

Réorganisation des lipides des membranes par des peptides vecteurs d'internalisation cellulaire

Table des matières

Liste des abréviations	9
Introduction générale	11
Introduction	15
Chapitre 1	17
Membranes cellulaires	17
1. Les lipides membranaires	20
1.1 Diacylphosphoglycérides (phospholipides).....	20
1.2 Diacylglycoglycérides (glycolipides)	22
1.3 Sphingolipides	22
Sphingophospholipides	22
Sphingoglycolipides.....	23
1.4 Stérols.....	23
1.5 Composition lipidique des membranes : l'asymétrie.....	24
1.6 L'Hétérogénéité membranaire.....	27
2. Systèmes modèle des membranes biologiques	27
2.1 Liposomes.....	27
2.1.1 Vésicules multilamellaires (MLV)	28
2.1.2 Vésicules unilamellaires de petite taille (SUV).....	28
2.1.3 Vésicules unilamellaires de taille moyenne (LUV)	28
2.1.4 Vésicules géantes unilamellaires (GUV).....	29
3. Les géométries membranaires possibles	30
4. Fluidité membranaire	34
4.1 Fluidité et conformation des chaînes hydrocarbonées.....	36
5. Les phases lamellaires dans les membranes : gel, liquide et gel-ondulée	37
5.1 Phase lamellaire gel $L\beta$	39
5.2 Phases lamellaires liquides.....	39
5.3 Passage d'une phase gel à la phase liquide.....	40
5.4 Phase ondulée	40
6. Cholestérol	45
6.1 Cholestérol : influence sur l'organisation des phospholipides	46

6.2 Rôle du cholestérol dans la formation de phase liquide ordonnée au sein des membranes lipidiques	48
7. Nanodomains des membranes	49
7.1 Les domaines radeaux.....	50
7.2 Radeaux et pathologies.....	56
Références	56
Chapitre 2	63
Peptides pénétrants ou « Cell-Penetrating Peptides » (CPP)	63
1. Définition et classification.....	64
2. Les peptides dérivés de protéines	66
2.1 La pénétratine.....	66
2.2 Le peptide Tat.....	71
3. Les peptides chimères.....	72
3.1 Le transportan	72
3.2 Pep-1	74
4. Les peptides synthétiques.....	76
4.1 Les polyarginines et dérivés	76
4.2. Le peptide amphipatique modèle (MAP)	78
5. Les peptides antimicrobiens.....	79
6. Modes d'internalisation.....	79
6.1 Endocytose.....	82
Endocytose physique.....	87
6.2 Passage direct à travers la membrane plasmique.....	88
Formation de micelles inverses.....	88
Diffusion adaptative à travers la membrane.....	89
Formation de pores	91
Perméabilisation par électroporation	94
Entrée de peptides par des microdomaines de membrane.....	94
Références	98
Résultats	109
Chapitre 3	111
Réarrangements membranaires induits par la pénétratine.....	111
1. Introduction	111
2. Augmentation de la compacité des lipides des membranes induite par la pénétratine : étude par fluorescence du Laurdan	117

3. La pénétратine favorise la transition vers la phase gel ondulée : étude par calorimétrie.....	120
4. Conclusion.....	123
Références	125
Chapitre 4	129
Utilisation de la sonde cholestérol-pyrène pour déterminer la distribution du cholestérol dans la membrane.....	129
1. Le cholestérol-pyrène comme sonde fluorescente.....	129
Comparaison du comportement spectral du cholestérol-pyrène après chauffage et refroidissement des membranes	133
Différences entre les membranes L_o et L_d	135
Détermination des longueurs d'onde spécifiques pour les membranes L_o et L_d	137
2. Comparaison des membranes de types L_o et L_d	142
3. L'environnement de la sonde cholestérol-pyrène dans des LUV PC et SM/Chol : étude par l'anisotropie	151
4. Distribution du cholestérol dans les membranes avec coexistence des domaines L_o - L_d	152
5. Comportement de la sonde pour le mélange ternaire avec ajout de céramide ...	155
Conclusion.....	157
Références	162
Chapitre 5	165
Les effets des peptides vecteurs sur l'organisation du cholestérol et internalisation des peptides dans différentes LUV	165
A. Effet des peptides sur la distribution du cholestérol-pyrène dans les membranes	166
1. Effet des peptides sur la distribution du cholestérol-pyrène dans les membranes désordonnées L_d (PC).....	166
2. Effet des peptides sur la distribution du cholestérol-pyrène dans les membranes ordonnées L_o (SM/Chol)	168
3. Effet des peptides sur la distribution du cholestérol-pyrène dans les membranes avec des domaines L_o et L_d (PC/SM/Chol).....	170
Conclusion.....	173
B. Mouvement du cholestérol-pyrène après l'ajout des peptides : étude par l'anisotropie.....	176
C. Internalisation des peptides dans les LUV	177
Conclusion.....	180

