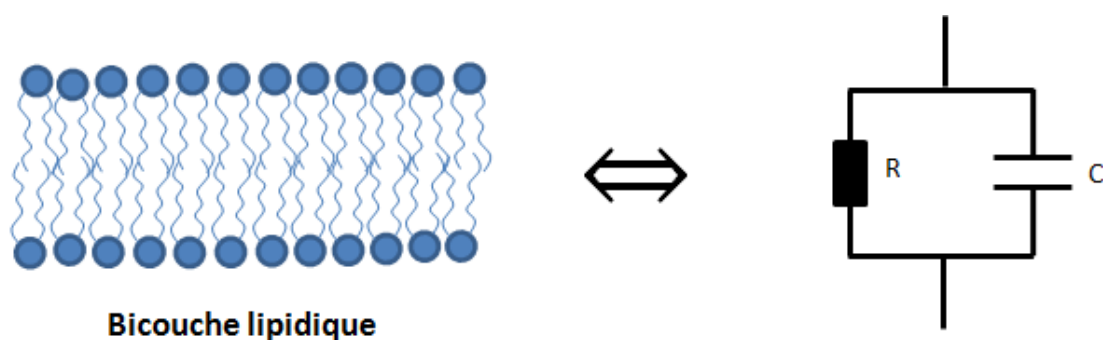


Fig. III.1 Schéma électrique équivalent d'une bicouche lipidique. R et C sont respectivement la résistance et la capacité de la bicouche lipidique.

III.1 Les membranes artificielles comme modèle

Il existe de nombreux systèmes modèles de membrane biologique dont certains seront présentés dans ce chapitre de manière non exhaustive avec leurs avantages et leurs inconvénients. Nous essayerons ici de déterminer en quoi le modèle de "Bicouche à l'Interface de Gouttes" (BIG) constitue un modèle expérimental particulièrement intéressant pour notre étude.

III.1.1 Les vésicules

Les vésicules constituent sans doute le système membranaire modèle le plus utilisé. Il s'agit d'une bicouche de lipides refermée sur elle-même pour former une poche aqueuse plus ou moins sphérique. Il en existe de plusieurs sortes et de plusieurs tailles (figure III.2). Chaque type de vésicules présente des caractéristiques différentes et est préparé différemment. La revue de Francis Szoka, Jr. et Demetrios Papahadjopoulos sur les méthodes comparatives de la préparation des vésicules [Szoka and Papahadjopoulos, 1980] a été d'une aide précieuse pour la rédaction de cette partie.

Les vésicules, ou liposomes, peuvent être utilisées pour encapsuler et compartimenter les protéines, étudier des propriétés mécaniques d'une bicouche, etc. Leur efficacité dans cette tâche dépend fortement de leur taille et de la manière dont elles sont produites. Un des avantages est leur stabilité, comparée à d'autre système modèle, qui peut être de plusieurs jours, mais elles sont le plus souvent fraîchement préparées. Leur stabilité est donc rarement problématique et peu étudiée. Les vésicules se fabriquent toutes avec des volumes de l'ordre du millilitre, cela représente généralement une quantité importante de peptides à utiliser pour nos études. De par leur formation que nous aborderons dans ce qui suit, avoir une phase aqueuse différente à l'intérieur et à l'extérieur de la vésicule peut s'avérer fastidieux car cela impose des étapes de dialyse, de centrifugation et/ou de dilution. Cependant elles ont déjà été utilisées dans le cadre d'études sur des CPP.

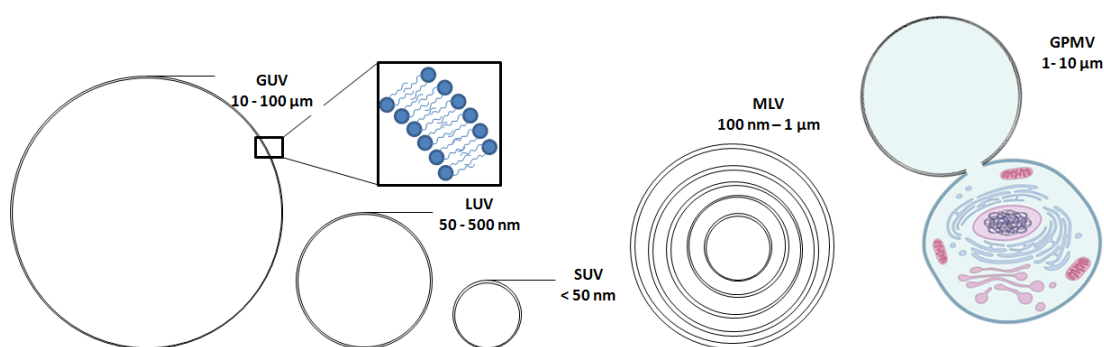


Fig. III.2 Schéma des différentes vésicules lipidiques : SUV pour "Small Unilamellar Vesicle", LUV pour "Large Unilamellar Vesicle", GUV pour "Giant Unilamellar Vesicle", MLV pour "Multi-Lamellar Vesicles" et GPMV pour "Giant Plasma Membrane Vesicles".

III.1. LES MEMBRANES ARTIFICIELLES COMME MODÈLE

a) Les vésicules multilamellaires (MLV)

Les vésicules multilamellaires sont un empilement de bicouches lipidiques. L'image d'un oignon est souvent donnée pour décrire ce type de système. Leur fabrication, très simple, consiste à déposer un film de lipides sur une surface propre (du téflon par exemple), puis à bien le sécher sous vide ou sous un flux d'air ou d'argon. Le film est ensuite recouvert de solution aqueuse qui constituera la phase à l'intérieur des vésicules. L'ensemble est ensuite agité doucement et en quelques heures les MLV vont se former. On peut également décider de ne pas agiter pour laisser "pousser" les MLV : les couches de lipides superposées sur le support vont gonfler en s'hydratant puis se décrocher et se refermer en vésicules. Ce sont ces vésicules qui ont été utilisées pour l'étude en BFP présentée au chapitre précédent.

L'intérieur de la vésicule est difficilement accessible ou observable au microscope et la succession de bicouches n'en fait pas un système de choix pour l'étude de transport au travers de membranes. Cependant elles ont déjà été utilisées pour l'étude des CPP : Almeida *et al.* utilisent la calorimétrie et les rayons X sur ce type de système modèle pour mesurer les modifications de la bicouche en présence de CPP (la Pénétratine notamment)[Almeida *et al.*, 2016].

b) Les petites vésicules (SUV)

Les petites vésicules (de taille inférieure à 50 nm) sont obtenues à partir des MLV par l'utilisation d'ultrasons qui vont apporter l'énergie nécessaire à la formation de la courbure importante des SUV. Certaines précautions lors de la sonication, comme travailler en atmosphère inerte (argon ou azote), doivent être prises afin d'éviter une hydrolyse des lipides ou l'oxydation des doubles liaisons C-C que l'on trouve dans les chaînes carbonnées de certains lipides. Pour les ultrasons, il est possible d'utiliser un bain de sonication qui permet de contrôler la température du système (et prévenir l'altération des lipides) ou une sonde à ultrasons qui apportera plus d'énergie aux MLV et formera plus efficacement les SUV. En effet, une température inférieure à la température de transition des lipides utilisés va former des SUV comportant des défauts et entraîner des fusions entre vésicules.

Ces petites vésicules ont une courbure beaucoup plus importante que les LUV et les GUV (voir plus bas). L'épaisseur de la bicouche ne peut plus être négligée devant le rayon de courbure. Cela peut entraîner une asymétrie de composition car la courbure du feuillet interne est plus importante que celle du feuillet externe et peut contraindre les lipides. Elles nécessitent plus de lipides sur le feuillet externe. De plus de par leur très petit volume (~ 10 fL), les SUV présentent un faible taux d'encapsulation de molécules d'intérêt.

c) Les grandes vésicules (LUV)

Tout comme les SUV, les LUV peuvent être fabriquées à partir des MLV. Par extrusion, après plusieurs cycles de congélation/décongélation, les MLV sont extrudées successivement jusqu'à obtenir la taille souhaitée au travers de membranes poreuses dont le diamètre des pores est de plus en plus petit (compris entre 500 et 50 nm) et à une température supérieure à la température de transition des lipides. Par sonication à une température inférieure à la température de transition, les SUV sont formées avec des défauts et elles fusionnent lorsque la température passe au dessus de la température de transition des lipides. Cette deuxième méthode, moins classique, est moins utilisée.

Ces vésicules de taille plus grande permettent une meilleure encapsulation de molécules hydrosolubles. Elles ont également été utilisées pour l'étude de CPP (R_6W_3 et R_6L_3) entrant dans ces vésicules par translocation a été mesurée par spectrométrie de masse [Walrant et al., 2013].

d) Les vésicules géantes (GUV)

Les vésicules géantes ne sont pas préparées à partir de MLV, et lors de la fabrication de MLV par la méthode d'hydratation, seule une petite proportion des vésicules sont unilamellaires et de taille supérieure au micron. Les GUV sont souvent préparées par électroformation. Un film de lipides est déposé sur des plaques conductrices (en platine ou ITO, oxyde d'indium-étain) disposées face à face à quelques millimètres de distance. La chambre est scellée et remplie d'un milieu conducteur. Un générateur relié à ces plaques va alors produire un champ électrique alternatif de quelques 100 V.m^{-1} qui va former les GUV (figure III.3). Rodriguez *et al.* ont comparé ces deux techniques de formation des GUV et ont pu constater que l'électroformation permet de former des vésicules géantes et unilamellaires avec un bien meilleur rendement que la technique d'hydratation (80 % contre 40 % des vésicules sont unilamellaires) [Rodriguez et al., 2005].

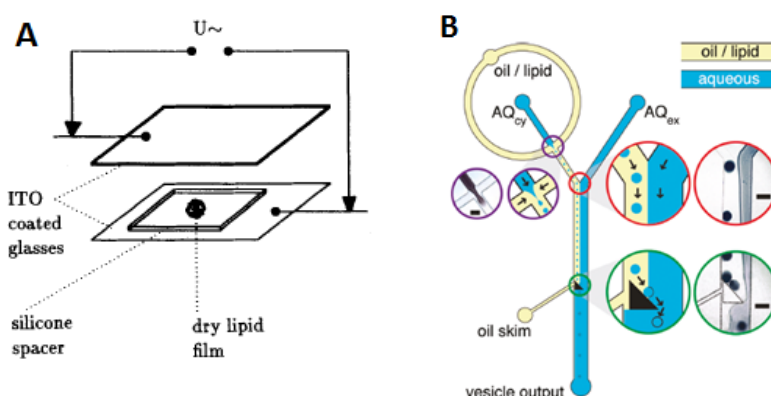


Fig. III.3 (A) Schéma de principe pour l'électroformation de GUV [Angelova et al., 1992]. (B) Schéma de principe de la fabrication de GUV par microfluidique [Matosevic and Paegel, 2011].

Une autre préparation astucieuse, utilisant la microfluidique, a été proposée en 2011 par Matosevic et Paegel [Matosevic and Paegel, 2011]. Il s'agit de produire des gouttes de phase aqueuse dans une phase continue d'huile et de lipide. Des micelles inverses se forment puis lorsque celles-ci traversent à nouveau l'interface huile-eau, la bicouche se forme. Cette méthode, déjà connue comme "évaporation en phase inverse" (ou "Reverse-Phase Evaporation", REV), permet de former des vésicules qui seront de taille contrôlée grâce à l'utilisation de la microfluidique. Cependant l'exposition même brève de la phase aqueuse au solvant de la phase huile, peut s'avérer problématique pour les molécules que l'on souhaite encapsuler dans les GUV.

Ces vésicules sont de la taille des cellules ou plus grandes, elles sont facilement observables au microscope optique et manipulable à l'aide de pipettes de verre. Cependant, de par leur

III.1. LES MEMBRANES ARTIFICIELLES COMME MODÈLE

fabrication, il est plus difficile d'incorporer dans les GUV toutes espèces chargées. Toutes les compositions lipidiques ne sont pas envisageables. Les GUV ont déjà pu être utilisées pour étudier les CPP et en particulier PEP1. Dans leur étude, Sharonov *et al.* observent en fluorescence que le CPP est capable de s'adsorber à la surface de GUV en quantité dépendante de la force ionique et de la charge des lipides des GUV [Sharonov and Hochstrasser, 2007].

e) Les vésicules géantes de membrane plasmique (GPMV)

Les GPMV constituent le modèle membranaire le plus proche des membranes cellulaires parmi les vésicules. Elles sont en effet issues directement des cellules. Dans son étude de 2007, Baumgart et ses collaborateurs montrent que des cellules recevant un traitement chimique (éthanol, 4 % en volume) bourgeonnent et produisent des vésicules qui peuvent être détachées (avec un traitement au formaldéhyde) [Baumgart et al., 2007]. La vésicule peut mesurer plusieurs microns et présenter des domaines lipidiques mais pas de cytosquelette. L'asymétrie de ces bicouches serait conservée mais la composition en lipides serait très variable d'une GPMV à l'autre. Ces vésicules, incapable de reproduire des mécanismes d'endocytose, ont déjà été utilisées comme modèle pour l'étude de la translocation des CPP [Säilik et al., 2011].

III.1.2 Les membranes supportées

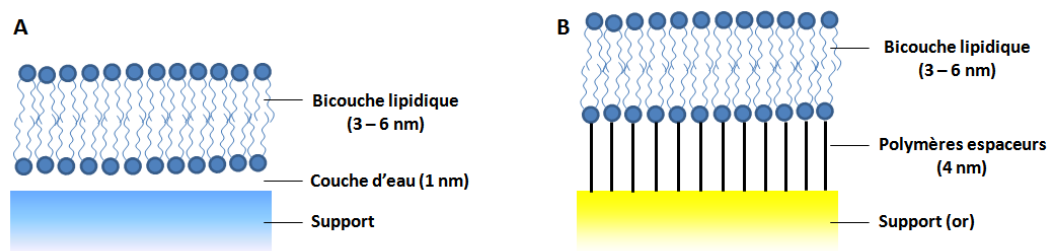


Fig. III.4 (A) Schéma de principe des membranes supportées. (B) Membrane supportée capable d'incorporer une protéine transmembranaire.

Les membranes supportées sont des bicouches lipidiques déposées sur un support (du silicium, du mica ou du quartz par exemple). Une solution contenant des SUV est déposée sur une lame de verre préalablement nettoyée avec des détergents et séchée. Les vésicules éclatent sur le verre et forment des bicouches planes supportées par la lame de verre (figure III.4). Une autre méthode consiste à gonfler une bulle d'air à l'aide d'une seringue dans un mélange d'eau et de lipides puis à aspirer cette bulle au contact de la lame de verre. La monocouche à l'interface de l'air et de l'eau va se replier pour former une bicouche tout en se déposant sur le support (méthode "Bubble Collapse Deposition" BCD, [Mager and Melosh, 2007]). Il est possible d'obtenir des bicouches supportées asymétriques par la technique de Langmuir-Blodgett. Il s'agit de sortir lentement et verticalement une lame de mica parfaitement nettoyée d'un bain d'eau saturé en lipides à l'interface eau/air pour former la première couche (les têtes polaires en contact avec le mica), puis de la plonger à nouveau dans un bain du même type (avec des lipides différents) pour former la seconde couche de lipides.

CHAPITRE III. L'ACTIVITÉ DES CPPS SUR DES MEMBRANES MODÈLES

Ces bicouches présentent l'avantage d'être très stables. Si elles ne sont pas exposées à l'air, car cela disperse les lipides de la bicouche, elles peuvent être utilisées pendant des jours voire des semaines. Leur grande stabilité et le fait qu'elles soient très peu mobiles rendent ces bicouches très faciles à observer par des techniques d'imagerie comme l'AFM ou le TIRF. Cependant cela a aussi pour conséquence une mobilité des lipides plus faible que pour les autres modèles membranaires. Des analyses de photoblanchiment (FRAP) montrent que les lipides ont un coefficient de diffusion deux fois plus faible que celui observable dans des vésicules géantes par exemple ($1,9 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ contre $3,7 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$, [Pincet et al., 2016]). Un autre inconvénient est qu'un seul côté de la membrane est accessible ce qui rend ce modèle difficile à utiliser pour l'étude de la translocation. La fine couche d'eau entre le support et la bicouche ne permet pas d'étudier le passage d'une molécule d'un côté à l'autre de la membrane. De plus, l'interaction avec le support peut poser problème notamment lors de l'incorporation de protéines transmembranaires qui se dénaturent à son contact. Il est possible d'attacher chimiquement et directement sur le support la première monocouche par l'intermédiaire d'une molécule hydrophile qui jouera le rôle d'espaceur. Cela permet d'augmenter l'espace entre la bicouche et le support de quelques nanomètres et d'incorporer des protéines [Naumann et al., 1995].

III.1.3 Les membranes suspendues

Les membranes suspendues constituent un des systèmes membranaires modèles les plus anciens. Paul Mueller *et al.* décrivent ainsi en 1962 la formation d'une bicouche lipidique suspendue d'une dizaine de millimètres carrés et de 6 à 9 nm d'épaisseur [Mueller et al., 1962]. Une solution contenant lipides et solvant (généralement squalène ou décane) est "peinte" sur un trou de quelques millimètres dans une paroi de téflon séparant deux compartiments contenant une solution saline et préalablement exposé au solvant que l'on a laissé sécher. Le potentiel électrique des deux compartiments peut être contrôlé et des expériences d'électrophysiologies peuvent ainsi être menées.

Comme nous pouvons le voir sur la représentation schématique du système de membrane suspendue de la figure III.5, il reste toujours un "coin" de solvant au niveau des bords de la bicouche lipidique. Cet excès de solvant peut modifier l'épaisseur de la bicouche et ses propriétés cependant il est inévitable et assure une certaine stabilité de la bicouche. Cette stabilité est bien inférieure à celle des membranes supportées puisque la bicouche suspendue conserve son intégrité seulement quelques heures.

Un avantage majeur de cette technique est qu'elle permet d'effectuer des mesures électriques sur la membrane modèle. De plus, des protéines transmembranaires et des canaux peuvent s'insérer dans la bicouche ce qui en fait un système de choix pour mener des expériences d'électrophysiologie sur système membranaire modèle. Ces membranes suspendues ont également été utilisées dans le cadre de l'étude des CPP. Herce *et al.* ont par exemple étudié la formation de pores par R9 (CPP synthétique composé de 9 arginines) sur des membranes suspendues POPC et POPG/POPC à 3/1 [Herce et al., 2009]. Ils mesurent une augmentation du courant électrique significative dix minutes après l'ajout de $7 \mu\text{M}$ de CPP pour chacune des compositions lipidiques. Ils observent également des marches de courant qu'ils associent à l'ouverture de pores stables dont le diamètre moyen est calculé à 0,66 nm. Ils testent également d'autres peptides (Pénétratine, Tat, PG-1) et obtiennent les mêmes résultats mais ces expériences nécessitent une quantité importante de produits au vu des

III.1. LES MEMBRANES ARTIFICIELLES COMME MODÈLE

volumes de chacun des compartiments.

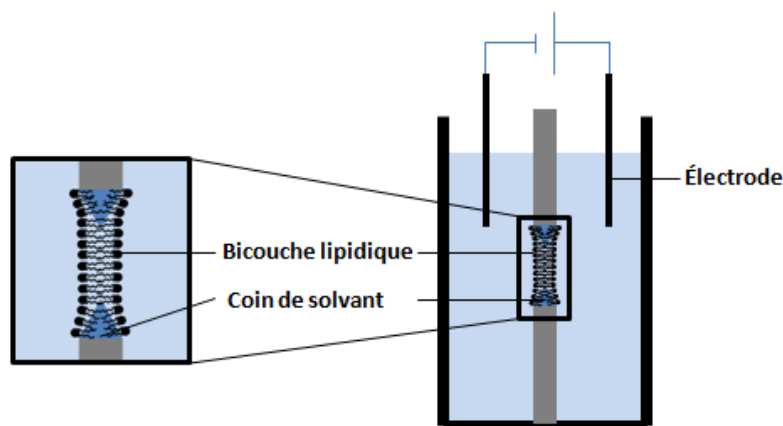


Fig. III.5 Schéma de principe des membranes suspendues.

La difficulté d'observer en microscopie une telle membrane et les quantités de produits à utiliser (sachant que les chambres ont un volume de quelques millilitres et que la concentration en peptide est autour de $5 \mu M$) éliminent cette technique dans le cadre de notre étude. Pierre Soule a pu, au cours de sa thèse, développer un montage de microscope à évanescente sur bicouche suspendue (chapitre IV de sa thèse [Soule, 2015]) pour observer la translocation de CPP en molécule unique mais nous n'avons pas persévéré dans cette voie.

III.1.4 Les nano-disques membranaires

Les nano-disques membranaires sont un assemblage non covalent de phospholipides en bicouche sous forme de disque de 10 à 20 nm enrobé de protéines amphipatiques dites protéines d'échafaudage qui évitent aux queues carbonées des lipides d'être exposées à la phase aqueuse (figure III.6). Ces nano-disques sont très stables et parfaitement solubles dans les phases aqueuses, ils peuvent contenir ou non des protéines membranaires. Ils sont un bon moyen de solubiliser des protéines sans avoir recours aux détergents qui peuvent perturber les interactions protéine-protéine ou les dénaturer. Les protéines sont extraites et temporairement solubilisées à l'aide de détergents en présence de lipides et de protéines amphiphiles (les "MSP" pour "Membrane Scaffold Protein" issue de la famille des apolipoprotéines humaines) qui servent de ceinture et structurent les nanodisques. Lorsque le détergent est retiré de la solution (par dialyse par exemple), les protéines et les lipides s'assemblent spontanément en disques de taille contrôlée par la longueur des MSP. Le rapport lipides *versus* MSP de la préparation est déterminant pour former une population homogène de nano-disques. Un rapport élevé favorisera des disques plus grands : pour un périmètre total donné des nano-disques (par les MSP), un plus grand nombre de lipides impose une plus grande surface de bicouche donc de grands disques plutôt que beaucoup de petits. *A contrario* un rapport trop faible engendrera des nano-disques avec insuffisamment de lipides pour former une bicouche suffisamment rigide permettant de maintenir la protéine dans la bonne conformation. La température semble aussi impacter la formation des nano-disques, les nano-disques sont formés plus efficacement en se plaçant proche de la température de transition des lipides utilisés [Bayburt and Sligar, 2010]. Avec les nano-disques, l'environnement immédiat en lipides de

la protéine et son éventuel assemblage en oligomère peuvent ainsi être préservés proche de l'état naturel.

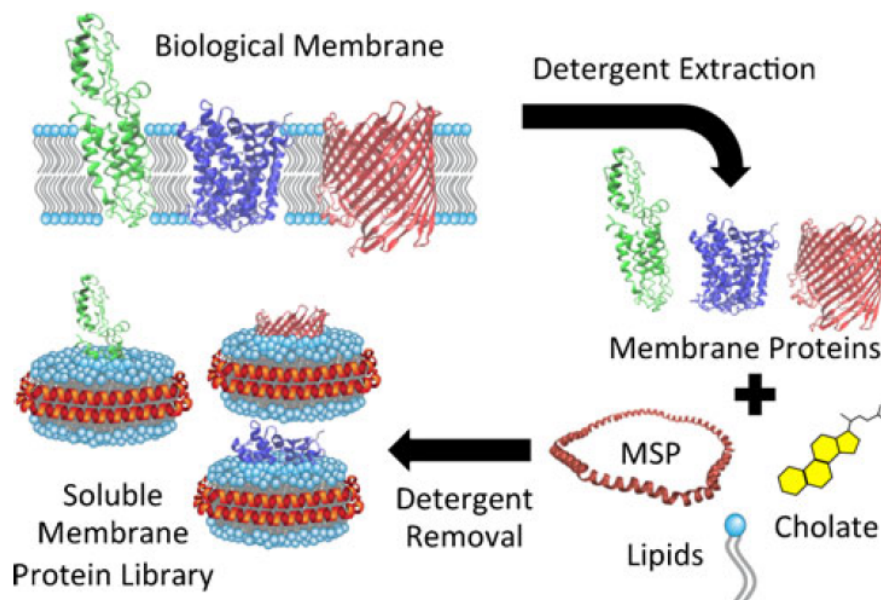


Fig. III.6 Schéma de principe de la formation des nano-disques membranaires [Marty et al., 2013]

Les nano-disques sont donc très utiles pour étudier les protéines membranaires seules, sous forme d'oligomère ou sous forme de complexe et ils peuvent également être utilisés pour étudier différents récepteurs [Bayburt and Sligar, 2010]. Ces protéines sont alors très faciles à manipuler car elles résistent à des conditions plus extrêmes (en pH, température, solvant...). Il est également envisageable d'utiliser les nano-disques pour déterminer la structure tridimensionnelle des protéines [Kijac et al., 2007]. Cependant, les nano-disques ne permettent pas de définir un intérieur et un extérieur et donc, dans le cadre d'une protéine de transport qui ne fait que traverser la membrane, l'intérêt d'utiliser les nano-disques membranaires semble moindre d'autant que les CPP sont pour la plupart des molécules fortement chargées et parfaitement solubles en phase aqueuse.

III.1.5 Les bicouches à l'interface de goutte, BIG

Les bicouches à l'interface de gouttes (ou "Droplet Interface Bilayers", DIB) sont obtenues à partir d'une émulsion inverse d'eau dans un mélange d'huile (du squalène, du dodécane, du silicone...) et de lipides. Depuis une dizaine d'années leur utilisation a connu un véritable essor. Elles sont très faciles à fabriquer et consomment peu de produit. Les phospholipides présents dans la phase huile vont se positionner à l'interface des deux phases et stabiliser l'émulsion. Les gouttes d'eau sont donc entourées d'une monocouche de lipides avec les têtes polaires dans la phase aqueuse et les queues carbonées et hydrophobes en phase huile. Lorsque deux gouttes d'eau entrent en contact, si les interfaces sont suffisamment décorées en lipides, les gouttes adhèrent et une bicouche lipidique se forme spontanément entre elles

III.1. LES MEMBRANES ARTIFICIELLES COMME MODÈLE

(figure III.7). On a donc une bicouche lipidique plane entre deux réservoirs aqueux ce qui représente un système modèle de membrane biologique très simple.

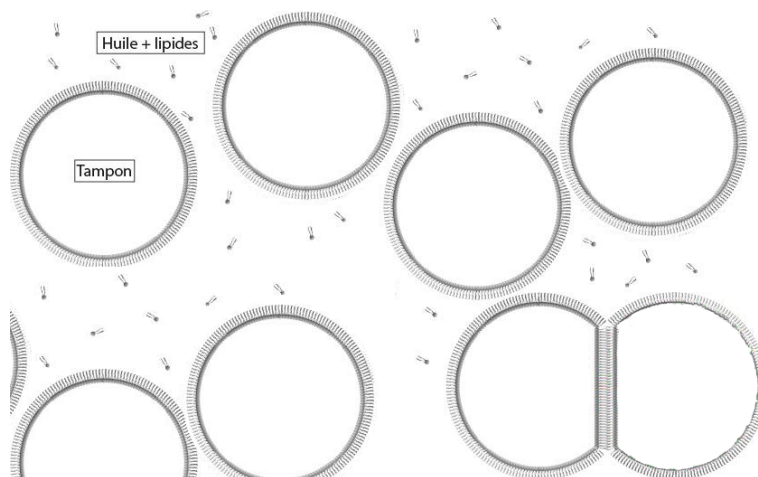


Fig. III.7 Schéma de principe des BIG. Adapté de la thèse de Pierre Soule [Soule, 2015].

Les BIG trouvent leur origine dans une étude de Tsofina *et al.* [Tsofina *et al.*, 1966]. Ainsi avec leur système (figure III.8) ils parviennent à former une bicouche plane de 4,7 à 8,0 nm d'épaisseur (mesurée par interférométrie), 10^8 à $10^9 \Omega.cm^2$ de résistance électrique et de $1 \mu F.cm^{-2}$ de capacité en mettant en contact deux gouttes aqueuses contenant de l'albumine d'oeuf dans une phase hydrophobe contenant des lipides issus de cellules du cerveau dissous dans de l'hexane. Les lipides se positionnent aux interfaces et lorsque les gouttes sont mises en contact la bicouche peut se former. Il a pu être montré que la résistance de la bicouche pouvait être abaissée à $10^4 \Omega.cm^2$ lors de l'insertion de protéines dans cette membrane modèle.

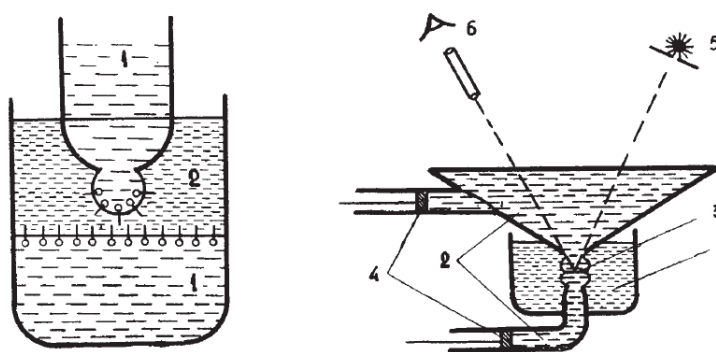


Fig. III.8 Schéma de principe du système de Tsofina *et al.* [Tsofina *et al.*, 1966]. Des traits longs sont utilisés pour représenter la phase aqueuse, des traits courts pour la phase huile. Le schéma de droite montre comment l'épaisseur de la bicouche est mesurée par interférence.

Ce système a été adapté plus récemment par Funakoshi *et al.* à une échelle inférieure [Funakoshi *et al.*, 2006]. Ils ont en effet utilisé un système microfluidique pour reproduire

cette membrane modèle (figure III.9). La phase aqueuse est une solution de KCl (100 mM) et la phase hydrophobe est un mélange du lipide 1,2-Diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DphPC) à 25 mg.mL^{-1} dans du décane. Les mesures électriques effectuées sur ce système donnent une valeur de capacité de la bicouche autour de $0,25 \text{ }\mu\text{F.cm}^{-2}$ ce qui est une valeur typique pour une membrane lipidique. Le système a également permis d'observer par des mesures électriques la formation de nano-pores dans la bicouche en ajoutant de la gramicidine A en phase aqueuse. La formation de ces nano-pores vient confirmer l'absence d'une couche d'huile entre les deux feuillets de lipides qui empêcherait l'insertion de la gramicidine.

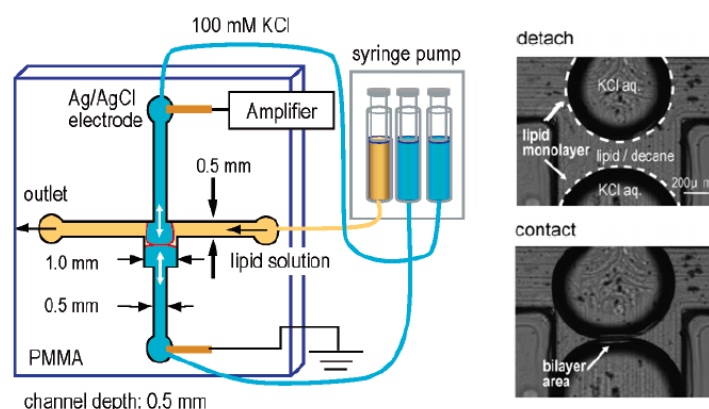


Fig. III.9 Schéma de principe du système de Funakoshi *et al.* [Funakoshi *et al.*, 2006].

Ce type de bicouche lipidique a également été mis en place en utilisant des émulsions d'eau dans un mélange d'huile et de lipide. À ce jour ce sont d'ailleurs les émulsions qui sont le plus souvent utilisées pour former les BIG. Il existe deux techniques pour faire ces émulsions. La méthode dite "lipid in" où les lipides sont placés en phase aqueuse et la méthode "lipid out" où les lipides sont initialement en phase huile (figure III.10). La méthode "lipid in" proposée par Hwang *et al.* consiste à préparer des LUV (*cf.* plus haut dans ce chapitre) dans une solution de chlorure de sodium (200 mM) [Hwang *et al.*, 2008]. Cette solution de LUV sert ensuite à faire l'émulsion dans de l'hexadécane pour former les BIG. Les lipides des LUV vont rapidement se placer aux interfaces des gouttes et de la phase continue. Avec cette méthode il n'y a pas (ou très peu) de lipides en phase huile. La méthode "Lipid out" consiste à placer les lipides en phase huile. Un co-solvant, qui peut être de l'éther ou du chloroforme, est nécessaire pour solubiliser les lipides dans l'huile. En effet les huiles (squalène, huiles silicone, décane...) utilisées pour former les BIG sont des mauvais solvants pour les lipides. Thiam *et al.* ont déterminé le diagramme de stabilité des BIG avec une huile silicone (de viscosité 50 mPa.s) comme mauvais solvant et du chloroforme comme bon solvant [Thiam *et al.*, 2012]. L'adhésion des gouttes est directement impactée par la quantité de lipides présents en solution mais également par la fraction en bon et mauvais solvant. Indépendamment de la concentration en lipides au moins 40 % de chloroforme est nécessaire pour assurer une formation initiale correcte des BIG, dans le cas contraire les lipides s'agrègent et forment des amas. Une fois le contact établi entre les gouttes et la bicouche formée, les auteurs constatent que l'angle de contact entre les gouttes augmente avec l'évaporation du chloroforme (solvant très volatil) et que la bicouche peut rester stable même si le bon solvant s'évapore au delà des 40 % en masse de la phase organique. Aucun

III.1. LES MEMBRANES ARTIFICIELLES COMME MODÈLE

lipide n'est présent en phase aqueuse avec cette méthode.

