



**HAL**  
open science

# Analyse des interactions molécules-membranes et conception de vecteurs lipidiques sélectifs

Ofelia Maniti

► **To cite this version:**

Ofelia Maniti. Analyse des interactions molécules-membranes et conception de vecteurs lipidiques sélectifs. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Claude Bernard Lyon 1, 2022. tel-04428420

**HAL Id: tel-04428420**

**<https://hal.science/tel-04428420>**

Submitted on 6 Feb 2024

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

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

Public Domain

**Rapport d'activité en vue de l'obtention de  
l'Habilitation à Diriger des Recherches**

**Analyse des interactions molécules-membranes et conception de vecteurs  
lipidiques sélectifs**

**Présenté par**

**Ofelia MANITI**

**Le 22 juin 2022  
devant**

**l'Université Claude BERNARD Lyon 1**

**Jury:**

**Dr. Grégory DURAND, Avignon Université**

**Dr. Thierry DURAND, Université de Montpellier**

**Prof. Agnès GIRARD-EGROT, Université Claude Bernard Lyon 1**

**Prof. Catherine PICART, CEA, Grenoble**

**Dr. Christophe MARQUETTE, Université Claude Bernard Lyon 1 -CNRS**

**Prof. Patrick SAULNIER, Université d'Angers**

**Dr. André SCHRODER, INSA de Lyon-CNRS**



## Table des matières

<b>Liste des abréviations</b> .....	5
<b>Introduction</b> .....	7
<b>1. Parcours de recherche</b> .....	7
<b>2. Activité pédagogique</b> .....	10
<b>3. Responsabilités pédagogiques</b> .....	12
<b>4. Encadrement doctoral et scientifique :</b> .....	13
<b>Thèse de doctorat</b> .....	17
<i>La créatine kinase mitochondriale – organisatrice de la membrane mitochondriale ? Ségrégation de la cardiolipine sur des monocouches phospholipidiques. Perturbations induites par un agent issu de la peroxydation lipidique, le 4-hydroxynonéal.</i> .....	17
<b>1. La Créatine kinase mitochondriale</b> .....	18
<b>2. La membrane interne de la mitochondrie</b> .....	21
<b>3. Modèle membranaire d'étude</b> .....	22
<b>4. Formation de complexes Cardiolipine-CKmt visualisés par microscopie à l'angle de Brewster</b> ....	24
<b>5. Influence de la composition en chaînes acyles de la CL sur la formation de complexes protéine-lipide</b> .....	26
<b>6. Action de l'agent oxydant 4-hydroxynonéal sur la formation de complexes protéine-lipide</b> .....	29
<b>7. La fixation de la CKmt à la monocouche analysée par mesures électrochimiques</b> .....	30
<b>7.1. Insertion de la CKmt dans la monocouche de CL</b> .....	33
<b>7.2 Stabilisation de la membrane par rapport aux variations de potentiel suite à la fixation de la CKmt</b> .....	34
<b>7.3 Deux étapes dans l'interaction CKmt-monocouche: adsorption suivie par l'insertion de segments protéiques</b> .....	35
<b>8. Réorientation des domaines protéiques par Spectroscopie Infrarouge de Réflexion – Absorption par Modulation de Polarisation (PM-IRRAS)</b> .....	37
<b>8.1 Orientation de la CKmt à l'interface air-tampon</b> .....	38
<b>8.2 Changements d'orientation des domaines protéiques suite à l'interaction avec la monocouche</b> .....	39
<b>9. Suite du projet – développements ultérieurs</b> .....	42
<b>Premier stage Postdoctoral (2008-2009)</b> .....	45
<i>Mécanisme d'interaction des peptides basiques de type vecteur avec des membranes modèles et biologiques</i> ...	45
<b>1. L'endocytose physique comme voie d'entrée des peptides vecteurs basiques à l'intérieur des cellules</b> .....	47
<b>2. Tubulations induites par la pénétratine sur les vésicules issues de la membrane plasmique</b> .....	51
<b>3. Est-ce que la capacité de former de tubulations au niveau de la membrane est spécifique à la pénétratine ?</b> .....	53
<b>Deuxième stage Postdoctoral (2009-2011)</b> .....	59
<i>Interactions des protéines recombinantes de la famille ERM (Ezrine/Radixine/Moésine) avec l'actine et des membranes phospholipidiques biomimétiques</i> .....	59
<b>Maître de conférences</b> .....	71
<b>Université Claude Bernard Lyon 1, UMR 5246</b> .....	71
<b>1. Présentation générale de thématiques de recherche</b> .....	72
<b>1.1. Liposomes sur mesure pour le ciblage des cellules tumorales</b> .....	72
<b>1.2. Fluidité des vésicules extracellulaires</b> .....	73

1.3.	Rôles des structures lipidiques dans les articulations synoviales .....	74
1.4.	Analyse des mécanismes impliqués dans l'interaction liposomes – membranes en utilisant des bicouches lipidiques supportées biomimétique .....	74
2.	La membrane lipidique au cœur du ciblage tumoral : vers de nouveaux vecteurs, thérapeutiques liposomaux .....	75
2.1	Le contexte du projet.....	75
2.2	Ciblages des cellules tumorales: avec ou sans anticorps ? .....	80
2.3	Premiers test d'interaction liposomes-cellules.....	83
2.4	Encapsulation d'un principe actif dans les liposomes de fluidité membranaire variable .....	89
2.5	Le mécanisme de ciblage basé sur la fluidité membranaire est-il un mécanisme plus général? .	95
2.6	Vers des méthodes d'analyse moins invasives: corrélation fluidité liposomes / vésicules extracellulaires de type exosomes .....	95
3.	Comment transformer les résultats prometteurs obtenus <i>in cellulo</i> en un nanovecteur de nouvelle génération efficace prêt à l'utilisation <i>in vivo</i> ? .....	97
4.	Vers des modèles d'étude plus complexes: analyse de la biodistribution et du ciblage tumoral ...	103
5.	Aspects mécanistiques de l'interaction liposomes - membrane .....	103
6.	Mise au point d'une méthode de dosage de membranes à l'aide du fluorophore Dioll .....	109
7.	Rôles de structures lipidiques dans les articulations synoviales.....	111
Conclusion .....		115

## Liste des abréviations

4-HNE	4-hydroxynonéal
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AFM	Microscopie à Force Atomique
ANT	<i>Adenosine Nucleotide Translocator</i>
ARA	<i>Anti Reflecting and made of Absorbing material</i>
ATP	Adénosine TriPhosphate
BAM	Microscopie à l'Angle de Brewster
BALM	<i>Backside Absorbing Layer Microscopy</i>
CF	Carboxyfluorescéine
CCD	Dispositif à transfert de charges (pour <i>Charge Coupled Device</i> )
CD	Dichroïsme circulaire
Chol	Cholestérol
CK	Créatine kinase
CKmt	Créatine kinase mitochondriale
CL	Cardiolipine
COX	Cytochrome C Oxydase
CPP	<i>Cell penetrating peptides</i>
CR	Cytochrome C NADPH Réductase
cryo-TEM	Cryo-Microscopie Electronique à Transmission
CTCF	<i>Corrected Total Cell Fluorescence</i>
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
DAPC	1,2-DiArachidoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-PhosphatidylCholine
DiI	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DLPC	1,2-DiLinoléoyl- <i>sn</i> -glycéro-3- PhosphatidylCholine
DLS	« <i>Dynamic Light Scattering</i> » ou diffusion dynamique de la lumière
DMPC	1,2-DiMyristoyl- <i>sn</i> -glycéro-3- PhosphatidylCholine
DOGS-NTA	« <i>1,2-DiOleoyl-<i>sn</i>-Glycero-3-[(N-(5-amino-1-carboxyentyl) iminodiacetic acid) Succinyl]</i> »
DOPC	1,2-DiOléoyl- <i>sn</i> -glycéro-3- PhosphatidylCholine
DOPE	1,2-DiOléoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-PhosphatidylEthanolamine
DPPC	1,2-DiPalmitoyl- <i>sn</i> -glycéro-3- PhosphatidylCholine
DPPT	1,2-DiPalmitoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-PhosphoThioéthanol
DSPC	1,2-DiStéaroyl- <i>sn</i> -glycéro-3- PhosphatidylCholine
DTX	Docétaxel
EDTA	ÉthylèneDiamineTétraAcétique
EGFR	« <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> » ou récepteur au facteur de croissance épidermique
EPR	<i>Enhanced Permeability and Retention</i>
ERM	Ezrine/Radixine/Moésine
FERM	<i>4.1 Protein</i> /Ezrine/Radixine/Moésine
FRAP	« <i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i> » ou recouvrement de fluorescence après photoblanchiment
FTIR	<i>Fourier Transformed Infrared Spectroscopy</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GP	« <i>Generalized Polarization</i> » ou polarisation généralisée
GPMV	Vésicules Géantes de la Membrane Plasmique
GUV	Vésicule unilamellaire géante (« <i>Giant Unilamellar Vesicle</i> »)

HER2	<i>Human Epithelial Receptor 2</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IR	Infrarouge
LDH	Lactate DésHydrogénase
LUT	« <i>LookUp Table</i> » ou table de conversion
LUV	« <i>Large Unilamellar Vesicle</i> » ou grande vésicule unilamellaire
MLV	« <i>MultiLamellar Vesicle</i> » ou vésicule multilamellaire
MMAE	MonoMéthyle Auristatine E
NBD-PE	N-(7-Nitro-2-1,3-BenzoxaDiazol-4-yl)-1,2-dioléoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-PhosphatidylEthanolamine
NDPK	nucléotide diphosphate kinase
P19-4H	Peptide pilotis
PA	Phosphatase Alcaline
PAH	Peptide fusogène
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PC	PhosphatidylCholine
PE	PhosphatidylEthanolamine
PEG	PolyÉthylène Glycol
pep-tBLM	<i>peptide-tethered Bilayer Lipid Membrane</i>
PFA	<i>paraFormAldéhyde</i>
PI	PhosphatidylInositol
PIP <sub>2</sub>	phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate
PIP <sub>3</sub>	phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
pcn	potentiel de charge nulle
PM-IRRAS	Spectroscopie Infrarouge de Réflexion – Absorption par Modulation de Polarisation
POPC	1-Palmitoyl-2-Ooléoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-PhosphatidylCholine
PS	PhosphatidylSérine
Rhod-PE	N-(lissamine Rhodamine B sulfonyl)-1,2-dioléoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-PhosphatidylEthanolamine
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
SL	Sphingolipide
SLB	<i>Supported Lipid Bilayer</i>
SM	SphingoMyéline
SPR	« <i>Surface Plasmon Resonance</i> » - résonance plasmonique de surface
SPRi	Imagerie par SPR
SUV	« <i>Small Unilamellar Vesicle</i> » ou petite vésicule unilamellaire
tBLM	<i>tethered Bilayer Lipid Membrane</i>
TIRF	« <i>Total Internal Reflection Fluorescence</i> » ou fluorescence par réflexion totale interne
T <sub>m</sub>	Température de transition de phase
VDAC	<i>Voltage Dependent Anion Channel</i>

## Introduction

Mon activité scientifique s'organise, depuis ma thèse, autour des membranes biologiques et des interactions molécules-membranes, en utilisant à la fois des membranes biomimétiques, des membranes de cellules en culture ou des vésicules d'origine naturelle. La nature des molécules analysées englobe plusieurs catégories : des protéines, comme la créatine kinase mitochondriale ou les protéines de la famille Ezrine/Radixine/Moésine (ERM), des peptides, comme la pénétratine, des molécules thérapeutiques ou toxiques, incluant des assemblages supramoléculaires de type liposomes.

### **1. Parcours de recherche**

Pendant ma thèse, soutenue le 2 octobre 2008 devant l'Université Claude Bernard Lyon 1 et réalisée dans l'équipe des Drs. Thierry Granjon et Olivier Marcillat, j'ai analysé l'interaction de la créatine kinase mitochondriale (CKmt) avec la membrane interne de la mitochondrie. Dans cette étude, ce n'est pas le partenaire d'interaction qui était recherché, mais les conséquences de l'interaction sur l'organisation protéolipidique de la membrane, notamment la ségrégation de la cardiolipine, un phospholipide anionique présent dans la membrane interne de la mitochondrie, connu comme cible de fixation de la CKmt. L'important dans ces travaux est l'utilisation de trois techniques couplées aux monocouches de Langmuir en tant que modèle membranaire. Ces techniques (microscopie à l'angle de Brewster (BAM), spectroscopie infrarouge à l'interface air-tampon (PM-IRRAS) et mesures de capacité différentielle d'une électrode de mercure en contact avec la monocouche) sont peu connues, mais elles ont donné un nombre important d'informations par rapport aux mécanismes moléculaires de l'interaction. Je décrirai plus loin ces techniques et les résultats majeurs qui ont été obtenus. Mes travaux de thèse ont mené à la publication de 10 articles. J'ai annexé à cette rédaction les 4 articles qui me semblent les plus importants.

En ce qui concerne le premier stage postdoctoral réalisé à l'Université Pierre et Marie Curie, Paris, dans l'équipe du Dr. Jesus Ayala Sanmartin, je me suis intéressée à l'interaction de peptides vecteurs avec les membranes. Ces peptides ont une action de type "Cheval de Troie" : ils pénètrent dans la cellule en entraînant avec eux d'autres molécules. Le mécanisme d'action n'étant pas élucidé, l'hypothèse de travail du

laboratoire était une « endocytose physique » : en se fixant sur la membrane, la pénétratine forme des invaginations/tubulations qui sont ensuite internalisées avec leur contenu par les cellules. Ces phénomènes étant trop rapides *in cellulo*, l'équipe les avait mis en évidence sur des vésicules géantes de type GUV (*Giant unilamellar vesicles*). J'ai tout d'abord adapté au laboratoire un modèle membranaire très intéressant, de vésicules naturelles obtenues à partir de la membrane plasmique par bourgeonnement. L'effet des peptides sur ces vésicules est étonnant. Nous avons pu observer une richesse de structures qui inclue des tubulations vers l'intérieur ou vers l'extérieur de la vésicule, avec des dynamiques variables, des modifications de courbure membranaire, ainsi que la formation des domaines membranaires très rigides. Dans ce manuscrit, j'ai essayé d'illustrer ces propos avec des images de microscopie confocale. Au vue de ces effets, l'entrée des peptides dans les cellules impliquerait, non pas un seul, mais de multiples mécanismes. Ces travaux ont mené à la publication de 5 articles, dont 2 disponibles en annexes.

Le deuxième stage postdoctoral, réalisé au Laboratoire des Matériaux et du Génie Physique, dans l'équipe du Prof. Catherine Picart, à Grenoble, a porté sur l'étude des interactions des protéines de la famille des ERM (ezrine/radixine/moésine) avec la membrane plasmique et les filaments d'actine. Ces protéines participent à la fixation du cytosquelette d'actine à la membrane plasmique et sont impliquées dans les phénomènes liés à la motilité cellulaire. La fonction physiologique de ces protéines implique des mécanismes d'activation complexes, que nous avons réussis en partie à reproduire *in vitro*. Nous avons pu montrer que, lorsque l'ezrine ou la moésine se fixent à la membrane des liposomes, des changements de structure ont lieu, aboutissant à une structure tridimensionnelle de la protéine plus ouverte. Cependant, ces changements ne sont pas suffisants pour entraîner une fixation des filaments d'actine à la protéine et des phosphorylations supplémentaires pourraient se produire *in vivo* pour assurer le lien entre la membrane et le cytosquelette. J'ai également participé à une étude plus large de l'équipe du Prof. Steve Shaw concernant la fixation de la moésine à la membrane, menée à la fois *in vitro* et *in cellulo*. Cette étude est marquante car elle montre encore une fois la complexité de ces interactions. Ces travaux ont mené à 4 publications, dont 2 disponibles en annexe.

Depuis ma nomination comme Maître de conférences à l'Université Claude Bernard Lyon 1 en octobre 2011 à l'Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires,

dans l'Equipe Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires (GEMBAS), mon projet de recherche s'organise autour de la conception sur mesure de vecteurs lipidiques pour la délivrance de composés actifs et le ciblage spécifique de cellules tumorales avec plusieurs directions d'étude. En premier lieu, nous avons pu montrer, lors d'une première thèse encadrée sur le sujet et soutenue en décembre 2020, que nous pouvons cibler des cellules cancéreuses en assurant une compatibilité entre les propriétés physicochimiques des membranes du vecteur et celles de la cellule cible. La sélectivité du ciblage n'est pas due à un ciblage actif, *i.e.* anticorps, mais à une spécificité basée sur la fluidité membranaire qui peut être mesurée à l'aide d'une sonde créée à l'Institut, le Dioll. Ainsi nous avons pu montrer une distribution sélective des molécules vectorisées entre les lignées cellulaires non tumorales et les lignées cellulaires tumorales de prostate, qu'il s'agisse de fluorophores (Bompard et al. 2020) ou de principes actifs (Abawi et al. 2021). Outre les deux bourses obtenues par Julien Bompard et Ariana Abawi lors du concours à l'Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences Santé (EDISS), plusieurs projets ont permis de financer ces études (BQR Université Lyon 1 (2013-2014), Projet Ligue contre le Cancer (2015-2016), Projet ANR via l'institut Carnot-LiSa (2016-2017). J'ai également participé au développement des applications de la sonde Dioll (1 brevet et 2 articles soumis pour publication), qui a été soutenu par plusieurs projets financés (projet pre-maturation CNRS (2018-2019), suivi d'un projet de maturation financé par la Société d'accélération du transfert de technologies (SATT) Pulsalys (2019-2020), portés par le Dr. Thierry Granjon) et d'un projet collaboratif ICBMS-Centre de Recherche contre le Cancer de Lyon (CRCL), dans le cadre de l'appel d'offre PlasCan (2020-2021) porté par le Dr. Arnaud Vigneron.

Un autre axe de mes recherches actuelles porte sur la purification et l'analyse des propriétés physicochimiques des vésicules extracellulaires de type exosomes, ou *small extracellular vesicles sEV*. L'étude des sEV connaît actuellement un vrai essor car on leur attribue un rôle dans la formation des métastases. Le développement des nouvelles techniques d'analyse et de séparation de ces vésicules constitue le cœur du projet Pack Ambition Recherche FluiDiPlast, financé pour 5 ans par la région Auvergne Rhône-Alpes, projet collaboratif porté par le Dr. Arnaud Vigneron (CRCL) et impliquant les équipes LCO2-Glyco et GEMBAS de l'ICBMS, l'équipe GeParm du Laboratoire d'Automatique, de Génie des Procédés et de Génie Pharmaceutique (LAGEPP) et l'entreprise privée Covalab.

En parallèle, dans le cadre des projets portés par le Prof. Agnès Girard-Egrot, j'ai participé au développement de nouvelles membranes biomimétiques, à base de bicouches supportées sur des pilotis peptidiques (International Patent WO/2016/066947) (Girard-Egrot, Maniti, and Rebaud 2016). Ces membranes, très flexibles en termes de composition lipidiques, sont découplées du substrat et peuvent trouver de multiples applications comme l'insertion des protéines transmembranaires (Chadli et al. 2018, 2017), ou l'analyse par des techniques microscopiques des phénomènes de fusion membranaire (Bompard et al. 2021).

Enfin, je m'intéresse également aux vésicules synoviales, structures lipidiques multilamellaires secrétées par les synoviocytes au niveau de l'articulation. Les pathologies ostéoarticulaires, comme l'arthrose et l'arthrite rhumatoïde, induisent une déstructuration de ces assemblages vésiculaires. En collaboration avec l'équipe MecaLip du Laboratoire de Mécanique des Contacts et des Structures (LaMCoS), nous cherchons à comprendre le rôle de ces assemblages moléculaires sur les performances des articulations, dans le but de proposer des vésicules de substitution mimant les propriétés mécaniques et lubrifiantes des vésicules saines. Deux articles sont en préparation.

D'autres sujets/collaborations ont permis de diversifier mon activité de recherche dans différents projets, qui ont abouti à la publication de 15 articles en dehors de ceux mentionnés plus haut.

## **2. Activité pédagogique**

Mon activité d'enseignement se concentre dans les unités d'enseignement (UE) de Licence 2<sup>ème</sup> année (environ 90h) et 3<sup>ème</sup> année du parcours Biochimie de la licence Sciences de la Vie et de la Terre (SVT) (environ 60h). J'interviens également dans la Licence Professionnelle Analyse des Aliments et Substances Naturelles (15h) et dans les UE du tronc commun de L1 SVT (10h).

Depuis 2017, je suis responsable de l'UE de L3 Techniques Spectroscopiques en Biochimie. Dans le cadre de cette UE, j'encadre depuis mon recrutement les Travaux Pratiques (TP) portant sur l'analyse de l'activité enzymatique de l'invertase par polarimétrie et, plus récemment, les Travaux Dirigés (TD) portant sur les applications des méthodes spectroscopiques optiques. Depuis 2020, je suis responsable de l'UE

Prélèvement Echantillonnage Analyse et Traitement (PEAT) de la LPro Analyse des Aliments et Substances Naturelles. J'ai contribué à mettre en place cette UE, qui se déroule sur le site de l'Université et sur celui du Lycée Jean-Baptiste de la Salle, à Lyon, avec une équipe pédagogique mixte université/lycée.

Lors de mon recrutement, j'ai pu mettre en place une série de travaux dirigés portant sur l'expression de résultats et l'analyse de données dans l'UE de L2 Biochimie Expérimentale 1. J'ai mis en place, sur la même thématique, une série de TD dans le cadre de l'UE PEAT de la LPro Analyse des Aliments et Substances Naturelles.

De mes compétences en recherche, j'ai cherché à intervenir dans les enseignements portant sur la biochimie des lipides. J'assure une séance de travaux pratiques dans l'UE Projets Tuteurés et Biomolécules (2<sup>ème</sup> année licence Biochimie) sur l'encapsulation de l'acide ascorbique dans les liposomes, j'interviens en cours magistraux sur la structure des lipides dans la même UE. En 3<sup>ème</sup> année de licence, j'assure les Cours Magistraux (CM) et les TD portant sur les membranes biologiques dans l'UE Biochimie Structurale et Fonctionnelle 1. J'interviens également dans l'UE optionnelle Biomolécules et Applications Industrielles sur la vectorisation de principes actifs. Une autre thématique que j'ai privilégiée concerne la purification de protéines. J'assure deux séries de TP, l'une sur la purification du lysozyme à partir de blanc d'œuf dans l'UE de L2 Biochimie Techniques Préparatives et Analytiques en Biochimie, et l'autre sur la purification de la lactate déshydrogénase à partir d'un homogénat de foie de rat dans l'UE de L2 Sciences de la vie, Enzymologie et métabolisme. Depuis 2011, j'interviens également dans l'UE enzymologie en assurant les enseignements d'un groupe de TD.

J'interviens ponctuellement dans les UE de première année de L1 en tant qu'intervenant en TP et TD.

## Présentation synthétique des enseignements :

Enseignement	Niveau	Nature	Volume horaire*	Effectif de l'UE*
Techniques Spectroscopiques en Biochimie	L3	TD et TP	43	120
Biochimie Structurale et Fonctionnelle	L3	CM et TD	31	120
Enzymologie et métabolisme	L2	TP	32	500
Techniques préparatives et analytiques en Biochimie	L2	TP	32	120
Biochimie expérimentale	L2	TD	12	120
Enzymologie	L2	TD	10	120
Projets tutorés et Biomolécules	L2	TP	28	120
Biomolécules et applications industrielles	L2	CM	4.5	40
Biomolécules A	L1	TP	12	700
Prélèvement, échantillonnage, analyse et traitement	LPro	TD	18	12

\* en moyenne, peut varier légèrement selon le nombre d'inscrits

### 3. Responsabilités pédagogiques

Je suis actuellement responsable de deux Unités d'Enseignement : Techniques Spectroscopiques en Biochimie de L3 Biochimie (6 crédits, UE obligatoire) et Prélèvement, Echantillonnage, Analyse et Traitement de la Licence professionnelle Analyse des aliments et des Substances Naturelles-Qualité.

Depuis 2013, je suis référent pédagogique, j'assure le suivi pédagogique de 60 étudiants de première et deuxième année de licence, portail SVT – Université Lyon 1.

Je suis aussi membre de la Commission Pédagogique en charge d'instruire les dossiers d'admission en Licence SVT.

Depuis 2014, je suis responsable de la planification des enseignements (gestion des emplois du temps) de 2ème et 3ème année de Licence SVT, parcours Biochimie.

#### 4. Encadrement doctoral et scientifique

##### *Encadrement de thèses :*

- **Depuis octobre 2021** : Co-encadrante de la thèse de Mlle Ariana Abawi (70 %), directrice de thèse Pr. Agnès Girard-Egrot (30%): *Interactions vecteurs-membranes de cellules tumorales pour la délivrance optimisée de médicaments*
  - Monomethyl Auristatin E Grafted-Liposomes to Target Prostate Tumor Cell Lines. Abawi A, Wang X, Bompard J, Bérot A, Andretto V, Gudimard L, Devillard C, Petiot E, Joseph B, Lollo G, Granjon T, Girard-Egrot A, **Maniti O**. Int J Mol Sci. 2021 22(8):4103.
- **2017-2020**: Co-encadrante de la thèse de M Julien Bompard (70%), directrice de thèse Pr. Agnès Girard-Egrot (30%): *Liposomes sur mesure pour un ciblage optimisé des membranes cellulaires sur la base de leurs caractéristiques physicochimiques*. Soutenue le 16/12/2020
  - Membrane Fluidity as a New Means to Selectively Target Cancer Cells with Fusogenic Lipid Carriers. Bompard J, Rosso A, Brizuela L, Mebarek S, Blum LJ, Trunfio-Sfarghiu, Lollo AM, Granjon T, Girard-Egrot A, **Maniti O** Langmuir 2020 36 (19): 5134-5144
  - BALM: Watching the Formation of Tethered Bilayer Lipid Membranes with Submicron Lateral Resolution. Bompard J, **Maniti O**, Aboukhachfe R, Ausserre D, Girard-Egrot A. Langmuir. 2021 37(31):9457-9471.
- **Depuis octobre 2019** : Participation à l'encadrement de la Thèse de Layth Ben Trad (dir de Thèse Dr Thierry Granjon, dr Ana-Maria Trunfio-Sfarghiu et prof Ahmed Landoulsi, cotutelle UCBL –Faculté de Bizerte, Tunisie) : *Bio-lubrification par vésicules biomimétiques : Application dans la détection et la thérapie précoce des maladies articulaires* ; taux d'encadrement 20 %
  - 2 articles en préparation: Identification and role of extracellular vesicles and their phospholipid structure in the tribological performances of synovial fluids associated with human joint pathologies. Ben-Trad L, Matei CI, Sava MM, Duclos ME, Filali S, Berthier I, Guichardant M, Bernoud-Hubac N, **Maniti O**, Landoulsi A, Blanchin MG, Miossec P, Granjon T, Trunfio-Sfarghiu AM.
  - Multi-scale analysis of phospholipid vesicles synthesized by human synoviocytes in joint pathologies. Role in lubrication and inflammatory process Filali S, Darragi-Raies N, Ben-Trad L, Piednoir A, Hong SS, Pirot F, Landoulsi A, Girard-Egrot A, Granjon T, Maniti O, Miossec P, Trunfio-Sfarghiu AM
- **Depuis octobre 2021**: Participation à l'encadrement de la Thèse de Mlle Anna Bérot (dir de Thèse Dr Thierry Granjon) *Développement d'anticorps et de nanovecteurs lipidiques pour la purification et la caractérisation des exosomes dans le cadre du cancer du sein*; taux d'encadrement 20 %
- **2015-2018** : Participation à l'encadrement de la Thèse de Mme Meriem Chadli (directrice de thèse Pr Agnès Girard-Egrot) (20 %) : *Développement de la technologie*

« *TransMembraChip* » : *biopuces à membranes pour la réinsertion et le criblage d'agonistes / antagonistes de protéines membranaires* - thèse soutenue le 16 juillet 2018

- A new functional membrane protein microarray based on tethered phospholipid bilayers. Chadli M, **Maniti O**, Marquette C, Tillier B, Cortès S, Girard-Egrot A. *Analyst*. 2018 143(9):2165-73.
  - New Tethered Phospholipid Bilayers Integrating Functional G-Protein-Coupled Receptor Membrane Proteins. Chadli M, Rebaud S, **Maniti O**, Tillier B, Cortès S, Girard-Egrot A. *Langmuir*. 2017. 3(39):10385-401.
- **2015-2018** : Participation à l'encadrement de la Thèse de Mme Jihen Zouaoui (directeurs de thèse dr Thierry Granjon et prof Ahmed Landoulsi) : *Caractérisation biomécanique et biophysique à différentes échelles des cellules du cancer de la prostate : Marqueurs biologiques pertinents pour évaluer le potentiel métastatique cellulaire* (20 %) : thèse soutenue le 18 septembre 2018
    - Multi-scale mechanical characterization of prostate cancer cell lines: Relevant biological markers to evaluate the cell metastatic potential. Zouaoui J, Trunfio-Sfarghiu AM, Brizuela L, Piednoir A, **Maniti O**, Munteanu B, Mebarek S, Girard-Egrot A, Landoulsi A, Granjon T. *Biochim Biophys Acta*. 2017 1861(12):3109-19.

#### ***Encadrement de M2 Recherche Biochimie Structurale et Fonctionnelle (5 stages)***

- **Janvier -juillet 2021**: Mlle Ariana Abawi (100 %) : *Interactions vecteurs-membranes de cellules tumorales pour la délivrance optimisée de médicaments*
- **Janvier -juillet 2020** : Mlle Xiaoyi Wang (100 %) : *Délivrance de molécules thérapeutiques par liposomes: ciblage des cellules cancéreuses selon leur fluidité membranaire*
- **Janvier -juillet 2018** : Mlle Samira Samba-Mossiamasson (100 %) : *Mise au point et validation d'une technique de dosage des membranes biologiques.*
- **Janvier –juillet 2017** : M Julien Bompard (100 %) : *Liposomes sur mesure pour le ciblage des cellules selon leur fluidité membranaire*
- **Octobre 2013-juillet 2014**: Encadrement d'un étudiant de M2 Recherche Biochimie Structurale et Fonctionnelle, Mme Meriem Chadli (70 %) : *Développement de vecteurs lipidiques fonctionnalisés et d'une membrane modèle pour des études d'interactions membranaires visant à optimiser la délivrance ciblée de principes actifs*

#### ***Encadrement d'étudiants de Licence et IUT (16 stages) :***

##### **Stages de L3 Biochimie**

[Stage volontaire:](#)

- **Décembre 2017-mars 2018** : Mlle Julie Roy: *Extraction et dosage de lipides membranaires à partir des cellules prostatiques tumorales et non-tumorales.*

Stages de 7 semaines intégrés à la formation (10 stages)

- **Mars-mai 2022:**
  - Mlle Jade Délean
  - M Benjamin Brigaud colab avec le Dr Ana-Maria Trunfio-Sfarghiu
- **Mars-mai 2020:** Mlle Nika Zarubina: *Caractérisation des liposomes encapsulant des molécules actives. Tests d'agrégation*
- **Mars-mai 2019:**
  - Mlle Ariana Abawi: *Préparation et caractérisation des liposomes pour le ciblage de cellules tumorales*
  - Mlle Paola Franco-Bareto colab. avec le Dr Ana-Maria Trunfio-Sfarghiu: *Caractérisation biochimique et rhéologique du liquide synovial*
- **Mars-avril 2017 :**
  - Mlle Sarah Benyahya : *Mise en place d'une membrane biomimétique reconstituée sur l'or à partir de vésicules lipidiques fusionnées*
  - Mlle Fabiana Izaguirre-Vega : *Interactions de vecteurs lipidiques avec des cellules tumorales de prostate pour la délivrance de médicaments*
- **Avril-mai 2015** : M Hoang Tong Kieu, colab. avec Dr Bastien Doumeche : *Stabilisation des liposomes sur des électrodes en papier et détection électrochimique des molécules encapsulées*
- **Avril-mai 2013:** Mlle Natacha Jugnot: *Mise en place d'un protocole expérimental pour la préparation d'immunoliposomes*
- **Avril-mai 2012:** Mlle Aurélie Michelet: *Etude de l'interaction de vecteurs lipidiques avec un système membranaire modèle*

### **Stages volontaires de L2 Biochimie**

- **Juin-juillet 2017** : Mlle Charlotte Sorieul : *Libération contrôlée et détection électrochimique des molécules encapsulées dans les liposomes*
- **Janvier-mars 2016** :) Mlle Sarah Benyahya, colab. avec Dr Trunfio-Sfarghiu: *Mise au point d'un protocole de fixation sur verre et de visualisation par AFM et microscopie confocale des vésicules synoviales biomimétiques*

- **Janvier -mars 2013:** Mlle Domitile Chambre: Mise en place d'un protocole de *préparation des billes de polyélectrolyte et encapsulation des liposomes*

**Stages IUT 2<sup>ème</sup> année (2 stages):**

- **Mars-juillet 2017 :** Mlle Elise Cuchet : *Mise au point et validation d'une technique de dosage des lipides contenus dans les liposomes et protéoliposomes*
- **Mars-juillet 2015 :** M Dave Diamond, échange académique avec le Collège Shawinigan Québec, Canada: *Encapsulation des liposomes dans des billes de polyélectrolyte*

***Stage de 4<sup>ème</sup> année de Biochimie et Biotechnologies, INSA de Lyon:***

- **Avril-juillet 2019:** Mlle Anna Bérot: *Délivrance de molécules thérapeutiques à l'aide de liposomes : ciblage sur la base de propriétés physicochimiques des membranes*

## Thèse de doctorat

*La créatine kinase mitochondriale – organisatrice de la membrane mitochondriale ?  
Ségrégation de la cardiolipine sur des monocouches phospholipidiques. Perturbations  
induites par un agent issu de la peroxydation lipidique, le 4-hydroxynonéal.*

Réalisé à l'ICBMS UMR-CNRS 5246, Laboratoire de Génie Enzymatique et Biomoléculaire  
Université Claude Bernard Lyon 1 sous la direction des Drs Olivier Marcillat  
et Thierry Granjon

Soutenue publiquement le 2 octobre 2008

Les interactions protéines – membranes régissent une multitude de processus biologiques. Au niveau de la mitochondrie, des interactions spécifiques entre des protéines membranaires (intrinsèques ou extrinsèques) interviennent dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire ou dans le déclenchement et le déroulement de l'apoptose. Parmi ces protéines, la créatine kinase mitochondriale (CKmt) et son interaction avec la membrane interne de la mitochondrie jouent un rôle dans le maintien de la structure et le bon fonctionnement de la mitochondrie. Pendant ma thèse, je me suis intéressée aux processus mis en jeu dans l'interaction de cette protéine avec la membrane. En début de ce chapitre, je voudrais introduire les deux acteurs principaux de mes travaux de thèse, la créatine kinase mitochondriale (CKmt) et la membrane interne de la mitochondrie, et plus particulièrement la cardiolipine (CL), lipide spécifique de cette structure membranaire.

## 1. La Créatine kinase mitochondriale

Les créatine kinases (CK) sont des enzymes exprimées dans les tissus aux besoins énergétiques importants et variables, comme les cellules musculaires squelettiques ou cardiaques, les cellules nerveuses, les spermatozoïdes ou les cellules rénales. Elles catalysent la phosphorylation réversible de la créatine par l'ATP suivant la réaction :



Cette réaction permet le stockage et le transport de l'énergie chimique contenue dans l'ATP sous forme de phosphocréatine (PCr) et sa libération rapide lors d'un besoin énergétique.

Les CK, enzymes de la famille des guanidino kinases, existent sous plusieurs isoformes spécifiques des tissus et des compartiments cellulaires. Chez les vertébrés, on connaît 5 isoenzymes, dont 3 isoformes cytosoliques et 2 isoformes mitochondriales.

Les isoformes cytosoliques sont dimériques et se différencient suivant le type de tissus. Les sous-unités constitutives des dimères, B et M, s'associent pour former trois types d'isoenzymes :

- MM présente dans les cellules musculaires;
- BB dans les cellules nerveuses;
- MB présente en petite quantité dans le cœur, les poumons et l'estomac.

Dans la mitochondrie, une isoforme sarcomérique est présente dans les cellules musculaires striées, et une isoforme ubiquitaire dans des organes ou tissus comme le cerveau, les reins, la

peau, les organes reproductifs, etc... (Schlegel et al. 1988; Wallimann et al. 1992; Haas and Strauss 1990). Les isoformes mitochondriales de la CK (CKmt) existent sous deux formes stables interconvertibles : un dimère et un octamère (Marcillat et al. 1987; Schlegel et al. 1988). Sous forme octamérique, et uniquement sous cette forme, elles sont localisées à la face externe de la membrane interne des mitochondries, en concentration importante au niveau des sites de contact entre les membranes externe et interne (Kottke et al. 1991; Kottke, Wallimann, and Brdiczka 1994). La forme octamérique est prédominante (Wyss et al. 1992). Les formes mitochondriales sont toujours co-exprimées avec les formes cytoplasmiques correspondant au type cellulaire. Le foie est le seul organe qui n'exprime aucune isoforme de la créatine kinase dans les conditions physiologiques.

L'existence de 2 isoformes à la localisation cellulaire différente, cytoplasmique et mitochondriale, joue un rôle important dans le transport d'énergie. L'ATP synthétisé dans la mitochondrie sert à phosphoryler la créatine, pour donner la phosphocréatine, une molécule plus petite qui peut quitter la mitochondrie par diffusion à travers une porine, le transporteur VDAC (Voltage Dependent Anion Channel). Au niveau cytosolique, elle est déphosphorylée par les isoenzymes cytosoliques de la CK, une réaction qui permet la régénération de l'ATP : c'est ce qu'on appelle la navette phosphocréatine. (Jacobus and Lehninger 1973)

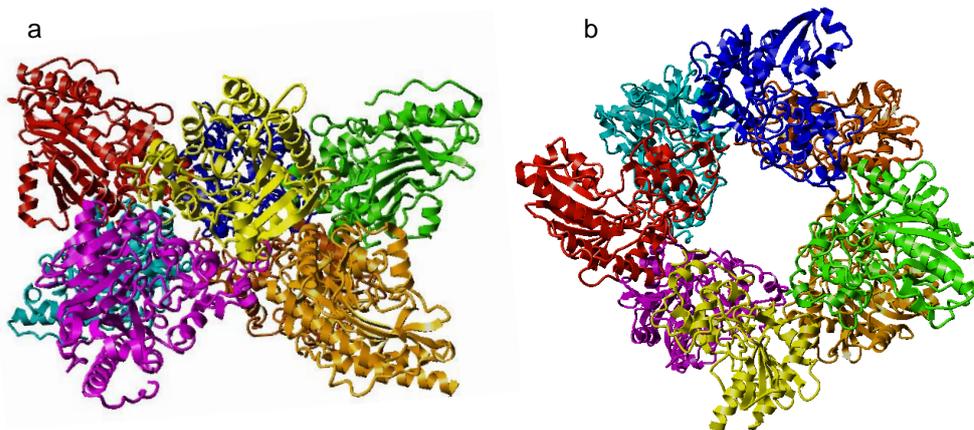
Le rôle classiquement attribué aux créatines kinases mitochondriales concerne le transport de l'énergie à travers les membranes mitochondriales sous forme de phosphocréatine. Ce rôle ne peut pas être dissocié de ceux de deux autres protéines mitochondriales : la porine ou VDAC et l'ANT (Adenosine Nucleotide Translocator). Cependant, plusieurs études attribuent à cette enzyme un rôle structural. Ce rôle serait déterminé par sa fixation à la membrane, plus ou moins indépendant de l'activité catalytique. Par exemple, l'inactivation des gènes codant pour la CKmt dans les kératinocytes conduit à une morphologie aberrante des mitochondries, ainsi qu'à une diminution de la prolifération cellulaire et augmentation de la nécrose cellulaire (Lenz et al. 2007). Ce rôle structural pourrait être lié à la fixation de la protéine à la membrane et à son interaction avec la cardiolipine. En modulant la distribution de la CL au niveau de la membrane la CKmt pourrait diriger la fixation des molécules comme le cytochrome c, les protéines de la famille Bax et l'organisation des complexes transmembranaires au niveau de la membrane interne de la mitochondrie.

Des études avec des liposomes de compositions phospholipidiques variables ont établi que la fixation de l'enzyme à la membrane mettait en jeu des interactions électrostatiques, les

partenaires étant des phospholipides chargés négativement, en particulier la cardiolipine (CL), (Müller et al. 1985; M Schlame and Augustin 1985; Vacheron et al. 1997).

La structure tridimensionnelle de la CKmt de poulet en présence d'ATP a été résolue en 1996 (Fritz-Wolf et al. 1996). Le monomère de la CKmt est constitué de 380 acides aminés dont 33 % sont conformés en hélices  $\alpha$  et 14 % en feuillettes  $\beta$  anti-parallèles. Ces monomères sont arrangés en 2 domaines : un petit domaine du côté N-terminal, résidus 1 à 112, comprenant une hélice  $\alpha_{310}$  et 5 hélices  $\alpha$  (domaine I), et un grand domaine du côté C-terminal, résidus 113 à 380, contenant 8 feuillettes  $\beta$  antiparallèles et 7 hélices  $\alpha$  (domaine II).

L'octamère de la CKmt est un parallélépipède de 93 x 93 x 86,8 Å, une structure presque cubique (Figure 1). Il est constitué de 4 dimères en forme de banane, organisés autour d'un axe de symétrie central. Les 4 faces latérales sont identiques, mais différentes des faces supérieure et inférieure.



**Figure 1 :** Structure de l'octamère de la CKmt sarcomérique de poulet: a. Vue latérale; b. Vue du haut. Les monomères sont représentés en couleurs différentes (Fritz-Wolf *et al.*, 1996).

La structure obtenue par diffraction des rayons X montre deux domaines possibles d'interaction avec la membrane, qui sont exposés sur deux surfaces opposées et qui présentent des charges positives susceptibles d'interagir avec la CL. Il s'agit du domaine Asp357-Lys380 de l'extrémité C-terminale et du domaine interne Ala107-Gln115 (Kabsch and Fritz-Wolf 1997). La mutagenèse dirigée des résidus Lys de l'extrémité C-terminale, notamment 2 résidus Lys consécutifs 379 et 380 et un 3ème résidu, Lys 369, supposés être impliqués dans l'interaction, diminue la fixation de plus de 90 % (Schlattner et al. 2004). Ces résidus chargés positivement sont exposés sur les faces supérieure et inférieure du cube octamérique. En conclusion, la fixation à la membrane se fait par l'intermédiaire de ces deux faces. Ce domaine joue donc le rôle principal dans l'interaction CKmt- membrane. La fixation résiduelle pourrait être due à une interaction hydrophobe avec la membrane.

La fixation de la protéine aux liposomes contenant des phospholipides chargés négativement (CL ou phosphatidylglycérol) induit des changements de structure au niveau de la protéine et des changements d'état physique des lipides avec une tendance à rigidifier la membrane (Granjon et al. 2001).

Des mesures calorimétriques avec des vésicules contenant des mélanges CL-Dipalmitoyl phosphatidyléthanolamine (DPPE) ou CL-Palmitoyl-Oléoyl-phosphatidyléthanolamine (POPE) ont montré que la fixation de la CKmt induit l'apparition du pic spécifique des phosphatidyléthanolamines sur la transition de phase du mélange. Ces résultats ont été interprétés comme une séparation entre les deux composants du mélange, suite à la fixation de la protéine (Epanand et al. 2007).

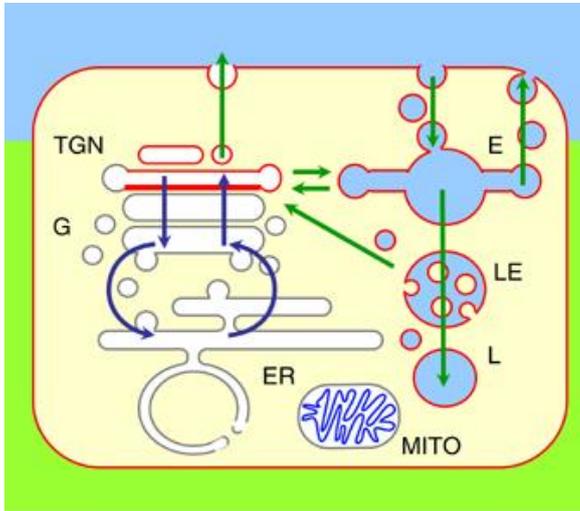
## **2. La membrane interne de la mitochondrie**

Même si l'existence des radeaux lipidiques ou rafts, tels que décrits à l'origine, est encore sous débat, il est généralement reconnu que la membrane n'est pas homogène et que dans les membranes plasmiques, tout comme dans celles de la plupart des organelles, des domaines de différente fluidité modulent le fonctionnement des protéines membranaires. Cette organisation repose sur la propriété des (glyco)sphingolipides à adopter des phases plus organisées, modulées par l'association avec le cholestérol, créant ainsi des domaines de taille de 10 à 200 nm, plus rigides, plus épais, favorisant une interaction avec certaines protéines transmembranaires (van Meer 2005; Pike 2006).

De ce point de vue, les membranes mitochondriales constituent une exception (Figure 2). Probablement du fait de leur origine différente et de l'absence d'un transport vésiculaire, elles contiennent très peu de cholestérol et une fraction relativement faible de sphingolipides (SL) dans la membrane externe. Ces lipides sont absents dans la membrane interne (Ardail et al. 2003; Comte, Maïsterrena, and Gautheron 1976). En revanche, cette membrane contient un phospholipide spécifique, la cardiolipine (CL). Pourrait-il jouer un rôle dans la microcompartmentation ?

Des domaines de CL ont été mis en évidence au niveau des membranes bactériennes. En 2000, Mileykovskaya et Dowhan ont observé des accumulations de CL dans la membrane d'*E. coli* suite à un marquage de ce phospholipide avec une sonde fluorescente spécifique (Mileykovskaya and Dowhan 2000). Des domaines riches en CL ont aussi été observés dans les membranes de *B. subtilis* pendant la sporulation (Kawai et al. 2004). Ces structures contribueraient à maintenir co-localisés les composants de la chaîne respiratoire (Zhang,

Mileykovskaya, and Dowhan 2002). En même temps, la CL est l'une des cibles potentielles des molécules impliquées dans l'apoptose, comme tBid, qui présentent une affinité pour ce lipide. Les domaines enrichis en CL pourraient déterminer la transmission du signal apoptotique dans la mitochondrie, ainsi que la proportion de cytochrome c ancré au niveau de la membrane interne.



