

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES CHIMIQUE À FINALITÉ APPROFONDIE

#### Nanoréacteurs bio-inspirés

#### utilisation de polymères amphiphiles pour la stabilisation de liposomes intégrant des transporteurs membranaires protéiques

Alfano, Ugo

*Award date:*  
2023

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



Université de Namur

Faculté des sciences

Département de Chimie

Laboratoire de Chimie Physique des Biomolécules

***Nanoréacteurs bio-inspirés : utilisation de polymères amphiphiles pour la stabilisation de liposomes intégrant des transporteurs membranaires protéiques***

Mémoire présenté pour l'obtention du grade académique de Master Chimie « Chimie du Vivant et des Nanomatériaux » : finalité Approfondie

Ugo Alfano

Août 2023



# Table des matières

# Table des matières

---

I.	Les nanoréacteurs bio-inspirés.....	1
II.	La membrane biologique.....	1
III.	Protéines membranaires.....	3
III.a.	Structures et fonctions des protéines membranaires.....	3
III.b.	Surexpression des protéines membranaires.....	5
IV.	Membrane artificielle et liposomes.....	6
IV.a.	Structure des lipides en solution.....	6
IV.b.	Caractéristiques structurales des liposomes.....	8
IV.c –	Stabilité des liposomes.....	9
IV.c.1.	Stabilité chimique.....	9
IV.c.2.	Stabilité mécanique.....	10
V.	Utilisation de polymères amphiphiles.....	10
V.a.	Polymersomes.....	10
V.b.	Vésicules hybrides.....	12
VI.	Objectifs et stratégie.....	15
VII.	Formation des systèmes vésiculaires.....	19
VII.a.	Principe : réhydratation du film.....	19
VII.b.	Résultats.....	20
IIIX.	Etude de la perméabilité à l'acridine orange.....	21
IIIX.a.	Principe.....	22
IIIX.b.	Résultats.....	23
IX.	Surexpression et purification de l'OmpF.....	25
IX.a.	Principe.....	25
IX.b.	Résultats.....	26
X.	Intégration de l'OmpF dans les systèmes vésiculaires.....	29
X.a.	Principe.....	29
X.b.	Résultats.....	30
XI.	Conclusions.....	34
XII.	Perspectives.....	35
XIII	Formation des vésicules.....	38
XIII.a.	Réhydratation du film.....	38
XIV.	Evaluation de la perméabilité des vésicules.....	39
XV.	Surexpression de l'OmpF.....	39
XVI.	Purification de l'OmpF.....	40

XVI.a. Purification .....	40
XVI.b. Electrophorèse SDS-PAGE .....	40
XVI.c. Dosage protéique.....	41
XVII. Formation de protéovésicules .....	41
XVII.a. Insertion de la protéine membranaire au sein de la membrane des vésicules.....	41
XVIII. Dichroïsme circulaire (CD) .....	42
XIX. Diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	42
XVII. Bibliographie.....	45

# Propos liminaires

UNIVERSITE DE NAMUR

Faculté des Sciences

Secrétariat du Département de Chimie

Rue de Bruxelles 61 – 5000 NAMUR

Téléphone : +32(0)81 72.54.44 – Téléfax : +32(0)81 72.54.40

E-mail : enseignement.chimie@unamur.be - www.unamur.be/sciences

## **Nanoréacteurs bio-inspirés : utilisation de polymères amphiphiles pour la stabilisation de liposomes intégrant des transporteurs membranaires protéiques**

### **Résumé**

Depuis plusieurs années, l'incorporation de protéines membranaires au sein de différents systèmes attire l'intérêt des scientifiques. Ces nouveaux outils permettent d'accaparer la fonction biologique de ladite protéine afin de réaliser différents biomatériaux. Parmi-eux apparaît les protéoliposomes, consistant en l'incorporation d'une protéine membranaire au sein d'une vésicule phospholipidique appelée liposome. La bicouche phospholipidique permet de mimer la membrane native de la protéine.

Les liposomes présentent cependant certains défauts qui leurs sont propres (stabilité, perméabilités, etc.). L'une des techniques permettant de contrebalancer ces défauts, est l'utilisation simultanée de lipides et de polymères afin de former des vésicules dit « hybrides ». Ces vésicules présentent des propriétés intermédiaires entre des vésicules « tout-lipides » (liposomes) et des vésicules « tout-polymères » (polymersomes).

L'objectif de ce travail est donc de former différents supports protéiques (protéoliposomes, protéo-polymersomes et protéo-vésicules hybrides) en incorporant une protéine membranaire au sein des différentes membranes. À terme, cela permettrait de réaliser des vésicules possédant différentes propriétés contrebalançant les défauts des liposomes.

La protéine membranaire utilisée durant ce mémoire est la protéine OmpF (*outer membran protein F*). Il s'agit d'une protéine trimérique sous forme de tonneau- $\beta$  permettant le transport non-sélectifs d'ions et de biomolécules ayant une masse atomique jusqu'à 600 Da. La protéine a été surexprimée dans *E. coli*, purifiée et incorporée au sein des différentes vésicules.

Mémoire de Master en Sciences Chimiques à Finalité Approfondie

Août 2023

Promoteur : *Catherine Michaux*

Author : Ugo Alfa



## Liste des abréviations

ATP	Adénosine triphosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique
AO	Acridine orange
ARN	Acide ribonucléique
$C_{a-e}$	Concentration d'extinction de fluorescence
CD	Dichroïsme circulaire
CMC	Concentration micellaire critique
D.O.	Densité optique
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DNase I	Désoxyribonucléase I
E. Coli	Escherichia coli
GUV	<i>Giant unilamellar vesicles</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
Ls	Liposomes
LUV	<i>Large unilamellar vesicles</i>
MLV	<i>Multilamellar vesicles</i>
MVV	<i>Multivesicular vesicles</i>
OG	n-octyl- $\beta$ -D-glucoside
OmpF	Outer membran protein F
OLs	OmpF-Liposomes
OPs	OmpF-Polymersomes
OVHs	OmpF-Vésicules hybrides
PBD-b-PEO	Poly(butadiène)-poly(oxyde d'éthylène)
PMOXA-b-PDMS-b-PMOXA	poly(2-méthyle-2-oxazoline)- poly(diméthylsiloxane)-poly(2-méthyle-2-oxazoline)
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine
Ps	Polymersomes
RNase A	Ribonucléase A

SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SUV	<i>Small unilamellar vesicles</i>
TB	<i>Terrific Broth</i>
TEM	Microscopie électronique à transmission
Triton X-100	TX-100
ULV	<i>Unilamellar vesicles</i>
UV	Ultraviolet
VHs	Vesicules hybrides
$\lambda_{em}$	Longuer d'onde d'émission
$\lambda_{ex}$	Longueur d'onde d'excitation



# Partie 1 - Introduction théorique

### I. Les nanoréacteurs bio-inspirés

---

Les nanoréacteurs bio-inspirés sont des nanomatériaux s'inspirant ou utilisant des processus biologiques lors de leur mise en œuvre. Certains de ces matériaux sont produits grâce à des organismes vivants comme c'est le cas pour des nano particules d'argent ou d'or recouvert par de l'oxide de graphène réduit<sup>1</sup>. Ces derniers sont notamment utilisés pour leurs propriétés antibactériennes. D'autres types de nanomatériaux quant à eux sont basés sur le mimétisme de processus biologiques ou intègrent directement du matériel biologique pour obtenir des propriétés comme la biocompatibilité<sup>2</sup>. Ce type de matériaux est principalement utilisé dans le domaine de la délivrance de substances médicamenteuses<sup>3</sup> et dans l'industrie agroalimentaire<sup>4</sup> mais voit naître un intérêt grandissant dans des domaines comme la catalyse ou le développement de biosenseurs. En effet, de nombreuses études sont menées afin de reproduire le processus de photosynthèse<sup>5</sup> ou produire des matériaux répondant à des stimuli (pH, température, concentration en ions, etc.)<sup>6</sup>. Parmi les plateformes les plus utilisées on retrouve notamment les liposomes, les bicelles ou encore les nanodisques<sup>7</sup>. Ces dernières sont conçues dans le but de mimer la membrane biologique et permettent de supporter des protéines membranaires

### II. La membrane biologique

---

Afin d'imiter les propriétés des membranes biologiques, il est important de bien comprendre leurs propriétés ainsi que leurs fonctions. Les membranes en tant que telles sont composées de lipides (glycérophospholipides, cholestérol, etc.). Ces derniers sont une catégorie de molécules amphiphiles (Fig.1) très importante chez les organismes vivants. Ces composés peuvent avoir divers rôles au sein d'une cellule comme le stockage d'énergie, la signalisation ou encore la structuration des membranes plasmiques<sup>8</sup>. Les lipides peuvent être classés en plusieurs catégories en fonction de leur composition chimique et plus particulièrement en fonction de la présence de certains groupements chimiques. Ainsi, la famille des phospholipides, qui constituent majoritairement les membranes plasmiques, sont

## Partie 1 - Introduction

des acides gras composés de deux longues chaînes carbonées (lipophiles) et d'un groupement phosphate, liés par un groupement glycérol.

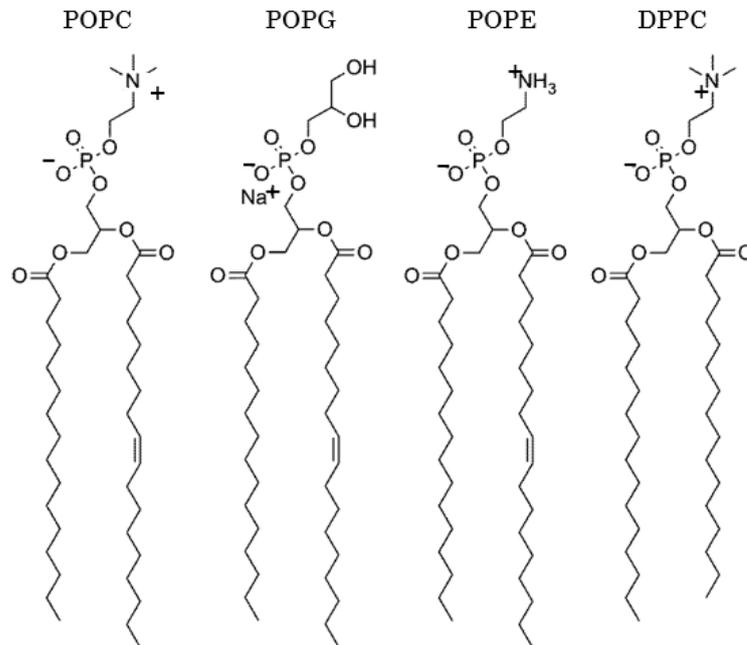


Figure 1 – Structures moléculaires de différents phospholipides.

Au sein de la membrane, les phospholipides sont assemblés sous forme de bicouche<sup>8</sup>, leur permettant de se mouvoir de manière latérale ou transversale<sup>9</sup> (Fig. 2). Cette propriété porte le nom de fluidité membranaire et est à l'origine du modèle de la mosaïque fluide<sup>10</sup>.

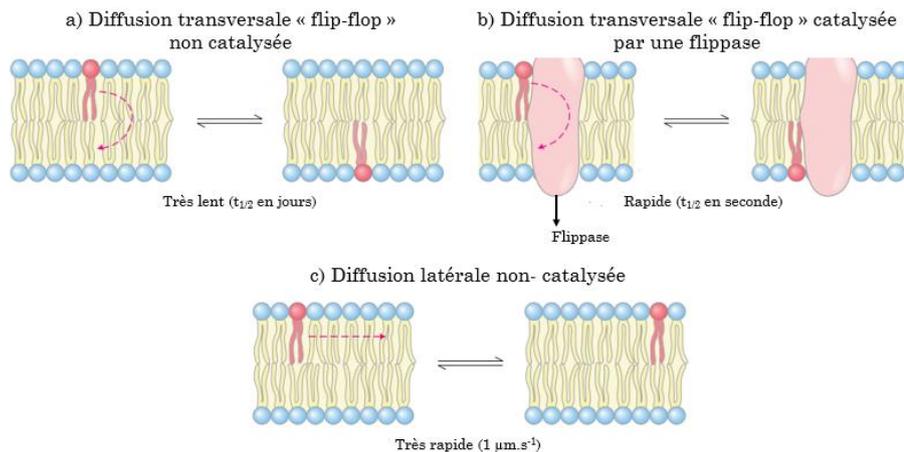


Figure 2 - Illustration des différents mouvements opérés par les lipides au sein d'une bicouche lipidique<sup>15</sup>.

Afin d'assurer des fonctions de transduction du signal<sup>11</sup>, de transport de métabolites<sup>12</sup> ou encore de défense, des entités comme des anticorps ou encore des protéines membranaires se trouvent enchâssés ou en interaction avec la bicouche

lipidique. Grâce à la fluidité membranaire, les protéines dites transmembranaires peuvent aussi bouger au sein de la membrane.

### III. Protéines membranaires

#### III.a. Structures et fonctions des protéines membranaires

L'ensemble des protéines présentes chez les êtres vivants peuvent être classées en fonction de leur structure (Fig. 3) et de leur fonction. Les protéines globulaires, solubles en milieu aqueux se retrouveront plutôt dans le cytoplasme et dans le sang où elles exhibent des fonctions catalytiques. Les protéines fibreuses bien que non-solubles en milieu aqueux se trouveront aussi bien dans le milieu extracellulaire qu'intracellulaire où elles endossent un rôle structurel pour la cellule. Les protéines membranaires, à l'instar des protéines fibreuses, sont insolubles en milieu aqueux mais trouvent fonction au sein de bicouches lipidiques (membrane cellulaire, appareil de golgi, etc.).