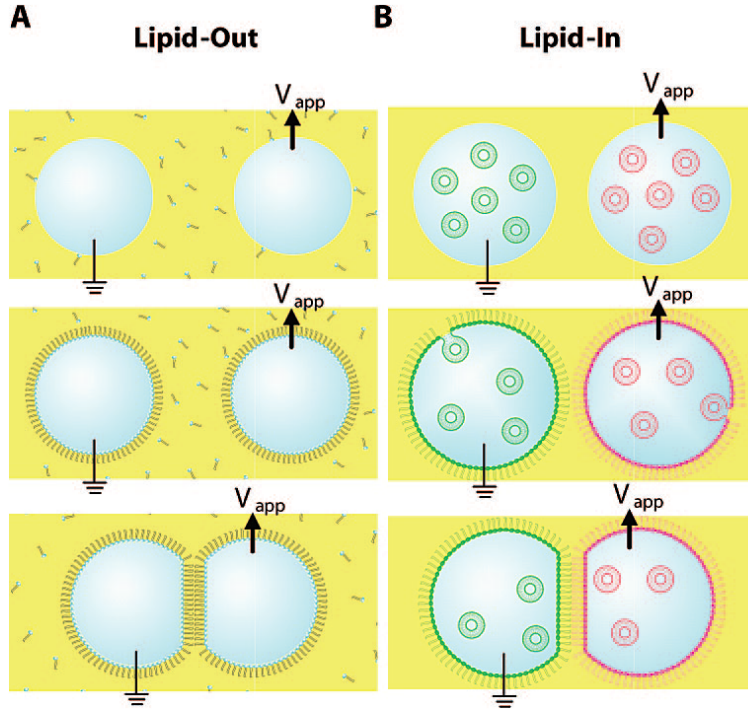


Fig. III.10 Schémas de principe des deux principales techniques pour former les BIG : (A) "Lipid out" avec les lipides en phase huile et (B) "Lipid in" avec les lipides en phase aqueuse [Hwang et al., 2008].

Les BIG ont été caractérisées par l'intermédiaire de différentes études comme celle sur l'énergie d'adhésion et la tension de surface des monocouches [Poulin and Bibette, 1998] confirmant que la bicouche formée ne contient que très peu d'huile. La mesure de l'angle de contact entre les gouttes permet de déterminer l'énergie d'adhésion. Cette énergie augmente avec la quantité de mauvais solvant. Une autre étude a déterminé que l'angle de contact entre gouttes est dépendant des lipides et de l'huile utilisés [Ben M'barek et al., 2017].

Un des avantages majeurs de ce système sur les autres modèles de membranes est qu'il semble relativement simple de faire des bicouches asymétriques, notamment par la méthode dite "lipid in" [Hwang et al., 2008]. Comme pour les membranes suspendues, l'addition de protéines membranaires est possible et le potentiel de membrane peut aisément être contrôlé ([Hwang et al., 2008], [Iwamoto et al., 2018], [Oiki and Iwamoto, 2018]...). Cependant ces bicouches sont beaucoup plus stables car le problème du coin de solvant ne se pose pas. La phase huile entourant la bicouche lipidique préserve à la fois de l'évaporation et sert de réservoir à lipides pour la bicouche. Les BIG constituent donc un système adapté pour étudier les protéines membranaires notamment et leur utilisation est maintenant très courante. Ce système a également été utilisé dans le cadre d'étude sur PEP1, un peptide pénétrant ([Huang et al., 2011] et [Li et al., 2017]). La translocation d'enzymes liées de façon non covalente à PEP1 est observée en microscopie de fluorescence.

Il nous a donc paru intéressant d'utiliser le système de BIG pour étudier la translocation des CPP. C'est un système simple à mettre en place, facile à observer en microscopie (no-

tamment en microscopie de fluorescence) et qui permet de limiter les coûts en matériel. Nous avons choisi de travailler sur des gouttes de taille plus petite que celles généralement utilisées dans les études rappelées ici (une centaine de microns contre quelques centaines de microns voire de l'ordre du millimètre) et en méthode "Lipid out". Nous cherchons à déterminer de possibles interactions entre les CPP et les lipides de la membrane, il paraît donc préférable d'éviter les contacts en phase aqueuse qui pourraient avoir lieu avec la méthode "Lipid in".

III.2 Les Bicouches à l'interface de gouttes en présence de peptides pénétrants

III.2.1 Le principe

La translocation des peptides pénétrants peut être étudiée par l'intermédiaire des bicouches à l'interface de gouttes. L'idée est ici de préparer deux populations distinctes de gouttes. Une population contient le peptide d'intérêt, marqué en fluorescence, la seconde population de gouttes contient simplement du tampon phosphate (PBS). Les deux populations sont ensuite mélangées et des paires mixtes peuvent ainsi se former aléatoirement. Une paire est dite mixte lorsqu'elle est formée par une goutte de chaque population. On peut ensuite quantifier la translocation du peptide à travers la bicouche lipidique en mesurant l'intensité de fluorescence dans chacune des gouttes de la paire.

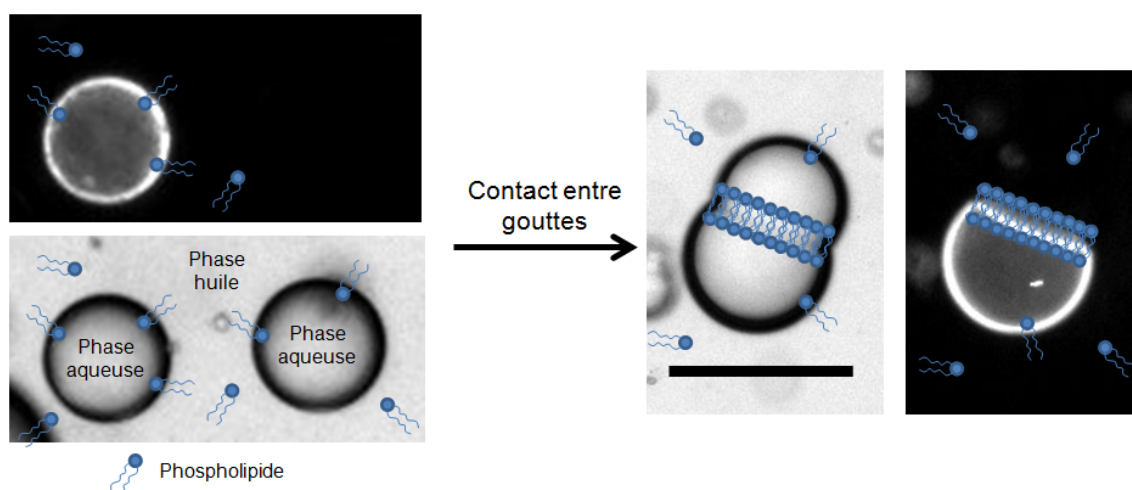


Fig. III.11 Photo d'une émulsion inverse servant à la formation de bicouches à l'interface des gouttes. Les lipides (POPG) sont représentés schématiquement (l'échelle n'est pas respectée). À droite, photos en lumière blanche et en fluorescence d'une paire mixte. Le fluorophore est de l'Alexa488. La barre d'échelle représente 50 μm .

III.2.2 Mise en place et protocole

La composition des différentes phases est décrite dans ce qui suit. Les émulsions inverses sont préparées avec 2 μL de phase aqueuse mélangée avec 20 μL d'une phase huile dans un

III.2. LES BICOUCHES À L'INTERFACE DE GOUTTES EN PRÉSENCE DE PEPTIDES PÉNÉTRANTS

tube type EPPENDORF. Ce tube est ensuite agité 1 à 2 secondes (manuellement ou à l'aide d'un agitateur) en prenant garde de ne pas incorporer d'air dans l'émulsion ainsi formée.

a) La phase aqueuse

La phase aqueuse est composée d'un tampon phosphate salin (150 mM NaCl, 40 mM phosphate, pH = 7,4 sous forme de pastille (MERCK) à dissoudre dans 100 mL d'eau déionisée) auquel est ajouté 10 mM de $MgCl_2$ et éventuellement 5 μ M de peptides marqués (peptides pénétrants ou peptide contrôle R_6L_3 (RLLRRLRR) synthétisé par stratégie Fmoc). La présence de sel dans la phase aqueuse entraîne une stabilisation des émulsions [Aronson and Princen, 1980], cependant un compromis a dû être trouvé pour que l'environnement soit compatible avec les peptides utilisés, la concentration de 10 mM de $MgCl_2$ a donc été retenue. Les peptides sont marqués en fluorescence à l'aide de différentes sondes : Alexa488, FluoProbe 488 (INTERCHIM) ou encore de la carboxyfluorescéine accrochées en C-terminal par l'intermédiaire d'une cystéine.

b) La phase hydrophobe

La phase hydrophobe, ou phase huile, est composée de squalène ($C_{30}H_{50}$) représenté figure III.12, 0,08% (en masse) de lipides et 15% (en volume) de chloroforme. Les lipides étant stockés en solution dans du chloroforme à 25 $g.L^{-1}$, cela correspond à préparer une solution stock de 200 μ L de squalène ($d = 0,86$), pour 5,5 μ L de lipides (138 μ g) et 30 μ L de chloroforme. La masse molaire des différents lipides utilisés étant proche d'un lipide à l'autre, le volume de lipide ajouté à la phase huile varie peu d'une expérience à l'autre. Au cours des différentes études, trois types de lipide (AVANTI POLAR LIPID) ont été utilisés : POPC, un phospholipide zwitterionique (globalement neutre) très abondant sur le feuillet externe des membranes cellulaires des eucaryotes, POPG qui est chargé négativement et que l'on retrouve plutôt dans les membranes des bactéries et POPS qui est chargé négativement et que l'on retrouve plutôt sur le feuillet interne des membranes des cellules eucaryotes. Ces trois phospholipides présentent une chaîne carbonée à 18 carbones présentant une insaturation sur le neuvième carbone et une autre chaîne à 16 carbones, saturée (figure III.12). Le rôle du chloroforme, bon solvant des lipides, est de permettre une meilleure solubilisation des lipides dans le squalène, mauvais solvant pour les lipides. Il permet de décorer les gouttes d'eau en lipides plus efficacement [Poulin and Bibette, 1998].

c) Les Peptides

La Pénétratine (RQIKIWFQNRRMKWKK) utilisée a été synthétisée dans le laboratoire par Mehdi Amoura (LBM) sur phase solide en utilisant une stratégie Boc et en ajoutant un fluorophore en N-terminal par ajout d'une lysine (FluoroProbe de INTERCHIM (FP488)). Après avoir constaté la médiocre qualité de cette sonde nous avons opté pour une Pénétratine marquée par une sonde Alexa488 maléimide à l'aide d'une cystéine en N-terminal (LIFE TECHNOLOGIES). Les peptides sont purifiés par RP-HPLC (chromatographie en phase inverse) et contrôlés en spectroscopie de masse. Le peptide R_6L_3 (RLLRRLRR), synthétisé par Astrid Walrant (LBM) et préparé comme la Pénétratine, a été choisi comme peptide de contrôle. Il présente en effet de nombreuses caractéristiques d'un CPP (une dizaine d'acides aminés, chargé positivement) mais s'internalise très mal [Walrant et al., 2011].

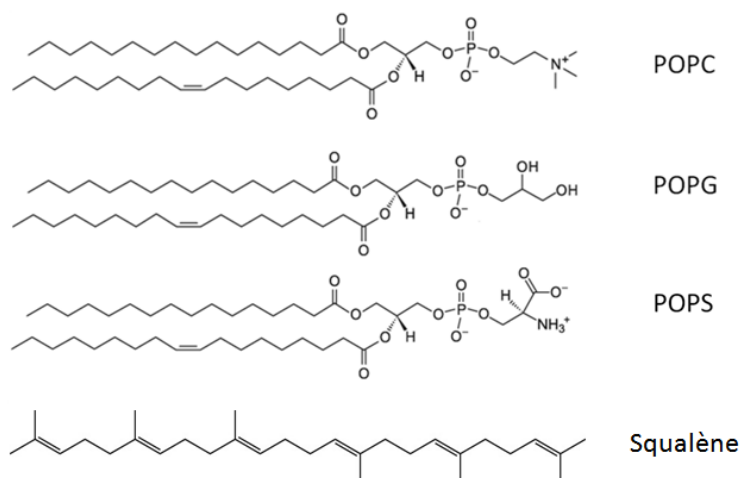


Fig. III.12 Formules semi-développées des phospholipides utilisés et du squalène.

d) Le dépôt pour observation

Lorsque l'émulsion est formée, elle est déposée sur une lame de verre préalablement recouverte d'une fine couche de PolyDiMethylSyloxane (PDMS) pour être observée au microscope de fluorescence. Le PDMS est préparé sous forme liquide par mélange de deux composants du kit Sylgard 184 acheté chez DOW CORNING. La base et l'agent durcissant sont ajoutés dans des proportions 10 pour 1 puis déposés sur une lame de verre. La lame est ensuite mise à l'étuve pendant 1h à 80°C ce qui permet la polymérisation et le durcissement du PDMS. Les gouttes d'eau de l'émulsion, plus denses que l'huile, vont se déposer sur la lame. La couche de PDMS constitue un revêtement hydrophobe qui empêche les gouttes de s'étaler pendant la durée de l'expérience (30 minutes) et permet à la bicouche d'être maintenue en position. La figure III.13 présente des photos prises juste après le dépôt des deux populations de goutte. On remarque que la situation où une paire mixte est formée ne représente pas la situation majoritaire. On note la présence de doublets non mixtes, de triplets, d'agrégats... L'observation du dépôt à la recherche d'une paire mixte doit être rapide sous peine de manquer les premiers instants de la translocation du peptide.

e) Mesures et acquisition des données

Les observations sont effectuées à l'aide d'un microscope inversé OLYMPUS avec des objectifs OLYMPUS 10x ou 20x selon la taille des gouttes observées et d'une caméra PRINCETON INSTRUMENT. L'excitation des fluorophores s'effectue grâce à une lampe à vapeur de mercure et à des filtres adaptés à la sonde fluorescente utilisée (centrés sur 494 nm pour l'excitation et 518 nm pour l'émission pour Alexa488, FP488 et la fluorescéine, centrés sur 555 nm pour l'excitation et 580 nm pour l'émission pour la rhodamine). L'analyse des images s'effectue avec le logiciel ImageJ. Pour chaque paire, le diamètre des gouttes et le diamètre de la surface de contact sont déterminés. En effet, on estime que la surface de contact entre les deux gouttes est un disque. La goutte est observée durant 30 minutes et une photo est prise toutes les deux à cinq minutes, l'intensité de fluorescence est mesurée, pour chaque photo, au centre de chacune des gouttes des paires mixtes. Elle permet de quantifier la translocation mais elle

III.2. LES BICOUCHES À L'INTERFACE DE GOUTTES EN PRÉSENCE DE PEPTIDES PÉNÉTRANTS

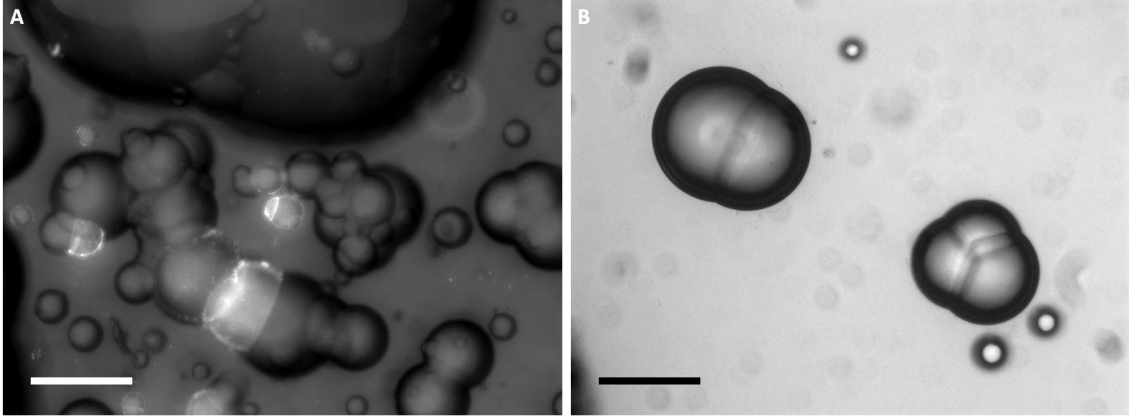


Fig. III.13 (A) Observation au microscope inversé à l'objectif d'un dépôt sur lame PDMS (barre d'échelle 100 μm). Les gouttes plus lumineuses contiennent de la Pénétratine marquée. (B) Doublet et triplet de gouttes en lumière blanche. La barre d'échelle représente 50 μm .

n'est pas directement proportionnelle à la concentration en peptide à cause notamment du photoblanchiment. On s'intéresse donc au rapport d'intensité de fluorescence entre les deux gouttes. Ainsi avec C_1 , F_1 et V_1 la concentration, l'intensité de fluorescence et le volume d'une goutte de la paire et C_2 , F_2 et V_2 pour la seconde goutte on a :

$$\frac{C_1}{C_2} = \frac{F_1}{F_2}$$

Il est de plus raisonnable d'estimer que le peptide fluorescent, chargé et hydrophile, ne s'échappe pas dans la phase huile. La quantité de peptide est donc conservée et l'on a :

$$C_1(t=0) \times V_1 = C_1 \times V_1 + C_2 \times V_2$$

car on considère que tout le peptide fluorescent est dans la goutte 1 à $t = 0$. Finalement grâce à ces deux équations nous pouvons extraire la concentration en peptide de la goutte initialement vide à chaque instant.

$$C_2 = \frac{C_1(t=0) \times V_1}{V_2 + \frac{V_1 \times F_1}{F_2}}$$

L'intensité de fluorescence varie d'une paire de gouttes à l'autre, or il nous faut pouvoir conclure quant à la translocation ou non du peptide. On considère donc arbitrairement que l'on observe de la translocation si 10 % des peptides fluorescents sont passés dans la seconde goutte, c'est à dire si après 30 minutes on a la condition $\frac{F_2}{F_1} > 0,1$ vérifiée. En effet, l'intensité de fluorescence de la goutte 1 est de 100 à quelques centaines d'unités après 30 minutes. Donc le critère de $\frac{F_2}{F_1} > 0,1$ impose que la fluorescence de la goutte 2 soit supérieure à 10 (au minimum), cela correspond à une intensité de fluorescence légèrement supérieure à l'intensité du fond et donc détectable d'où le choix de ce critère.

III.2.3 Le contrôle du potentiel membranaire

Les membranes naturelles présentent un potentiel membranaire autour de quelques dizaines de millivolts et il semble que les charges jouent un rôle important dans le phénomène

CHAPITRE III. L'ACTIVITÉ DES CPPS SUR DES MEMBRANES MODÈLES

de translocation (autant pour le peptide que pour les phospholipides de la membrane). Nous avons donc cherché à contrôler le potentiel de membrane de notre système. Dans ce but nous avons inséré dans chacune des gouttes d'une paire une électrode reliée à un amplificateur électrique pour imposer une tension et mesurer le courant à travers la bicouche lipidique. Pour cela nous avons utilisé des pipettes de patch (II.2) contenant des électrodes et remplies de solution aqueuse que nous avons insérées dans les gouttes. Ces pipettes étaient préalablement traitées au silane qui permet d'éviter que les gouttes de phase aqueuse ne mouille sur la pointe ce qui déstabilise les paires. Ce traitement consiste à immerger la pointe de pipette pleine sous légère surpression dans une solution de Diméthylchlorosilane à 10 % dans du toluène pendant environ deux minutes. La pointe de pipette est préalablement nettoyée dans une solution de méthanol pur puis de toluène pur. Une fois le traitement effectué la pipette est à nouveau rincée dans le toluène puis dans le méthanol avant d'être utilisée. Le silane va ainsi se déposer sur tout l'extérieur de la pointe de pipette rendant la surface complètement hydrophobe. Cette pipette est ensuite immergée dans la phase hydrophobe déposée sur une lame recouverte de PDMS. Des gouttes de taille contrôlée sont alors gonflées en bout de pipette à l'aide d'une seringue puis mises en contact et la bicouche se forme. Comme nous le verrons dans le chapitre suivant (IV.3.2) les phospholipides peuvent mettre un certain temps pour se positionner à l'interface eau/huile. Des fusions sont parfois observées lorsque les deux gouttes sont mises en contact. Augmenter la quantité de chloroforme dans la phase huile permet de surmonter cette difficulté (communication personnelle de Abdou Rachid Thiam). Lorsque deux gouttes entrent en contact, les lipides migrent rapidement à l'interface entre les gouttes. S'il n'y a pas assez de lipides aux interfaces, les deux gouttes, déstabilisées, peuvent fusionner. Le chloroforme étant un bon solvant pour les phospholipides, il augmente leur mobilité dans la phase hydrophobe. Il est également possible de former les paires de gouttes de façon manuelle (III.2.1) puis d'introduire *a posteriori* les pipettes dans chacune des deux gouttes de la paire. Une très légère surpression appliquée à chacune des pipettes permet d'assurer la continuité électrique entre l'électrode et l'intérieur de la goutte.

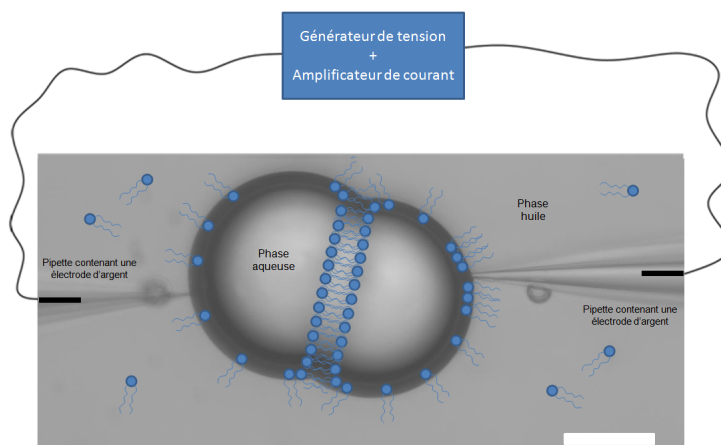


Fig. III.14 Photo du système de pipette pour le contrôle du potentiel des bicouches à l'interface des gouttes. Les lipides et les électrodes sont représentés schématiquement. La barre d'échelle représente $50\ \mu\text{m}$

III.3 Caractérisations des BIGs

Les bicouches à l'interface de gouttes présentent de nombreux avantages. Elles sont très faciles à former et à utiliser car il s'agit d'une simple émulsion inverse cependant elles sont formées de façon complètement aléatoire. Donc ni la formation des gouttes ni la formation de la bicouche ne sont contrôlées. On se retrouve souvent avec un réseau de gouttes à observer. Alors qu'on s'intéresse à la traversée d'une membrane par des peptides, cet enchaînement de plusieurs bicouches peut compliquer l'interprétation des observations. Comme il a été discuté précédemment, on cherche à former suffisamment de gouttes pour que la probabilité que deux gouttes se rencontrent soit suffisamment élevée mais pas trop pour éviter que les agrégats de trois gouttes ou plus ne soient favorisés. Le protocole (cf. III.2.2) a ainsi été choisi empiriquement pour répondre à cette problématique. Cette méthode présente deux avantages majeurs pour notre étude : la possibilité de faire des bicouches lipidiques asymétriques et de contrôler le potentiel.

III.3.1 L'asymétrie des bicouches

Les membranes biologiques sont asymétriques. Les feuillets interne et externe présentent une composition lipidique différente, cette asymétrie est entretenue et essentielle au bon fonctionnement cellulaire [van Meer, 2011]. Les différents systèmes modèles reproduisent mal cette asymétrie membranaire. *A contrario* cela est relativement facile de le faire avec le système de bicouche à l'interface de goutte. Il suffit de déposer l'une sur l'autre deux populations de gouttes préparées en présence de lipides différents et de s'intéresser aux paires formées avec une goutte de chaque population. Mais cette asymétrie est-elle conservée? Lors de la préparation des émulsions, les phospholipides se placent préférentiellement à l'interface eau/huile, le coefficient de partage étant favorable à l'interface. Les échanges de lipides entre l'interface et la phase huile sont alors défavorables. Un autre mécanisme qui peut perturber l'asymétrie entre les deux feuillets est le phénomène de "flip-flop". Il s'agit, pour un lipide de la bicouche, du passage d'un feuillet à l'autre. Sans recours à des protéines dédiées, ce passage est lent (de quelques heures à quelques jours) et dépend de la nature du lipide. Pour les membranes biologiques il est compensé par des protéines spécifiques, les "flipases" [Devaux et al., 2008]. Dans notre système la tension de membrane, de par sa construction, est différente et aucune protéine n'est ajoutée. Certaines études tendent à montrer que le phénomène de "flip-flop" reste lent dans les BIGs et que l'asymétrie est conservée plusieurs heures [Hwang et al., 2008]. Nous avons cherché à le confirmer dans notre système.

Pour observer au microscope le passage des lipides d'un feuillet à un autre nous pouvons marquer certains lipides en fluorescence, la difficulté est qu'ils se retrouvent à la fois à l'interface eau-huile et en phase huile. Il est alors impossible de marquer sélectivement un feuillet de la bicouche de cette façon. Nous avons donc choisi de placer la sonde photosensible (Alexa488) dans la phase aqueuse, couplée à de l'annexine V (Molecular Probes, LIFE TECHNOLOGIES). L'annexine V possède, en présence de calcium, une forte affinité pour la phosphatidylsérine (PS), elle va donc nous permettre de visualiser sa présence dans les feuillets différents. Utilisée dans une goutte présentant des phospholipides PS à l'interface, l'annexine V va se lier aux têtes PS et la goutte apparaîtra avec des bords plus fluorescents. Si la goutte n'a pas de lipides PS, la fluorescence sera uniforme en volume (figure III.15). Le rapport $\frac{I_{bord}}{I_{centre}}$ d'intensité de fluorescence est mesuré et s'il est supérieur à 1 nous concluons

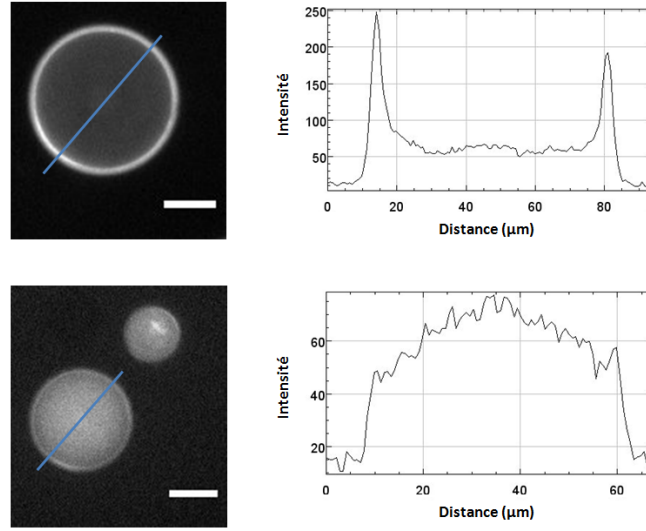


Fig. III.15 Photo de goutte avec annexine V en présence (en haut) et en absence (en bas) de DOPS. En présence de calcium, l'annexine V pontre les têtes PS des lipides et les bords apparaissent plus brillants car il y a une accumulation d'annexine-Alexa488. À droite sont représentés les profils d'intensité le long d'une droite (représentée en bleu) passant par le centre de la goutte. Le rapport entre l'intensité des bords et du centre est utilisé pour attester ou non la présence de DOPS dans la monocouche. La barre d'échelle représente 25 μm .

à la présence de PS dans la monocouche.

La constante de dissociation entre la PS et l'annexine V a été mesurée par Andree *et al.* à 0,2 nM [Andree et al., 1990]. L'annexine V est souvent utilisée comme marqueur des cellules apoptotiques, lorsque les lipides PS passent du feuillet interne au feuillet externe. Le fournisseur préconise 5 μL de solution commerciale d'annexine V dans 100 μL de tampon pour détecter 1 % de PS dans 10^6 cellules. Une estimation rapide donne 10^{14} lipides pour 10^6 cellules (surface d'une cellule $\sim 10^2 \mu\text{m}^2$, surface par lipide $\sim 1 \text{ nm}^2$), soit 10^{12} lipides PS détectables avec cette concentration en annexine V. Dans le cas des BIG, on estime à 10^{10} le nombre de lipides par goutte (surface d'une goutte $\sim 10^4 \mu\text{m}^2$) et environ mille gouttes par préparation soit 10^{13} lipides. Pour détecter 10 % de PS il faut donc environ la même concentration en annexine V que le protocole établi par le fournisseur.

Une gamme en concentration de DOPS a été effectuée en présence de 10 μL de solution commerciale d'annexine V (LIFE TECHNOLOGIES) pour 100 μL de solution aqueuse et de 2,5 mM de Ca^{2+} en phase aqueuse pour déterminer la quantité de PS nécessaire à la détection de bords fluorescents de nos gouttes. Nous avons donc préparé des émulsions avec différents rapport en DOPS/DOPC. Des gouttes aux bords fluorescents sont repérées pour chacune des préparations, cela signifie que la concentration en PS varie d'une goutte à l'autre pour une même préparation. Le rapport en lipides présente une certaine distribution dans la population de gouttes que l'on peut estimer centrée sur le rapport visé. Il nous faut donc effectuer une analyse statistique pour chaque condition. Pour un rapport en lipide DOPS/DOPC donné il s'agit de compter les gouttes présentant des bords fluorescents (avec un rapport $\frac{I_{\text{bord}}}{I_{\text{centre}}} > 1$).

III.3. CARACTÉRISATIONS DES BIGS

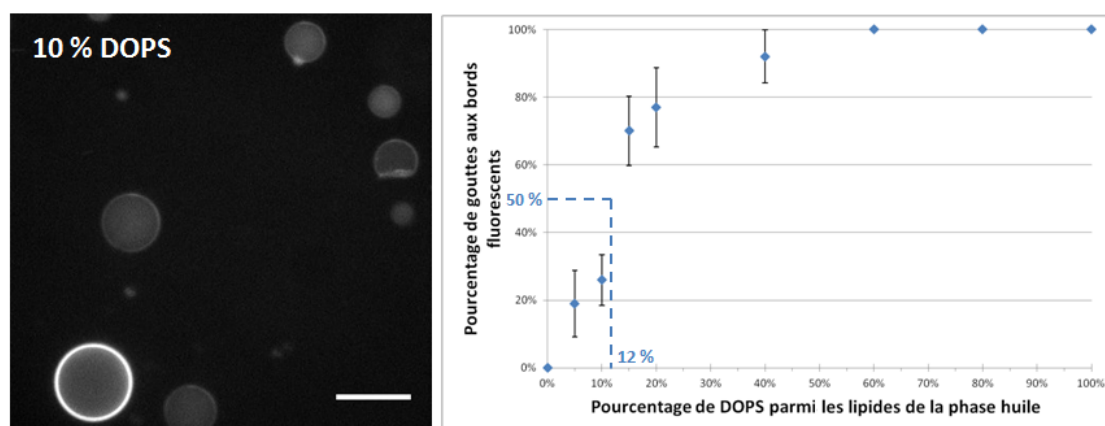


Fig. III.16 Gamme en concentration de DOPS. Pourcentage de gouttes aux bords fluorescents sur une quinzaine de gouttes par condition. Sur la photo sont visibles des gouttes préparées avec la condition 10 % de DOPS. La barre d'échelle représente 50 μm .

Les résultats sont présentés sur la figure III.16.

Dès 5 % en DOPS certaines gouttes présentent des bords fluorescents. Avec 60 % de DOPS ou plus, l'ensemble des gouttes ont des bords fluorescents. Avec notre système, lorsque des bords fluorescents apparaissent nous pouvons conclure à la présence d'au moins 5 % de DOPS dans la monocouche de lipide. De nos résultats on déduit qu'avec 12 % de DOPS environ 50 % des gouttes présentent des bords fluorescents. C'est pourquoi nous avons fixé 12 % de DOPS comme étant la limite de détection de l'annexine V dans notre système.

Nous avons ensuite préparé des paires mixtes asymétriques. Les gouttes de chaque population présentent des lipides différents, à savoir, DOPS et DOPC. On s'intéresse à la diffusion transverse des lipides, la diffusion latérale au sein d'une monocouche étant beaucoup plus rapide. En quelques minutes, un lipide se déplace sur l'ensemble de la surface de la goutte (pour un coefficient de diffusion latéral des lipides de l'ordre de $10 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [Thompson et al., 2007], [Pincet et al., 2016]). Les lipides au sein d'une goutte se répartissent donc de façon homogène en quelques minutes, la diffusion transverse au niveau de la BIG est donc le facteur limitant pour une composition lipidique homogène dans une paire formée par deux gouttes à la composition initiale différente. L'annexine V est ajoutée en phase aqueuse de telle sorte qu'au moment de la formation d'une paire mixte ($t = 0 \text{ min}$) la goutte PS (contenant les lipides DOPS) présente des bords fluorescent et pas la goutte PC (contenant les lipides DOPC). Si les lipides DOPS diffusent (par "flip-flop" ou en passant par l'huile) vers le feuillet DOPC, les bords de la goutte PC devraient apparaître en fluorescence. Nous avons pu constater effectivement l'apparition de bords fluorescents pour ces gouttes mais seulement après un délai supérieur à 60 minutes. Les résultats sont présentés sur la figure III.17.