**Figure 2:** Organisation des lipides dans la cellule animale: rouge – membranes riches en cholestérol et SL (membrane plasmique, le réseau trans golgi, endosomes); gris-membranes riches en glycérophospholipides (appareil de Golgi, réticulum endoplasmique); bleu – les exceptions : membrane mitochondriale interne, riche en cardiolipine et membranes des endosomes tardifs et des lysosomes, riches en acide lysobisphosphatidique (Van Meer, 2005).

Aux températures physiologiques, du fait de son fort degré d'insaturation, la CL est, contrairement aux sphingolipides mentionnés plus haut, à l'état fluide. Donc, si des domaines riches en CL se forment au niveau des membranes, leur association repose sur un autre mécanisme que celui des microdomaines riches en sphingolipides. Un facteur pouvant contribuer à l'association des domaines enrichis en CL pourrait être la présence de certaines protéines, transmembranaires ou périphériques. Parmi ces protéines, la CKmt est l'une des plus abondantes au niveau de la membrane mitochondriale interne et interagit avec une forte affinité avec la CL. La proportion de cette protéine est estimée à 7  $\mu\text{g}$  CKmt/mg de protéines mitochondriales de l'espace intermembranaire (Quemeneur, Eichenberger, and Vial 1990). Est-elle l'organisatrice de la membrane interne de la mitochondrie?

### 3. Modèle membranaire d'étude

La résolution des méthodes microscopiques à disposition au début de ma thèse ne permettant pas la visualisation des domaines CL-CKmt dans les mitochondries, nous avons fait le choix de

dissocier les deux partenaires de l'interaction du reste de la cellule et d'utiliser des membranes modèles, notamment les monocouches de Langmuir. Nous avons également fait le choix d'utiliser des mélanges de lipides naturels, aux chaînes variées et généralement insaturées, situation qui se rapproche de celle de la membrane interne.

A l'interface air/eau, les molécules amphiphiles forment spontanément un film monomoléculaire (monocouche de Langmuir). La partie polaire des molécules s'immerge dans la phase aqueuse alors que les chaînes aliphatiques restent dans l'air de manière à minimiser leur contact avec l'eau, formant à l'interface air-tampon une structure similaire à un demi-feuillet membranaire dont l'organisation est contrôlée par compression. Les monocouches de Langmuir représentent par conséquent un système d'étude intéressant des interactions protéines périphériques - lipides membranaires.

La présence d'une protéine à l'interface lipide-tampon peut être mise en évidence par une modification de l'isotherme de compression – décompression (par exemple un décalage vers les grandes valeurs d'aire moléculaire), une modification de la transition de phase ou de la pression de collapse, ou par l'enregistrement de l'évolution de la pression de surface (à aire constante) ou de l'aire (à pression constante) après addition de protéine dans la sousphase. Toutes ces mesures donnent une indication sur les capacités d'interaction d'une protéine ou d'un peptide avec les lipides constituant la monocouche.

En effet, les protéines sont capables de s'adsorber à l'interface air - eau et par simple mesure de pression, il est difficile de distinguer une adsorption spécifique d'une adsorption non spécifique. D'ailleurs, l'absence d'une augmentation de pression n'indique pas forcément l'absence d'interaction. Une protéine peut s'adsorber sur les têtes polaires d'un lipide sans s'insérer dans la monocouche et donc sans modification de la pression de surface.

Nous avons fait le choix d'analyser l'interaction de la CKmt avec les monocouches mimant la membrane mitochondriale. Dans la plupart de nos expériences, une pression de surface constante relativement élevée, à 30 mN/m a été utilisée pour mimer la situation physiologique (Marsh 1996; Eibl and Blume 1979) et minimiser les interactions non-spécifiques. Nous avons visualisé la morphologie de la monocouche par microscopie à l'angle de Brewster (BAM), analysé les modifications de structure et d'orientation de la protéine après fixation par une technique basée sur la spectroscopie infrarouge (PM-IRRAS) et analysé l'effet de la protéine sur la perméabilité de la monocouche par mesure de capacité différentielle d'une électrode de mercure en contact avec la monocouche.

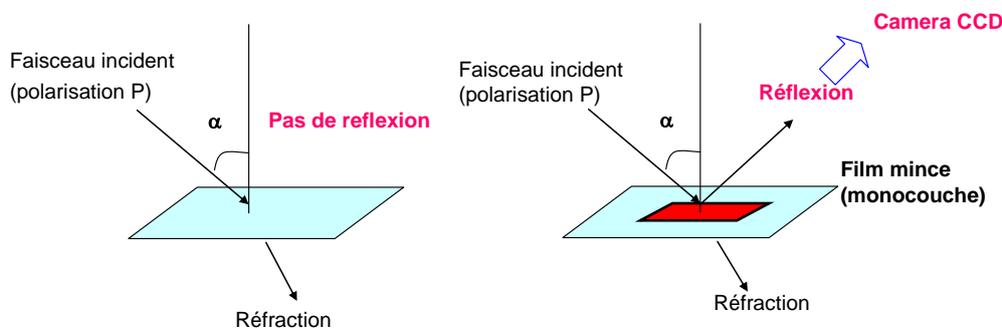
#### 4. Formation de complexes Cardiopolipine-CKmt visualisés par microscopie à l'angle de Brewster

La microscopie à l'angle de Brewster, BAM, développée en 1991 en parallèle par Hénon et Meunier et Hönig et Möebius, permet la visualisation directe, à l'échelle du micron, des films de molécules amphiphiles à l'interface air - eau (Hénon and Meunier 1991; Hönig and Möbius 1992).

Le principe a été décrit par le physicien écossais Sir David Brewster au 19<sup>ème</sup> siècle : lorsqu'une interface parfaitement plane et infiniment mince (interface de Fresnel) séparant deux milieux transparents d'indices de réfraction  $n_1$  et  $n_2$  est éclairée par un faisceau de lumière polarisée parallèlement au plan d'incidence (onde polarisée P), on enregistre deux phénomènes :

- une réfraction du rayon incident, avec une déviation qui dépend de l'indice de réfraction du deuxième milieu,  $n_2$ ;
- une réflexion du rayon incident à un angle égal à l'angle d'incidence.

A un angle particulier, dépendant de chaque type d'interface, la réflexion est annulée (Figure 3a). Cet angle est appelé l'angle de Brewster, défini par la relation  $\tan \alpha = n_1 / n_2$ . Pour l'interface air – eau, il vaut  $53^\circ$ .

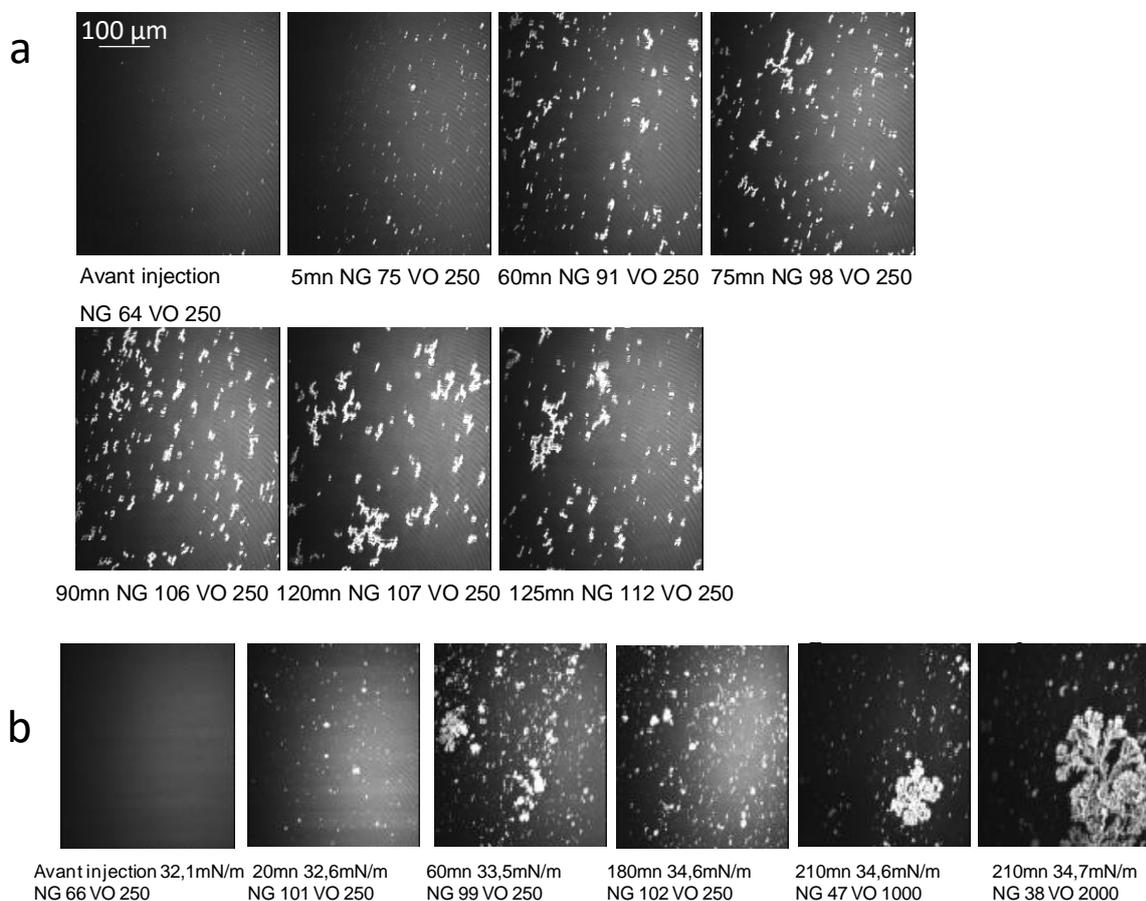


**Figure 3:** Trajet optique d'un faisceau polarisé incident à l'angle de Brewster sur une surface en absence (a) ou en présence (b) d'un film lipidique.

Ainsi, à l'interface air- eau, pour une incidence à l'angle de Brewster, le faisceau est entièrement réfracté (Figure 3a). En présence d'un film mince, les caractéristiques de l'interface changent, le faisceau est partiellement réfléchi et l'intensité de la lumière réfléchie est dépendante de l'épaisseur et de l'indice de réfraction du film (Figure 3b). En plaçant une caméra CCD dans la direction du rayon réfléchi, la visualisation d'une monocouche devient possible à l'échelle du micron. Ainsi, les régions plus épaisses (ou plus condensées) dans une monocouche vont

apparaître plus brillantes sur l'image (Gehlert, Siegel, and Vollhardt 1993).

L'ajout de la CKmt sous une monocouche constituée d'un mélange de phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE) et cardioline (CL) en rapport molaire de 2:1:1, avec une proportion de chaînes insaturées se rapprochant de celle existante dans la membrane mitochondriale interne, induit la formation de régions plus lumineuses observables par BAM (Figure 4a), qui augmentent progressivement en taille au cours du temps. L'augmentation de la luminosité est due à un épaissement du film interfacial et/ou à un changement d'indice de réfraction par la formation d'une phase plus épaisse et plus organisée (avec un indice de réfraction plus important). Ces deux phénomènes ne peuvent pas être dissociés.



**Figure 4:** Monocouche PC:PE:CL (2:1:1) (a) et CL (b) à 30 mN/m avant et après injection de CKmt. Des domaines blancs de formes irrégulières apparaissent progressivement. Le temps d'incubation après injection de la protéine en minutes, le niveau de gris (NG) et la vitesse d'obturation (VO) sont indiqués sous chaque image.

L'estimation de l'épaisseur locale des domaines indique que les molécules de protéine s'accablent en une organisation assez dense. Dans ces régions de forte luminosité, l'épaisseur estimée à 10-12 nm, est compatible avec la hauteur théorique d'un complexe lipide - protéine.

En effet, l'épaisseur de la monocouche lipidique en absence de CKmt a été estimée entre 1,8 et 2 nm, et l'octamère de CKmt est un cube 8-10 nm de côté (Fritz-Wolf et al. 1996). Ceci indique que, dans ces régions, les molécules de protéines sont organisées sous le film lipidique en une monocouche compacte, avec peu d'espace libre. Cette organisation pourrait se rapprocher de l'arrangement très régulier de la protéine mis en évidence dans les essais de cristallisation de la CKmt sur des films de CL (Schnyder et al. 1994).

L'injection de la protéine sous une monocouche de PC, un phospholipide zwitterionique, n'induit pas de changement au niveau de l'aspect du film interfacial. La formation de domaines brillants requiert la présence de CL, phospholipide chargé négativement et connu comme étant le partenaire d'interaction de la CKmt au niveau de la membrane mitochondriale. L'aspect homogène de la monocouche avant injection de l'enzyme, ainsi que la croissance lente des domaines, indiquent que la CKmt recrute des phospholipides pour former des domaines à organisation spécifique. Ce phénomène est particulièrement prononcé dans le cas d'une monocouche constituée de CL (Figure 4b). La forme en arborescence des domaines CKmt - CL, pouvant être caractérisée comme fractale, indique une forte tension à la frontière des deux régions d'état de condensation différente. La protéine induit une organisation plus ordonnée des lipides, semblable à un état gel, dans un environnement fluide. Pour illustrer un exemple opposé, les domaines riches en sphingolipides et cholestérol, caractérisés par une phase liquide ordonné dans un environnement liquide désordonné, forment des régions circulaires (Bagatolli 2006). Ceci est en accord avec des expériences réalisées au laboratoire sur des liposomes contenant une sonde fluorescente sensible à la polarité du milieu, le Laurdan, qui ont montré que la fixation de la CKmt aux liposomes PC:PE:CL (2:1:1) entraîne l'apparition d'une phase gel (Granjon et al. 2001). L'ensemble de ces résultats ont fait l'objet d'un article publié en 2008 dans *Biophysical Journal* et disponible en annexe 1. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.12.3911>

## **5. Influence de la composition en chaînes acyles de la CL sur la formation de complexes protéine-lipide**

Le degré d'insaturation et la composition des chaînes acyles de la CL est variable selon les tissus ou les organismes. Dans les mitochondries des cellules musculaires, du myocarde en particulier, jusqu'à 90% des molécules de CL se retrouvent sous forme de tetralinoléoylcardioline (TLCL) (Michael Schlame and Otten 1991; Michael Schlame et al. 2005). Le maintien de cette forte proportion en chaînes linoléoyles (C18:2) semble essentiel pour le bon fonctionnement de la mitochondrie. Des situations pathologiques comme l'ischémie

(Sparagna et al. 2007) ou le syndrome de Barth (Vreken et al. 2000; Barth et al. 1983) sont caractérisées par une proportion faible de chaînes insaturées, en particulier linoléoyle.

Nous avons testé l'interaction de la CKmt avec des monocouches constituées de lipides à chaînes acyles de longueur et de degré différents d'insaturation. L'interaction de la protéine avec une monocouche constituée de dimyristoyl phosphatidyl glycérol (DMPG) et tétramyrystoylcardiolipine (TMCL), phospholipides à chaînes relativement courtes (14 atomes de C) et saturées induit un épaissement homogène du film interfacial (Figure 5). Dans le cas d'un PG naturel (provenant du jaune d'œuf), constitué de molécules à chaînes saturées et insaturées, la fixation de la CKmt induit l'apparition de domaines brillants (Figure 5). Ces observations sont à rapprocher de celles effectuées avec les monocouches contenant de la CL. Cependant, les domaines formés sont sensiblement plus petits. Sur une monocouche de tétraoléoylcardiolipine (TOCL) (C18:1), les régions brillantes sont de formes irrégulières et de tailles variables (Figure 5). Cependant, cet effet semble moins fort que celui enregistré avec la CL extraite de cœur de bœuf, majoritairement constituée de chaînes linoléoyle (C18:2).

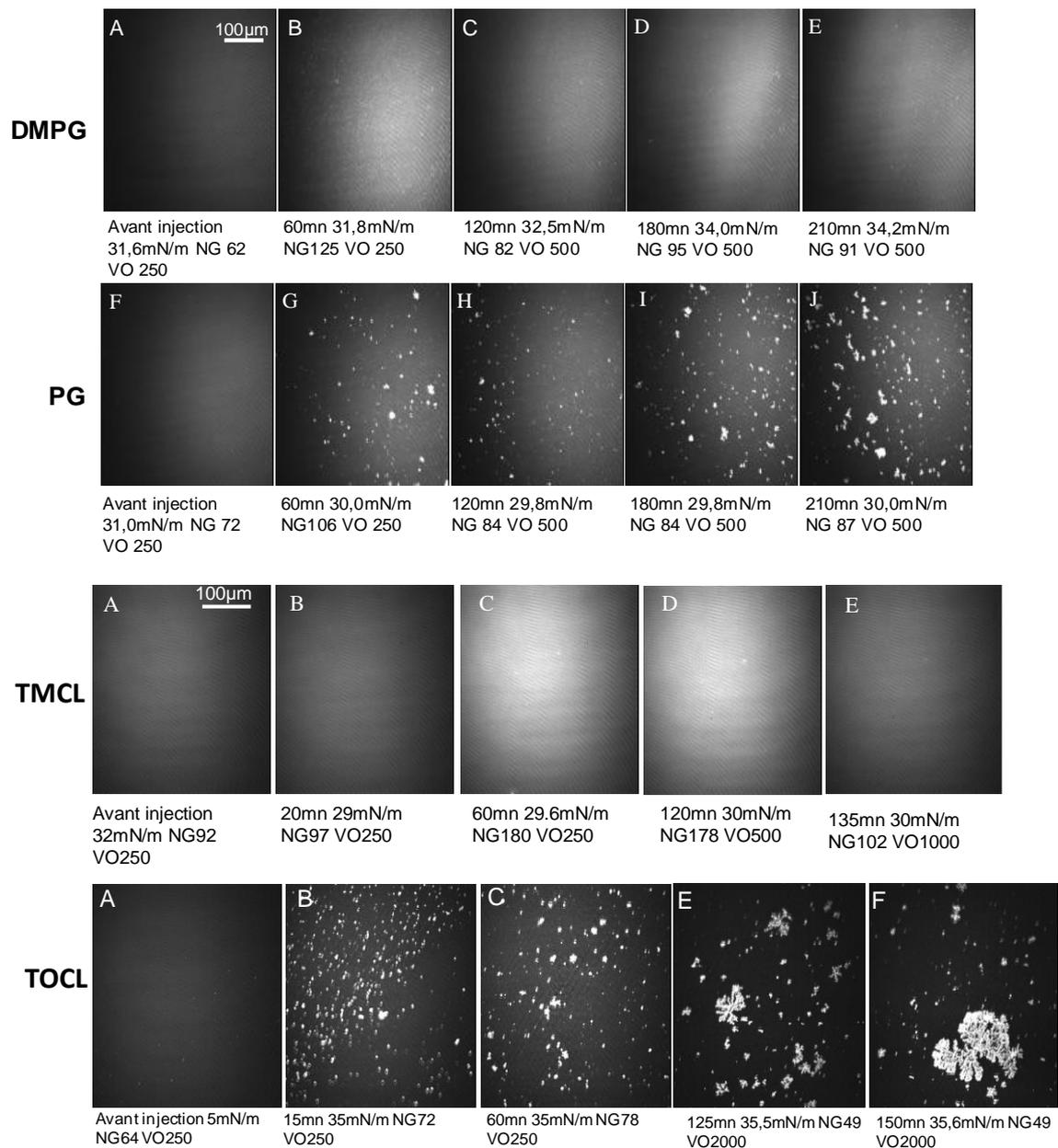


Figure 5: Monocouches lipidiques avant et après injection de la CKmt dans la sousphase. Les domaines CKmt-lipides apparaissent dans le cas de lipides insaturés (PG (jaune d'œuf) et TOCL) mais pas dans le cas des lipides saturés (DMPG et TMCL). Dans ce cas, la protéine entraîne une augmentation homogène du niveau de gris de l'image.

Le degré d'insaturation des chaînes acyles et, donc de fluidité des monocouches, a, par conséquent, une influence déterminante sur la morphologie de la monocouche après fixation de la CKmt. Les mitochondries des cellules musculaires expriment la CKmt en quantité importante. Elles présentent également un fort pourcentage de chaînes acyles insaturées, notamment linoléoyle. Ces deux observations peuvent être associées. La formation des complexes CL – CKmt et la ségrégation de la CL seraient donc importantes dans les cellules avec un métabolisme énergétique intense. Ces résultats ont fait l'objet d'un article publié dans

## **6. Action de l'agent oxydant 4-hydroxynonéal sur la formation de complexes protéine-lipide**

Afin d'analyser l'effet des modifications oxydatives de la CKmt sur son interaction avec les membranes, nous avons testé l'effet d'une molécule issue de la peroxydation lipidique, le 4-hydroxy-2-nonéal (4-HNE). Découvert en 1960 parmi les différents produits de l'auto-oxydation de l'ester méthylique du linoléate (Schauenstein, Esterbauer, and Zollner 1977), le 4-HNE résulte de la peroxydation des acides gras de la série n-6 et, en particulier, des acides arachidonique (20:4n-6) et linoléique (18:2n-6) (Esterbauer, Schaur, and Zollner 1991). Comparativement aux radicaux libres, les aldéhydes ont une durée de vie plus longue. Ils peuvent franchir les membranes et gagner d'autres compartiments cellulaires. Les aldéhydes agissent donc comme des «seconds messagers toxiques» de la peroxydation lipidique (Esterbauer, Schaur, and Zollner 1991). Le 4-HNE possède une double liaison conjuguée au groupement carbonyle, caractéristique des 4-hydroxyalkenals, qui lui confère une forte réactivité envers de nombreuses molécules biologiques.

Dans les conditions physiologiques, le 4-HNE réagit spontanément avec les groupements thiols pour former majoritairement des produits d'addition appelés adduits de Michael par l'attaque du groupement nucléophile -SH sur la double liaison C=C. Cet adduit peut se cycliser en hémiacétal. Dans des conditions pathologiques, le 4-HNE peut par le même mécanisme former des adduits avec les résidus cystéine des protéines. Dans certaines conditions, le 4-HNE réagit avec les groupements amine primaire des protéines, acides nucléiques et phospholipides. L'attaque nucléophile d'un groupement amine primaire au niveau de la double liaison du 4-HNE conduit à des adduits de Michael ou à la formation de bases de Schiff, si cette attaque concerne le groupement carbonyle du 4-HNE.

L'action du 4-HNE sur la CKmt entraîne une perte partielle de l'activité enzymatique à faibles concentrations ou quasi-totale (90 %) à fortes concentrations. Même à faibles concentrations, le 4-HNE entraîne l'agrégation de la solution protéique. L'apparition des bandes à 1618-1690  $\text{cm}^{-1}$  sur le spectre infrarouge de la protéine, caractéristiques de la formation des feuilletts  $\beta$  intermoléculaires de type  $\beta$ -amyloïde, confirme l'agrégation de la protéine sous l'action du 4-HNE. Les agrégats sont capables de se fixer aux monocouches contenant la CL par interaction électrostatique, mais la morphologie des domaines protéolipidiques est complètement modifiée.

De larges structures recouvrent la monocouche, leur morphologie rappelant celle obtenue par Ta *et al* en 2011 (Ta et al. 2011) suite à l'interaction de variants toxiques du peptide  $\beta$ -amyloïde avec des monocouches chargées négativement. Ces résultats font partie d'une publication disponible en annexe 3. <https://doi.org/10.3109/09687688.2015.1023376>

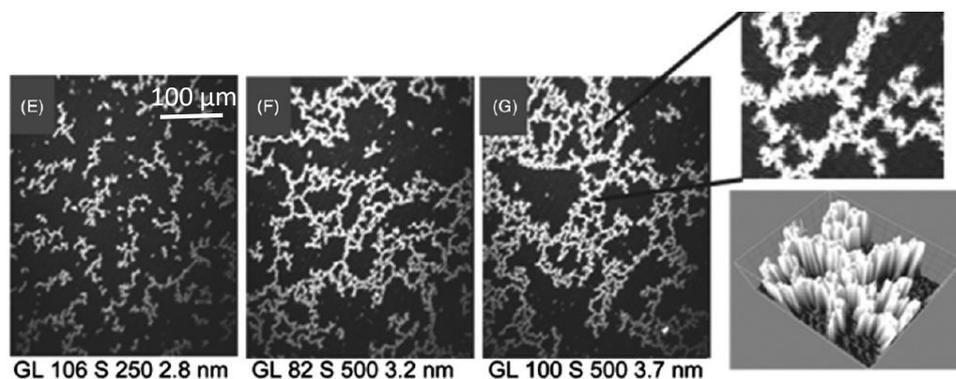
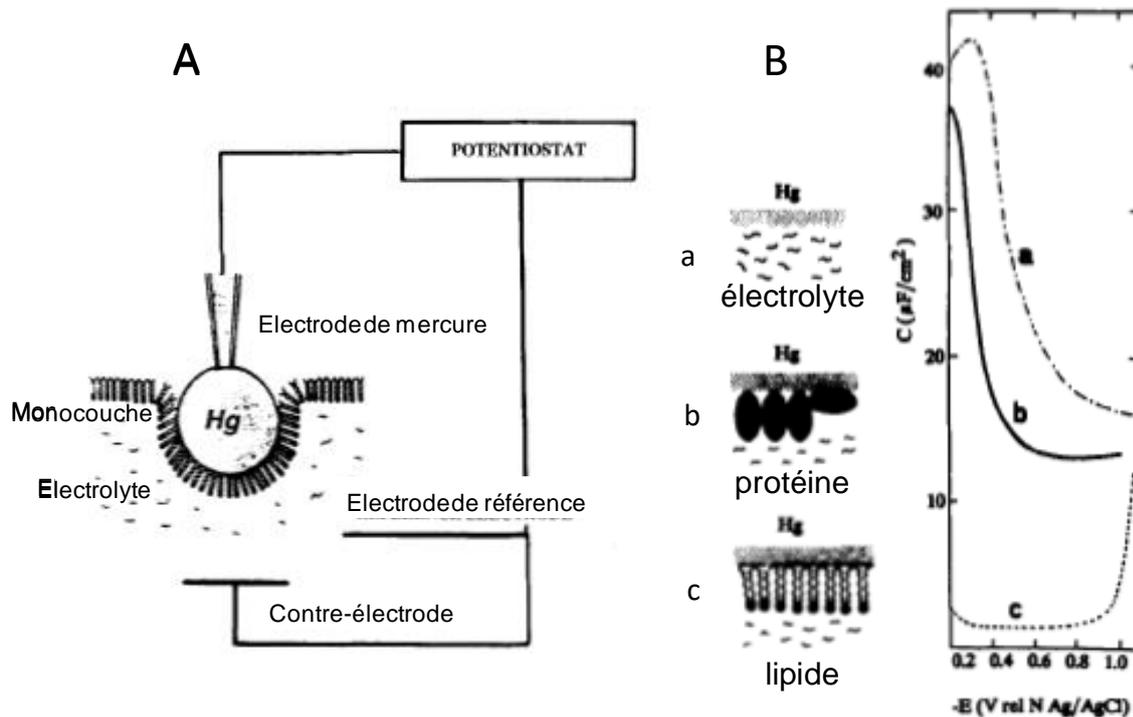


Figure 6: Monocouche de PC:PE:CL (2/2/1) après injection de CKmt pré-incubée avec le 4-HNE. Des réseaux dentelés recouvrent entièrement la surface.

## 7. La fixation de la CKmt à la monocouche analysée par mesures électrochimiques

Pour cette partie de l'étude, nous avons utilisé une technique électrochimique qui repose sur des mesures de capacité différentielle à l'aide d'une électrode de mercure, en collaboration avec le Prof. Marie-France Lecompte de l'Université Paul Sabatier de Toulouse.

D'un point de vue électrochimique, le système de membrane modèle peut être assimilé à un condensateur (Figure 7A), situé entre la surface de l'électrode de mercure (électrode de travail) et un point situé à l'intérieur de la solution non perturbée par la présence de cette électrode, l'ensemble constituant l'interface d'épaisseur  $e$ .



**Figure 7:** Représentation schématique du système utilisé pour les mesures de capacité différentielle. A. L'électrode de mercure est placée en contact avec une monocouche lipidique, la contre-électrode et l'électrode de référence sont plongées dans la sous-phase; B. Evolution de la capacité différentielle de l'électrode de mercure au contact de l'électrolyte (a), d'une monocouche protéique (b) ou d'une monocouche condensée de lipides (c), en fonction du potentiel (Lecompte, Bouix, and Mann 1994).

La capacité du condensateur, de dimension moléculaire, dépend de la composition de l'interface et du potentiel appliqué aux bornes de l'interface. Elle dépend de la constante diélectrique du milieu ( $\epsilon$ ), reliée à la polarité des molécules le constituant. La différence de potentiel est appliquée entre les électrodes de travail et de référence. **La capacité du condensateur**, assimilé à un condensateur plan, où  $S$  est la surface de l'électrode de travail, s'écrit :

$$C = \epsilon S / e$$

où  $S$  est la surface de l'électrode de travail,  $\epsilon$ , la constante diélectrique du milieu et  $e$ , la distance entre l'électrode de mercure et un point situé à l'intérieur de la solution non perturbée par la présence de cette électrode.

En pratique, pour réaliser la mesure, on superpose une tension sinusoïdale à la rampe de potentiel et on suit l'évolution de l'intensité du courant alternatif mesurée, ce qui permet de calculer une capacité, la capacité différentielle. Celle-ci est la dérivée seconde de la pression de surface par rapport au potentiel. Ce paramètre est donc particulièrement sensible aux moindres variations induites par la présence de molécules à l'interface.

En absence de monocouche, l'électrolyte a la valeur de capacité différentielle la plus forte

(Figure 7B, a). Les molécules adsorbées à l'électrode diminuent la capacité du système en fonction de leur polarité : les lipides, du fait de leurs parties hydrophobes, présentent la valeur la plus basse (Figure 7B, c); pour les protéines, cette valeur est intermédiaire (Figure 7B, b).

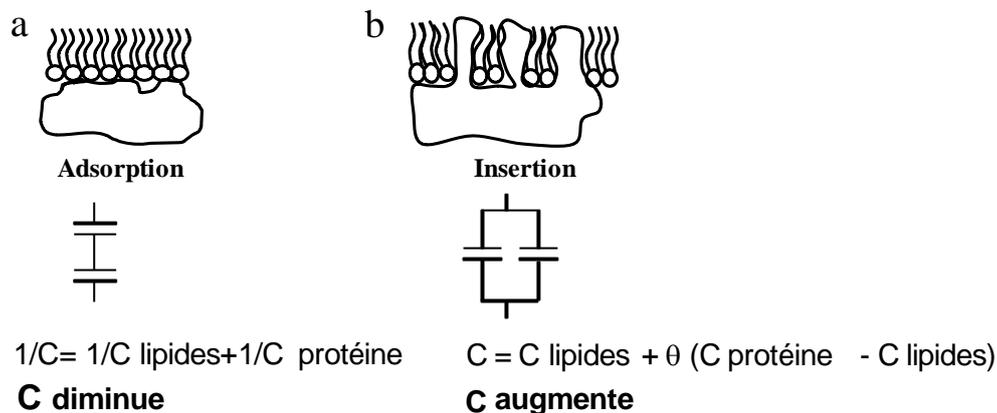
Ainsi, lorsque l'électrode de mercure est en contact avec une monocouche condensée de lipides, c'est-à-dire, lorsque ces molécules forment un film continu à la surface de l'électrolyte, ne permettant pas leur contact direct avec l'électrode, la capacité différentielle est basse et constante sur un intervalle de potentiel assez large. Cet intervalle de stabilité se distribue autour du potentiel de charge nulle (pcn) de l'électrode, -0,45 V dans le cas du mercure. A cette valeur, il n'y a pas de champ électrique surimposé appliqué à l'interface.

Si une protéine s'adsorbe aux têtes polaires de lipides, sa présence à l'interface ajoute un deuxième condensateur couplé en série (Figure 8a).

La capacité différentielle de l'ensemble s'écrit alors :

$$1/C = 1/C_{\text{lipides}} + 1/C_{\text{protéine}}$$

La valeur de C sera plus petite que celle de la monocouche de lipides. Une protéine adsorbée à la couche lipidique diminue donc la capacité différentielle du système.



**Figure 8:** Représentation schématique des modes d'interaction d'une protéine avec une monocouche de lipides en contact avec l'électrode de mercure et effet sur la capacité différentielle du système. Cas d'une adsorption à la monocouche (a); cas d'une insertion dans la monocouche (b).

Si au contraire, une protéine s'insère dans la monocouche, le système pourra être assimilé à des condensateurs couplés en parallèle (Figure 8b). La capacité différentielle est alors la somme des capacités des condensateurs, relatifs aux lipides d'une part et aux protéines d'autre part, au contact de l'électrode, pris séparément :

$$C = C_{\text{lipides}} + \theta (C_{\text{protéine}} - C_{\text{lipides}})$$

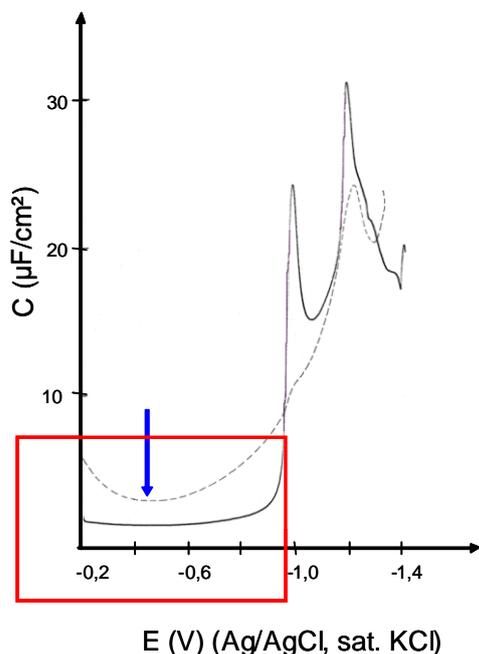
Avec  $\theta$ , la fraction de la monocouche de lipides qui a été pénétrée par les protéines.

L'insertion d'une protéine dans une monocouche lipidique peut impliquer, comme on peut l'observer sur la figure 8b, un certain degré d'adsorption. Sur un plan théorique, la diminution de la capacité enregistrée dans le cas d'une adsorption est beaucoup plus petite que l'augmentation obtenue dans le cas d'une insertion. Pour cette raison, l'effet dû à l'adsorption ne peut pas être pris en compte du fait de sa faible contribution. Ainsi, l'enregistrement de l'évolution de la capacité différentielle autour du pcn après addition de la molécule d'intérêt dans la sous-phase, permet de déterminer la situation qui l'emporte entre insertion de protéines dans une monocouche condensée ou adsorption aux têtes polaires des lipides (Lecompte 2005; Lecompte, Bouix, and Mann 1994; Lecompte et al. 1998).

### **7.1. Insertion de la CKmt dans la monocouche de CL**

Pour toutes les monocouches que nous avons étudiées, autour du pcn, la capacité différentielle est restée stable et constante (Figure 9), indiquant la formation d'un film compact et continu en contact avec l'électrode, empêchant l'accès des molécules d'électrolyte à l'électrode. Dans le cas de ces monocouches, que nous avons appelées condensées (Lecompte 2005), l'adsorption hydrophobe à l'interface air (argon) – eau (ou mercure – eau) est exclue.

L'addition de CKmt sous des monocouches contenant de la CL, induit une augmentation nette de la capacité différentielle au pcn, ce qui traduit une insertion dans la monocouche (Figure 9). Etant donné que l'espace libre parmi les lipides au sein du film interfacial est extrêmement réduit et que la CKmt est une protéine de taille relativement importante, nous avons interprété ce phénomène comme une insertion limitée à un ou plusieurs domaines de la molécule dans le cœur hydrophobe du film lipidique. Cette information a permis de compléter notre compréhension des phénomènes mis en jeu lors de l'interaction de la protéine avec la membrane (Maniti et al. 2009).



**Figure 9:** Capacité différentielle (C) d'une électrode de mercure au contact d'une monocouche de CL en absence (trait continu) ou en présence de CKmt 4 nM (pointillé), en fonction du potentiel (E).

## 7.2 Stabilisation de la membrane par rapport aux variations de potentiel suite à la fixation de la CKmt

Suite à la variation de potentiel appliquée à l'interface, hors de l'intervalle de stabilité, les monocouches subissent des réarrangements. Ces réarrangements se répercutent sur la courbe capacité différentielle vs. potentiel (C vs. E) sous la forme de pics caractéristiques du lipide. Des études sur des lipides de nature différente ont donné lieu à une interprétation du mécanisme de réarrangement (Nelson and Leermakers 1990). Ainsi, dans l'intervalle de potentiel entre -0,2 V et -0,7 V, les lipides sont organisés avec les chaînes acyles orientées vers l'électrode et la tête polaire vers la sous-phase. A des potentiels plus négatifs, les têtes polaires des lipides rentrent en compétition avec les chaînes acyles, au contact de l'électrode. Ce réarrangement correspond à un premier pic observé sur la courbe C vs. E. A des valeurs de potentiel encore plus négatives, la monocouche continue à subir des réorientations jusqu'à se désorber à -1,4 V. La présence ou l'absence d'un pic, correspondant à une étape dans le réarrangement de la monocouche, dépend de la structure du lipide, notamment de la charge du groupement polaire et du degré d'insaturation de la chaîne hydrophobe. Dans le cas de la CL et en absence de protéine, un premier pic est observé à une valeur de potentiel de -1 V, suivi d'un deuxième pic

à -1,3 V (Figure 9). Le premier peut être attribué à la déstabilisation de la monocouche et au passage des têtes polaires en contact avec l'électrode. Le deuxième, plus difficile à attribuer, pourrait correspondre à une formation de bicouches, suivie de la désorption des molécules de lipides de l'électrode, comme décrit précédemment pour la PC (Nelson and Leermakers 1990). Les pics observés sont très fins, indiquant que les réarrangements se produisant à l'électrode sont rapides (Lecompte 2005).

La présence de protéine induit une diminution de la hauteur des pics (Figure 9, trait pointillé), indiquant que des processus plus lents ont lieu à l'électrode. Ceci traduit une stabilisation de la monocouche par rapport à la variation de potentiel (Lecompte 2005). Des études réalisées sur des liposomes ont montré à la fois une stabilisation des lipides (avec un passage d'une phase cristal liquide à une phase gel) et une stabilisation de la protéine par rapport à la dénaturation thermique (Granjon et al. 2001). Ces deux aspects conduisent à l'idée d'une stabilisation du système protéine – membrane dans son ensemble par rapport aux stimuli extérieurs. Ceci peut être associé au rôle attribué à la CKmt dans la stabilisation de la structure des membranes mitochondriales et dans la formation des points de contact (Schlattner, Tokarska-Schlattner, and Wallimann 2006). En effet, les hépatocytes des souris transgéniques exprimant la CKmt ont un nombre plus important de points de contact entre la membrane externe et la membrane interne de la mitochondrie par rapport aux hépatocytes normaux, dépourvus de cette enzyme (Speer et al. 2005).

### **7.3 Deux étapes dans l'interaction CKmt-monocouche: adsorption suivie par l'insertion de segments protéiques**

En diminuant la quantité de protéine ajoutée au système, nous avons pu déceler deux étapes dans le mécanisme d'interaction avec CL. Une première courbe C vs. E, enregistrée 30 minutes après injection de la CKmt est caractéristique d'une adsorption à la monocouche (Figure 10). La courbe C vs. E enregistrée après 1 heure indique, comme dans le cas précédant, une insertion dans la monocouche. Les deux étapes du mécanisme d'interaction sont donc fonction du temps. Dans une première étape, la CKmt est adsorbée, probablement par interaction électrostatique, à la monocouche de CL, puis ses domaines hydrophobes s'insèrent dans le film lipidique. Un changement de conformation de la protéine pourrait avoir lieu après fixation aux têtes polaires des lipides, suivie d'une insertion, aboutissant à la formation d'un complexe protéine – lipide.



interfacial et la formation des régions à organisation plus ordonnée, comme celles observées sur les images de BAM. Cette étude a été publiée dans European Biophysical Journal en 2010, article disponible en annexe 4. <https://doi.org/10.1007/s00249-010-0600-4>

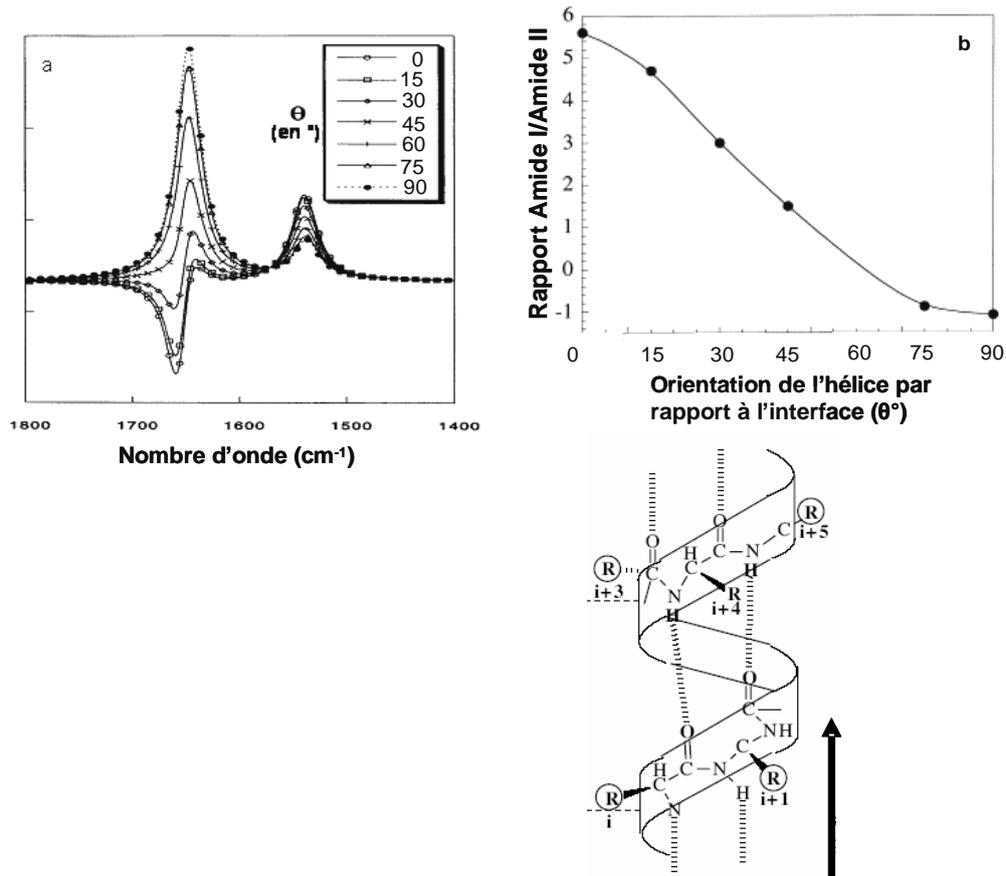
## **8. Réorientation des domaines protéiques par Spectroscopie Infrarouge de Réflexion – Absorption par Modulation de Polarisation (PM-IRRAS)**

Comme son nom l'indique, cette méthode combine la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) avec d'une part, les particularités de réflectivité en lumière polarisée et sous incidence quasi-rasante (IRRAS) et d'autre part, la modulation rapide de la polarisation du faisceau incident entre les polarisations linéaires parallèle (S) et perpendiculaire (P). Elle permet notamment la caractérisation des films ultraminces à l'interface air – eau dans un environnement ouvert (D. Blaudez et al. 1994).

Ainsi, la polarisation du faisceau incident est modulée entre un état linéaire P perpendiculaire et un état linéaire S parallèle à la surface d'incidence :

- la lumière polarisée P interagit à la fois avec les espèces adsorbées à la surface et avec les molécules de solvant et de gaz qui entourent l'échantillon;
- la lumière polarisée S n'interagit pas avec les espèces adsorbées à la surface mais interagit avec les molécules du milieu environnant.

A l'interface air – eau, les vibrations ayant un moment de transition parallèle à la surface présentent des bandes positives par rapport à la ligne de base, alors que les vibrations ayant un moment de transition perpendiculaire à la surface présentent des bandes négatives. L'intensité de la bande est nulle pour un moment de transition orienté à  $38^\circ$  par rapport à la normale (Daniel Blaudez et al. 1996). Des études sur des peptides modèles et des simulations ont montré que l'orientation des hélices  $\alpha$  par rapport à l'interface dépend des intensités relatives des bandes amides I et amide II (Cornut et al. 1996). Ainsi, une orientation de l'hélice parallèle à l'interface résulte en une bande amide I de forte intensité et une bande amide II de faible intensité (Figure 12). Une orientation perpendiculaire à l'interface est caractérisée par une bande amide I négative. L'absorption de la bande amide I est majoritairement due aux liaisons C=O, orientées parallèlement à l'axe de l'hélice. La bande amide II, due à la superposition de plusieurs absorptions, reste dans tous les cas positive.



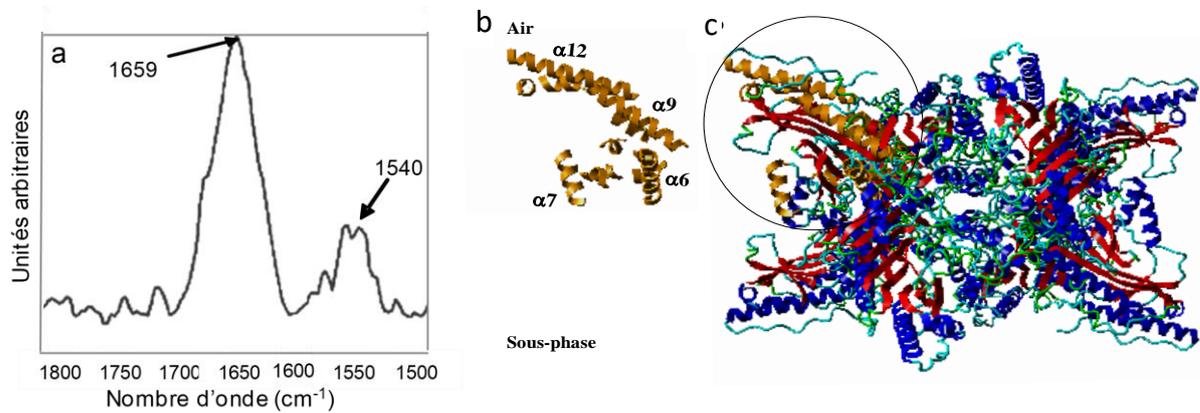
**Figure 12:** Orientation de l'hélice  $\alpha$  à l'interface air - eau. a) Simulation de spectres PM-IRRAS de l'hélice  $\alpha$  à différentes orientations; b) Rapport des intensités des bandes amide I/amide II en fonction de l'inclinaison de l'hélice par rapport au plan de l'interface (Cornut et al., 1996); c) orientation du moment dipolaire (flèche) pour une hélice  $\alpha$ .