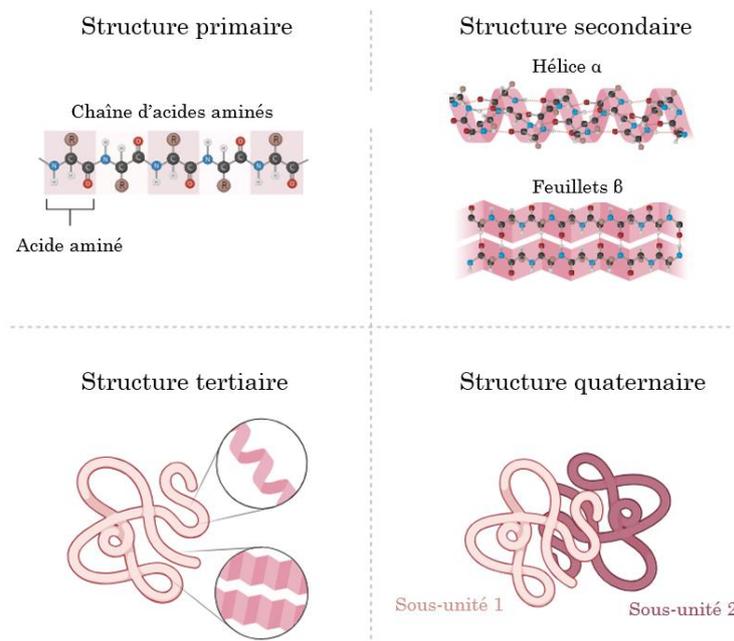


Figure 3 - Illustration de la structure primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire des protéines.

Parmi ces dernières se trouvent les protéines transmembranaires (qui traversent la bicouche lipidique) dont certaines sont à l'origine du transport

## Partie 1 - Introduction

d'ions<sup>13</sup> ou de molécules plus complexes comme le glucose<sup>14</sup> au travers de la membrane plasmique.

Le transport de ces différentes espèces peut être de deux types : passif ou actif (Fig. 4). Le moteur du transport passif est la différence de potentiel chimique entre le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire, matérialisée par les différences de concentration de l'espèce transportée au sein des deux compartiments. Les mouvements se font alors dans le sens du gradient de concentration. Le transport actif quant à lui nécessite l'intervention d'éléments extérieurs tels que la lumière ou de l'adénosine triphosphate (ATP), fournissant une énergie primordiale au mouvement d'espèces chimiques dans le sens contraire au gradient de concentration<sup>15</sup>.

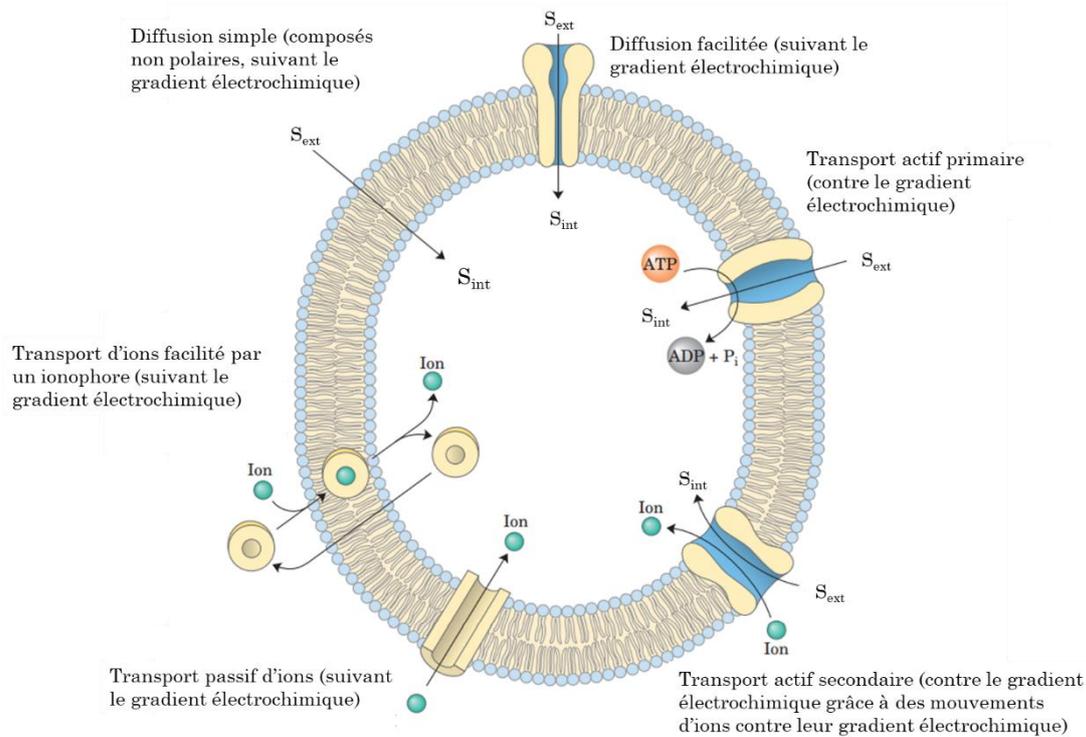


Figure 4 - Illustration de différents types de transport possibles à travers les membranes biologiques<sup>15</sup>.

Concernant les protéines de transport membranaires, les structures tertiaires les plus répandues sont celles dites en tonneau  $\beta$  et celles dites tout- $\alpha$ . Ces structures permettent d'exposer les résidus lipophiles vers l'extérieur de la molécule et ainsi permettre l'insertion dans des membranes plasmiques. Il existe des protéines pour lesquelles la structure tertiaire n'est pas suffisante à l'obtention

d'une fonction biologique. En effet, certaines protéines n'agissent que sous forme d'oligomères pour former la structure quaternaire de la protéine. Cette structure peut être le résultat d'interactions hydrogènes, ou encore d'effets hydrophobes en vue de minimiser les contacts entre des parties lipophiles et hydrophiles. L'OmpF fait partie de cette famille de protéine et ne s'insère que sous forme de trimère dans la membrane<sup>16,17</sup> (Fig.5).



Figure 5 – Structure DRX de l'OmpF sous forme trimérique (6ZHV).

Cette protéine a une structure tertiaire en tonneau  $\beta$  et joue le rôle de porine. Elle est caractérisée par un poids moléculaire d'environ 40 kDa (120 kDa pour le trimère) et participe passivement au transport de molécules dont le poids moléculaire n'excède pas 600 Da. L'OmpF sera utilisée dans le cadre de ce travail comme transporteur membranaire passif et non-sélectif.

### III.b. Surexpression des protéines membranaires

Lorsque l'on considère l'étude structurale et fonctionnelle d'une protéine, les premières étapes sont la production et la purification.

L'outil le plus fréquemment utilisé pour la production d'une protéine membranaire est la surexpression bactérienne par sa facilité de mise en œuvre et les rendements de production obtenus. Cependant cette méthode peut poser plusieurs problèmes<sup>18</sup>. Par exemple, toutes les membranes plasmiques ne possèdent pas la même composition en lipides. Une protéine membranaire propre à une espèce ne sera donc pas forcément repliée de manière fonctionnelle dans une membrane différente.

Afin de rendre possible la production d'une protéine par une souche bactérienne compétente, il convient d'effectuer une manipulation, dite de transformation, afin d'y injecter un plasmide portant le gène codant pour la protéine d'intérêt.

Lorsque que l'on souhaite produire et purifier des protéines membranaires, deux situations sont possibles. Il se peut que la protéine membranaire soit produite sous forme d'agrégats (appelés corps d'inclusion) biologiquement non-actifs. Il s'impose donc d'effectuer une étape de renaturation après purification de la protéine. La deuxième situation quant à elle concerne la surexpression de protéines directement dans la membrane bactérienne. Ceci est rendu possible par l'ajout du peptide signal correspondant dans le plasmide utilisé pour la transformation. Ce peptide long de 15 à 30 acides aminés se trouve du côté N-terminale de la protéine et permet d'indiquer à la machine cellulaire l'endroit où doit elle doit être envoyée. La protéine d'intérêt est alors acheminée vers la membrane dans laquelle elle se trouve sous sa forme native et fonctionnelle. Dans ce cas, la purification peut s'effectuer par centrifugations ou par séparation grâce à des techniques chromatographiques. Là alors, la protéine sera extraite de la membrane bactérienne et solubilisée au sein de micelles de détergent.

Dans la majorité des cas, les souches bactériennes utilisées pour la production de protéine sont des souches *Escherichia coli* (*E. coli*) modifiées génétiquement. L'utilisation intensive de cette souche est due au fait qu'il est relativement facile d'y intégrer un plasmide et que sa culture est rapide et aisée.

## IV. Membrane artificielle et liposomes

---

### IV.a. Structure des lipides en solution

Les lipides ont un caractère ambivalent et ne sont solubles que sous certaines conditions (Température, pH, concentration) dans les solvants aqueux et présentent un comportement bien particulier. Dans ce type de solvant, ces composés s'arrangent de manière à minimiser l'énergie libre de Gibbs du système. Cette énergie est associée aux interactions des molécules d'eau avec la tête hydrophile d'une part et à la variation d'entropie due à la non-solubilisation des

## Partie 1 - Introduction

chaînes lipophiles d'autre part. Les phospholipides, comme d'autres détergents peuvent être caractérisés par leur concentration micellaire critique (CMC)<sup>19</sup>. En deçà de cette concentration, la minimisation de l'énergie libre de Gibbs est matérialisée par le mouvement des lipides vers l'interface liquide/air. De cette manière, les parties lipophiles seront exposées vers l'extérieur de la solution et les têtes hydrophiles vers l'intérieur. Au-delà de la CMC, l'interface est saturée en lipide et ces derniers vont alors s'auto-assembler en des structures colloïdales pouvant avoir différentes géométries en fonction de la composition du lipide. Ces géométries peuvent être déterminées en calculant le paramètre d'empilement. Ce dernier rend compte de la différence de taille entre les parties lipophiles et hydrophiles. La figure 6 regroupe la formule permettant de calculer le paramètre d'empilement  $p$  ainsi que les géométries associées<sup>20</sup>.

Dans le cas des phospholipides, l'assemblage des molécules donne lieu à des vésicules (bicouche) sphériques appelées liposomes.

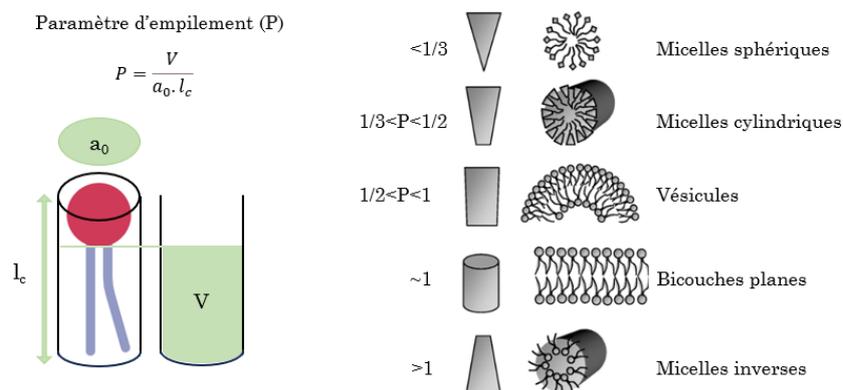


Figure 6 - Paramètre d'empilement et géométries associées<sup>20</sup>,  $a_0$  est la surface de la section de la partie hydrophile,  $l_c$  et  $V$  sont respectivement la longueur et le volume des chaînes lipophiles.

Par leur composition, la membrane des liposomes présente alors des propriétés proches de celles des membranes biologiques (fluidité, biocompatibilité, etc.). Comme introduit précédemment, ces similarités peuvent être exploitées afin de produire des nanoréacteurs bio-inspirés.

Les propriétés de la bicouche lipidique vis-à-vis de la perméabilité sont par exemple utilisées pour contrôler le relargage dans le cadre de la délivrance de substances médicamenteuses<sup>21</sup>. L'utilisation de telles plateformes permet notamment l'amélioration de la solubilité de principes actifs dans l'eau et la

diminution de la toxicité<sup>2</sup>. Des formulations à base de liposomes modifiés sont alors apparues dans le cadre de traitements anticancéreux ou antifongiques<sup>22,23</sup>.

Les liposomes sont aussi utilisés dans l'industrie agroalimentaire pour délivrer des exhausteurs de goûts ou des nutriments.

Il est donc possible de tirer profit des similitudes avec la membrane des cellules biologiques pour insérer des protéines membranaires dans la bicouche des liposomes<sup>24,25,26</sup>. Dépendamment de la protéine utilisée le transport passif peut être augmenté ou un transport actif (ATP, protons, etc.) peut être intégré au sein de la membrane.

### IV.b. Caractéristiques structurales des liposomes

Les liposomes sont classés en fonction de leur taille par les dénominations SUVs (*small unilamellar vesicles* – 20 à 100 nm), LUVs (*large unilamellar vesicles* – 100 à 1000 nm) et GUVs (*giant unilamellar vesicles* – 1 à 200  $\mu\text{m}$ ) (Fig. 3). Aussi, ces vésicules sont classées en fonction de leur morphologie par les dénominations ULVs (*unilamellar vesicles*), MLVs (*multilamellar vesicles*), et MVVs (*multivesicular vesicles*) (Fig. 7). Dépendamment du lipide utilisé, l'épaisseur de la membrane d'un liposome peut varier de 3 à 5 nm.