Au vu de ces résultats, l'asymétrie est conservée au moins 30 minutes avec les BIG concernant les lipides PS et PC (dans la limite de 12 % de détection de notre sonde, cf. la gamme présentée plus haut). La présence d'annexine V dans la goutte DOPS pourrait cependant freiner la diffusion transverse des lipides DOPS vers la goutte PC puisque qu'elle va ponter les têtes PS des lipides. Pour palier cet éventuel artefact, nous avons alors placé

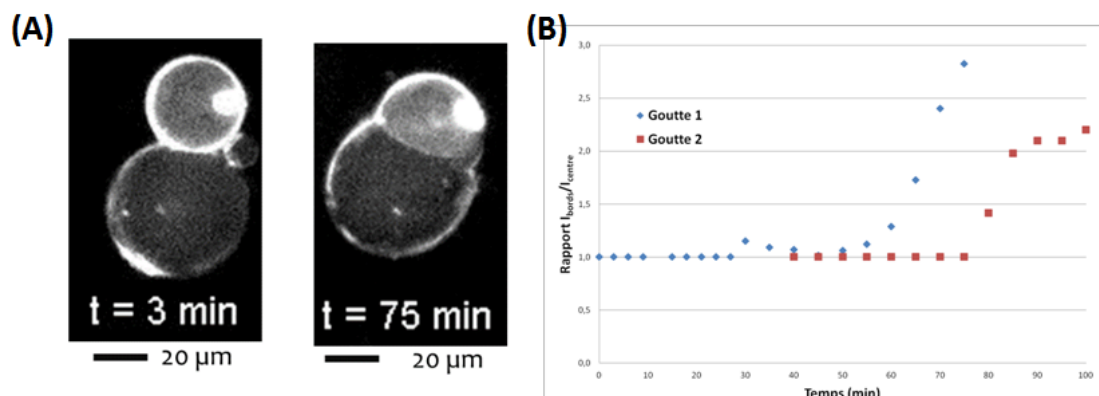


Fig. III.17 L'étude du "flip-flop" dans notre système de BIG a été faite sur deux paires mixtes. (A) Photos présentant une paire mixte asymétrique à $t = 3$ mn et $t = 75$ mn. (B) Rapport d'intensité lumineuse $\frac{I_{bord}}{I_{centre}}$ au cours du temps pour la goutte DOPC de différentes paires mixte.

l'annexine V dans la seule population de goutte PC et pu observer trois paires mixtes (figure III.18). Enfin, nous avons voulu savoir si un mélange de lipides pouvait présenter une diffusion transverse plus rapide. La composition de la goutte PS a donc été modifiée pour un mélange DOPS/DOPC de 60/40. Trois paires mixtes ont pu être observées. Dans ces deux conditions l'asymétrie est une fois encore conservée. Le rapport d'intensité $\frac{I_{bord}}{I_{centre}}$ reste égal à 1 durant toute la durée de l'expérience.

Nous avons donc montré que le système de BIG permet de préparer des bicouches asymétriques et que cette asymétrie est conservée durant au moins 30 minutes, temps caractéristique de nos observations de translocation. Ces expériences tendent à prouver que le phénomène de "flip-flop" présente des temps caractéristiques supérieurs à l'heure pour le système de BIG. Ces valeurs sont comparables aux données de "flip-flop" des phospholipides sur d'autres systèmes de membranes modèles. Nous avons donc pu étudier la translocation des CPP au travers de bicouches asymétriques avec le système de BIG.

III.3.2 Épaisseur et résistance des BIG

Avec le système des BIG il est également possible de contrôler le potentiel de part et d'autre de la bicouche lipidique comme nous l'avons vu dans une partie précédente (III.2.3). Des pipettes contenant des électrodes introduites dans les gouttes permettent enregistrer le courant traversant la bicouche en réponse à une marche de tension de 20 mV (figure III.19). On détermine alors la capacité et la résistance de la membrane. Le courant transitoire observé au niveau de cette marche est dû à la charge et la décharge de la capacité membranaire dans les résistances R_1 et R_2 dues au milieu aqueux entre les électrodes de part et d'autre de la BIG. La bicouche présente également une certaine résistance électrique bien plus élevée que celle des solutions aqueuses. Un modèle électrique simple de ce système (représenté figure III.22) est constitué d'une résistance R_b (due aux chaînes carbonées) en parallèle à une capacité C_b (due à la couche isolante principalement constituée par les chaînes). Les deux autres résistances (R_1 et R_2) représentent la résistance électrique de la solution et de

III.3. CARACTÉRISATIONS DES BIGS

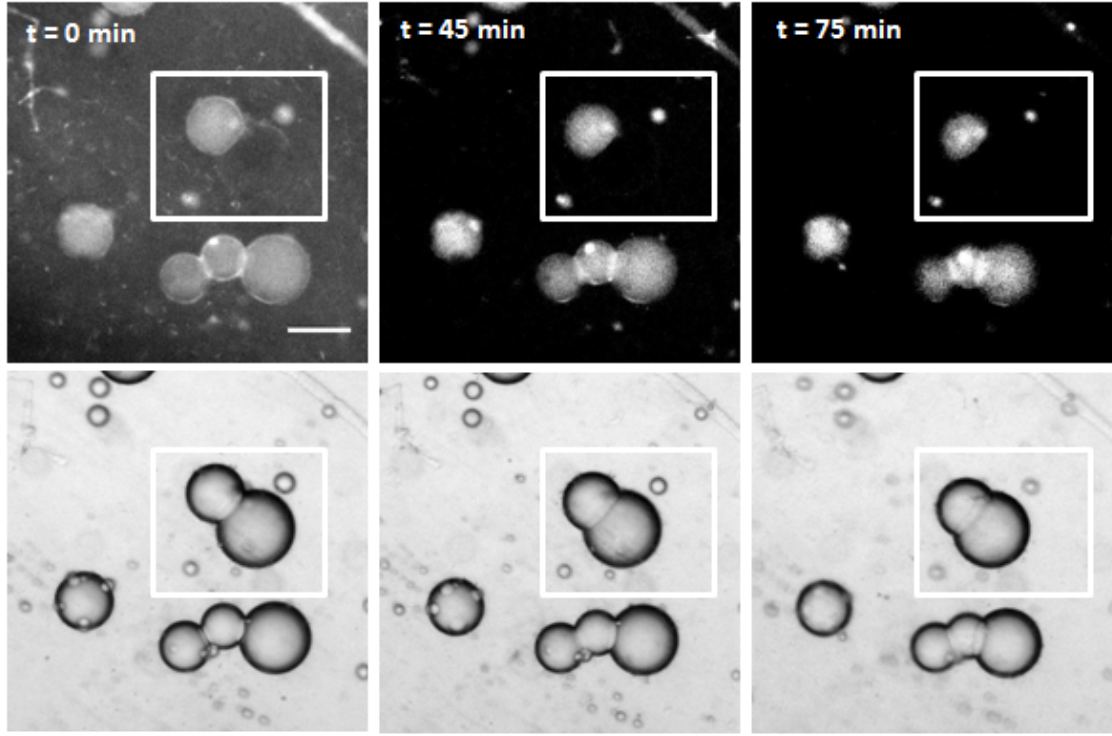


Fig. III.18 Observation d'une paire mixte PS/PC (dans le carré blanc) à des instants différents avec la présence d'annexine V uniquement dans la goutte PC (au total 3 paires ont été observées). La première ligne correspond aux photos prises en lumière de fluorescence, la deuxième correspond aux photos prises en lumière blanche. La barre d'échelle représente $50 \mu\text{m}$.

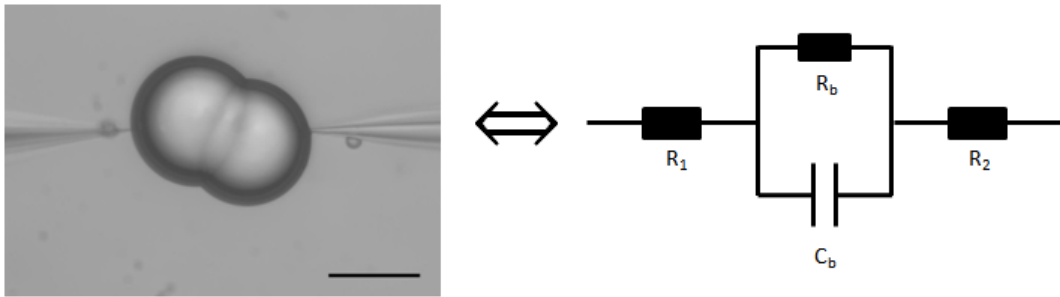


Fig. III.19 Photo et schéma électrique équivalent de la situation où deux pipettes contenant chacune une électrode sont plongées dans chacune des gouttes d'une BIG. La barre d'échelle représente $100 \mu\text{m}$.

la pipette et sont essentiellement la conséquence de la pointe fine des pipettes. Elles sont mesurées en plongeant les deux pipettes dans une même goutte (figure III.20)

On trouve alors typiquement $R_1 + R_2 \sim 10 \text{ M}\Omega$ (figure III.21). Cependant les pipettes peuvent facilement se salir avec des agrégats de lipides par exemple et cette résistance peut

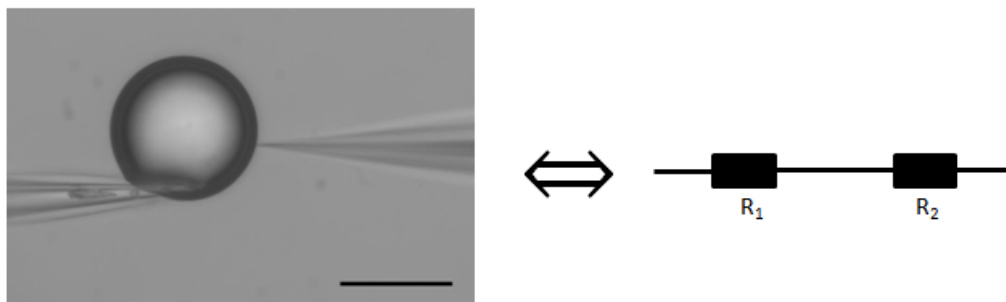


Fig. III.20 Photo et schéma électrique équivalent de la situation où les deux pipettes contenant chacune une électrode sont plongées dans une même goutte. La barre d'échelle représente $100\ \mu\text{m}$.

s'en trouver modifiée, il est donc important de mesurer régulièrement cette valeur.

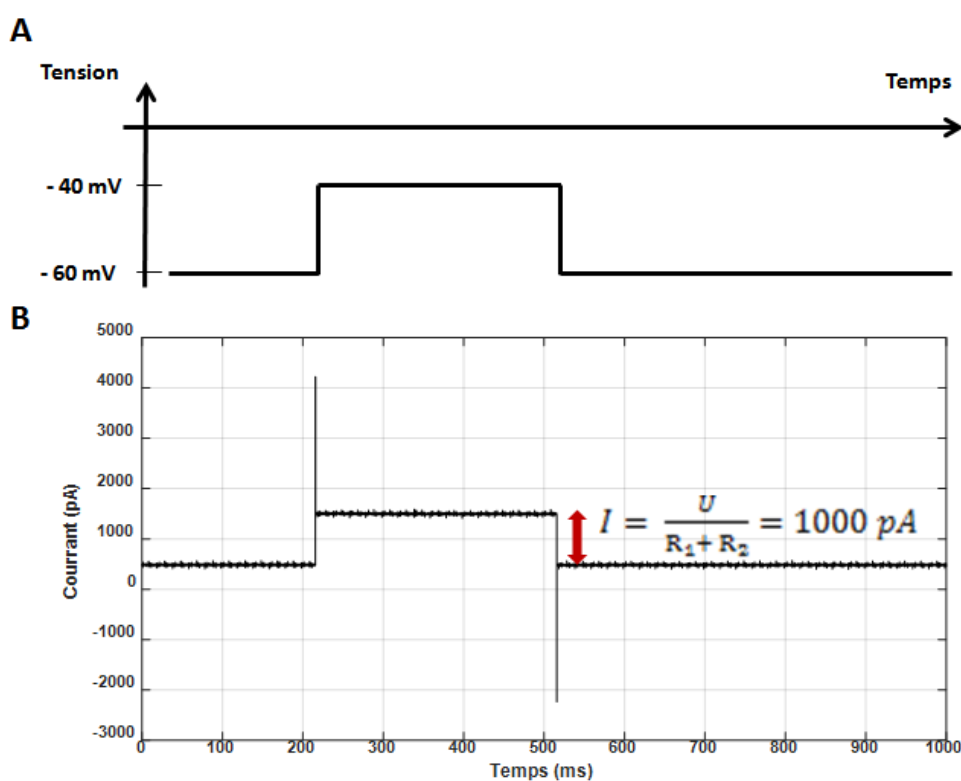


Fig. III.21 (A) Tension imposée entre les pipettes. (B) Courant électrique enregistré. On peut voir apparaitre la résistance électrique induite par les pipettes.

Le courant transitoire peut être ajusté par une exponentielle décroissante dont le temps caractéristique est $\tau = (R_1 + R_2) \times C_b$ (la résistance de la bicouche R_b est négligée car estimée à plusieurs ordres de grandeur supérieurs). Il est possible de mesurer la capacité

III.4. ÉTUDE DE LA TRANSLOCATION DES CPP À L'AIDE DES BIG

de la bicouche C_b et, en considérant celle ci comme un matériau diélectrique, de déduire l'épaisseur e du coeur hydrophobe de la bicouche : $e = \frac{\epsilon_r \times \epsilon_0 \times S}{C_b}$, avec S la surface de la bicouche, ϵ_r et ϵ_0 les permittivités relative de la membrane et du vide. La constante de temps τ et l'épaisseur de la bicouche ont pu être mesurées sur plusieurs paires de gouttes en condition POPC et POPG. Nous obtenons pour τ des valeurs de l'ordre de la milliseconde (figure III.22). On calcule, à partir d'une moyenne réalisée sur une dizaine de mesures, une épaisseur de bicouche de :

$$e = 3,5 \pm 1,5 \text{ nm}$$

Cela correspond à une valeur typique pour l'épaisseur d'une bicouche lipidique [Kučerka et al., 2011] et à une valeur de capacité de l'ordre de quelques $\mu F.cm^{-2}$. Nous pouvons donc conclure qu'il n'y a pas de couche de squalène continue entre les deux feuillets de lipides et que celui-ci est drainé vers l'extérieur de la membrane lors de la formation de la bicouche. Les BIG constituent donc un bon modèle pour étudier la translocation de peptide pénétrant à travers une membrane lipidique.

Nous pouvons également mesurer la résistance de la bicouche R_b . Elle est déduite de la différence de courant avant et après la marche, dès que la contribution capacitive de la bicouche peut être négligée (lorsque l'état stationnaire est atteint, après un temps supérieur à une dizaine de τ). Elle est normalisée par la surface de la bicouche pour comparer les BIG entre elles. Les résultats sont présentés sur la figure III.23.

Nous avons remarqué une grande variabilité pour les valeurs des résistances de surface d'une BIG à l'autre, cependant les résistances des bicouches POPG sont significativement plus élevées que celle des bicouches POPC. Il semble donc que les bicouches POPC soient plus perméables ou moins cohésives que les bicouches POPG mais cela ne permet pas d'expliquer une meilleure translocation des CPP comme nous le verrons plus loin. Nous expliquons cette résistance plus faible des BIG POPC par la présence de pores transitoires qui abaissent la résistance électrique globale de la bicouche. Si l'on considère que la conductivité d'une BIG est due à la conductivité des pores, on a : $G = Ng_1$, avec N le nombre de pores et g_1 la conductivité d'un pore. Or la conductivité d'un pore de diamètre 1 nm et de 4 nm de long vaut $g_1 = \frac{\sigma_{PBS} \times s_1}{e} = 300 \text{ pS}$ ($\sigma_{PBS} \sim 0,1 \text{ S.m}^{-1}$), ce qui nous donne pour la résistance $R = \frac{R_{surface}}{S} = \frac{1}{N \times g_1}$, donc $\rho = \frac{N}{S} = \frac{1}{R_{surface} \times g_1}$, nombre de pores par unité de surface, vaut 3000 pores par mm^2 (avec une résistance de surface de $10^3 \text{ G}\Omega.\mu m^2$). Cela correspond à quelques dizaines de pores dans le cadre de nos BIG en POPC.

III.4 Étude de la translocation des CPP à l'aide des BIG

Nous avons choisi d'étudier la translocation des CPP à travers une bicouche purement lipidique formée par la technique des BIG. Cette étude a fait l'objet d'une publication qui est soumise, je rappelle ici dans le détail les résultats de cette étude. L'observation et le suivi de la translocation de la Pénétratine sont faits par microscopie de fluorescence. Le but de cette étude était de déterminer les conditions favorables à la translocation de peptides pénétrants. Nous avons cherché à identifier les lipides partenaires de la Pénétratine et la force motrice responsable de la translocation du CPP. Dans cette partie, de nombreuses photos de paires mixtes sont présentées. On remarque que l'angle de contact entre les gouttes varie d'une condition à l'autre et au cours du temps. Cela est contrôlé par l'huile utilisée mais surtout par la "forme" du lipide [Ben M'barek et al., 2017], c'est pourquoi les paires présentées ont un

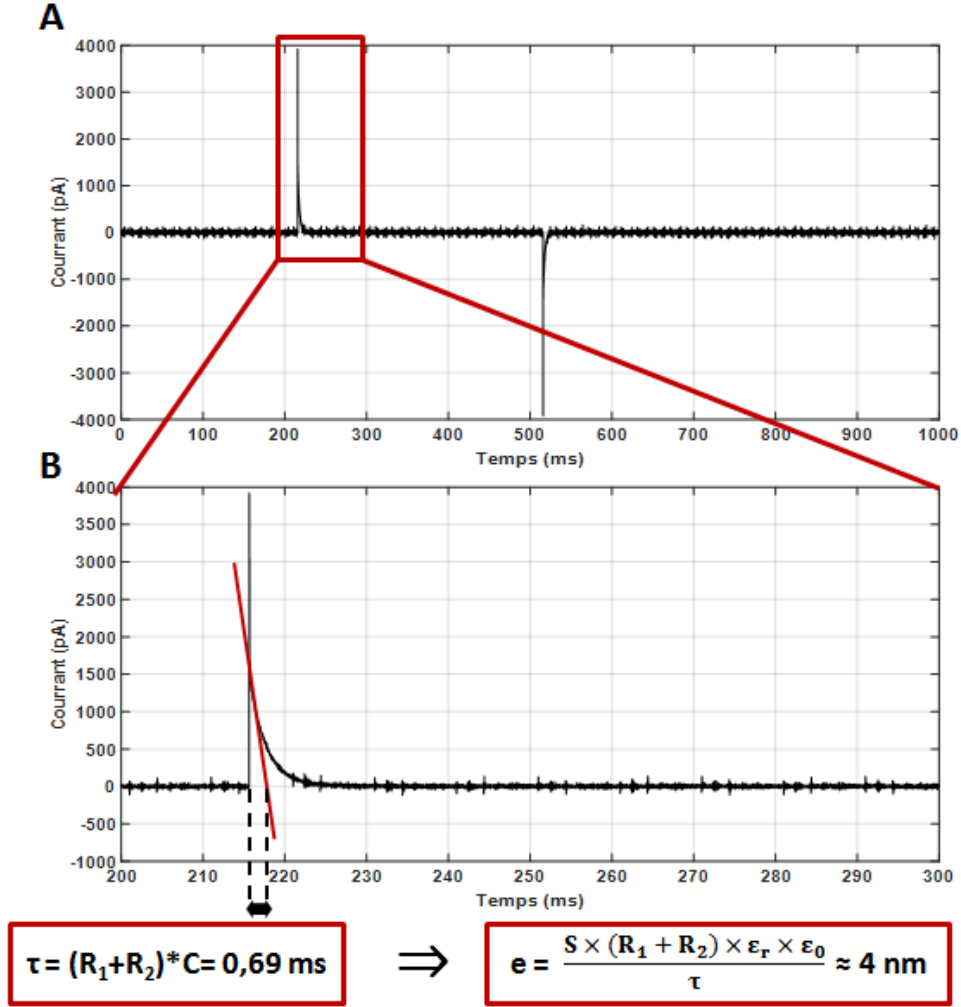


Fig. III.22 Mesure du courant à travers une bicouche de lipide POPG, le temps τ est représenté sur le graphique (B) du bas qui est un zoom de l'enregistrement (A). L'épaisseur est calculée avec $S = 10^{-8} \text{ m}^2$, $\epsilon_r = 2,8$, $\epsilon_0 = 8,85 \cdot 10^{-12} \text{ F.m}^{-1}$ et $(R_1 + R_2) = 10^7 \Omega$.

aspect différent. Certaines sont "très" sphériques (grand angle de contact) d'autres beaucoup moins (petit angle de contact).

III.4.1 Impact de différents lipides sur la translocation

Une première hypothèse a été que l'interaction électrostatique entre des CPPs chargés positivement et des lipides chargés négativement joue un rôle dans l'internalisation par translocation. Dans un premier temps, nous avons observé la translocation de la Pénétratine (possédant sept charges positives) au travers d'une bicouche constituée à 100 % de POPG, lipide anionique chargé négativement (figure III.24).

Nous pouvons observer pour une paire mixte que la goutte non fluorescente à $t = 0$ (ne contenant que du PBS) le devient en présence de Pénétratine mais pas en présence de

III.4. ÉTUDE DE LA TRANSLOCATION DES CPP À L'AIDE DES BIG

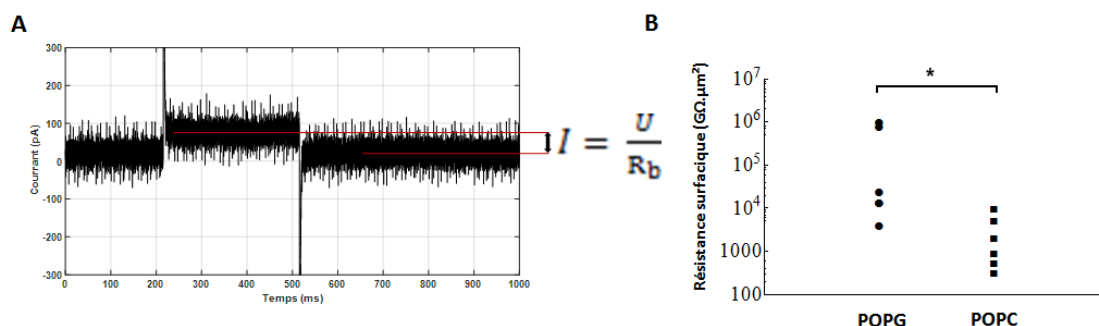


Fig. III.23 (A) Enregistrement du courant au travers d'une bicouche POPC. (B) Ensemble des résultats des résistances de surface des bicouches POPC et POPG.

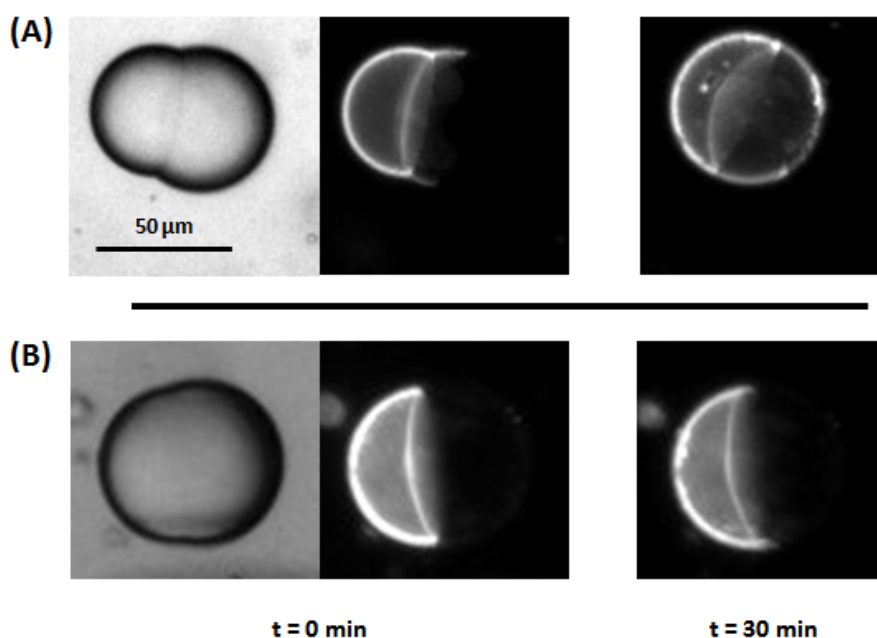


Fig. III.24 (A) Paire mixte contenant dans la goutte de gauche de la Pénétratine marquée en fluorescence. (B) On observe une paire mixte dont la goutte fluorescente contient R_6L_3 , peptide non pénétrant. À $t = 0$, les photos en lumière blanche et en lumière de fluorescence sont présentées. La phase huile est constituée de squalène et du lipide POPG uniquement.

R_6L_3 qui constitue notre peptide témoin. L'intensité de fluorescence augmente dans la goutte initialement sombre (figure III.25 A) et l'on estime que la concentration passe de 0 à presque $1 \mu M$ en 30 minutes (figure III.25 B). Il s'agit bien ici d'un passage de la Pénétratine au travers de la bicouche lipidique et donc de translocation que l'on peut quantifier. En effet on remarque que R_6L_3 n'est pas capable de passer dans la goutte initialement non fluorescente. On pourrait arguer que la Pénétratine se retrouve en phase hydrophobe et intègre la goutte non fluorescente en passant par la monocouche de lipide ou par l'huile mais les gouttes isolées

CHAPITRE III. L'ACTIVITÉ DES CPPS SUR DES MEMBRANES MODÈLES

ont une fluorescence qui n'évolue pas. Comme de plus la Pénétratine est fortement chargée et préfère un environnement hydrophile nous pouvons conclure qu'il s'agit bien d'un passage à travers la bicouche. Enfin une autre remarque pourrait être que le passage s'effectue en bordure de contact par diffusion dans la monocouche de lipide puisqu'elle apparaît plus fluorescente sur les photos, cela s'explique par l'interaction électrostatique entre les têtes polaire du lipide POPG et la Pénétratine. Cependant il n'est pas observé de passage avec le peptide témoin R_6L_3 et il n'y a pas de continuité entre les deux monocouches de lipide ce qui imposerait donc que la Pénétratine passe par la phase huile pour diffuser d'une monocouche à l'autre or cela n'est pas favorable. De plus des études en microscopie confocale réalisées par Pierre Soule ont mis en évidence la présence de Pénétratine en volume dans chacune des deux gouttes de la paire (Chapitre III partie Résultats de sa thèse [Soule, 2015]).

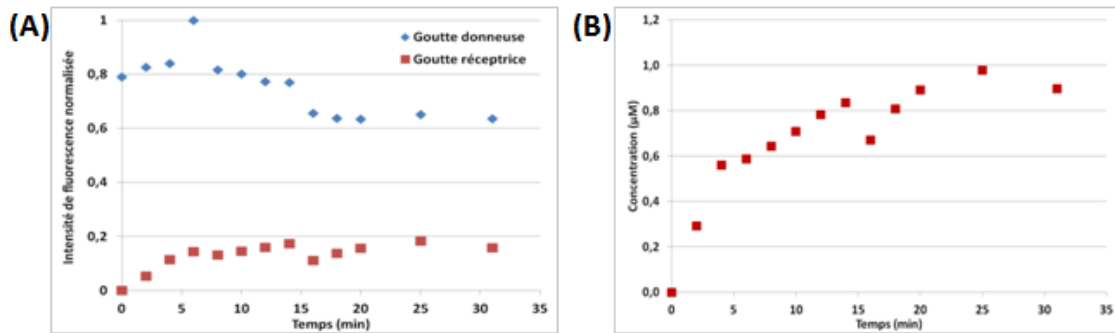


Fig. III.25 (A) Mesures de l'intensité de fluorescence dans chacune des gouttes. La goutte donneuse est la goutte fluorescente à $t = 0$. (B) Représentation d'une estimation de la concentration en Pénétratine calculée selon la méthode présentée dans la partie Mesures et acquisition de données.

Dans la continuité de ces résultats, nous avons mené une étude comparative sur l'impact de la nature du lipide pour la translocation de la Pénétratine. Des populations de gouttes avec différentes concentrations en POPG et POPC (lipide zwitterionique, globalement neutre) ont été préparées. La translocation présente un caractère probabiliste, certaines conditions sont plus favorables que d'autres au passage des CPP à travers la bicouche et entraînent une forte probabilité de translocation sans que le passage soit systématiquement observé. Il faut donc développer une approche statistique pour étudier ce phénomène. C'est pour cela que de 5 à 10 paires mixtes par condition ont été observées. Un critère pour affirmer que la translocation est effectivement observée a également été choisi arbitrairement. La condition $\frac{F_2}{F_1} > 0,1$ doit être vérifiée pour affirmer qu'il y a eu translocation du peptide avec F_1 l'intensité de fluorescence à $t = 30$ min de la goutte initialement fluorescente et F_2 l'intensité de fluorescence à $t = 30$ min de celle initialement non fluorescente. L'ensemble des résultats est présenté dans la figure qui suit (figure III.26). Le pourcentage de translocation représente le nombre d'expériences où la translocation est observée par rapport au nombre d'expériences totales.

On observe de la translocation en présence d'au moins 40 % de POPG dans la bicouche, mais pour des concentrations inférieures (20% et 0% en POPG) elle n'est pas significativement observée en comparaison avec le contrôle négatif R_6L_3 . Cela signifie qu'une certaine

III.4. ÉTUDE DE LA TRANSLOCATION DES CPP À L'AIDE DES BIG

quantité de POPG est nécessaire pour assurer la translocation de la Pénétratine à travers la bicouche lipique. Cette quantité se situe entre 20 et 40 % de POPG. Ces concentrations très éloignées des conditions physiologiques sont discutées en fin de chapitre.

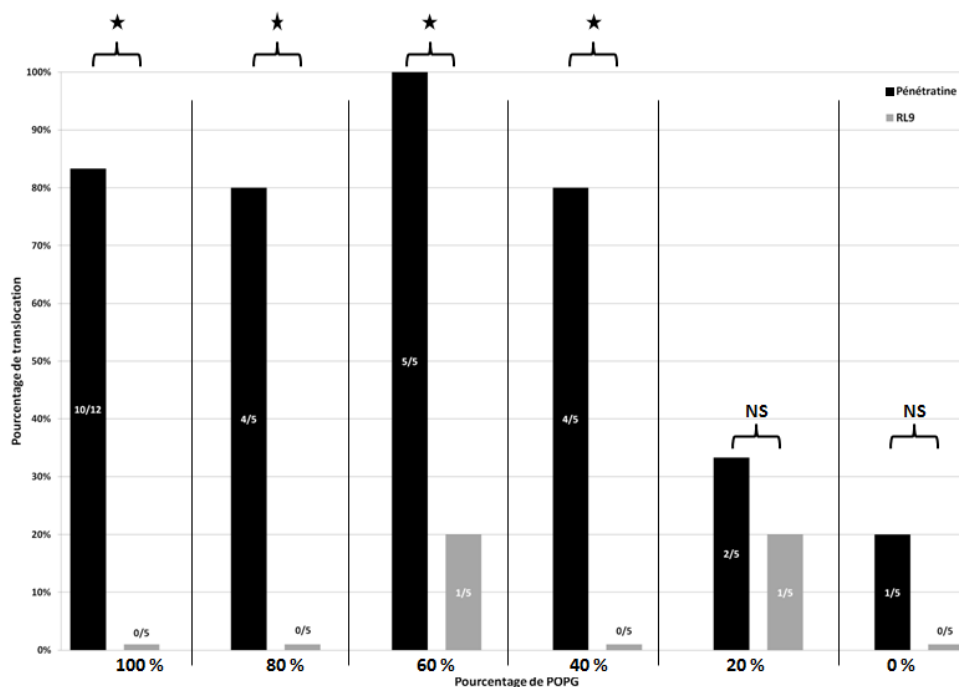


Fig. III.26 Étude de la translocation de la Pénétratine sur des bicouches POPG/POPC à différents ratios. Le taux de translocation observée est indiqué dans chaque cas. Les statistiques sont analysées par un test exact de Fisher, test non paramétrique adapté aux petits échantillons. L'étoile indique une différence significative avec une p -value inférieure à 5 %.

On pourra noter que R_6L_3 n'est pas capable de transloquer quelle que soit la concentration en POPG. Pierre Soule avait, dans sa thèse, choisi un témoin différent. Il utilisait la sonde fluorescente FP488 seule comme contrôle négatif. En condition 0 % POPG (donc 100 % POPC), il observait le passage de la sonde au travers de la bicouche, le contrôle négatif devenant positif (Chapitre III partie Résultats[Soule, 2015]) ! Cela explique en partie notre choix de prendre R_6L_3 comme témoin négatif. Les résultats de Pierre Soule peuvent cependant s'expliquer si l'on considère la mesure de la résistance de bicouche présentée précédemment (figure III.23). En effet les bicouches POPC ont une résistance de bicouche plus faible. Nous émettons ici l'hypothèse qu'elles présentent plus de pores et sont plus perméables, comme une sonde fluorescente est de taille beaucoup plus petite que R_6L_3 (environ 10 fois plus petite), il est probable que la sonde diffuse par les pores de la bicouche POPC alors que le peptide ne le pourra pas.

Finalement, nous avons cherché à utiliser un autre lipide anionique. Les observations ont été réalisées avec le lipide POPS et la translocation de la Pénétratine n'a pas été observée à travers ces bicouches 100 % POPS (figure III.27). Notre conclusion est que l'interaction électrostatique entre lipides et peptides ne peut pas à elle seule expliquer la translocation. Il faut également tenir compte d'une interaction chimique entre la Pénétratine et POPG.