### 8.1 Orientation de la CKmt à l'interface air-tampon

La CKmt possédant un comportement interfacial, nous avons pu enregistrer le spectre PM-IRRAS de la protéine à l'interface air-tampon, en absence de lipides. Le spectre PM-IRRAS de la CKmt (Figure 13a) est caractérisé par une bande amide-I de forte intensité avec un maximum d'intensité vers  $1659\text{ cm}^{-1}$ , caractéristique des hélices  $\alpha$ , et une bande amide-II relativement faible, centrée à  $1545\text{ cm}^{-1}$ . Ce spectre ne présente pas de bande d'absorption à  $1616\text{ cm}^{-1}$ , qui serait caractéristique d'une structure agrégée et dénaturée irréversiblement (Granjon et al. 2001). Des études antérieures au laboratoire ont également montré que la protéine à l'interface est active (Vernoux et al. 2006). Nous avons conclu que la CKmt ne subit pas de changements majeurs de structure à l'interface.

En faisant l'approximation que l'intensité à  $1659\text{ cm}^{-1}$  est due essentiellement aux hélices  $\alpha$ , majoritaires dans la structure secondaire de la CKmt, nous avons calculé un rapport amide-

I/amide-II de 3,2 pour la protéine à l'interface air-tampon. Ainsi, ce rapport de 3,2 correspondrait à une orientation de la résultante des moments dipolaires des hélices  $\alpha$  d'approximativement  $30^\circ$  par rapport au plan de l'interface (Figure 12).



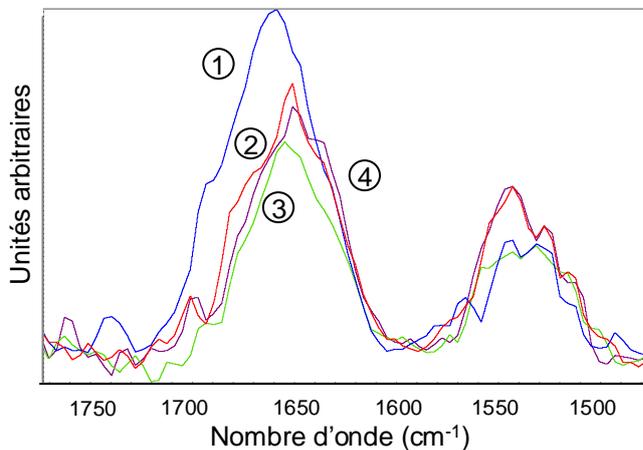
**Figure 13: Orientation de la CKmt à l'interface air-tampon.** a) Spectre PM-IRRAS de la CKmt à l'interface air – tampon TrisHCl 20 mM, pH 7,4; b) Orientation proposée pour la CKmt à l'interface air-tampon: a. hélices  $\alpha$  d'un monomère orienté de manière à obtenir une résultante des moments dipolaires inclinée de  $30^\circ$  par rapport au plan de l'interface; c) orientation correspondante de l'octamère - les faces supérieures et inférieures du cube sont parallèles à l'interface.

A l'aide du logiciel disponible sur le site « Protein Dipole Moment Server » (Felder et al. 2007), nous avons pu calculer un moment dipolaire résultant des hélices  $\alpha$  par rapport à un repère interne. Nous avons ensuite disposé le monomère de manière à ce que ce vecteur soit orienté à  $30^\circ$  par rapport au plan de l'interface (Figure 13b). Dans ce cas, les hélices  $\alpha 12$ , comprise entre les résidus E341-E363, et  $\alpha 9$ , comprise entre les résidus M241-R262, et la plupart des hélices plus courtes sont inclinées à des angles relativement faibles par rapport au plan de l'interface, bien que certaines hélices, comme  $\alpha 7$  et  $\alpha 6$  soient disposées verticalement. L'orientation de l'octamère de la CKmt correspondant à une telle disposition des hélices  $\alpha$  est celle présentant les faces supérieure et inférieure du cube parallèlement à l'interface (Figure 13c). Ces faces contiennent, au niveau du segment C-terminal, les résidus impliqués dans l'interaction avec les membranes, Lys 380, 379 et 368 (Schlattner et al. 2004).

## 8.2 Changements d'orientation des domaines protéiques suite à l'interaction avec la monocouche

En présence de monocouches contenant des phospholipides chargés négativement, une diminution du rapport amide-I/amide-II dans la région des hélices  $\alpha$  est enregistrée sur les spectres PM-IRRAS de la CKmt (Figure 14). Les spectres infrarouges de la CKmt obtenus

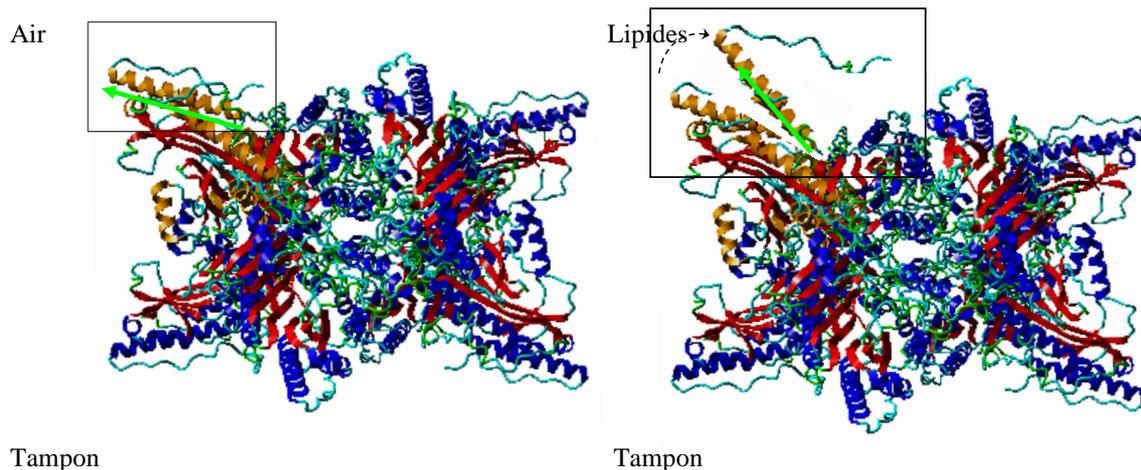
précédemment en présence ou en absence de liposomes ont montré que la protéine ne subit pas de changements majeurs de structure suite à l'interaction avec la membrane (Granjon et al. 2001). Les modifications observées dans cette étude, notamment le déplacement de l'absorption caractéristique des feuillets  $\beta$  antiparallèles de 1636 à 1632  $\text{cm}^{-1}$ , ont été attribuées à l'augmentation des liaisons hydrogène due à l'environnement hydrophobe des lipides et une possible réorientation de certains segments de la protéine qui rapprocherait deux feuillets  $\beta$  intramoléculaires (Granjon et al. 2001). La diminution de l'intensité de l'absorption des hélices  $\alpha$  observée en PM-IRRAS correspondrait alors plutôt à un changement d'orientation des hélices  $\alpha$  en présence de lipides, par rapport à la protéine à l'interface air – tampon. En effet, une disparition des hélices  $\alpha$  entrainerait l'apparition de nouvelles structures ( $\beta$  ou apériodiques) or, bien qu'une analyse fine des changements de structure soit très difficile étant donné le faible rapport signal sur bruit, aucune bande liée à de telles structures ne semble apparaître.



**Figure 14: Spectre PM-IRRAS de la CKmt** à l'interface air-tampon (courbe 1, bleu) et spectres de obtenus en présence d'une monocouche de CL (courbe 2, violet), DMPG (courbe 3, vert) ou PC:PE:CL (2:1:1) (courbe 4, rouge).

Comme indiqué ci-dessus, nous ne pouvons pas exclure un changement de structure secondaire de la protéine, mais compte tenu des modifications de structure relativement faibles observées en solution, la forte diminution de l'absorption dans la région 1650-1660  $\text{cm}^{-1}$  et l'augmentation de la bande amide-II semblent indiquer une verticalisation d'une ou de plusieurs hélices dans la protéine, suite à l'interaction avec les lipides constituant la monocouche. Il est difficile d'identifier les hélices impliquées, cependant nous pouvons faire quelques hypothèses.

Une première hypothèse serait la réorientation de l'hélice C-terminale,  $\alpha_{12}$ , suite à l'interaction avec la monocouche (Figure 15).

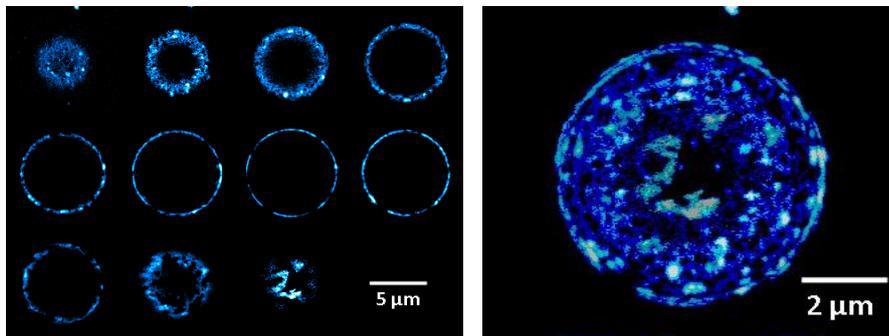


**Figure 15 :** Reorientation hypothétique de l'hélice  $\alpha$  12 en présence des lipides à l'interface : exemple d'un des 4 monomères (rectangle noir) exposés à l'interface lipides-tampon.

Constituée de 22 résidus et relativement importante en taille par rapport aux autres hélices de la protéine, l'hélice amphipathique  $\alpha$ 12 est située au voisinage du site de fixation à la membrane. Elle est donc susceptible de subir une re-orientation suite à l'interaction avec les lipides. Ce changement d'orientation permettrait aux résidus chargés positivement situés à l'extrémité de l'hélice, Arg 364 (chez le lapin) ou Lys 364 (chez le poulet et la plupart des autres mammifères), de participer à la fixation. Cette verticalisation nous permet d'éliminer une des hypothèses faites d'après les mesures de capacité différentielle, selon laquelle cette hélice pourrait s'insérer dans la monocouche en s'orientant parallèlement à l'interface. En même temps, l'insertion de l'hélice orientée verticalement semble exclue du fait de la présence des acides aminés chargés à son extrémité. La deuxième explication serait plutôt liée à un déplacement global des monomères, selon le type d'interface à laquelle ils sont exposés. En absence de monocouche et d'après les modèles (Castano et al. 1999), la résultante des moments dipolaires des hélices  $\alpha$  est inclinée par rapport à l'interface avec un angle de  $30^\circ$ . La meilleure orientation de l'octamère à l'interface air – eau est celle avec les faces supérieure et inférieure du cube de la CKmt parallèles au plan de l'interface. Dans ce cas, les monomères seraient distribués symétriquement par rapport à la normale et par rapport au plan de l'interface, dans une conformation proche de la structure cristallisée. En présence d'une monocouche chargée, les monomères en interaction directe avec les lipides pourraient subir une distorsion se traduisant par une modification dans l'orientation de la résultante des moments dipolaires de l'octamère par rapport à la membrane.

## 9. Suite du projet – développements ultérieurs

Après ma thèse, l'équipe a continué le travail sur l'interaction CKmt-membrane mitochondriale. Mouhedine Cheniour (thèse soutenue en 2012, dir. thèse Olivier Marcillat et Thierry Granjon) a pu mettre en évidence la présence des complexes protéolipidiques à la surface de vésicules géantes (GUV) composées de PC:PE:CL 2/2/1 (Figure 16). Il a également pu montrer que i) la protéine "ponte" les vésicules, ce qui confirme son rôle au niveau de points de contact entre les membranes mitochondriales et que ii) la fixation de la protéine induit une diminution de la fluidité membranaire et une homogénéisation globale de la fluidité membranaire (Cheniour et al. 2017).



**Figure 16:** GUV PC:PE:CL (2:1:1) après incubation avec CKmt-AEDANS. Des domaines de protéine se forment à la surface de la vésicule (Cheniour et al. 2017).

Afin de mettre en évidence l'existence de domaines de fluidité membranaire différente au sein de la membrane, l'équipe a démarré un projet de synthèse d'analogues du Laurdan, sonde de fluorescence sensible à la polarité de son environnement. Ce projet a abouti à une série d'analogues aux propriétés diverses (Cheniour et al. 2016) et à la synthèse d'une molécule en particulier, le Dioll, dont il sera question plus tard.

Nos expériences sur la CKmt montrent un rôle d'organisation de la protéine au niveau de la membrane mitochondriale. Mais, les hépatocytes sont dépourvues de CKmt. Dans la littérature (Schlattner et al. 2015, 2018), il a été suggéré qu'une autre protéine pourrait prendre la relève. Celle-ci serait la forme mitochondriale de la nucléotide diphosphate kinase-D, la NDPK-D. Pendant ma thèse, nous avons commencé à mettre en place un protocole de purification de la NDPK-D, puis des isoformes cytosolique A et B, travaux continués avec la thèse de Liberty François-Moutal (soutenue en 2013, dir thèse Olivier Marcillat et Thierry Granjon) (François-Moutal et al. 2016; François-Moutal, Marcillat, and Granjon 2014; François-Moutal et al. 2013). Nous avons pu montrer, d'une part, que l'isoforme mitochondrial de la NDPK, l'isoforme

D, pouvait également former des complexes avec la CL, mais avec des tailles et des épaisseurs beaucoup plus faibles, et, d'autre part, que l'isoforme cytosolique NDPK-B se fixe à la phosphatidylsérine au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique et que cette fixation entraîne une rigidification de la membrane et la formation de complexes NDPK-B – PS. La fixation a lieu en deux étapes, adsorption suivie d'une insertion de la protéine dans la membrane.



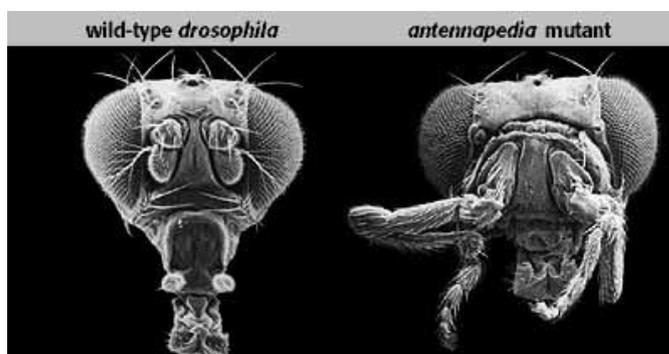
Premier stage Postdoctoral (2008-2009)

*Mécanisme d'interaction des peptides basiques de type vecteur avec des membranes  
modèles et biologiques*

Equipe du Dr. Jesus Ayala Sanmartin, UMR 7613 CNRS-Université Pierre et Marie Curie, Paris.

Pendant mon stage post-doctoral à l'Université Pierre et Marie Curie dans l'équipe du dr. Jesus Ayala Sanmartin, je me suis intéressée à l'interaction de peptides vecteurs (pénétratine, polyarginine, RW9, ...) avec des modèles membranaires tels que les liposomes et les bourgeons de la membrane plasmique. Je me suis plus particulièrement focalisée sur l'étude des modifications de courbure et fluidité membranaire, en utilisant la fluorescence d'une sonde sensible à la fluidité de son environnement, par microscopie optique, d'épifluorescence et confocale à l'aide d'un peptide à étiquette carboxyfluorescéine et de sondes membranaires.

Les peptides basiques pénétrants (CPP pour *cell penetrating peptides*) peuvent transporter à l'intérieur des cellules différentes molécules polaires ou apolaires. Parmi les premiers CPP décrits, nous pouvons citer le peptide Tatp47-57 (YGRKKRRQRRR), découvert en 1988, dérivé du facteur de transcription TAT du virus HIV (Green and Loewenstein 1988), ou encore le peptide principalement étudié lors de ce stage postdoctoral, la pénétratine (RQIKIWFQNRRMKWKK). La pénétratine est un peptide de 16 acides aminés issu d'Antennapedia, un facteur de transcription chez la Drosophile, qui contrôle le placement des pattes sur l'axe de polarité antéro-postérieur, d'où l'abréviation parfois utilisée de pANT. Une mutation sur ce facteur entraîne la formation de pattes à la place des antennes (Figure 17).



**Figure 17:** Drosophile normale (gauche) et drosophile possédant la mutation Antennapedia avec des pattes formées à la place des antennes. Image obtenue en microscopie électronique à balayage (Green and Loewenstein 1988) Source Image [Interactive Fly, Drosophila \(sdbonline.org\)](http://Interactive Fly, Drosophila (sdbonline.org)).

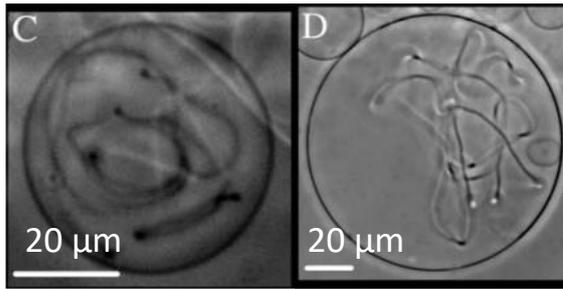
Le fragment correspondant à la pénétratine correspond à la séquence responsable de l'internalisation cellulaire et de l'adressage nucléaire de ce facteur (le *protein transduction domain*). Donc, ce peptide est capable de traverser les membranes et de transporter différents cargos à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. Depuis sa découverte en 1991 (Joliot et al. 1991), la pénétratine est utilisée comme peptide de pénétration cellulaire. Les CPP ont une action de type Cheval de Troie : ils pénètrent dans la cellule en entraînant

avec eux d'autres molécules. En règle générale, les CPP n'ont pas de récepteurs cellulaires connus. Différentes études ont montré que les peptides vecteurs peuvent à la fois être internalisés par des mécanismes de type endocytose (par exemple par voie indépendante de la clathrine (Drin et al. 2003), par la voie des cavéoles (Ferrari et al. 2003) ou par macropinocytose (Khalil et al. 2006)), mais aussi par des phénomènes de translocation (Derossi et al. 1996). Sur le même type cellulaire, la pénétratine peut être internalisée par endocytose à faibles concentrations ( $<5 \mu\text{M}$ ) ou par des mécanismes non-énergétiques à fortes concentrations (Alves et al. 2010).

Plusieurs études montrent une fixation exclusive des CPP sur les lipides chargés négatifs (Derossi et al. 1996; Vives 2005); d'autres montrent également une interaction avec des lipides neutres (Bellet-Amalric et al. 2000; Magzoub, Eriksson, and Gräslund 2003). Par mesures de fluorescence (la pénétratine possède 2 résidus Trp dans sa séquence), il a été montré que le peptide peut interagir à la fois avec des membranes chargées et non chargées, mais que 10 % de lipide chargé négativement suffisent pour augmenter fortement l'affinité du peptide pour la membrane (Christiaens et al. 2002). Une internalisation spontanée du peptide a été montrée en utilisant de GUV (Thorén et al. 2000; Persson, Thorén, Esbjörner, et al. 2004). En revanche, l'internalisation n'est pas spontanée lorsque des vésicules unilamellaires de type LUV (Large unilamellar vesicles) sont utilisées, l'application d'un potentiel transmembranaire étant nécessaire pour aboutir à l'internalisation du peptide (Terrone et al. 2003). La courbure membranaire est donc importante dans la translocation du peptide.

### **1. L'endocytose physique comme voie d'entrée des peptides vecteurs basiques à l'intérieur des cellules**

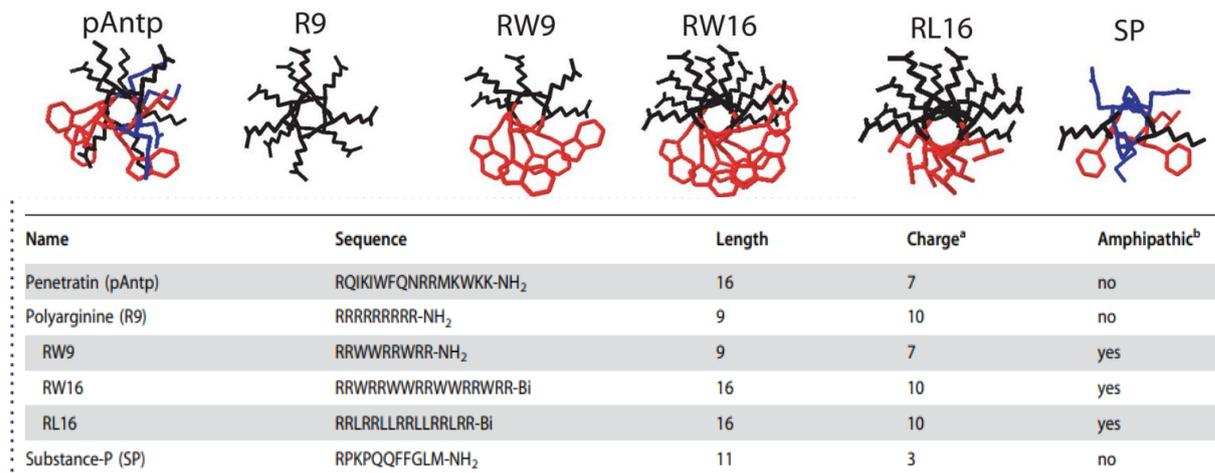
Les travaux précédents du laboratoire (thèse d'Antonin Lamazière, 2005-2008, dir. thèse Dr. Jesus Ayala-Sanmartin) ont montré que la pénétratine était capable de déformer profondément les bicouches lipidiques. A l'échelle microscopique, ces déstabilisations se traduisent par la formation d'invaginations tubulaires, très dynamiques, qui croissent à l'intérieur des vésicules géantes constituées de lipides en phase désordonnée (Figure 18).



**Figure 18:** Déformations membranaires induites par la pénétratine sur des GUVs PC:PG 9:1, observées par microscopie à contraste de phase. Barre d'échelle 20 µm (Lamazière et al. 2007)

À l'échelle moléculaire, la pénétratine génère une nouvelle phase lipidique qui s'apparente à des structures à forte courbure, semblables à des micelles inverses. Dans la formation de cette phase, la phosphatidyléthanolamine semble jouer un rôle important. Ces deux phénomènes se produisent sans apport énergétique extérieur et sans altérer la perméabilité membranaire.

Antonin Lamazière a analysé les effets de cinq autres peptides basiques: la Substance P, un neuromodulateur impliqué dans la transmission de la douleur qui agit *via* des récepteurs dédiés (SP), le peptide cationique R9, constitué d'un enchaînement de 9 arginines et trois peptides amphipathiques RW9, RW16 et RL9 (Figure 19).



**Figure 19:** Structures et caractéristiques des peptides analysés: séquence, nombre d'acides aminés, charge positive globale, caractère amphipathique de l'hélice (Lamazière et al. 2007).

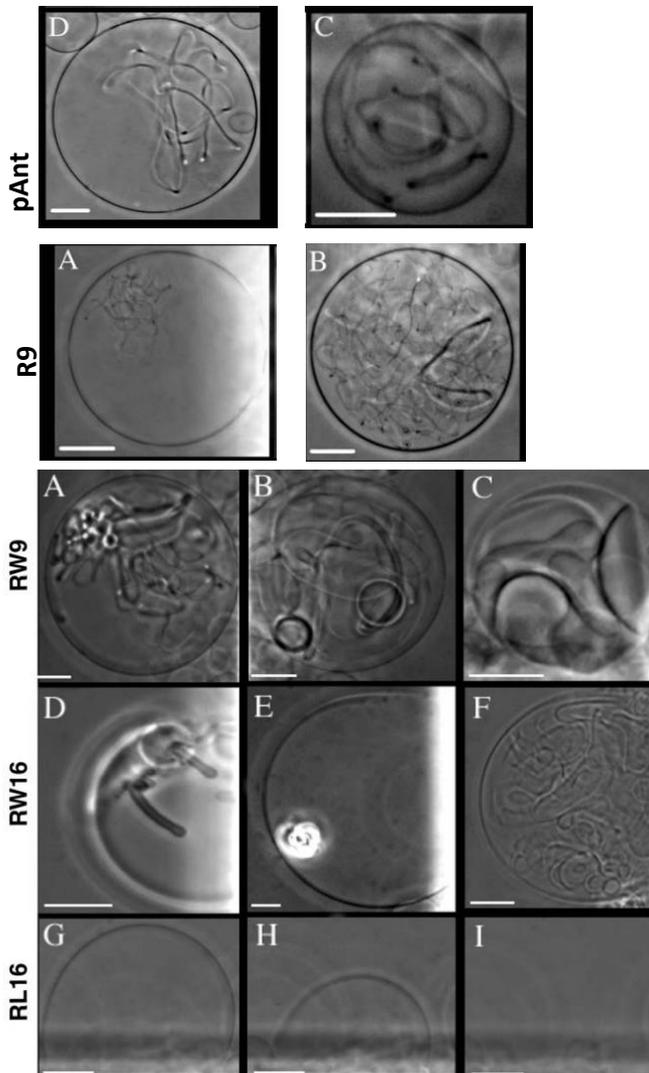
Les effets observés dépendent des caractéristiques du peptide (Figure 20). La pénétratine et le peptide R9 induisent la formation de microtubes à l'intérieur des vésicules qui envahissent progressivement le compartiment interne en moins de 20 min. L'intégrité de la vésicule est maintenue et on peut observer un processus d'attachement des vésicules

voisines.

Le peptide amphipatique RW16 induit également la formation de tubes, mais avec un diamètre systématiquement plus important, ainsi que des petits agrégats lipidiques à l'intérieur de la vésicule, ce qui cause une perturbation de la vésicule, une diminution de son diamètre et, occasionnellement, son éclatement. RW16 induit également l'adhésion de vésicules et la formation de petits agrégats, sans formation préalable de tubes.

Le peptide RW9 a un effet intermédiaire entre la pénétratine et le RW16, avec la formation concomitante de tubes fins et larges, la formation de petits agrégats lipidiques et la vésiculation à l'intérieur des GUV. L'intégrité des GUV n'est pas affectée.

Le peptide amphipathique RL16 induit la destruction complète des GUV en quelques secondes. La Substance-P ne perturbe pas la morphologie des vésicules.

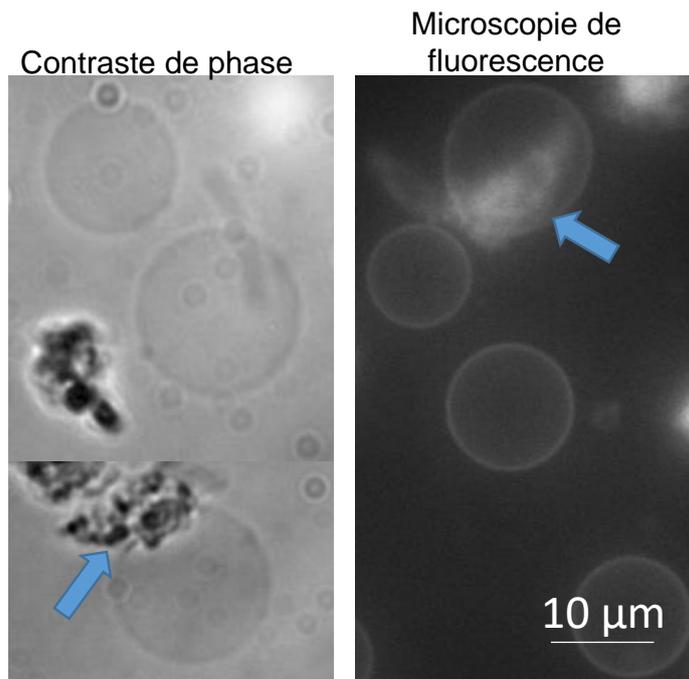


**Figure 20:** Déformations membranaires induites par les CPP sur des GUV PC:PG 9:1, observées par microscopie à contraste de phase. Barre d'échelle 20  $\mu$ m (Lamazière et al. 2007)

Ces résultats ont permis de proposer un modèle pour expliquer les différents comportements des peptides et leur effet sur les membranes: l'existence d'une «endocytose physique» comme nouvelle voie d'entrée des peptides vecteurs basiques à l'intérieur des cellules.

Suite à ces publications, une partie de mon travail de postdoctorat a été de vérifier l'existence des invaginations/tubulations lorsque la pénétratine et les autres peptides basiques se fixent sur des membranes plus complexes. Au niveau de la cellule, la présence du cortex d'actine, ainsi que celle de protéines telles que la dynamine, qui coupent les protrusions membranaires, empêchent la mise en évidence de la formation de tubules ou protrusions suite à l'interaction avec les membranes. C'est pour cela que nous avons utilisé un autre système d'étude, les bourgeons de la membrane plasmique, aussi appelés GPMV pour *Giant Plasma Membrane Vesicles* ou PMS pour *Plasma Membrane Spheres*. Ces vésicules, qui ont une composition proche de celle de la membrane plasmique, ont été utilisées dans plusieurs études pour analyser la coexistence des phases lipidiques (gel/liquide ordonné/liquide désordonné) dans des membranes de compositions plus complexes que celles des GUVs (Baumgart et al. 2007). Elles sont dépourvues de cytosquelette, mais contiennent des protéines transmembranaires et périphériques caractéristiques de la membrane plasmique. Cependant, l'asymétrie membranaire est perdue, la présence de PS à l'extérieur de la vésicule étant mise en évidence.

Plusieurs protocoles de préparation des bourgeons sont disponibles dans la littérature (Baumgart, Hess, and Webb 2003; Baumgart et al. 2007; Lingwood et al. 2008). Ils se forment notamment après une courte incubation (1h à 2h) avec des solvants tels que l'acétone ou le formaldéhyde. Nous avons choisi une méthode plus douce, décrite dans Lingwood *et al.*, 2008, par incubation des cellules (ici des cellules épithéliales, MDCK) avec PBS 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, 1 mg ml<sup>-1</sup> glucose, sur la nuit (Lingwood et al. 2008). Une population très nombreuse de vésicules de type GPMV a été obtenue. De manière générale, les vésicules sont rondes, leur diamètre variant entre 1 et 5 μm. Elles apparaissent soit individualisées (Figure 21), soit attachées à un corps cellulaire nettement rétréci (Figure 21, flèche).

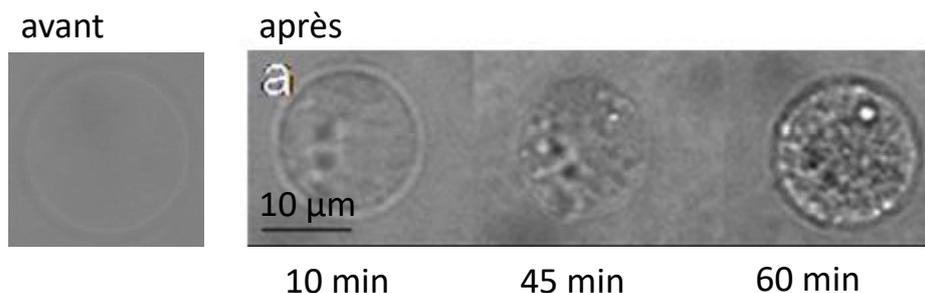


**Figure 21:** GPMV obtenues à partir des cellules MDCK visualisées par microscopie à contraste de phase (gauche) ou microscopie de fluorescence (marquage membranaire réalisé avec di-4-ANEPPDHQ).

Le marquage des membranes a été réalisé à l'aide de plusieurs sondes: le di-4-ANEPPDHQ, le DiI ou dans des cellules exprimant une protéine périphérique avec une étiquette GFP, l'annexine A2-GFP, qui est associé à la membrane plasmique. Pour toutes les expériences de microscopie nous avons utilisé une construction pénétratine-carboxyfluorescéine (CF), que j'ai synthétisée avec l'aide des Drs Fabienne Burlina et Gérard Chassaing, Laboratoire de Biomolécules, Université Pierre et Marie Curie.

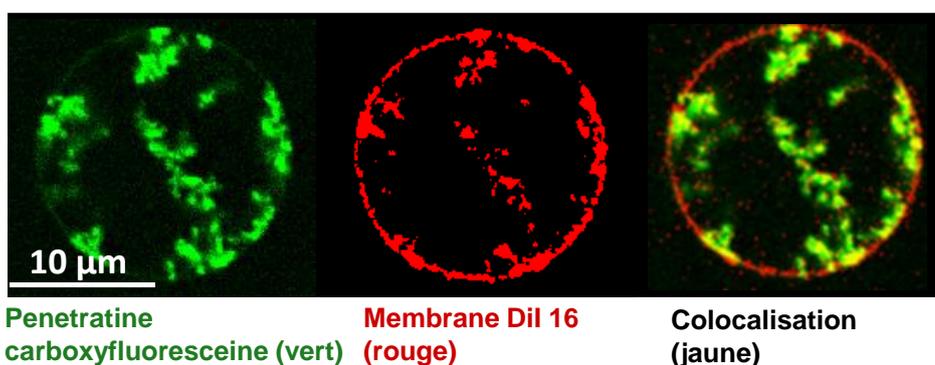
## **2. Tubulations induites par la pénétratine sur les vésicules issues de la membrane plasmique**

Observées par microscopie optique (contraste de phase), les vésicules apparaissent translucides en absence de pénétratine. Après ajout du peptide (10  $\mu$ M), on observe une accumulation de structures plus sombres et dynamiques à l'intérieur (Figure 22).



**Figure 22:** Structures formées par la pénétratine sur les GPMV. A gauche, GPMV avant l'ajout de pénétratine, à droite la même vésicule après ajout de pénétratine au cours du temps.

Afin de caractériser ces structures, nous avons utilisé la pénétratine-CF (en vert) et différents marquages membranaire. Comme nous pouvons voir dans la figure 23, des structures riches en pénétratine partent de la membrane des vésicules et grandissent vers l'intérieur. La taille et l'intégrité de la vésicule sont maintenues. Les structures sont également marquées par une sonde membranaire (ici DiI, en rouge). Elles sont dynamiques et rappellent les tubulations observées sur les membranes des GUVs PC/PG 9/1. Le peptide R9 est également capable de produire des structures similaires.



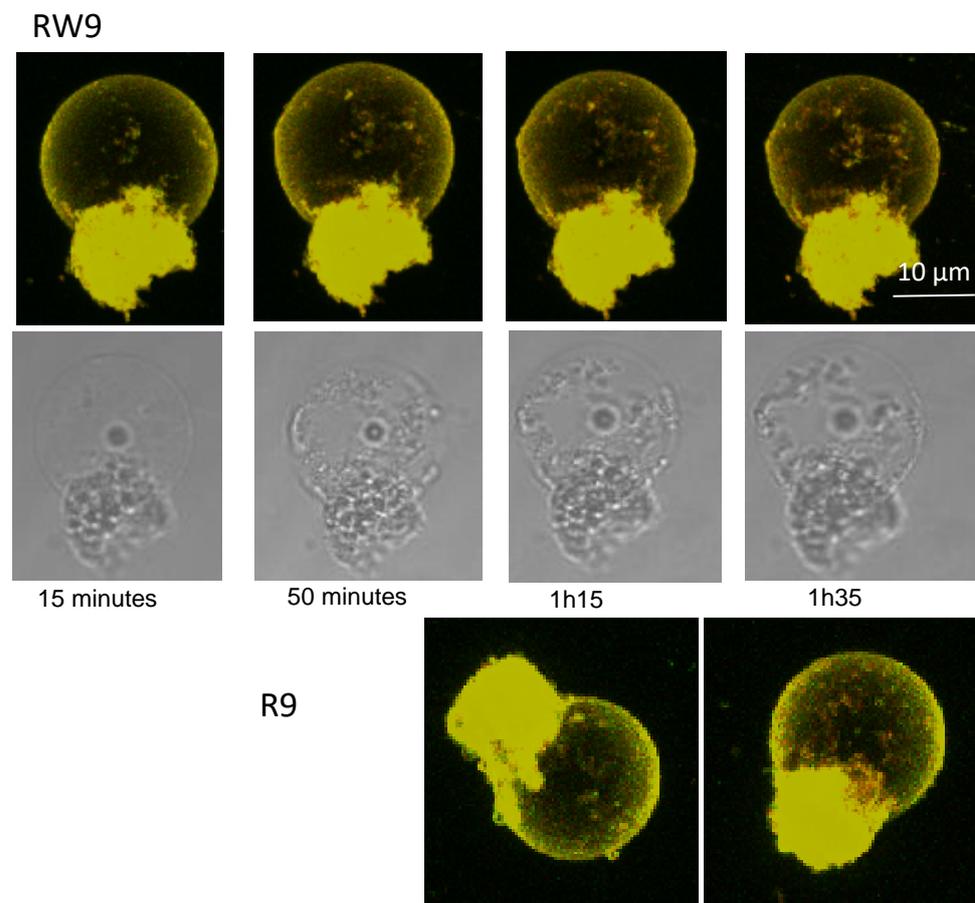
**Figure 23:** Les structures riches en pénétratine-CF contiennent également des membranes: colocalisation de la pénétratine avec le marqueur membranaire DiI.

Ces résultats sont à notre connaissance la première description de tubulations induites par des CPP dans les membranes biologiques. Les invaginations membranaires pourraient être dues à la formation de régions de courbure négative dans la membrane. Dans le cas de la pénétratine, ces régions seraient formées suite à l'association des résidus arginine aux phospholipides chargés négativement de la membrane induisant une compaction des lipides dans le feuillet externe. Une fois les invaginations initiées, des changements dans la tension membranaire permettraient la croissance spontanée des tubes à l'intérieur de la vésicule. Dans une cellule, une telle croissance des tubules est difficilement observable, certainement

dû à la présence de filaments d'actine en contact avec la membrane. Dans le cas des bourgeons de la membrane plasmique, l'absence de cytosquelette permet une certaine flexibilité de la membrane et la poursuite de la tubulation vers l'intérieur de la vésicule. Dans le cas des cellules, les vésicules d'endocytose sont rapidement séparées de la membrane par la dynamine, élément absent dans les bourgeons membranaires. La capacité de produire des invaginations a été décrite pour la toxine Shiga (Römer et al. 2007), ainsi que pour les domaines I bar des protéines (Saarikangas et al. 2009). Les travaux sur la toxine Shiga ont montré une stabilisation des invaginations membranaires dans des cellules dépourvues de dynamine et dans lesquelles la polymérisation de l'actine a été bloquée (Römer et al. 2007).

### 3. Est-ce que la capacité de former de tubulations au niveau de la membrane est spécifique à la pénétratine ?

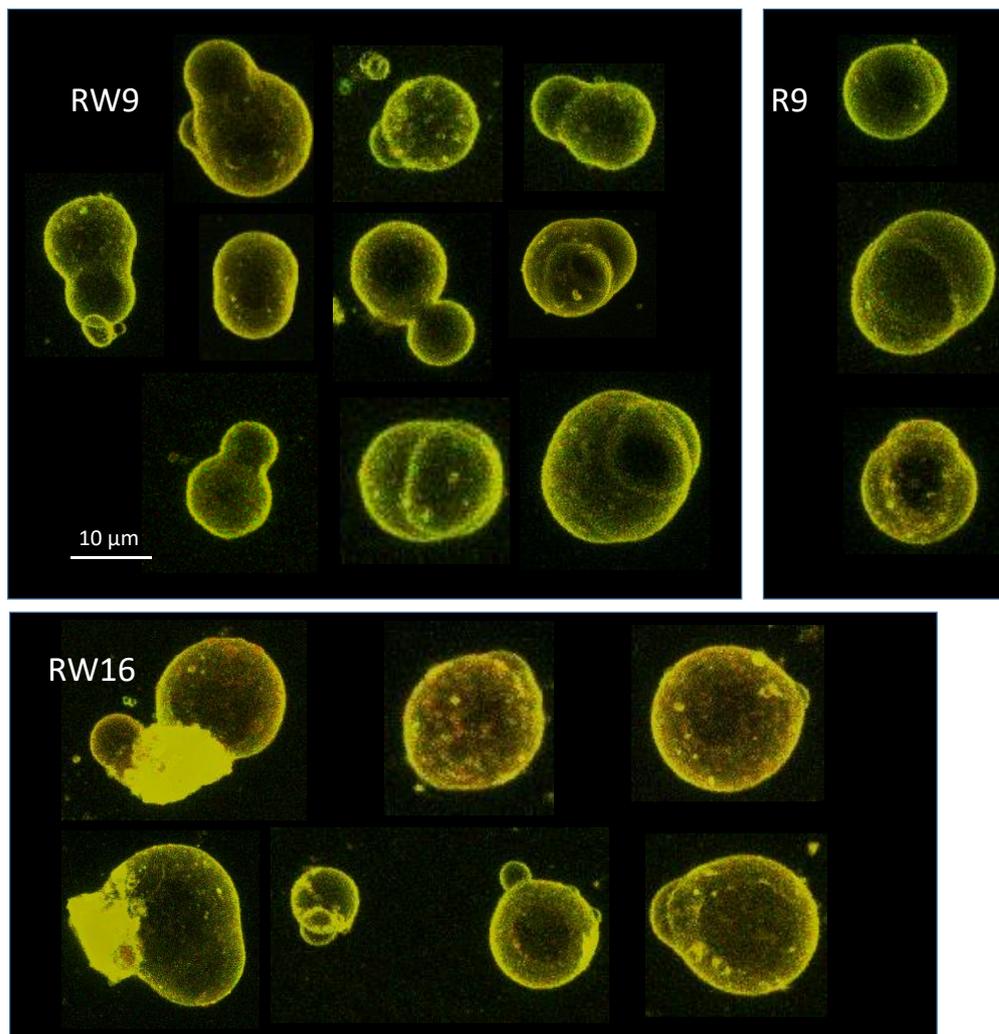
Nous avons utilisé le même modèle membranaire pour analyser l'interaction des peptides R9, RW9 et RW16.



**Figure 24 :** Accumulation de structures peptide/membrane à l'intérieur de GPMV produites par les peptides RW9 (haut) et R9 (bas).

L'effet des peptides basiques sur les GPMV est différent selon la charge et la structure du peptide. Les peptides R9 et RW9 peuvent former de tubulations à l'intérieur des vésicules mais leur fréquence est plus faible et leur diamètre plus grand (Figure 24). R9 et RW9 sont des peptides relativement courts et très chargés. La pénétratine est un peptide long et versatile du point de vue structural (Caesar et al. 2006; Magzoub, Eriksson, and Gräslund 2002; Magzoub et al. 2001; Persson, Thorén, Lincoln, et al. 2004; Maniti et al. 2010). Ce peptide peut se fixer à la membrane en différents points de sa surface et s'adapter en adoptant des structures plus diversifiées qui favorisent le pontage des membranes et la formation de tubes longs.

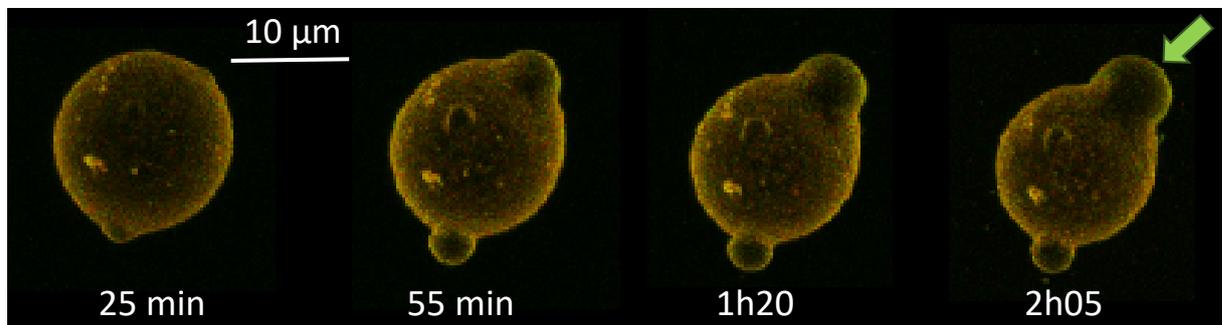
En plus de la formation de tubes, plusieurs phénomènes sont observés sur la morphologie des vésicules. L'effet le plus impressionnant est la déformation de la vésicule avec la formation de bourgeons /protubérances à l'extérieur de la vésicule (Figure 25).



**Figure 25:** Déformations de vésicules suite à l'interaction avec les peptides RW9, R9 et RW16.

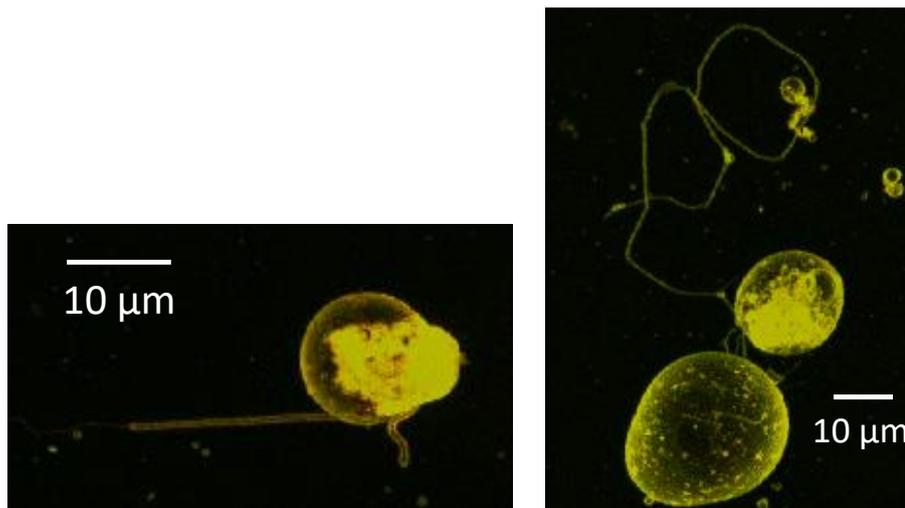
Le nombre de protrusions formées après incubation avec le peptide RW16 est significativement plus faible, ce qui indique que la longueur du peptide est importante pour l'induction des courbures positives dans la membrane.