Références	185
Conclusion.....	187
Conclusions générales et perspectives	189
Réarrangements membranaires induits par la pénétratine	189
Le cholestérol-pyrène comme sonde pour étudier la distribution du cholestérol dans la membrane.....	191
Pénétration des peptides pénétrants dans des LUV et leur effet sur l'organisation du cholestérol-pyrène dans les membranes.....	193
Notre compréhension de l'internalisation de certains CPP	195
Références	197
Matériels et Méthodes	201
Matériels et Méthodes	203
1. Préparation des membranes	203
1.1. Vésicules multi-lamellaires pour la calorimétrie.....	203
1.2. Vésicules unilamellaires pour la spectroscopie de fluorescence.....	204
2. Spectroscopie de fluorescence	205
2.1. Généralités.....	205
2.1.1. Les paramètres physiques liés au processus de fluorescence	206
2.1.2. Effet de l'environnement :	206
2.1.3. Extinction de fluorescence	207
2.2. Les fluorophores	208
2.2.1. Définition	208
2.2.2. La sonde Laurdan.....	208
2.2.3. Le Cholestérol-Pyrène	209
2.2.3. La sonde fluorescente NBD	216
2.3. La fluorescence comme outil d'investigation de la fluidité et de l'ordre membranaire	217
2.3.1. Par fluorescence de la sonde Laurdan	217
2.3.2. Par fluorescence polarisée :	218
2.4. Mise en œuvre des techniques de spectroscopie de fluorescence :	220
2.4.1. Matériel utilisé :	220
2.4.2. Détails de l'expérience de fluorescence du Laurdan.....	221
2.4.3. Détails de l'expérience avec le Cholestérol-Pyrène	222
2.4.4. Internalisation des peptides dans des LUV	223
3. Diffraction des rayons-X.....	224
3.1. Introduction.....	224
3.2. Détails des expériences.....	225

4. Calorimétrie différentielle.....	226
4.1. Généralités.....	226
4.2. Détails de l'expérience	227
6. Analyse statistique multivariée	228
Références	230
Annexes	235
ANNEXE A : La spectroscopie de fluorescence	237
A.1. Généralités.....	237
A.2. Le rendement quantique de fluorescence.....	240
A.3. L'intensité de fluorescence	242
A.4. La durée de vie de fluorescence	242
ANNEXE B : Diffraction des rayons-X.....	243
1. Éléments théoriques de la diffusion des rayons X.....	243
2. Les méthodes particulières d'analyse	245
2.1. Analyse par diffusion aux grands angles d'un solide partiellement ordonné (WAXD) :	245
2.2. Diffusion centrale des rayons X.....	246
2.3. La présentation des résultats	247
ANNEXE C :.....	249
Différentes sondes utilisées dans la littérature pour l'étude du cholestérol dans la membrane	249
ANNEXE D : Anisotropie.....	250
ANNEXE E :.....	251
ANNEXE F :.....	261

Liste des abréviations

AFM : Microscopie à force atomique	Exc : Assemblage de Py-met-Chol, excimères
AGI : Acides gras insaturés	GAG : Glycosaminoglycanes
AGS : Acides gras saturés	GFP : Protéine fluorescente verte
Ala : Alanine	Gln : Glutamine
ANP : Acides nucléiques peptidiques	Gly : Glycine
Arg : Arginine	GPI : Glycosylphosphatidylinositol
Asn: Asparagine	GPI : Glycosylphosphatidylinositol
ATP: Adénosine triphosphate	GPMV : Vésicules géantes de membrane plasmique
Chol: Cholestérol	GUV: <i>Giant Unilamellar Vesicle</i> (vésicule unilamellaire géant)
CK2 : Caséine kinase 2	HDL: <i>High Density Lipoprotein</i> (lipoprotéine de haute densité)
CL : Cardiolipine	His ou H: Histidine
CMC : Concentration micellaire critique	Ile : Isoleucine
CPP : <i>Cell Penetrating Peptides</i> (peptides vecteurs)	Iso : constant, point iso-émissive
CPyLd : Marqueur de la phase liquide désordonnée (Ld) (379 nm)	K : Lysine
CPyLo : Marqueur de la phase liquide ordonnée (Lo) (373 nm)	L _d : Phase liquide désordonnée
DMPC : 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine	LDL: <i>Low Density Lipoprotein</i> (lipoprotéine de basse densité)
DMPG : 1,2- dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycérol	Leu : Leucine
DOPC : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine	L _o : Phase liquide ordonnée
DOPS : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine	LUV : Large Unilamellar Vesicles Lys : Lysine
DPH : Diphénylhexatriène	Lβ: Phase lamellaire gel
DPPC : 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	MAP: <i>Model Amphipatic Peptide</i> (peptide modèle amphipathique)
DSPC : 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	Met: Methionine
	MLV : <i>Multi Lamellar Vesicle</i> (vésicule multilamellaire)