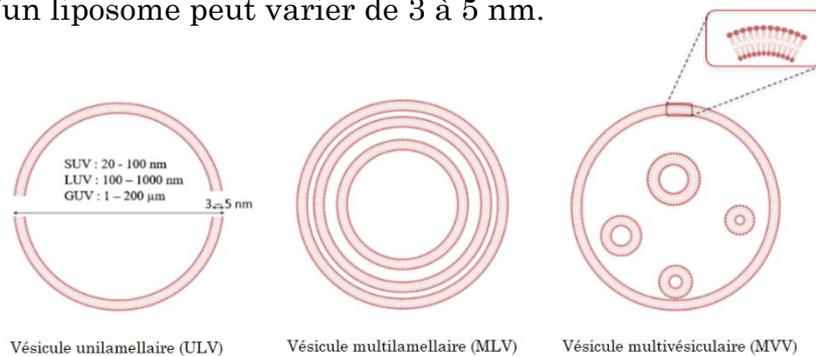


Figure 7 - Illustration des tailles et morphologies rencontrées lors de la formation de vésicules.

Il existe plusieurs méthodes de formation des liposomes (électroformation<sup>27</sup>, *hydrodynamic flow focusing*<sup>28</sup>, etc.) mais la plus couramment utilisée est celle de la réhydratation d'un film lipidique<sup>29</sup>.

### IV.c – Stabilité des liposomes

#### IV.c.1. Stabilité chimique

Bien que les liposomes soient de plus en plus utilisés, ces systèmes comportent des désavantages, notamment en termes de stabilité.

Comme exprimé précédemment, il existe des lipides de compositions diverses et variées (POPC ; 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine, cholestérol, cardiolipine, etc.) mais ceux principalement utilisés pour former les liposomes sont des phospholipides. Ces derniers possèdent un groupement ester, faisant la jonction entre la tête hydrophile et la queue lipophile, pouvant être hydrolysé en milieu aqueux (Fig. 8). Les propriétés physico-chimiques des lipides sont alors altérées et l'assemblage des lipides est compromis. La membrane s'en trouve fragilisée, ce qui peut mener à la coalescence ou à la destruction de la structure vésiculaire<sup>30,31</sup>.

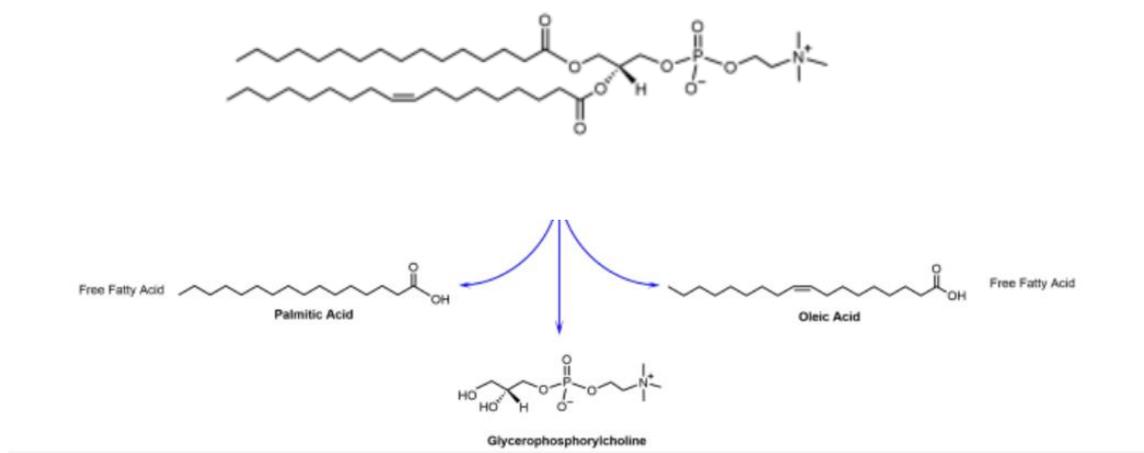


Figure 8 - Schéma réactionnel de l'hydrolyse du lien ester entre les parties lipophiles et hydrophiles du POPC.

Un autre point à soulever s'impose lors de l'utilisation de lipides insaturés. Dans ce cas, l'exposition des liposomes à des rayons ultra-violet induit une oxydation lente des insaturations<sup>30</sup> (Fig. 9), ce qui résulte en une modification de la composition chimique des lipides et par conséquent de leur assemblage. Les liposomes n'ont alors plus les propriétés mécaniques souhaitées. Ces derniers doivent donc être minutieusement stockés à basse température (4 °C) et à l'abri de la lumière.

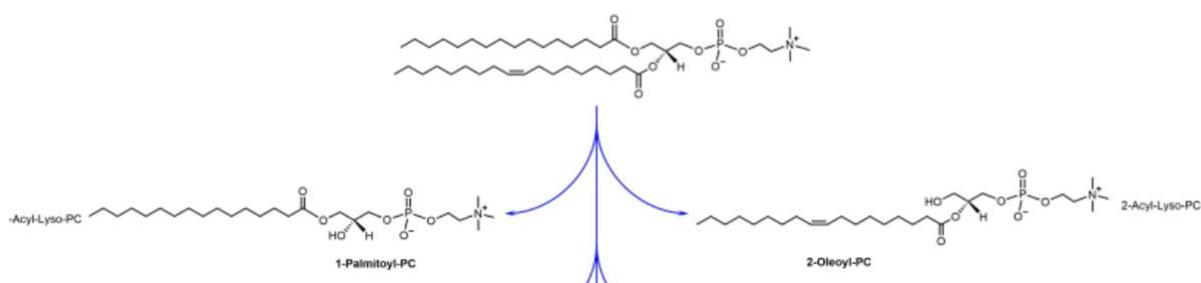


Figure 9 - Schéma réactionnel de l'oxydation des insaturations des parties lipophiles du POPC.

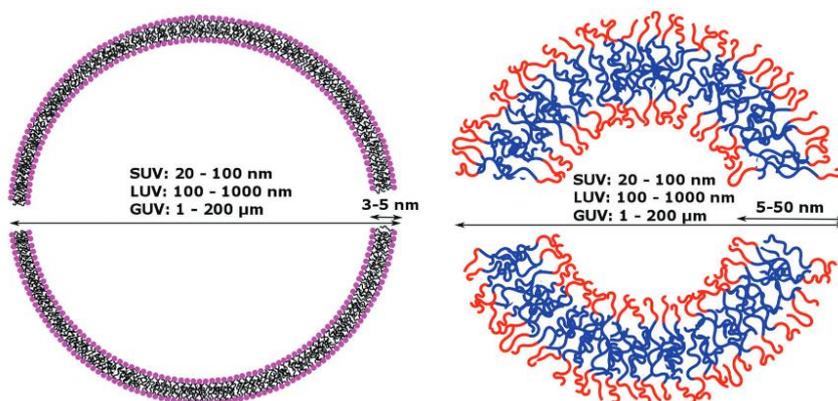
### IV.c.2. Stabilité mécanique

La résistance vis-à-vis du plissement et de l'étirement sont des propriétés mécaniques intrinsèques des membranes<sup>32,33</sup> qui caractérisent leur solidité lorsque des contraintes leur sont appliquées. Dans le cas de la délivrance de substances médicamenteuses utilisant des liposomes comme transporteurs, ces déformations apparaissent dans les vaisseaux sanguins où l'écoulement du sang dans les veines leur applique des forces de cisaillement. Les vésicules peuvent alors être détruites et le principe actif (relargué de manière non-contrôlé) peut ne pas se trouver à l'endroit ciblé et/ou en trop grande quantité. Ce manque de stabilité peut alors impacter le transport des liposomes et leur utilisation dans des processus industriels ou thérapeutiques.

## V. Utilisation de polymères amphiphiles

### V.a. Polymersomes

Parmi de nombreuses manières d'améliorer les propriétés de systèmes vésiculaires (fonctionnalisation, changement de la composition lipidique, etc.) la suppléance des lipides par des polymères amphiphiles a été largement étudiée depuis le milieu des années nonante<sup>34,35</sup>. En effet, certains de ces polymères comme le poly(butadiène)-poly(oxyde d'éthylène) (PBD-b-PEO) ou le poly(2-méthyle-2-oxazoline)-poly(diméthylsiloxane)-poly(2-méthyle-2-oxazoline) (PMOXA-b-PDMS-b-PMOXA) ont montré pouvoir former des vésicules en solution, appelées polymersomes<sup>36,37</sup> (Fig. 10), ayant des propriétés chimiques et mécaniques bien différentes de celles des liposomes<sup>38</sup>.



Les connaissances dans le domaine de la synthèse de ces composés, permet une beaucoup plus grande diversité chimique par rapport aux lipides. En effet, la synthèse de liposomes se cantonne à l'utilisation de phospholipides et est par conséquent limitée en termes de versatilité.

L'utilisation de polymères permet d'avoir accès à des molécules avec de plus longues chaînes lipophiles. En effet, les phospholipides ont généralement des chaînes carbonées de 16 ou 18 atomes de carbone alors que pour les polymères cette quantité peut varier d'une dizaine à une centaine d'atomes. La membrane des polymersomes est alors caractérisée par une fluidité membranaire moins importante que pour les liposomes, ayant pour effet d'améliorer leur stabilité mécanique. Cette caractéristique est aussi à l'origine de la faible perméabilité de ce type de vésicules.

L'absence de groupement hydrolysables contribue également à rendre les polymersomes chimiquement et mécaniquement plus stables que les liposomes.

Il est alors possible de former des polymersomes de compositions très diverses pour en ajuster les propriétés.

Malheureusement, les spécificités permettant aux polymersomes d'être plus stables et moins perméables sont aussi à l'origine de leur limitation quant à l'utilisation comme système de délivrance de substances médicamenteuses ou encore comme nanoréacteurs bio-inspirés. En effet, l'absence de fluidité membranaire rend moins aisée l'insertion de protéines au sein de la membrane en vue de modifier le transport au travers de celle-ci. De plus, l'environnement étant

bien différent de l'environnement natif des protéines membranaires, il n'est pas toujours certain que ces dernières exhibent une structure tertiaire ou quaternaire fonctionnelle.

Enfin, lorsque l'on considère le secteur thérapeutique d'autres désavantages sont rencontrés. La présence de polymères dans un organisme peut s'avérer cytotoxique et peuvent s'agréger, ce qui entraîne diverses complications. Cependant, des efforts ont été fournis afin de produire des polymères biocompatibles<sup>39,40</sup> comme le copolymère tribloc PDOXA-b-PDMS-b-PDOXA.

### V.b. Vésicules hybrides

Afin de pallier les désavantages des liposomes et des polymersomes, tout en conservant leurs avantages, une méthode consistant en la formation de vésicules mixtes a été mise en place. Les vésicules, dites hybrides, sont alors composées de lipides et de polymères et leurs propriétés peuvent être finement ajustées. Cet ajustement dépend des lipides et des polymère utilisés. En effet, certaines associations permettront l'obtention de vésicules homogènes, alors que d'autres peuvent donner naissance à des vésicules à phases séparées (Fig.10)<sup>41,42,43</sup>.

Dans le cas d'une distribution homogène, l'ajustement des propriétés est rendu possible par la présence d'un continuum entre les propriétés des vésicules et les concentrations relatives en lipides et en polymères. En effet, plus la quantité de polymères sera grands vis-à-vis de la concentration en lipides, plus les caractéristiques chimiques et mécaniques des vésicules seront proches des polymersomes, et *vice versa*. Il est alors possible de déterminer un ratio lipide/polymère permettant d'obtenir des vésicules ayant les propriétés souhaitées. Les vésicules hybrides homogènes présentent une plus grande fluidité membranaire que les polymersomes et permettent une insertion plus fonctionnelle des protéines, tout en gardant une certaine robustesse du système vésiculaire.

Dans certaines conditions il est possible de former des vésicules à phase séparées. Il y a présence de portions membranaires riches en lipides, ou en polymères, appelées nano-domaines. Ces derniers sont à l'origine d'une anisotropie des propriétés chimiques et mécaniques des vésicules. Dans le cas de l'utilisation

## Partie 1 - Introduction

---

de protéines membranaires par exemple, l'insertion se fera plutôt dans les domaines présentant une plus grande fluidité membranaire, c'est à dire dans les nano-domaines riches en lipides. La protéine se trouvera dans un environnement plus proche de son environnement natif et présentera une meilleure fonctionnalité que dans une membrane polymérique.

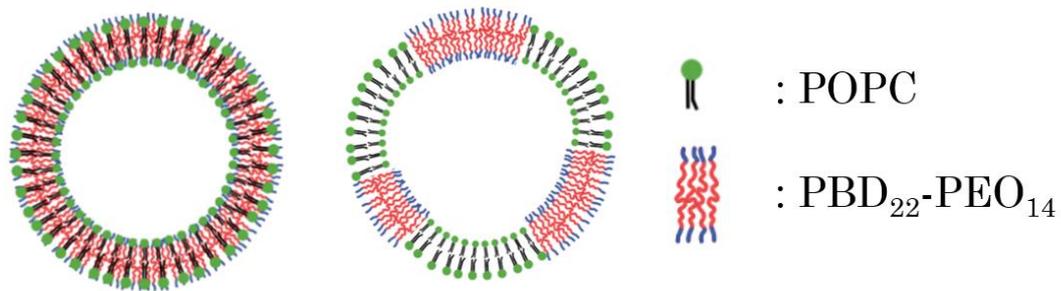


Figure 11 - Illustration des différences morphologiques entre les membranes des vésicules hybrides homogènes (à gauche) et à phases séparées (à droite).

## Partie 2 – Objectifs et stratégies

### VI. Objectifs et stratégie

L'objectif de ce travail s'inscrit dans un contexte global de recherche de stabilité concernant les nanoréacteurs bio-inspirés intégrant des protéines transmembranaires. Il a alors été choisi de travailler sur la formation de vésicules artificielles (liposomes) intégrant l'OmpF qui prend le rôle de protéine modèle et permet l'augmentation du transport non-sélectif entre les compartiments internes et externes. Afin de stabiliser ce système l'effet de l'ajout de polymères amphiphiles au sein des liposomes sur leur propriétés mécaniques et chimiques est étudié.