L'organisation de la membrane au niveau de la protubérance se retrouve dans certains cas modifiée comme le montre le marquage de la membrane avec la sonde di-4-ANEPPDHQ. Cette sonde est sensible à l'organisation membranaire, *via* des interactions avec le cholestérol (Amaro et al. 2017) Nous avons enregistré des images en microscopie confocale sur deux canaux 570–590 nm et 620–640 nm selon le protocole de (Jin et al. 2006). En absence de peptides, les intensités des deux canaux sont similaires. Nous avons attribué une coloration verte au canal 570-590 nm et rouge au canal 620-640 nm. L'image fusionnée de deux canaux montre une membrane homogène colorée en jaune. Le peptide R9 ne modifie pas cette coloration, en revanche, après ajout du peptide RW9, nous avons observé sur certains GPMV des régions distinctes colorées en vert. Ceci indique la présence de régions plus ordonnées dans la membrane. Ce phénomène est observé dans la plupart des cas au niveau des protubérances comme le montre la figure 26.



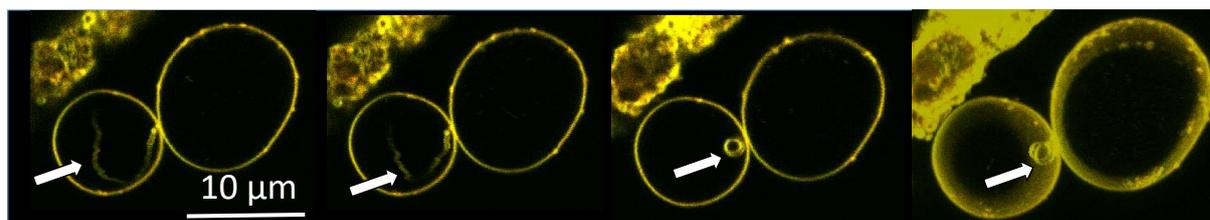
**Figure 26:** Formation de protubérances sur les GPMV suite à l'action du peptide RW9. La membrane a été marquée avec la sonde sensible à l'organisation de la membrane di-4-ANEPPDHQ. Une coloration verte au niveau de la protusion (flèche) indique une plus grande rigidité.

Un deuxième effet est la formation de tubes avec des diamètres entre 0,2 et 1 μm et de longueurs variant entre 5 et plus de 100 μm (Figure 27). La plupart de tubes se forment à partir de bourgeons encore attachés au corps cellulaire. Nous avons supposé que celui-ci pourrait constituer un réservoir de lipides qui permettrait la croissance des tubes (comme l'électrode dans le cas des GUV électroformés).



**Figure 27:** Formation de tubes à l'extérieur des bourgeons suite à l'interaction des peptides avec les vésicules.

Un phénomène très intrigant observé de manière systématique est l'enroulement de tubes très fins sous l'effet du faisceau d'éclairage (Figure 28). Ces phénomènes, bien que nombreux, sont très rapides et sont difficiles à capturer en images.



**Figure 28:** Enroulement d'un tube sous l'effet du faisceau d'éclairage. Le tube est en mouvement à l'extérieur de la vésicule, puis s'enroule pour former une spirale à la surface.

Ces résultats ont fait le sujet de deux articles publiés en International Journal of Biochemistry & Cell Biology, disponibles en annexe 5 et 6.

<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.02.017>

<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.02.010>

En parallèle, nous avons analysé l'effet et le rôle individuel des lipides dans la fixation et l'internalisation du peptide. Nous avons choisi d'effectuer cette analyse sur des modèles membranaires très simples (LUV de 100 nm de diamètre) et constitués d'un seul type de lipide. L'importance de la charge dans l'interaction pénétratine-membrane a déjà été largement analysée, nous nous sommes intéressés en plus à l'interaction de la pénétratine avec la PE. Nous avons pu montrer que l'affinité de la pénétratine pour les bicouches

supportées PC:PE (1/1) est d'un ordre de grandeur plus important que celle de pénétratine pour les bicouches PC et 4 fois plus important que les bicouches PG.

Nous avons pu mettre en évidence des phénomènes d'agrégation des vésicules constituées de PC et surtout de PE, mais pas des vésicules de PG : le mécanisme d'interaction est donc très différent – l'exposition de charges négatives ne permet pas le "pontage" de vésicules PG par la pénétratine, mais le permet pour celles de PC et PE.

Nous avons également mis en évidence des changements de fluidité de la membrane ou par des mesures de fluorescence en utilisant le Laurdan comme sonde sensible à la fluidité membranaire et par des mesures de spectroscopie infrarouge: la pénétratine produit une rigidification des vésicules de PE et de PG. Cette rigidification est due à l'expulsion des molécules d'eau au niveau des têtes polaires et de la chaîne glycérol, et non à un effet sur les chaînes acyles, dont les vibrations caractéristiques sont peu ou pas modifiées sur le spectre FTIR.

Les changements de conformation du peptide après fixation aux trois types de liposomes ont été analysés par dichroïsme circulaire (CD) et spectroscopie infrarouge (FTIR) et ont confirmé le statut de caméléon structural de la pénétratine. Les spectres en solution correspondent à un état avec peu de structures secondaires périodiques. La fixation aux vésicules de PG entraîne la formation d'hélices  $\alpha$  très marquées sur le spectre CD et feuilletts  $\beta$ , plus visibles sur le spectre FTIR. En présence de PE, la pénétratine adopte majoritairement une structure en hélice  $\alpha$  sur le spectre FTIR ; la forte agrégation induite par la pénétratine ne nous a cependant pas permis d'obtenir les spectres CD correspondants. Nous avons pu proposer un modèle d'interaction pénétratine – membranes différent selon la charge de la membrane cible : le peptide, non-structuré en solution, adopte une structure secondaire bien définie en présence de lipides chargés comme le PG. Cette structuration ne permet pas l'exposition des charges positives à la surface et ne permet pas la fixation de plusieurs vésicules sur le même peptide, ni la formation de complexes multimoléculaires de peptide.

L'interaction avec les phospholipides zwitterioniques dépend de la taille de la tête polaire du lipide. La pénétratine semble capable d'établir à la fois des interactions électrostatiques et non-électrostatiques. L'interaction a lieu en deux étapes : dans la première, le peptide induit une répulsion au niveau des lipides et dans la deuxième, les phospholipides se redistribuent dans une bicouche plus compacte, incluant le peptide plus ou moins "structuré" par l'interaction. Cette nouvelle structure permet la formation de complexes vésiculaires. Il est très intéressant de remarquer, d'une part la forte affinité de la pénétratine pour la PE, et

d'autre les effets très importants que le peptide induit sur les vésicules de PE: très forte agrégation, rigidification, changement de structure secondaire. Ces effets pourraient intervenir dans la translocation des protéines à travers les membranes. Dans ce cas, la structure membranaire en contact avec le peptide serait le feuillet interne de la membrane plasmique, riche en PE.

La diminution de fluidité membranaire et l'hétérogénéité de régions membranaires créées par le peptide pourrait également avoir une importance physiologique dans la translocation. Le pontage entre les membranes favoriserait la formation de structures tubulaires avant l'internalisation.

Ces résultats ont été publiés dans PLoS ONE en 2010, article disponible en annexe 7.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015819>

Deuxième stage Postdoctoral (2009-2011)

*Interactions des protéines recombinantes de la famille ERM (Ezrine/Radixine/Moésine) avec l'actine et des membranes phospholipidiques biomimétiques*

Equipe du Prof. Catherine Picart,

Laboratoire de Matériaux et du Génie Physique, CNRS-UMR 5628, Grenoble.

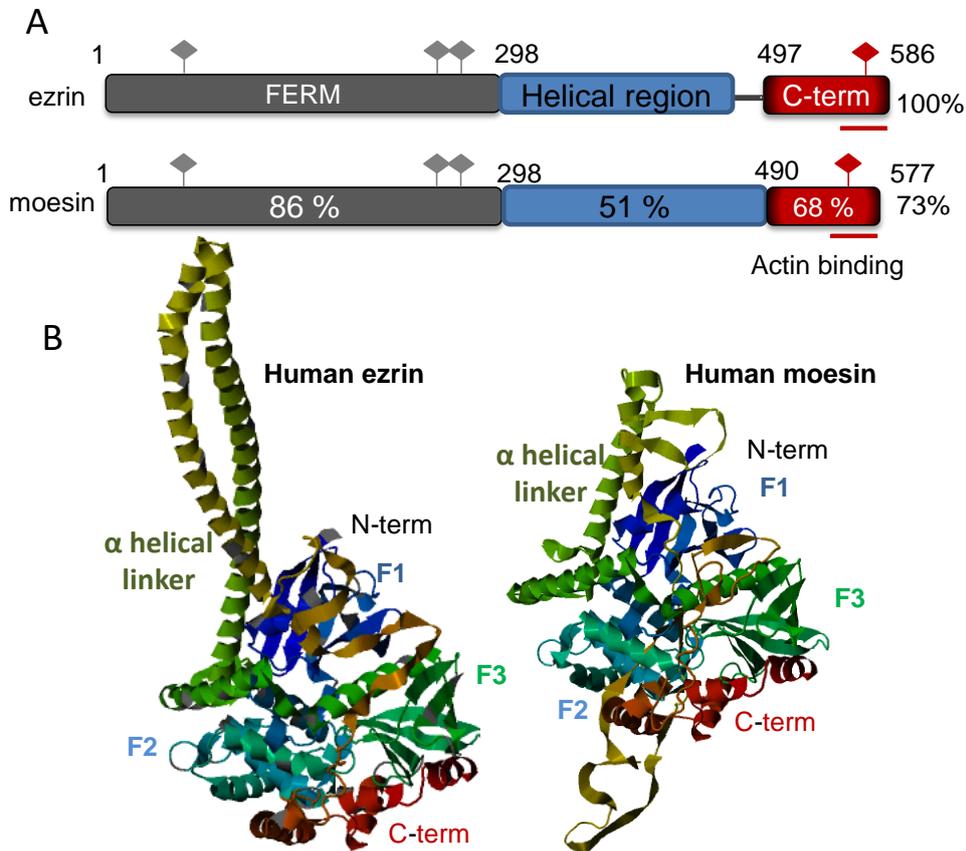
Lors de ce second stage postdoctoral, j'ai analysé les interactions des protéines de la famille des ERM (Ezrine/Radixine/Moésine) avec la membrane plasmique et les filaments d'actine par une approche biomimétique, en utilisant des vésicules lipidiques et des protéines recombinantes, pour reproduire et analyser *in vitro* ces interactions.

Le cortex d'actine est un réseau dense de microfilaments et de protéines, associé à la membrane plasmique qui, grâce à la tension qu'il génère, contrôle la forme, la polarisation et la motilité de la cellule. Les protéines de la famille ERM, l'ezrine, la radixine, la moésine sont des protéines qui "lient" les filaments d'actine (l'actine-F) à la membrane plasmique. Elles organisent ainsi le cortex d'actine au voisinage de la membrane participant à la formation de bourgeons, microvillosités, lamellae, pseudopodes, jonctions, synapses, etc (Fehon, McClatchey, and Bretscher 2010; Niggli and Rossy 2008). Chez les vertébrés, les ERM présentent des localisations distinctes: l'ezrine est retrouvée surtout dans les cellules épithéliales, étant initialement isolées à partir des cellules pariétales gastriques (Bretscher, Reczek, and Berryman 1997), la moésine est présente dans les cellules endothéliales et la radixine dans les hépatocytes. Les souris dépourvues d'ezrine ont des cellules intestinales présentant des vili courts et mal orientés, et ne survivent pas plus de quelques jours (Saotome, Curto, and McClatchey 2004); celles dépourvues de radixine présentent des dommages au niveau du foie et survivent 8 semaines (Kikuchi et al. 2002) et celles dépourvues de moésine ne présentent pas de différences phénotypiques avec les souris sauvages (Doi et al. 1999). Les ERM ont donc à la fois des fonctions spécifiques et des fonctions qui peuvent être prises en charge par les autres membres de la famille.

De par leur rôle dans la régulation de la motilité cellulaire, l'ezrine et la moésine ont été souvent associées aux phénomènes de métastase (Estecha et al. 2009; Yu et al. 2004; Khanna et al. 2004; Elliott et al. 2005). L'ezrine et la moésine sont distribuées de manière différente lors de l'invasion des matrices de collagène par les cellules: la moésine est présente au niveau du dôme cortical d'actine et l'ezrine au niveau des protrusions membranaires (Estecha et al. 2009). Des distributions différentes des deux protéines ont été également mises en évidence lors de l'activation des lymphocytes T (Shaffer et al. 2009; Ilani et al. 2007). Dans ce cas, l'ezrine est présente au niveau de la synapse immunologique et la moésine est présente au pôle distal. La moésine, et non l'ezrine, est également impliquée dans l'entrée des virus dans les cellules (Barrero-Villar et al. 2009). L'ezrine et la moésine ont donc à la fois des fonctions redondantes et des fonctions distinctes au niveau cellulaire.

Du point de vue structural, l'ezrine partage 73 % d'identité de séquence avec la moésine et 76 % avec la radixine (Niggli and Rossy 2008). Les trois ERM sont composées d'un domaine N-

terminal, impliqué dans la fixation à la membrane, le domaine FERM, d'un domaine C-terminal responsable de la fixation aux filaments d'actine et d'une région charnière (Figure 29). Cette région charnière, essentiellement structurée en hélice  $\alpha$ , est repliée dans la forme inactive, mais est supposée s'ouvrir lors de l'activation des ERM.

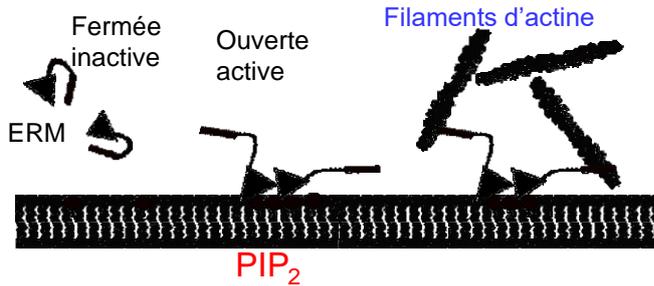


**Figure 29:** Structure des ERM. A. Domaines structuraux de l'eZRin et de la moesine: domaine FERM (gris), domaine C-terminal (rouge) et la région charnière hélicoïdale (bleu). B. Structure tertiaire de l'eZRin: à gauche la forme fermée et à droite la forme ouverte, obtenue par modélisation à partir de la structure cristallographique de *S. frugipeda* (2I1JA). F1, F2, F3 sont les trois lobes du domaine FERM.

Les mécanismes moléculaires de l'activation ne sont pas entièrement établis, mais il est décrit que dans l'état inactif, cytosolique, les domaines FERM et C-terminal interagissent, et les sites de fixation à l'actine sont masqués. Dans leur forme active, les ERM s'ouvrent et le site de fixation à l'actine est exposé (Figure 30). Un élément essentiel dans l'activation des ERM est la fixation à la membrane (Yonemura et al. 2002; Hao et al. 2009; Hirao et al. 1996; Fievet et al. 2004; Barret et al. 2000). Des processus de phosphorylation ont également été proposés (Fievet et al. 2004).

Au niveau membranaire, le partenaire d'interaction est le phosphatidylinositol (4,5)-

bisphosphate, le PIP<sub>2</sub>, lipide impliqué dans les mécanismes de régulation de la formation du cytosquelette (Saarikangas, Zhao, and Lappalainen 2010).

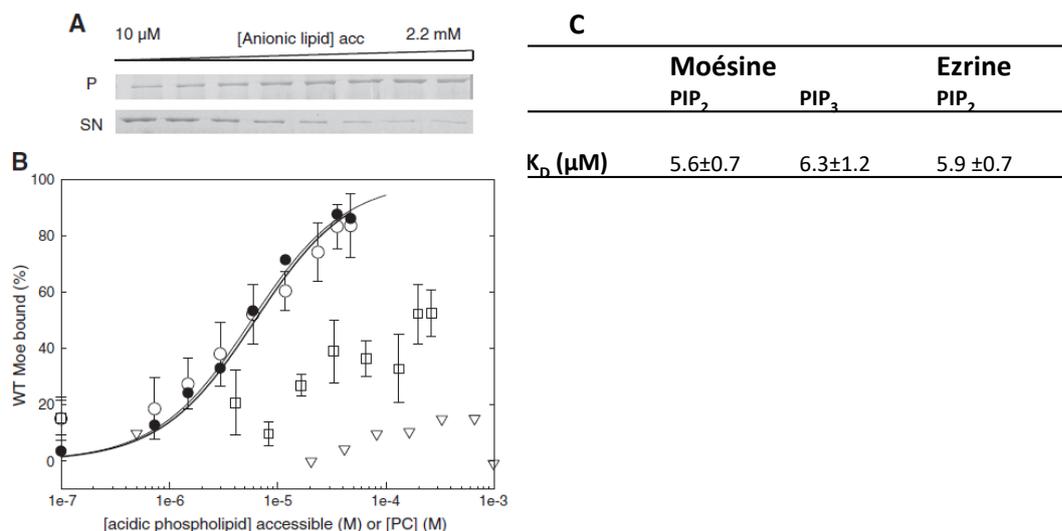


**Figure 30:** Mécanisme hypothétique d'activation des ERM : les ERM subissent un changement de conformation suite à la fixation à la membrane qui entraîne une ouverture de la structure protéique et l'exposition du site d'interaction avec l'actine.

Un but majeur de mon activité pendant ce stage postdoctoral a été de reconstituer ces interactions *in vitro*. Pour cela, nous avons tout d'abord analysé l'interaction de l'eitrine et de la moésine avec des liposomes, des LUV contenant du PIP<sub>2</sub>, et les modifications structurales de ces deux protéines suite à la fixation à la membrane (article annexe 8).

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.07.004>

Si l'interaction de l'eitrine avec des membranes modèles avait déjà été étudiée, la fixation de la moésine avait été négligée. Nous avons mis en place un protocole de purification de cette protéine et nous avons estimé et comparé les constantes d'affinité des deux protéines par rapport au LUV contenant du PIP<sub>2</sub> ou PIP<sub>3</sub> (Figure 31).



**Figure 31:** Fixation de la moésine aux liposomes. Les liposomes chargés en saccharose ont été séparés du surnageant par centrifugation. A. La quantité de protéine fixée a été estimée à partir du gel SDS-PAGE. B. Pourcentage de fixation en fonction de la concentration de phospholipide chargé négativement ( $\circ$ ) PIP<sub>2</sub>, ( $\bullet$ )PIP<sub>3</sub> ; ( $\square$ )PS , ( $\nabla$ ) contrôle liposomes PC ( concentration Moésine 0,4  $\mu\text{M}$ ) et valeurs de  $K_D$  (C).

En termes de structure, nous avons pu obtenir un faisceau de preuves qui vont dans la direction d'un "relâchement" de la structure des deux protéines: les résidus tryptophane et la sonde Alexa546 greffée au domaine C-terminal sont plus exposés au solvant, les deux protéines sont plus sensibles à la protéolyse après fixation à la membrane. En termes de structure secondaire, les spectres FTIR des deux protéines montrent une diminution du % des hélices  $\alpha$ , en faveur de structures apériodiques (Tableau 1).

		ezrine		moésine	
		PIP <sub>2</sub> -LUV -	PIP <sub>2</sub> -LUV +	PIP <sub>2</sub> -LUV -	PIP <sub>2</sub> -LUV +
Hélices $\alpha$	<u>position du pic (cm<sup>-1</sup>)</u>	1653	1652	1650	1650
	%	39	32	50	37
Feuillets $\beta$ intramoléculaire	<u>position du pic (cm<sup>-1</sup>)</u>	1631	1635	1635	1635
	%	37	32	32	30
Structures apériodiques	<u>position du pic (cm<sup>-1</sup>)</u>	1644	1641	1644	1640
	%	17	31	10	32
Feuillets $\beta$ intermoléculaire	<u>position du pic (cm<sup>-1</sup>)</u>	1606	1606		
	%	3.5	1		

**Tableau 1:** Position du maximum de la bande de vibration et pourcentage de la structure sur la totalité de la bande amide I obtenues par déconvolution des spectres FTIR de l'ezrine et de la moésine en solution ou après fixation à des LUV PC:PIP<sub>2</sub> 95:5.

Cependant, malgré de multiples tests, nous n'avons pas pu mettre en évidence, avec certitude, une fixation aux filaments d'actine des ERM fixées aux LUV. A titre d'exemple, la figure 32A montre une image des filaments d'actine observés par microscopie TIRF (*total internal reflection fluorescence microscopy*), en présence de liposomes ayant fixé l'ezrine-Alexa488. Les filaments sont marqués à la phalloïdine Alexa546. On observe une distribution aléatoire des LUV et des filaments. La même distribution aléatoire est observée par cryo-microscopie (Figure 32B).

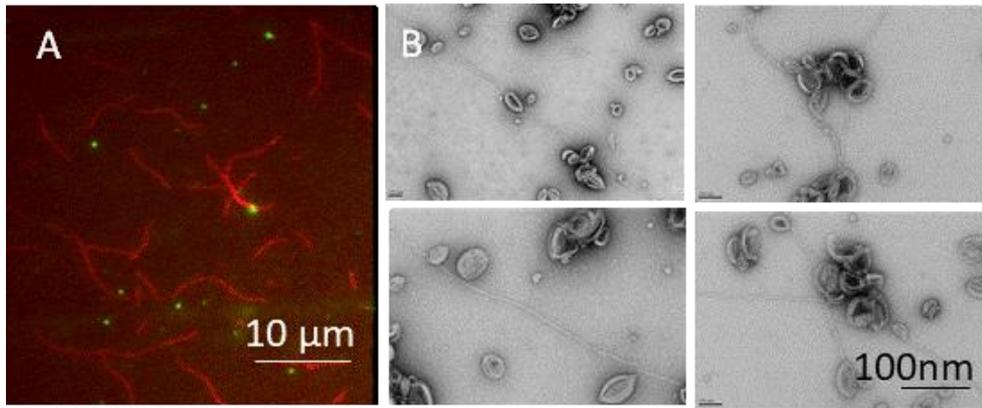
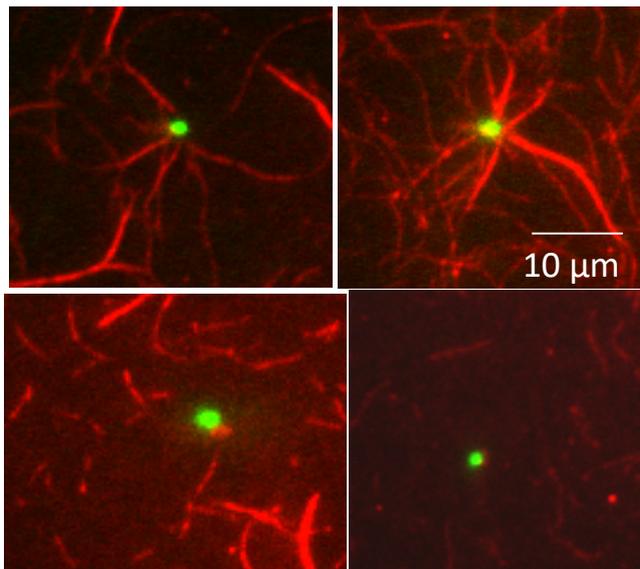


Figure 32: Filaments d'actine et LUV-PIP<sub>2</sub> Ezrine: A. Image en microscopie TIRF (Ezrine Alexa488 et Actine Phalloïdine Alexa546). B. Images en microscopie électronique à transmission: gauche : LUV-PIP<sub>2</sub>/actine, droite : LUV-PIP<sub>2</sub> Ezrine/actine.

En revanche, lorsque l'ezrine est adsorbée sur des billes de polystyrène en présence de PIP<sub>2</sub>, nous pouvons observer une croissance des filaments d'actine à partir de ces billes (Figure 33).



**Figure 33:** Organisation des filaments d'actine autour des billes sur lesquelles l'ezrine fluorescente est adsorbée. Haut: en présence de PIP<sub>2</sub>; Bas: en absence de PIP<sub>2</sub>. L'actine est marquée en rouge (Alexa546 Phalloïdine) et l'ezrine en vert (Alexa488).

Nous avons émis l'hypothèse que les changements de structure de l'ezrine en présence de LUV - PIP<sub>2</sub> ne sont pas suffisants pour induire l'activation de la protéine. D'autres phénomènes pourraient être mis en jeu comme la phosphorylation de l'ezrine. Nous avons donc purifié un double mutant phosphomimétique, Ezrine T235D T567D (Ezrine DD). L'interaction de ce mutant avec des bicouches lipidiques contenant du PIP<sub>2</sub> a été analysée après mon départ du

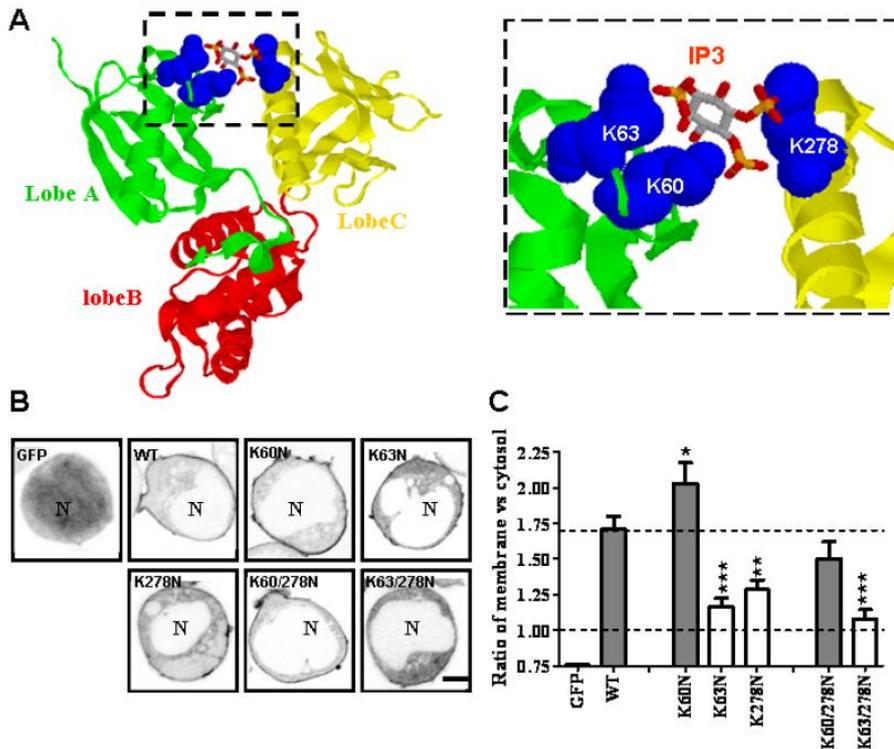
laboratoire pendant la thèse de Quentin Lubart (soutenue en 2016, dir Thèse Prof Catherine Picart). En effet, la forme mutée de l'eitrine se fixe effectivement à la membrane, et permet l'accumulation des microtubules à la surface d'une bicouche supportée contenant du PIP<sub>2</sub> (Lubart et al. 2018).

En parallèle, j'ai participé à une étude menée par l'équipe du Prof Steve Shaw du National Cancer Institute, Bethesda, Etats Unis, dans laquelle les rôles de chaque site de fixation de la moésine au PIP<sub>2</sub> ont été analysés dans un contexte cellulaire et confirmés par des expériences *in vitro* réalisées dans notre laboratoire. Cet article est disponible en annexe 9.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.304881>

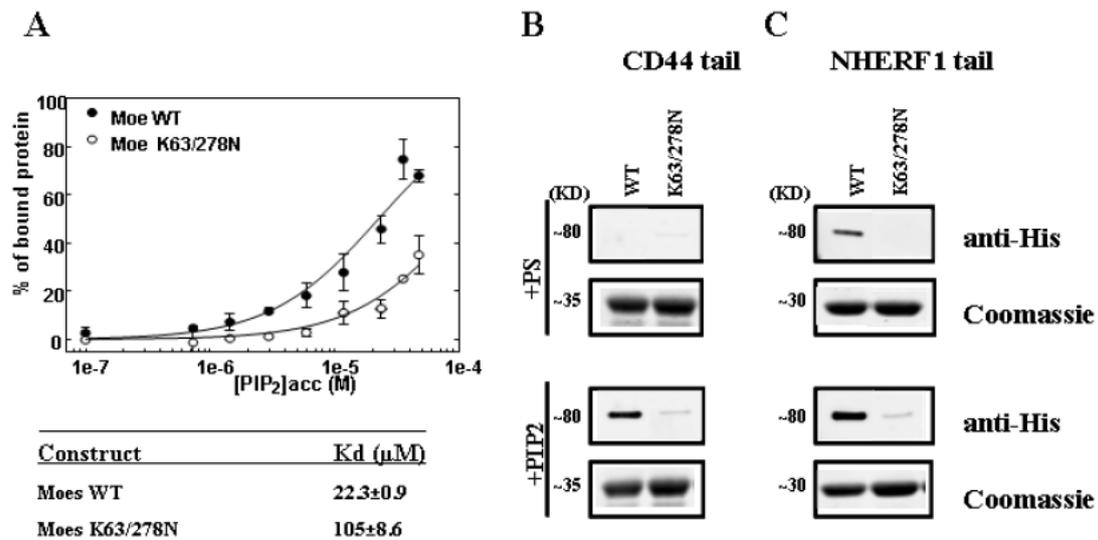
En termes de séquence/structure, deux sites de fixation ont été proposés dans la littérature. Le premier, le “PIP<sub>2</sub>-binding POCKET” (POCKET) a été identifié sur la structure cristalline du domaine FERM de la radixine complexé à l'IP<sub>3</sub> (Hamada et al. 2000). Ce site est situé dans un sillon entre les lobes A et C du domaine FERM. Le deuxième, PATCH, est situé sur le lobe C et a été proposé comme site de fixation par V Niggli et ses collaborateurs grâce à une séquence de 2 paires de résidus lysine (K253/K254 et K262/K263) (Barret et al. 2000). La mutation de ces 4 résidus lysines en asparagines (le mutant 4N) abolit toute fixation à la membrane. Le rôle de chaque site dans la séquence d'activation des ERM est mal compris. Le domaine POCKET, par exemple, est complètement masqué dans la structure 3D de la protéine et une fixation au PIP<sub>2</sub> est difficilement envisageable (Li et al. 2007). Le domaine PATCH peut initier la fixation à la membrane, mais peut-il également induire l'ouverture de la protéine et son activation ?

Des mutants ont été générés par l'équipe de Steve Shaw et leur fonctionnalité testée. Premièrement, parmi les mutants des résidus impliqués dans l'interaction Radixin FERM-IP<sub>3</sub> (POCKET) (K60 and K63 - lobe A and K278 - lobe C) (Figure 34A), les K63N et K278N diminuent la fixation de la protéine GFP à la membrane de 50 % et la double mutation de 80 %.



**Figure 34:** Le domaine POCKET et la fixation de la Moésine à la membrane des cellules Jukat. A. Les 3 lobes du domaine FERM et les résidus K60, K63 et K278 impliqués dans l'interaction avec l'IP<sub>3</sub> dans la structure cristallisée. B. Distribution de la Moésine-GFP WT et mutants K60N, K63N, K278N, K60/278N, K63/278N dans la cellule. C. Enrichissement membranaire calculé comme le rapport entre la fluorescence mesurée à la membrane/fluorescence mesurée dans le cytosol.

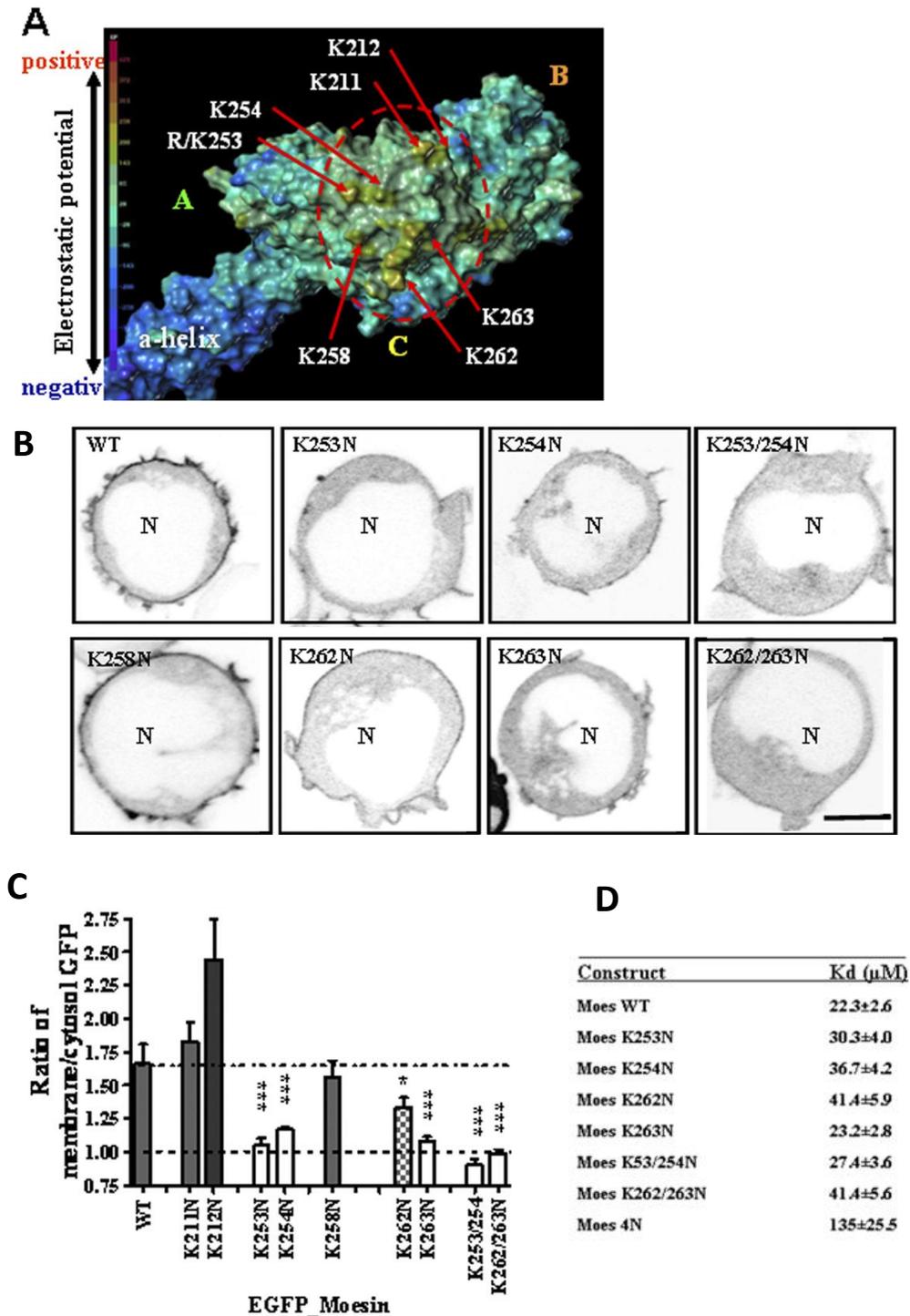
Afin de confirmer ce résultat, nous avons effectué des tests de cosédimentation avec des liposomes LUV-PIP<sub>2</sub> et déterminé les constantes de dissociation de la moésine WT et K63/K278N (Figure 35). La double mutation K63/278N induit une augmentation marquée du K<sub>D</sub> (de 22 à 105 μM). La forme mutée ne se fixe pas aux protéines membranaires CD44 et NHERF1 en présence de PIP<sub>2</sub>.



**Figure 35:** La mutation de résidus K63 et K278 du POCKET réduit considérablement la fixation de la moésine au PIP<sub>2</sub> et annule l'interaction avec les domaines cytoplasmiques des protéines membranaires CD44 (B) et NHERF1 (C) en présence de PIP<sub>2</sub>.

En ce qui concerne la région PATCH, 4 résidus lysines ont déjà été analysés (K253/K254 et K262/K263) (Barret et al. 2000). En plus de ces 4 résidus, 3 autres résidus lysine sont susceptibles d'intervenir dans l'interaction (K211, K212 et K258) (Fig. 36A). Parmi les résidus mutés les K253, K254 et K263 sont critiques pour la fixation à la membrane (Fig. 36 B et C). Le quatrième mutant, K262N, présente également une diminution de la fixation à la membrane, mais moins importante. Ces résidus correspondent aux 2 paires initialement décrites (Barret et al. 2000).

Est-ce que la diminution de la localisation membranaire est due à une modification de l'affinité pour le PIP<sub>2</sub>? Les tests de co-sédimentation montrent qu'au contraire, les mutations ponctuelles induisent peu ou pas de variation au niveau du K<sub>D</sub>, mais la mutation des 4 résidus, le mutant 4N, réduit drastiquement la fixation du mutant 4N (Figure 36 D).



**Figure 36:** Le domaine PATCH et la fixation de la Moésine à la membrane. A. Localisation des résidus d'intérêt et potentiel électrostatique de surface. B. Distribution de la Moésine- GFP WT et mutants dans les cellules Jurkat. C. Enrichissement membranaire calculé comme le rapport entre la fluorescence mesurée à la membrane/fluorescence mesurée dans le cytosol. D. Constantes de dissociation des mutants déterminées par cosédimentation avec des liposomes PC/PIP<sub>2</sub> (95/5)

Les mutations ponctuelles affectent donc la localisation membranaire sans affecter la fixation au PIP<sub>2</sub>, ce qui suggère que la localisation membranaire est plus complexe que la simple fixation

au PIP<sub>2</sub>. L'activation nécessiterait des phénomènes complémentaires à la fixation au lipide, comme par exemple l'interaction avec les protéines membranaires comme CD44 et NHERF-1. En effet, l'interaction avec ces protéines en présence de PIP<sub>2</sub> se retrouve grandement affectée à la fois par les mutations ponctuelles et par les double ou quadruple mutations. Les "simple" mutants peuvent se fixer au PIP<sub>2</sub>, mais ne sont pas activés suite à la fixation.

Deux sites de fixation au PIP<sub>2</sub> sont donc présents, avec des localisations et des accessibilités différentes : le domaine PATCH étant exposé à la surface, peut initier le contact avec le PIP<sub>2</sub>, pendant que le domaine POCKET est masqué par un segment chargé négativement (*acidic region*) d'approximativement 23 acides aminés (472-494) (Figure 37). Ce segment masque également la poche hydrophobe responsable de l'interaction avec le CD44. Cette région, dont l'importance a été décrite pour la première fois, a été dénommée FLAP. Une forme tronquée de la protéine dans laquelle le FLAP a été enlevé présente une fixation très importante au PIP<sub>2</sub> et peut se fixer aux protéines CD44 et NHERF1. En résumé, les domaines PATCH et POCKET participent à la fixation de la moésine à la membrane. PATCH, exposé à la surface et accessible, est le premier site d'interaction. Sa fixation à la membrane produit le déplacement du domaine FLAP qui, à son tour, rend accessible le domaine POCKET pour l'interaction avec la membrane.

En absence de PIP<sub>2</sub>, les sites de phosphorylation du domaine C-terminal ne sont pas accessibles (Hicks et al. 2008; Pearson et al. 2000; Fievet et al. 2004). La fixation du PIP<sub>2</sub> au domaine POCKET compléterait l'activation de la moésine et permettrait la phosphorylation des sites, et, par conséquent, la stabilisation de la forme ouverte, active, capable d'interagir avec les filaments d'actine.



**Maître de conférences**  
**Université Claude Bernard Lyon 1, UMR 5246**

Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires  
Dans l'*Equipe Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages*  
*Supramoléculaires (GEMBAS)*.

**Depuis oct. 2011**

## **1. Présentation générale de thématiques de recherche**

Mon activité scientifique actuelle s'organise autour 4 thématiques ayant toutes en commun les lipides et leurs rôles au niveau des membranes, et l'étude des interactions molécules-membranes.

### **1.1. Liposomes sur mesure pour le ciblage des cellules tumorales**

Lors de mon recrutement dans l'équipe en 2011, j'ai souhaité mettre à profit mon expérience dans le domaine des membranes pour la conception de vecteurs de délivrance de médicaments de nature lipidique et l'analyse de leur interaction avec les membranes cellulaires et biomimétiques. Je me suis intéressée plus particulièrement aux liposomes, un des plus anciens mais des plus intéressants systèmes de délivrance de médicaments. Leur succès clinique est lié à leur structure en bicouche phospholipidique semblable à celle des membranes biologiques. Cependant, un taux d'encapsulation faible, un greffage d'anticorps coûteux avec de faibles rendements, ainsi qu'une charge de surface trop importante provoquant une élimination rapide des liposomes dans le sang pénalisent l'emploi de ces nanovecteurs en médecine. Afin d'augmenter la spécificité et l'efficacité des liposomes dans la vectorisation des chimiothérapies, le facteur utilisé pour cibler les cellules cancéreuses est la fluidité membranaire, chiffrée à l'aide d'une sonde de fluorescence développée à l'ICBMS et brevetée (collaboration avec l'équipe LCO2-Glyco). Ce projet de recherche a mené à la soutenance de thèse de Julien BOMPARD (co-encadrée avec le Prof. Agnès Girard-Egrot), le 16 décembre 2020. Pendant sa thèse, Julien Bompard a analysé l'interaction de liposomes de fluidité membranaire variable avec plusieurs lignées de cellules cancéreuses. Il a pu montrer que l'internalisation de ces vecteurs pouvait être modulée en fonction de la fluidité membranaire et que l'interaction entre la membrane du liposome et la membrane plasmique correspondait à un phénomène de fusion. Ces travaux ont été publiés dans *Langmuir* en 2020. Ils ont été présentés dans divers congrès sous forme de communications orales ou poster, et ils ont été accueillis avec beaucoup d'intérêt; Julien ayant remporté plusieurs fois le prix de la meilleure communication « Jeune chercheur » ou du meilleur poster.

Lors des stages de M2 recherche de Mme Xiaoyi Wang (2020) et de Mme Ariana Abawi (2021), nous avons poursuivi ce projet afin de délivrer un spécifiquement composé actif dans les lignées cancéreuses prostatiques. Nous avons choisi la délivrance des composés ancrés dans les membranes, afin d'augmenter l'efficacité de l'encapsulation, avec une

molécule phare, la Monométhyl Auristatine E, greffée sur un dérivé lipidique. Ces travaux ont été publiés en 2021 dans l'International Journal of Molecular Science.

Des tests avec d'autres molécules actives sont actuellement en cours.

La stabilité des liposomes *in vivo* est également analysée, en vue d'une utilisation thérapeutique de ces vecteurs. Cette étude est réalisée en collaboration avec le dr Giovanna Lollo de l'équipe GeParm du LAGEPP.

Nous poursuivons actuellement les tests sur d'autres lignées cellulaires afin de vérifier si la corrélation entre la fluidité membranaire des liposomes et celle des cellules cibles est un phénomène plus général et si ce paramètre peut être utilisé de manière systématique pour le ciblage des cellules tumorales. Ces mesures seront faites durant la thèse d'Ariana Abawi (2021-2024), que je co-dirige actuellement avec le Prof Agnès Girard-Egrot, en collaboration avec le dr Thierry Granjon, de l'équipe LCO2, ICBMS.

## **1.2. Fluidité des vésicules extracellulaires**

Dans le cadre d'un projet régional financé sur la période 2021-2026, coordonné par le Dr. Arnaud Vigneron, CRCL, dans lequel je suis responsable scientifique pour l'équipe GEMBAS, nous allons analyser la fluidité membranaire des vésicules extracellulaires de type exosomes dans un contexte d'évolution tumorale. Les exosomes sont des vésicules extracellulaires libérées par les cellules dans des situations physiologiques et pathologiques et sont envisagés comme biomarqueurs. Ils présentent des avantages majeurs par rapport à l'analyse de biopsies ou de tumeurs *in situ* car ils sont excrétés par la tumeur. Une corrélation de la fluidité membranaire des exosomes/vésicules extracellulaires (EV), issues de la tumeur et plus accessibles que les biopsies, avec celle des liposomes ciblant la tumeur présenterait une avancée thérapeutique importante.

L'analyse de la fluidité membranaire dans un contexte de développement tumoral fait partie d'un projet plus ample, concernant l'utilisation de la sonde Dioll dans des buts diagnostiques et pronostiques, financé d'abord par la Ligue contre le Cancer, Comité de Haute Savoie (2015-2016), puis par le CNRS dans le cadre d'un programme de pré-maturation (2016-2018) et par la SATT Pulsalys (maturation) (2019-2020), projets coordonnés par le Dr. Thierry Granjon, et par la région Rhône-Alpes-Auvergne via un financement Pack Ambition Recherche (2021-2026), projet coordonné par le Dr. Arnaud Vigneron. Dans ces projets je suis partenaire responsable de l'équipe GEMBAS.

### **1.3. Rôles des structures lipidiques dans les articulations synoviales**

Les performances lubrifiantes des articulations synoviales humaines, qui surclassent de loin les formulations de synthèse, sont dues à l'interface cartilage-liquide synovial, capable d'accommoder le glissement avec un frottement minime. En particulier, la présence des vésicules lipidiques multilamellaires, les vésicules synoviales, secrétées par les synoviocytes, semble essentielle pour le bon fonctionnement de l'articulation. Les pathologies ostéoarticulaires comme l'arthrose et l'arthrite rhumatoïde induisent une déstructuration de ces assemblages vésiculaires. En collaboration avec l'équipe MecaLip du LaMCoS, nous cherchons à comprendre le rôle de ces assemblages moléculaires sur les performances des articulations, dans le but de proposer des vésicules de substitution mimant les propriétés mécaniques et lubrifiantes des vésicules saines. Ce projet fait l'objet de la thèse de Layth Ben Trad, que je co-encadre avec Dr. Thierry Granjon et le Dr Ana-Maria Trunfio-Sfarghiu.