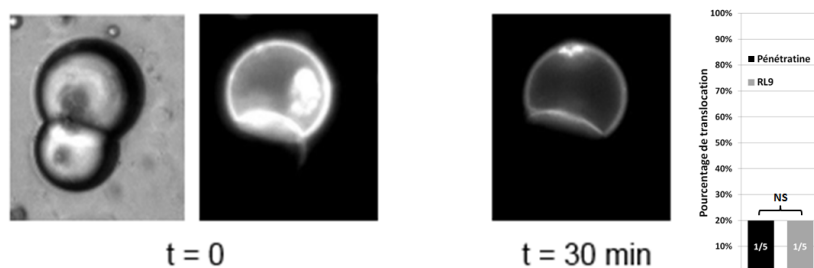


Fig. III.27 Observation d'une paire mixte avec 100 % de POPS dans la phase huile. La Pénétratine n'est pas capable de translocation au travers de cette bicouche lipidique. Le taux de translocation, 1 paire sur 5 observées, est précisé sur le graphe.

III.4.2 Impact de l'asymétrie sur la translocation

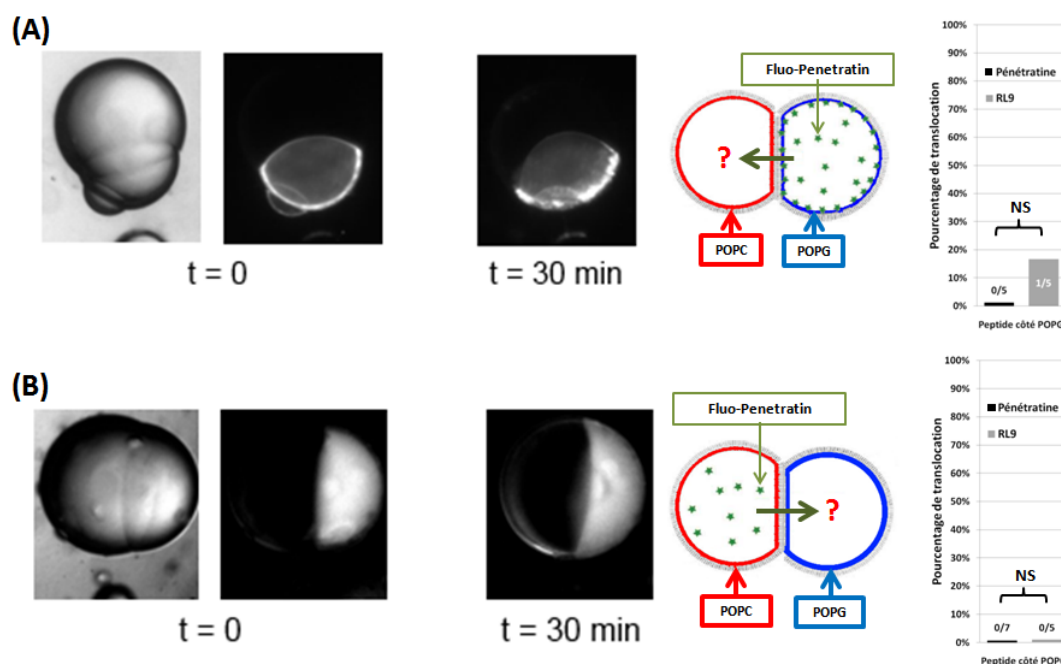


Fig. III.28 BIG asymétrique POPC/POPG avec le peptide dans les gouttes POPG (A) ou dans les gouttes POPC (B). Aucune de ces conditions n'est favorable au passage de la Pénétratine.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la translocation de la Pénétratine à travers des bicouches asymétriques qu'il est possible de former par l'intermédiaire des BIG (voir plus haut). Des gouttes POPC contenant de la Pénétratine fluorescente ont été mélangées avec des gouttes POPG contenant seulement du PBS. Le cas inverse, avec la Pénétratine dans les gouttes POPG, a ensuite été étudié. L'observation des paires mixtes a donné les résultats

III.4. ÉTUDE DE LA TRANSLOCATION DES CPP À L'AIDE DES BIG

rapportés en figure III.28. La translocation de la Pénétratine n'est pas observable à travers ce type de bicouche asymétrique POPC/POPG. Nous en concluons qu'une certaine quantité de POPG est nécessaire pour permettre la translocation de la Pénétratine (entre 20 % et 40 %) mais elle est nécessaire dans chacun des feuillets de la bicouche.

Finalement, un dernier type de BIG asymétriques a été essayé : des gouttes POPG ont été mélangées à des gouttes POPS. On observe maintenant que la translocation de la Pénétratine est possible dans le sens POPG vers POPS mais pas dans le sens inverse. Les conditions contrôles en R_6L_3 ont également été effectuées, elle se sont révélées négatives (1 passage sur 9 avec R_6L_3 côté POPG et 0 sur 5 avec R_6L_3 côté POPS).

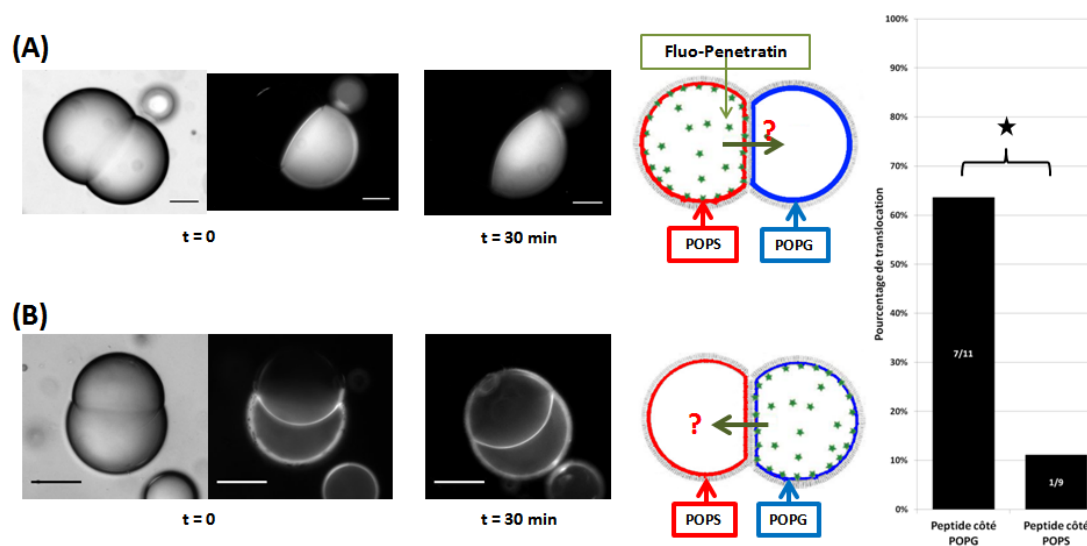


Fig. III.29 BIG asymétrique POPS/POPG. Pour les photos de la ligne (A), le peptide est dans les gouttes POPS. Pour celle de la ligne (B) il est dans les gouttes POPG. Sur le graphique de droite est représenté le nombre de paire mixte où de la translocation a pu être observée selon que la Pénétratine est dans les gouttes POPG (passage) ou POPS (pas de passage).

III.4.3 Conclusion et perspective

Au cours de cette étude nous avons démontré la capacité que possède la Pénétratine à transloquer au travers de certaines bicouches lipidiques. Certains lipides anioniques permettent le passage de la Pénétratine mais la charge ne suffit pas à expliquer à elle seule la translocation puisque celle-ci n'est pas observée au travers de bicouche 100 % POPS. L'étude sur des BIG asymétriques nous en apprend un peu plus sur les étapes du mécanisme de translocation :

- Une première étape consiste en l'adhésion de la Pénétratine sur le feuillet proximal de la bicouche. Cette étape est observée avec les lipides POPG et POPS qui ont une tête hydrophobe chargée négativement (la monocouche de lipide est fluorescente) mais

CHAPITRE III. L'ACTIVITÉ DES CPPS SUR DES MEMBRANES MODÈLES

pas avec la PC. Cela correspond à une première étape d'approche de la membrane cellulaire par le peptide (figure I.9 du chapitre 1).

- Une seconde étape, encore mal connue, consiste en l'insertion dans la bicouche, ou l'amincissement de la bicouche, ou une décoration en POPG du peptide... Cette étape a été mise en évidence par les expériences en BIG asymétriques POPS/POPG puisque le passage est observé dans un sens mais pas dans l'autre. Si l'on rapporte cela aux mécanismes proposés par Bechara et Sagan [Bechara and Sagan, 2013], cela peut correspondre à la formation de la micelle inverse, du pore ou à la décoration préalable du peptide par les lipides pour écranter ses charges.
- Une troisième étape consiste en la traversée de la bicouche par le peptide. Elle nécessite des lipides chargés négativement dans le feuillet distal. En effet la translocation n'a jamais été observée en BIG asymétriques POPG/POPC mais l'a été en condition POPG/POPS avec les lipides POPS qui servent de force motrice à la traversée. Toujours en faisant référence aux mécanismes présentés au chapitre I, cette étape correspond à l'ouverture de la micelle inverse vers l'intérieur de la cellule, le passage du peptide par le pore ou la traversée par le peptide des queues hydrophobes de la bicouche.

Il est important de garder à l'esprit que les concentrations en lipides sont assez éloignées des conditions physiologiques que l'on peut retrouver dans une cellule. Les lipides POPG se retrouvent à hauteur de quelques pourcents (variable d'un type cellulaire à l'autre) et plutôt sur le feuillet interne des membranes plasmiques. Cependant nous estimons que les BIG représentent un bon système modèle et que les conditions testées peuvent mimer une concentration locale très éloignée de la composition lipidique globale d'une cellule.

Au cours de cette thèse, des expériences moins approfondies ont été effectuées pour observer la translocation avec d'autres CPP et d'autres sondes fluorescentes. Elles sont résumées dans la figure suivante (figure III.30)

Il est intéressant de remarquer que le peptide Tat semble être capable de translocation alors que son mécanisme d'internalisation ne fait pas consensus (endocytose [Gump and Dowdy, 2007] *versus* translocation [Jiao et al., 2009]). Cependant pour une étude plus poussée des paramètres régissant la translocation des CPPs nous pensons qu'il est nécessaire de développer une nouvelle technique pour l'observation et la fabrication des BIG. Nous l'avons dit, nous étudions un phénomène probabiliste d'où la nécessité d'une approche statistique. Les paires sont cependant formées de façon totalement aléatoire après mélange des deux populations de gouttes. Nous n'avons que très peu de contrôle sur la formation des gouttes et la formation des paires (taille, temps de contact...). C'est pourquoi nous avons essayé par la suite de développer un outil microfluidique capable de produire en grande quantité et avec des paramètres contrôlés de nombreuses BIG.

Il aurait été intéressant de regarder la translocation de la Pénétratine avec le système de BIG sous contrôle de potentiel. Nous pouvons imaginer imposer une différence de potentiel sur une BIG pour inhiber ou forcer une translocation par exemple. Cela permettrait d'en savoir plus sur la seconde étape du mécanisme de translocation proposé ci-dessus. Cependant par manque de temps et de matériels ces expériences n'ont pas encore pu être réalisées.

III.4. ÉTUDE DE LA TRANSLOCATION DES CPP À L'AIDE DES BIG

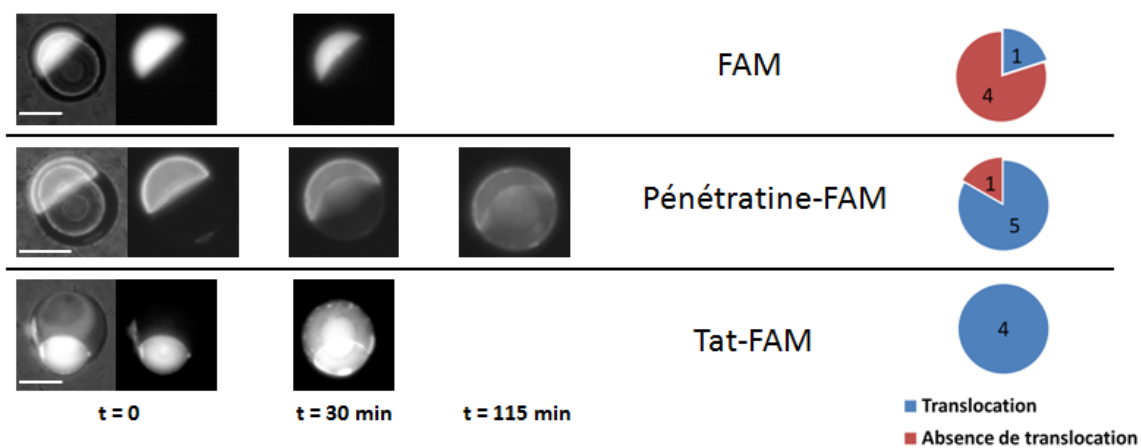


Fig. III.30 La carboxyfluorescéine (FAM) couplée au peptide Pénétratine ou au peptide Tat a été utilisée pour suivre en fluorescence l'évolution de paire mixte composée à 100 % par des lipides POPG. Les résultats avec la carboxyfluorescéine montre que la Pénétratine est toujours capable de translocation mais que Tat également. La dernière colonne présente le nombre de paire mixtes observées avec et sans translocation. La barre d'échelle représente 100 μm .

CHAPITRE III. L'ACTIVITÉ DES CPPS SUR DES MEMBRANES MODÈLES

IV – Microfluidique et automatisation de la formation des BIG

Ce chapitre présente le développement d'un outil microfluidique pour la production et le contrôle de paires de gouttes dans le but d'étudier des BIG en grand nombre et simultanément. La microfluidique est l'étude de l'écoulement des fluides à l'échelle du micromètre. À cette échelle l'écoulement est laminaire avec des phénomènes de viscosité qui dominent les phénomènes inertiels. Dans notre cas, l'écoulement de gouttes aqueuses à une vitesse de quelques centimètres par seconde dans des canaux de 100 microns donne une estimation du nombre de Reynolds :

$$R_e = \frac{\text{Forces d'inertie}}{\text{Forces visqueuses}} = \frac{\rho \times U \times L_{\text{canal}}}{\eta_{\text{huile}}} = \frac{10^3 \text{ kg.m}^{-3} \times 1 \text{ cm.s}^{-1} \times 100 \text{ }\mu\text{m}}{10^{-2} \text{ Pa.s}} \sim 0,1$$

avec ρ la masse volumique, U la vitesse caractéristique du fluide, L_{canal} la longueur caractéristique du système et η la viscosité dynamique du fluide. À cette échelle les forces de gravité sont dominées par les forces capillaires et la manipulation de micro-objets (nos gouttes) ne s'effectue pas de la même façon qu'à une échelle supérieure. L'écoulement de gouttes de phase aqueuse dans une phase huile constitue un écoulement diphasique et la tension de surface a également un rôle prépondérant pour la manipulation de ces émulsions en microfluidique. L'utilisation de lipides, qui sont des tensioactifs, va en effet modifier la tension de l'interface eau/huile. La déformabilité des gouttes s'en trouve modifiée et leur manipulation plus difficile.

L'utilisation d'un tel système présente l'avantage d'une faible consommation de produits (quelques dizaines de microlitres par phase) et une compacité permettant l'observation d'une dizaine de paires de gouttes dans le champ du microscope. Cela en fait un outil de choix pour l'étude statistique que nous souhaitons mener.

IV.1 Microfabrication et développement de notre outil

Nous cherchons donc à fabriquer un outil capable de faire et manipuler des objets de quelques dizaines de microns. Dans un premier temps nous avons fabriqué des moules de cet outil. Cette partie présente deux techniques de microfabrication que nous avons utilisées. La microfabrication consiste à usiner des objets micrométriques dont la résolution est de l'ordre de quelques micromètres voire de quelques centaines de nanomètres lorsque les machines les plus performantes sont utilisées. Dans notre cas, nous cherchons à fabriquer des canaux, ayant une section pour l'écoulement de fluide allant de quelques microns à une centaine de

micromètres carrés, avec une précision de quelques micromètres. Depuis quelques dizaines d'années plusieurs techniques ont été mises au point afin de résoudre cette problématique et permettre de connecter des canaux en réseaux qui formeront ce que l'on appellera une puce microfluidique. Cette microfabrication implique de travailler dans une atmosphère contrôlée, avec peu de poussières qui pourraient venir se déposer sur les différentes surfaces et perturber la fabrication. Les étapes de préparation d'une puce microfluidique sont donc effectuées dans une "salle blanche". Ce savoir-faire et les différents outils nécessaires pour la fabrication des puces nous ont été transmis par la plate-forme de l'Institut des Nanosciences de Paris (INSP) et l'atelier de fabrication du LISE sur le campus Pierre et Marie Curie de Sorbonne Université ainsi que par la plate-forme technologique de l'Institut Pierre Gilles de Gennes (IPGG).

IV.1.1 La lithographie molle ou "soft-lithography"

La "soft-lithography" consiste à fabriquer un micro ou nano-objet en coulant un liquide élastomère thermodurcissable dans un moule présentant les reliefs souhaités en négatif. Cette technique présente l'avantage d'être rapide (fabrication d'une puce en une journée) et à bas coût. Les différentes étapes de ce procédé sont rappelées sur la figure IV.1.

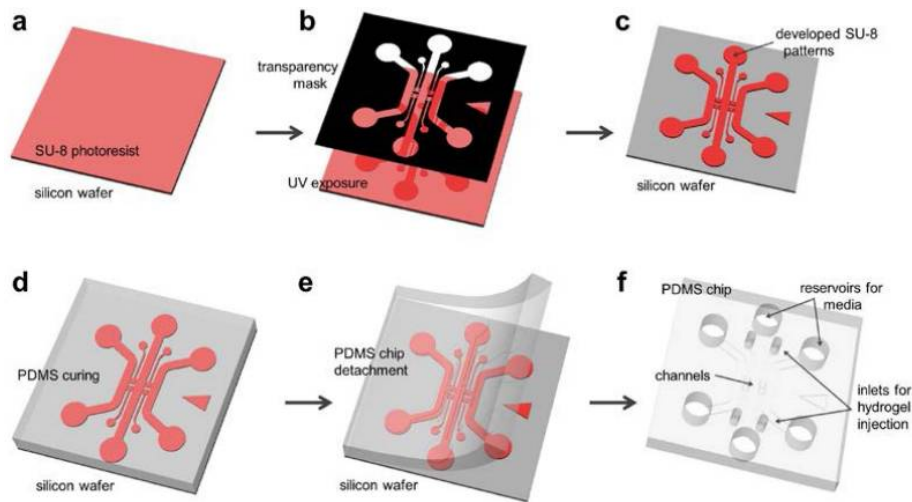


Fig. IV.1 Les différentes étapes de "soft-lithography" (d à f) et les étapes de photolithographie préalable (a à c) pour la fabrication du moule. (a) La résine SU-8 est déposée et pré-cuite sur un support. (b) La résine est exposée aux UV à travers un masque. (c) La résine est cuite et développée. (d) Le PDMS est coulé sur le moule. (e) Le PDMS est démoulé. (f) La puce est percée et collée [Shin et al., 2012].

Dans un premier temps il faut donc fabriquer un masque qui servira de pochoir pour fabriquer le moule. Les masques sont faits d'un matériau transparent aux UV, généralement du quartz ou du verre, recouvert d'une fine couche opaque aux UV (généralement du chrome). La résolution du moule ne pourra jamais être supérieure à la résolution du masque. Dans certains cas, lorsqu'une résolution plus faible est tolérée, le masque peut être simplement imprimé sur un support transparent. Vient ensuite l'étape de photolithographie. De la résine photosensible est déposée sur un support pour former une galette d'épaisseur homogène (figure IV.1 (a)). Il faut ensuite évacuer, par chauffage, le solvant utilisé pour étaler la résine

IV.1. MICROFABRICATION ET DÉVELOPPEMENT DE NOTRE OUTIL

qui forme alors un disque solide. L'insolation aux UV à travers le masque va induire des réactions physico-chimiques qui modifient la solubilité de la résine vis à vis d'un solvant développeur (figure IV.1 (b)). Il existe plusieurs types de résines. Les résines dites positives (PMMA, DQN, AZ), dont l'exposition aux UV entraîne une plus grande solubilité et les négatives (SU8) qui deviennent insolubles une fois exposées aux UV. La résine SU8 (représentée figure IV.2 (a)) va par exemple réticuler aux endroits spécifiques où le masque n'est pas recouvert de chrome et durcir. Cette étape est limitante concernant la résolution finale du moule. S'en suit une étape de développement dans un bain de solvant qui éliminera la résine non exposée (pour les résines négatives) ou exposée (résine positive) (figure IV.1 (c)).

L'étape suivante (figure IV.1 (d)) est le moulage par un polymère et son réticulant (par exemple le polydiméthylsiloxane (PDMS), figure IV.2 (b)). Le PDMS présente de nombreux avantages : il est transparent dans le visible et souple (selon la concentration en réticulant, généralement choisie à 1/10), il se découpe facilement, est inerte, hydrophobe et perméable aux gaz et solvants organiques apolaires et oxydable par plasma. Une fois coulé dans le moule, une étape de réticulation (généralement par chauffage) permet de faire durcir la puce. Elle est ensuite démoulée (figure IV.1 (e)) et les entrées et sorties sont percées dans la puce (figure IV.1 (f)) puis elle est collée sur un support (une lame de verre par exemple) par traitement au plasma d'oxygène et est prête à être utilisée.

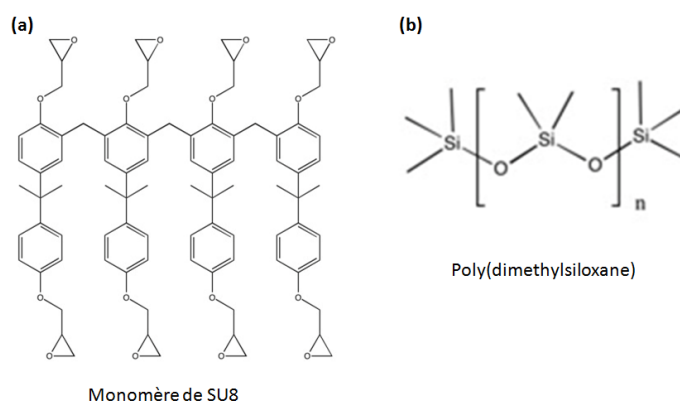


Fig. IV.2 Formules semi-développées de la résine SU8 et du PDMS. La résine SU8 réticule par ouverture des cycles epoxy lorsqu'elle est exposée à une lumière UV (à 365 nm dans notre cas). Les chaînes de PDMS vont se brancher les unes aux autres et donc durcir sous l'effet du réticulant.

La taille théorique des motifs que l'on peut obtenir par cette technique est comprise entre 0,2 et 500 microns, et dépend surtout de la précision des motifs présents sur le moule. Il est important également de prendre en compte le rapport d'aspect qui est le rapport de la hauteur du canal sur la largeur la plus petite. Cette technique permet d'atteindre un rapport d'aspect de l'ordre de 10.

Il est aussi possible de fabriquer le moule en utilisant des imprimantes 3D.

IV.1.2 L'impression 3D

L'impression 3D voit le jour au début des années 1980 avec le dépôt de plusieurs brevets sur la technique de fabrication additive (Jean-Claude André, Olivier de Witte, et Alain le Méhauté, pour l'entreprise CILAS ALCATEL) et de stéréolithographie (Chuck Hull). La première imprimante est distribuée par 3D SYSTEM en 1987, il s'agit de la SLA-1. Son fonctionnement repose sur la solidification couche par couche d'un liquide photosensible (principe de stéréolithographie). Les imprimantes 3D ont connu un véritable essor au début des années 2000 et sont utilisées dans de très nombreux domaines dont la médecine, l'aéronautique, l'architecture, la recherche et aussi par des particuliers. Utilisées initialement pour réaliser des prototypes, elles peuvent désormais servir à produire des objets à une échelle industrielle. Elles sont également largement utilisées en microfluidique pour la fabrication de moules. Au cours des dernières années la résolution de ces machines n'a cessé d'augmenter pour atteindre actuellement une précision submicrométrique. L'avantage de l'impression 3D est qu'elle permet d'obtenir directement le moule et de s'affranchir de la fabrication d'un masque et de l'étape de photolithographie.

L'impression 3D consiste en la superposition de couches 2D de matériaux pouvant être du papier, du plastique, du métal, de la céramique ou même du verre [Kotz et al., 2017]. Elle nécessite de dessiner en 3D dans un fichier informatique le modèle qui sera reproduit tranche par tranche. Il existe plusieurs procédés pour superposer les différentes couches de matière. Dans sa revue sur les manières d'utiliser l'impression 3D, R. Scopigno *et al.* identifient quatre techniques principales de fabrication additive (figure IV.3) [Scopigno et al., 2017]. Il peut s'agir de solidifier un liquide par photopolymérisation (procédé de stéréolithographie), de déposer directement de la matière (fondue qui va durcir en refroidissant), d'agglomérer par collage ou de laminar couche par couche.

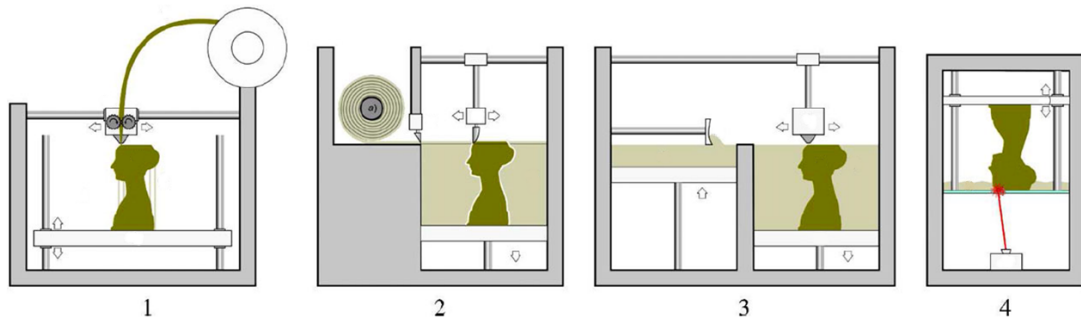


Fig. IV.3 Représentation schématique des principales techniques de fabrication additive. 1 : Modelage par dépôt de filament en fusion (FDM), 2 : Fabrication par laminage (LOM), 3 : Agglomération de poudre par collage (GMB), 4 : Stéréolithographie (SLA) [Scopigno et al., 2017].

La méthode par dépôt (FDM) est sans doute la méthode la plus commune (figure IV.3 n° 1). Elle consiste à faire fondre un filament (en général de plastique Acrylonitrile butadiène styrène (ABS) ou Polylactide (PLA)) et à le déposer par l'intermédiaire d'une tête mobile couche après couche en faisant descendre le plateau support de l'objet. La technique de laminage consiste à coller une fine plaque de matériel (plastique, papier, métal...) qui sera

IV.1. MICROFABRICATION ET DÉVELOPPEMENT DE NOTRE OUTIL

découpée par une lame adaptée selon un patron puis à recommencer ainsi de suite. On se retrouve finalement avec l'objet enchâssé dans un bloc de matériaux (figure IV.3 n° 2). Pour la méthode d'agglomération de poudre il s'agit de déposer une fine couche uniforme de très petites particules de matériaux (d'une dizaine de nanomètres). Le collage s'effectue par un agent chimique ou un réticulant déposé par la tête mobile de l'imprimante puis une nouvelle couche de poudre est déposée, *etc.* (figure IV.3 n° 3). Enfin la stéréolithographie est une technique de polymérisation de résine par une source lumineuse (souvent un laser UV) comme présenté sur la figure IV.3 (n° 4). C'est une technique très rapide et sans doute la plus coûteuse.

Il a également été envisagé de préparer le moule par des techniques de gravure mais celles-ci s'avèrent beaucoup plus coûteuse pour obtenir la résolution souhaitée.

IV.1.3 Former des gouttes en microfluidique

Nous nous intéressons à la formation de gouttes de taille et de composition parfaitement contrôlées. La difficulté est ici d'obtenir rapidement un grand nombre de gouttes mono-disperses de quelques dizaines de micromètres. Dans leur étude de 2001, Alfonso M. Gañán-Calvo et José M. Gordillo décrivent un système permettant d'obtenir une population de bulles de ce type [Gañán-Calvo and Gordillo, 2001]. Par un système présenté à la figure IV.4, ils réussissent à produire des bulles de gaz dans un flux de liquide. Ils s'attachent également à décrire la physique de ce phénomène et déterminent les paramètres influant sur la taille des bulles : la propriété du liquide et du gaz, la géométrie du système ainsi que les paramètres des deux flux. Il s'agit d'un écoulement commun liquide/gaz au travers d'un trou de taille suffisamment petite (plus petit que la largeur du flux de cœur, 30 à 500 microns). L'écoulement focalisé entraîne un affinement du jet de gaz lorsqu'il passe par le trou et le gaz (fluide au cœur de l'écoulement) peut alors se fragmenter en gouttes mono-disperses du fait de la friction entre les deux phases. Dans une précédente étude, Alfonso M. Gañán-Calvo avait déjà étudié un tel système mais avec un flux de liquide sous pression d'un flux de gaz [Gañán-Calvo, 1998].

Ce système d'écoulement focalisé ou "flow focusing" a de nouveau pu être étudié plus tard en microfluidique, avec l'écoulement confiné de deux phases liquides non miscibles : l'eau comme phase dispersée (liquide de cœur de jet) et l'huile comme phase continue. En 2003, Shelley L. Anna *et al.* étudient l'impact des flux et du ratio des flux des différentes phases sur la taille des gouttes formées par ce "flow focusing" [Anna et al., 2003]. Les gouttes formées sont de taille mono-disperse cependant le contrôle de la taille n'est pas parfaitement maîtrisé. Une tendance est pourtant notable, un fort flux d'huile et un faible ratio flux d'eau/flux d'huile formera plutôt des gouttes de tailles inférieures au rétrécissement alors qu'au contraire un flux d'huile plus faible formera plutôt des gouttes de tailles supérieures à ce rétrécissement (figure IV.5).

Todd Thorsen *et al.* présentent également un système microfluidique pour la production de gouttes mono-disperses en phases liquide-liquide en 2001 [Thorsen et al., 2001]. Il s'agit de canaux microfluidiques connectés pour former un T avec une sortie et une entrée pour chacune des phases liquides non miscibles. Le schéma du dispositif est présenté sur la figure IV.6. Des gouttes de tailles différentes sont produites selon la valeur des pressions des phases huile et eau. Des gouttes mono-disperses simples sont obtenues pour une pression de la phase huile supérieure de 10 à 30 % à la pression de la phase aqueuse. Au cours de ma thèse,

les techniques de jonction en T et d'écoulement focalisé ont été utilisées. Cette dernière a finalement été retenue car elle nous a donné de meilleurs résultats. En terme de débit, nous sommes plutôt dans la partie supérieure gauche du diagramme (figure IV.5) avec pour valeur de flux d'huile Q_0 et de flux d'eau Q_i :

$$Q_0 = 1.10^{-5} \text{ mL.s}^{-1} \text{ et } \frac{Q_i}{Q_0} \sim \frac{1}{4}.$$

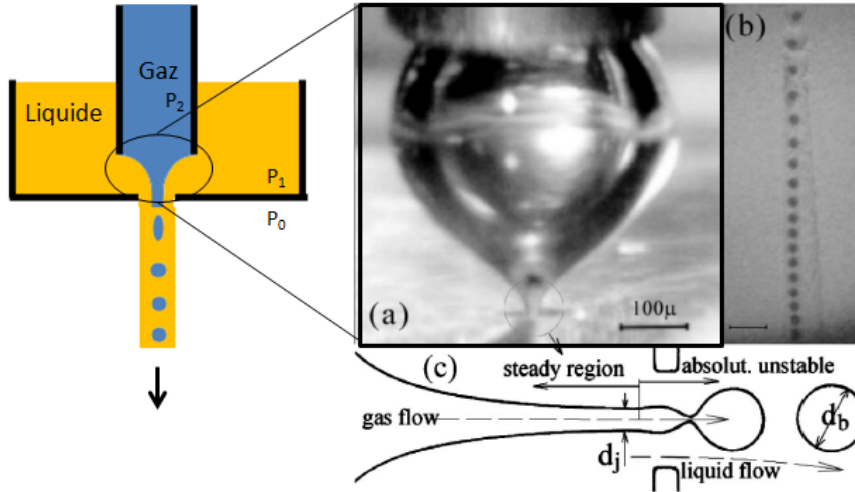


Fig. IV.4 À gauche, schéma du système avec $P_0 < P_1 < P_2$ les pressions des différents compartiments. À droite une figure tirée de l'étude de Alfonso M. Gañán-Calvo et José M. Gordillo contenant une photo de la sortie de la voie de gaz (a), une photo du jet en sortie de trou (b) et un schéma centré sur le trou, ce dernier faisant une centaine de microns (c) [Gañán-Calvo and Gordillo, 2001].