Dans ce cadre, il est primordial de trouver des moyens d'améliorer les propriétés mécaniques et chimiques des liposomes.

La protéine membranaire choisie pour assurer la fonction de transport est OmpF. Cette dernière permet le transport passif de molécules dont le poids moléculaire n'excède pas 600 Da. Aussi, elle est très bien décrite dans la littérature et à déjà montré pouvoir être insérée dans des membranes lipidiques et polymériques.

La formation des vésicules hybrides est effectuée en utilisant le POPC et le PBD<sub>22</sub>-PEO<sub>14</sub> (Fig. 12) et en appliquant la méthode d'hydratation du film lipidique.

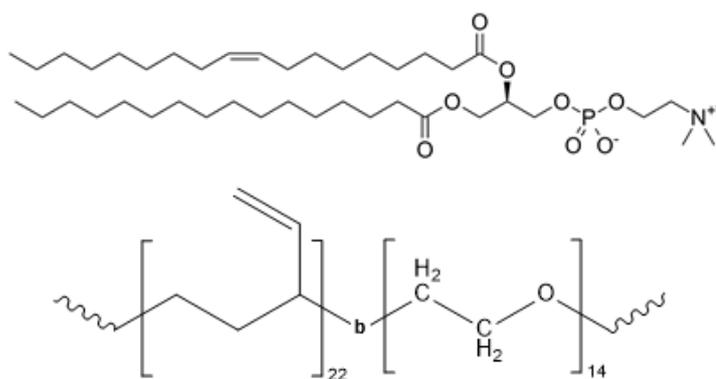


Figure 12 - Structure chimique du POPC (a) et du PBD<sub>22</sub>-PEO<sub>14</sub> (b).

## Partie 2 – Objectifs et stratégies

Ces molécules sont choisies car il a déjà été montré dans la littérature que de telles vésicules pouvaient être formées<sup>44</sup> et ils sont tous deux disponibles commercialement.

La première étape consiste alors à former des liposomes de POPC (Ls), des vésicules hybrides POPC/PBD<sub>22</sub>-PEO<sub>14</sub> (VHs) et des polymersomes de PBD<sub>22</sub>-PEO<sub>14</sub> (Ps) afin de comparer les systèmes entre eux. La formation des différents types de vésicules est vérifiée en utilisant des mesures de diffusion dynamique de la lumière (DLS). Aussi, la microscopie électronique à transmission (TEM) est utilisée pour obtenir des informations sur la morphologie des diverses vésicules.

Un test de perméabilité impliquant le phénomène d'auto-extinction de fluorescence est mis en place afin d'investiguer le transport à travers la membrane. Ce test est réalisé après l'encapsulation d'un fluorophore, l'acridine orange, au sein des vésicules.

La deuxième étape consiste alors en la production d'OmpF. Pour ce faire, la surexpression bactérienne est utilisée. La souche *E. coli* BL21 (DE3) Omp8 a été choisie car elle ne produit aucune protéine membranaire et permet de faciliter l'étape de purification. Il est alors nécessaire d'effectuer une étape de transformation de la souche avec un plasmide contenant le gène codant pour l'OmpF. Cette dernière est surexprimée directement en membrane, ce qui permet l'utilisation d'une méthode de purification par centrifugations successives. La protéine d'intérêt se trouve alors solubilisée dans des micelles de n-octyl-β-D-glucoside (OG ; Fig. 13) qui est un détergent doux. Afin de vérifier l'efficacité du procédé, une analyse par *sodium dodécylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) est mise en place. L'utilisation du dichroïsme circulaire (CD) permet ensuite de sonder la structure de la protéine.

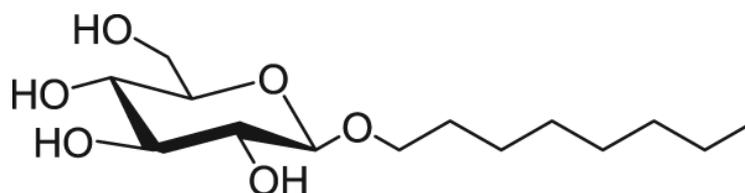
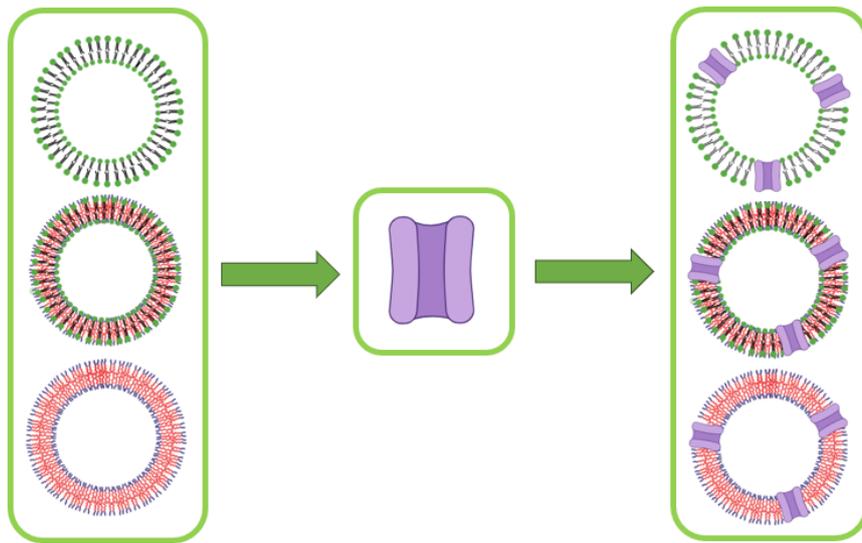


Figure 13 - Structure chimique de l'OG.

## Partie 2 – Objectifs et stratégies

---

Troisièmement, la reconstitution d'OmpF au sein des 3 types de vésicules est effectuée et le dichroïsme circulaire est utilisé afin de confirmer sa bonne insertion. Des tests de perméabilité sont alors effectués sur les trois types de protévésicules afin de déterminer si l'insertion de l'OmpF accroît le transport en dehors des vésicules.



**Figure 13 - Schéma global de la stratégie mise en place pour produire des plateformes plus stables pour l'insertion de protéines transmembranaires.**

## Partie 3 - Résultats

# VII. Formation des systèmes vésiculaires

---

La première étape de ce mémoire consiste en la formation de différents systèmes vésiculaires afin de les comparer avant et après insertion de la protéine membranaire. Les liposomes sont formés à partir de POPC, les vésicules hybrides à partir de POPC/ PBD<sub>22</sub>-PEO<sub>14</sub> en ratio 50/50 et les polymersomes à partir de PBD<sub>22</sub>-PEO<sub>14</sub>. Il est décidé de conduire cette étude sur des LUVs pour leur rayon de courbure moins important que les SUVs, facilitant généralement l'insertion de protéines transmembranaires.

## VII.a. Réhydratation du film

Il existe plusieurs méthodes pour former des vésicules mais la plus couramment utilisée est la méthode de réhydratation d'un film (Fig. 15). Ainsi, les liposomes, les vésicules hybrides et les polymersomes seront synthétisés de cette manière-là.

Cette technique consiste premièrement à dissoudre les molécules amphiphiles utilisées dans du chloroforme (1). Le solvant est ensuite évaporé et les molécules amphiphiles se déposent au fond du récipient sous forme de membranes (2). Après hydratation de ces dernières, elles gonflent et se referment pour former des vésicules en solution (3). A ce moment se trouvent dans la solution plusieurs types de vésicules (MLVs, ULVs, MVVs) et il faut procéder à des cycles de sonication ainsi que de gels/dégels pour n'obtenir que des ULVs (4). Ces étapes permettent d'induire des contraintes mécaniques sur les vésicules pour les faire céder et se reformer, limitant les probabilités de formation de MLVs ou de MVVs. Afin de n'obtenir que des LUVs ayant le diamètre souhaité, la solution de vésicules doit subir une étape d'extrusion au travers d'un filtre dont les pores sont dudit diamètre (5).

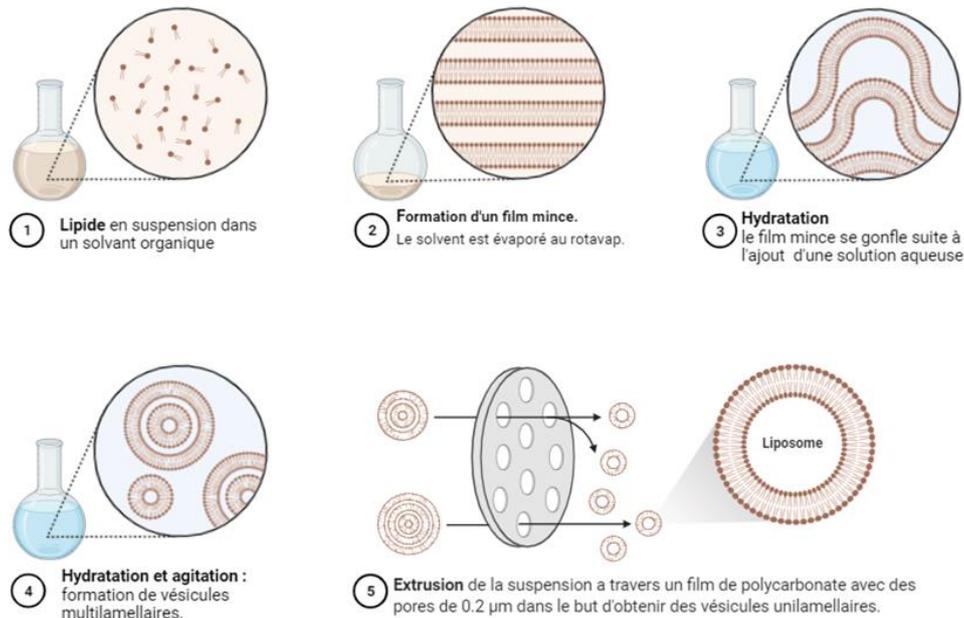


Figure 145 - Illustration schématique de la méthode de réhydratation d'un film appliquée aux liposomes.

### VII.b. Résultats

Les différents types de vésicules (Ls, VHs, Ps) ont été formés en utilisant la méthode précédemment expliquée. Ces dernières ont été analysées en DLS et les diamètres hydrodynamiques ( $\overline{D}_h$ ) moyens sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 1 - Rayons hydrodynamiques moyens des différentes vésicules formées mesurés par DLS.

Type de vésicules		Ls	VHs	Ps
$\overline{D}_h$ (nm)	Batch 1	163±5	132±2	158±3
	Batch 2	167±2	107±2	/

Les différentes vésicules n'ayant pas la même composition, elles ne se comportent pas de la même manière vis-à-vis des diverses étapes de formation, pouvant ainsi faire varier leur diamètre hydrodynamique. Les différentes valeurs présentées permettent d'affirmer que les vésicules ont bien été formées et que leur taille est uniforme. On observe les plus petits  $\overline{D}_h$  pour les VHs.

Dans le cas des liposomes, la formation de vésicules est aussi appuyée par des micrographies obtenues par TEM (Fig. 16).

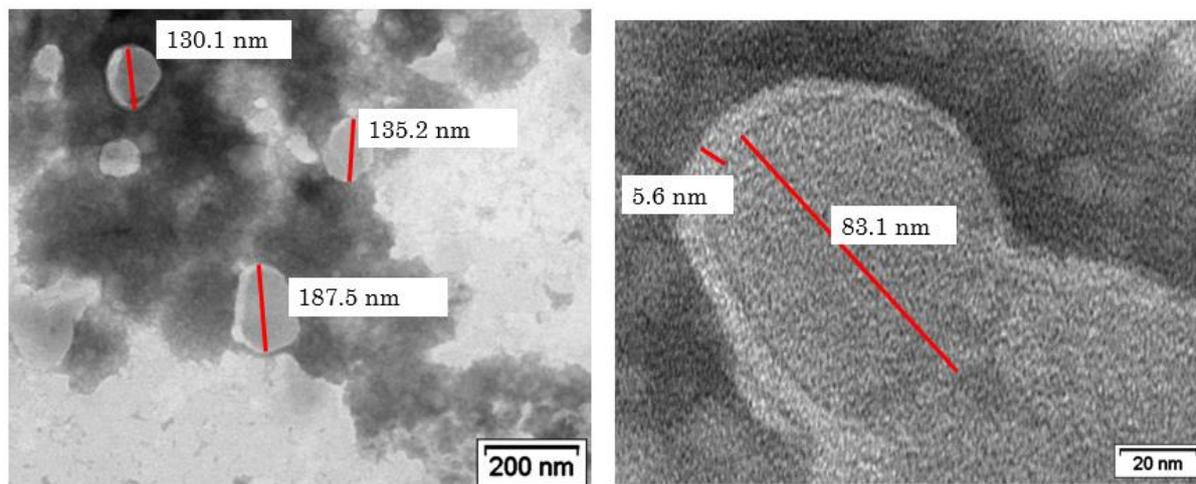


Figure 16 - Micrographies TEM par *negative staining* des liposomes obtenus.

Les rayons observés diffèrent de ceux obtenus via la DLS mais restent dans un ordre de grandeur autour de  $\sim 160$  nm. Cette différence est due au traitement nécessaire que doivent subir les vésicules avant la mesure et notamment à l'étape de séchage. Il est aussi observé que l'épaisseur de la membrane est de l'ordre de 6 nm alors qu'une épaisseur de l'ordre de 4-5 nm est reportée dans la littérature<sup>45,36</sup>. Cette différence peut aussi être dû aux conditions de mesures. Aussi, on observe que toutes les vésicules sont bien unilamellaires et univesiculaires, confirmant bien la formation de LUVs et d'ULVs.