### **1.4. Analyse des mécanismes impliqués dans l'interaction liposomes – membranes en utilisant des bicouches lipidiques supportées biomimétique**

Dans une deuxième partie de sa thèse, M Bompard a cherché à caractériser l'interaction liposomes-membranes sur de modèles membranaires afin de mieux comprendre ses mécanismes. Pour cela, nous avons utilisé un système de membranes biomimétiques, des bicouches supportées découplées du support, mis au point dans notre équipe depuis 2014 et breveté. Ce projet, né sous l'impulsion du professeur Girard-Egrot, est un projet phare de notre groupe de recherche « membranes biomimétiques » dans lequel je suis fortement impliquée. Nous avons couplé ce système à une technique d'imagerie innovante, en collaboration avec le Dr. Dominique Ausséré (CNRS).

## **2. La membrane lipidique au cœur du ciblage tumoral : vers de nouveaux vecteurs, thérapeutiques liposomaux**

Situées à l'interface cellule/environnement, les membranes cellulaires subissent des transformations profondes lors de l'évolution d'une pathologie et sont susceptibles de servir de biomarqueurs, mais aussi de cibles thérapeutiques. Plusieurs études ont relié, par exemple, l'agressivité du cancer à des changements de la composition lipidique et donc, des propriétés physico-chimiques de la membrane plasmique qui devient alors de plus en plus fluide (Edmond *et al.*, 2015; Hattori *et al.*, 1987; Komizu *et al.*, 2012; Sherbet, 1989; Zouaoui *et al.*, 2017). Cependant, malgré les modifications profondes des membranes biologiques dans des conditions pathologiques, les aspects membranaires sont très peu exploités pour des approches thérapeutiques.

Parmi les différents systèmes de vectorisation développés, les systèmes liposomaux sont les plus répandus de par leur facilité de préparation, leur caractère amphiphile qui les rend compatibles à la vectorisation de composés hydrophiles ou hydrophobes, ou encore, leur innocuité en termes de biocompatibilité et biodégradabilité. Les liposomes sont des vésicules lipidiques, constituées d'une ou plusieurs bicouches, et sont généralement recouverts d'un revêtement hydrophile qui leur confère leur stabilité dans la circulation sanguine. Les stratégies de vectorisation ciblée à partir de liposomes reposent le plus souvent sur un couplage avec un fragment protéique, un anticorps ou un ligand, spécifique d'un des éléments surexprimés à la surface des cellules tumorales. En ce sens, les stratégies développées tirent parti des modifications de la composition protéique de la membrane plasmique pour un ciblage spécifique. Certaines stratégies tirent également partie des modifications de la composition glucidique, *via* un couplage des liposomes avec des fragments de lectines. En revanche, les modifications de la composition lipidique et des propriétés physicochimiques de la membrane plasmique sont encore à ce jour très largement sous-exploitées.

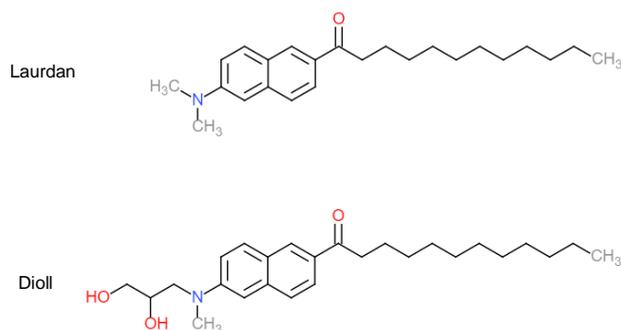
### **2.1 Le contexte du projet**

En 2011, un article publié par Komizu *et al* dans ACS Medicinal Chemistry Letters montre que des liposomes hybrides (constitués de 90 % DMPC et 10 % éthers de polyoxyéthylène dodécyle) inhibent la croissance des cellules tumorales. Cet effet est corrélé à la fluidité de la membrane plasmique des cellules, mesurée par dépolarisation de fluorescence en utilisant le 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH) (Komizu *et al.* 2011). L'activité antitumorale des

liposomes hybrides passe par l'induction de l'apoptose *via* l'activation de la Caspase 3 (Ueoka et al. 2011). Des études ultérieures ont confirmé ces résultats, apportant des données expérimentales qui montrent que les liposomes hybrides sont capables de discriminer entre les cellules de carcinome hépatiques, avec des membranes plus fluides, et les hépatocytes normaux (Komizu, Ueoka, and Ueoka 2012). Des effets thérapeutiques ont été obtenus également sur un modèle murin et chez les patients atteints de lymphomes (Ueoka et al. 2011). Ces résultats ouvrent la voie d'un ciblage cellulaire/tumoral basé sur les propriétés biophysiques des membranes.

D'autre part, le dr. Thierry Granjon, en collaboration avec le Dr. David Gueyrard et le prof. Peter Goekdjian, a mis au point dans l'institut une sonde (le Dioll) capable de mesurer de manière simple la fluidité membranaire à la fois sur des systèmes modèles (liposomes, nanoemulsions) et sur des membranes cellulaires (Cheniour et al. 2016).

Jusqu'à présent, le Laurdan (6-lauroyl-2-diméthylaminonaphtalène) est probablement la sonde la plus utilisée pour étudier la fluidité membranaire dans des assemblages biomimétiques, du fait de sa grande sensibilité à la polarité de son environnement. Cette molécule associe un noyau naphthalène, doté d'un rendement quantique de fluorescence élevé, à une chaîne alkyle lui permettant une bonne insertion dans la membrane (Figure 38). La tête polaire de la sonde se place à l'interface entre les chaînes acyles et les groupements phosphates des phospholipides au niveau de la chaîne glycérol (Jurkiewicz et al. 2012). Le Laurdan présente cependant plusieurs désavantages qui limitent son utilisation *in vivo*. Il est peu soluble dans un milieu aqueux, a une tendance à précipiter, sa fluorescence est relativement faible avec une forte tendance au photoblanchiment. Pour cette raison, la plupart des études *in cellulo* utilisent un système de microscopie biphotonique. De plus, le Laurdan marque, en plus des membranes, les gouttelettes lipidiques, ce qui entraîne des artefacts dans l'évaluation de la fluidité des membranes cellulaires.



**Figure 38:** Structures chimiques du Laurdan et Dioll.

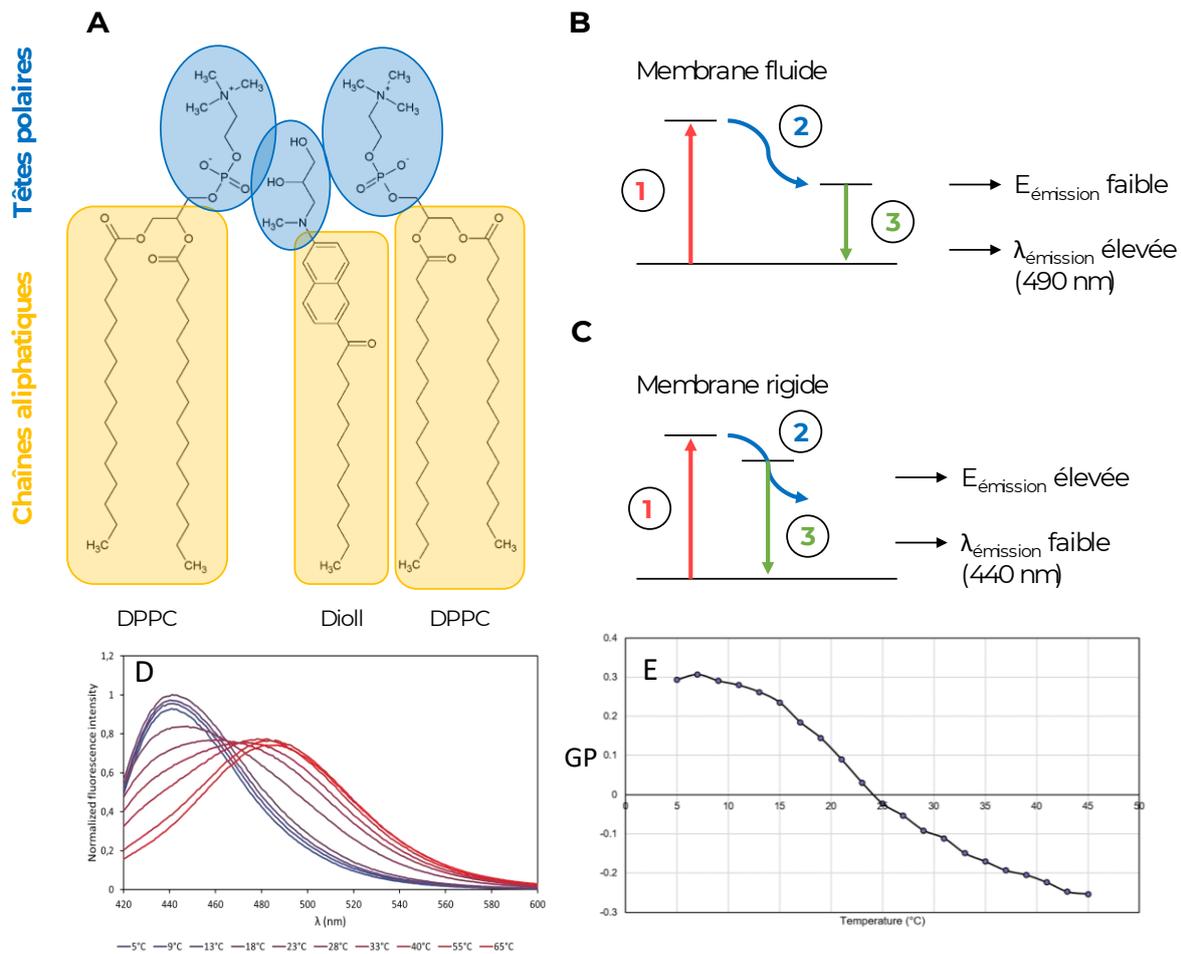
L'analogue du Laurdan, la sonde Dioll reprend la même structure globale, avec une différence majeure: un groupement méthyle de la tête "polaire" est remplacé par un isopropandiol, ce qui rend la molécule plus hydrophile sans ajout de charge supplémentaire (Figure 38). Ceci lui confère une meilleure solubilité dans des milieux aqueux et une intensité d'émission de fluorescence plus importante.

Comme son analogue plus connu, le Dioll s'insère dans les bicouches lipidiques, probablement au niveau de la chaîne glycérol (représentée schématiquement en Figure 39A) et sa fluorescence est très sensible à la polarité de l'environnement, qui influe sur la relaxation vibrationnelle de la molécule. Comme c'est le cas de toutes les molécules fluorescentes, après absorption d'un photon exciteur, le fluorophore subit des phénomènes de relaxation vibrationnelle, correspondant le plus souvent à une dissipation d'énergie dans le milieu par interaction avec les molécules de solvant. Par conséquent, le photon réémis sous forme de fluorescence a une énergie plus basse que celle du photon exciteur et, par conséquent, une longueur d'onde d'émission plus élevée. Lorsque le Dioll est inséré dans une membrane fluide, la longueur d'onde du maximum d'émission est de 490 nm (Figure 39B) pour une excitation à 390 nm. En revanche, quand la sonde est insérée dans une membrane rigide, le manque de mobilité des molécules dans la membrane réduit l'accessibilité de la sonde au solvant, ce qui atténue la relaxation vibrationnelle (Figure 39C). Le photon d'émission lorsque la sonde se situe dans une membrane rigide a donc une énergie plus élevée que celui émis dans le cas d'une membrane fluide, ce qui se traduit par une longueur d'onde d'émission de fluorescence plus faible (440 nm). Ainsi, en fonction de l'état physique de la membrane, on observe une inversion de l'intensité des pics d'émission (Figure 39D): le rapport  $I_{440\text{nm}} / I_{490\text{nm}}$  diminue. Dans le cas du Laurdan, on assiste à une perte de rendement assez importante lorsque cette sonde est insérée dans une membrane fluide, alors que cette perte est plus limitée dans le cas du Dioll. A partir des spectres d'émission obtenus, un paramètre qui permet de donner une estimation quantitative de la fluidité membranaire peut être calculé: il s'agit de la polarisation généralisée (GP) (Parasassi et al. 1991). Le paramètre GP est calculé à partir des intensités des pics d'émission de fluorescence obtenus pour chaque état de la membrane, selon la formule suivante :

$$GP = \frac{I_{gel} - I_{cl}}{I_{gel} + I_{cl}}$$

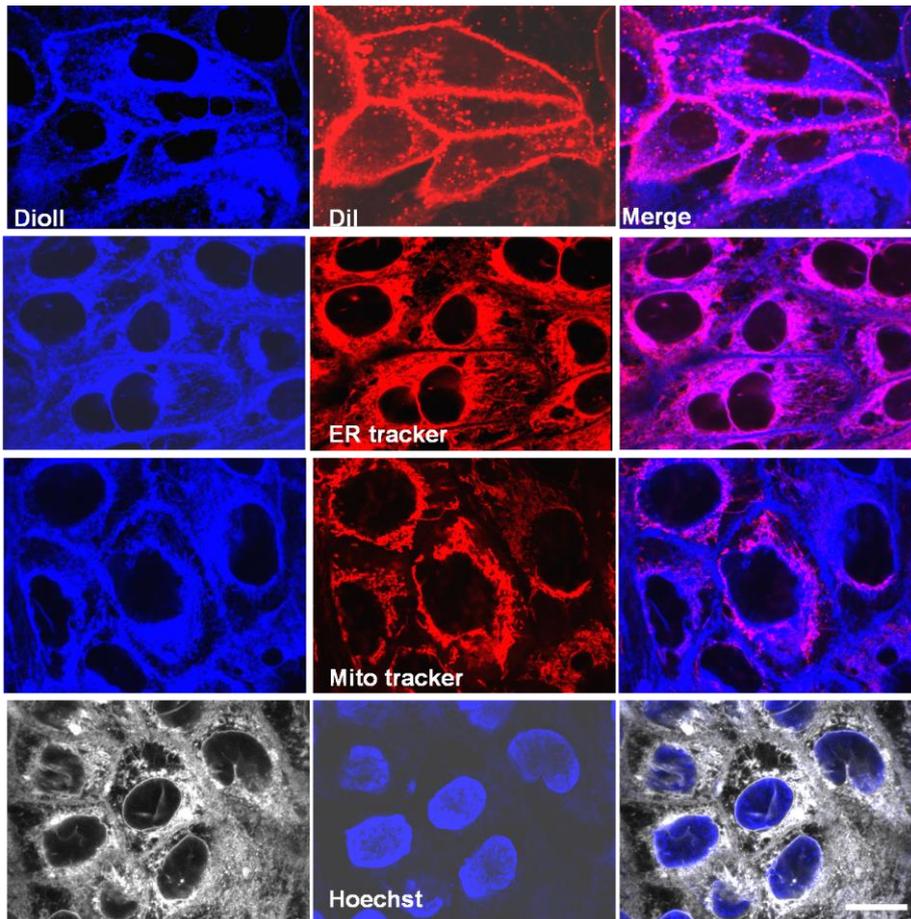
$I_{gel}$  et  $I_{cl}$  correspondent respectivement aux intensités maximales de fluorescence en phase gel ( $I_{gel}$ ) et en phase cristal-liquide ( $I_{cl}$ ). Selon la formule présentée ci-dessus, plus la valeur du paramètre GP est élevée, plus les lipides qui constituent la membrane adoptent une

conformation ordonnée et plus la fluidité de la membrane diminue. A l'inverse, plus il est faible, plus les lipides adoptent une conformation désordonnée et plus la fluidité membranaire augmente (Parasassi et al. 1998). La figure 39E montre l'évolution du GP en fonction de la température. Le point d'inflexion permet de calculer une température de transition de phase.

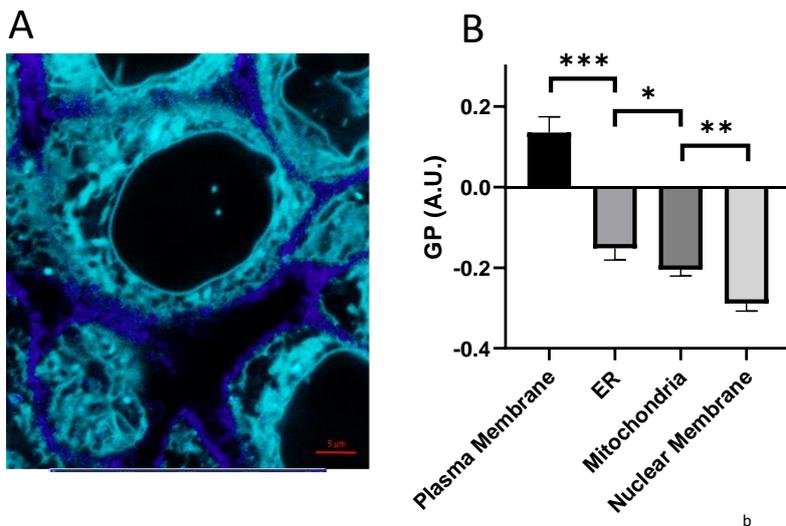


**Figure 39:** Fluorescence du DiIol dans les membranes lipidiques. A. Schéma représentant l'insertion du DiIol dans une membrane lipidique de DPPC. B. Phénomènes de relaxation dans une membrane fluide. C. Phénomènes de relaxation dans une membrane rigide. 1 : Excitation ; 2 : Relaxation vibrationnelle ; 3 : Retour à l'état fondamental et émission du photon de fluorescence. D. Spectres du DiIol inséré dans la membrane des liposomes DMPC à plusieurs températures. E. GP obtenu à partir des spectres de la figure D en fonction de la température.

Parmi ses nombreux avantages, le DiIol a la capacité de marquer rapidement l'ensemble des membranes des cellules (Figure 40), ce qui permet de quantifier la fluidité membranaire des différents types membranaires (Figure 41), mais également la fluidité globale de la cellule.



**Figure 40:** Le DiIol marque l'ensemble des membranes cellulaires. Tests de colocalisation avec des marqueurs membranaires (DiI), du réticulum endoplasmique (ER Tracker), de la mitochondrie (Mito Tracker) et du noyau (Hoechst).



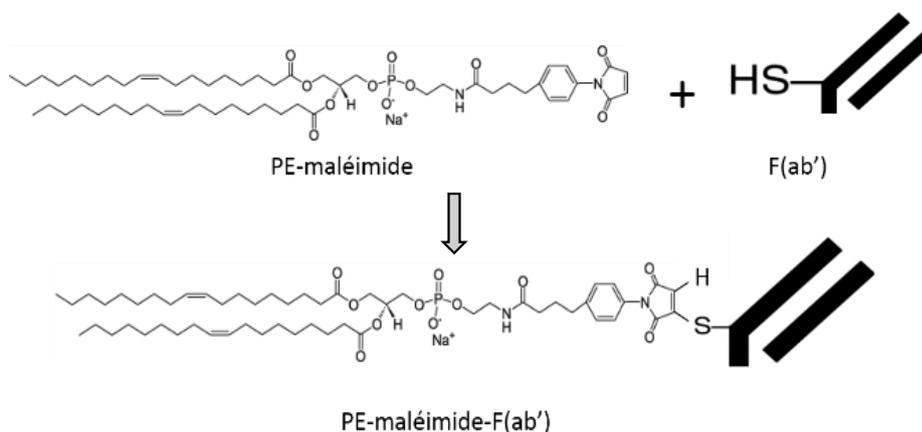
**Figure 41:** Cellules mammaires épithéliales (HMEC), marquées par DiIol. A. La membrane plasmique, plus rigide présente une coloration différente de la membrane des organelles. B. Mesure du GP réalisée au niveau des différentes membranes par traitement d'image.

Nous avons donc décidé d'utiliser cette sonde afin de mesurer des variations de la fluidité des membranes des cellules tumorales et d'utiliser les modifications des propriétés membranaires comme facteur de ciblage par des liposomes de composition modulable. En effet, en adaptant la longueur de la chaîne lipidique et l'insaturation des phospholipides constituant les membranes liposomales, il est possible d'ajuster leur fluidité pour correspondre à celle de la membrane cible, et favoriser de façon spécifique la fusion du liposome avec la membrane plasmique de la cellule cancéreuse.

## 2.2 Ciblage des cellules tumorales: avec ou sans anticorps ?

Les premiers tests de fusion entre des liposomes de fluidité similaire, en absence de cellules, n'ont pas été concluants: quelle que soit la composition des liposomes, l'efficacité de la fusion, déclenchée à l'aide d'un peptide fusogène et évaluée par FRET, n'est pas significativement différente selon le type de liposomes testés.

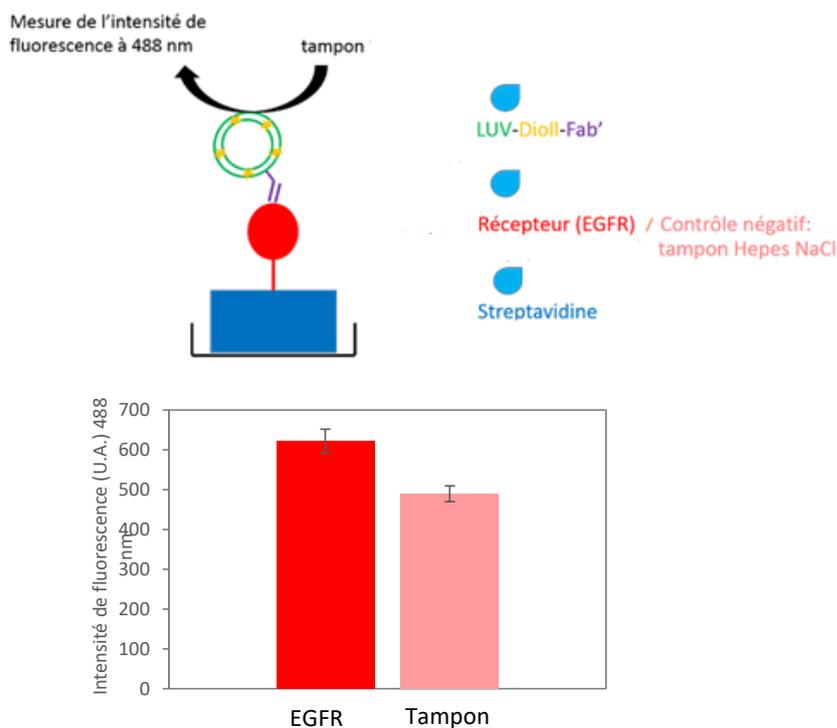
Lors du stage de M2 de Meriem Chadli (sept-juin 2014), nous avons décidé d'ajouter un autre élément de reconnaissance. Sur la base d'une littérature assez abondante à l'époque, nous avons décidé de greffer un fragment d'anticorps anti-EGFR à la surface des liposomes par une réaction entre un groupement thiol présent sur le fragment d'anticorps obtenu par fragmentation par protéolyse ménagée, et un lipide possédant une tête maléimide intégré dans les liposomes (Figure 42). L'EGFR est un récepteur membranaire surexprimé à la surface des cellules cancéreuses dans de nombreux types de tumeurs solides et faisant l'objet d'un intérêt accru en recherche fondamentale et industrielle.



**Figure 42:** Réaction de greffage du fragment Fab' de l'anticorps anti-EGFR au groupement maléimide présent sur la tête amine de la PE. Ce dérivé est intégré au sein des liposomes.

Après préparation des immunoliposomes, nous avons analysé par deux méthodes différentes leur interaction avec la cible, le fragment extracellulaire de récepteur à l'EGF, soit par un test d'immunodétection de type ELISA, soit par un test en SPRi en utilisant une bicouche supportée découplée du support.

Le premier test consiste à mesurer l'interaction entre l'EGFR et les immunoliposomes sur une plaque de 96 puits (Figure 43). L'EGFR a été fixé par le biais de son étiquette « strep-tag » à la streptavidine adsorbée au fond des puits. L'immunoliposome a été rendu fluorescent par intégration du Dioll dans la bicouche lipidique. L'intensité de fluorescence à 490 nm a été mesurée pour une  $\lambda_{exc}$  de 390 nm. Un contrôle sans EGFR a été effectué pour s'assurer de la spécificité de reconnaissance des immunoliposomes.

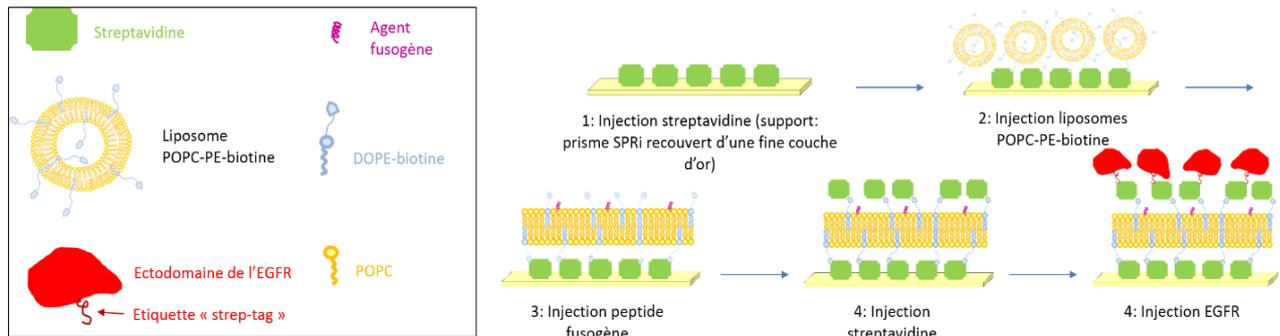


**Figure 43 :** Test d'immunodétection révélée par mesure de l'intensité de fluorescence du Dioll intégré dans les LUVs pour la détection de l'interaction entre immunoliposomes et EGFR - En rouge, présence d'EGFR dans les puits; en rose, absence d'EGFR dans les puits.

Une différence significative entre l'intensité de fluorescence mesurée en présence ou en absence d'EGFR a été observée, avec une augmentation mesurée de 22 % de l'intensité de fluorescence en présence d'EGFR (Figure 43). Ce résultat est en faveur d'une reconnaissance spécifique de l'EGFR par les immunoliposomes dont il est la cible.

Un deuxième test mis au point implique la formation préalable d'une bicouche phospholipidique

supportée à la surface d'un prisme SPRI. Cette bicouche est formée sur une surface préalablement recouverte de streptavidine et contient un lipide biotinylé. Le fragment extracellulaire du récepteur à l'EGFR se fixe sur la bicouche, mimant la situation physiologique dans laquelle le récepteur traverse la membrane et expose son exodomaine à l'extérieur de la cellule. Les liposomes peuvent ensuite interagir avec ce récepteur (Figure 44).



**Figure 44:** Formation de la bicouche modèle exposant le fragment de l'EGFR

Cependant, le rendement de greffage, le coût des anticorps et les faibles différences d'interaction entre les liposomes greffés ou non et le récepteur nous ont fait abandonner cette voie.

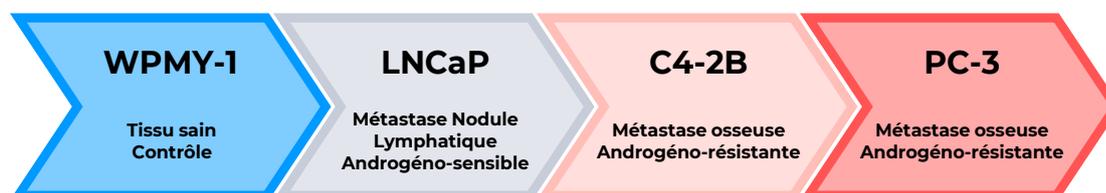
Meriem Chadli a poursuivi la mise au point des systèmes biomimétiques d'analyse des interactions molécules membranes en thèse Cifre (Dir thèse Agnès Girard-Egrot) en collaboration avec l'entreprise Synthelis (2015-2018). Elle a notamment continué la mise au point d'un mode de formation de bicouches supportées innovant, initié par le prof Agnès Girard-Egrot (ref brevet), en y intégrant des récepteurs transmembranaires (Chadli et al. 2018, 2017). Ces travaux font partie d'un axe important d'étude du groupe "Membranes Biomimétiques" de l'équipe GEMBAS, auquel je participe activement et qui seront décrits plus loin.

Cette approche, le greffage des anticorps sur des liposomes, sera adoptée à nouveau en 2021, lors de la thèse Cifre d'Anna Bérot (Dir. thèse Thierry Granjon), en collaboration avec l'entreprise Covalab. Le greffage des fragments d'anticorps sur les liposomes sera réalisé en utilisant une technologie brevetée par Covalab, ce que, nous l'espérons, va améliorer le rendement de greffage. Cependant, le but de cette thèse n'est pas de favoriser la fusion avec les membranes, mais au contraire, de délivrer une molécule fluorescente au niveau des endosomes, afin d'obtenir des exosomes fluorescents. Dans le cadre de ce projet de thèse, je participe à la mise au point de conditions de marquage et de purification des exosomes.

## 2.3 Premiers test d'interaction liposomes-cellules

L'arrivée dans l'institut du Dr. Leyre Brizuela-Madrid nous a permis de donner une autre dimension au projet et d'analyser les capacités d'interaction des liposomes-vecteurs avec les membranes de cellules en culture. Le Dr Brizuela-Madrid nous a proposé un modèle de cancer de la prostate. Nous avons tout d'abord comparé deux types cellulaires : PC-3 (lignée cellulaire de cancer de prostate métastatique, obtenue à partir d'une métastase osseuse d'un adénocarcinome prostatique de grade IV) et WPMY-1 (lignée cellulaire obtenue à partir de (myo)fibroblastes et de cellules épithéliales issues du stroma de la prostate; elle sert de contrôle mimant le tissu prostatique sain) (stage M2 de Julien Bompard, janv-juin 2017). M Bompard a continué ces analyses lors de sa thèse (2017-2020). Nous avons élargi cette étude avec deux autres lignées tumorales les LNCaP et les C4-2B, la première correspondant à une métastase issue d'un cancer de la prostate localisée dans un ganglion lymphatique supraclaviculaire, la seconde créée par inoculation chez une souris de cellules LNCaP et de fibroblastes issus d'un ostéosarcome, suivie d'une castration des souris pour induire une indépendance aux hormones. Les cellules ainsi créées forment des métastases osseuses.

Les 4 lignées tumorales présentent donc des degrés d'agressivité différents, schématisés dans la figure 45.

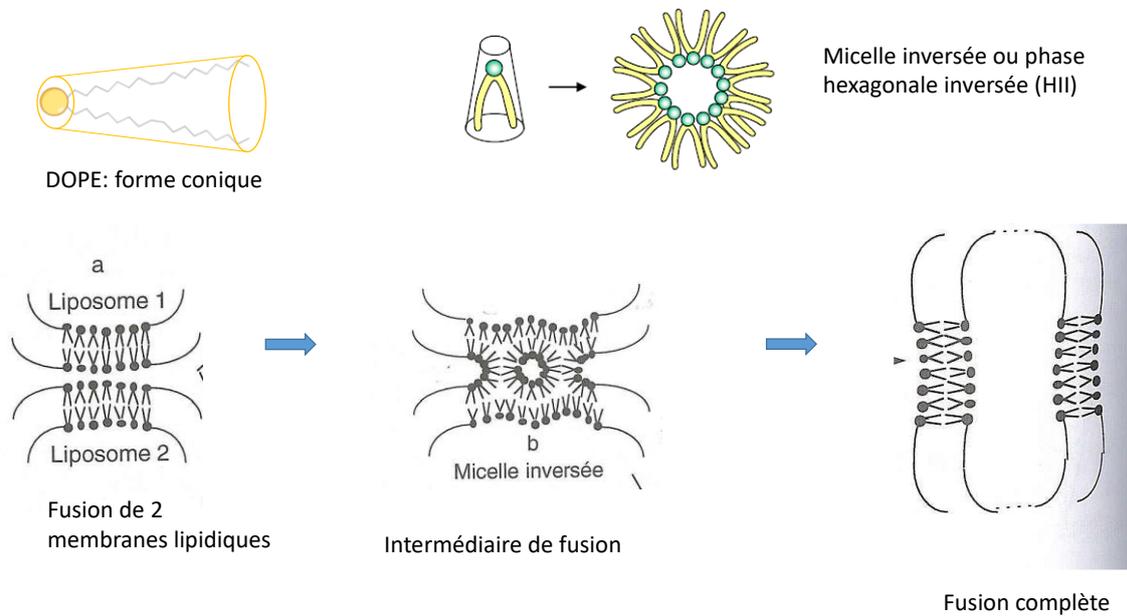


**Figure 45.** Lignées utilisées de cancer de la prostate.

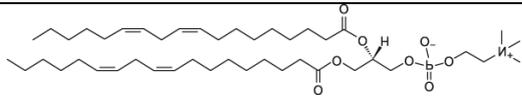
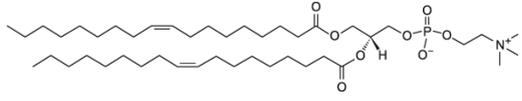
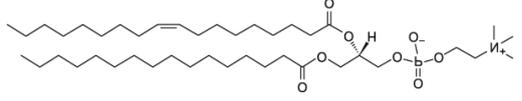
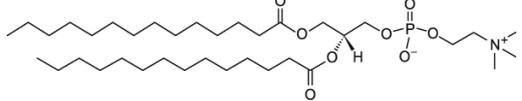
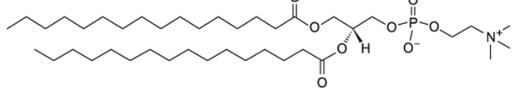
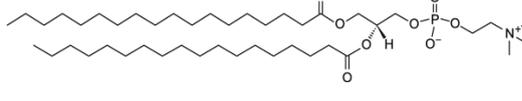
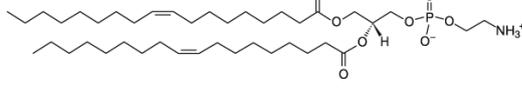
Des travaux portant sur deux des lignées prostatiques utilisées (WPMY-1 et PC-3) avaient été réalisés dans le cadre de la thèse de Jihen ZOUAOUI (Dir Thèse Thierry Granjon, 2015-2018) et avaient montré, par le biais de méthodes rhéologiques, que la membrane des cellules tumorales PC-3 était plus souple et plus déformable que celle des cellules contrôles WPMY-1 (Zouaoui et al. 2017). Ces résultats vont dans le sens d'une plus grande fluidité des membranes des cellules tumorales plus fluide que celles des cellules non-tumorales.

Nous avons préparé une gamme de six compositions liposomales, en faisant varier la taille et la saturation des chaînes acyles des molécules de PC. Nous avons rendu ces liposomes fusogéniques en ajoutant dans la composition un lipide, la dioléoyl-phosphatidyl-éthanolamine

(DOPE). Grâce à sa forme conique, ce phospholipide a la propensité de former des phase hexagonales inversées ( $H_{II}$ ) (Israelachvili, Mitchell, and Ninham 1976) dans les membranes (Figure 46, haut). Ces structures contribuent à la stabilisation d'intermédiaires de fusion entre les membranes, ce qui facilite les processus de fusion (Figure 46, bas). Ce lipide représente 20 % de la composition des liposomes détaillés dans le tableau 2.



**Figure 45:** Rôle structural de la DOPE : formation de phases  $H_{II}$  et rôle dans la fusion membranaire. Haut: ce lipide présente une géométrie conique qui lui permet de s'associer dans des structures de type hexagonale inversée. Bas: ces structures sont décrites comme des intermédiaires de fusion entre deux membranes.

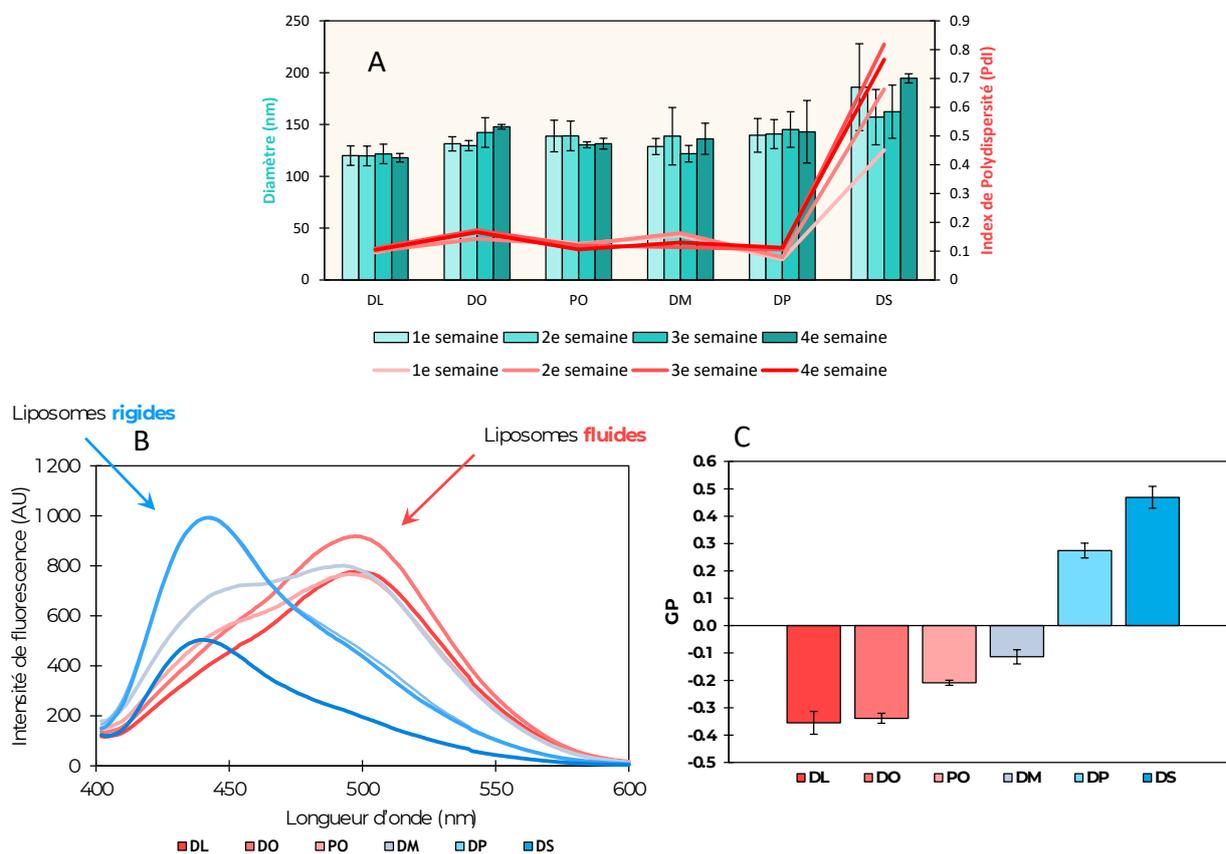
Noms de liposomes		Lipides	Chaînes acyles	Structure	Tm
DL	80 %	1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	18:2 (Cis) PC		-57°C
DO		1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	18:1 ( $\Delta^9$ -Cis) PC		-17°C
PO		1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine	16:0-18:1 PC		-4°C
DM		1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	14:0 PC		24°C
DP		1,2-dipalmitoyl-glycero-3-phosphocholine	16:0 PC		41°C
DS		1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	18:0 PC		55°C
Toutes les préparations	DOPE 20 %	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	18:1 ( $\Delta^9$ -Cis) PE		-16°C

**Tableau 2:** Composition des liposomes utilisés dans les tests de vectorisation. Selon les conditions expérimentales, les liposomes peuvent également contenir un lipide fluorescent, du Dioll ou le principe actif.

Les liposomes préparés ont été caractérisés en termes de taille et de polydispersité par diffusion dynamique de la lumière (DLS) (Figure 47A) et par microscopie électronique à transmission cryogénique (cryo-TEM), en collaboration avec le Dr Giovanna Lollo de l'équipe GePharm du LAGEPP. Nous avons obtenu des préparations de taille homogène, située autour de 125 nm avec un indice de polydispersité (PDI) inférieur à 0,2, à l'exception de la préparation la plus rigide, DS, où une population de vésicules agrégées est présente, en plus de celle présentant une taille de 125 nm. Les liposomes sont stables sur plusieurs mois à 4°C.

La fluidité membranaire a été évaluée à l'aide de la sonde Dioll (Figure 47B et C).

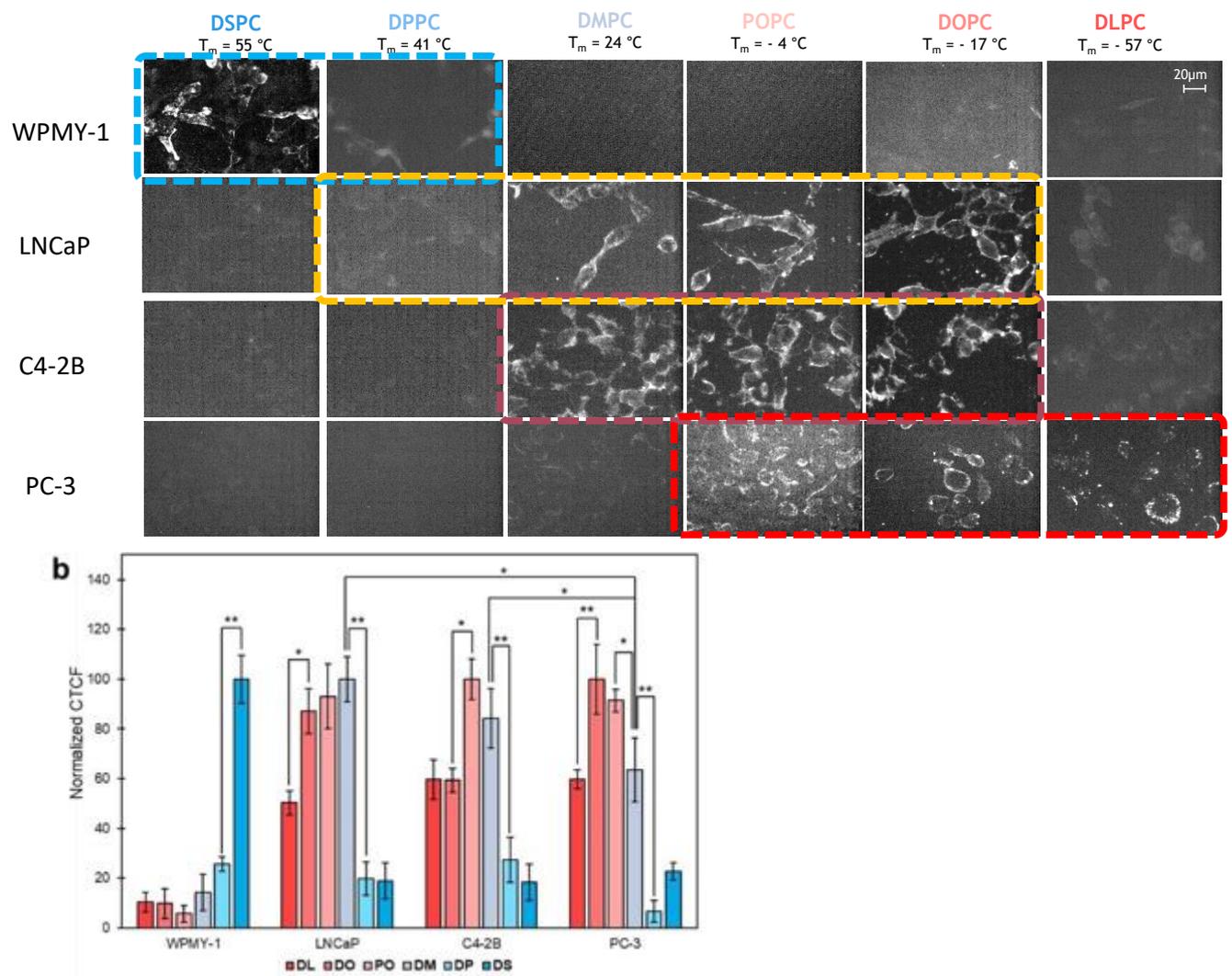
Une gamme de fluidité membranaire assez large a été obtenue, allant de liposomes très rigides de type DS avec une valeur de GP de 0,5 jusqu'aux liposomes de type DL avec un GP de -0,33.



**Figure 47:** Caractérisation des liposomes utilisés comme vecteurs: A. Diamètre moyen et PDI sur 4 semaines. B. Spectres du Dioll inséré dans la membrane à 37°C (ex. 390 nm). C. GP calculé à partir des spectres à 37°C. Les barres d'erreurs représentent l'écart type de 3 mesures sur 3 préparations liposomales différentes.

L'interaction liposome-membrane a été évaluée par microscopie de fluorescence, à l'aide d'un

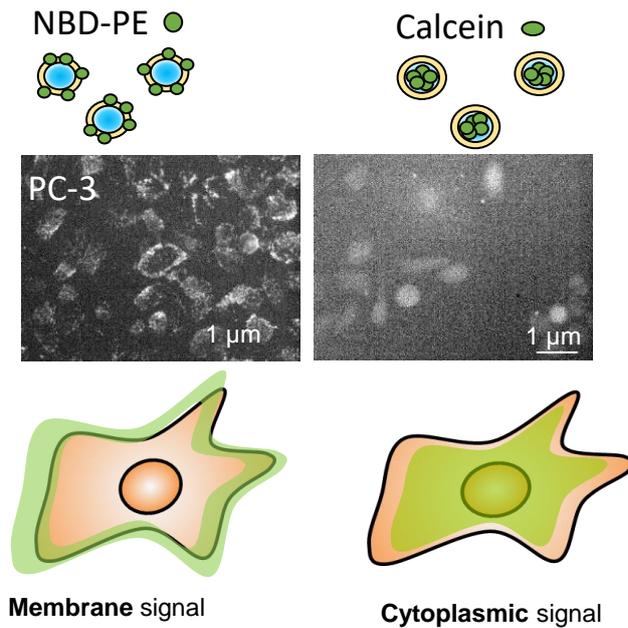
marqueur fluorescent intégré dans la membrane des liposomes, la NBD-PE ou la Rhodamine-PE. Lorsque les liposomes sont internalisés, les cellules deviennent fluorescentes (Figure 48A). Cette fluorescence peut être quantifiée par un traitement d'image (Figure 48B). Nous avons obtenu un résultat très intéressant avec un ciblage spécifique des lignes tumorales par les liposomes PO, DO et, spécifiquement, par DL, dans le cas des PC-3, et par DM, dans le cas des LNCaP et C4-2B. Inversement, les liposomes de type DS rigides à 37°C interagissent uniquement avec la lignée non tumorale WPMY-1.



**Figure 48** : Interaction des liposomes de fluidité croissante avec les cellules de prostate non-tumorales (WPMY-1) et tumorales (LNCaP, C4-2B et PC-3). a. Profil de fluorescence après incubation des cellules avec des liposomes fluorescents marqués à la NBD-PE b. Quantification de l'intensité de fluorescence au niveau des cellules par traitement d'image.