Par la suite, diverses études [Ward et al., 2005], [Stan et al., 2009] ont mesuré l'impact de différents paramètres sur la taille et la fréquence des gouttes tels que la température, la nature des phases utilisées et leur tension interfaciale... Les effets de la température pourraient d'ailleurs être importants à prendre en compte car contrôler la température du système peut s'avérer indispensable dans le cadre d'une étude de phénomènes biologiques tels que la translocation et l'endocytose de peptides vecteurs par exemple. La formation de gouttes de quelques dizaines de microns de diamètre, soit un volume de quelques dizaines de nanolitres, est donc relativement bien comprise et elle présente un avantage certain pour étudier des réactions chimiques ou biologiques. La goutte sert de microréacteur, où la concentration en réactif est parfaitement homogène du fait de la diffusion rapide à cette échelle. Cela permet également de multiplier le nombre de réactions en parallèle. En effet, selon la taille des gouttes produites par le système microfluidique il est possible de travailler dans un compartiment de réaction 10^3 à 10^9 fois plus petit que le plus petit des volumes d'une microplaque (chaque puit contient au minimum 1 à 2 μL). Linas Mazutis *et al.* présentent par exemple un système microfluidique capable de produire une goutte issue de la fusion d'une paire à des fréquences de l'ordre du kHz [Mazutis et al., 2009a]. Deux populations de gouttes sont formées par écoulement focalisé contenant chacune un réactif différent, puis la paire est fusionnée et analysée par détection de fluorescence. Ce système permet d'observer

IV.1. MICROFABRICATION ET DÉVELOPPEMENT DE NOTRE OUTIL

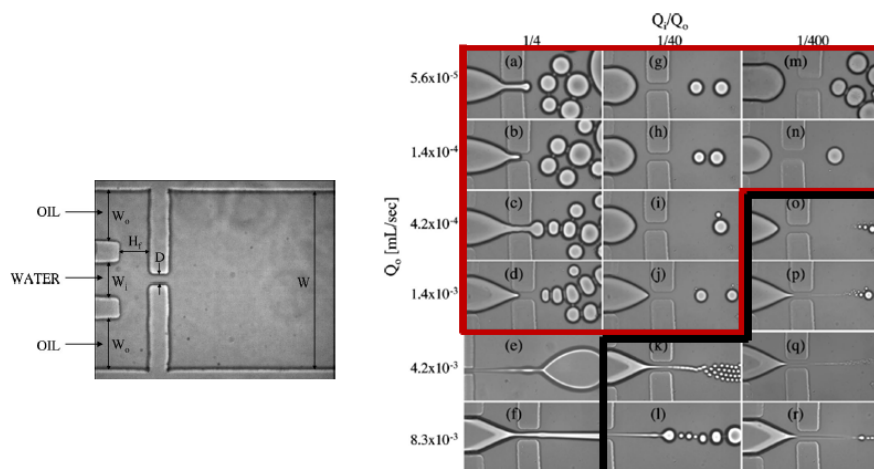


Fig. IV.5 À gauche, schéma du système microfluidique de "flow focusing" de Shelley L. Anna. À droite diagramme des gouttes selon les différentes conditions de flux. Dans le cadre noir les gouttes plus petites que le rétrécissement, en rouge celles plus grosses. Shelley L. Anna et al. 2003 [Anna et al., 2003].

des réactions enzymatiques successives dans des gouttes de 10 et 30 microns de diamètre, à une fréquence de 3000 par seconde [Mazutis et al., 2009b].

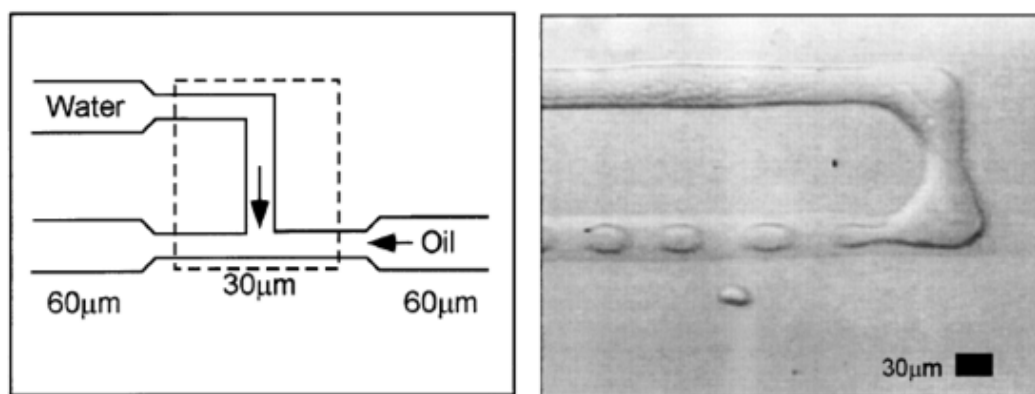


Fig. IV.6 Schéma et photo du système microfluidique de jonction en T [Thorsen et al., 2001].

Une autre difficulté réside dans la manipulation de paires de gouttes stables pour former des bicouches à l'interface de gouttes (BIG). Il est possible et relativement simple, en utilisant des puces microfluidiques, de générer des réseaux de gouttes [Elani et al., 2012], [Stanley et al., 2010]. Il ne s'agit plus d'étudier la goutte comme un microréacteur mais plutôt les interfaces entre les gouttes qui sont des membranes modèles. Utiliser des réseaux de gouttes complique les analyses dans le cadre d'une étude d'interaction protéines-membranes. Chaque contact entre gouttes est une membrane à travers laquelle le CPP peut transloquer. Dès lors chaque paire doit être isolée des autres et la phase aqueuse de chacune des

gouttes doit pouvoir être changée. Certaines études ont été réalisées sur le piégeage systématique de paires de gouttes, aussi bien d'un point de vue théorique [Gopalan et al., 2010], [Xu et al., 2012] que pratique ([Thiam et al., 2011], chapitre 7 de la thèse de Chen Xiaoming [Chen, 2015], [Bai et al., 2010]). L'idée est d'utiliser des voies de garage reliées au circuit principal de la puce. Les gouttes suivront le chemin où la résistance hydrodynamique est la plus faible. Une fois cette voie remplie par une ou plusieurs gouttes, la résistance de la voie augmente (généralement parce que les gouttes obstruent une saignée) puis les gouttes suivantes utiliseront une autre voie, avec une résistance hydrodynamique plus faible, etc. Il suffit en théorie pour une voie de garage contenant zéro ou une goutte, d'avoir une résistance hydrodynamique plus faible que la voie principale, mais qu'elle soit plus élevée lorsque deux gouttes sont dans la voie de garage (figure IV.7).

Pour former les BIG, des lipides sont utilisés : ce sont des tensioactifs qui vont diminuer la tension interfaciale entre les deux phases et rendre les gouttes plus déformables. Elles seront alors susceptibles de quitter les voies de garage en se faufilant par les saignées reliées au circuit principal sous l'effet de la pression de Laplace [Nguyen et al., 2016]. La tension de surface est donc un paramètre majeur pour former des BIG en microfluidique. D'autres études ont prouvé qu'il était possible de former des paires sans utiliser de pièges pour les gouttes [Frenz et al., 2008], [Elani et al., 2016]. Elani *et al.* forment par exemple des paires de gouttes à l'aide d'une double émulsion [Elani et al., 2016]. Dans une phase continue aqueuse, une goutte d'huile contient une paire de gouttes d'eau formant une DIB. Ces paires étant toujours en mouvement, il est plus complexe de les observer.

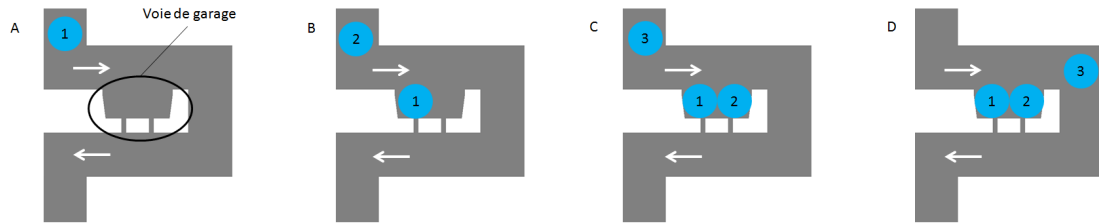


Fig. IV.7 Schéma de principe du piégeage de gouttes par paire. Inspiré de [Nguyen et al., 2016]. Les flèches indiquent le sens de l'écoulement. Les gouttes sont repérées par un numéro. Les événements (A), (B), (C) et (D) sont dans l'ordre chronologique.

IV.2 Mise en place du système

IV.2.1 Détermination de la géométrie de notre système

La géométrie et les dimensions de l'écoulement focalisé que nous avons utilisé ont été déterminées sur la base des données de l'étude de Claudiu A. Stan *et al.* [Stan et al., 2009] et complétées par des simulations réalisées sur le logiciel COMSOL MULTIPHYSICS (figure IV.8). Il s'agit d'un logiciel de simulation numérique basé sur la méthode des éléments finis. Les paramètres de la simulation COMSOL ont été les suivants :

- Flux laminaire de deux phases ("Laminar Two phase flow, level set")
- Dépendance en temps

IV.2. MISE EN PLACE DU SYSTÈME

- Pour la phase dispersée (la phase aqueuse, en rouge) : $\rho = 1000 \text{ kg.m}^3$, $\mu = 0,001 \text{ Pa.s}$, Vitesse du flux à l'entrée = $0,06 \text{ m.s}^{-1}$
- Pour la phase continue (le squalène, en bleu) : $\rho = 860 \text{ kg.m}^3$, $\mu = 0,012 \text{ Pa.s}$, Vitesse du flux à l'entrée = $0,09 \text{ m.s}^{-1}$
- Pour la tension interfaciale nous avons choisi $\gamma = 40 \text{ mN.m}^{-1}$ (tension interfaciale eau-huile).

Le maillage autour de l'axe doit être affiné pour obtenir un tel résultat, cela entraîne un allongement de la durée de calcul et, au regard de la puissance de calcul à notre disposition, rend tout calcul en 3D impossible.

La géométrie retenue finalement présente des canaux de $100 \text{ }\mu\text{m}^2$ de section et une largeur de $50 \text{ }\mu\text{m}$ pour le rétrécissement de l'écoulement focalisé. En accord avec les différentes études, nous avons pu confirmer qu'avec cette géométrie il était possible de former des gouttes (figure IV.8).

Deux stratégies ont été mises en place pour former les paires de gouttes en microfluidique. Former des paires aléatoirement dans une chambre d'observation et piéger les gouttes directement par paire après leur formation dans un réseau de pièges. Les réseaux de pièges ont été choisis d'après diverses sources (communication personnelle de R. Thiam, [Gopalan et al., 2010], [Bai et al., 2010], [Elani et al., 2016], [Nguyen et al., 2016], [Chen, 2015]) et des simulations complémentaires à l'aide du logiciel COMSOL. Cependant nos résultats expérimentaux se sont révélés différents de ces études et de nombreux ajustements ont dû être réalisés pour tenir compte notamment de la tension de surface plus faible des gouttes d'eau couvertes de lipides (*cf.* partie suivante sur la tension de surface).

IV.2.2 Matériel et méthode

a) Préparation des puces microfluidiques

Les puces microfluidiques ont été préparées par "soft lithography". Les moules ont été fabriqués de deux façons différentes : à l'aide d'une imprimante 3D ou par photolithographie. Les premiers tests ont été effectués à l'aide de moules réalisés par une imprimante Form2 (imprimante de type SLA de chez FORMLABS) à partir des fichiers Openscad que l'on peut retrouver en annexe (Annexe C). L'utilisation de la Nanoscribe (imprimante 3D également de type SLA) d'une précision inférieure au micron, est actuellement envisagée pour la préparation des moules. Ce type d'imprimante permettra un rapport d'aspect bien supérieur à celui obtenu avec la photolithographie. On coule ensuite le PDMS fraîchement préparé (*cf.* chapitre III) et dégazé dans le moule puis le tout est placé dans une étuve pendant 1h à 80°C . La puce est ensuite découpée puis collée sur une lame de verre recouverte de PDMS afin d'éviter aux gouttes de mouiller sur le verre. Pour cette étape de collage, les surfaces sont ionisées de PDMS à l'aide d'un plasma d'oxygène pendant une minute en utilisant un nettoyeur à plasma ("Plasma Cleaner"). Des liaisons covalentes se forment entre les différentes pièces de PDMS. Finalement l'ensemble est replacé dans l'étuve à 80°C pendant deux heures. Cela permet de restituer son caractère hydrophobe au PDMS.

Du fait de la limite de résolution des moules par impression 3D (de l'ordre de quelques dizaines de micromètres avant l'utilisation de la Nanoscribe), nous avons choisi par la suite la fabrication des puces microfluidiques par "soft lithography". Nous avons dans un premier temps préparé un masque de verre de taille 3 pouces (CIPEC) recouvert de chrome et présentant une résolution de l'ordre du micromètre. Ceci a été réalisé par Loïc Becerra de

CHAPITRE IV. MICROFLUIDIQUE ET AUTOMATISATION DE LA FORMATION DES BIG

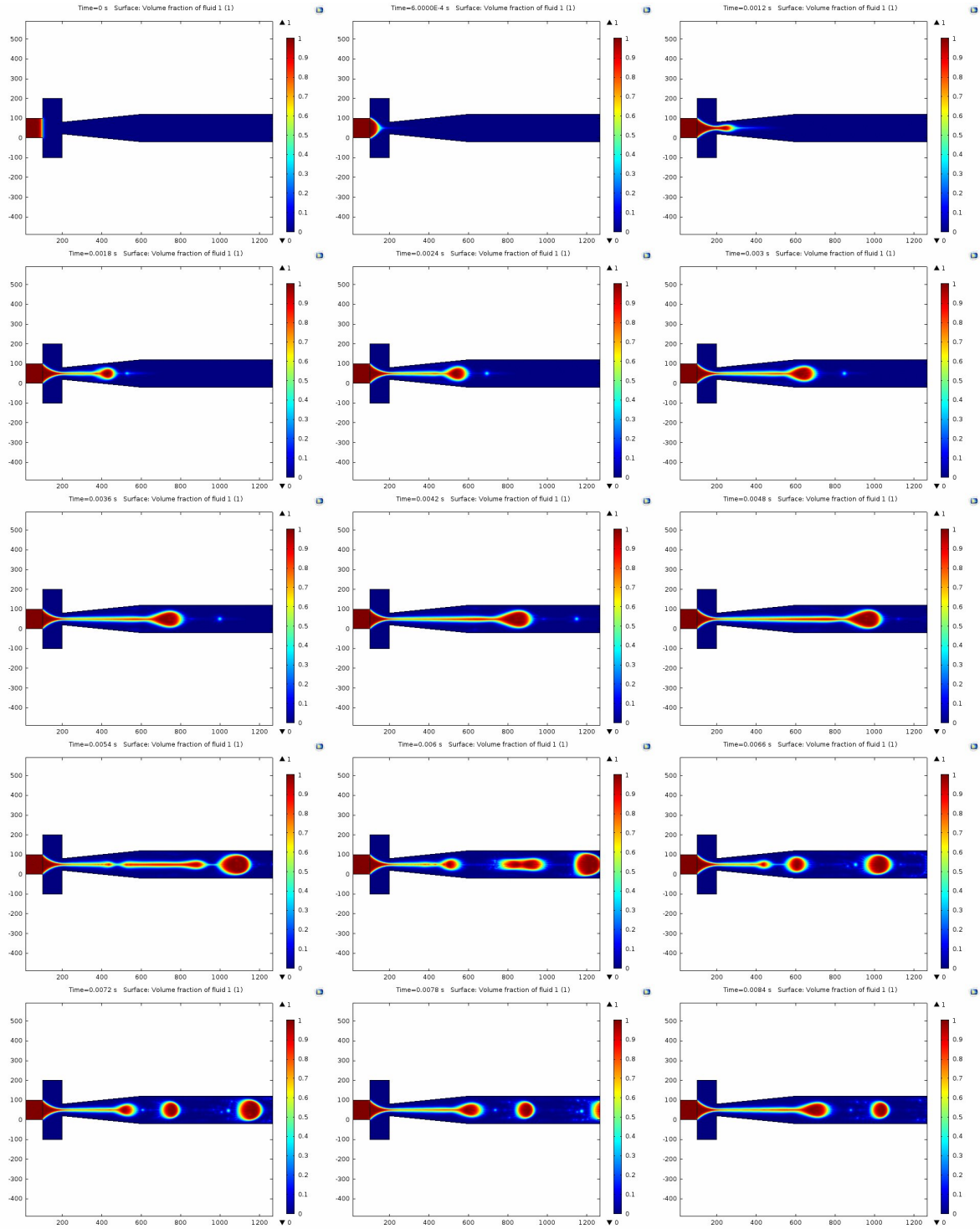


Fig. IV.8 Simulation 2D de l'écoulement focalisé à l'aide du logiciel COMSOL à différents instants. La fraction volumique de l'eau est représentée. Les dimensions sont notées en micromètre en abscisse et en ordonnée.

IV.2. MISE EN PLACE DU SYSTÈME

l'INSP d'après les fichiers CleWin que nous avons dessiné. Le moule est ensuite préparé avec une résine photosensible SU-8 déposée sur un support de taille 5 pouces en silicium. Lorsque la résine est déposée sur le support plusieurs étapes de recuit et d'exposition vont se succéder. Pour une résine SU-8 liquide (MICROCHEM), préparation dite par "spincoating" :

- Un recuit "soft-bake" à 65°C pendant 5 minutes puis à 95°C pendant 10 minutes.
- Une exposition aux UV à l'aide d'une MJB4 au travers du masque chrome-verre. La dose à appliquer va dépendre de la résine, de la puissance de la lampe et de la nature du masque mais elle est comprise entre 200 et 300 $mJ.cm^{-1}$.
- Un recuit "post-bake" à 65°C pendant 5 minutes puis à 95°C pendant 10 minutes.
- Un développement dans un bain de "SU-8 developer" (Propylène glycol monométhyl éther acétate, PGMEA) pendant 10 minutes puis un rinçage à l'isopropanol.
- Un recuit "hard-bake" à 150 - 200°C pendant une dizaine de minutes pour relâcher les contraintes.

Il existe également dans le commerce des galettes de résine SU8, appelé films secs, qu'il suffit de déposer sur un support. Pour un film sec de 100 μm SUEX (DJ DEVCORP), préparation par laminage :

- Le support en silicium est préchauffé deux minutes à 85°C.
- La galette en SU-8 est laminée sur le support à une vitesse de 0,2 $cm.s^{-1}$ et une température de 66°C.
- Une exposition aux UV à l'aide d'un UVKUB 2 au travers du masque chrome-verre. La dose d'énergie à appliquer pour ce type de résine est de 900 $mJ.cm^{-2}$ mais un temps d'exposition plus faible à la lampe à UV (conduisant à une énergie surfacique plus faible) semble donner une meilleure précision pour les motifs de nos puces (diminution de l'ordre de 5 % du temps d'exposition). Avec l'UVKUB il est conseillé d'effectuer une exposition pulsée de la résine (par exemple 6 pulses de 6 secondes induisent une exposition de la résine à 850 $mJ.cm^{-2}$).
- Un recuit à 65°C pendant 5 minutes puis à 95°C pendant 10 minutes.
- Un développement dans un bain de "SU-8 developer" (Propylène glycol monométhyl éther acétate, PGMEA) pendant 30 minutes puis un rinçage à l'isopropanol.
- Un recuit "hard-bake" à 150 - 200°C pendant une dizaine de minutes.

Le moule est ensuite utilisé de la même façon que les moules fabriqués par impression 3D.

b) Préparation des solutions

Les phases aqueuse et huile sont préparées selon le même protocole que la méthode manuelle de fabrication des BIG (partie [III.2.1](#)).

c) Le système Fluigent de contrôle des flux

Les flux des différentes phases dans les puces microfluidiques sont imposés par un contrôleur de pression (FLUIGENT). Le principe est d'imposer une surpression contrôlée (de quelques millibars à 2 bars) dans un réservoir relié à la puce microfluidique ce qui engendre un flux proportionnel à cette surpression (de quelques $pL.min^{-1}$ à quelques $\mu L.min^{-1}$). La connexion entre le réservoir et la puce est assurée par des tubes en téflon de diamètre intérieur égal à 250 μm pour la phase aqueuse et 500 μm pour la phase huile et longs d'une quinzaine de centimètres. Les surpressions utilisées sont comprises entre 5 et 60 mbars pour les voies de la phase aqueuse, 20 à 150 mbars pour les voies de la phase squalène et contrôlées à l'aide

du logiciel MAESFLO. Les surpressions de chaque voie doivent être ajustées pour chaque nouvelle puce de façon à obtenir un écoulement convenable, généralement avec une surpression de la voie squalène légèrement supérieure à la surpression de la voie phase aqueuse. Les puces sont au préalable remplies de phase continue (le squalène contenant les lipides) puis les tubes de la phase aqueuse sont connectés en prenant soin d'avoir une goutte perlant à l'extrémité afin d'éviter toute bulle d'air dans la puce.

IV.3 Résultats

IV.3.1 Formation des BIG à l'aide de différentes puces microfluidiques

Huit masques différents chrome-verre de taille 3 pouces (7,62 cm) ont été fabriqués au cours de cette thèse. Huit types différents de moule contenant chacun une dizaine de motifs de puce ont donc été produits. Comme présenté précédemment, la production des gouttes s'est faite par des jonctions en T ou des écoulements focalisés (figure IV.9). L'écoulement focalisé étant plus stable aux pressions que nous avons utilisées, nous avons finalement abandonné les jonctions en T pour la production de gouttes.

Dans un premier temps l'objectif a été de former les paires au hasard dans une "grande" chambre (10 mm × 5 mm) sans piège. La réunion des deux populations de gouttes pouvait se faire avant (Schéma A et B de la figure IV.10) ou directement dans la chambre (Schéma C). La formation des gouttes par les co-écoulements confinés n'est pas instantanément stable. Les premières gouttes sont de tailles très variables et il faut parfois plusieurs minutes avant d'obtenir une production stable et régulière. Nous avons donc ajouté une voie de purge sur les puces qui nous permet d'évacuer ces premières gouttes indésirables (Schéma B de la figure IV.10). L'envoi des gouttes vers la chambre se fait alors en bouchant la voie de purge (par un tube en téflon de 100 μm de diamètre interne par exemple), mais cela perturbe parfois la formation des gouttes car cela change la résistance hydrodynamique en sortie et donc les pressions au niveau de l'écoulement focalisé.

Nous avons pu vérifier qu'il est possible d'observer des paires mixtes pendant au moins une heure à l'aide de puces microfluidiques. Ces observations en condition contrôle (100 % POPG dans la phase squalène et sonde fluorescente FP488 dans une des phases aqueuses) ont confirmé les résultats déjà obtenus par la méthode manuelle, à savoir que la sonde fluorescente seule ne pouvait passer au travers de la bicouche. Cependant, nous souhaitons utiliser la microfluidique pour gagner en contrôle sur la formation des paires également. Par la suite nous avons donc essayé de capturer les gouttes formées par l'écoulement focalisé par paire dans des réseaux de pièges.

Les réseaux de pièges testés ont été nombreux, ils sont présentés dans la suite de ce chapitre et sont de plusieurs types. Les premiers que nous avons testés sont de type "aller-retour". Il s'agit en effet de piéger une première population de goutte dans des pièges simples, où il n'y a de la place que pour une goutte. Le flux est alors inversé, la goutte piégée est déplacée vers un piège double (plus grand) qui va également pouvoir accueillir la seconde goutte issue de l'autre population. Ce second piège doit non seulement être plus grand mais également contenir des saignées pour permettre au flux de passer dans le piège et y attirer la deuxième goutte alors même que la première est déjà en place. Nous avons pu tester une puce basée sur l'étude de Preethi Gopalan *et al.* (figure IV.11 (A) [Gopalan et al., 2010], son principe est détaillé et complété par des simulations COMSOL 2D que nous avons réalisées

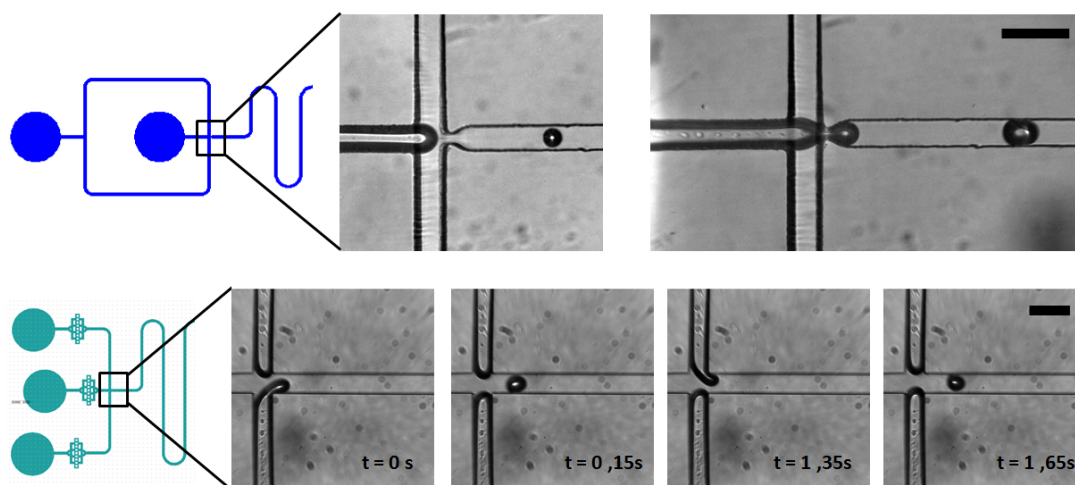


Fig. IV.9 Schémas (CLÉWIN) et photos des co-écoulements confinés (première ligne) et des jonctions en T (deuxième ligne). Les phases aqueuses apparaissent plus contrastées. Les disques sont les voies d'entrées des différentes phases. Pour les co-écoulements confinés les surpressions sont de 11 mbars pour la phase aqueuse et 20 mbars pour la phase squalène pour la première photo, 60 mbars pour la phase aqueuse et 90 mbars pour la phase squalène pour la seconde photo. Pour la jonction en T les surpressions sont de 48 mbars et 31 pour les phases aqueuses et 44 mbars pour la phase squalène. Les barres d'échelle représentent $200\text{ }\mu\text{m}$.

pour déterminer la géométrie des pièges) ou inspirée de l'étude de Bai *et al.* (figure IV.11 B et C [Bai *et al.*, 2010]). Le fonctionnement de la puce de type "Gopalan" est expliqué en détail dans la figure IV.12. Cependant l'inversion du flux pose problème pour les co-écoulements confinés. Ils doivent générer des gouttes en continu, à rythme régulier, or ils exercent une pression l'un sur l'autre car ils sont reliés au même réseau ce qui rend la production de gouttes instable.

Nous avons alors opté pour une séparation de la production et du piégeage des gouttes. Les gouttes sont produites sur une puce séparée qui est connectée par l'intermédiaire d'un tube en téflon au réseau de pièges (figure IV.13). Cette configuration, qui s'appuie sur l'étude de Bai *et al.* [Bai *et al.*, 2010], semblait prometteuse (*cf* les photos de la figure IV.13) mais lors de la récupération des gouttes, ces dernières s'agrègent, se collent ou fusionnent au moment d'être transférées et se fractionnent à nouveau lorsqu'elles arrivent dans le réseau de pièges. Nous n'avons donc pas réussi à utiliser les puces de type "aller-retour" pour former des BIG mixtes en microfluidique. Dans l'étude de Bai *et al.* ce ne sont pas des lipides mais des polymères en brosse qui sont utilisés. Il semble que les lipides changent fortement la stabilité des gouttes dans la puce et rendent ce système inefficace pour former des BIG.

Les changements de flux n'étant pas compatibles avec la manipulation de nos gouttes, un second type de puce a donc été essayé. Les pièges sont dans le sens du flux, et les deux populations de gouttes sont regroupées avant d'atteindre le réseau. Ces puces présentent des motifs issus de différentes articles ([Thiam *et al.*, 2012] figure IV.14, [Chen, 2015] figure IV.15) ou dessinées par nos soins (figure IV.16). Pour ces puces, les résultats sont décevants.

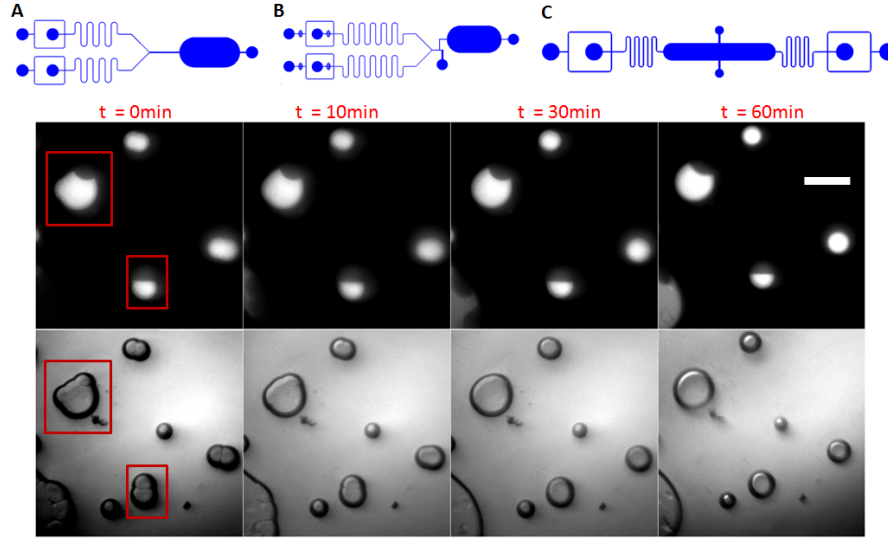


Fig. IV.10 Schémas (CLÉWIN) des premières puces microfluidiques testées. Les photos en fluorescence (première ligne) et en lumière blanche (deuxième ligne) viennent confirmer la possibilité d'observer des BIG dans le cadre de notre étude. Le fluorophore utilisé est FP488 (Interchim). La barre d'échelle représente $200 \mu m$.

L'air est difficilement chassé du réseau de pièges, les gouttes ne restent pas dans les pièges, fusionnent, ou forment des multiplets et aucune paire mixte n'a pu être formée de manière contrôlée.

Les résultats les plus prometteurs ont pu être obtenus avec une puce inspirée de l'étude de Nguyen *et al.* [Nguyen *et al.*, 2016]. Dans cette étude, les auteurs s'intéressent au piégeage par paire (ou multiplet) de gouttes recouvertes de lipides DPhPC (1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) issus d'une seule population. Une étude théorique des résistances hydrodynamiques nécessaires pour dimensionner les pièges a également été menée. Le piège doit présenter une résistance suffisamment faible pour attirer le flux mais suffisamment élevée pour qu'une fois les gouttes prises au piège, elles ne le quittent pas sous l'effet de la pression de Laplace. La géométrie des canaux et des pièges est calculée selon ces deux contraintes. On doit avoir :

- $R_{\text{piège}} = \frac{a \times \eta \times L}{h \times w^3} < R_{\text{voie de contournement}} = \frac{a \times \eta \times L}{h^4}$, avec μ la viscosité du fluide, et L , h , w respectivement la longueur, la hauteur et la largeur des canaux. a est un paramètre adimensionné dépendant de w et h , $a = 12 \times (1 - \frac{192 \times w}{\pi^5 \times h} \times \tanh(\frac{\pi \times h}{2 \times w}))$ pour un canal de section rectangulaire.
- La pression de part et d'autre du piège telle que $\Delta P < P_{\text{Laplace}} = 2 \times \gamma \times (\frac{1}{w_b} - \frac{1}{r_d})$, avec w_b et r_d les largeurs de la saignée et le rayon de la goutte et γ la tension de surface entre les deux phases. Où P_{Laplace} est la pression suffisante à partir de laquelle la goutte s'échappe par la saignée (figure IV.17).

Nous avons reproduit cette puce avec des canaux principaux de $100 \mu m$ de large. La largeur du canal est augmentée à $120 \mu m$ dans le réseau de pièges pour éviter la surpression engendrée lorsque, le piège étant complet, une nouvelle goutte arrive par la voie principale. Enfin la géométrie du piège est présentée à la figure IV.18, brièvement il s'agit d'un décroche-

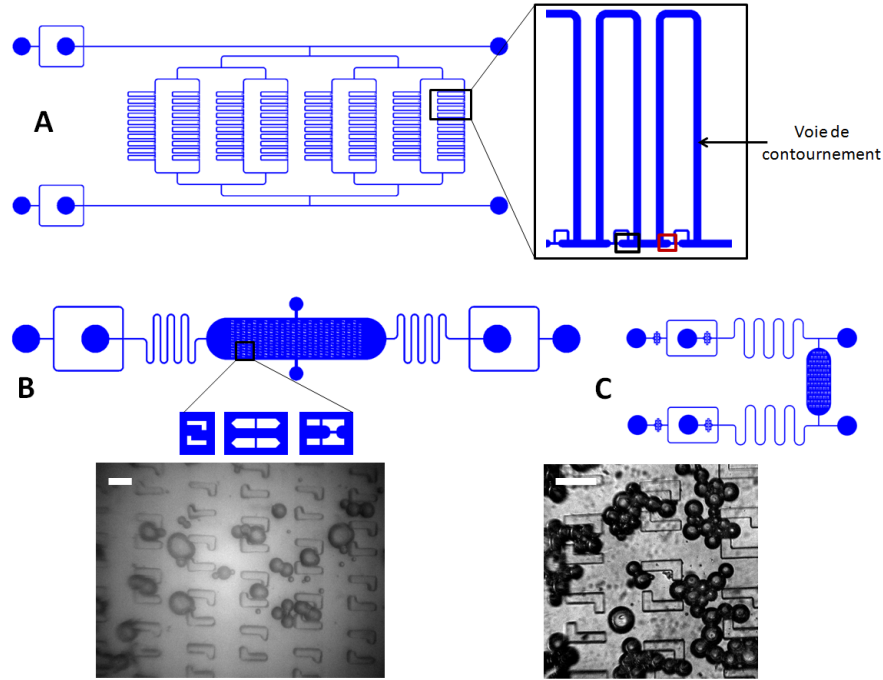


Fig. IV.11 (A) Schéma de la puce de type "Gopalan". Dans le cadre rouge le piège simple "aller", dans le cadre noir le piège double retour. (B) Schémas et photos de puces de type "aller-retour" avec une grande chambre contenant une centaine de pièges. Les barres d'échelle représentent $200\ \mu\text{m}$.