## VIII. Etude de la perméabilité à l'acridine orange

---

L'un des paramètres permettant de différencier les systèmes étudiés est basé sur les différences de transport à travers leur membrane. Les liposomes sont connus pour être plus perméables que les vésicules hybrides, elles-mêmes plus perméables que les polymersomes. Etudier la perméabilité des différentes vésicules donnera donc aussi des informations sur leur composition chimique. Il est aussi important d'évaluer le transport afin de le comparer au système intégrant une protéine de transport transmembranaire, l'OmpF. La protéine modèle choisie ne laissant passer que des molécules dont la masse moléculaire n'excède pas 600 Da, le fluorophore sélectionné est l'acridine orange (AO). Le type de membrane

étudié n'est pas perméable vis-à-vis de grosses molécules lipophiles à cause de leur interaction avec l'intérieur de la bicouche lipidique. Cependant, l'AO a déjà été employée pour déterminer la perméabilité de polymersomes en utilisant la spectroscopie de corrélation de fluorescence<sup>46</sup>.

### VIII.a. Principe

Parmi les différentes manières d'évaluer la perméabilité de systèmes vésiculaires, il a été choisi de sonder le relargage d'un fluorophore préalablement encapsulé, l'AO (Fig. 17), en utilisant la spectroscopie de fluorescence ainsi qu'en exploitant le phénomène d'auto-extinction de fluorescence.

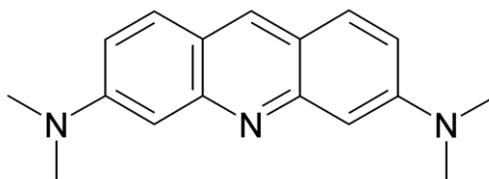


Figure 17 - Structure moléculaire de l'acridine orange.

Un fluorophore est un composé (le plus souvent conjugué) qui, lorsqu'il est irradié à une certaine longueur d'onde ( $\lambda_{ex}$ ), se trouve dans un état excité. Lors de sa relaxation une lumière de plus grande longueur d'onde est émise ( $\lambda_{em}$ ).

L'intensité de fluorescence augmente avec la concentration du fluorophore jusqu'à une certaine concentration appelée concentration d'extinction de fluorescence ( $C_{a-e}$ ). A partir de cette concentration, l'intensité diminue jusqu'à atteindre zéro. Ce phénomène est dû à différents facteurs. L'un d'entre eux consiste en l'agrégation du fluorophore, entraînant un changement de la structure électronique et modifiant la longueur d'onde d'excitation. L'excitation à une longueur d'onde initiale n'entraîne donc plus forcément de fluorescence.

L'étude du transport de l'AO à travers la membrane des vésicules est donc effectuée en utilisant une solution d'acridine, dont la concentration est au moins supérieure à  $C_{a-e}$ , lors de l'étape de réhydratation du film.

L'AO encapsulée diffuse alors à travers la membrane des vésicules, où elle se trouvera en quantité bien plus faible à l'extérieure de la vésicule et pourra être

excitée. L'intensité d'émission est suivie au cours du temps afin de produire un profil de perméabilité.

### VIII.b. Résultats

Afin de déterminer la  $C_{a-e}$  de l'acridine dans le tampon d'étude, plusieurs échantillons ayant des concentrations différentes en AO sont préparées et analysées par spectroscopie de fluorescence (Fig. 18).

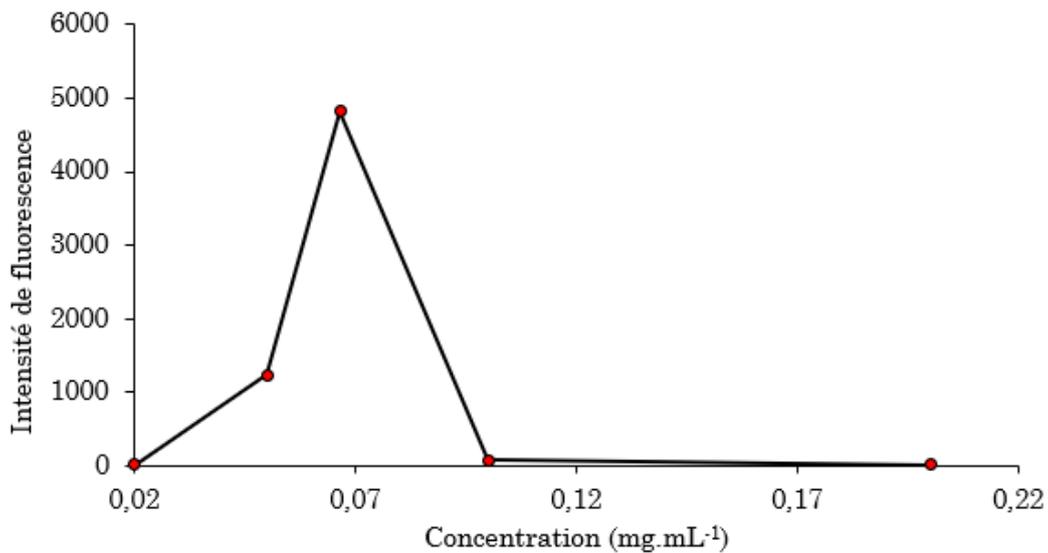


Figure 18 - Evolution de l'intensité de fluorescence de l'acridine orange en fonction de la concentration,  $\lambda_{ex}=460$  nm ;  $\lambda_{em}=530$  nm.

On observe qu'à partir de  $0,07$  mg.mL<sup>-1</sup> d'AO, la fluorescence diminue fortement. L'intensité atteint zéro pour une concentration  $0,2$  mg.mL<sup>-1</sup> correspondant à la concentration d'auto-extinction de fluorescence.

Afin d'évaluer leur perméabilité, les différentes vésicules sont formées en utilisant une solution d'AO concentrée à hauteur de  $0,1$  mg.mL<sup>-1</sup> lors de l'étape de réhydratation du film. Afin d'éliminer l'AO non-encapsulée, qui pourrait interférer avec les mesures de fluorescence, une colonne de dessalage est utilisée.

L'intensité de fluorescence est suivie pour une longueur d'onde d'excitation de  $460$  nm et une longueur d'onde d'émission de  $530$  nm durant  $18$ h (Fig. 19).

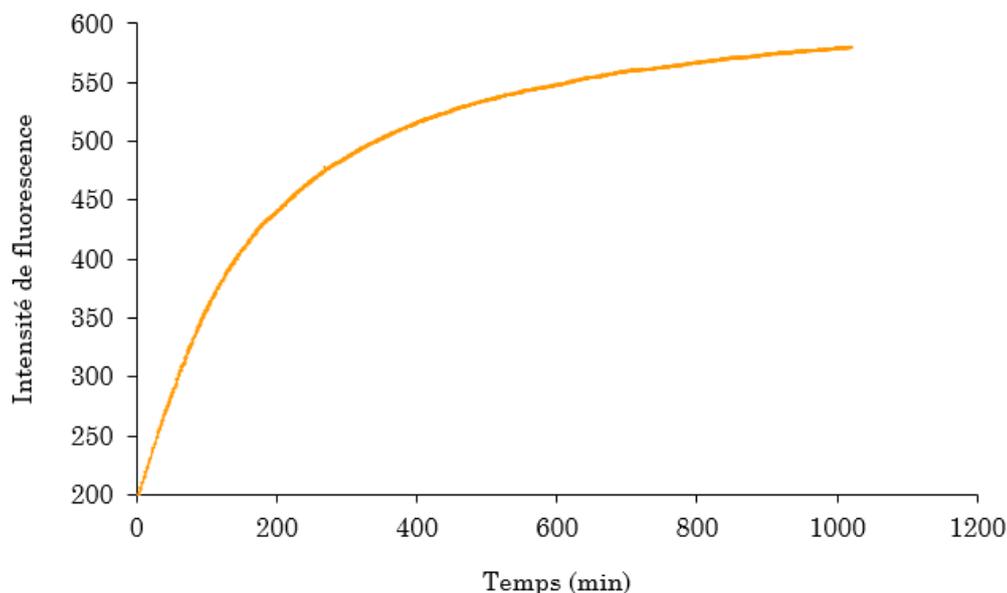


Figure 1915 - Evolution de l'intensité de fluorescence d'une solution de liposomes encapsulant de l'acridine orange au cours du temps,  $\lambda_{ex}=460$  nm ;  $\lambda_{em}=530$  nm.

L'intensité d'émission augmente de manière linéaire jusqu'à 2h30 puis vers un plateau. Cette courbe peut être interprétée comme étant le profil cinétique du relargage de l'AO montrant que la diffusion est d'abord rapide puis plus lente jusqu'à atteindre un équilibre. En ce qui concerne les VHs, cette manipulation a aussi été effectuée mais il y a eu formation d'un précipité orange lors de la préparation des échantillons. Ces derniers ont quand même subi le traitement de lavage sur PD10 et leur intensité de fluorescence a été suivie durant 18 h. Les résultats obtenus montrent que l'intensité d'émission était très faible et ne montrait aucune évolution au cours du temps. Une hypothèse est qu'une grande partie de l'AO précipite lors de la préparation des échantillons, ne permettant pas une encapsulation efficace. Afin d'élucider les causes de la précipitation de l'AO, ont été effectués. La seule différence entre la formation de Ls et de VHs est la présence du co-polymère dibloc PBD<sub>22</sub>-PEO<sub>14</sub> en rapport 50/50 avec le POPC. Un test consistant à ajouter une solution d'AO à une solution de vésicules hybrides préalablement formés dans du tampon phosphate a été réalisé. La précipitation de l'AO est toujours observée et conduit à la conclusion que la présence du PBD<sub>22</sub>-PEO<sub>14</sub> induit la précipitation de ce fluorophore.

# IX. Surexpression et purification de l'OmpF

---

Afin de modifier le transport à travers les différents types de membrane, la protéine transmembranaire OmpF a été choisie pour y être intégrée. Cette protéine a été largement étudiée dans la littérature et constitue un modèle de protéine transmembranaire en tonneau  $\beta$ . Elle est aussi connue pour sa stabilité structurale et fonctionnelle.

## IX.a. Principe

L'OmpF étant naturellement produite par *E. coli*, il est plus aisé de surexprimer cette dernière directement en membrane de la bactérie. La souche bactérienne *E. coli* BL21 DE3 omp8 est choisie car elle permet de ne produire aucune protéine membranaire à l'exception de la protéine d'intérêt. L'utilisation de cette souche modifiée permet ainsi de faciliter la purification et d'obtenir des échantillons plus purs. Après transformation de cette souche par l'implémentation d'un plasmide pOmpF codant pour OmpF, seule cette protéine membranaire est produite.

Une culture est alors effectuée dans un milieu TB (*Terrific Broth*), apportant les nutriments nécessaires à la prolifération bactérienne. A ce milieu est ajouté de l'ampicilline afin d'empêcher la croissance de bactéries dans lesquelles le plasmide n'a pas été intégré.

Lorsqu'il n'y a pas d'autres apports en nutriments que le milieu initial, la croissance bactérienne comporte plusieurs phases. Ces dernières sont entre autres caractérisées par la quantité de bactéries dispersées dans le milieu de culture. Une indication de cette quantité, décrite par la turbidité, peut être obtenue en mesurant la densité optique (D.O.) à 600 nm.

Pendant la première phase, les bactéries utilisent les nutriments pour répliquer le matériel nécessaire à la division cellulaire (protéines, ADN, etc.). La deuxième phase correspond à la croissance exponentielle de la population bactérienne jusqu'à atteindre un plateau correspondant à la troisième phase. A ce stade, la quantité de nutriments présente permet de maintenir un rapport

équivalentent entre le nombre de bactéries qui meurent et qui se divisent. Enfin, lorsque la quantité de nutriments arrive en-deçà d'un certain seuil, le taux de mort bactérienne augmente et la D.O. diminue.

Il est alors impératif d'induire la production de protéine lors de la deuxième phase, en ajoutant de l'isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG), lorsque la densité optique se situe entre 0.5 et 0.8. Après la période d'induction de la protéine, les cellules bactériennes sont centrifugées, le culot est lysé mécaniquement et la protéine se trouve alors dans les débris de membrane bactérienne. Le protocole mis en place est alors composé de différentes étapes de centrifugation et de dispersion dans des tampons phosphate contenant de l'OG à différentes concentrations. L'OG est un détergent fortement utilisé dans la purification de protéine membranaire grâce à sa grande CMC ( $> 0.7\%$  ( $w/v$ )). Cette caractéristique permet l'insertion d'une grande quantité de molécules d'OG dans les membranes bactériennes jusqu'à leur rupture. Il se forme alors des micelles mixtes composées de lipides (provenant de la membrane), de protéines et d'OG. Lorsque la quantité d'OG augmente, jusqu'à la CMC, les lipides sont éliminés et seules les protéines restent dans les micelles d'OG.

Lors de la première étape, le culot est dispersé dans un tampon phosphate contenant de la DNase I et de la RNase A pour fluidifier la solution en détruisant les brins d'ADN et d'ARN. La solution est centrifugée pour éliminer les composés solubles tels que les protéines non membranaires, les débris d'ADN et d'ARN. Ensuite, le culot est suspendu dans un tampon phosphate contenant de l'OG à une concentration inférieure à sa CMC afin de former des micelles mixtes lipides/OG/protéine puis centrifugé. Le culot est alors dispersé dans une solution tampon phosphate contenant de l'OG à une concentration supérieure à sa CMC pour en extraire la protéine. Cette dernière est finalement solubilisée par des micelles d'OG.

### IX.b. Résultats

Afin de vérifier l'efficacité de la méthode, la pureté de l'échantillon protéique est vérifiée par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) (Fig. 20). Ce procédé permet la séparation

## Partie 3 – Résultats

des protéines en fonction de leur taille et ainsi que la vérification du contenu protéique de l'échantillon. L'analyse se porte alors sur l'échantillon protéique gardé à 4 °C et un échantillon protéique chauffé à 95 °C durant 5 minutes.