Les résultats indiquent une distribution du fluorophore au niveau de la membrane cellulaire. La présence de NBD-PE au niveau de la membrane plasmique indique soit l'adsorption des

liposomes fluorescents à la surface de la cellule, soit son intégration dans la membrane cellulaire après fusion des liposomes avec cette dernière. Pour discriminer entre ces deux types d'interaction, nous avons encapsulé un fluorophore hydrosoluble, la calcéine, dans les liposomes. Après incubation des liposomes avec les cellules, ce fluorophore est distribué diffuse dans la cellule de manière. Cette observation est en faveur du relargage du fluorophore dans le cytoplasme, donc d'un processus de fusion membranaire, plutôt que d'une adhésion des liposomes à la surface de la membrane plasmique (Figure 49).



**Figure 49:** Distribution des fluorophores dans la cellule. La distribution du fluorophore membranaire sur la membrane cellulaire (gauche) et du fluorophore soluble dans le cytosol (droite) indique un mécanisme de fusion entre la membrane du liposome et celle de la cellule. Expériences réalisées avec des cellules PC-3 et des liposomes PO.

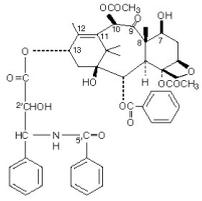
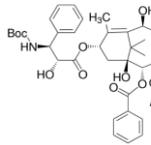
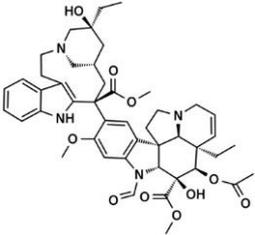
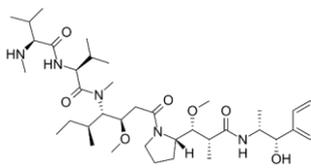
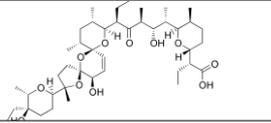
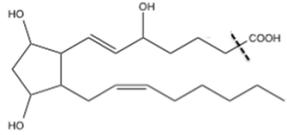
Nous pouvons conclure que la composition lipidique des liposomes a un impact direct sur leur interaction avec la membrane cellulaire. Le paramètre modifié par les variations de composition lipidique est la fluidité membranaire des liposomes, qui est donc responsable de cette différence d'interaction. En effet, seules la longueur et la saturation des chaînes varient dans la gamme de composition lipidique ; la nature de la partie polaire est identique de par tous les liposomes. Cette hypothèse est étayée par trois publications indépendantes, qui montrent toutes une influence de la composition lipidique sur l'interaction membrane-membrane (Abumanhal-Masarweh et al. 2019; Carradori et al. 2018; Takechi-Haraya et al. 2016). Une telle approche constitue une alternative aux stratégies habituelles de vectorisation ciblée, en proposant une solution à moindre coût et facilement modulable, basée sur la composition lipidique plutôt que sur un greffage protéique coûteux. De surcroît, cette approche permet une internalisation par

fusion membranaire plutôt que par endocytose, évitant ainsi la dégradation endosomale des composés actifs. L'ensemble de ces résultats a été publié dans Langmuir et disponible en annexe 10.

<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00262>

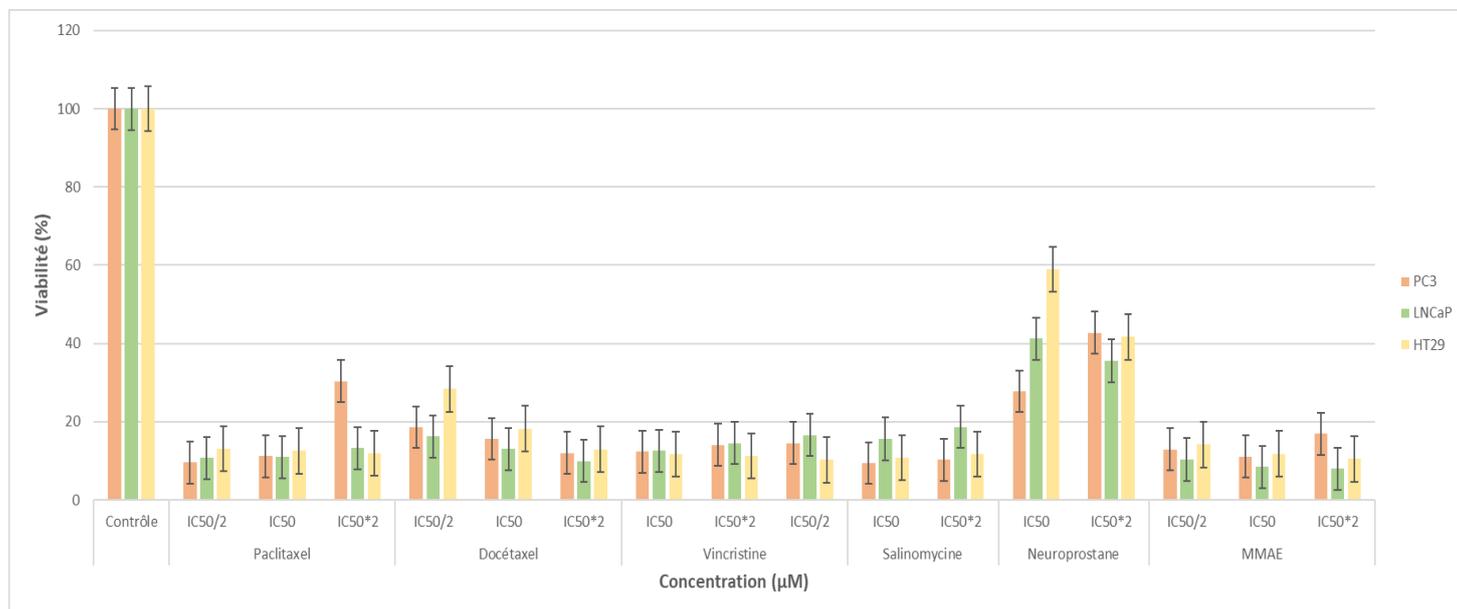
#### **2.4 Encapsulation d'un principe actif dans les liposomes de fluidité membranaire variable**

Ces premiers résultats nous ont encouragés à poursuivre dans cette voie de ciblage basée sur la fluidité membranaire en encapsulant un principe actif dans les liposomes. Ceci a été le but de deux stages M2 recherche (Xiaoyi Wang, janv-juillet 2020 et Ariana Abawi janv-juillet 2021) et d'un stage ingénieur 4<sup>ème</sup> année de l'INSA (Anna Bérot, avril-juillet 2019) que j'ai encadré. Tout d'abord, nous nous sommes intéressés aux différents types de molécules anti-tumorales pouvant être encapsulées dans les liposomes. Lors de son stage de M2 (janv-juin 2020), réalisé pendant la période de confinement, Xiaoyi Wang a effectué une recherche bibliographique pour identifier des molécules anti-tumorales efficaces sur des lignées cancéreuses en culture utilisées au laboratoire. Différents candidats ont alors été envisagés (Tableau 3). Ils incluent à la fois des anti-tumoraux connus tels que le paclitaxel, le docétaxel ou la vincristine, des molécules dont des études plus récentes ont prouvé leur efficacité contre les cancers du sein et de la prostate, telles que la MonoMéthyl Auristatine E (MMAE) ou la salinomycine, et des molécules dont le potentiel est suggéré mais leur utilisation n'est pas encore validée, telles que les neuroprostanes ou les phytoprostanes (série de molécules mise à disposition par le Dr. Thierry Durand).

	Définition	Cancer ciblé	Mode d'action	IC50	Structure	Affinité pour l'eau
<b>Paclitaxel</b>	Actif naturel extrait de l'écorce de <i>Taxus brevifolia</i>	-Carcinome ovarien -cancer du sein, de la tête, du cou et du poumon	-Anti-microtubule : liaison aux 31 dérivés d'acides aminés N-ter de la sous unité bêta-tubuline des microtubules  -Microtubules associés à la molécule sont dysfonctionnels et provoquent donc la mort de la cellule	LNCaP : 0,025 µM PC-3 : 1,573 µM HT-29 : 0,016 µM		Hydrophobe
<b>Docétaxel</b>	Appartient à la classe des taxanes	-Carcinome ovarien -Cancer du sein, du poumon, du cou, et de la prostate	-Même mode d'action que le Paclitaxel	LNCaP : 0,005 µM PC-3 : 0,067µM HT29 : 0,004 µM		Hydrophobe
<b>Vincristine</b>	-Un alcaloïde naturel extrait de la <i>Catharanthus roseus</i> et communément appelée pervenche de Madagascar.  -Initialement étudiée pour ses propriétés anti-diabétiques		-Se lie aux tubulines et inhibe la polymérisation des microtubules du fuseau mitotique entraînant la suppression de la mitose.	LNCaP : 0,046µM PC-3 : 0,521 µM HT29 :0,032 µM		Hydrophile
<b>MMAE</b>	-Dérivé synthétique de la dolastatine 10  -un depsipeptide linéaire composé de 5 acides aminés dérivé avec des chaînes latérales méthyle et méthoxyde substituées	-Les lymphomes -Cancer du sein, de prostate	-Inhibe la polymérisation de la tubuline.  -Induit le mécanisme de mort cellulaire « catastrophe mitotique »	LNCaP et PC-3 : 2nM HT-29 : 5nM		Hydrophobe
<b>Salinomycine</b>	Antibiotique polyéther isolé de <i>Streptomyces album</i> .	-cancer du sein, de l'ovaire	-Inhibiteur des cellules souches cancéreuses (CSC)	LNCaP, PC-3 et HT-29 : 5 µM		Hydrophobe
<b>Neuroprostane</b>	Analogue de l'isoprostane (deux carbones de plus)	-cancer du sein	-Effet anti-prolifératif	Non déterminé (basé sur des études précédentes au laboratoire : 100 et 200 µM)		Hydrophobe

**Tableau 3 :** Récapitulatif des caractéristiques des 6 candidats médicaments identifiés par recherches bibliographiques. Les valeurs d'IC50 proviennent de la base de données « *Genomics of Drug Sensitivity in Cancer* » (GDSC).

Lors du stage d'Ariana Abawi, nous avons évalué l'efficacité de ces 6 molécules sur 3 lignées cancéreuses : LNCaP, PC-3 et HT-29 (lignée cellulaire modèle de cancer du côlon) (**Figure 50**).



**Figure 50 :** Quantification de la viabilité cellulaire sur 3 lignées tumorales, PC-3 en orange, LNCaP en vert et HT29 en jaune, à l'aide d'un test à la résazurine, 3 jours après le traitement des cellules. Un contrôle sans médicament correspondant à 100% de viabilité a été réalisé.

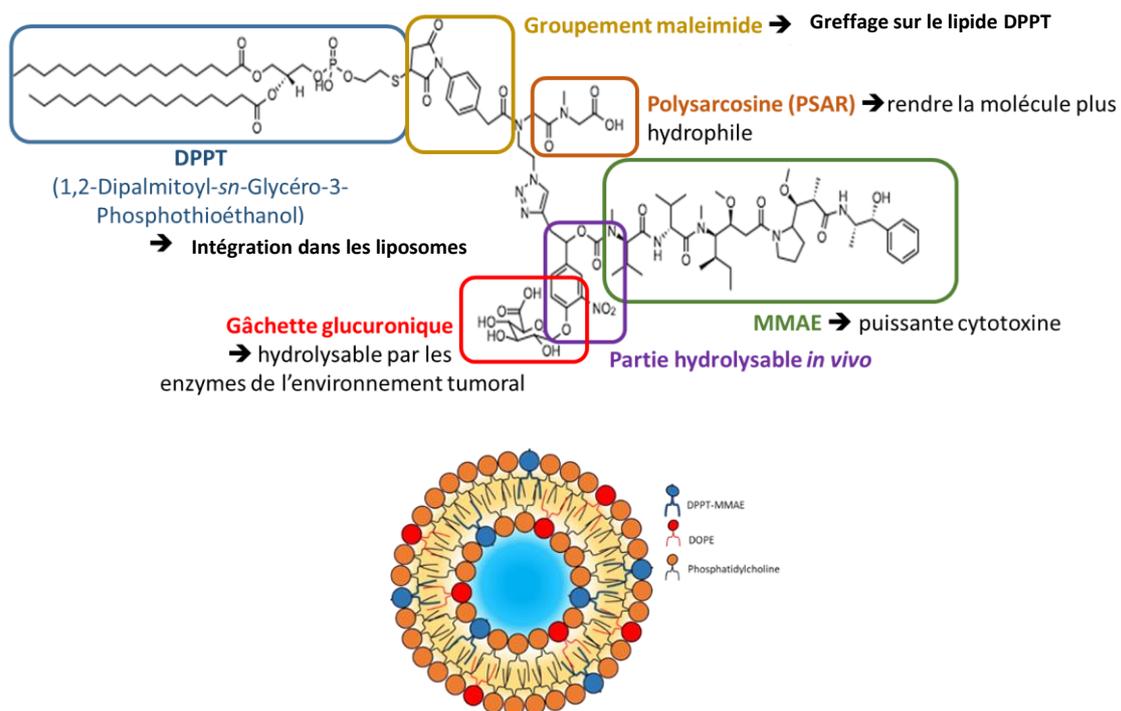
La sensibilité aux médicaments des différentes lignées cellulaires a été mesurée en utilisant un test de viabilité à la résazurine, 72h après traitement avec les molécules. Les tests ont été réalisés à la concentration correspondant à leur IC50 obtenu dans la littérature (disponibles dans la base de données GDSC), mais aussi à une concentration 2 fois supérieure ou 2 fois inférieure à cette valeur. Cette étude révèle une diminution significative des viabilités cellulaires pour les 3 lignées, avec un pourcentage de viabilité toujours inférieur à 30% pour tous les médicaments sauf pour le neuroprostane, pour lequel nous avons enregistré un pourcentage de viabilité d'environ 40%.

Nous avons donc sélectionné 2 molécules : la MMAE, qui est la molécule qui engendre le taux de viabilité le plus bas à la concentration la plus faible (1 nM) et la vincristine, une molécule hydrophile, agissant également à une faible concentration (environ 16 nM).

La MMAE est un des principaux composants cytotoxiques des assemblages nommés « conjugués anticorps-médicaments » ou « *Antibody-Drug Conjugates* » en anglais (ADC). Elle est notamment utilisée, en tant qu'ADC, pour traiter des cancers tels que le lymphome (Francisco et al., 2003) ou le cancer du sein (Yardley et al., 2015). Cependant, l'utilisation des ADC présente des limites liées à l'hydrophobicité, l'inhomogénéité et au faible rapport

médicament/anticorps (DAR « Drug to Antibody Ratio ») des conjugués. Plus le DAR est élevé, plus le nombre de cargaisons de médicaments fortement hydrophobes est grand, ce qui augmente en parallèle l'hydrophobicité globale du conjugué.

Pour résoudre ce problème, l'équipe du Prof. Benoit Joseph à l'ICBMS a associé la polysarcosine (PSAR) à l'ADC. Cette molécule rend l'ensemble plus hydrophile et plus efficace (Viricel *et al.*, 2019). L'équipe SMITH et la start-up "Mablink" nous ont donc fourni une construction incluant le module PSAR, initialement destinée à être greffée sur un anticorps, que nous avons greffé sur la tête thioéthanol d'un lipide incorporé par la suite dans la bicouche du liposome. Cette construction a été réalisée par Anna Bérot et le Dr Waren Viricel (Mablink). La construction globale, présentée en figure 51 et appelée par la suite DPPT-MMAE, inclut la MMAE comme puissante cytotoxine, une gâchette glucuronide (hydrolysable *in vivo* par des enzymes de l'environnement tumoral), un agent de liaison auto-immolatif, une tête de bioconjugaison auto-hydrolysable à base de maléimide et une unité PSAR décrite précédemment (Figure 51).



**Figure 51:** Structure de la DPPT-MMAE réalisée pour cette étude et intégrée dans des liposomes de fluidité variable (79,96% de PC (POPC, DSPC, DMPC ou DPPC), 20% de DOPE et 0,04% de DPPT-MMAE).

La construction DPPT-MMAE a été intégrée dans la composition de 4 types de liposomes DS, DP, DM, PO, de fluidité membranaire variable, avec un rapport molaire lipide/médicament de

2500 :1 (Figure 51).

Nous avons mesuré la taille de ces liposomes, leur charge de surface (le potentiel Zeta) et leur fluidité membranaire. En comparaison avec les préparations sans MMAE, les liposomes-MMAE sont plus gros. Toutes les préparations de liposomes ont un potentiel Zeta négatif compris entre -15 mV et -25 mV, à l'exception de DP-MMAE (-45 mV). Le DPPC a les mêmes chaînes acyles que le dérivé DPPT-MMAE. Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'orientation différente de la tête polaire en présence du dérivé induit un changement de la charge de surface. La distribution de la taille et du PDI des échantillons est stable sur une période de 12 semaines. Seul l'échantillon DS-MMAE est sujet à des phénomènes d'agrégation au cours du temps. Tous ces résultats sont encourageants car ils indiquent que les liposomes MMAE pourraient être utilisés comme vecteurs de médicaments.

Comme notre étude repose sur l'interaction des liposomes avec des lignées cancéreuses selon le paramètre de fluidité membranaire, nous avons mesuré l'effet du dérivé MMAE sur la fluidité des membranes liposomales pour les 4 échantillons préparés, en utilisant le Dioll. A 37°C, nous obtenons une échelle de fluidité variant entre -0,16 et -0,12 pour les membranes des PO-MMAE et DM-MMAE et -0,05 et 0,13 pour DP et DS-MMAE.

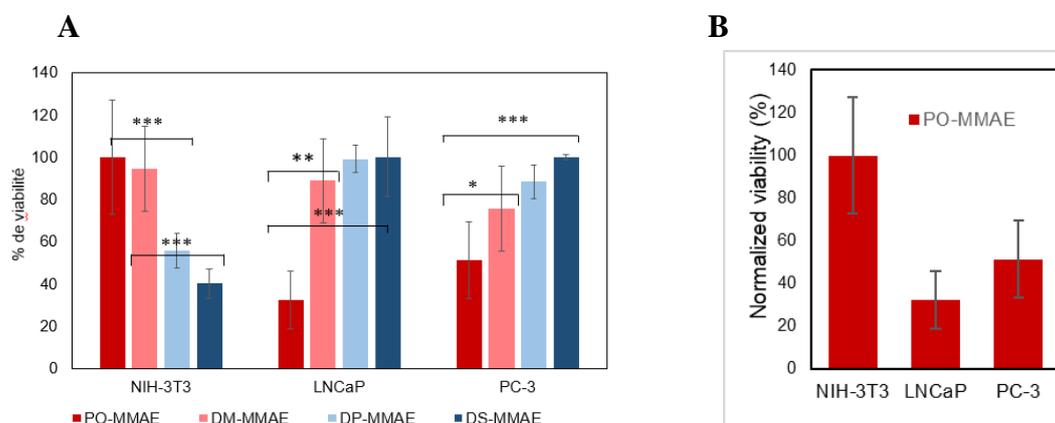
Les valeurs de GP sont inférieures à celles obtenues pour les liposomes dépourvus de MMAE. Cette différence peut s'expliquer par la présence de la tête volumineuse du dérivé DPPT-MMAE, qui gêne l'organisation de la bicouche et augmente ainsi la mobilité du solvant au voisinage du fluorophore. Ceci dit, ce résultat confirme que le dérivé MMAE a été intégré avec succès dans la membrane liposomale.

Nous avons effectué les tests de vectorisation sur des lignées cellulaires de cancer de la prostate, LNCaP et PC-3. En parallèle, une lignée de fibroblastes a été utilisée comme contrôle non tumoral.

Nous avons tout d'abord vérifié l'effet inhibiteur de la DPPT-MMAE libre (concentration finale à 100 nM) dans du DMSO vis-à-vis des 3 lignées NIH-3T3, PC-3 et LNCaP. Les résultats montrent que la viabilité a globalement diminué pour les 3 lignées cellulaires testées, mais une importante variabilité entre les dosages a été observée, ainsi qu'une action sur la lignée contrôle.

En revanche, les liposomes PO-MMAE ont montré une efficacité réduite sur les fibroblastes, mais un fort effet sur les lignées cellulaires tumorales, avec une diminution de plus de 60% de la viabilité cellulaire pour LNCaP et de plus de 50%, pour PC-3. Les liposomes DP et DS-MMAE ont peu ou pas d'effet sur les lignées tumorales, mais affectent la viabilité des

fibroblastes (Figure 52A). Les liposomes DM ont peu d'effet sur la viabilité des trois lignées. Ces résultats corroborent ceux de Julien Bompard : les liposomes aux membranes fluides fusionnent plus facilement avec celles des cellules cancéreuses.



**Figure 52:** Sélectivité des liposomes MMAE vis-à-vis des fibroblastes et des lignées cellulaires tumorales. (A) : les liposomes PO, DM, DP et DS-MMAE ont été incubés avec des lignées cellulaires NIH-3T3, LNCaP et PC-3, et la viabilité a été mesurée en utilisant le test à la résazurine. \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$  et \*  $p < 0.05$ , test Student. (B) : diminution de la viabilité des cellules tumorales PC-3 et LNCaP mais pas de celle des cellules NIH-3T3 en présence de PO-MMAE.

En ciblant les cellules tumorales et en ayant peu d'effet sur les lignées fibroblastiques, les liposomes PO-MMAE sont donc des vecteurs intéressants (Figure 52B). Ces résultats ont été publiés récemment dans un numéro spécial du International Journal of Molecular Science, "Nanostructures Applied to Drug Delivery and Diagnosis", disponible en annexe 11.

<https://doi.org/10.3390/ijms22084103>

Cependant, la construction DPPT-MMAE, même si intéressante d'un point de vue théorique, est relativement compliquée à mettre en œuvre car la synthèse est complexe et la molécule n'est pas disponible commercialement. Nous nous sommes alors intéressés à un autre médicament, la vincristine, commercialement disponible, peu onéreuse et efficace à des concentrations de l'ordre du nM. La vincristine a été initialement étudiée pour ses propriétés antidiabétiques. Le mécanisme de son activité anti-tumorale réside dans l'inhibition de la polymérisation des microtubules du fuseau mitotique entraînant la suppression de la mitose. Cependant, certains points tels que son taux de clairance rapide et sa neurotoxicité dose-dépendante limitent son potentiel d'utilisation. Une des solutions est son encapsulation dans des liposomes conventionnels dont une préparation est déjà utilisée en clinique (Marqibo®).

Nous avons donc encapsulé la vincristine dans le cœur hydrophile des liposomes par une méthode de gradient de pH (Mayer et al. 1990), dans le but de rendre la membrane imperméable et emprisonner la vincristine. Ce projet de vectorisation de la vincristine fait partie de la thèse d'Ariana Abawi, commencée en octobre 2021.

### **2.5 Le mécanisme de ciblage basé sur la fluidité membranaire est-il un mécanisme plus général?**

D'autres lignées cellulaires que celles déjà utilisées *i.e.* du cancer du côlon, du poumon, de la prostate et du sein (disponibles dans l'équipe ou dans l'équipe du Dr. Arnaud Vigneron, CRCL), seront testées, afin de vérifier s'il existe une corrélation entre la fluidité membranaire des liposomes et celle des cellules cibles. Ce paramètre sera systématiquement quantifié à l'aide du Dioll. Cette mesure permettra d'obtenir une valeur chiffrée de la fluidité qui permettra en retour un ajustement fin des propriétés des membranes liposomales à celles des cellules ciblées. Ces mesures seront faites durant la thèse d'Ariana Abawi, en collaboration avec le Dr. Thierry Granjon, équipe LCO2, ICBMS.

### **2.6 Vers des méthodes d'analyse moins invasives: corrélation fluidité liposomes / vésicules extracellulaires de type exosomes**

Les exosomes sont des vésicules extracellulaires (EV) libérées par les cellules dans des situations physiologiques et/ou pathologiques. Ils sont constitués d'une membrane phospholipidique, de protéines et d'acides ribonucléiques. L'étude des exosomes connaît actuellement un vrai essor car les tumeurs secrètent des quantités importantes de vésicules extracellulaires et on leur attribue un rôle dans la formation des métastases. De par leur taille et leur composition, ils s'apparentent aux liposomes, ce qui explique mon intérêt pour ces particules.

Cet axe de recherche fait partie d'un projet plus ample, concernant l'utilisation du Dioll à buts diagnostique et pronostique, financé d'abord par le CNRS dans le cadre d'un programme de pré-maturation, par la SATT Pulsalys (maturation), et actuellement par la région Rhône-Alpes-Auvergne *via* un financement PAR. Le projet dans sa globalité s'articule autour de 3 objectifs successifs : 1) établir une relation entre la perte d'identité cellulaire et l'agressivité des tumeurs, puis 2) entre l'agressivité et la fluidité membranaire, et 3) utiliser les vésicules extracellulaires (EV) comme marqueur de cette agressivité dans un but pronostique. Les EV présentent des

avantages majeurs par rapport à l'analyse de biopsies ou de tumeurs *in situ* puisqu'elles sont facilement accessibles dans les fluides corporels, qu'elles sont exemptes des contraintes mécaniques et environnementales et qu'elles représentent mieux la diversité phénotypique totale d'une tumeur (Théry 2015). Nous avons déjà montré sur des lignées cellulaires (brevet déposé n° 19306175.1) que les EV ont un signal de fluidité qui dépend de l'état physiopathologique de la cellule.

Par conséquent, une corrélation entre la fluidité membranaire des exosomes/EV, issues de la tumeur et plus accessibles que les biopsies, et celle des liposomes ciblant la tumeur représenterait une avancée thérapeutique importante.

De façon générale, les méthodes de purifications des EV ne font pas consensus et il n'existe pas à ce jour de moyens simples pour discriminer les EV issues de la tumeur de celles issues du reste de l'organisme. Mon rôle dans le cadre de ce projet est de participer à la mise en place de méthodes de purification et de caractérisation des EV, impliquant un ciblage des cellules tumorale et le marquage des exosomes tumoraux. Ce projet fait partie du projet de thèse Cifre d'Anna Bérot, en collaboration avec l'entreprise Covalab et l'équipe LCO2, avec comme premier but de valider et de développer un outil capable d'extraire les EV de petite taille, les exosomes, basé sur l'utilisation d'anticorps préparés par la société Covalab et des techniques d'immunoprécipitation séquentielle, afin d'obtenir des échantillons de grande qualité permettant par la suite une meilleure caractérisation de ces EV, et d'analyser leur fluidité membranaire.

En parallèle, nous avons commencé à définir les modalités permettant d'analyser de façon optimale la fluidité des vésicules extracellulaires excrétées par les cellules. De par la petitesse des vésicules analysées, les marquages basés sur l'expression de protéines de surface ne peuvent suffire à l'obtention d'un signal de fluorescence capable de détecter ces vésicules extracellulaires. Nous avons pu montrer qu'à l'inverse, le Dioll s'insérant en grande quantité dans les membranes et possédant un rendement quantique de fluorescence élevé, permet de détecter les vésicules extracellulaires.

### 3. Comment transformer les résultats prometteurs obtenus *in cellulo* en un nanovecteur de nouvelle génération efficace prêt à l'utilisation *in vivo* ?

Malgré leurs avantages et le nombre de formulations actuellement approuvées, les liposomes présentent des contraintes qui limitent leur efficacité. En particulier, les liposomes sont rapidement éliminés du système circulatoire par les macrophages, des cellules du système immunitaire. Leur élimination est due à leur reconnaissance par des opsonines, des protéines qui marquent les éléments extérieurs à l'organisme en s'y adsorbant, favorisant ainsi leur phagocytose par les macrophages (Yan, Scherphof, and Kamps 2005). Pour limiter l'adsorption des opsonines et prolonger la durée de vie des liposomes, la stratégie la plus couramment adoptée est celle de la pégylation, qui consiste en l'enrobage des liposomes par des chaînes de polyéthylène glycol (PEG) (Suk et al. 2016). On parle alors de liposomes furtifs de par leur capacité à échapper à la reconnaissance du système immunitaire; ce sont les liposomes dits de « deuxième génération » (**Figure 53**). La pégylation représente également une plateforme pour la fonctionnalisation, en permettant une bonne exposition des ligands spécifiques au bout des chaînes de PEG, pour faciliter les interactions avec les cellules cibles ou permettre le greffage du principe actif. On parle alors de liposomes de troisième ou quatrième génération (**Figure 53**).

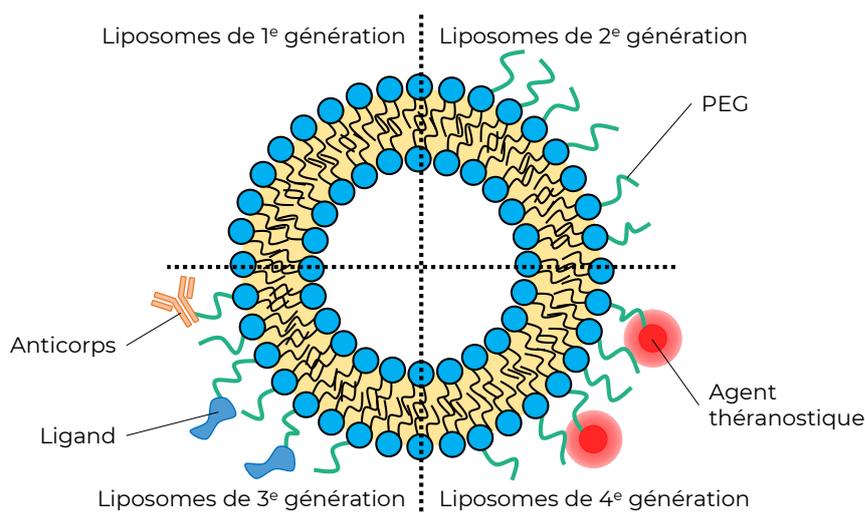


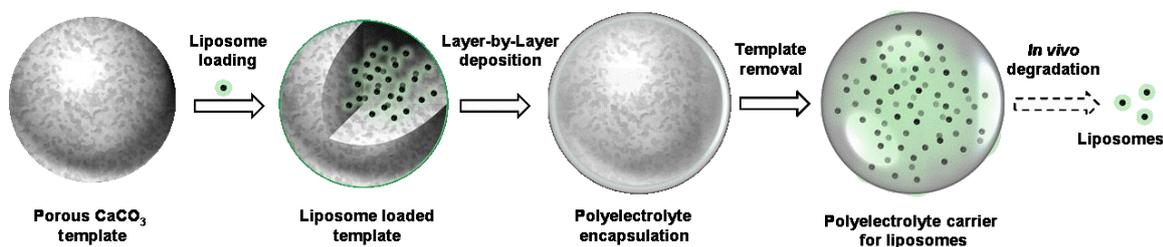
Figure 53: Représentation schématique de liposomes dits de 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> génération.

Cependant, plusieurs études récentes ont mis en exergue les limites des stratégies actuelles de vectorisation basées sur des liposomes (Verhoef and Anchordoquy 2013). En particulier, la pégylation peut, dans certains cas, réduire leur durée de vie dans le système circulatoire,

modifier leur mode d'interaction avec leur cible, voire même déclencher une réponse immunogène spécifique du à la pégylation des liposomes (Thi et al. 2020).

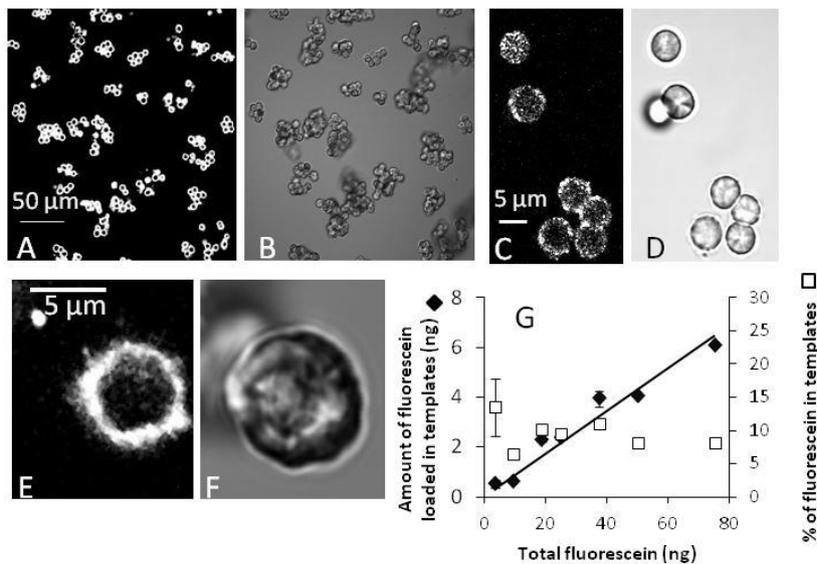
En particulier, l'enrobage des liposomes d'un revêtement hydrophile pourrait limiter les phénomènes de fusion des liposomes avec la membrane de la cellule cible que nous cherchons à mettre en place. Nous avons ainsi cherché des stratégies alternatives à la pégylation. Parmi celles décrites dans la littérature, nous pouvons citer la protection des liposomes eux-mêmes dans des films biodégradables, des échafaudages ou des hydrogels (Mufamadi et al. 2011).

Une stratégie adoptée lors d'une collaboration avec le laboratoire chinois Key Lab of Colloid & Surface Science, CAS Institute of Chemistry de Pekin, et le Prof. Jumbai Li a visé à prendre en charge les liposomes eux-mêmes par des transporteurs, tels que des capsules de polyélectrolytes, afin de pallier à leur manque de stabilité dans le sang et de prolonger l'action thérapeutique du principe actif encapsulé. Nous avons ainsi pu encapsuler au cœur de capsules de polyélectrolytes des liposomes incorporant des fluorophores hydrophiles ou membranaires. Tout d'abord, nous avons préparé des matrices poreuses de  $\text{CaCO}_3$  que nous avons mis en présence de liposomes. Ces matrices ont ensuite été enrobées de plusieurs couches consécutives de polyelectrolytes, alternant charges positives et charges négatives (Figure 54).



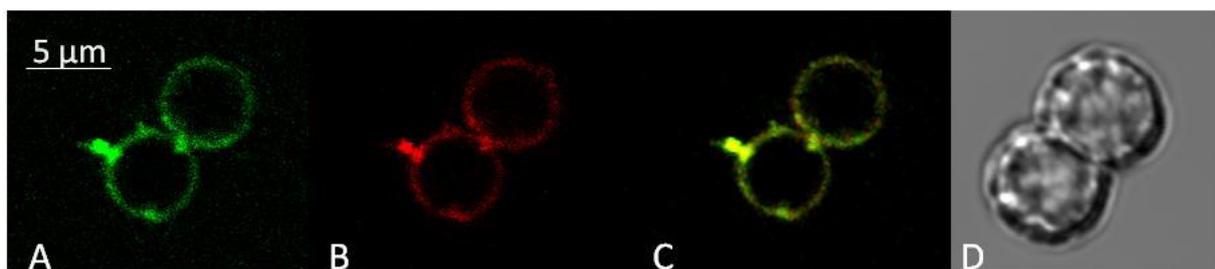
**Figure 54:** Représentation schématique de la formation de capsules polyélectrolyte encapsulant des liposomes.

Les liposomes peuvent pénétrer à l'intérieur des pores de la matrice  $\text{CaCO}_3$  et la quantité de fluorophore retenue dans les matrices a été estimée à l'aide d'une gamme étalon après dissolution de la matrice par traitement à l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA). Nous avons observé l'intégration d'environ 10 % de la quantité de totale de fluorophore dans les matrices et une augmentation de la quantité de fluorophore dans les matrices proportionnelle à la quantité de fluorescéine ajoutée (Figure 55).

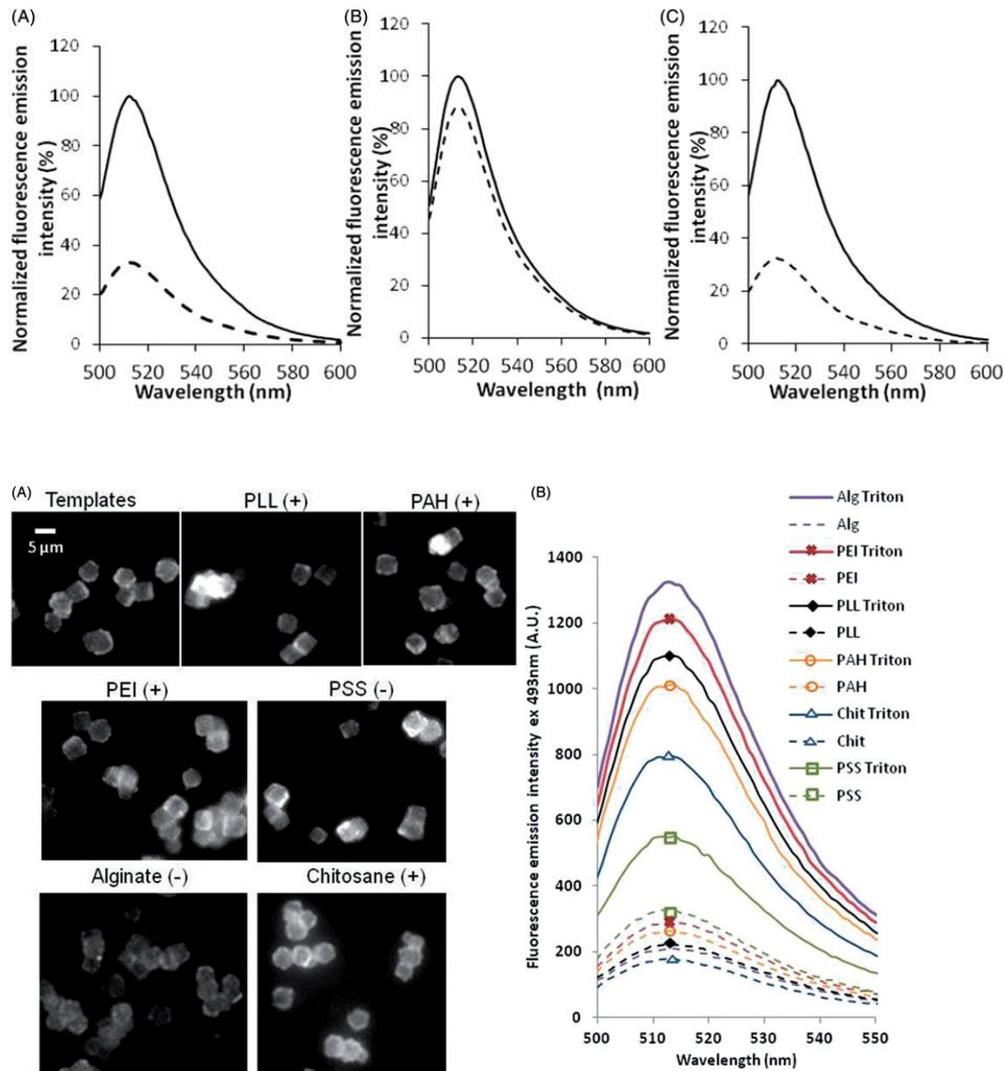


**Figure 55:** Matrices de  $\text{CaCO}_3$  après incubation avec les liposomes contenant de la fluorescéine (A-D) ou de la NBD-PE (E et F). G. Quantification de la fluorescéine chargée dans les matrices sous forme de liposomes. Carrés: % de fluorescéine intégrée dans les matrices, losanges: quantité en ng de fluorescéine intégrée pour 3,8 mg matrice.

Les liposomes intégrés dans les matrices sont intacts, comme le montre la bonne colocalisation de la fluorescéine avec le marqueur membranaire rhodamine-PE (Figure 56) et l'expérience de relargage de la calcéine (Figure 57). Dans ce cas, la calcéine a été encapsulée à une concentration qui induit des phénomènes de quenching de fluorescence à l'intérieur des liposomes. L'ajout de détergent entraîne une libération de la calcéine et une augmentation de l'intensité de fluorescence (Figure 57) lorsque les liposomes sont inclus dans la matrice et lorsque 1 à 2 couches de polyélectrolytes enrobent la matrice. Au-delà de 2 couches, le détergent ne peut plus pénétrer dans la capsule.



**Figure 56.** La fluorescéine (A) et la Rhodamine-PE (B) intégrées dans les liposomes colocalisent (C) au niveau des matrices  $\text{CaCO}_3$ . D. Image en lumière transmise de la même matrice.



**Figure 57:** Les liposomes intégrés dans les matrices recouvertes par une couche de polyélectrolyte sont intacts. Haut: fluorescence de la calcéine avant (pointillés) et après (trait plein) ajout de triton-X100 (2 %) A. Caléine (20 mM) intégrée dans les liposomes, B. Calcéine en solution, C. Calcéine intégrée dans les liposomes, intégrés à leur tour dans les matrices. La matrice a été préalablement dissoute par l'EDTA. Bas: A. Les matrices intégrant les liposomes chargés de calcéine ont été recouvertes d'un film de polyelectrolyte chargé positivement ou négativement. B. Spectres de la calcéine obtenues avant (pointillés) et après (trait plein) ajout de Triton-X100.

Nous avons donc réussi à encapsuler des liposomes contenant un fluorophore dans des matrices de carbonate et, par la suite, dans des microbilles de polyelectrolyte. Ces liposomes sont bien intacts à l'intérieur de ces particules. Ils peuvent donc être libérés après une dégradation des billes de polyélectrolytes. Cependant, la taille et les phénomènes d'agrégation de ces capsules limiteraient leur utilisation. Pendant le stage IUT de Dave Diamond (échange académique avec le Collège Shawinigan Québec, Canada, mars-juillet 2015), nous avons amélioré le protocole de préparation par traitement aux ultrasons afin de réduire l'agrégation et d'obtenir des particules

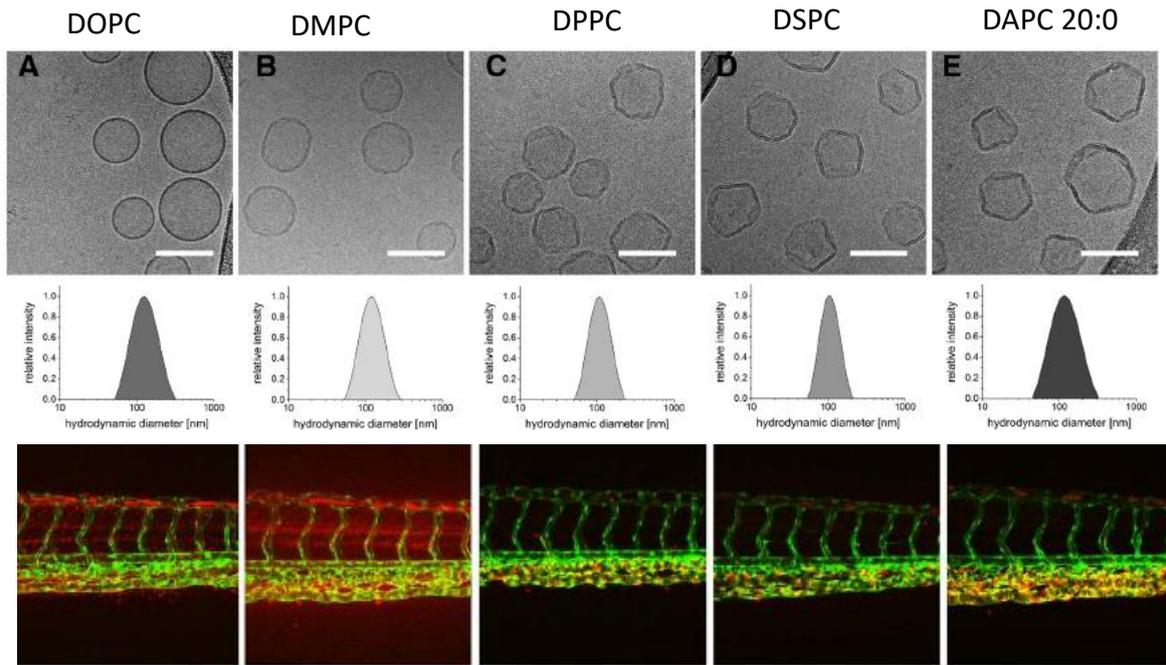
de 1 à 3  $\mu\text{m}$  isolées, dont l'utilisation *in vivo* pourrait être envisagée. Ces résultats ont fait le sujet d'une publication disponible en annexe 12.

<https://doi.org/10.3109/08982104.2014.950275>

Plusieurs études ont montré qu'en fonction de la composition et des caractéristiques des liposomes, certaines préparations liposomales non-pegylées sont stables et présentent des temps de circulation assez longs.

Par exemple, en 2001, les liposomes Myocet (PC et Cholestérol en rapport molaire 55:45), encapsulant de la doxorubicine, ont été mis sur le marché, en association avec du cyclophosphamide, pour le traitement du cancer du sein métastatique de la femme adulte. Cependant, cette préparation a été retirée du marché en 2018 car elle ne présentait pas assez d'avantages par rapport aux hormonothérapies ou aux thérapies ciblées anti-HER<sub>2</sub>, ou à l'administration conventionnelle des anthracyclines (doxorubicine et épirubicine) dont la toxicité cardiaque est moins limitante du fait de l'évolution des protocoles de chimiothérapie. En 2012, les liposomes Marquibo, constitués de SM et de cholestérol (6:4), encapsulant de la vincristine (Acrotech Biopharma, LLC) ont reçu l'approbation de la FDA pour dans le traitement de certaines leucémies et est actuellement disponible pour une utilisation clinique.

La fluidité de la membrane liposomale semble influencer non seulement la capacité d'interaction avec les cellules cibles mais aussi le comportement des liposomes dans la circulation sanguine. Une étude récente montre qu'en fonction de la température de transition de phase gel-LC du lipide composant les liposomes, donc de sa fluidité à la température de travail, les liposomes injectés chez les poissons zèbre ont des profils de distribution différents (Sieber et al. 2017). Les liposomes fluides à 28°C, température physiologique du poisson, constitués de DOPC et DMPC rentrent dans la circulation du poisson (Figure 58, bas, marquage en rouge des liposomes) et les liposomes rigides restent accrochés aux parois. Les liposomes fluides sont plutôt sphériques (Figure 58 Haut) et les liposomes rigides présentent des formes irrégulières. Les auteurs mettent en relation cette forme irrégulière avec la capacité des protéines/opsonines à s'accrocher au niveau de la bicouche lipidique et à promouvoir l'élimination des liposomes.