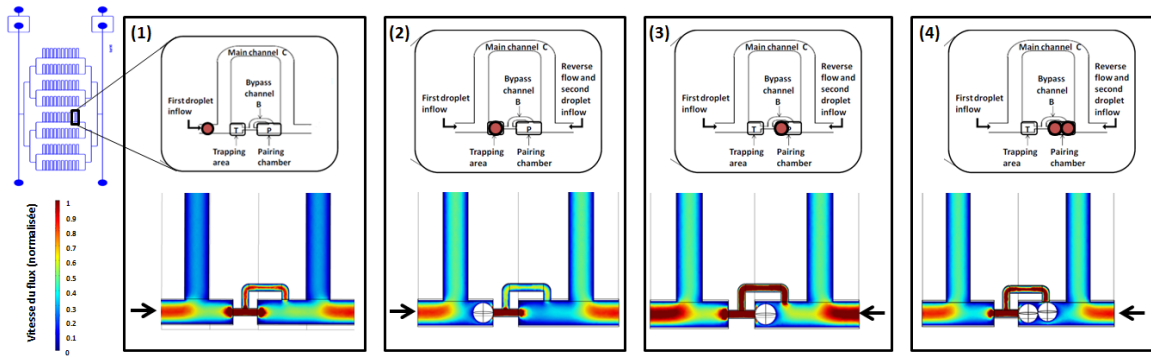


Fig. IV.12 Fonctionnement théorique pour le piégeage de paire de gouttes avec la puce de type "Gopalan". Le sens du flux est indiqué par une flèche. (1) Une première goutte arrive et se place dans dans un piège simple. (2) Une fois le piège simple complet, la goutte suivante suit la voie de contournement. (3) Lorsque tous les pièges simples sont complets le flux est inversé et une première goutte se place dans le piège double. Le flux entraîne la goutte suivante dans le piège double. (4) Lorsque le piège double est complet, la goutte suivante est entraînée par le flux dans la déviation. Les simulations COMSOL que nous avons pu réaliser (deuxième ligne) confirment ces différentes étapes [Gopalan et al., 2010].

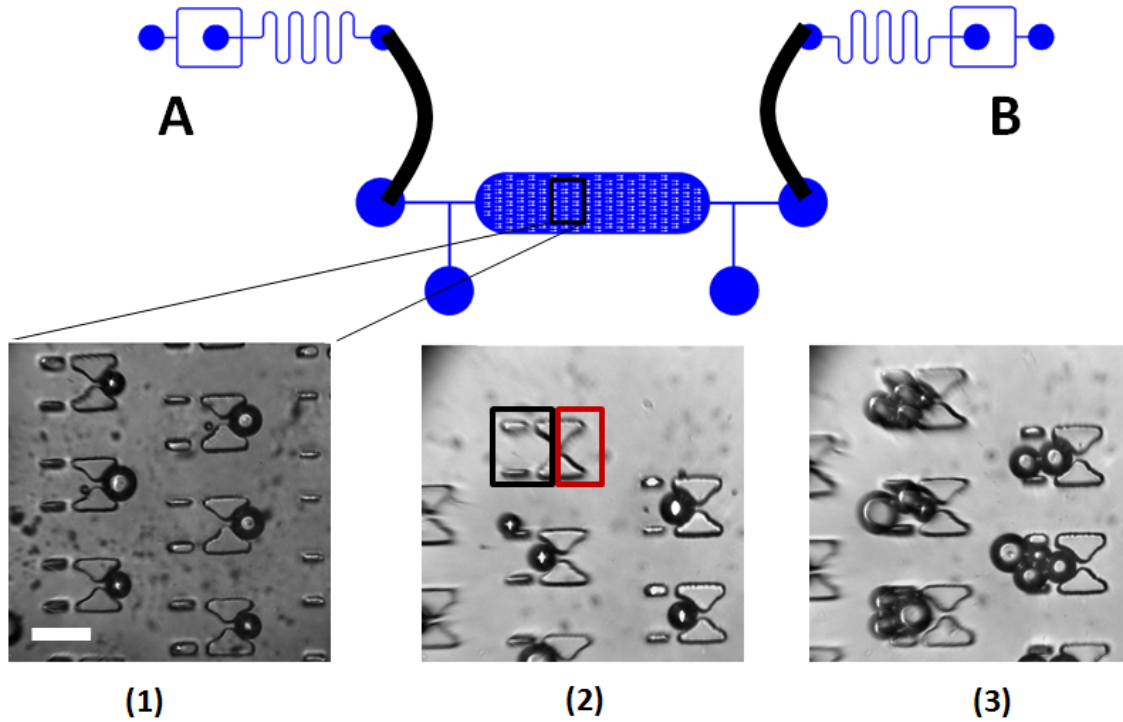


Fig. IV.13 Puce de type "Bai", le tube reliant la puce de production des gouttes au réseau de pièges est représenté en noir. Dans le cadre rouge le piège simple "aller", dans le cadre noir le piège double retour. La photo (1) correspond à la 1^{re} étape avec le co-écoulement (B) connecté et une goutte dans chaque piège aller. La photo (2) est prise juste après l'inversion de flux avec le co-écoulement (A) connecté à la chambre. La photo (3) correspond à la dernière étape lorsque la seconde population de goutte issue de (B) arrive dans les pièges. Les barres d'échelle représentent 200 μm .

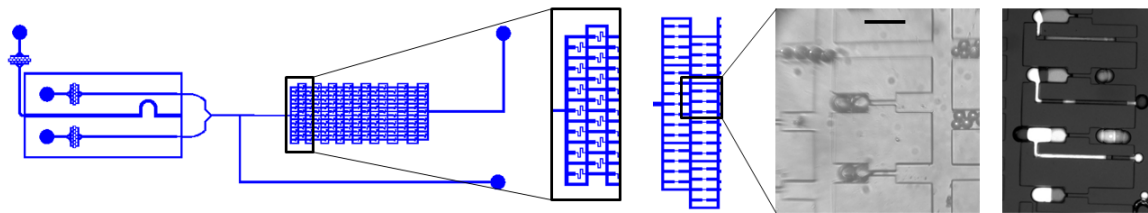


Fig. IV.14 Puce de type "Thiam". Le réseau contient plus d'une centaine de pièges. Sur les photos, les gouttes visibles en fluorescence (FP488), s'échappent des pièges par les saignées. La barre d'échelle représente 200 μm . Ce réseau de pièges nous a permis de former des multiplets mais rarement des paires mixtes. Du fait du grand nombre de pièges, le débit est faible dans le réseau ce qui entraîne une agrégation des gouttes. De plus de nombreuses bulles d'air se retrouvent bloquées dans la puce.

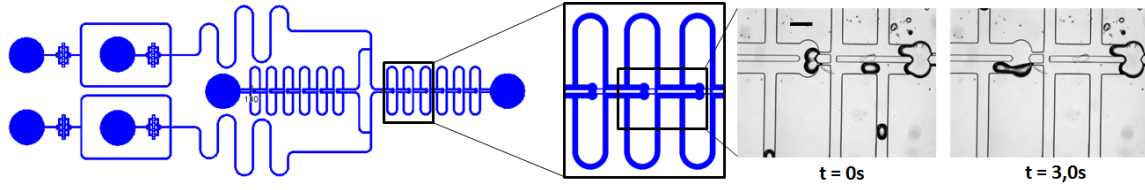


Fig. IV.15 Puce de type "Chen" [Chen, 2015]. Les réseaux de pièges sont doublés, la voie de purge présente ainsi une résistance hydrodynamique semblable à la voie de piège et le passage de l'une à l'autre se fait sans modification de pression pour le co-écoulement. Sur les photos on peut voir une BIG en place ($t = 0s$) chassée sous la pression ($t = 3s$). La barre d'échelle représente $200 \mu m$. Ce réseau a été initialement dessiné pour des gouttes d'eau dans l'huile. L'ajout de lipides change totalement les conditions et malgré nos ajustements (voie de détour raccourcie, pièges plus étroits, élargissement du canal principal) les gouttes sont très sensibles au flux de la voie principale et ne se sont jamais bloquées dans les pièges.

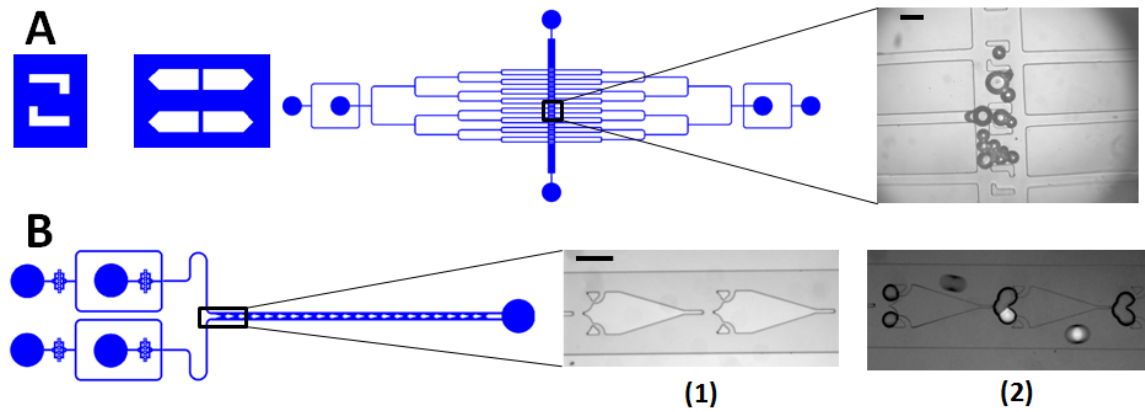


Fig. IV.16 Puces développées par nos soins. (A) Les gouttes de chacune des deux populations arrivent de part et d'autre d'un axe central contenant des pièges pour les bloquer. L'écoulement se fait vers le haut et le bas de cet axe central. Les gouttes ne se s'arrêtent que temporairement dans les pièges, dès lors il n'a pas été possible de former des paires. (B) Les pièges sont deux coupes côte à côte faisant face au flux pour cisailler la phase aqueuse et retenir les gouttes. Deux gouttes sont prises au piège mais trop éloignées pour former une BIG, deux triplets sont également observables. Les barres d'échelle représentent $200 \mu m$. Cette puce a été dessinée pour s'affranchir de la voie de purge. Il est très facile, en augmentant fortement la pression de la voie d'huile, de vider tous les pièges pour recommencer le piégeage par paire. Les deux zones de pièges semblent trop éloignées l'une de l'autre mais avec un peu de développement cette puce pourrait donner des résultats positifs.

ment rectangulaire dans la voie principale de $240 \mu m$ de largeur sur $160 \mu m$ de profondeur comportant deux saignées. Différentes largeurs de saignées ont été essayées (15, 20 et 25 microns). C'est avec cette puce que nous avons à ce jour les résultats les plus prometteurs (figure IV.18).

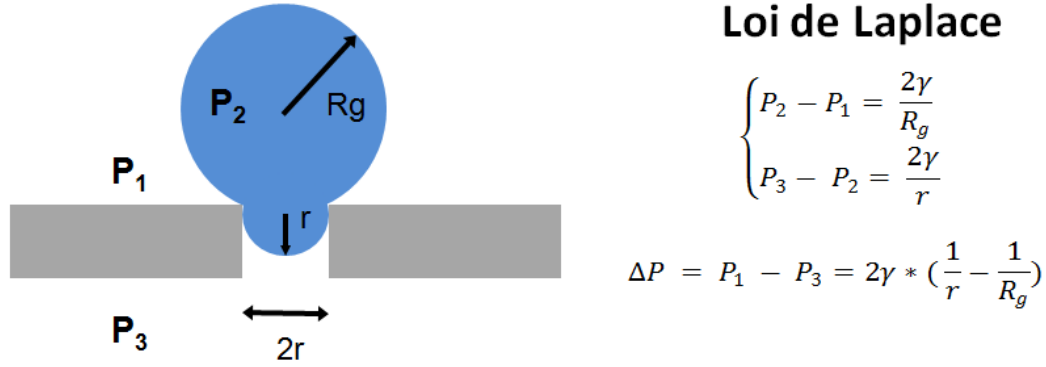


Fig. IV.17 Schéma de principe d'une goutte de rayon R_g sous pression passant dans un canal de largeur $2r$. La loi de Laplace est rappelée à droite.

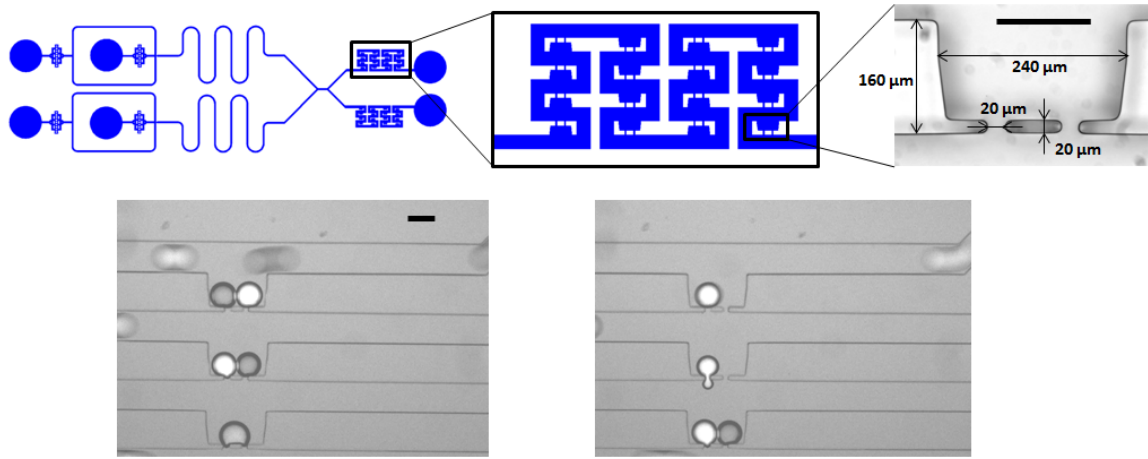


Fig. IV.18 Puce de type "Nguyen" ou "pièges en série". Zoom sur le réseau et sur un piège. Sur les photos, des paires mixtes se forment mais les gouttes s'échappent des pièges par les saignées. Les barres d'échelle représentent $100 \mu m$.

Cependant nous ne parvenons pas encore à conserver les paires durant les trentes minutes nécessaires à notre étude, les gouttes finissent par sortir du piège. La largeur maximum des saignées pour que le piège fonctionne dépend fortement de la tension de surface entre la phase squalène et la phase aqueuse, or si elle est de 40 mN.m^{-1} pour des phases pures, la présence de lipides abaisse considérablement cette valeur. Cela impose de rétrécir les saignées et d'allonger les voies de contournement des pièges (*cf.* les formules présentées plus haut). Si la deuxième condition ne pose pas de problème, la résolution de la première est limitée par la technique de lithographie. Les calculs imposent en effet des saignées inférieures à 10 microns pour une tension interfaciale de 5 mN.m^{-1} , sachant que les pressions imposées dans la puce sont de quelques millibars à quelques dizaines de millibars. On atteint ici un rapport d'aspect de 10 (hauteur des canaux : $100 \mu m$) ce qui est difficilement réalisable avec la technique de lithographie que nous utilisons. C'est pour pallier cette difficulté que nous

avons envisagé d'utiliser une imprimante 3D Nanoscribe. Sa résolution est bien supérieure puisqu'elle est théoriquement capable de produire un voxel (équivalent 3D du pixel) de $150\text{ nm} \times 150\text{ nm} \times 1000\text{ nm}$.

Nous avons alors cherché à déterminer précisément la tension interfaciale entre la goutte d'eau et la phase squalène pour dessiner une puce avec les motifs adéquats.

IV.3.2 Étude de la tension interfaciale entre la phase aqueuse et la phase huile

Il existe plusieurs méthodes pour mesurer une tension de surface. Andreas, Hauser et Tucher proposent dans leur étude [ANDREAS et al., 1937] de laisser tomber une goutte d'un fluide dans un autre et de mesurer les diamètres D_e et D_s de la goutte à deux positions différentes au moment où elle se décroche pour chuter (figure IV.19). Andreas *et al.* ont vérifié empiriquement la relation :

$$\gamma = (\rho_1 - \rho_2) \times \frac{g \times D_e^2}{4 \times \beta}, \text{ où } \beta = 0,13 - 0,76 \times \alpha + 1,77 \times \alpha^2 - 0,54 \times \alpha^3 \text{ avec } \alpha = \frac{D_s}{D_e}.$$

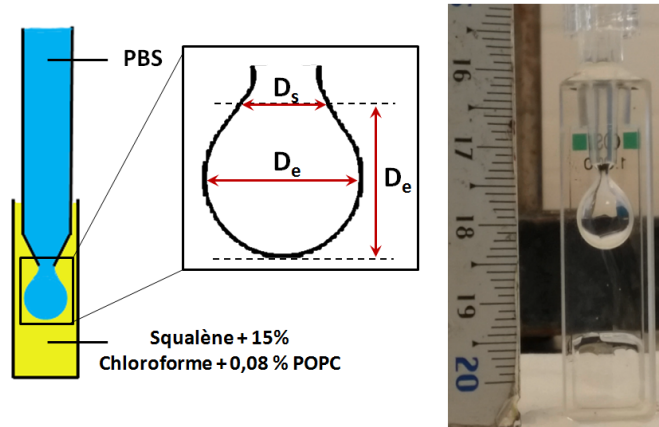


Fig. IV.19 Schéma et photo de l'expérience de la goutte pendante. Les longueurs mesurées au moment du décrochement de la goutte sont rappelées.

Nous avons donc placé l'embout d'une burette contenant du PBS dans une cuve transparente remplie de phase organique (squalène mélangé ou non avec des lipides). Le robinet de la burette est très légèrement ouvert pour former des gouttes de quelques centaines de microlitres qui vont se décrocher en quelques secondes. On trouve alors comme tension interfaciale :

- PBS/Squalène : $\gamma = 40\text{ mN.m}^{-1}$ avec $\rho_1 = 1000\text{ kg.m}^{-3}$, $\rho_2 = 858\text{ kg.m}^{-3}$, $D_e = 5,87\text{ mm}$ et $D_s = 4,18\text{ mm}$
- PBS/Squalène + Lipides : $\gamma = 12\text{ mN.m}^{-1}$ avec $\rho_1 = 1000\text{ kg.m}^{-3}$, $\rho_2 = 980\text{ kg.m}^{-3}$, $D_e = 7,46\text{ mm}$ et $D_s = 4,73\text{ mm}$

Cette méthode donne donc un premier ordre de grandeur mais comporte un grand nombre d'imprécisions. Nous ne sommes pas sûrs premièrement que les quelques secondes nécessaires à la goutte pour se décrocher suffisent à ce qu'elle soit décorée entièrement en lipides. Deuxièmement la masse volumique de la phase squalène peut varier fortement à cause du chloroforme très volatil qui représente plus de 15 % en volume. Nous avons donc mesuré cette tension interfaciale à l'aide d'un appareil de mesure de tension de surface ("Drop Shape

Analyzer", DSA100) basé sur ce même principe de goutte pendante. Nous pouvons former et observer des gouttes d'un microlitre sur lesquelles il est possible d'effectuer un suivi temporel de la tension interfaciale.

La valeur initiale est bien autour de 10 mN.m^{-1} mais elle diminue au cours du temps, sans doute parce que les lipides mettent un certain temps à décorer l'interface eau-huile (figure IV.20). La tension interfaciale est au final inférieure à 1 mN.m^{-1} .

Cependant, une fois encore cette mesure nécessite de connaître la masse volumique de chacune des phases. Une autre méthode pour mesurer la tension interfaciale et s'affranchir de la mesure de la masse volumique consiste à utiliser la loi de Laplace que nous avons déjà discutée. Une goutte qui se déforme sous l'effet d'une certaine pression pour passer à travers une saignée le fera de façon proportionnelle à la tension de surface (*cf* le schéma figure IV.17).

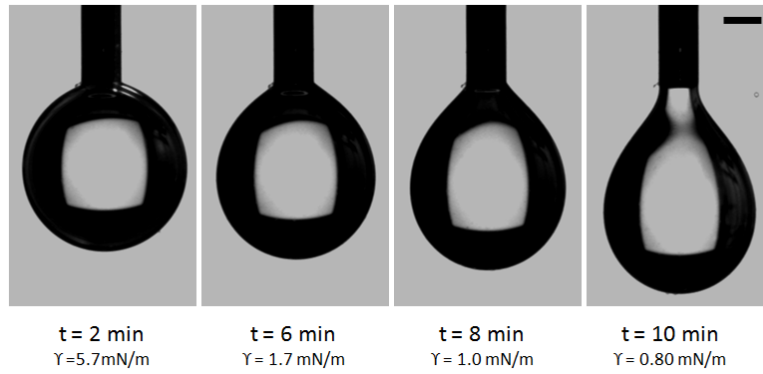


Fig. IV.20 Évolution de la forme et de la tension interfaciale de la goutte au cours du temps lorsqu'elle se décore en lipide. Elle s'allonge de plus en plus au cours du temps. La barre d'échelle représente $500 \mu\text{m}$.

Nous avons utilisé le système de contrôle de pression du montage BFP-Électrophysiologie pour aspirer une goutte couverte de lipides au bout d'une pipette. Avec ce système nous contrôlons l'aspiration en bout de pipette avec la position du réservoir. L'aspiration est convertie en pression d'aspiration sachant que descendre le réservoir d'un millimètre correspond à une dépression de 10 Pa en bout de pipette. Connaissant le diamètre de la pipette et celui de la goutte nous sommes alors capables de déterminer la tension de surface. Une des difficultés a été de s'assurer que le mouillage des lipides ne perturbe pas la mesure. Pour cela nous avons traité l'intérieur et l'extérieur des pipettes au silane (*cf* protocole sur le traitement des pipettes III.2.3). Le résultat de ce traitement est visible sur la figure IV.21.

La mesure a pu être faite sur cinq gouttes en présence de lipides POPS. La valeur de la tension interfaciale mesurée vaut :

$$\gamma = 0,71 \pm 0,12 \text{ mN.m}^{-1}$$

Finalement nous avons également mesuré la tension de surface pour nos gouttes directement à l'aide d'une puce microfluidique. Là encore il s'agit d'utiliser la loi de Laplace. Six pièges ne pouvant contenir qu'une seule goutte avec des saignées de plus en plus étroites sont

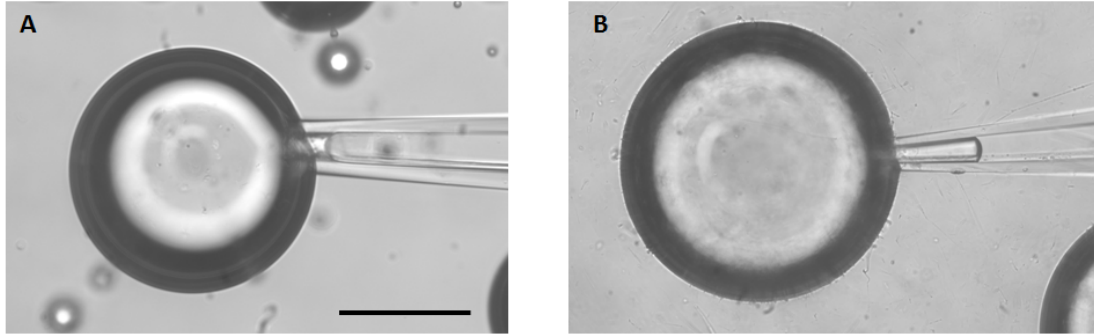


Fig. IV.21 Mouillage de la phase aqueuse couverte à son interface avec la phase squalène par des lipides avec (B) et sans (A) traitement au silane. L'inversion du ménisque est observable. La barre d'échelle représente $100\ \mu\text{m}$.

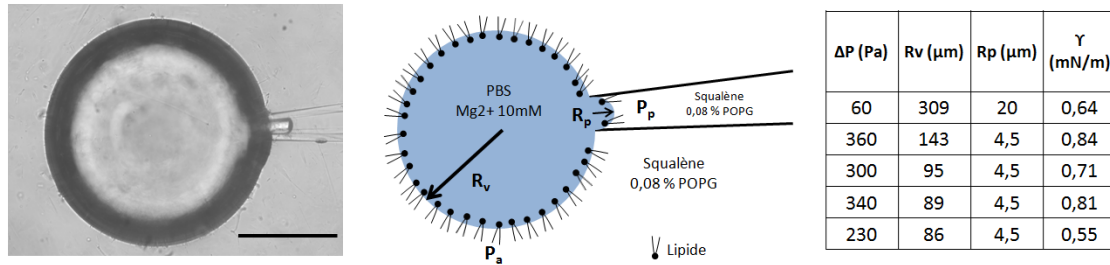


Fig. IV.22 Photo et schéma de la mesure de la tension interfaciale γ , d'une goutte couverte de lipide POPS. Le tableau de droite rappelle l'ensemble des mesures effectuées. La barre d'échelle représente $100\ \mu\text{m}$.

disposés à la suite d'un écoulement focalisé (figure IV.23). Il s'agit de déterminer à partir de quelle largeur de saignée la goutte s'échappe du piège.

La suppression des flux est imposée par le contrôleur FLUIGENT elle diminue tout au long de la puce. Pour déterminer le différentiel de pression ΔP avant et après le piège, il suffit de mesurer le flux au niveau des pièges (à l'aide d'une poussière ou d'une goutte n'allant pas dans les pièges). Nous avons alors : $\Delta P = Q \times R$, où Q est le flux ($1,5 \cdot 10^{-11}\ \text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) et R la résistance hydrodynamique de la puce entre les deux points où sont mesurées les pressions ($6 \cdot 10^{13}\ \text{Pa} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-3}$). Dans le cadre de notre puce nous calculons $\Delta P = 10^2\ \text{Pa}$ et donc $3\ \text{mN} \cdot \text{m}^{-1} < \gamma < 6\ \text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$, puisque la goutte dans le piège avec $12\ \mu\text{m}$ de saignée est bloquée (photo (A) de la figure IV.24) alors que celle dans le piège à $18\ \mu\text{m}$ finit par sortir (photo (B)).

Avec ces différentes valeurs de tension nous sommes en mesure de calculer les suppressions à ne pas dépasser selon la largeur des saignées afin d'éviter qu'une goutte ne s'échappe de son piège. Ces valeurs sont rappelées dans le graphique suivant.

En conclusion, nous avons rencontré quelques difficultés à reproduire les résultats de piégeage de gouttes que nous avons trouvés dans la littérature. Cela peut s'expliquer parce que nous nous plaçons dans des conditions légèrement différentes des études en question : avec des lipides en phase continu et des gouttes d'une centaine de microns de diamètre

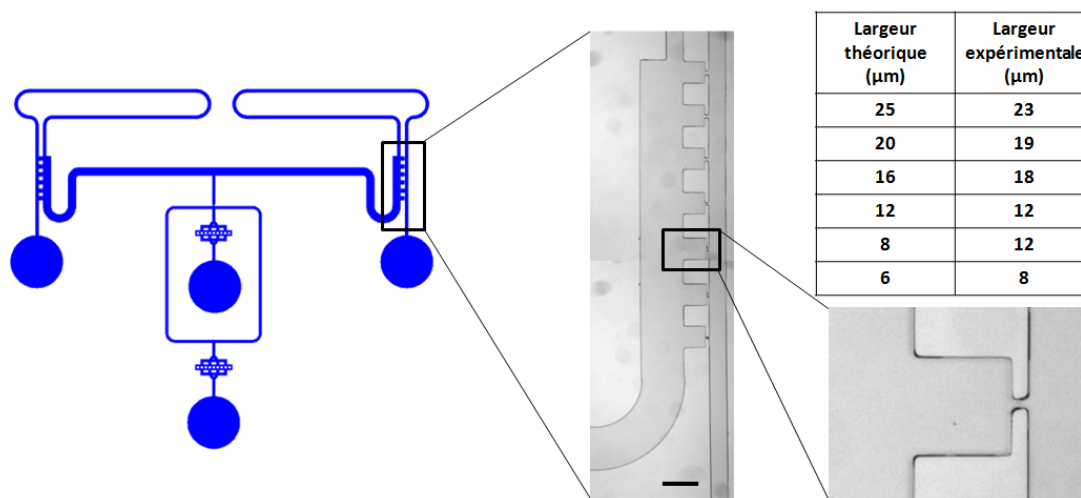


Fig. IV.23 Schéma de la puce de mesure de la tension de surface. Zoom sur le réseau et sur un piège. Le tableau résume la valeur théorique des saignées (celle sur le masque chrome verre) et celle effectivement mesurées sur la puce microfluidique. Cette différence est due à la lithographie lors de la fabrication du moule. La barre d'échelle représente 200 μm.

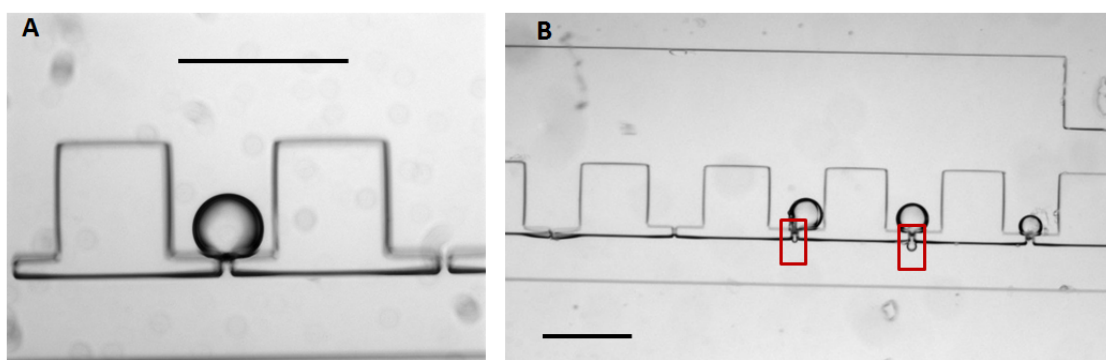


Fig. IV.24 Puce permettant de mesurer la tension de surface. (A) Une goutte bloquée dans un piège de 12 μm de saignée, la goutte ne s'échappe pas. (B) Trois gouttes dans des pièges de 25, 20 et 16 μm de saignée (de la droite vers la gauche). Les gouttes s'échappent par les saignées. Les barres d'échelle représentent 200 μm.

avec lesquelles nous souhaitons former des paires mixtes. Cependant en multipliant les essais nous nous sommes rapprochés de l'objectif de former des BIG en utilisant la microfluidique. En utilisant la dernière puce présentée et en dimensionnant les saignées en accord avec les résultats de tension interfaciale de nos gouttes (figure IV.25) il devrait être possible de former des paires mixtes avec des puces microfluidiques pour observer la translocation de CPP. Pour cela nous envisageons d'utiliser l'impression 3D et la Nanoscribe à laquelle nous avons maintenant accès et qui nous permettra de microfabriquer nos puces avec plus de précision. Ce travail se poursuivra dans le cadre de la thèse de Pauline Gehan au Laboratoire des BioMolécules.

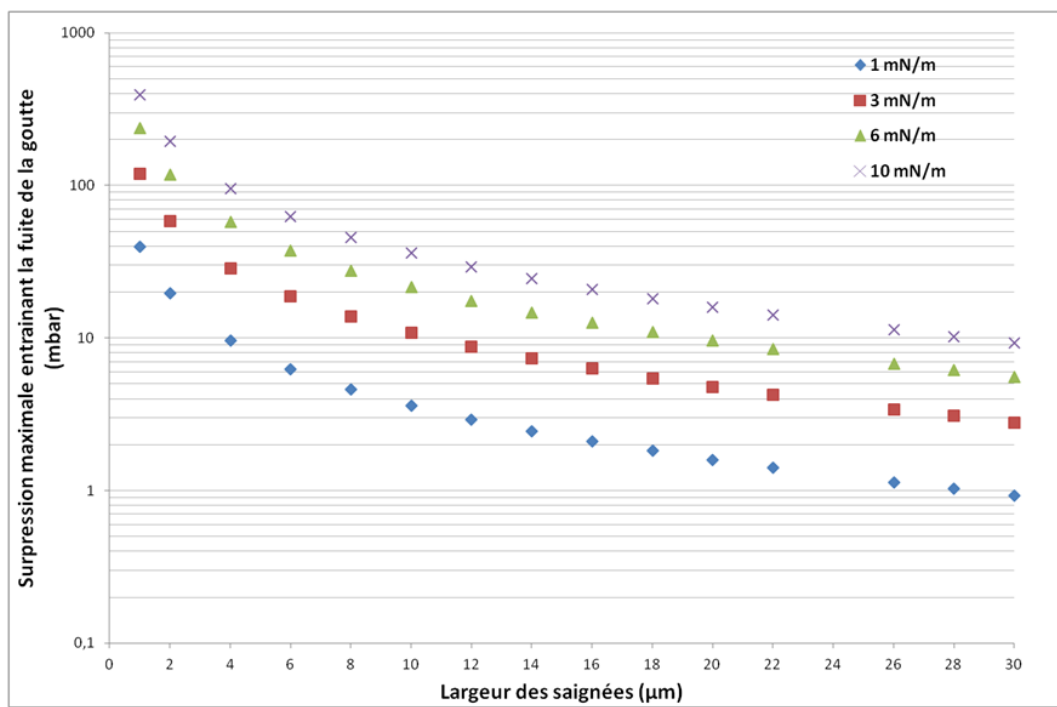


Fig. IV.25 Graphique représentant la surpression maximale autorisée de part et d'autre d'un piège avant qu'une goutte ne puisse s'échapper par la saignée. Quatre tensions interfaciales différentes sont prises en compte : 1, 3, 6 et 10 $mN.m^{-1}$.