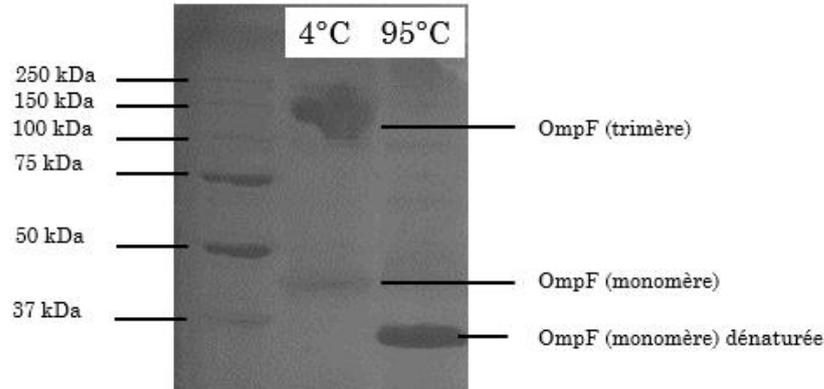


Figure 20 - Gel SDS (12%) de l'OmpF conservée au frigo et chauffée à 95 °C durant 5 minutes.

Concernant l'échantillon gardé à 4 °C, deux bandes sont observées : une première se situe entre 37 et 50 kDa alors que la deuxième est retrouvée aux alentours de 150 kDa. Sous sa forme native, l'OmpF forme un trimère (120 kDa), correspondant à la bande autour de 150 kDa. La bande entre 37 et 50 kDa quant à elle correspondrait à l'OmpF sous sa forme monomérique (40 kDa). Pour s'assurer que les deux bandes correspondent à la même protéine, l'échantillon protéique a été chauffé à 95 °C (Fig. 20). Il apparaît alors que les deux bandes disparaissent au profit de l'apparition d'une bande légèrement en dessous de 37 kDa. Ce phénomène est connu sous le nom de mobilité thermo-dépendante et est propre aux protéines sous forme de tonneau  $\beta$ . En effet, la dénaturation d'OmpF due à la température induit une diminution du volume moléculaire et ainsi qu'une augmentation de la mobilité au sein du gel SDS-PAGE. Il peut donc être affirmé que les deux bandes observées sur le gel correspondent bien à l'OmpF, l'une à la forme trimérique et l'autre à la forme monomérique.

Aussi, la présence d'OmpF sous forme de trimère met en lumière le fait que cette protéine est résistante à la dénaturation par le SDS, ce qui est caractéristique des protéines avec des structures similaires.

Des différences existent entre la masse moléculaire renseignée dans la littérature et celle observée sur le gel. En effet, les protéines en tonneau  $\beta$  sont

## Partie 3 – Résultats

---

connues pour exhiber une mobilité différente de celle des protéines globulaires. Pour une même masse moléculaire, les protéines en tonneau  $\beta$  sont généralement plus volumineuses que les protéines globulaires et migreront moins loin dans le gel SDS, ce dernier séparant les protéines en fonction de leur volume moléculaire. L'hypothèse est donc que la première bande correspond à la masse moléculaire de l'OmpF sous forme trimérique (120 kDa) et la deuxième correspond à la masse moléculaire de l'OmpF sous forme de monomère (40 kDa).

Lorsque la pureté de l'échantillon est confirmée, il est possible d'en déterminer la concentration en protéines via des mesures UV et en appliquant la loi de Beer-Lambert (éq 2).

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C \quad (2)$$

Où  $A$  est l'absorbance,  $l$  est la longueur du trajet optique (cm),  $\varepsilon$  le coefficient d'extinction molaire en  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$  et  $C$  est la concentration en  $M$

Pour ce faire, il est considéré que la forme trimérique est la seule présente en solution permettant d'utiliser le coefficient d'extinction molaire calculé de l'OmpF sur base de sa séquence en acides aminés ( $\varepsilon_{OmpF \text{ trimère}, 280 \text{ nm}} = 177742 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ). La concentration en OmpF a été évaluée comme valant  $63 \mu M$  ( $2.3 \text{ mg} \cdot mL^{-1}$ ). Le rendement de la production de l'OmpF après purification est donc d'environ  $0.09 \text{ mg}$  de protéines par millilitre de culture bactérienne.

Ensuite, la structure de l'OmpF dans des micelles d'OG a été caractérisée en utilisant la spectroscopie CD. La figure 21 montre une bande positive au-dessus de  $200 \text{ nm}$  et négative centrée à  $222 \text{ nm}$ , ce qui est un signal typique de protéine riche en feuilletts  $\beta$  antiparallèles comme c'est le cas pour l'OmpF. Ceci permet d'affirmer que l'OmpF est bien sous forme de tonneau  $\beta$ .

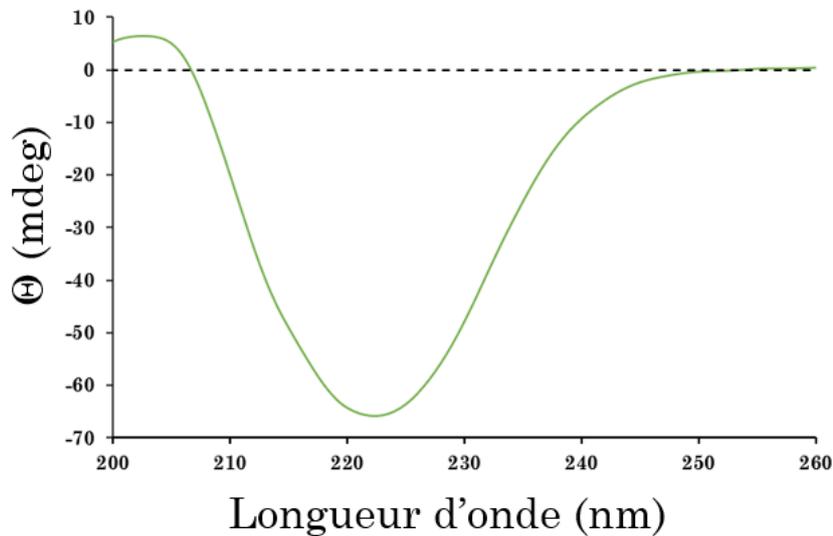


Figure 21 - Spectre CD de l'OmpF dans un tampon phosphate 20 mM, pH 7.4 et 3 % OG.

## X. Intégration de l'OmpF dans les systèmes vésiculaires

### X.a. Principe

Afin d'insérer l'OmpF dans la membrane des différentes vésicules, il est d'usage de d'abord la déstabiliser en utilisant un détergent, généralement le Triton X-100 (Fig 22).

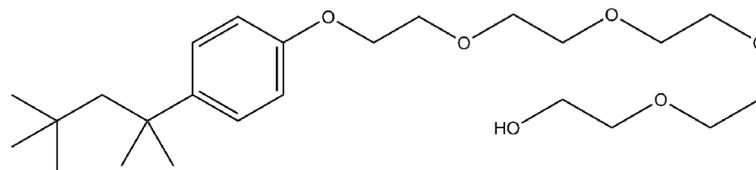


Figure 22 - Structure moléculaire du Triton X-100.

Les molécules de détergent s'insèrent dans la membrane, provoquant des défauts dans l'assemblage des lipides ou des molécules de polymères et la fragilisent. La solution protéique est alors ajoutée pour obtenir un rapport massique lipide/protéine 10/1 et la solution finale est mise sous incubation. Enfin le détergent est éliminé des membranes à l'aide de billes adsorbantes. Concernant les liposomes, il a été montré que l'insertion de protéines membranaires pouvait être réalisée sans déstabiliser les membranes.

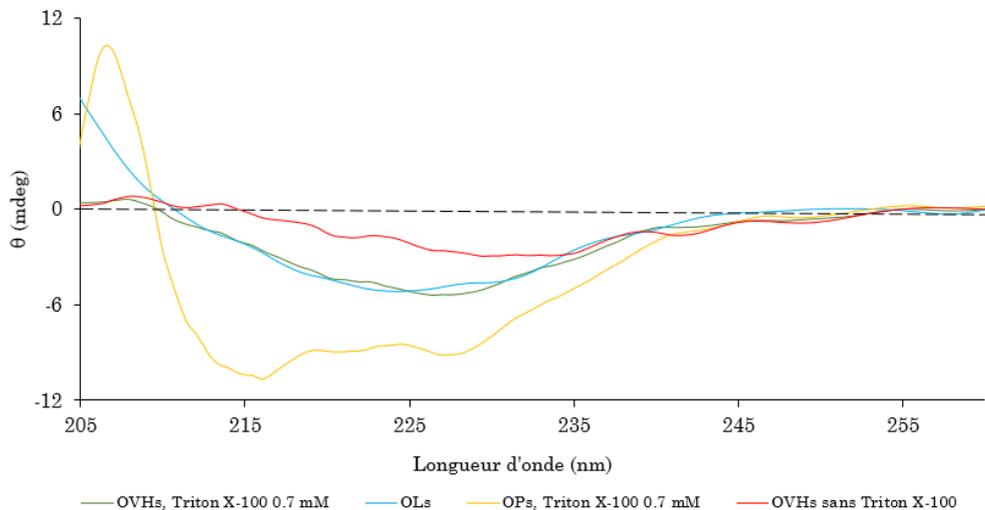
## X.b. Résultats

Les différents types de vésicules (Ls, VHs et Ps) ont été formés en appliquant le protocole de réhydratation du film et ont été utilisées pour former des protéovésicules (OLs, OVHs et OPs). L'insertion d'OmpF au sein des vésicules hybrides sans utiliser de Triton X-100 (TX-100) est aussi effectuée afin d'en vérifier l'utilité. Le tableau suivant regroupe les rayons hydrodynamiques moyens ( $\overline{D_h}$ ) obtenus pour les différents systèmes vésiculaires.

Tableau 2 - Rayons hydrodynamiques moyens ( $\overline{D_h}$ ) mesurés par DLS des différentes vésicules et protéovésicules formées.

Type de vésicules		Ls	OLs	VHs	OVHs avec TX-100	OVHs sans TX-100	Ps	OPs
$\overline{D_h}$ (nm)	Batch 1	163±5	128±2	132±2			158±3	151±2
	Batch 2	167±2	133±3	107±2	89±3	91±2		

Concernant les liposomes et les vésicules hybrides avec TX-100, les spectres CD montrent respectivement une bande positive centrée sur 205 nm et 210 nm ainsi qu'une bande négative centrée sur 225 nm (Fig. 23). Le signal observé est typique des protéines riches en feuillet  $\beta$  et est semblable au spectre observé pour l'OmpF solubilisée dans des micelles d'OG. Ceci supporte l'hypothèse que l'OmpF est bien insérée dans les membranes lipidique et hybride.



**Figure 23 - Spectres CD des OLs (noir), OVHs avec 0.7 mM Triton X-100 (vert), OVHs sans Triton X-100 (rouge) et OPs (jaune).**

Dans ces deux spectres la bande négative est centrée sur une valeur différente que pour l'OmpF solubilisée dans des micelles d'OG, ce qui est principalement dû au changement d'environnement de l'OmpF et donc à des modifications de structures secondaires. Les différences observées dans les spectres OVHs avec et sans TX-100 indiquent que l'insertion de l'OmpF dans des membranes hybrides POPC/PBD<sub>22</sub>-PEO<sub>14</sub> 50/50 n'est pas possible sans déstabilisation préalable. En effet, le spectre CD des OVHs sans Triton X-100 ne présente pas de bandes caractéristiques des feuillets  $\beta$ , ce qui peut être dû à l'agrégation de l'OmpF.

Dans le cas des polymersomes on observe une bande positive autour de 210 nm ainsi que deux bandes négatives : une centrée sur 215 et 228 nm, ce qui est typiques des structures secondaires de type hélice  $\alpha$ . Ceci semble correspondre à un mélange d'hélice  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$ . L'OmpF étant un tonneau  $\beta$ , ceci indique que l'OmpF ne s'est pas intégrée dans la membrane. En effet, les polymersomes étant plus stables que les vésicules hybrides, il est possible que la concentration en Triton X-100 soit suffisante pour intégrer OmpF dans ces dernières mais pas dans les polymersomes.

## Partie 3 – Résultats

Dans le cas des OLs, des images TEM ont aussi été obtenues (Fig. 24).

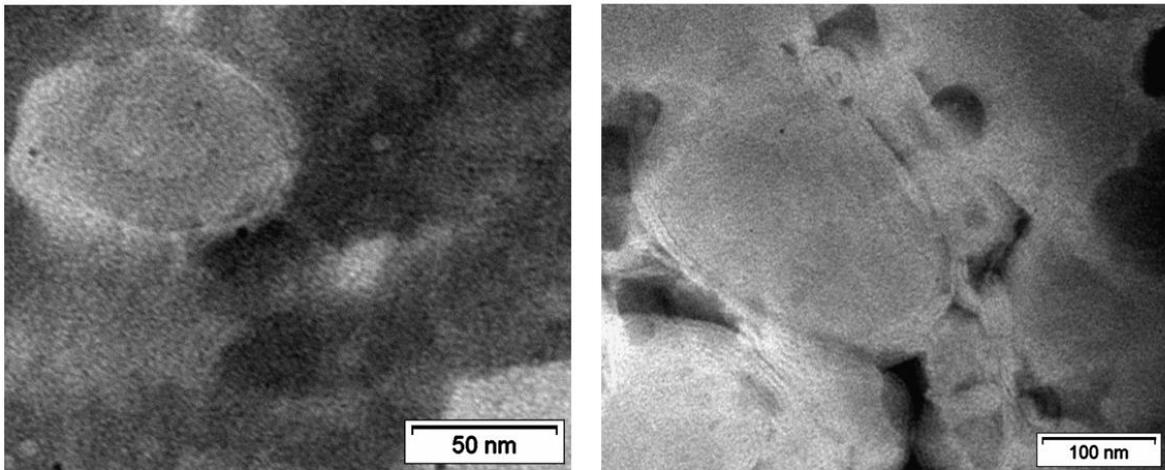


Figure 24 - Micrographies TEM de OLs.