**Figure 58:** Etude de la distribution vasculaire des liposomes de fluidité décroissante injectés dans la veine centrale du poisson zèbre. Haut: images en cryo-microscopie électronique des liposomes et diamètre hydrodynamique moyen Bas: Distribution des liposomes marqués à la rhodamine dans le poisson. Les cellules du système vasculaire du poisson zèbre exprime une protéine –GFP. (Sieber et al. 2017)

Cette étude est extrêmement intéressante dans la perspective de mon projet de recherche car les liposomes fusogènes de type PO et DO ont des formes sphériques et pourraient, de la même façon, montrer une circulation sanguine prolongée. Un autre moyen de réduire l'adsorption de protéines à leur surface et d'augmenter le temps de circulation plasmatique des liposomes est de modifier la charge des liposomes. Le but est d'obtenir une particule hydrophile, mais peu chargée, qui pourra échapper aux mécanismes d'élimination rapide dans le sang, tout en gardant ses capacités de fusion sélective avec les membranes tumorales.

Pour envisager l'étude de la stabilité des liposomes dans des liquides biologiques et dans l'organisme, une collaboration forte a été mise en place avec le dr Giovanna Lollo de l'équipe Génie Pharmaceutique du Laboratoire d'Automatique, de Génie des Procédés et de Génie Pharmaceutique (LAGEPP – UMR 5007). En vue d'une utilisation *in vivo*, la stabilité des liposomes sera étudiée dans des milieux de culture et des fluides biologiques avant d'envisager d'explorer des modèles d'études plus complexes ou l'injection chez le petit animal.

#### **4. Vers des modèles d'étude plus complexes: analyse de la biodistribution et du ciblage tumoral**

Nos collaborateurs du Centre de Recherches en Cancérologie de Lyon, Dr. Samia Ruby et Dr. Arnaud Vigneron, ont mis au point un modèle de tumeur mammaire *in vivo* par développement spontané sous l'influence du gène *c-myc* inductible à la doxycycline. Sous l'influence de cette molécule, les souris développent, dans un premier temps, des tumeurs, puis lors de l'arrêt du traitement à la doxycycline, les tumeurs régressent. Par des mécanismes de remodelage épigénétique entraînant une perte d'identité cellulaire, des nouvelles tumeurs apparaissent à la suite de cette phase de régression.

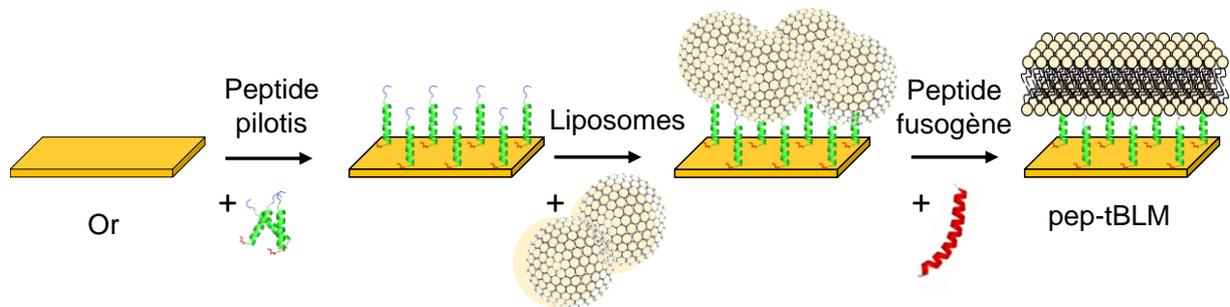
Dans le cadre du projet FluiDiPlast, financé par la Région AURA, l'équipe du Dr. Vigneron procédera à une mesure de la fluidité membranaire des différentes sous-populations des cellules cancéreuses au sein de ces tumeurs et estimera leur capacité à induire de nouvelles tumeurs. En parallèle du projet FluiDiPlast, nous allons vérifier la biodistribution après injection des liposomes marqués (fluorescence ou radioactivité) chez ces souris, estimer leur capacité à atteindre la tumeur et à la marquer. L'efficacité du ciblage sera estimée en fonction des données de fluidité en évaluant la capacité des vecteurs chargés en médicament à diminuer la masse tumorale.

#### **5. Aspects mécanistiques de l'interaction liposomes - membrane**

Afin de caractériser l'interaction liposome-membrane et d'évaluer l'impact des changements de la composition lipidique et des propriétés membranaires sur cette interaction, nous avons cherché à recréer un modèle d'interaction membranaire biomimétique. L'enjeu de ce projet est de dissocier les mécanismes cellulaires "actifs", impliqués dans la fusion des liposomes avec la membrane, des mécanismes "passifs" impliquant les propriétés physicochimiques des deux membranes en contact, ce qui permettrait de comprendre pourquoi un appariement de chaînes pourrait moduler l'interaction liposome/membrane. Nous souhaitons donc recréer une membrane à partir des lipides extraits de membranes plasmiques, ce qui mimera, ne serait-ce que partiellement, la membrane de la cellule cible et analyser la possibilité de la fusion des liposomes avec ce modèle.

Les bicouches biomimétiques utilisées ont été formées selon une technique développée par le Prof. Agnès Girard-Egrot, brevetée et caractérisée au cours des thèses de Samuel REBAUD (Girard-Egrot, Maniti, and Rebaud 2016) et Meriem CHADLI (Chadli et al. 2018, 2017). Cette

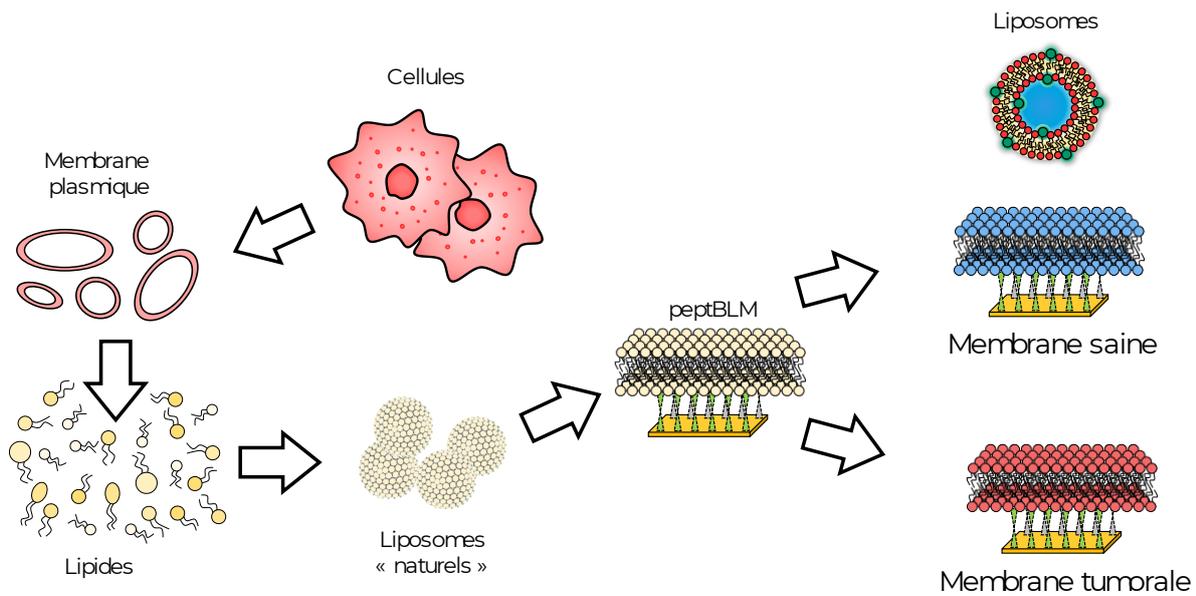
méthode, qui permet la formation de bicouches lipidiques attachées et découplées du support, se distingue par une grande mobilité des lipides au sein de la bicouche grâce à son espacement vis-à-vis de son support et par une grande flexibilité de composition lipidique. Le protocole expérimental de formation des bicouches biomimétiques est schématisé **Figure 59**.



**Figure 59.** Formation de bicouches biomimétiques supportées sur de pilotis de peptide.

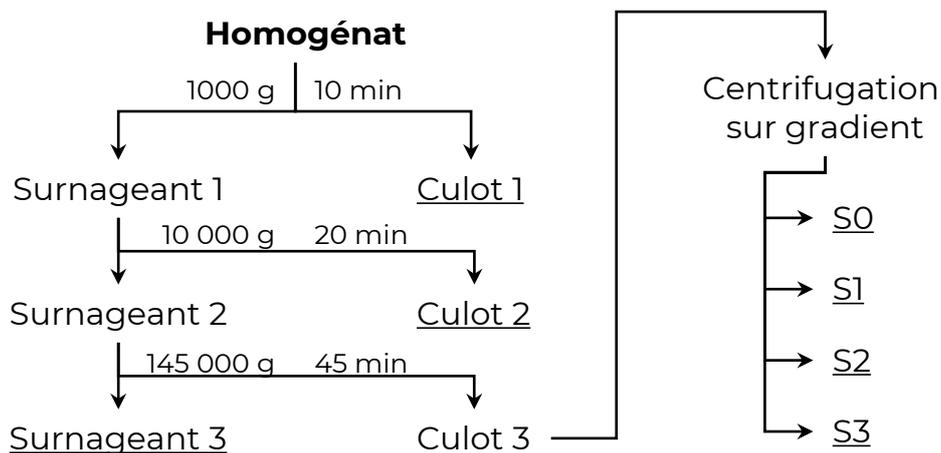
A la surface d'un substrat d'or est ajouté un peptide pilotis dérivé de la laminine (P19-4H), qui s'ancree à la surface. Puis, l'ajout de liposomes enrichis en un lipide à tête chelatrice, le DOGS-NTA(Ni), liant un atome de Nickel, va conduire à l'attachement des liposomes au peptide pilotis. Enfin, l'ajout d'un peptide fusogène conduit à l'ouverture des liposomes et à la formation d'une bicouche lipidique plane reposant au-dessus des pilotis qui assurent son attachement, mais également son découplage au support. La formation de ces bicouches a déjà été caractérisée par imagerie par résonance plasmonique de surface (SPRi), par recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) et par microscopie à force atomique (AFM). L'utilisation de protéoliposomes a permis de montrer que ce modèle est adapté à la réinsertion de protéines membranaires complexes, en réalisant une bicouche biomimétique réincorporant la protéine CXCR4 fonctionnelle, un récepteur couplé aux protéines G qui possède sept passages transmembranaires (Chadli et al. 2017).

Dans le cadre de la thèse de Julien Bompard (2017-2020), nous avons mis au point un protocole de fractionnement cellulaire dans le but d'isoler des fragments de membranes plasmiques. Nous avons extrait ces lipides et nous avons formé des liposomes "naturels" à partir de ces extraits (Figure 60) afin de reconstituer, selon le protocole décrit ci-dessus, des bicouches biomimétiques à partir de membranes naturelles.

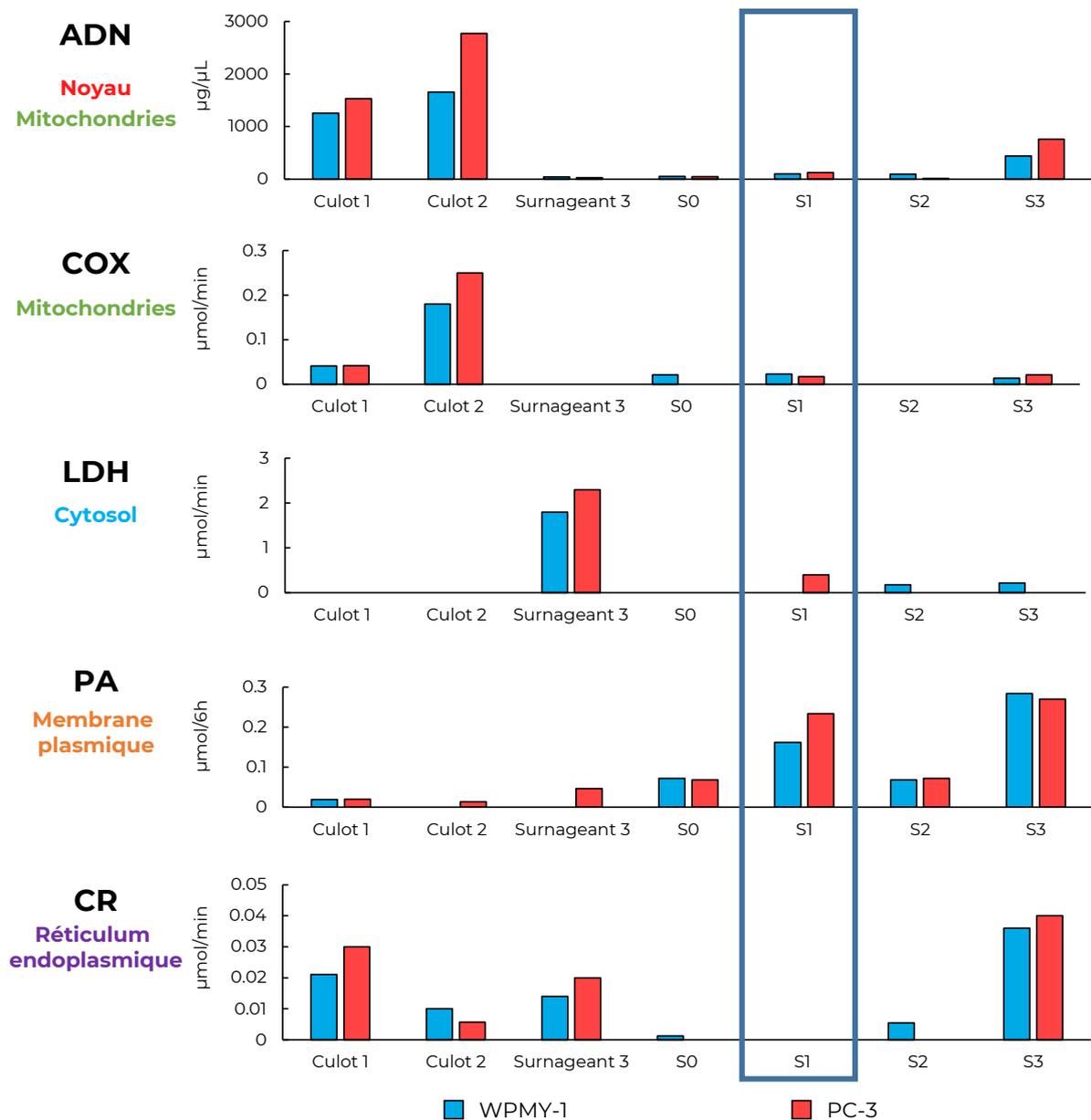


**Figure 60:** Projet de reconstitution de bicouches supportées biomimétiques à partir de membranes naturelles et d'analyse de l'interaction liposomes/membrane.

Après le fractionnement cellulaire des cellules WPMY-1 et PC-3, sur la base d'un protocole adapté de la littérature (van Blitterswijk et al. 1982) et en collaboration avec le Dr. Saïda MEBAREK (ICBMS - UMR CNRS 5246 - Equipe MEM<sup>2</sup>) (Figure 61), nous avons cherché des marqueurs spécifiques pouvant faire l'objet des dosages colorimétriques (Figure 62), de chaque fraction récupérée.



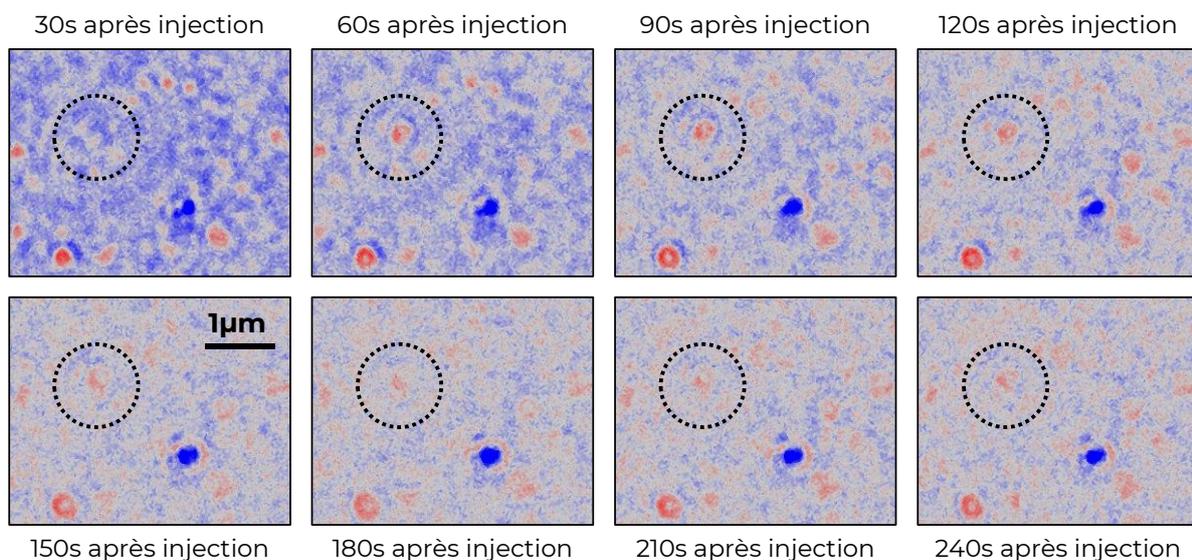
**Figure 61:** Fractionnement cellulaire: Plusieurs fractions sont obtenues suite à la lyse cellulaire et à des centrifugations différentielles. Le culot 3 correspond aux vésicules issues du réticulum endoplasmique et des membranes plasmiques, qui sont ensuite séparés par centrifugation à haute vitesse (100 000 x g) sur gradient de saccharose.



**Figure 62:** Marqueurs présents dans les fractions obtenues après fractionnement de cellules WPMY-1 et PC-3). Pour chaque test sont indiqués le ou les organite(s) concerné(s).

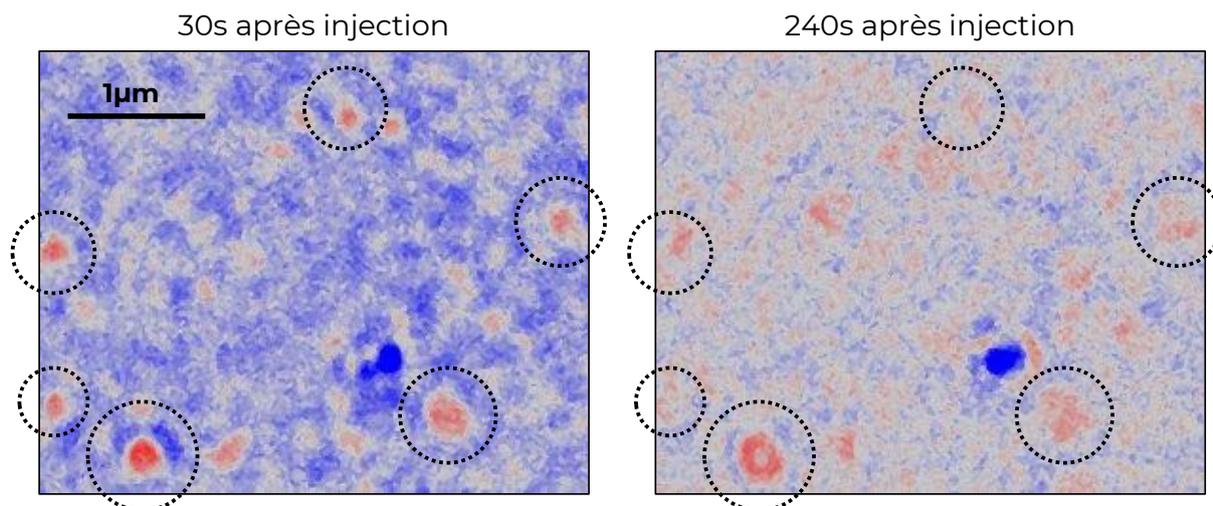
Ces tests ont permis de confirmer la présence d'une activité de la phosphatase alcaline dans les fractions issues des microsomes, ce qui montre la présence de membranes plasmiques. Parmi les fractions microsomales, les fractions S1 et S3 contiennent la plus grande quantité de membrane plasmique, mais les fractions S3 contiennent également de l'ADN ainsi qu'une forte activité de la Cytochrome C NADPH Réductase (CR), qui est le marqueur du réticulum endoplasmique. En comparaison, les fractions S1 ne contiennent pas ces éléments et ont donc été collectées (Figure 62, rectangle). Les phospholipides ont été extraits par le protocole de Bligh et Dyer (Bligh and Dyer 1959) et reconstitués dans des liposomes, afin d'être utilisés pour former les bicouches supportées sur les pilotis peptidiques. La formation des bicouches

supportées a été suivie par SPRi et par BALM, une méthode de microscopie optique en temps réel à ultra-haute résolution, développée par le Dr Dominique AUSSERRÉ (IMMM - UMR CNRS 6283). Elle est basée sur l'utilisation de couches anti-réfléchissantes faites de matériaux absorbants, appelées ARA (pour « *Anti Reflecting and made of Absorbing material* »). L'intérêt de ces couches anti réfléchissantes est de générer des interférences destructrices qui permettent d'obtenir l'extinction du signal de fond et, par conséquent, une meilleure résolution des objets observés. Cette technique a été utilisée pendant la thèse de Julien Bompard pour visualiser la formation des bicouches supportées de POPC et le mélange mimant la membrane plasmique (Bompard et al. 2021). A l'échelle globale, par SPRi et par BALM, nous n'avons pas pu obtenir des données montrant la fusion des liposomes et la formation de la bicouche supportée, mais à l'échelle locale, des phénomènes de fusion des liposomes ont pu être observée (Figure 63). Après fixation (cercle pointillé), le liposome semble progressivement s'estomper, sa couleur passant du rouge intense à des tons pâles plus proches du rose. En parallèle, les zones bleues autour du liposome passent elles aussi progressivement à des tons plus proches du rose.

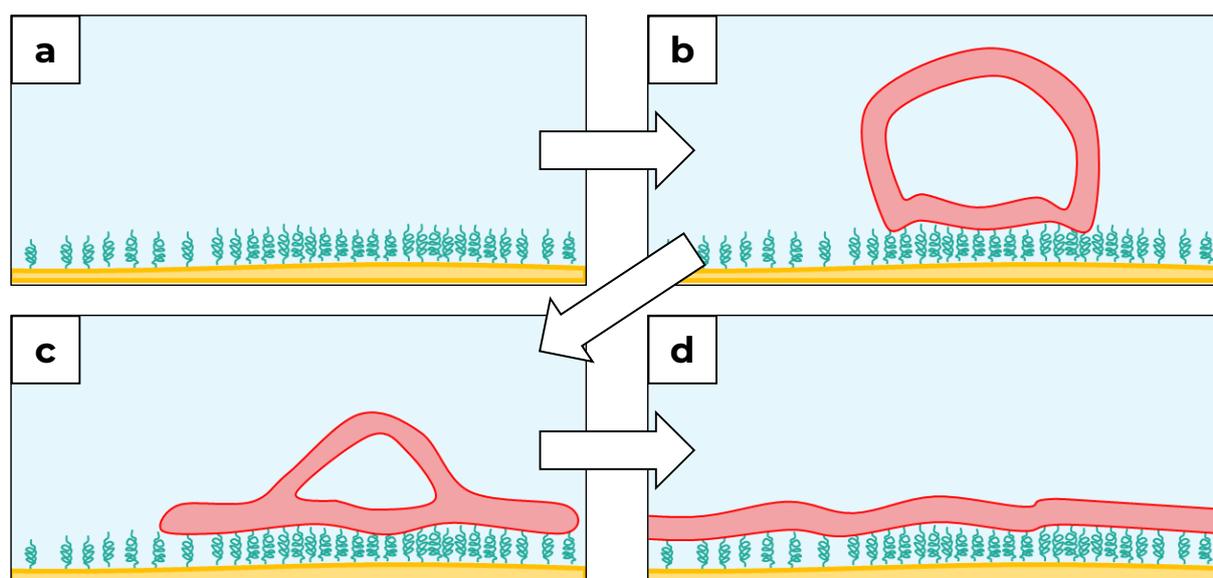


**Figure 63:** Cinétique imagée par la BALM de la phase de fixation de liposomes obtenus à partir des lipides naturels sur des peptides pilotis. Les images ont été colorées par la table de conversion ou LUT (pour « *LookUp Table* ») « phase », qui colorie les intensités basses en bleu, les intensités moyennes en blanc et les intensités élevées en rouge.

Ce phénomène s'explique par l'étalement du liposome et est particulièrement fréquent, comme le montre la Figure 64, où de nombreuses tâches rouges s'élargissent et s'éclaircissent en quelques minutes (cercles pointillés noirs). Ces phénomènes sont schématisés en figure 65.



**Figure 64:** Cinétique imagée par la BALM de la phase de fixation de liposomes constitués de lipides naturels sur des peptides pilotis. Les images ont été colorées par la LUT « phase », qui colorie les intensités basses en bleu, les intensités moyennes en blanc et les intensités élevées en rouge.



**Figure 65:** Représentation schématique du mécanisme de dépôt de matière lors de la phase d'accrochage des liposomes sur des peptides pilotis.

- a. Surface initiale recouverte de peptide pilotis.
- b. Adsorption du liposome.
- c. Aplatissement progressif du liposome.
- d. Formation d'une bicouche.

Ces résultats, bien que préliminaires, montrent que nous pouvons obtenir des extraits lipidiques enrichis en lipides issus de la membrane plasmique et préparer des liposomes, puis des bicouches supportées, à partir de ces extraits. La composition de ces extraits sera analysée par la suite. La formation de bicouches supportées sera suivie et caractérisée par les techniques déjà mises en place pour les bicouches "synthétiques" : SPRi, microscopie de fluorescence

(dynamique par FRAP) et BALM dans le but d'optimiser leur formation.

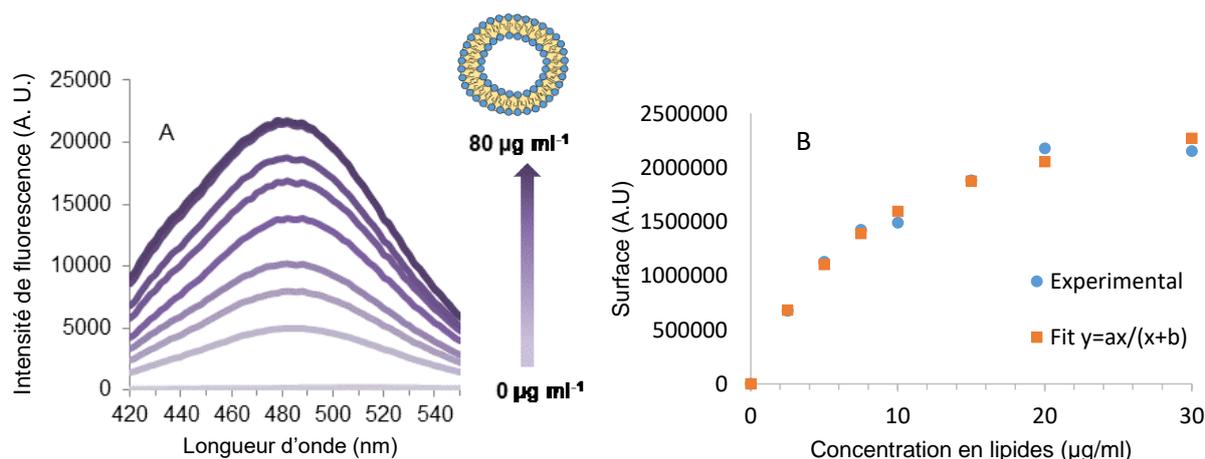
A terme, ce projet a pour objectif de former quatre systèmes membranaires biomimétiques distincts de par leur composition lipidique, reproduisant ainsi la membrane des quatre lignées prostatiques utilisées, pour étudier l'interaction de ces modèles naturels avec des vecteurs lipidiques. De manière plus générale, la mise en place de ces systèmes modèles sera une avancée technologique pour l'analyse des diverses interactions molécules – membranes "de plus en plus biomimétiques" et la reconstitution de protéines transmembranaires d'intérêt thérapeutique.

## **6. Mise au point d'une méthode de dosage de membranes à l'aide du fluorophore Dioll**

Une étape commune à tous les projets décrits précédemment est la préparation de liposomes. Nous préparons les liposomes selon des protocoles classiques impliquant de cycles de congélation/décongélation suivie d'extrusion. A la fin du protocole, il convient de déterminer la quantité de lipides présente dans les échantillons. La plupart des protocoles de dosage de lipides sont relativement longs et fastidieux. Ils impliquent des étapes d'extraction des lipides dans des solvants organiques, voir des étapes de minéralisation, et par conséquent la verrerie et l'appareillage adapté. Nous avons envisagé une méthode alternative.

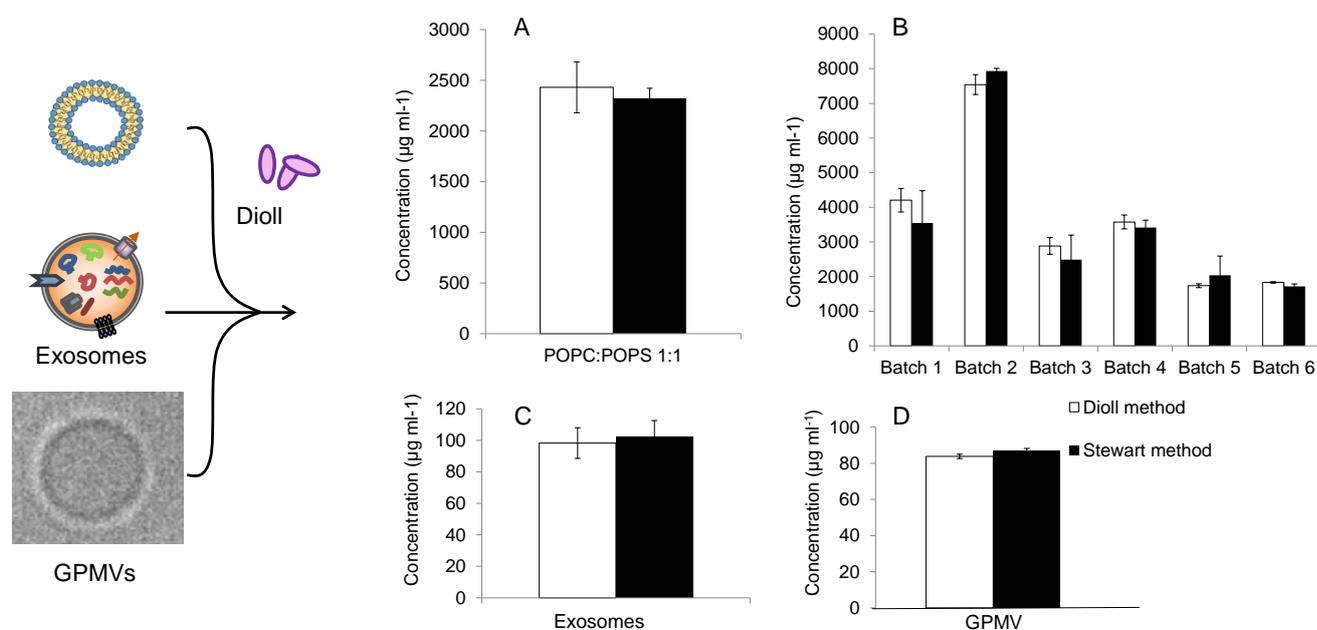
Le Dioll est une molécule fluorescente qui s'intègre facilement dans les membranes et ne présente pas de fluorescence dans un milieu aqueux. L'intensité de l'émission de fluorescence du Dioll dans une solution de liposomes dépend donc de la quantité de "membranes" lipidiques à disposition. A partir de ce constat, nous avons détourné l'utilisation de cette molécule pour mettre au point une nouvelle technique de dosage.

Pendant son stage de M2 recherche (janvier-juillet 2018), Samira Samba-Mossiamasson, a enregistré les spectres du Dioll en présence de quantités croissantes de liposomes. On observe que l'intensité d'émission de fluorescence augmente avec la quantité de liposomes jusqu'à atteindre un plateau (Figure 66A). L'évolution de l'intensité en fonction de la concentration en lipides suit une fonction hyperbolique et peut constituer une gamme étalon. Cependant, l'intensité de fluorescence à une longueur d'onde d'émission fixe dépend de l'état physique de la membrane de l'échantillon à doser car le spectre du Dioll présente deux bandes distinctes selon l'état de fluidité de la membrane. En considérant l'aire totale sous la courbe, seule la quantité totale de lipides entre en jeu, l'état de fluidité de la bicouche lipidique n'étant plus un problème. Nous avons donc préféré d'utiliser le paramètre *aire sous la courbe* d'émission de fluorescence pour la réalisation de la gamme étalon (Figure 66B).



**Figure 66:** Evolution de la fluorescence du Dioll inséré dans les membranes de liposomes POPC. A. spectres de fluorescence à 21°C (ex 390 nm) B. Evolution de l'aire sous le pic en fonction de la concentration en lipide présent en solution pour une concentration en Dioll de 2 µM.

Nous avons ainsi pu doser les phospholipides dans les vésicules artificielles comme les liposomes et les protéoliposomes (figure 67 A et B), mais aussi des vésicules naturelles telles que les vésicules extracellulaires de type exosomes et les GPMV (Figure 67 C et D). Nous avons pu obtenir une bonne corrélation avec la méthode de Stewart, classiquement utilisée pour doser les phospholipides.



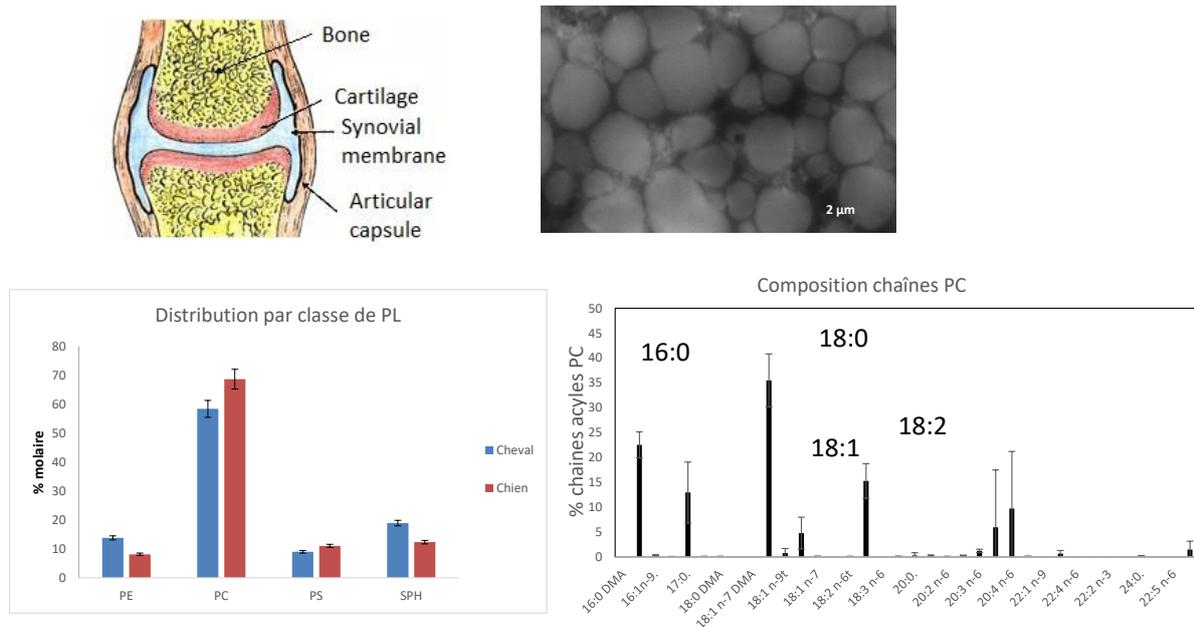
**Figure 67:** Dosage de vésicules à l'aide du Dioll: A. Liposomes POPC:POPS 1:1; B. Six lots de production de protéoliposomes incluant le récepteur transmembranaire CXCR4; C. Exosomes; D. GPMV.

En termes de détection, nous pouvons quantifier des concentrations inférieures à 1 µg/ml, ce qui constitue une très bonne limite de quantification. Le dosage ne nécessite pas d'extraction des lipides par des solvants, comme les méthodes classiques de dosage de lipides, Stewart (Stewart 1980), Bartlett (Bartlett 1959) et Rouser (Rouser, Siakotos, and Fleischer 1966) et est relativement rapide avec un temps d'exécution inférieur à 30 min.

Ce dosage fait l'objet d'une soumission pour publication (Annexe 13) et fait partie intégrante des applications du Dioll brevetées (Cheniour et al. 2019). Cette méthode a été améliorée pendant le projet maturation sur les applications technologiques du Dioll, financé par la SATT Pulsalys. Le traitement des données a été automatisé et nous espérons pouvoir proposer aux utilisateurs un kit de dosage de membranes "clé en main".

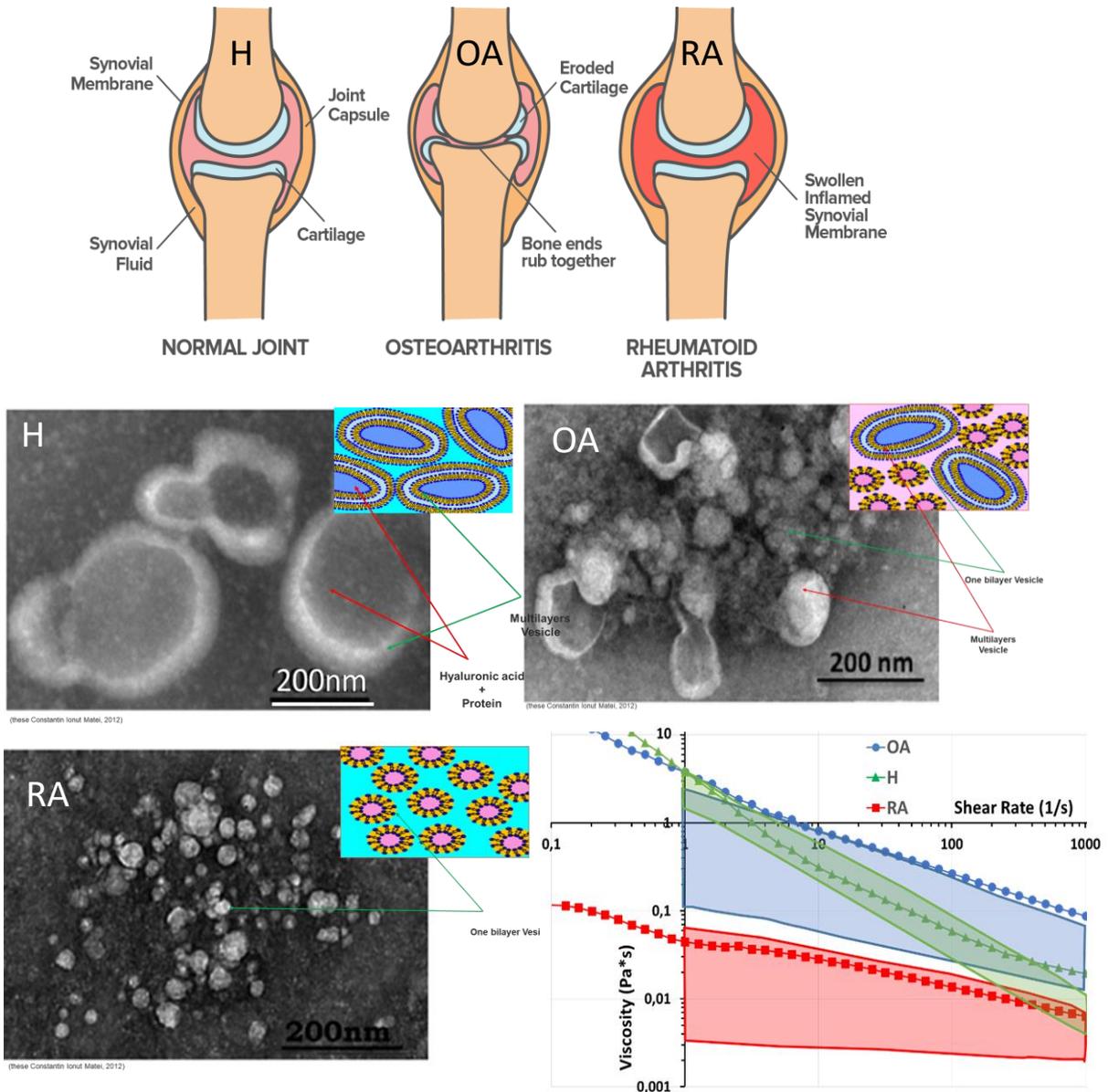
## **7. Rôles de structures lipidiques dans les articulations synoviales**

Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Ana-Maria Trunfio-Sfarghiu, de l'équipe MecaLip, LaMCoS, je m'intéresse en parallèle à un autre type de vésicules extracellulaires, les vésicules synoviales. Ces vésicules sont synthétisées par les synoviocytes au niveau des articulations et leur présence semble essentielle pour le bon fonctionnement des articulations. Dans une articulation saine, les vésicules ont une taille micrométrique et sont constituées de plusieurs bicouches lipidiques qui entourent des protéines et des "pelotes" d'acide hyaluronique (Figure 68). Les vésicules sont principalement constituées de phosphatidylcholines avec une composition particulière en chaînes acyles (Figure 68).



**Figure 68:** Vésicules lipidiques dans le liquide synovial. A. Schéma d'une articulation: le liquide synovial remplit la capsule synoviale. B. Vésicules lipidiques présentes dans le liquide synovial de chien en microscopie électronique à transmission. C. Distribution par classe de phospholipides extraits de liquide synovial de chien et de cheval. D. Distribution des chaînes de PC issue de liquide synovial de chien.

Les pathologies ostéoarticulaires, comme l'arthrose et l'arthrite rhumatoïde, induisent une augmentation de la quantité de phospholipides et de protéines, notamment de gamma globulines, et une diminution de la quantité d'acide hyaluronique. Les travaux du Dr. Trunfio-Sfarghiu montrent une déstructuration de ces assemblages vésiculaires ainsi qu'une chute des capacités lubrifiantes du liquide synovial (Figure 69).



**Figure 69:** Liquide synovial sain et pathologique - Schéma d'une articulation du genou sain (H), lors d'une pathologie de type ostéoarthrose (OA) ou de type arthrite rhumatoïde (RA), et images obtenues en MET des vésicules lipidiques présentes dans des échantillons issus de prélèvements correspondant de patients. Viscosité mesurée sur un rhéomètre classique en configuration con/plan à 37°C : en bleu liquides arthrosiques, en rouge liquides arthritiques, en vert liquides sains. Les courbes corroborent les valeurs de la littérature : le pavé rouge correspond aux mesures de la bibliographie pour les liquides arthritiques, le pavé bleu pour les liquides arthrosiques, pavé vert pour les liquides sains.

Nous cherchons donc à comprendre le rôle de ces assemblages moléculaires sur les performances des articulations. Dans le cadre de la thèse de Layth Ben Trad, que je co-encadre, nous avons pu montrer que non seulement la quantité de phospholipides dans le liquide synovial était altérée dans le cas de pathologies ostéoarticulaires, mais aussi la qualité avec une diminution du rapport phospholipides/lipides totaux. Certaines modifications dans la

composition en classes de phospholipides et en chaînes acyles ont été observées. Nous avons également pu montrer que les composants protéiques et glucidiques du liquide synovial modifient la rhéologie des membranes.

Jusqu'à présent, le traitement classique administré dans le cas de pathologies articulaire est l'administration d'acide hyaluronique par injection au niveau de l'articulation. Ce traitement peut être amélioré en prenant en compte la contribution de composants lipidiques et protéiques. Nous allons donc analyser par diverses techniques les propriétés de vésicules synoviales dans le but de proposer des vésicules de substitution mimant les propriétés mécaniques et lubrifiantes des vésicules saines. Il s'agit ici d'une approche similaire à celle abordée pour la préparation de vecteurs lipidiques adaptés aux cellules cibles tumorales. Sur la base d'un premier jeu de données lipidomiques et des mesures rhéologiques, nous allons adapter la composition des vésicules pour mimer au plus près les caractéristiques des vésicules synoviales.

## Conclusion

En résumé, mes projets à court terme ont pour axe central la conception de vecteurs sur mesure pour la délivrance de composés actifs et le ciblage spécifique des cellules tumorales. A l'intérieur de cet axe, plusieurs directions se dessinent. En premier lieu, l'originalité du projet réside dans la corrélation entre les propriétés physicochimiques des membranes du vecteur et celle de la cellule cible. La sélectivité de ciblage n'est pas due à un ciblage actif, comme avec les anticorps, mais à une spécificité de composition, mesurée par le paramètre fluidité membranaire. La fluidité des membranes, telle que mesurée à l'aide de l'outil Dioll, est très facilement quantifiable. Les projets parallèles, comme les mesures de la fluidité des exosomes dans le cadre du projet FluiDiPlast, menées en collaboration avec le Dr. Arnaud Vigneron du CRCL viendront nourrir, avec des informations importantes, cette partie du projet.

En vue d'une application thérapeutique, il est également important que l'étude des interactions vecteur/membrane cible ne se limitent pas au niveau des cellules en culture. Pour cela, à court terme, la stabilité des vecteurs sera analysée dans des divers milieux biologiques et des études de biodistribution seront menées, avec la collaboration du Dr. Giovanna Lollo du LAGEPP.

Toujours dans le cadre du projet PAR FluiDiPlast, des modèles tumoraux murins seront obtenus. Après validation de la sélectivité sur cellules *in vitro*, nous pourrions envisager, en collaboration avec le Dr. Samia Ruby du CRCL, une validation du ciblage tumoral chez la souris.

Les premiers tests d'encapsulation ont été encourageants. Nous avons pu montrer une action sélective du dérivé lipidique MMAE intégré dans les liposomes vers les lignées tumorales. Une autre série de tests est en cours de réalisation avec la vincristine encapsulée dans les liposomes. Nous sommes toujours à la recherche de composés dont l'efficacité ou la sélectivité pourraient être augmentée par l'encapsulation dans les liposomes.