*CHAPITRE IV. MICROFLUIDIQUE ET AUTOMATISATION DE LA FORMATION
DES BIG*

Conclusion

Au cours de cette thèse nous nous sommes attachés à décrire les différentes étapes de la translocation, un des mécanismes d'internalisation des CPP. Cette traversée directe de la membrane cellulaire est encore mal comprise et nous avons essayé de déterminer le rôle des différents acteurs impliqués dans les étapes d'adhésion, d'insertion et de traversée de la membrane. Les CPP sont des protéines de quelques dizaines de résidus et les acides aminés arginine et tryptophane confèrent à ces peptides un caractère cationique et hydrophobe, essentiel à la traversée de la bicouche lipidique. Nous nous sommes focalisés sur la Pénétratine, un CPP composé de 16 résidus, dont 7 chargés positivement (les acides aminés lysine et arginine).

Pour étudier la translocation nous avons mis en place une expérience couplant des mesures de force et des mesures électriques. Les mesures de force entre un CPP et ses partenaires membranaires ont pu être effectuées à l'aide du Biomembrane Force Probe. Une première partie du travail de cette thèse a donc consisté à fabriquer le BFP et à s'assurer que la stabilité du système permet de mesurer des forces aussi faibles qu'une vingtaine de piconewtons. Cela a nécessité un travail important sur l'amortissement mécanique du montage expérimental afin de réduire l'amplitude des vibrations à quelques nanomètres. Ces mesures de forces sur cellules vivantes ont ensuite été couplées avec des mesures électriques effectuées en "patch-clamp". Une fois encore, après une étape de développement consistant à réduire les bruits électriques à une dizaine de picoampères, nous avons apporté la preuve qu'il était possible de réaliser de telles expériences, cependant l'étude doit être poursuivie afin d'en tirer de plus amples enseignements.

La translocation a également été étudiée par l'intermédiaire d'un système modèle : les bicouches à l'interface de gouttes (BIG). À l'aide de ces membranes modèles nous avons observé l'impact de la nature des lipides et de l'asymétrie de la bicouche sur la translocation de la Pénétratine. Nous avons pu déterminer l'importance des lipides POPG : au moins 40 % de ces lipides dans le feuillet proximal ainsi que des lipides chargés négativement dans le feuillet distal sont nécessaires pour assurer le passage de la Pénétratine au travers de la bicouche lipidique. Les BIG représentent un système de choix pour cette étude, cependant la formation des bicouches est aléatoire et la translocation étant un phénomène stochastique, elle nécessite une approche statistique qui est chronophage. C'est pourquoi nous avons développé un système microfluidique capable de générer des dizaines de BIG simultanément. Pour définir une puce microfluidique capable d'assurer la fabrication de populations de gouttes monodisperses en taille et de contrôler la formation des paires, divers motifs ont été expérimentés. Ces mises au point ont en particulier nécessité un travail intermédiaire de mesure de la tension interfaciale de la monocouche de lipides.

Pour conclure, une partie importante de ce travail de thèse a consisté à développer et

CHAPITRE IV. MICROFLUIDIQUE ET AUTOMATISATION DE LA FORMATION DES BIG

mettre en place des systèmes permettant d'étudier la translocation des peptides pénétrants. Des résultats majeurs ont été obtenus, en particulier sur l'importance de la composition lipidique de chacun des feuilletts de la bicouche. La mise en œuvre des montages mis en place devrait permettre d'obtenir rapidement de nombreux autres résultats sur les mécanismes d'internalisation des CPP.

A – Communication orale "BPS2018"

Résumé de la communication orale au congrès annuel de la "Biophysical Society" 2018 à San Francisco, Californie (États-Unis d'Amérique) : "Assessing the Translocation of Cell Penetrating Peptides using Force Measurements, Electrophysiology and Emulsions"

Platform: Membrane Active Peptides and Toxins

1855-Plat

Assessing the Translocation of Cell Penetrating Peptides using Force Measurements, Electrophysiology and Emulsions

Simon Kulifaj, Sophie Cribier, Vincent Vivier, Nicolas Rodriguez, Kieu Ngo.

UMR 7203, University Pierre et Marie Curie, Paris, France.

Cell Penetrating Peptides (CPPs) are known to be able to cross cell membranes with a cargo through two different mechanisms: endocytosis and direct translocation. However, the molecular mechanism of the translocation is largely unknown. Our objectives are to find the intermediate structures formed by CPP and protein, sugar, and lipid partners, to quantify the strength of the interactions and to measure the kinetics of the steps of the interaction of a CPP with a membrane. This is achieved by using two approaches: (i) coupled BioMembrane Force and electrophysiology, (ii) model membrane in inverse emulsions.

(i) Biomembrane Force Probe is a technique for measuring the adhesion force between few molecules grafted on a micrometric bead and a target cell or a liposome. This technique has been used to identify partners of CPP at the cell surface. Electrophysiological measurements on the target cell enable to detect a possible perturbation of a membrane interacting with CPPs.

(ii) Inverse emulsions are aqueous droplets into oil covered by lipids. At the interface between two adhering droplets a bilayer is formed. We monitor the translocation of fluorescently labeled CPP through this bilayer. The translocation of several CPPs through negatively charged bilayer within tens of minutes has been detected. The nature of the lipids and the asymmetry of the bilayer seem to impact the translocation. We are currently improving the formation of the pairs of droplets with microfluidic devices for statistical analysis.

B – Programme Matlab pour le traitement des données du BFP

Ce programme écrit sous Matlab est inspiré de celui écrit par Pierre Soule et que l'on peut retrouver en annexe de sa thèse. Je rappelle brièvement ici son principe. Les mesures effectuées lors de l'utilisation du BFP sont automatiquement enregistrées dans un fichier .txt en tableau de valeur permettant de tracer les courbes de force, de mesurer le bruit de l'enregistrement ainsi que la valeur de la force, si celle-ci est supérieure à 20 pN. Il a cependant subi un certain nombre de modifications :

- La courbe n'est plus ajustée par une exponentielle. Seul le plateau (sonde hors contact) est ajusté par une droite.
- Chaque courbe de force est affichée à l'écran. L'utilisateur peut alors choisir de garder l'analyse telle quelle, supprimer la courbe ou calculer lui même la force en définissant le plateau par rapport auquel la force sera calculée.
- Le bruit est calculé sur la phase aller et sur la phase retour du plateau seulement comme la déviation standard par rapport à une courbe idéale sans bruit (droite).

Un programme pour revoir une courbe d'un fichier donné a également été écrit. Il renvoie la courbe de force, le bruit sur la mesure ainsi que la force et contient la possibilité d'ajuster la position du plateau permettant de calculer la force.

```

function auto2(fileindex)

rep = 'C:\Users\Simon\ownCloud\Thèse Simon\Patch\20180426 billes sans pen\m2';
ext = '*.txt';
chemin = fullfile(rep,ext);
B = dir(chemin);
f=0;
e=0;
E=[];
annul=0;
valid=0;
Event=[];
cellname=B(fileindex).name

cd(rep);
data=importdata(cellname,'\t',14);
fid=fopen(cellname);
conditions=textscan(fid,'%s',36);
pN=conditions{1,1}{17,1}
fclose(fid);
cd('C:\Users\Simon\ownCloud\Thèse Simon\manip BFP\Matlab');

if size(data)>0

    if size(data.data,1)>1000 %Import data as readable table for matlab
        A=Import(data);
        f=f+1;
        a=1;
        filename(f,:)=(cellname);

        if size(A,2)>=10
            while 2*a<=size(A,2)
                [D,C]=orderBFP(a,A); % Retrieving curves of index a C=in D=out
                ['curve ' num2str(a)]

                try

                    if max(D(:,1))>1 & max(C(:,1))>1 & C(length(C),1)<12 & min(D)>-50
                        [Df,Cf]=Fit(D,C); %Fitting data using exp model
                        [minima,bruit,bruitA,bruitR]=Ecart(Df,D,Cf,C); %Measuring
                        distance to the fit

                        if 30<abs(minima)
                            display('Force')
                            valid=valid+1;
                            [crit]=affichage(D,Df,C,Cf,minima,bruit,bruitA,bruitR)

                            while crit==2
                                startfit=input('startfit =');
                                endfit=input('endfit =');
                                minima=adjustfit(C,D,startfit,endfit)
                                crit=input('entrer 2 pour modifier, 1 pour conserver');
                            end

                        0 pour supprimer');
                    end

                catch
                    a=a+1;
                end
            end
        end
    end

    % Sauvegarde de l'analyse sous format .mat en complet et csv pour le reste
    Event.E=E;
    Event.V=size(E,1)/valid*100;
    cla
    Event.valid=valid;
    Event.annul=annul;
    Event.file=filename;
    Event.conditions=conditions;
    Event
    save('Global.mat','Event')
end

```

```

end

else
    display('Not enough back and forth')

end

else
    display('Piezo extension too small')
end
end

% Sauvegarde de l'analyse sous format .mat en complet et csv pour le reste
Event.E=E;
Event.V=size(E,1)/valid*100;
cla
Event.valid=valid;
Event.annul=annul;
Event.file=filename;
Event.conditions=conditions;
Event
save('Global.mat','Event')
end

```

```

if crit==1 & 25<abs(minima)
    e=e+1;
    E(e,3)=abs(minima);
    E(e,4)=bruitR;
    E(e,2)=a;
    E(e,1)=f;
end

if crit==0
    annul=annul+1;
    valid=valid-1;
end

else
    display('Normal')
    valid=valid+1;
    [crit]=affichage(D,Df,C,Cf,minima,bruit,bruitA,bruitR)

    while crit==2
        startfit=input('startfit =');
        endfit=input('endfit =');
        minima=adjustfit(C,D,startfit,endfit)
        crit=input('entrer 2 pour modifier, 1 pour conserver');

        if crit==1 & 30<abs(minima)
            e=e+1;
            E(e,3)=abs(minima);
            E(e,4)=bruitR;
            E(e,2)=a;
            E(e,1)=f;
        end

        end

        if crit==0
            annul=annul+1;
            valid=valid-1;
        end

        end

        else
            display('insufficient data')
            Df=0;
            Cf=0;
            [crit]=affichage(D,Df,C,Cf,bruitA,bruitR)
            annul=annul+1;
        end

        a=a+1;

    catch
        a=a+1;
    end
end

```

```

function [G1 G2] = reviewgraph(a,cellname,startfit,endfit)
%début ddu fit après startfit µm
%fin du fit endfit micron avant la fin de la course du piezo

if nargin<=2
    startfit=0;

end
if nargin<=3
    endfit=1.6;
end

%récupération des données
rep = 'C:\Users\Simon\ownCloud\Thèse Simon\Patch\20180426 billes sans pen\ml';
ext = '*.txt';
chemin = fullfile(rep,ext);
B = dir(chemin);
cd(rep);
data=importdata(cellname, '\t',14);
cd('C:\Users\Simon\ownCloud\Thèse Simon\manip BFP\Matlab');
A=Import(data);

%retrace la courbe voulue d'après le fichier choisi
C=[];
D=[];
t=2*a;
n=1;
k=0;
p=1;
delays=1.1;

while A(n,t-1)<A((n+1),t-1)
    if A(n,t-1)>delays
        C(p,1)=A(n,(t-1));
        C(p,2)=-A(n,t);
        p=p+1;
    end
    n=n+1;
end

n=n-1;
k=n;
while A(n,t-1)>delays
    D(n-k+1,1)=A(n,(t-1));
    D(n-k+1,2)=-A(n,t);
    n=n+1;
end

% suppression 1er micron et de la montée pour le fit
d=[];
c=[];
p=1;
k=0;
for i=1:length(D)
    if D(i,1)>startfit && D(i,1)<max(D(:,1))-endfit

```

```

        'String', textel);
annotation('textbox', [0.5 0.8 0.1 0.1],'FitHeightToText', 'ON', 'FontSize', 24, ...
        'String', texte2);

```

```

        d(i-k,1)=D(i,1);
        d(i-k,2)=D(i,2);
    else
        k=k+1;
    end
end

k=0;
for p=1:length(C)
    if C(p,1)>startfit && C(p,1)<max(C(:,1))-endfit
        c(p-k,1)=C(p,1);
        c(p-k,2)=C(p,2);
    else
        k=k+1;
    end
end

%fit du tableau de décroissance par fonction linéaire
linear=fittype(theta(a,b,x) a*x+b);
G1=0;
G2=0;
[Df G1]=fit(d(:,1),d(:,2),linear);
[Cf G2]=fit(c(:,1),c(:,2),linear);

% affichage des figures et des fits
figure
X=startfit:0.1:max(C(:,1))-endfit;
plot(X,Df(X),'b', 'LineWidth', 2)
hold on
plot(X,Cf(X),'r', 'LineWidth', 2)
plot(D(:,1),D(:,2),'b', 'LineWidth', 2)
plot(C(:,1),C(:,2),'r', 'LineWidth', 2)

% options du graphique
xlabel({'Élongation du piézoélectrique (µm)'});
ylabel({'Force (pN)'),'Color',[0.15 0.15 0.15]);
grid ON
legend OFF
set(gca,'XTick',[1:1:10],'YTick',[-80:20:220]);
axis([1 12 -80 220]);
set(gca, 'FontSize', 24);

%affichage de la force et du bruit
% [minima,bruit,bruitA,bruitR]=Ecart(Df,D,Cf,C,startfit,endfit);
% G1
% G2

textel = ['Force (pN) ', num2str(minima)];
texte2 = ['Bruit (pN) ', num2str(bruit)];

annotation('textbox', [0.3 .8 .1 .1], 'FitHeightToText', 'ON', 'FontSize', 24, ...

```

*ANNEXE B. PROGRAMME MATLAB POUR LE TRAITEMENT DES DONNÉES DU
BFP*

C – Fichiers OpenScad

Sont rappelés ici les fichiers OpenScad nécessaires à l'impression des moules de certaines puces microfluidiques utilisées au cours de ce travail de thèse. Les puces ont été imprimées à l'aide de l'imprimante Form2 (imprimante de type SLA de chez FORMLABS).

```

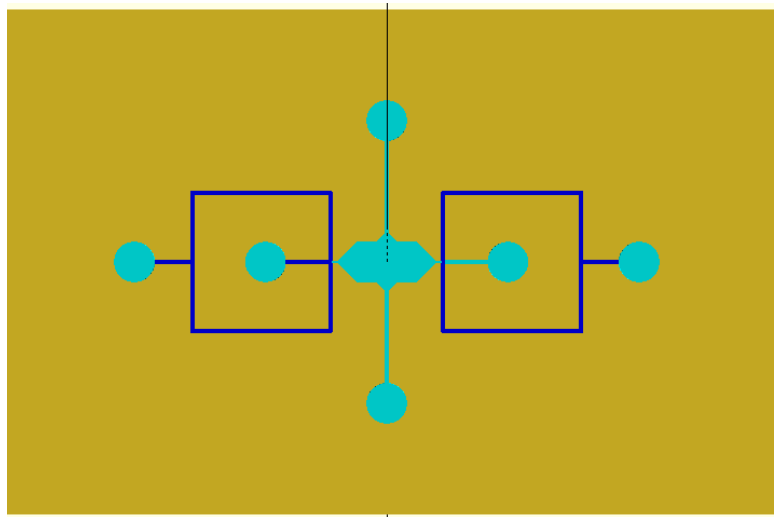
////////////////////////////////////
// Partie 1 : chambre, rectangle de 2x3 mm
// avec canal de 100 µm
translate([-1,-1.5,5])color([0,1,1]) cube([2,3,0.2]);
// Triangle
translate([0,1.5,5.1])color([0,1,1])
linear_extrude(height = 0.2, center = true, convexity = 10, twist = 0)
polygon(points=[[-1,0],[1,0],[0,1]], paths=[[0,1,2]]);
// Triangle
translate([0,-1.5,5.1])color([0,1,1])
linear_extrude(height = 0.2, center = true, convexity = 10, twist = 0)
polygon(points=[[1,0],[-1,0],[0,-1]], paths=[[0,1,2]]);
// Canal de 100 µm de large
translate([0,-2.5,5.1]) color([0,1,1]) cube([0.1,0.4,0.2],center=true);
// Canal de 100 µm de large
translate([0,2.5,5.1]) color([0,1,1]) cube([0.1,0.4,0.2],center=true);
////////////////////////////////////
// Partie 2 : première flow-focusing
// Canal de 200 µm de large
translate([0,4.2,5.1]) color([0,1,1]) cube([0.2,3,0.2],center=true);
// Entrée eau 1,
translate([0,6,5.1])color([0,1,1]) cylinder(d=2,$fn=100,h=0.2,center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([-1,2.8,5.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,90]) cube([0.2,5,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([1,2.8,5.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,-90]) cube([0.2,5,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([3.4,6.2,5.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,0]) cube([0.2,7,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([-3.4,6.2,5.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,0]) cube([0.2,7,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([0,9.6,5.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,90]) cube([0.2,7,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([0,10.5,5.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,0]) cube([0.2,2,0.2],center=true);
// Entrée huile 1
translate([0,12.5,5.1])color([0,1,1]) cylinder(d=2,$fn=100,h=0.2,center=true);
////////////////////////////////////
// Partie 3 : deuxième flow-focusing
// Canal de 200 µm de large
translate([0,-4.2,5.1]) color([0,0,1]) cube([0.2,3,0.2],center=true);
// Entrée eau 2
translate([0,-6,5.1])color([0,1,1]) cylinder(d=2,$fn=100,h=0.2,center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([-1,-2.8,5.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,-90]) cube([0.2,5,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([1,-2.8,5.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,90]) cube([0.2,5,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([3.4,-6.2,5.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,0]) cube([0.2,7,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([-3.4,-6.2,5.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,0]) cube([0.2,7,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([0,-9.6,5.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,90]) cube([0.2,7,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([0,-10.5,5.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,0]) cube([0.2,2,0.2],center=true);
// Entrée huile 2
translate([0,-12.5,5.1])color([0,1,1]) cylinder(d=2,$fn=100,h=0.2,center=true);
////////////////////////////////////
// Partie 4 : circuit de sortie : au milieu de la chambre
// Canal de 200 µm de large

```

```

translate([0,0,5.1])color([0,1,1]) cube([14,0.2,0.2],center=true);
// Sortie 1 et sortie 2 : cercle de rayon de 1 mm
translate([-7,0,5.1])color([0,1,1]) cylinder(d=2,$fn=100,h=0.2,center=true);
translate([7,0,5.1])color([0,1,1]) cylinder(d=2,$fn=100,h=0.2,center=true);
// Support de dimensions (25x76x8 = taille lame de verre)
translate([-12.5,-38,-3])cube([25,76,8]);
// Triangle
translate([-1,0,5.1])color([0,1,1])rotate([0,0,90])
linear_extrude(height = 0.2, center = true, convexity = 10, twist = 0)
polygon(points=[[-0.5,0],[0.5,0],[0,0.5]], paths=[[0,1,2]]);
translate([1,0,5.1])color([0,1,1])rotate([0,0,90])
linear_extrude(height = 0.2, center = true, convexity = 10, twist = 0)
polygon(points=[[0.5,0],[-0.5,0],[0,-0.5]], paths=[[0,1,2]]);

```




```

////////////////////////////////////
// Partie 1 : chambre, rectangle de 2x3 mm
// avec canal de 100 µm
//translate([-1,-1.5,9])color([0,1,1]) cube([2,3,0.2]);
// Triangle
//translate([0,1.5,9.1])color([0,1,1])
//linear_extrude(height = 0.2, center = true, convexity = 10, twist = 0)
//polygon(points=[[-1,0],[1,0],[0,1]], paths=[[0,1,2]]);
// Triangle
//translate([0,-1.5,9.1])color([0,1,1])
//linear_extrude(height = 0.2, center = true, convexity = 10, twist = 0)
//polygon(points=[[1,0],[-1,0],[0,-1]], paths=[[0,1,2]]);
// Canal de 100 µm de large
//translate([0,-2.5,9.1]) color([1,1,1]) cube([0.1,0.4,0.2],center=true);
// Canal de 100 µm de large
translate([-4,8.5,9.1]) color([0,1,1]) cube([0.1,0.5,0.2],center=true);
// Canal de 100 µm de large
translate([-4,-8.5,9.1]) color([0,1,1]) cube([0.1,0.5,0.2],center=true);
////////////////////////////////////
// 10/03 : déplacer à droite + 6 mm pour séparer les 2 flowfocusing
// Partie 2 : première flow-focusing
// Canal de 200 µm de large
translate([-4,10.2,9.1]) color([0,1,1]) cube([0.2,3,0.2],center=true);
// Entrée eau 1,
translate([-4,12,9.1])color([0,1,1]) cylinder(d=2,$fn=100,h=0.2,center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([-5,8.8,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,90]) cube([0.2,5,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([-3,8.8,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,-90]) cube([0.2,5,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([-0.6,12.2,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,0]) cube([0.2,7,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([-7.4,12.2,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,0]) cube([0.2,7,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([-4,15.6,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,90]) cube([0.2,7,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([-4,16.5,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,0]) cube([0.2,2,0.2],center=true);
// Entrée huile 1
translate([-4,17.5,9.1])color([0,1,1]) cylinder(d=2,$fn=100,h=0.2,center=true);
////////////////////////////////////
// 10/03 : déplacer à gauche - 6 mm pour séparer les 2 flowfocusing
// Partie 3 : deuxième flow-focusing
// Canal de 200 µm de large
translate([-4,-10.2,9.1]) color([0,0,1]) cube([0.2,3,0.2],center=true);
// Entrée eau 2
translate([-4,-11,9.1])color([0,1,1]) cylinder(d=2,$fn=100,h=0.2,center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([-5,-8.8,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,-90]) cube([0.2,5,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([-3,-8.8,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,90]) cube([0.2,5,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([-0.6,-12.2,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,0]) cube([0.2,7,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([-7.4,-12.2,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,0]) cube([0.2,7,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([-4,-15.6,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,90]) cube([0.2,7,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([-4,-16.5,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,0]) cube([0.2,2,0.2],center=true);
// Entrée huile 2

```

```

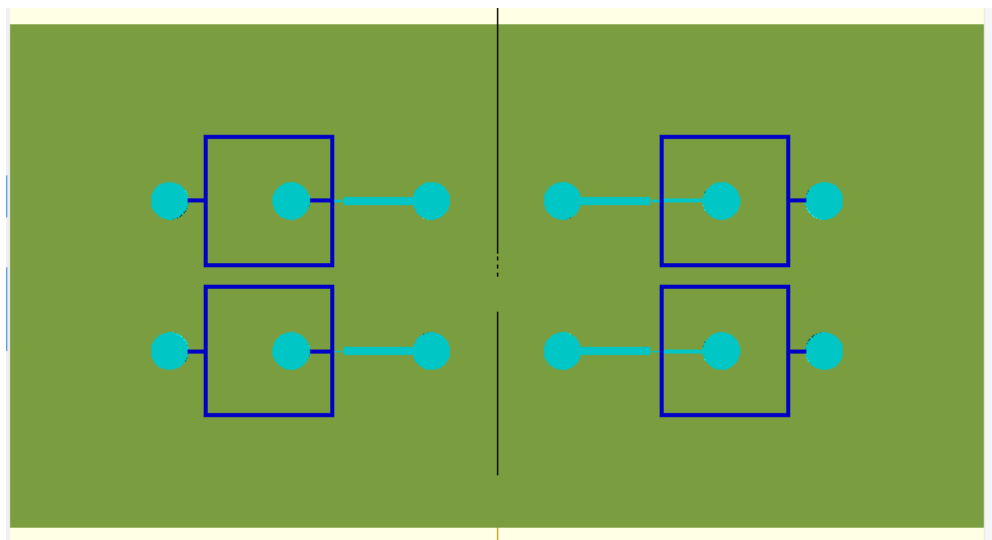
translate([-4,-17.5,9.1])color([0,1,1]) cylinder(d=2,$fn=100,h=0.2,center=true);
////////////////////////////////////
// Partie 4 : circuit de sortie : au milieu de la chambre
// Canal de 200 µ de large
//translate([0,0,9.1])color([0,1,1]) cube([14,0.2,0.2],center=true);
// Sortie 1 et sortie 2 : cercle de rayon de 1 mm
//translate([-7,0,9.1])color([0,1,1]) cylinder(d=2,$fn=100,h=0.2,center=true);
//translate([7,0,9.1])color([0,1,1]) cylinder(d=2,$fn=100,h=0.2,center=true);
// Triangle de sortie
//translate([-1,0,9.1])color([0,1,1])rotate([0,0,90])
//linear_extrude(height = 0.2, center = true, convexity = 10, twist = 0)
//polygon(points=[[-0.5,0],[0.5,0],[0,0.5]], paths=[[0,1,2]]);
//translate([1,0,9.1])color([0,1,1])rotate([0,0,90])
//linear_extrude(height = 0.2, center = true, convexity = 10, twist = 0)
//polygon(points=[[0.5,0],[-0.5,0],[0,-0.5]], paths=[[0,1,2]]);
////////////////////////////////////
// 10/03/2016
// Sortie des gouttelettes
// Canal de 500 µm de large
translate([-4,6.2,9.1]) color([0,1,1]) cube([0.4,4,0.2],center=true);
// Sortie 1
translate([-4,3.5,9.1])color([0,1,1]) cylinder(d=2,$fn=100,h=0.2,center=true);
// Canal de 500 µm de large
translate([-4,-6.2,9.1]) color([0,1,1]) cube([0.4,4,0.2],center=true);
// Sortie 2
translate([-4,-3.5,9.1])color([0,1,1]) cylinder(d=2,$fn=100,h=0.2,center=true);
////////////////////////////////////
// Flow focusing 80µm
// Canal de 80 µm de large
translate([4,8.5,9.1]) color([0,1,1]) cube([0.08,0.5,0.2],center=true);
// Canal de 100 µm de large
translate([4,-8.5,9.1]) color([0,1,1]) cube([0.08,0.5,0.2],center=true);
////////////////////////////////////
// 10/03 : déplacer à droite + 6 mm pour séparer les 2 flowfocusing
// Partie 2 : première flow-focusing
// Canal de 200 µm de large
translate([4,10.2,9.1]) color([0,1,1]) cube([0.2,3,0.2],center=true);
// Entrée eau 1,
translate([4,12,9.1])color([0,1,1]) cylinder(d=2,$fn=100,h=0.2,center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([3,8.8,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,90]) cube([0.2,5,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([5,8.8,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,-90]) cube([0.2,5,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([7.4,12.2,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,0]) cube([0.2,7,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([0.6,12.2,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,0]) cube([0.2,7,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([4,15.6,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,90]) cube([0.2,7,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([4,16.5,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,0]) cube([0.2,2,0.2],center=true);
// Entrée huile 1
translate([4,17.5,9.1])color([0,1,1]) cylinder(d=2,$fn=100,h=0.2,center=true);
////////////////////////////////////
// 10/03 : déplacer à gauche - 6 mm pour séparer les 2 flowfocusing
// Partie 3 : deuxième flow-focusing
// Canal de 200 µm de large
translate([4,-10.2,9.1]) color([0,0,1]) cube([0.2,3,0.2],center=true);
// Entrée eau 2

```

```

translate([4,-11,9.1])color([0,1,1]) cylinder(d=2,$fn=100,h=0.2,center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([3,-8.8,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,-90]) cube([0.2,5,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([5,-8.8,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,90]) cube([0.2,5,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([7.4,-12.2,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,0]) cube([0.2,7,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([0.6,-12.2,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,0]) cube([0.2,7,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([4,-15.6,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,90]) cube([0.2,7,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([4,-16.5,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,0]) cube([0.2,2,0.2],center=true);
// Entrée huile 2
translate([4,-17.5,9.1])color([0,1,1]) cylinder(d=2,$fn=100,h=0.2,center=true);
////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////
// Partie 4 : circuit de sortie : au milieu de la chambre
// Canal de 200 µ de large
//translate([0,0,9.1])color([0,1,1]) cube([14,0.2,0.2],center=true);
// Sortie 1 et sortie 2 : cercle de rayon de 1 mm
//translate([-7,0,9.1])color([0,1,1]) cylinder(d=2,$fn=100,h=0.2,center=true);
//translate([7,0,9.1])color([0,1,1]) cylinder(d=2,$fn=100,h=0.2,center=true);
// Triangle de sortie
//translate([-1,0,9.1])color([0,1,1])rotate([0,0,90])
//linear_extrude(height = 0.2, center = true, convexity = 10, twist = 0)
//polygon(points=[[-0.5,0],[0.5,0],[0,0.5]], paths=[[0,1,2]]);
//translate([1,0,9.1])color([0,1,1])rotate([0,0,90])
//linear_extrude(height = 0.2, center = true, convexity = 10, twist = 0)
//polygon(points=[[0.5,0],[-0.5,0],[0,-0.5]], paths=[[0,1,2]]);
////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////
// 10/03/2016
// Sortie des gouttelettes
// Canal de 500 µm de large
translate([4,6.2,9.1]) color([0,1,1]) cube([0.4,4,0.2],center=true);
// Sortie 1
translate([4,3.5,9.1])color([0,1,1]) cylinder(d=2,$fn=100,h=0.2,center=true);
// Canal de 500 µm de large
translate([4,-6.2,9.1]) color([0,1,1]) cube([0.4,4,0.2],center=true);
// Sortie 2
translate([4,-3.5,9.1])color([0,1,1]) cylinder(d=2,$fn=100,h=0.2,center=true);
////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////
// Partie 5 : support avec deux ouvertures pour faciliter le démoulage
difference()
{
translate([0,0,7]) cube([34,60,14],center=true);
translate([0,0,16]) cube([24,50,14],center=true);
translate([0,-30,16]) cube([10,12,14],center=true);
translate([0,30,16]) cube([10,12,14],center=true);
}

```



```

////////////////////////////////////
// Partie 1 : chambre, rectangle de 4x10 mm
translate([-2,-14,9])color([0,1,1]) cube([4,10,0.2]);
// Triangle
translate([0,-4,9.1])color([0,1,1])
linear_extrude(height = 0.2, center = true, convexity = 10, twist = 0)
polygon(points=[[-2,0],[2,0],[0,1]], paths=[[0,1,2]]);
// Canal de 400 µm de large
translate([0,-2.4,9.1]) color([0,1,1]) cube([0.4,2,0.2],center=true);
// Triangle
translate([0,-14,9.1])color([0,1,1])
linear_extrude(height = 0.2, center = true, convexity = 10, twist = 0)
polygon(points=[[2,0],[-2,0],[0,-1]], paths=[[0,1,2]]);
// Canal de 400 µm de large
translate([0,-17,9.1]) color([0,1,1]) cube([0.4,4.5,0.2],center=true);
// Sortie Goutte
translate([0,-20,9.1])color([0,1,1]) cylinder(d=2,$fn=100,h=0.2,center=true);
////////////////////////////////////
// Partie 2 : flow-focusing 1
// Canal de 100 µm de large
translate([-5,11.5,9.1]) color([0,1,1]) cube([0.1,0.5,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([-5,13.2,9.1]) color([0,1,1]) cube([0.2,3,0.2],center=true);
// Entrée eau 1,
translate([-5,15,9.1])color([0,1,1]) cylinder(d=2,$fn=100,h=0.2,center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([-6,11.8,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,90]) cube([0.2,5,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([-4,11.8,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,-90]) cube([0.2,5,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([-1.6,15.2,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,0]) cube([0.2,7,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([-8.4,15.2,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,0]) cube([0.2,7,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([-5,18.6,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,90]) cube([0.2,7,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([-5,19.5,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,0]) cube([0.2,2,0.2],center=true);
// Entrée huile 1
translate([-5,21.5,9.1])color([0,1,1]) cylinder(d=2,$fn=100,h=0.2,center=true);
////////////////////////////////////
// Partie 3 : flow-focusing 2
// Canal de 100 µm de large
translate([5,11.5,9.1]) color([0,1,1]) cube([0.1,0.5,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([5,13.2,9.1]) color([0,1,1]) cube([0.2,3,0.2],center=true);
// Entrée eau 1,
translate([5,15,9.1])color([0,1,1]) cylinder(d=2,$fn=100,h=0.2,center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([4,11.8,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,90]) cube([0.2,5,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([6,11.8,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,-90]) cube([0.2,5,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([8.4,15.2,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,0]) cube([0.2,7,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([1.6,15.2,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,0]) cube([0.2,7,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([5,18.6,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,90]) cube([0.2,7,0.2],center=true);
// Canal de 200 µm de large
translate([5,19.5,9.1]) color([0,0,1]) rotate([0,0,0]) cube([0.2,2,0.2],center=true);

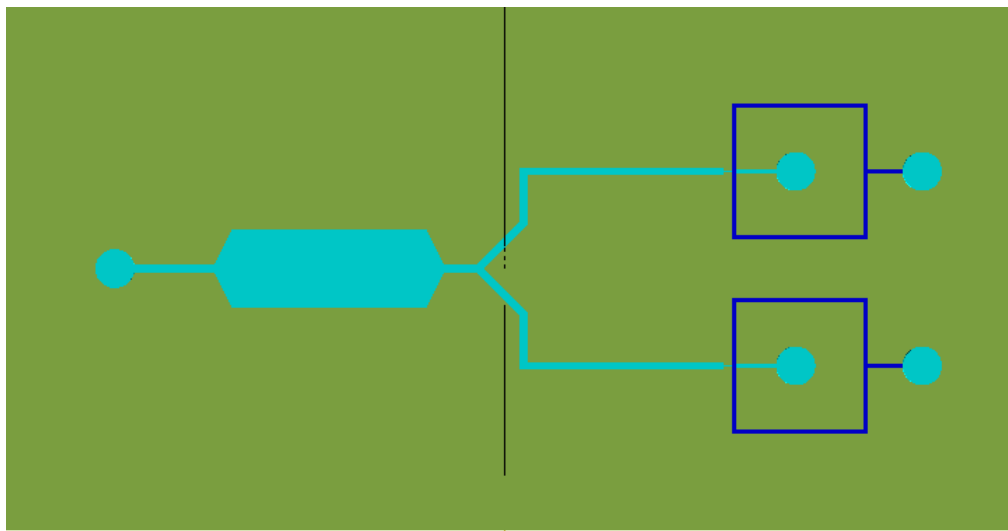
```

```

// Entrée huile 1
translate([5,21.5,9.1])color([0,1,1]) cylinder(d=2,$fn=100,h=0.2,center=true);
////////////////////////////////////
// Partie 4 : Chemin jusqu'à la chambre
// Canal de 400 µm de large
translate([-5,6.125,9.1]) color([0,1,1]) cube([0.4,10.25,0.2],center=true);
// Canal 400 µm de large
translate([-3.7,1,9.1]) color([0,1,1]) rotate([0,0,-90]) cube([0.4,3,0.2],center=true);
// Canal 400 µm de large
translate([-1.1,-0.2,9.1]) color([0,1,1]) rotate([0,0,45]) cube([0.4,3.5,0.2],center=true);
// Canal de 400 µm de large
translate([5,6.125,9.1]) color([0,1,1]) cube([0.4,10.25,0.2],center=true);
// Canal 400 µm de large
translate([3.7,1,9.1]) color([0,1,1]) rotate([0,0,-90]) cube([0.4,3,0.2],center=true);
// Canal 400 µm de large
translate([1.1,-0.2,9.1]) color([0,1,1]) rotate([0,0,-45]) cube([0.4,3.5,0.2],center=true);
////////////////////////////////////
// Partie 5 : support avec deux ouvertures pour faciliter le démoulage

difference()
{
translate([0,0,7]) cube([34,60,14],center=true);
translate([0,0,16]) cube([24,50,14],center=true);
translate([0,-30,16]) cube([10,12,14],center=true);
translate([0,30,16]) cube([10,12,14],center=true);
}

```



ANNEXE C. FICHIERS OPENSCAD

D – Probabilité des événements d'adhésion

Si n est le nombre de molécules de Pénétratine au niveau de la surface de contact de la bille avec la cellule et p_1 la probabilité qu'une molécule de Pénétratine adhère à son partenaire d'interaction de la membrane plasmique, alors les probabilités $P(1)$ et $P(2)$ qu'il y ait respectivement seulement une et seulement deux adhésions valent :

$$P(1) = n \times p_1 \times (1 - p_1)^{n-1} \sim n \times p_1$$
$$P(2) = \frac{n \times (n-1)}{2} \times p_1^2 \times (1 - p_1)^{n-2} \sim \frac{n^2}{2} \times p_1^2 \sim \frac{P(1)^2}{2}$$

En présence de Pénétratine, le taux d'adhésion sur des cellules CHO de type sauvage est de 38 %, donc en considérant que les adhésions impliquant trois Pénétratines et plus sont négligeables devant les adhésions simples et doubles, on a :

$$P(1) + \frac{P(1)^2}{2} = 0,38 \Rightarrow \begin{cases} P(1) &= 0,32 \\ P(2) &= \frac{P(1)^2}{2} = 0,06 \end{cases}$$

Les adhésions uniques représentent donc de 84 % des adhésions.