Sur ces images, les points noirs correspondent aux protéines. Et montre la présence d'OmpF à la surface des liposomes.

Afin de de sonder le transport à travers les OLs le même protocole que pour les liposomes a été effectué mais la précipitation de l'AO a été observé. Une solution protéique contenant de l'OG (3 % (*w/v*)) est ajoutée à une solution de liposomes, pour une concentration finale en OG de 0.29 % (*w/v*). Ainsi, le premier test a consisté en la préparation d'une solution d'AO (à la même concentration que tampon d'hydratation) contenant de l'OG à 0.29 % (*w/v*). Dans ce cas, une précipitation a été également observée. Il peut alors être conclu que, lors de la formation de OLs, la présence d'OG induit la précipitation de l'AO, ce qui entrave son encapsulation.

## Partie 4 - Conclusions et perspectives

### XI. Conclusions

---

L'objectif de ce travail s'insérait dans un projet général consistant à contrôler la stabilité et la perméabilité de vésicules lipidiques en vue de les utiliser comme plateformes pour produire des nanoréacteurs bio-inspirés. La méthode choisie a consisté en l'ajout de molécules polymériques amphiphiles (PBD<sub>22</sub>-PEO<sub>14</sub>) pour améliorer la stabilité et d'une protéine transmembranaire modèle (OmpF) pour augmenter le transport. A des fins comparatives, toutes les manipulations ont été effectuées avec des liposomes, des vésicules hybrides ainsi que les polymersomes.

La première étape a été de former les trois types de vésicules cités précédemment, ce qui a été réalisé en utilisant la méthode de réhydratation d'un film. Après analyse en DLS, il a été confirmé que les vésicules avaient bien été formées et avaient un diamètre hydrodynamique moyen de l'ordre de 160 nm pour les liposomes, 130 nm pour les vésicules hybrides et 160 nm pour les polymersomes.

En deuxième lieu, un test de perméabilité basé sur le phénomène d'auto-extinction de fluorescence de l'acridine orange (AO) a été mis en place. Il a donc fallu déterminer la concentration d'auto-extinction de fluorescence ( $C_{a-e}$ ) de l'AO en relevant le spectre d'émission ( $\lambda_{ex} = 430$  nm,  $\lambda_{ém} = 450$  nm) de solutions d'une concentration en AO allant de 1 à 0.01 mg/mL. La concentration  $C_{a-e}$  a été déterminée comme valant autant 0.2 mg/mL.

Afin d'étudier le transport de l'AO au travers de la membrane des différents types de vésicule, ces dernières ont été formées en encapsulant de l'AO avec une concentration supérieure à  $C_{a-e}$  lors de l'étape de réhydratation du film. En ce qui concerne les liposomes, il a été observé que le relargage était rapide durant les premières 2h30 et tendait par la suite vers un plateau correspondant à l'équilibre osmotique.

Afin de produire des vésicules intégrant la protéine membranaire OmpF, cette dernière a été produite par surexpression bactérienne dans une souche *E. coli* BL21 (DE3) omp8 pour faciliter les futures étapes de purification. Cette souche a subi une étape de transformation par implémentation d'un plasmide lui

permettant de produire l'OmpF. Après culture, induction, lyse et purification par centrifugations successives, l'OmpF a été obtenue, sous forme solubilisée dans des micelles d'OG, avec un rendement de 0.09 mg par millilitre de milieu de culture. Afin de confirmer le bon repliement de l'OmpF dans les micelles d'OG, une analyse par dichroïsme circulaire a été conduite et le spectre obtenu est typique d'une protéine riche en feuillets  $\beta$ . Il est donc conclu que l'OmpF a été purifiée avec succès et que sa structure tertiaire correspond bel et bien à un tonneau $\beta$ .

La solution d'OmpF a donc pu être utilisée pour produire des protéovésicules. Dans le cas des liposomes, il n'a pas été nécessaire de procéder à une étape de déstabilisation de la membrane comme c'est le cas pour les vésicules hybrides. Pour ces deux types de vésicules, la reconstitution de l'OmpF a été vérifiée en utilisant des analyses par spectroscopie CD. Les spectres obtenus sont proches de celui obtenu pour l'OmpF pure, indiquant la bonne insertion de cette dernière dans les deux types de membranes. Il est à noter que des effets bathochromes ont été observés et correspondent à des changements d'environnement de la protéine entre les micelles, la bicouche lipidique et la membrane des vésicules hybrides.

Similairement aux vésicules hybrides, la formation de protéopolymersomes a nécessité une étape de déstabilisation de la membrane. Après analyse par spectroscopie CD, il apparaît que le signal ne correspond pas à celui d'une protéine riche en feuillets  $\beta$ , indiquant que l'OmpF n'a pas été insérée dans la membrane polymérique.

## XII. Perspectives

---

Pour aller plus avant dans cette étude, il aurait été de circonstance d'étudier la perméabilité des différents systèmes en utilisant différents fluorophores pour éviter des interactions avec la membrane ou avec le détergent. Aussi, d'autres stratégies existent pour étudier le transport au sein de vésicules et pourraient être mises en place.

## Partie 4 – Conclusions et perspectives

---

Il aurait été intéressant de produire des vésicules hybrides de plusieurs compositions afin de déterminer si l'une ou l'autre permettrait une meilleure intégration de l'OmpF. Ces essais, couplés à une analyse de stabilité chimique vis-à-vis du Triton X-100 ou du dodécyl- $\beta$ -D-maltoside (DDM), qui est un détergent plus doux, auraient permis de déterminer quelle association aurait été la plus optimale quant à l'obtention du meilleur transport et de la meilleure stabilité chimique.

Il a été reporté dans la littérature que l'encapsulation de la glucose oxydase dans des liposomes résultait en la modification de sa cinétique enzymatique. Le même protocole appliqué aux vésicules hybrides et aux polymersomes permettrait de savoir si le type de vésicules a aussi un impact sur l'activité enzymatique. Il a aussi été montré que lorsque l'OmpF était intégrée dans les liposomes encapsulant de la GOX, cette dernière exhibait une plus grande vitesse de réaction. Ce protocole pourrait aussi être mis en place pour examiner l'influence des différents types de membranes.

## Partie 5 - Matériels et méthodes

### XIII Formation des vésicules

---

#### XIII.a. Réhydratation du film

Cette dernière consiste à dissoudre une quantité connue des composés amphiphiles dans du chloroforme, puis de le faire évaporer à l'aide d'un évaporateur rotatif (pompe à vide Vacuubrand™ PC 3001 VARIO et évaporateur rotatif Heidolph™ Laborata 4000 efficient). Les molécules amphiphiles vont alors se disposer de manière à former des bicouches, résultant en un fin film déposé dans le fond du contenant. Lorsqu'une solution tampon (de volume et composition connue) est ajoutée, le film subit un gonflement jusqu'à la formation de vésicules. A ce stade, les vésicules ont des tailles et des morphologies différentes (MLVs, MVVs, ULVs). Il est donc nécessaire de les calibrer en mettant en place plusieurs étapes.

La première, la sonication à 40 kHz pendant 45 secondes (dans un bain à ultrasons Ultrasonic cleaner DW-5200DTD), permet de faire un premier tri en détruisant les plus vésicules de grandes tailles (GUVs).

La deuxième étape permet de détruire les MVVs au profit des ULVs en effectuant 15 cycles de gel/dégel. Le contenant est alors plongé dans de l'azote liquide à -80 °C puis dans de l'eau à 85 °C.

La troisième étape, appelée extrusion permet d'obtenir des vésicules avec des diamètres semblables. L'on utilise alors une extrudeuse, dans laquelle sont placés deux filtres supports et un filtre en polycarbonate ayant une taille de pore connue afin de fixer le diamètre des vésicules. Dans le cadre de ce travail, tous les types de vésicules ont été préparés en utilisant un filtre de 200 nm. L'extrudeuse est rincée avec le même tampon ayant servi à l'hydratation du film puis les vésicules sont prélevés à la seringue (Hamilton™) avant d'effectuer 15 passages à travers le filtre.

### XIV. Evaluation de la perméabilité des vésicules

---

Des solutions d'AO sont préparées dans un tampon phosphate 20 mM à pH 7,4. Les concentrations en AO utilisées sont de : 1 mg.mL<sup>-1</sup>, 0.2 mg.mL<sup>-1</sup>, 0.1 mg.mL<sup>-1</sup>, 0.067 mg.mL<sup>-1</sup>, 0.050 mg.mL<sup>-1</sup>, 0.040 mg.mL<sup>-1</sup>, 0.020 mg.mL<sup>-1</sup>, 0.013 mg.mL<sup>-1</sup> et 0.125 mg.mL<sup>-1</sup>. Les mesures sont effectuées après excitation de l'AO à 460 nm alors que l'émission est mesurée à 530 nm.

L'encapsulation de l'AO au sein des différentes vésicules en appliquant le mode opératoire cite au point XIII.a. et en utilisant une solution d'AO 0.1 mg.mL<sup>-1</sup> dans un tampon phosphate 20 mM à pH 7,4 pour hydrater le film.

Avant d'effectuer les mesures permettant de caractériser la perméabilité, l'AO non-encapsulée doit être éliminée. Cette étape est réalisée par un passage de la suspension de vésicules à travers une colonne de dessalage (PD10, Healthcare) préalablement équilibrée avec un tampon phosphate 20 mM à pH 7,4.

La solution, nettoyée de l'AO non-encapsulée est alors transférée dans une cellule en quartz d'1 cm et le fluorophore est excité à 460 nm alors que l'émission est relevée à 530 nm durant 17 h.

### XV. Surexpression de l'OmpF

---

L'OmpF est surexprimée dans une souche bactérienne E. coli BL21 (DE3) Omp8 résistante à l'ampicilline, qui est connue pour ne pas produire de protéine membranaire. **Ajouter l'étape de transformation**

La préculture est faite dans 50 mL de TB avec 50 µL d'ampicilline 100 mg.mL<sup>-1</sup>. Cette solution est placée dans un incubateur à 37 °C durant 19 h, sous agitation à 175 tours/min. La culture est préparée par ajout de 2.5 mL de la préculture dans 200 mL de TB frais. La culture bactérienne est incubée durant 4h à 37 °C jusqu'à ce que la densité optique de la solution se situe entre 0.5 et 0.8 (mesurée à 600 nm).

La production de protéine est alors initiée par l'ajout de 200  $\mu$ L d'IPTG 1M. Après 4h d'incubation à 37 °C, la culture est centrifugée à 7000 g à 4 °C (Centrifugeuse Eppendorf™ 5804 R). Le culot bactérien est alors dispersé dans 5 mL d'une solution tampon Tris 50 mM à pH 7.4, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> et 1mM CaCl<sub>2</sub>. Les bactéries sont mécaniquement lysées en utilisant une tête de sonication.

## XVI. Purification de l'OmpF

---

### XVI.a. Purification

La suspension préalablement lysée est centrifugée (ultracentrifugeuse Beckman L7-65) à 50000 g et 4 °C durant 15 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé deux fois avec 3 mL de tampon phosphate 20 mM par centrifugation à 50000 g pendant 15 minutes à 4 °C. Le culot est ensuite suspendu dans une solution d'OG 0.125% dans un tampon phosphate 20 mM à pH 7.4, incubée pendant 1h à 37 °C et la solution est centrifuge à 50000 g à 4 °C pendant 40 minutes. Le surnageant est évacué et le culot est suspendu dans une solution d'OG 3% dans un tampon phosphate 20 mM à pH 7.4. Après une dernière centrifugation à 50000 g à 4 °C pendant 40 minutes l'OmpF se retrouve dans le surnageant, solubilisée par des micelles d'OG.

### XVI.b. Electrophorèse SDS-PAGE

Le gel utilisé est constitué de deux gels différents, coulés dans une cassette Novex® Life Technologies™ d'1 mm d'épaisseur.

Le premier est le gel de séparation (*running gel*) et est constitué d'un mélange de 12 % d'acrylamide, de Tris-HCL 0.375 M à pH 8.8, de SDS 0.1%, d'APS 0.5% et de TEMED. Ce dernier est coulé dans une cassette Novex Life Technologies™ d'1.0 mm jusqu'à remplir les trois quarts. Une couche d'éthanol 20% d'environ 1 cm est ajoutée et éliminée après 45 minutes.

Le deuxième gel (*stacking gel*) est coulé au-dessus du premier et est composé d'acrylamide 4%, de Tris-HCL 0.126 M à pH 6.8, de SDS 0.1%, d'APS 0.5% et de

TEMED. Un peigne permettant de former des puits pour les échantillons est placé sur le dessus du gel et enlevé juste avant l'utilisation

Les échantillons placés dans les puits sont préparés en mélangeant 10  $\mu\text{L}$  de la solution à analyser avec 10  $\mu\text{L}$  de tampon de charge (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 20 % glycérol, 2 % SDS, 0.02 % bleu de bromophénol, 0.07 M b-mercapto-éthanol). 10  $\mu\text{L}$  de ce mélange sont utilisés pour l'analyse dans les puits du gel.