Finalement, un faisceau d'indices montrent que l'internalisation du composé actif est principalement due à des mécanismes de fusion membranaire. Sont-ils uniquement dus, comme la compatibilité entre les deux membranes l'indique, à des interactions entre les lipides? Quel est le rôle des protéines de fusion dans la membrane? Nous souhaitons analyser ces interactions en utilisant un modèle membranaire biomimétique mis au point dans le laboratoire, constitué de bicouches supportées sur des pilotis peptidiques obtenues à partir des phospholipides extraits de membranes plasmiques des lignées tumorales ou contrôles.

L'approche biomimétique mise en place dans le cadre de ce projet sera également mise à profil dans le cadre du projet mené en collaboration avec le Dr. Ana-Maria Trunfio Sfarighiu du

LaMCoS sur la caractérisation des vésicules synoviales et l'élaboration de vésicules biomimétiques mimant au plus près celles issues des cellules synoviales non pathologiques.

## Références

- Abawi, Ariana, Xiaoyi Wang, Julien Bompard, Anna Bérot, Valentina Andretto, Leslie Gudimard, Chloé Devillard, et al. 2021. “Monomethyl Auristatin E Grafted-Liposomes to Target Prostate Tumor Cell Lines.” *International Journal of Molecular Sciences* 22 (8). <https://doi.org/10.3390/ijms22084103>.
- Abumanhal-Masarweh, Hanan, Dana da Silva, Maria Poley, Assaf Zinger, Evgenya Goldman, Nitzan Krinsky, Ron Kleiner, et al. 2019. “Tailoring the Lipid Composition of Nanoparticles Modulates Their Cellular Uptake and Affects the Viability of Triple Negative Breast Cancer Cells.” *J Control Release* 307: 331–41. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.06.025>.
- Alves, Isabel D., Chen Yu Jiao, Soline Aubry, Baptiste Aussedat, Fabienne Burlina, Gérard Chassaing, and Sandrine Sagan. 2010. “Cell Biology Meets Biophysics to Unveil the Different Mechanisms of Penetratin Internalization in Cells.” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.02.009>.
- Amaro, Mariana, Francesco Reina, Martin Hof, Christian Eggeling, and Erdinc Sezgin. 2017. “Laurdan and Di-4-ANEPPDHQ Probe Different Properties of the Membrane.” *Journal of Physics D: Applied Physics* 50 (13). <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aa5dbc>.
- Ardail, Dominique, Iuliana Popa, Jacques Bodennec, Pierre Louisot, Daniel Schmitt, and Jacques Portoukalian. 2003. “The Mitochondria-Associated Endoplasmic-Reticulum Subcompartment (MAM Fraction) of Rat Liver Contains Highly Active Sphingolipid-Specific Glycosyltransferases.” *The Biochemical Journal* 371 (Pt 3): 1013–19. <https://doi.org/10.1042/BJ20021834>.
- Bagatolli, Luis A. 2006. “To See or Not to See: Lateral Organization of Biological Membranes and Fluorescence Microscopy.” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.05.019>.
- Barrero-Villar, Marta, José Román Cabrero, Mónica Gordón-Alonso, Jonathan Barroso-González, Susana Álvarez-Losada, M. Ángeles Muñoz-Fernández, Francisco Sánchez-Madrid, and Agustín Valenzuela-Fernández. 2009. “Moesin Is Required for HIV-1-Induced CD4-CXCR4 Interaction, F-Actin Redistribution, Membrane Fusion and Viral Infection in Lymphocytes.” *Journal of Cell Science* 122 (1): 103–13. <https://doi.org/10.1242/jcs.035873>.
- Barret, Cécile, Christian Roy, Philippe Montcourrier, Paul Mangeat, and Verena Niggli. 2000.

- “Mutagenesis of the Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) Binding Site in the NH<sub>2</sub>-Terminal Domain of Ezrin Correlates with Its Altered Cellular Distribution.” *Journal of Cell Biology* 151 (5): 1067–79. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.5.1067>.
- Barth, P. G., H. R. Scholte, J. A. Berden, J. M. Van Der Klei-Van Moorsel, I. E.M. Luyt-Houwen, E. Th Van’T Veer-Korthof, J. J. Van Der Harten, and M. A. Sobotka-Plojhar. 1983. “An X-Linked Mitochondrial Disease Affecting Cardiac Muscle, Skeletal Muscle and Neutrophil Leucocytes.” *Journal of the Neurological Sciences* 62 (1–3): 327–55. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(83\)90209-5](https://doi.org/10.1016/0022-510X(83)90209-5).
- Bartlett, G. R. 1959. “Phosphorus Assay in Column Chromatography.” *The Journal of Biological Chemistry* 234 (3): 466–68. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)70226-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)70226-3).
- Baumgart, Tobias, Adam T. Hammond, Prabuddha Sengupta, Samuel T. Hess, David A. Holowka, Barbara A. Baird, and Watt W. Webb. 2007. “Large-Scale Fluid/Fluid Phase Separation of Proteins and Lipids in Giant Plasma Membrane Vesicles.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (9): 3165–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611357104>.
- Baumgart, Tobias, Samuel T. Hess, and Watt W. Webb. 2003. “Imaging Coexisting Fluid Domains in Biomembrane Models Coupling Curvature and Line Tension.” *Nature* 425 (6960): 821–24. <https://doi.org/10.1038/nature02013>.
- Bellet-Amalric, E, D Blaudez, B Desbat, F Graner, F Gauthier, and A. Renault. 2000. “Interaction of the Third Helix of Antennapedia Homeodomain and a Phospholipid Monolayer, Studied by Ellipsometry and PM-IRRAS at the Air-Water Interface.” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1467 (1): 131–43. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00218-2](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00218-2).
- Blaudez, D., T. Buffeteau, J.C. C. Cornut, B. Desbat, N. Escafre, M. Pezolet, J. M. Turlet, and et al. 1994. “Polarization Modulation FTIR Spectroscopy at the Air-Water Interface.” *Thin Solid Films* 242 (1–2): 146–50. [https://doi.org/10.1016/0040-6090\(94\)90519-3](https://doi.org/10.1016/0040-6090(94)90519-3).
- Blaudez, Daniel, Jean Marie Turlet, Jean Dufourcq, Delphine Bard, Thierry Buffeteau, and Bernard Desbat. 1996. “Investigations at the Air/Water Interface Using Polarization Modulation IR Spectroscopy.” *Journal of the Chemical Society - Faraday Transactions* 92 (4): 525–30. <https://doi.org/10.1039/ft9969200525>.
- Bligh, E G, and W J Dyer. 1959. “A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification.” *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37 (8): 911–17. <https://doi.org/10.1139/o59-099>.
- Blitterswijk, W. J. van, G. de Veer, J H Krol, and P Emmelot. 1982. “Comparative Lipid

- Analysis of Purified Plasma Membranes and Shed Extracellular Membrane Vesicles from Normal Murine Thymocytes and Leukemic GRSL Cells.” *BBA - Biomembranes* 688 (2): 495–504. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(82\)90361-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(82)90361-3).
- Bompard, Julien, Ofelia Maniti, R. Aboukhachfe, D. Ausserre, and Agnès Girard-Egrot. 2021. “BALM: Watching the Formation of Tethered Bilayer Lipid Membranes with Submicron Lateral Resolution.” *Langmuir* 37 (31): 9457–71. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c01184>.
- Bompard, Julien, Annalisa Rosso, Leyre Brizuela, Saïda Mebarek, Loïc J. Blum, A.-M. Ana Maria Trunfio-Sfarghiu, Giovanna Lollo, et al. 2020. “Membrane Fluidity as a New Means to Selectively Target Cancer Cells with Fusogenic Lipid Carriers.” *Langmuir* 36 (19): 5134–44. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00262>.
- Bretscher, A, D Reczek, and M Berryman. 1997. “Ezrin: A Protein Requiring Conformational Activation to Link Microfilaments to the Plasma Membrane in the Assembly of Cell Surface Structures.” *Journal of Cell Science* 110 (24): 3011–18. <https://doi.org/10.1242/jcs.110.24.3011>.
- Caesar, Christina E.B., Elin K. Esbjörner, Per Lincoln, and Bengt Nordén. 2006. “Membrane Interactions of Cell-Penetrating Peptides Probed by Tryptophan Fluorescence and Dichroism Techniques: Correlations of Structure to Cellular Uptake.” *Biochemistry* 45 (24): 7682–92. <https://doi.org/10.1021/bi052095t>.
- Carradori, Dario, Andreia G dos Santos, Julien Masquelier, Adrien Paquot, Patrick Saulnier, Joël Eyer, Véronique Prémat, Giulio G Muccioli, Marie Paule Mingeot-Leclercq, and Anne des Rieux. 2018. “The Origin of Neural Stem Cells Impacts Their Interactions with Targeted-Lipid Nanocapsules: Potential Role of Plasma Membrane Lipid Composition and Fluidity.” *Journal of Controlled Release* 292: 248–55. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.11.005>.
- Castano, Sabine, Bernard Desbat, Michel Laguerre, and Jean Dufourcq. 1999. “Structure, Orientation and Affinity for Interfaces and Lipids of Ideally Amphipathic Lytic LiKj(I=2j) Peptides.” *Biochim. Biophys. Acta* 1416: 176–94.
- Chadli, Meriem, Ofelia Maniti, Christophe Marquette, Bruno Tillier, Sandra Cortès, Agnès Girard-Egrot, B Tilier, Sandra Cortès, and Agnès Girard-Egrot. 2018. “A New Functional Membrane Protein Microarray Based on Tethered Phospholipid Bilayers.” *Analyst* 143 (9): 2165–73. <https://doi.org/10.1039/c8an00260f>.
- Chadli, Meriem, Samuel Rebaud, Ofelia Maniti, Bruno Tillier, Sandra Cortès, Agnès Girard-Egrot, Christophe Marquette, et al. 2017. “New Tethered Phospholipid Bilayers

- Integrating Functional G-Protein-Coupled Receptor Membrane Proteins.” *Langmuir* 33 (39): 2165–73. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01636>.
- Cheniour, Mouhedine, Jonathan Brewer, Luis Bagatolli, Olivier Marcillat, and Thierry Granjon. 2017. “Evidence of Proteolipid Domain Formation in an Inner Mitochondrial Membrane Mimicking Model.” *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1861 (5): 969–76. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.02.001>.
- Cheniour, Mouhedine, David Gueyrard, Peter G. Goekjian, Thierry Granjon, and Olivier Marcillat. 2016. “A Convenient and Versatile Synthesis of Laurdan-like Fluorescent Membrane Probes: Characterization of Their Fluorescence Properties.” *RSC Advances* 6 (7): 5547–57. <https://doi.org/10.1039/c5ra20369d>.
- Cheniour, Mouhedine, David Gueyrard, Peter Goekjian, Olivier Marcillat, Ofelia Maniti, Arnaud Vigneron, Sebastien Ibanez, and Thierry Granjon. 2019. Fluorescent probes and applications thereof. EP19306175, issued 2019.
- Christiaens, Bart, Sofie Symoens, Stefan Vanderheyden, Yves Engelborghs, Alain Joliot, Alain Prochiantz, Joël Vandekerckhove, Maryvonne Rosseneu, and Berlinda Vanloo. 2002. “Tryptophan Fluorescence Study of the Interaction of Penetratin Peptides with Model Membranes.” *European Journal of Biochemistry* 269 (12): 2918–26. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02963.x>.
- Comte, J, B Maïsterrena, and D C Gautheron. 1976. “Lipid Composition and Protein Profiles of Outer and Inner Membranes from Pig Heart Mitochondria. Comparison with Microsomes.” *Biochimica et Biophysica Acta* 419 (2): 271–84. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(76\)90353-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90353-9).
- Cornut, Isabelle, Bernard Desbat, Jean Marie Turlet, and Jean Dufourcq. 1996. “In Situ Study by Polarization Modulated Fourier Transform Infrared Spectroscopy of the Structure and Orientation of Lipids and Amphipathic Peptides at the Air-Water Interface.” *Biophysical Journal* 70 (1): 305–12. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79571-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79571-1).
- Derossi, Daniele, Sophie Calvet, Alain Trembleau, Allé Brunissen, Gérard Chassaing, and Alain Prochiantz. 1996. “Cell Internalization of the Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Is Receptor-Independent.” *Journal of Biological Chemistry* 271 (30): 18188–93. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.30.18188>.
- Doi, Yoshinori, Masahiko Itoh, Shigenobu Yonemura, Satoru Ishihara, Hiroshi Takano, Tetsuo Noda, Shoichiro Tsukita, and Sachiko Tsukita. 1999. “Normal Development of Mice and Unimpaired Cell Adhesion/Cell Motility/Actin-Based Cytoskeleton without Compensatory up-Regulation of Ezrin or Radixin in Moesin Gene Knockout.” *Journal of*

- Biological Chemistry* 274 (4): 2315–21. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.4.2315>.
- Drin, Guillaume, Sylvine Cottin, Emmanuelle Blanc, Anthony R. Rees, and Jamal Temsamani. 2003. “Studies on the Internalization Mechanism of Cationic Cell-Penetrating Peptides.” *Journal of Biological Chemistry* 278 (33): 31192–201. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303938200>.
- Eibl, Hansjörg, and Alfred Blume. 1979. “The Influence of Charge on Phosphatidic Acid Bilayer Membranes.” *BBA - Biomembranes* 553 (3): 476–88. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(79\)90303-1](https://doi.org/10.1016/0005-2736(79)90303-1).
- Elliott, Bruce E., Jalna A. Meens, Sandip K. SenGupta, Daniel Louvard, and Monique Arpin. 2005. “The Membrane Cytoskeletal Crosslinker Ezrin Is Required for Metastasis of Breast Carcinoma Cells.” *Breast Cancer Research* 7 (3): 1–9. <https://doi.org/10.1186/BCR1006/FIGURES/4>.
- Epand, Raquel F, Malgorzata Tokarska-Schlattner, Uwe Schlattner, Theo Wallimann, and Richard M Epand. 2007. “Cardiolipin Clusters and Membrane Domain Formation Induced by Mitochondrial Proteins.” *Journal of Molecular Biology* 365 (4): 968–80. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.028>.
- Estecha, Ana, Lorena Sánchez-Martín, Amaya Puig-Kröger, Rubén A. Bartolomé, Joaquín Teixidó, Rafael Samaniego, and Paloma Sánchez-Mateos. 2009. “Moesin Orchestrates Cortical Polarity of Melanoma Tumour Cells to Initiate 3D Invasion.” *Journal of Cell Science* 122 (19): 3492–3501. <https://doi.org/10.1242/jcs.053157>.
- Esterbauer, Hermann, Rudolf Jörg Schaur, and Helmward Zollner. 1991. “Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malonaldehyde and Related Aldehydes.” *Free Radical Biology and Medicine*. Free Radic Biol Med. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6).
- Fehon, Richard G., Andrea I. McClatchey, and Anthony Bretscher. 2010. “Organizing the Cell Cortex: The Role of ERM Proteins.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm2866>.
- Felder, Clifford E., Jaime Prilusky, Israel Silman, and Joel L. Sussman. 2007. “A Server and Database for Dipole Moments of Proteins.” *Nucleic Acids Research* 35 (SUPPL.2): W512–21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm307>.
- Ferrari, Aldo, Vittorio Pellegrini, Caterina Arcangeli, Antonio Fittipaldi, Mauro Giacca, and Fabio Beltram. 2003. “Caveolae-Mediated Internalization of Extracellular HIV-1 Tat Fusion Proteins Visualized in Real Time.” *Molecular Therapy* 8 (2): 284–94. [https://doi.org/10.1016/S1525-0016\(03\)00122-9](https://doi.org/10.1016/S1525-0016(03)00122-9).

- Fievet, Bruno T., Alexis Gautreau, Christian Roy, Laurence Del Maestro, Paul Mangeat, Daniel Louvard, and Monique Arpin. 2004. "Phosphoinositide Binding and Phosphorylation Act Sequentially in the Activation Mechanism of Ezrin." *Journal of Cell Biology* 164 (5): 653–59. <https://doi.org/10.1083/jcb.200307032>.
- Francois-Moutal, Liberty, Ofelia Maniti, Olivier Marcillat, and Thierry Granjon. 2013. "New Insights into Lipid-Nucleoside Diphosphate Kinase-D Interaction Mechanism: Protein Structural Changes and Membrane Reorganisation." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1828 (2): 906–15. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.08.023>.
- Francois-Moutal, Liberty, Olivier Marcillat, and Thierry Granjon. 2014. "Structural Comparison of Highly Similar Nucleoside-Diphosphate Kinases: Molecular Explanation of Distinct Membrane-Binding Behavior." *Biochimie* 105: 110–18. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25010650/>.
- Francois-Moutal, Liberty, Myriam M. Ouberai, Ofelia Maniti, Mark E. Welland, Agnieszka Strzelecka-Kiliszek, Marcin Wos, Slawomir Pikula, et al. 2016. "Two-Step Membrane Binding of NDPK-B Induces Membrane Fluidity Decrease and Changes in Lipid Lateral Organization and Protein Cluster Formation" 32 (48). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27934520/>.
- Fritz-Wolf, K, T Schnyder, T Wallimann, and W Kabsch. 1996. "Structure of Mitochondrial Creatine Kinase." *Nature* 381 (6580): 341–45. <https://doi.org/10.1038/381341a0>.
- Gehlert, U, S Siegel, and D Vollhardt. 1993. "Direct Visualization of Monolayer Structures with a Brewster Angle Microscope BT - Trends in Colloid and Interface Science VII." In , edited by P Laggner and O Glatter, 247. Darmstadt: Steinkopff.
- Girard-Egrot, Agnès, Ofelia Maniti, and Samuel Rebaud. 2016. Substrate/peptide/lipid bilayer assembly, preparation methods and associated detection methods. WO/2016/066947, issued 2016.
- Granjon, Thierry, Marie Jane Vacheron, Christian Vial, and René Buchet. 2001. "Mitochondrial Creatine Kinase Binding to Phospholipids Decreases Fluidity of Membranes and Promotes New Lipid-Induced Beta Structures as Monitored by Red Edge Excitation Shift, Laurdan Fluorescence, and FTIR." *Biochemistry* 40 (20): 6016–26. <https://doi.org/10.1021/bi002293e>.
- Green, Maurice, and Paul M. Loewenstein. 1988. "Autonomous Functional Domains of Chemically Synthesized Human Immunodeficiency Virus Tat Trans-Activator Protein." *Cell* 55 (6): 1179–88. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90262-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90262-0).
- Haas, R C, and A W Strauss. 1990. "Separate Nuclear Genes Encode Sarcomere-Specific and

- Ubiquitous Human Mitochondrial Creatine Kinase Isoenzymes.” *The Journal of Biological Chemistry* 265 (12): 6921–27.
- Hamada, Keisuke, Toshiyuki Shimizu, Takeshi Matsui, Shoichiro Tsukita, Sachiko Tsukita, and Toshio Hakoshima. 2000. “Structural Basis of the Membrane-Targeting and Unmasking Mechanisms of the Radixin FERM Domain.” *EMBO Journal* 19 (17): 4449–62. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.17.4449>.
- Hao, Jian Jiang, Yin Liu, Michael Kruhlak, Karen E. Debell, Barbara L. Rellahan, and Stephen Shaw. 2009. “Phospholipase C - Mediated Hydrolysis of PIP2 Releases ERM Proteins from Lymphocyte Membrane.” *Journal of Cell Biology* 184 (3): 451–62. <https://doi.org/10.1083/jcb.200807047>.
- Hénon, S, and J Meunier. 1991. “Microscope at the Brewster Angle: Direct Observation of First-order Phase Transitions in Monolayers.” *Review of Scientific Instruments* 62 (4): 936–39. <https://doi.org/10.1063/1.1142032>.
- Hicks, Stephanie N., Mark R. Jezyk, Svetlana Gershburg, Jason P. Seifert, T. Kendall Harden, and John Sondek. 2008. “General and Versatile Autoinhibition of PLC Isozymes.” *Molecular Cell* 31 (3): 383–94. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.06.018>.
- Hirao, Motohiro, Naruki Sato, Takahisa Kondo, Shigenobu Yonemura, Morito Monden, Takuya Sasaki, Yoshimi Takai, Shoichiro Tsukita, and Sachiko Tsukita. 1996. “Regulation Mechanism of ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) Protein/Plasma Membrane Association: Possible Involvement of Phosphatidylinositol Turnover and Rho-Dependent Signaling Pathway.” *Journal of Cell Biology* 135 (1): 37–51. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.1.37>.
- Hönig, Dirk, and Dietmar Möbius. 1992. “Reflectometry at the Brewster Angle and Brewster Angle Microscopy at the Air-Water Interface.” *Thin Solid Films* 210–211: 64–68. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0040-6090\(92\)90169-C](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0040-6090(92)90169-C).
- Ilani, Tal, Chand Khanna, Ming Zhou, Timothy D. Veenstra, and Anthony Bretscher. 2007. “Immune Synapse Formation Requires ZAP-70 Recruitment by Ezrin and CD43 Removal by Moesin.” *Journal of Cell Biology* 179 (4): 733–46. <https://doi.org/10.1083/jcb.200707199>.
- Israelachvili, Jacob N., D. John Mitchell, and Barry W. Ninham. 1976. “Theory of Self-Assembly of Hydrocarbon Amphiphiles into Micelles and Bilayers.” *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics* 72: 1525–68. <https://doi.org/10.1039/F29767201525>.
- Jacobus, WE, and A L Lehninger. 1973. “Creatine Kinase of Rat Heart Mitochondria. Coupling

- of Creatine Phosphorylation to Electron Transport.” *The Journal of Biological Chemistry* 248 (13): 4803–10.
- Jin, Lei, Andrew C. Millard, Joseph P. Wuskell, Xuemei Dong, Dianqing Wu, Heather A. Clark, and Leslie M. Loew. 2006. “Characterization and Application of a New Optical Probe for Membrane Lipid Domains.” *Biophysical Journal* 90 (7): 2563–75. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.072884>.
- Joliot, A., C. Pernelle, H. Deagostini-Bazin, and A. Prochiantz. 1991. “Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (5): 1864–68. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.5.1864>.
- Jurkiewicz, P., L. Cwiklik, P. Jungwirth, and M. Hof. 2012. “Lipid Hydration and Mobility: An Interplay between Fluorescence Solvent Relaxation Experiments and Molecular Dynamics Simulations.” *Biochimie* 94 (1): 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.06.027>.
- Kabsch, W, and K Fritz-Wolf. 1997. “Mitochondrial Creatine Kinase--a Square Protein.” *Current Opinion in Structural Biology* 7 (6): 811–18. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(97\)80151-0](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(97)80151-0).
- Kawai, Fumitaka, Momoko Shoda, Rie Harashima, Yoshito Sadaie, Hiroshi Hara, and Kouji Matsumoto. 2004. “Cardiolipin Domains in Bacillus Subtilis Marburg Membranes.” *Journal of Bacteriology* 186 (5): 1475–83. <https://doi.org/10.1128/JB.186.5.1475-1483.2004>.
- Khalil, Ikramy A., Kentaro Kogure, Shiroh Futaki, and Hideyoshi Harashima. 2006. “High Density of Octaarginine Stimulates Macropinocytosis Leading to Efficient Intracellular Trafficking for Gene Expression.” *Journal of Biological Chemistry* 281 (6): 3544–51. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503202200>.
- Khanna, Chand, Xiaolin Wan, Seuli Bose, Ryan Cassaday, Osarenoma Olomu, Arnulfo Mendoza, Choh Yeung, Richard Gorlick, Stephen M. Hewitt, and Lee J. Helman. 2004. “The Membrane-Cytoskeleton Linker Ezrin Is Necessary for Osteosarcoma Metastasis.” *Nature Medicine* 10 (2): 182–86. <https://doi.org/10.1038/nm982>.
- Kikuchi, Shojiro, Masaki Hata, Kanehisa Fukumoto, Yukari Yamane, Takeshi Matsui, Atsushi Tamura, Shigenobu Yonemura, et al. 2002. “Radixin Deficiency Causes Conjugated Hyperbilirubinemia with Loss of Mrp2 from Bile Canalicular Membranes.” *Nature Genetics* 31 (3): 320–25. <https://doi.org/10.1038/NG905>.
- Komizu, Yuji, Hidetsugu Ueoka, Koichi Goto, and Ryuichi Ueoka. 2011. “Remarkable Inhibitory Effects of Hybrid Liposomes on Growth of Human Colon Cancer Cells through

- Induction of Cell Cycle Arrest along with Apoptosis.” *International Journal of Nanomedicine* 6 (September): 1913–20.
- Komizu, Yuji, Hidetsugu Ueoka, and Ryuichi Ueoka. 2012. “Selective Accumulation and Growth Inhibition of Hybrid Liposomes to Human Hepatocellular Carcinoma Cells in Relation to Fluidity of Plasma Membranes.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 418 (1): 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.134>.
- Kottke, M, V Adams, T Wallimann, V K Nalam, and D Brdiczka. 1991. “Location and Regulation of Octameric Mitochondrial Creatine Kinase in the Contact Sites.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1061 (2): 215–25. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(91\)90287-i](https://doi.org/10.1016/0005-2736(91)90287-i).
- Kottke, M, T Wallimann, and D Brdiczka. 1994. “Dual Electron Microscopic Localization of Mitochondrial Creatine Kinase in Brain Mitochondria.” *Biochemical Medicine and Metabolic Biology* 51 (2): 105–17. <https://doi.org/10.1006/bmmb.1994.1015>.
- Lamazière, Antonin, Fabienne Burlina, Claude Wolf, Gérard Chassaing, Germain Trugnan, and Jesus Ayala-Sanmartin. 2007. “Non-Metabolic Membrane Tubulation and Permeability Induced by Bioactive Peptides.” *PLoS ONE* 2 (2): e201. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0000201>.
- Lecompte, Marie France. 2005. “Interaction of an Amphitropic Protein (Factor Xa) with Membrane Models in a Complex System.” *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1724 (3): 307–14. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.05.004>.
- Lecompte, Marie France, Gaëlle Bouix, and Kenneth G. Mann. 1994. “Electrostatic and Hydrophobic Interactions Are Involved in Factor Va Binding to Membranes Containing Acidic Phospholipids.” *Journal of Biological Chemistry* 269 (3): 1905–10. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)42112-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)42112-0).
- Lecompte, Marie France, Anne Claire Bras, Nicole Dousset, Isabelle Portas, Robert Salvayre, and Maryse Ayrault-Jarrier. 1998. “Binding Steps of Apolipoprotein A-I with Phospholipid Monolayers: Adsorption and Penetration.” *Biochemistry* 37 (46): 16165–71. <https://doi.org/10.1021/bi9813072>.
- Lenz, Holger, Melanie Schmidt, Vivienne Welge, Thomas Kueper, Uwe Schlattner, Theo Wallimann, Hans-Peter Elsässer, et al. 2007. “Inhibition of Cytosolic and Mitochondrial Creatine Kinase by siRNA in HaCaT- and HeLaS3-Cells Affects Cell Viability and Mitochondrial Morphology.” *Molecular and Cellular Biochemistry* 306 (1–2): 153–62. <https://doi.org/10.1007/s11010-007-9565-8>.
- Li, Qianzhi, Mark R. Nance, Rima Kulikauskas, Kevin Nyberg, Richard Fehon, P. Andrew Karplus, Anthony Bretscher, and John J.G. Tesmer. 2007. “Self-Masking in an Intact

- ERM-Merlin Protein: An Active Role for the Central  $\alpha$ -Helical Domain.” *Journal of Molecular Biology* 365 (5): 1446–59. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.075>.
- Lingwood, Daniel, Jonas Ries, Petra Schwille, and Kai Simons. 2008. “Plasma Membranes Are Poised for Activation of Raft Phase Coalescence at Physiological Temperature.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (29): 10005–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804374105>.
- Lubart, Quentin, Helene Vitet, Fabien Dalonneau, Aline Le Roy, Mathieu Kowalski, Morgane Lourdin, Christine Ebel, Marianne Weidenhaupt, and Catherine Picart. 2018. “Role of Phosphorylation in Moesin Interactions with PIP2-Containing Biomimetic Membranes.” *Biophysical Journal* 114 (1): 98–112. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.10.041>.
- Magzoub, Mazin, L. E.Göran Eriksson, and Astrid Gräslund. 2002. “Conformational States of the Cell-Penetrating Peptide Penetratin When Interacting with Phospholipid Vesicles: Effects of Surface Charge and Peptide Concentration.” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1563 (1–2): 53–63. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00373-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00373-5).
- Magzoub, Mazin, Kalle Kilk, L. E.Göran Eriksson, Ülo Langel, and Astrid Gräslund. 2001. “Interaction and Structure Induction of Cell-Penetrating Peptides in the Presence of Phospholipid Vesicles.” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1512 (1): 77–89. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(01\)00304-2](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(01)00304-2).
- Maniti, Ofelia, Isabel Alves, Germain Trugnan, and Jesus Ayala-Sanmartin. 2010. “Distinct Behaviour of the Homeodomain Derived Cell Penetrating Peptide Penetratin in Interaction with Different Phospholipids.” *PLoS ONE* 5 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015819>.
- Maniti, Ofelia, Marie France Lecompte, Olivier Marcillat, Bernard Desbat, René Buchet, Christian Vial, and Thierry Granjon. 2009. “Mitochondrial Creatine Kinase Binding to Phospholipid Monolayers Induces Cardiolipin Segregation.” *Biophysical Journal* 96 (6): 2428–38. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.12.3911>.
- Marcillat, O, D Goldschmidt, D Eichenberger, and C Vial. 1987. “Only One of the Two Interconvertible Forms of Mitochondrial Creatine Kinase Binds to Heart Mitoplasts.” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 890 (2): 233–41. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(87\)90024-7](https://doi.org/10.1016/0005-2728(87)90024-7).
- Marsh, Derek. 1996. “Lateral Pressure in Membranes.” *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(96\)00009-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(96)00009-3).
- Mayer, L D, M B Bally, H Loughrey, D Masin, and P R Cullis. 1990. “Liposomal Vincristine Preparations Which Exhibit Decreased Drug Toxicity and Increased Activity against

- Murine L1210 and P388 Tumors.” *Cancer Research* 50 (3): 575–79.
- Meer, Gerrit van. 2005. “Cellular Lipidomics.” *The EMBO Journal* 24 (18): 3159–65. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600798>.
- Mileykovskaya, E, and W Dowhan. 2000. “Visualization of Phospholipid Domains in Escherichia Coli by Using the Cardiolipin-Specific Fluorescent Dye 10-N-Nonyl Acridine Orange.” *Journal of Bacteriology* 182 (4): 1172–75 <https://doi.org/10.1128/JB.182.4.1172-1175.2000>.
- Mufamadi, Maluta S., Viness Pillay, Yahya E. Choonara, Lisa C. Du Toit, Girish Modi, Dinesh Naidoo, and Valence M. K. Ndesendo. 2011. “A Review on Composite Liposomal Technologies for Specialized Drug Delivery.” *Journal of Drug Delivery* 2011 (February): 1–19. <https://doi.org/10.1155/2011/939851>.
- Müller, M, R Moser, D Cheneval, and E Carafoli. 1985. “Cardiolipin Is the Membrane Receptor for Mitochondrial Creatine Phosphokinase.” *Journal of Biological Chemistry* 260 (6): 3839–43.
- Nelson, A., and F. A.M. Leermakers. 1990. “Substrate-Induced Structural Changes in Electrode-Adsorbed Lipid Layers. Experimental Evidence from the Behaviour of Phospholipid Layers on the Mercury-Water Interface.” *Journal of Electroanalytical Chemistry* 278 (1–2): 73–83. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(90\)85124-N](https://doi.org/10.1016/0022-0728(90)85124-N).
- Niggli, Verena, and Jérémie Rossy. 2008. “Ezrin/Radixin/Moesin: Versatile Controllers of Signaling Molecules and of the Cortical Cytoskeleton.” *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.02.012>.
- Parasassi, Tiziana, Ewa K. Krasnowska, Luis Bagatolli, and Enrico Gratton. 1998. “Laurdan and Prodan as Polarity-Sensitive Fluorescent Membrane Probes.” *Journal of Fluorescence* 8 (4): 365–73. <https://doi.org/10.1023/A:1020528716621>.
- Parasassi, Tiziana, Gelsomina De Stasio, Giampietro Ravagnan, Ruth M. Rusch, and Enrico Gratton. 1991. “Quantitation of Lipid Phases in Phospholipid Vesicles by the Generalized Polarization of Laurdan Fluorescence.” *Biophysical Journal* 60 (1): 179–89. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(91\)82041-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82041-0).
- Pearson, M.A., D. Reczek, A. Bretscher, and P.A. Karplus. 2000. “Structure of the ERM Protein Moesin Reveals the FERM Domain Fold Masked by an Extended Actin Binding Tail Domain.” *Cell* 101: 259–70.
- Persson, Daniel, Per E.G. Thorén, Elin K. Esbjörner, Mattias Goksör, Per Lincoln, and Bengt Nordén. 2004. “Vesicle Size-Dependent Translocation of Penetratin Analogs across Lipid Membranes.” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1665 (1–2): 142–55.

- <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.07.008>.
- Persson, Daniel, Per E.G. Thorén, Per Lincoln, and Bengt Nordén. 2004. “Vesicle Membrane Interactions of Penetratin Analogues.” *Biochemistry* 43 (34): 11045–55. <https://doi.org/10.1021/bi036054d>.
- Pike, Linda J. 2006. “Rafts Defined: A Report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function.” *Journal of Lipid Research* 47 (7): 1597–98. <https://doi.org/10.1194/jlr.E600002-JLR200>.
- Quemeneur, E, D Eichenberger, and C Vial. 1990. “Immunological Determination of the Oligomeric Form of Mitochondrial Creatine Kinase in Situ.” *FEBS Letters* 262 (2): 275–78. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80209-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80209-2).
- Römer, Winfried, Ludwig Berland, Valérie Chambon, Katharina Gaus, Barbara Windschiegl, Danièle Tenza, Mohamed R.E. Aly, et al. 2007. “Shiga Toxin Induces Tubular Membrane Invaginations for Its Uptake into Cells.” *Nature* 450 (7170): 670–75. <https://doi.org/10.1038/nature05996>.
- Rouser, George, A. N. Siakotos, and Sidney Fleischer. 1966. “Quantitative Analysis of Phospholipids by Thin-Layer Chromatography and Phosphorus Analysis of Spots.” *Lipids* 1 (1): 85–86. <https://doi.org/10.1007/BF02668129>.
- Saarikangas, Juha, Hongxia Zhao, and Pekka Lappalainen. 2010. “Regulation of the Actin Cytoskeleton-Plasma Membrane Interplay by Phosphoinositides.” *Physiological Reviews*. *Physiol Rev*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2009>.
- Saarikangas, Juha, Hongxia Zhao, Anette Pykäläinen, Pasi Laurinmäki, Pieta K. Mattila, Paavo K.J. Kinnunen, Sarah J. Butcher, and Pekka Lappalainen. 2009. “Molecular Mechanisms of Membrane Deformation by I-BAR Domain Proteins.” *Current Biology* 19 (2): 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.12.029>.
- Saotome, Ichiko, Marcello Curto, and Andrea I. McClatchey. 2004. “Ezrin Is Essential for Epithelial Organization and Villus Morphogenesis in the Developing Intestine.” *Developmental Cell* 6 (6): 855–64. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.05.007>.
- Schauenstein, Erwin, Hermann Esterbauer, and Helmward Zollner. 1977. *Aldehydes in Biological Systems*. Pion.
- Schlame, M, and W Augustin. 1985. “Association of Creatine Kinase with Rat Heart Mitochondria: High and Low Affinity Binding Sites and the Involvement of Phospholipids.” *Biomedica Biochimica Acta* 44 (7–8): 1083–88.
- Schlame, Michael, and Dörte Otten. 1991. “Analysis of Cardiolipin Molecular Species by High-Performance Liquid Chromatography of Its Derivative 1,3-Bisphosphatidyl-2-Benzoyl-

- Sn-Glycerol Dimethyl Ester.” *Analytical Biochemistry* 195 (2): 290–95. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(91\)90332-N](https://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90332-N).
- Schlame, Michael, Mindong Ren, Yang Xu, Miriam L. Greenberg, and Ivan Haller. 2005. “Molecular Symmetry in Mitochondrial Cardiolipins.” *Chemistry and Physics of Lipids* 138 (1–2): 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2005.08.002>.
- Schlattner, Uwe, Florian Gehring, Nathalie Vernoux, Malgorzata Tokarska-Schlattner, Dietbert Neumann, Olivier Marcillat, Christian Vial, and Theo Wallimann. 2004. “C-Terminal Lysines Determine Phospholipid Interaction of Sarcomeric Mitochondrial Creatine Kinase.” *Journal of Biological Chemistry* 279 (23): 24334–42. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314158200>.
- Schlattner, Uwe, Malgorzata Tokarska-Schlattner, Richard M. Eband, Mathieu Boissan, Marie Lise Lacombe, and Valerian E. Kagan. 2018. “NME4/Nucleoside Diphosphate Kinase D in Cardiolipin Signaling and Mitophagy.” *Laboratory Investigation*. Lab Invest. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2017.113>.
- Schlattner, Uwe, Malgorzata Tokarska-Schlattner, Richard M. Eband, Mathieu Boissan, Marie Lise Lacombe, Judith Klein-Seetharaman, and Valerian E. Kagan. 2015. “Mitochondrial NM23-H4/NDPK-D: A Bifunctional Nanoswitch for Bioenergetics and Lipid Signaling.” *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 388 (2): 271–78. <https://doi.org/10.1007/s00210-014-1047-4>.
- Schlattner, Uwe, Malgorzata Tokarska-Schlattner, and Theo Wallimann. 2006. “Mitochondrial Creatine Kinase in Human Health and Disease.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1762 (2): 164–80. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.09.004>.
- Schlegel, J, M Wyss, U Schürch, T Schnyder, A Quest, G Wegmann, H M Eppenberger, and T Wallimann. 1988. “Mitochondrial Creatine Kinase from Cardiac Muscle and Brain Are Two Distinct Isoenzymes but Both Form Octameric Molecules.” *Journal of Biological Chemistry* 263 (32): 16963–69.
- Schnyder, T, M Cyrklaff, K Fuchs, and T Wallimann. 1994. “Crystallization of Mitochondrial Creatine Kinase on Negatively Charged Lipid Layers.” *Journal of Structural Biology* 112 (2): 136–47. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1994.1015>.
- Shaffer, Meredith H., Renell S. Dupree, Peimin Zhu, Ichiko Saotome, Richard F. Schmidt, Andrea I. McClatchey, Bruce D. Freedman, and Janis K. Burkhardt. 2009. “Ezrin and Moesin Function Together to Promote T Cell Activation.” *The Journal of Immunology* 182 (2): 1021–32. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.2.1021>.

- Sieber, Sandro, Philip Grossen, Pascal Detampel, Salome Siegfried, Dominik Witzigmann, and Jörg Huwlyer. 2017. "Zebrafish as an Early Stage Screening Tool to Study the Systemic Circulation of Nanoparticulate Drug Delivery Systems in Vivo." *Journal of Controlled Release* 264 (October): 180–91. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.08.023>.
- Sparagna, Genevieve C., Adam J. Chicco, Robert C. Murphy, Michael R. Bristow, Christopher A. Johnson, Meredith L. Rees, Melissa L. Maxey, Sylvia A. McCune, and Russell L. Moore. 2007. "Loss of Cardiac Tetralinoleoyl Cardiolipin in Human and Experimental Heart Failure." *Journal of Lipid Research* 48 (7): 1559–70. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600551-JLR200>.
- Speer, Oliver, Nils Bäck, Tanja Buerklen, Dieter Brdiczka, Alan Koretsky, Theo Wallimann, and Ove Eriksson. 2005. "Octameric Mitochondrial Creatine Kinase Induces and Stabilizes Contact Sites between the Inner and Outer Membrane." *Biochemical Journal* 385 (2): 445–50. <https://doi.org/10.1042/BJ20040386>.
- Stewart, John Charles Marshall. 1980. "Colorimetric Determination of Phospholipids with Ammonium Ferrothiocyanate." *Analytical Biochemistry* 104 (1): 10–14. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90269-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90269-9).
- Suk, Jung Soo, Qingguo Xu, Namho Kim, Justin Hanes, and Laura M Ensign. 2016. "PEGylation as a Strategy for Improving Nanoparticle-Based Drug and Gene Delivery." *Advanced Drug Delivery Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>.
- Ta, Ha Phuong, Karine Berthelot, Bénédicte Couлары-Salin, Bernard Desbat, Julie Géan, Laurent Servant, Christophe Cullin, and Sophie Lecomte. 2011. "Comparative Studies of Nontoxic and Toxic Amyloids Interacting with Membrane Models at the Air-Water Interface." *Langmuir* 27 (8): 4797–4807. <https://doi.org/10.1021/la103788r>.
- Takechi-Haraya, Yuki, Kumiko Sakai-Kato, Yasuhiro Abe, Toru Kawanishi, Haruhiro Okuda, and Yukihiro Goda. 2016. "Atomic Force Microscopic Analysis of the Effect of Lipid Composition on Liposome Membrane Rigidity." *Langmuir* 32 (24): 6074–82. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00741>.
- Terrone, Donato, Stephane Leung Wai Sang, Liya Roudaia, and John R. Silvius. 2003. "Penetratin and Related Cell-Penetrating Cationic Peptides Can Translocate Across Lipid Bilayers in the Presence of a Transbilayer Potential." *Biochemistry* 42 (47): 13787–99. <https://doi.org/10.1021/bi035293y>.
- Théry, Clotilde. 2015. "Cancer: Diagnosis by Extracellular Vesicles." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature14626>.
- Thi, Thai Thanh Hoang, Emily H Pilkington, Dai Hai Nguyen, Jung Seok Lee, Ki Dong Park,

- and Nghia P Truong. 2020. “The Importance of Poly(Ethylene Glycol) Alternatives for Overcoming PEG Immunogenicity in Drug Delivery and Bioconjugation.” *Polymers*. <https://doi.org/10.3390/polym12020298>.
- Thorén, Per E.G., Daniel Persson, Mattias Karlsson, and Bengt Nordén. 2000. “The Antennapedia Peptide Penetratin Translocates across Lipid Bilayers - The First Direct Observation.” *FEBS Letters* 482 (3): 265–68. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02072-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02072-X).
- Ueoka, Ryuichi, Yoko Matsumoto, Koichi Goto, Hideaki Ichihara, and Yuji Komizu. 2011. “Membrane Targeted Chemotherapy with Hybrid Liposomes for Tumor Cells Leading to Apoptosis.” *Current Pharmaceutical Design* 17 (17): 1709–19. <https://doi.org/10.2174/138161211796355128>.
- Vacheron, M J, E Clottes, C Chautard, and C Vial. 1997. “Mitochondrial Creatine Kinase Interaction with Phospholipid Vesicles.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 344 (2): 316–24. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0181>.
- Verhoef, Johan J.F., and Thomas J. Anchordoquy. 2013. “Questioning the Use of PEGylation for Drug Delivery.” *Drug Delivery and Translational Research* 3 (6): 499–503. <https://doi.org/10.1007/s13346-013-0176-5>.
- Vernoux, N., T. Granjon, O. Marcillat, F. Besson, and C. Vial. 2006. “Interfacial Behavior of Cytoplasmic and Mitochondrial Creatine Kinase Oligomeric States.” *Biopolymers* 81: 270–81.
- Vives, Eric. 2005. “Present and Future of Cell-Penetrating Peptide Mediated Delivery Systems: ‘Is the Trojan Horse Too Wild to Go Only to Troy?’” In *Journal of Controlled Release*, 109:77–85. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.09.032>.
- Vreken, Peter, Fredoen Valianpour, Leo G. Nijtmans, Les A. Grivell, Barbara Plecko, Ronald J.A. Wanders, and Peter G. Barth. 2000. “Defective Remodeling of Cardiolipin and Phosphatidylglycerol in Barth Syndrome.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 279 (2): 378–82. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3952>.
- Wallimann, T, M Wyss, D Brdiczka, K Nicolay, and H M Eppenberger. 1992. “Intracellular Compartmentation, Structure and Function of Creatine Kinase Isoenzymes in Tissues with High and Fluctuating Energy Demands: The ‘phosphocreatine Circuit’ for Cellular Energy Homeostasis.” *Biochemical Journal* 281 ( Pt 1 (Pt 1): 21–40. <https://doi.org/10.1042/bj2810021>.
- Wyss, M, J Smeitink, R A Wevers, and T Wallimann. 1992. “Mitochondrial Creatine Kinase: A Key Enzyme of Aerobic Energy Metabolism.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1102 (2):

- 119–66. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(92\)90096-k](https://doi.org/10.1016/0005-2728(92)90096-k).
- Yan, Xuedong, Gerrit L. Scherphof, and Jan A.A.M. Kamps. 2005. “Liposome Opsonization.” *Journal of Liposome Research*. <https://doi.org/10.1081/LPR-64971>.
- Yonemura, Shigenobu, Takeshi Matsui, Shoichiro Tsukita, and Sachiko Tsukita. 2002. “Rho-Dependent and -Independent Activation Mechanisms of Ezrin/Radixin/Moesin Proteins: An Essential Role for Polyphosphoinositides in Vivo.” *Journal of Cell Science* 115 (12): 2569–80. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.12.2569>.
- Yu, Yanlin, Javed Khan, Chand Khanna, Lee Helman, Paul S. Meltzer, and Glenn Merlino. 2004. “Expression Profiling Identifies the Cytoskeletal Organizer Ezrin and the Developmental Homeoprotein Six-1 as Key Metastatic Regulators.” *Nature Medicine* 10 (2): 175–81. <https://doi.org/10.1038/nm966>.
- Zhang, Mei, Eugenia Mileykovskaya, and William Dowhan. 2002. “Gluing the Respiratory Chain Together. Cardiolipin Is Required for Supercomplex Formation in the Inner Mitochondrial Membrane.” *Journal of Biological Chemistry* 277 (46): 43553–56. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200551200>.
- Zouaoui, J., A. M. Trunfio-Sfarghiu, L. Brizuela, A. Piednoir, O. Maniti, B. Munteanu, S. Mebarek, A. Girard-Egrot, A. Landoulsi, and T. Granjon. 2017. “Multi-Scale Mechanical Characterization of Prostate Cancer Cell Lines: Relevant Biological Markers to Evaluate the Cell Metastatic Potential.” *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1861 (12): 3109–19. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.09.003>.