Nous pouvons conclure que pour un taux d'adhésion de la sonde BFP à la surface des cellules de 38 %, nous observons essentiellement des adhésions simples, impliquant une seule pénétratine.

ANNEXE D. PROBABILITÉ DES ÉVÉNEMENTS D'ADHÉSION

Bibliographie

- [Almeida et al., 2016] Almeida, C., Lamazière, A., Filleau, A., Corvis, Y., Espeau, P., and Ayala-Sanmartin, J. (2016). Membrane re-arrangements and rippled phase stabilisation by the cell penetrating peptide penetratin. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1858(11) :2584–2591. [47](#)
- [Alves et al., 2008] Alves, I. D., Goasdoué, N., Correia, I., Aubry, S., Galanth, C., Sagan, S., Lavielle, S., and Chassaing, G. (2008). Membrane interaction and perturbation mechanisms induced by two cationic cell penetrating peptides with distinct charge distribution. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1780(7-8) :948–959. [16](#)
- [Åmand et al., 2008] Åmand, H. L., Fant, K., Nordén, B., and Esbjörner, E. K. (2008). Stimulated endocytosis in penetratin uptake : Effect of arginine and lysine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 371(4) :621–625. [10](#), [11](#)
- [Ando et al., 2001] Ando, T., Kodera, N., Naito, Y., Kinoshita, T., Furuta, K., and Toyoshima, Y. Y. (2001). A High-speed Atomic Force Microscope for Studying Biological Macromolecules in Action. *ChemPhysChem*, 4(11) :1196–1202. [22](#)
- [ANDREAS et al., 1937] ANDREAS, J. M., HAUSER, E. A., and TUCKER, W. B. (1937). BOUNDARY TENSION BY PENDANT DROPS ^¹. *The Journal of Physical Chemistry*, 42(8) :1001–1019. [95](#)
- [Andree et al., 1990] Andree, H. a., Reutelingsperger, C. P., Hauptmann, R., Hemker, H. C., Hermens, W. T., and Willems, G. M. (1990). Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *The Journal of biological chemistry*, 265(9) :4923–4928. [62](#)
- [Angelova et al., 1992] Angelova, M. I., Soléau, S., Méléard, P., Faucon, F., and Bothorel, P. (1992). Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications. *Trends in Colloid and Interface Science VI*, 131(899) :127–131. [48](#)
- [Anna et al., 2003] Anna, S. L., Bontoux, N., and Stone, H. A. (2003). Formation of dispersions using "flow focusing" in microchannels. *Applied Physics Letters*, 82(3) :364–366. [81](#), [83](#)
- [Aronson and Princen, 1980] Aronson, M. P. and Princen, H. M. (1980). Contact angles associated with thin liquid films in emulsions. *Nature*, 286(5771) :370–372. [57](#)
- [Ashkin and Dziedzic, 1989] Ashkin, A. and Dziedzic, J. M. (1989). Optical trapping and manipulation of single living cells using infra-red laser beams. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*, 93 :254–260. [24](#)

- [Bagatolli and Gratton, 2000] Bagatolli, L. A. and Gratton, E. (2000). Two photon fluorescence microscopy of coexisting lipid domains in giant unilamellar vesicles of binary phospholipid mixtures. *Biophysical Journal*, 78(1) :290–305. [6](#)
- [Bai et al., 2010] Bai, Y., He, X., Liu, D., Patil, S. N., Bratton, D., Huebner, A., Hollfelder, F., Abell, C., and Huck, W. T. S. (2010). A double droplet trap system for studying mass transport across a droplet-droplet interface. *Lab on a Chip*, 10(10) :1281. [84](#), [85](#), [89](#)
- [Baumgart et al., 2007] Baumgart, T., Hammond, A. T., Sengupta, P., Hess, S. T., Holowka, D. A., Baird, B. A., and Webb, W. W. (2007). Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(9) :3165–3170. [6](#), [49](#)
- [Bayburt and Sligar, 2010] Bayburt, T. H. and Sligar, S. G. (2010). Membrane protein assembly into Nanodiscs. *FEBS Letters*, 584(9) :1721–1727. [51](#), [52](#)
- [Bechara et al., 2013] Bechara, C., Pallerla, M., Zaltsman, Y., Burlina, F., Alves, I. D., Lequin, O., and Sagan, S. (2013). Tryptophan within basic peptide sequences triggers glycosaminoglycan- dependent endocytosis. *FASEB Journal*, 27(2) :738–749. [7](#)
- [Bechara and Sagan, 2013] Bechara, C. and Sagan, S. (2013). Cell-Penetrating Peptides : 20 Years Later, Where Do We Stand ? *FEBS Lett.*, 587 :1693. [14](#), [15](#), [74](#)
- [Ben M’barek et al., 2017] Ben M’barek, K., Ajjaji, D., Chorlay, A., Vanni, S., Forêt, L., and Thiam, A. R. (2017). ER Membrane Phospholipids and Surface Tension Control Cellular Lipid Droplet Formation. *Developmental Cell*, 41(6) :591–604.e7. [55](#), [67](#)
- [Benmerah and Lamaze, 2002] Benmerah, A. and Lamaze, C. (2002). Endocytose : Chaque voie compte ! *Medecine/Sciences*, 18(11) :1126–1136. [14](#)
- [Bennink et al., 2001] Bennink, M. L., Leuba, S. H., Leno, G. H., Zlatanova, J., De Grooth, B. G., and Greve, J. (2001). Unfolding individual nucleosomes by stretching single chromatin fibers with optical tweezers. *Nature Structural Biology*, 8(7) :606–610. [24](#)
- [Binnig and Quate, 1986] Binnig, G. and Quate, C. F. (1986). Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*, 56(9) :930–933. [22](#)
- [Binnig and Rohrer, 1982] Binnig, G. and Rohrer, H. (1982). Scanning tunneling microscopy. *Surface Science*, 126(126) :236–244. [21](#)
- [Bretscher, 1972] Bretscher, M. S. (1972). Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nature New Biology*, 236(61) :11–12. [6](#)
- [Chen, 2015] Chen, X. (2015). *2015 Droplet-based Microfluidic Chip Design for High Throughput Screening Applications*. PhD thesis, University of Waterloo. [84](#), [85](#), [89](#), [93](#)
- [Delaroche et al., 2007] Delaroche, D., Aussadat, B., Aubry, S., Chassaing, G., Burlina, F., Clodic, G., Bolbach, G., Lavielle, S., and Sagan, S. (2007). Tracking a new cell-penetrating (W/R) nonapeptide, through an enzyme-stable mass spectrometry reporter tag. *Analytical Chemistry*, 79(5) :1932–1938. [8](#), [12](#)
- [Derossi et al., 1994] Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269(14) :10444–10450. [8](#), [9](#)
- [Devaux et al., 2008] Devaux, P. F., Herrmann, A., Ohlwein, N., and Kozlov, M. M. (2008). How lipid flippases can modulate membrane structure. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1778(7-8) :1591–1600. [61](#)

- [Elani et al., 2012] Elani, Y., DeMello, A. J., Niu, X., and Ces, O. (2012). Novel technologies for the formation of 2-D and 3-D droplet interface bilayer networks. *Lab on a Chip*, 12(18) :3514. [83](#)
- [Elani et al., 2016] Elani, Y., Solvas, X. C. I., Edel, J. B., Law, R. V., and Ces, O. (2016). Microfluidic generation of encapsulated droplet interface bilayer networks (multisomes) and their use as cell-like reactors. *Chem. Commun.*, 52(35) :5961–5964. [84](#), [85](#)
- [Evans et al., 1995] Evans, E., Ritchie, K., and Merkel, R. (1995). Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces. *Biophysical Journal*, 68(6) :2580–2587. [26](#), [31](#)
- [Fawell et al., 1994] Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y., Moore, C., Chen, L. L., Pepinsky, B., and Barsoum, J. (1994). Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(2) :664–668. [8](#)
- [Finer et al., 1994] Finer, J. T., Simmons, R. M., and Spudich, J. A. (1994). Single myosin molecule mechanics : Piconewton forces and nanometre steps. *Nature*, 368(6467) :113–119. [24](#)
- [Frankel and Pabo, 1988] Frankel, A. D. and Pabo, C. O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 55(6) :1189–1193. [7](#), [8](#)
- [Frenz et al., 2008] Frenz, L., Blouwolff, J., Griffiths, A. D., and Baret, J. C. (2008). Microfluidic production of droplet pairs. *Langmuir*, 24(20) :12073–12076. [84](#)
- [Funakoshi et al., 2006] Funakoshi, K., Suzuki, H., and Takeuchi, S. (2006). Lipid bilayer formation by contacting monolayers in a microfluidic device for membrane protein analysis. *Analytical Chemistry*, 78(24) :8169–8174. [53](#), [54](#)
- [Futaki et al., 2001] Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., and Sugiura, Y. (2001). Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *Journal of Biological Chemistry*, 276(8) :5836–5840. [7](#), [8](#)
- [Gañán-Calvo, 1998] Gañán-Calvo, A. M. (1998). Generation of Steady Liquid Microthreads and Micron-Sized Monodisperse Sprays in Gas Streams. *Physical Review Letters*, 80(2) :285–288. [81](#)
- [Gañán-Calvo and Gordillo, 2001] Gañán-Calvo, A. M. and Gordillo, J. M. (2001). Perfectly Monodisperse Microbubbling by Capillary Flow Focusing. *Physical Review Letters*, 87(27) :274501–274501–4. [81](#), [82](#)
- [Gopalan et al., 2010] Gopalan, P., Ahn, B., and Oh, K. W. (2010). SERIAL MICROFLUIDIC DEVICE FOR MICRO DROPLET TRAPPING AND PAIRING. In *ASME 2010 International Mechanical Engineering Congress and Exposition*, pages 1–2. [84](#), [85](#), [88](#), [91](#)
- [Gosse and Croquette, 2002] Gosse, C. and Croquette, V. (2002). Magnetic tweezers : Micromanipulation and force measurement at the molecular level. *Biophysical Journal*, 82(6) :3314–3329. [25](#)
- [Gump and Dowdy, 2007] Gump, J. M. and Dowdy, S. F. (2007). TAT transduction : the molecular mechanism and therapeutic prospects. *Trends in Molecular Medicine*, 13(10) :443–448. [74](#)
- [Harder et al., 1998] Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P., and Simons, K. (1998). Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *Journal of Cell Biology*, 141(4) :929–942. [6](#)

- [Herce et al., 2009] Herce, H. D., Garcia, A. E., Litt, J., Kane, R. S., Martin, P., Enrique, N., Rebolledo, A., and Milesi, V. (2009). Arginine-rich peptides destabilize the plasma membrane, consistent with a pore formation translocation mechanism of cell-penetrating peptides. *Biophysical Journal*, 97(7) :1917–1925. 37, 50
- [Huang et al., 2011] Huang, J., Lein, M., Gunderson, C., and Holden, M. A. (2011). Direct quantitation of peptide-mediated protein transport across a droplet-interface bilayer. *Journal of the American Chemical Society*, 133(40) :15818–15821. 55
- [Hwang et al., 2008] Hwang, W. L., Chen, M., Cronin, B., Holden, M. A., and Bayley, H. (2008). Asymmetric droplet interface bilayers. *Journal of the American Chemical Society*, 130(18) :5878–5879. 54, 55, 61
- [Iwamoto et al., 2018] Iwamoto, M., Elfaramawy, M. A., Yamatake, M., Matsuura, T., and Oiki, S. (2018). Concurrent In Vitro Synthesis and Functional Detection of Nascent Activity of the KcsA Channel Under a Membrane Potential Concurrent In Vitro Synthesis and Functional Detection of Nascent Activity of the KcsA Channel Under a Membrane Potential. *ACS Synthetic Biology*. 55
- [Jégou, 2008] Jégou, A. (2008). *Étude de l’Adhésion Gamétique par Mesure de Force ; Modulation des propriétés d’adhésion par organisation des protéines membranaires*. PhD thesis, Paris Diderot (Paris VII). 31
- [Jiao et al., 2009] Jiao, C. Y., Delaroche, D., Burlina, F., Alves, I. D., Chassaing, G., and Sagan, S. (2009). Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. *Journal of Biological Chemistry*, 284(49) :33957–33965. 15, 16, 74
- [Joanne et al., 2009] Joanne, P., Galanth, C., Goasdoué, N., Nicolas, P., Sagan, S., Lavielle, S., Chassaing, G., El Amri, C., and Alves, I. D. (2009). Lipid reorganization induced by membrane-active peptides probed using differential scanning calorimetry. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1788(9) :1772–1781. 16
- [Joliot et al., 1991] Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H., and Prochiantz, A. (1991). Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(5) :1864–1868. 7, 9
- [Kawamoto et al., 2011] Kawamoto, S., Takasu, M., Miyakawa, T., Morikawa, R., Oda, T., Futaki, S., and Nagao, H. (2011). Inverted micelle formation of cell-penetrating peptide studied by coarse-grained simulation : Importance of attractive force between cell-penetrating peptides and lipid head group. *Journal of Chemical Physics*, 134(9). 16
- [Kijac et al., 2007] Kijac, A. Z., Li, Y., Sligar, S. G., and Rienstra, C. M. (2007). Magic-angle spinning solid-state NMR spectroscopy of nanodisc-embedded human CYP3A4. *Biochemistry*, 46(48) :13696–13703. 52
- [Kotz et al., 2017] Kotz, F., Arnold, K., Bauer, W., Schild, D., Keller, N., Sachsenheimer, K., Nargang, T. M., Richter, C., Helmer, D., and Rapp, B. E. (2017). Three-dimensional printing of transparent fused silica glass. *Nature*, 544(7650) :337–339. 80
- [Kučerka et al., 2011] Kučerka, N., Nieh, M. P., and Katsaras, J. (2011). Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1808(11) :2761–2771. 67
- [Langel et al., 1996] Langel, Ü., Pooga, M., Kairane, C., Zilmer, M., and Bartfai, T. (1996). A galanin-mastoparan chimeric peptide activates the Na⁺,K⁺-ATPase and reverses its inhibition by ouabain. *Regulatory Peptides*, 62(1) :47–52. 11

- [Li et al., 2007] Li, F., Pincet, F., Perez, E., Eng, W. S., Melia, T. J., Rothman, J. E., and Tareste, D. (2007). Energetics and dynamics of SNAREpin folding across lipid bilayers. *Nature Structural and Molecular Biology*, 14(10) :890–896. [20](#)
- [Li et al., 2017] Li, X., Huang, J., Holden, M. A., and Chen, M. (2017). Peptide-Mediated Membrane Transport of Macromolecular Cargo Driven by Membrane Asymmetry. *Analytical Chemistry*, 89(22) :12369–12374. [55](#)
- [Mager and Melosh, 2007] Mager, M. D. and Melosh, N. A. (2007). Lipid bilayer deposition and patterning via air bubble collapse. *Langmuir*, 23(18) :9369–9377. [49](#)
- [Maniti et al., 2010] Maniti, O., Alves, I., Trugnan, G., and Ayala-Sanmartin, J. (2010). Distinct behaviour of the homeodomain derived cell penetrating peptide penetratin in interaction with different phospholipids. *PLoS ONE*, 5(12). [9](#)
- [Marty et al., 2013] Marty, M. T., Wilcox, K. C., Klein, W. L., and Sligar, S. G. (2013). Nanodisc-solubilized membrane protein library reflects the membrane proteome. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(12) :4009–4016. [52](#)
- [Matosevic and Paegel, 2011] Matosevic, S. and Paegel, B. M. (2011). Stepwise synthesis of giant unilamellar vesicles on a microfluidic assembly line. *Journal of the American Chemical Society*, 133(9) :2798–2800. [48](#)
- [Mazutis et al., 2009a] Mazutis, L., Baret, J.-C., and Griffiths, A. D. (2009a). A fast and efficient microfluidic system for highly selective one-to-one droplet fusion. *Lab on a Chip*, 9(18) :2665. [82](#)
- [Mazutis et al., 2009b] Mazutis, L., Baret, J.-C., Treacy, P., Skhiri, Y., Araghi, A. F., Ryckelynck, M., Taly, V., and Griffiths, A. D. (2009b). Multi-step microfluidic droplet processing : kinetic analysis of an in vitro translated enzyme. *Lab on a Chip*, 9(20) :2902. [83](#)
- [Mitchell et al., 2000] Mitchell, D. J., Steinman, L., Kim, D. T., Fathman, C. G., and Rothbard, J. B. (2000). Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *Journal of Peptide Research*, 56(5) :318–325. [12](#)
- [Morris et al., 2001] Morris, M. C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F., and Divita, G. (2001). TECHNICAL REPORT A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Cell*, 19(December) :1173–1176. [8](#), [12](#)
- [Mueller et al., 1962] Mueller, P., Rudin, D. O., Ti Tien, H., and Wescott, W. C. (1962). Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature*, 194(4832) :979–980. [50](#)
- [Nakase et al., 2012] Nakase, I., Konishi, Y., Ueda, M., Saji, H., and Futaki, S. (2012). Accumulation of arginine-rich cell-penetrating peptides in tumors and the potential for anticancer drug delivery in vivo. *Journal of Controlled Release*, 159(2) :181–188. [17](#)
- [Naumann et al., 1995] Naumann, R., Jonczyk, A., Kopp, R., van Esch, J., Ringsdorf, H., Knoll, W., and Gräber, P. (1995). Incorporation of Membrane Proteins in Solid-Supported Lipid Layers. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 34(18) :2056–2058. [50](#)
- [Neher and Sakmann, 1976] Neher, E. and Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260(5554) :799–802. [35](#), [37](#)

- [Nguyen et al., 2016] Nguyen, M.-A., Srijanto, B., Collier, C. P., Retterer, S. T., and Sarles, S. A. (2016). Hydrodynamic trapping for rapid assembly and in situ electrical characterization of droplet interface bilayer arrays. *Lab Chip*, 16(18) :3576–3588. [84](#), [85](#), [90](#)
- [Oiki and Iwamoto, 2018] Oiki, S. and Iwamoto, M. (2018). Lipid bilayers manipulated through monolayer technologies for studies of channel-membrane interplay. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 41(3) :303–311. [55](#)
- [Olson et al., 2009] Olson, E. S., Aguilera, T. a., Jiang, T., Ellies, L. G., T, Q., Wong, E., Gross, L., and Tsien, R. Y. (2009). In vivo characterization of activatable cell penetrating peptides for targeting protease activity in cancer. *Integrative Biology*, 1 :382–393. [17](#)
- [Oteyza et al., 2014] Oteyza, D. G. D., Gorman, P., Chen, Y.-C., Wickenburg, S., Riss, A., Mowbray, D. J., Etkin, G., Pedramrazi, Z., Tsai, H.-Z., Rubio, A., Crommie, M. F., and Fisher, F. R. (2014). Direct Imaging of Covalent Bond Structure in Single-Molecule Chemical Reactions Dimas. *Science*, 1434(2013) :1434–1438. [21](#)
- [Perez et al., 2008] Perez, E., Li, F., Taresté, D., and Pincet, F. (2008). The Surface Force Apparatus to Reveal the Energetics of Biomolecules Assembly. Application to DNA Bases Pairing and SNARE Fusion Proteins Folding. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 1(4) :240–246. [19](#), [20](#)
- [Pincet et al., 2016] Pincet, F., Adrien, V., Yang, R., Delacotte, J., Rothman, J. E., Urbach, W., and Taresté, D. (2016). FRAP to characterize molecular diffusion and interaction in various membrane environments. *PLoS ONE*, 11(7) :1–19. [50](#), [63](#)
- [Pincet and Husson, 2005] Pincet, F. and Husson, J. (2005). The solution to the streptavidin-biotin paradox : The influence of history on the strength of single molecular bonds. *Biophysical Journal*, 89(6) :4374–4381. [31](#)
- [Plénat et al., 2005] Plénat, T., Boichot, S., Dosset, P., Milhiet, P. E., and Le Grimmeléc, C. (2005). Coexistence of a two-states organization for a cell-penetrating peptide in lipid bilayer. *Biophysical Journal*, 89(6) :4300–4309. [23](#)
- [Pooga et al., 2017] Pooga, M., Hallbrink, M., Zorko, M., and Langel, U. (2017). Cell penetration by transportan. *The FASEB Journal*, 12(1) :67–77. [8](#), [11](#)
- [Poulin and Bibette, 1998] Poulin, P. and Bibette, J. (1998). Adhesion of Water Droplets in Organic Solvent. *Langmuir*, 14(22) :6341–6343. [55](#), [57](#)
- [Richard et al., 2003] Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L. V., and Lebleu, B. (2003). Cell-penetrating peptides : A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1) :585–590. [15](#)
- [Rodriguez et al., 2005] Rodriguez, N., Pincet, F., and Cribier, S. (2005). Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation : A comparison by fluorescence microscopy. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 42(2) :125–130. [48](#)
- [Rounsevell et al., 2004] Rounsevell, R., Forman, J. R., and Clarke, J. (2004). Atomic force microscopy : Mechanical unfolding of proteins. *Methods*, 34(1) :100–111. [23](#)
- [Säälik et al., 2011] Säälik, P., Niinep, A., Pae, J., Hansen, M., Lubenets, D., Langel, Ü., and Pooga, M. (2011). Penetration without cells : Membrane translocation of cell-penetrating peptides in the model giant plasma membrane vesicles. *Journal of Controlled Release*, 153(2) :117–125. [49](#)

- [Schwarze et al., 1999] Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-akbani, A., Dowdy, S. F., Schwarze, S. R., Ho, A., and Vocero-akbani, A. (1999). In vivo Protein Transduction : Delivery of a Biologically Active Protein into the Mouse. *Science*, 285(5433) :1569–1572. [17](#)
- [Scopigno et al., 2017] Scopigno, R., Cignoni, P., Pietroni, N., Callieri, M., and Dellepiane, M. (2017). Digital Fabrication Techniques for Cultural Heritage : A Survey. *Computer Graphics Forum*, 36(1) :6–21. [80](#)
- [Sharonov and Hochstrasser, 2007] Sharonov, A. and Hochstrasser, R. M. (2007). Single-molecule imaging of the association of the cell-penetrating peptide Pep-1 to model membranes. *Biochemistry*, 46(27) :7963–7972. [49](#)
- [Shin et al., 2012] Shin, Y., Han, S., Jeon, J. S., Yamamoto, K., Zervantonakis, I. K., Sudo, R., Kamm, R. D., and Chung, S. (2012). NIH Public Access. *Nature Protocols*, 40(6) :1301–1315. [78](#)
- [Singer and Nicolson, 1972] Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972). The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science*, 175(4023) :720–731. [5](#)
- [Soule, 2015] Soule, P. P. (2015). *Étude des mécanismes de translocation des Peptides Pénétrateurs de Cellules (CPP) à l'aide de techniques biophysiques*. PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie. [27](#), [51](#), [53](#), [70](#), [71](#)
- [Stan et al., 2009] Stan, C. A., Tang, S. K. Y., and Whitesides, G. M. (2009). Independent control of drop size and velocity in microfluidic flow-focusing generators using variable temperature and flow rate. *Analytical Chemistry*, 81(6) :2399–2402. [82](#), [84](#)
- [Stanley et al., 2010] Stanley, C. E., Elvira, K. S., Niu, X. Z., Gee, A. D., Ces, O., Edel, J. B., and DeMello, A. J. (2010). A microfluidic approach for high-throughput droplet interface bilayer (DIB) formation. *Chemical Communications*, 46(10) :1620. [83](#)
- [Szoka and Papahadjopoulos, 1980] Szoka, F. and Papahadjopoulos, D. (1980). COMPARATIVE PROPERTIES AND METHODS OF PREPARATION OF LIPID VESICLES (LIPOSOMES). *Cancer Research*, pages 467–508. [46](#)
- [Thiam et al., 2011] Thiam, A. R., Bremond, N., and Bibette, J. (2011). Adhesive emulsion bilayers under an electric field : From unzipping to fusion. *Physical Review Letters*, 107(6). [84](#)
- [Thiam et al., 2012] Thiam, A. R., Bremond, N., and Bibette, J. (2012). From stability to permeability of adhesive emulsion bilayers. *Langmuir*, 28(15) :6291–6298. [54](#), [89](#)
- [Thompson et al., 2007] Thompson, J. R., Heron, A. J., Santoso, Y., and Wallace, M. I. (2007). Enhanced stability and fluidity in droplet on hydrogel bilayers for measuring membrane protein diffusion. *Nano Letters*, 7(12) :3875–3878. [6](#), [63](#)
- [Thorsen et al., 2001] Thorsen, T., Roberts, R. W., Arnold, F. H., and Quake, S. R. (2001). Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device. *Physical Review Letters*, 86(18) :4163–4166. [81](#), [83](#)
- [Tsofina et al., 1966] Tsofina, L. M., Liberman, E. A., and Babakov, A. V. (1966). Production of bimolecular protein-lipid membranes in aqueous solution. *Nature*, 212(5063) :681–683. [53](#)
- [van Meer, 2011] van Meer, G. (2011). Dynamic transbilayer lipid asymmetry. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(5) :1–11. [61](#)

- [Vives et al., 1997] Vives, E., Brodin, P., and Lebleu, B. (1997). A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus. *The Journal of biological chemistry*, 272(25) :16010–16017. [8](#)
- [Walrant et al., 2011] Walrant, A., Correia, I., Jiao, C. Y., Lequin, O., Bent, E. H., Goasdoué, N., Lacombe, C., Chassaing, G., Sagan, S., and Alves, I. D. (2011). Different membrane behaviour and cellular uptake of three basic arginine-rich peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1808(1) :382–393. [57](#)
- [Walrant et al., 2013] Walrant, A., Matheron, L., Cribier, S., Chaignepain, S., Jobin, M. L., Sagan, S., and Alves, I. D. (2013). Direct translocation of cell-penetrating peptides in liposomes : A combined mass spectrometry quantification and fluorescence detection study. *Analytical Biochemistry*, 438(1) :1–10. [48](#)
- [Ward et al., 2005] Ward, T., Faivre, M., Abkarian, M., and Stone, H. A. (2005). Microfluidic flow focusing : Drop size and scaling in pressure versus flow-rate-driven pumping. *Electrophoresis*, 26(19) :3716–3724. [82](#)
- [Wender et al., 2008] Wender, P. A., Galliher, W. C., Goun, E. A., Jones, L. R., and Pillow, T. H. (2008). The design of guanidinium-rich transporters and their internalization mechanisms. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(4-5) :452–472. [16](#)
- [Williams et al., 1997] Williams, E. J., Dunican, D. J., Green, P. J., Howell, F. V., Derossi, D., Walsh, F. S., and Doherty, P. (1997). Selective inhibition of growth factor-stimulated mitogenesis by a cell-permeable Grb2-binding peptide. *The Journal of biological chemistry*, 272(35) :22349–22354. [8](#), [12](#)
- [Xu et al., 2012] Xu, J., Ahn, B., Lee, H., Xu, L., Lee, K., Panchapakesan, R., and Oh, K. W. (2012). Droplet-based microfluidic device for multiple-droplet clustering. *Lab Chip*, 12(4) :725–730. [84](#)
- [Yin et al., 1995] Yin, H., Wang, M. D., Svoboda, K., Landick, R., Block, S. M., and Gelles, J. (1995). Transcription Against an Applied Force. *Science*, 270(5242) :1653–1657. [24](#)

Sujet : Étude des mécanismes de translocation des Peptides Pénétrateurs de Cellules

approche en microfluidique, électrophysiologie et mesures de forces

Résumé : Faire traverser une membrane cellulaire à des molécules bioactives est un enjeu majeur dans des perspectives thérapeutiques ou de diagnostique. En effet l'activité de nombreuses molécules bioactives, médicaments ou agents de contraste pour l'imagerie médicale, est limitée par leur faible capacité à entrer à l'intérieur des cellules cibles. Les "Cell Penetrating Peptides" (CPP), possède la propriété de traverser la membrane cellulaire en entraînant des molécules bioactives liées covalamment ou non. Les CCP permettent ainsi d'améliorer l'efficacité et le ciblage de molécules telles que des acides nucléiques (siRNA ou plasmide), des protéines...

Nous cherchons à obtenir une description détaillée (cinétique et énergétique) des différentes étapes (adhésion/insertion/traversée) de l'interaction des CPP avec la membrane d'une cellule. Nous développons une approche originale couplant une mesure de force d'interaction entre les CPP et la membrane via la technique du "Biomembrane Force Probe" et une mesure électrique de type électrophysiologie permettant de déterminer le degré d'insertion des CPP dans la membrane et l'état de cette dernière. En parallèle, nous mettons en place des outils de microfluidique qui nous permettront de tester sur des systèmes modèles l'impact de différents paramètres (nature du lipide, charge, température...) sur la traversée d'une membrane par un CPP.

Mots clés : Biophysique, Cell Penetrating Peptides, Translocation, Biomembrane Force Probe, Électrophysiologie, Patch clamp, Bicouche à l'Interface de Goutte, Microfluidique

Subject : Investigation of Cell Penetrating Peptide (CPP) translocation

Abstract: Cell Penetrating Peptides (CPPs) are known to be able to cross cell membranes with a cargo through two different mechanisms: endocytosis and direct translocation. However, the molecular mechanism of the translocation remains unknown. Our objectives are to find the intermediate structures formed by the CPP and the protein, sugar, and lipid partners, to quantify the strength of the interactions and to measure the kinetics of the steps of the interaction of a CPP with a membrane. This is achieved by using two approaches:

(i) coupled BioMembrane Force and electrophysiology, (ii) model membrane in inverse emulsions. (i) Biomembrane Force Probe is a technique for measuring the adhesion force between few molecules grafted on a micrometric bead and a target cell or a liposome. This technique has been used to identify partners of CPP at the cell surface. Electrophysiological measurements on the target cell enable to detect a possible perturbation of a membrane interacting with CPPs. (ii) Inverse emulsions are aqueous droplets into oil covered by lipids. At the interface between two adhering droplets a bilayer is formed. We monitor the translocation of fluorescently labeled CPP through this bilayer. The translocation of several CPPs through negatively charged bilayer within tens of minutes has been detected. The nature of the lipids and the asymmetry of the bilayer seem to impact the translocation. We are currently improving the formation of the pairs of droplets with microfluidic devices for statistical analysis.

Keywords : Biophysic, Cell Penetrating Peptides, Translocation, Biomembrane Force Probe, Electrophysiology, Patch clamp, Droplet Interface Bilayers, Microfluidic