La cassette est insérée dans une cellule d'électrophorèse Novex® Life Technologies™ XCell SureLock™ qui est alors remplie de tampon de migration (25 mM Tris-HCl, 3.4 mM glycine, 0.1 % SDS). Le peigne est enlevé délicatement et les échantillons y sont déposés. La migration est alors permise par l'application d'un potentiel électrique (200 V)

Lorsque la migration est terminée, le gel est coloré dans une solution de bleu de Coomassie (30 mM bleu de Coomassie R250, 11 M méthanol, 1.7 M acide acétique) durant 30 minutes, rincée à l'eau distillée puis décolorer avec une solution de décoloration (7.4 M méthanol, 1.7 M acide acétique) pendant 2 heures.

### XVI.c. Dosage protéique

La concentration en protéine est déterminée en utilisant le coefficient d'extinction calculé de l'OmpF sous forme de trimère ( $\epsilon_{\text{Trimère d'OmpF}, 280 \text{ nm}} = 177742 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) en appliquant la loi de Beer-Lambert. L'absorbance de la solution protéique est mesurée à l'aide un spectrophotomètre VWR UV-6300PC à une longueur d'onde de 280 nm en utilisant une cuvette en quartz donc le trajet optique est de 10 mm.

## XVII. Formation de protéovésicules

---

### XVII.a. Insertion de la protéine membranaire au sein de la membrane des vésicules

Dans le cas des liposomes, l'insertion de la protéine est effectuée en mélangeant une solution de liposomes avec la solution protéique purifiée pour

atteindre un rapport massique lipide/OmpF de 10 pour 1. La solution est alors incubée durant 4h à 20 °C sous agitation douce.

Pour ce qui est des VHs et des Ps, 0.7 mM d'un détergent (Triton X-100) est ajouté à la solution de vésicules. La solution est alors placée sous agitation durant 10 minutes à 20 °C. x  $\mu$ L La solution protéique est ajoutée et le mélange est incubé durant 40 minutes à 20 °C sous agitation douce.

L'incorporation de la protéine est alors induite par l'élimination du détergent. Cette étape est effectuée par plusieurs ajouts de billes de polystyrène (bio beads) permettant l'adsorption des détergents. Premièrement, 40 mg de bio beads sont ajoutés au mélange, qui est placé 30 minutes sous agitation douce à 20 °C. Deuxièmement, la solution est transférée dans un tube contenant 40 mg de bio beads et incubée durant 1h à 20 °C sous agitation douce. Troisièmement, la solution est transférée dans un tube contenant 100 mg de bio-beeds et mise sous incubation durant 15 h à 20 °C sous agitation douce. Enfin, les bio-beads sont éliminées.

### XVIII. Dichroïsme circulaire (CD)

---

La méthode utilisée pour caractériser l'OmpF est le dichroïsme circulaire. Pour la protéine pure, un échantillon protéique concentré à hauteur de 0.1 mg.Ml<sup>-1</sup> est introduit dans une cellule en quartz Suprazil (Hellma) d'1 mm de trajet optique. Ensuite, quatre spectres sont enregistrés par un spectropolarimètre MOS-500 à 20°C et moyennés (vitesse de balayage de 20 nm/min, largeur de fente de 0.5, pas de mesure de 0.1 nm et la constante de temps fixée à 2 s). Les mêmes paramètres sont utilisés lors de la caractérisation des protéovésicules mais la concentration en protéine est de 0.22 mg.Ml<sup>-1</sup>.

### XIX. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

---

Afin de vérifier la présence de vésicules dans les différents échantillons préparés, Les échantillons sont transférés dans des cellules Kartell™ STD en polyméthacrylate de méthyle (PMMA) ayant un trajet optique d'1 cm et 12

mesures par échantillons sont effectuées avec un spectrophotomètre Horiba Zetasizer SZ-100. Ces mesures sont moyennées afin d'obtenir le diamètre hydrodynamique moyen des particules en solutions.

## XX. Microscopie électronique à transmission

---

L'ensemble des manipulations décrites ci-contre sont réalisées sous la supervision d'un membre du service de microscopie électronique.

Les différentes vésicules préparées dans ce travail ont été analysés en TEM au moyen d'une coloration négative avec l'acide phosphotungstique (PTA) comme élément de contraste. Les différentes micrographies sont faites au moyen d'un microscope électronique à transmission FEITM G2 20 à filament de LaB6. Le potentiel d'accélération est de 120 kV. Les grilles d'analyses sont en cuivres recouvertes de carbones et de Formvar, le tout hydrophilisé au moyen de décharge lumineuse de plasma (Quorum Q150T E/S).

Les analyses sont faites sur un bout de Parafilm propre. 3 gouttes différentes doivent être déposées. La première (eau milliQ filtrée à 0.2  $\mu\text{m}$ ) afin de rincer le film, la seconde avec l'échantillon à analyser et la troisième avec l'agent contrastant (PTA 2% (v/v) pas sur dans eau milliQ pH 7.4) filtré à 0.2  $\mu\text{m}$ . Suite à l'hydrophilisation, la grille est rincée 5 fois à l'eau milliQ et déposée 10 minutes sur la goutte d'échantillon. L'excédent de solutions est retiré à l'aide de papier buvard et la grille est déposée sur l'agent contrastant pendant 1 minute. Enfin, la grille est laissée 15 minutes à l'air libre afin de sécher. La grille peut ensuite être analysée en TEM.

## Partie 6 - Bibliographie

### XVII. Bibliographie

---

1. Wu, G. *et al.* Recent advancement of bioinspired nanomaterials and their applications: A review. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **10**, (2022).
2. Lee, M.-K. Liposomes for Enhanced Bioavailability of Water-Insoluble Drugs: In Vivo Evidence and Recent Approaches. *Pharmaceutics* **12**, 264 (2020).
3. Kalepu, S. Liposomal drug delivery system - A Comprehensive Review. (2013).
4. Taylor, T. M., Davidson, P. M., Bruce, B. D. & Weiss, J. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **45**, 587–605 (2005).
5. Albanese, P., Mavelli, F. & Altamura, E. Light energy transduction in liposome-based artificial cells. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **11**, 1161730 (2023).
6. Kauscher, U., Holme, M. N., Björnmalm, M. & Stevens, M. M. Physical stimuli-responsive vesicles in drug delivery: Beyond liposomes and polymersomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **138**, 259–275 (2019).
7. Dufourc, E. J. Bicelles and nanodiscs for biophysical chemistry. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1863**, 183478 (2021).
8. van Meer, G., Voelker, D. R. & Feigenson, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 112–124 (2008).
9. Parisio, G., Sperotto, M. M. & Ferrarini, A. Flip-Flop of Steroids in Phospholipid Bilayers: Effects of the Chemical Structure on Transbilayer Diffusion. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 12198–12208 (2012).
10. Lombard, J. Once upon a time the cell membranes: 175 years of cell boundary research. *Biol. Direct* **9**, 32 (2014).

## Partie 6 – Bibliographie

---

11. Lee, M. J. & Yaffe, M. B. Protein Regulation in Signal Transduction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8**, a005918 (2016).
12. Guan, L. Structure and mechanism of membrane transporters. *Sci. Rep.* **12**, 13248 (2022).
13. Gamper, N. & Shapiro, M. S. Regulation of ion transport proteins by membrane phosphoinositides. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 921–934 (2007).
14. Navale, A. M. & Paranjape, A. N. Glucose transporters: physiological and pathological roles. *Biophys. Rev.* **8**, 5–9 (2016).
15. Albert Lehninger\_ David L. Nelson\_ Michael M. Cox - Lehninger Principles of Biochemistry (2012, W. H. Freeman) - libgen.li.pdf.
16. Dhakshnamoorthy, B., Ziervogel, B. K., Blachowicz, L. & Roux, B. A structural study of ion permeation in OmpF porin from anomalous X-ray diffraction and molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 10.1021/ja407783a (2013).
17. Koebnik, R., Locher, K. P. & Van Gelder, P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.* **37**, 239–253 (2000).
18. Geertsma, E. R., Groeneveld, M., Slotboom, D.-J. & Poolman, B. Quality control of overexpressed membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 5722–5727 (2008).
19. Scollo, F. *et al.* Phospholipids Critical Micellar Concentrations Trigger Different Mechanisms of Intrinsically Disordered Proteins Interaction with Model Membranes. *J. Phys. Chem. Lett.* **9**, 5125–5129 (2018).

## Partie 6 – Bibliographie

---

20. Stuart, M. & Boekema, E. Two distinct mechanisms of vesicle-to-micelle and micelle-to-vesicle transition are mediated by the packing parameter of phospholipid–detergent systems. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 2681–9 (2007).
21. Daraee, H., Etemadi, A., Kouhi, M., Alimirzalu, S. & Akbarzadeh, A. Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* **44**, 381–391 (2016).
22. Liu, P., Chen, G. & Zhang, J. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. *Molecules* **27**, 1372 (2022).
23. vyxeos-liposomal-epar-medicine-overview\_fr.pdf.
24. Sanders, M. R., Findlay, H. E. & Booth, P. J. Lipid bilayer composition modulates the unfolding free energy of a knotted  $\alpha$ -helical membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E1799–E1808 (2018).
25. Godoy-Hernandez, A. *et al.* Rapid and Highly Stable Membrane Reconstitution by LAiR Enables the Study of Physiological Integral Membrane Protein Functions. *ACS Cent. Sci.* **9**, 494–507 (2023).
26. Yue, K., Trung, T. N., Zhu, Y., Kaldenhoff, R. & Kai, L. Co-Translational Insertion of Aquaporins into Liposome for Functional Analysis via an *E. coli* Based Cell-Free Protein Synthesis System. *Cells* **8**, 1325 (2019).
27. Boban, Z., Mardešić, I., Subczynski, W. K. & Raguz, M. Giant Unilamellar Vesicle Electroformation: What to Use, What to Avoid, and How to Quantify the Results. *Membranes* **11**, 860 (2021).
28. Michelon, M., Oliveira, D. R. B., de Figueiredo Furtado, G., Gaziola de la Torre, L. & Cunha, R. L. High-throughput continuous production of liposomes

- using hydrodynamic flow-focusing microfluidic devices. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **156**, 349–357 (2017).
29. Zhang, H. Thin-Film Hydration Followed by Extrusion Method for Liposome Preparation. in *Liposomes* (ed. D'Souza, G. G. M.) vol. 1522 17–22 (Springer New York, 2017).
30. Grit, M. & Crommelin, D. J. A. Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. *Chem. Phys. Lipids* **64**, 3–18 (1993).
31. Grit, M., De Smidt, J. H., Struijke, A. & Crommelin, D. J. A. Hydrolysis of phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions. *Int. J. Pharm.* **50**, 1–6 (1989).
32. Karaz, S. & Senses, E. Liposomes Under Shear: Structure, Dynamics, and Drug Delivery Applications. *Adv. NanoBiomed Res.* **3**, 2200101 (2023).
33. Et-Thakafy, O. *et al.* Mechanical Properties of Membranes Composed of Gel-Phase or Fluid-Phase Phospholipids Probed on Liposomes by Atomic Force Spectroscopy. *Langmuir* **33**, 5117–5126 (2017).
34. Discher, B. M. *et al.* Polymersomes: Tough Vesicles Made from Diblock Copolymers. *Science* **284**, 1143–1146 (1999).
35. Moreno, S. *et al.* Light-Driven Proton Transfer for Cyclic and Temporal Switching of Enzymatic Nanoreactors. *Small* **16**, 2002135 (2020).
36. Fauquignon, M. *et al.* Large hybrid Polymer/Lipid Unilamellar vesicle (LHUV) at the nanoscale: An insight into the lipid distribution in the membrane and permeability control. *J. Colloid Interface Sci.* **604**, 575–583 (2021).

37. Kumar, M., Habel, J. E. O., Shen, Y., Meier, W. P. & Walz, T. High-Density Reconstitution of Functional Water Channels into Vesicular and Planar Block Copolymer Membranes. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 18631–18637 (2012).
38. Rideau, E., Dimova, R., Schwille, P., R. Wurm, F. & Landfester, K. Liposomes and polymersomes: a comparative review towards cell mimicking. *Chem. Soc. Rev.* **47**, 8572–8610 (2018).
39. Du, Y., Chen, W., Zheng, M., Meng, F. & Zhong, Z. pH-sensitive degradable chimaeric polymersomes for the intracellular release of doxorubicin hydrochloride. *Biomaterials* **33**, 7291–7299 (2012).
40. Nahire, R. *et al.* Multifunctional polymersomes for cytosolic delivery of gemcitabine and doxorubicin to cancer cells. *Biomaterials* **35**, 6482–6497 (2014).
41. Nam, J., Vanderlick, T. K. & Beales, P. A. Formation and dissolution of phospholipid domains with varying textures in hybrid lipo-polymersomes. *Soft Matter* **8**, 7982 (2012).
42. Chemin, M., Brun, P.-M., Lecommandoux, S., Sandre, O. & Le Meins, J.-F. Hybrid polymer/lipid vesicles: fine control of the lipid and polymer distribution in the binary membrane. *Soft Matter* **8**, 2867 (2012).
43. Nam, J., Beales, P. A. & Vanderlick, T. K. Giant Phospholipid/Block Copolymer Hybrid Vesicles: Mixing Behavior and Domain Formation. *Langmuir* **27**, 1–6 (2011).
44. Rottet, S. *et al.* Characterisation of Hybrid Polymersome Vesicles Containing the Efflux Pumps NaAtm1 or P-Glycoprotein. *Polymers* **12**, 1049 (2020).

## Partie 6 – Bibliographie

---

45. Pinisetty, D., Moldovan, D. & Devireddy, R. The Effect of Methanol on Lipid Bilayers: An Atomistic Investigation. *Ann. Biomed. Eng.* **34**, 1442–1451 (2006).
46. Ihle, S. *et al.* Nanocompartments with a pH release system based on an engineered OmpF channel protein. *Soft Matter* **7**, 532–539 (2011).