NZ : *Nucleation zones* (zones de nucléation)

P/L : Ratio molaire peptide/lipide

pAntP, Pen : pénétratine

PC : Phosphatidylcholine

PE : Phosphatidyléthanolamine

Pep-1: *Synthetic peptide carrier Pep-1*

PG: Phosphatidylglycérol

PI: Phosphatidylinositol

PMS: *Plasma membrane spheres* (spheres de membrane plasmique)

PS: Phosphatidylsérine

Pβ' : Phase ondulée

R : Arginine

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RPE : Résonance paramagnétique électronique

SAXD : Diffraction de rayons-X aux petits angles

SM: Sphingomyéline

SMoC: *Small-Molecule Carriers*

S_o: *Solid ordered*

SPT: *Single particle tracking*

SUV : *Small Unilamellar Vesicle* (vésicule unilamellaire petit)

T_m : température de transition de phase (transition de la phase gel vers la phase fluide)

TOF-SIMS : Spectroscopie de masse à ionisation secondaire

Tpre : température de pre-transition de phase (transition de la phase gel vers la phase ondulée)

Trp : Tryptophane

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

WAXD : Diffraction de rayons-X aux grands angles

Introduction générale

L'organisation des lipides de la membrane et leur interaction avec des peptides vecteurs est d'un grand intérêt pour la pharmacologie. L'objectif thérapeutique étant d'optimiser le passage à travers la membrane cellulaire de molécules bioactives associées aux peptides vecteurs d'internalisation cellulaire, nous cherchons à mieux comprendre les interactions entre les peptides et les membranes.

Les lipides membranaires sont impliqués dans plusieurs fonctions cellulaires comme la motilité cellulaire ou encore la régulation de l'activité de certaines protéines. Les membranes naturelles ont une organisation complexe et sont composées de très nombreuses molécules. Pour effectuer nos études, nous avons utilisé des membranes modèles qui miment certains aspects des membranes cellulaires et qui sont plus simples à appréhender : des vésicules uni-lamellaires ou multi-lamellaires.

Les CCP (*cell-penetrating peptides*) ont la capacité de traverser les membranes et d'atteindre l'intérieur de la cellule. Les premières études ont caractérisé les CPP comme des petits peptides, de moins de 30 résidus d'acides aminés, avec une capacité d'internalisation cellulaire indépendante de l'énergie et sans nécessiter de récepteurs. L'internalisation avait lieu même à 4°C et permettait de distribuer des cargos à l'intérieur de la cellule (Ü. Langel 2007). Ceci était basé sur le fait que les premières études concernant l'internalisation des CPP suggéraient qu'elle n'était pas empêchée par la réduction de la quantité d'ATP, la basse température, ou par des inhibiteurs d'endocytose (Ü. Langel 2007). De nombreuses modifications des séquences ont également montré leur capacité d'internalisation ce qui a suggéré que les récepteurs sélectifs à la surface des cellules ne sont pas impliqués dans l'internalisation. Tout cela a amené à penser que l'internalisation ne se faisait que par un mécanisme de transfert direct à travers la bicouche lipidique de la membrane. Ceci est toujours suggéré par le modèle d'internalisation par micelle inverse (Berlose et al. 1996) qui semblerait se produire pour plusieurs peptides tels que la pénétratine. Plus tard cette vision a évolué et les mécanismes d'entrée des peptides ont été réévalués. Aujourd'hui, un CPP peut être défini comme un peptide composé de 5 à 40 résidus d'acides aminés, avec

généralement des résidus basiques, capable de traverser la membrane cellulaire grâce à différents mécanismes, incluant l'endocytose, et de transporter un cargo bioactif lié de façon covalente ou non covalente. Des études récentes montrent que pour certains peptides, l'internalisation peut se faire par un mécanisme dépendant d'énergie impliquant une liaison avec l'héparane sulfate extracellulaire et par différents types d'endocytose comme la macropynocytose ou l'endocytose dépendante de la clathrine. De plus il semble que les mécanismes d'endocytose sont plus courants pour les CPP liés à un cargo que pour les CPP seuls (Sebastien Deshayes et al. 2004; Thorén et al. 2003; Troeira Henriques, Costa, and Castanho 2005). Depuis les travaux du groupe d'Alain Prochiantz en 1994, de nombreux peptides capables de traverser les membranes ont été découverts. On peut citer le peptide TAT, les peptides modèles amphipatiques, le transportan et la pénétratine. La pénétratine, que nous étudions dans un premier temps, est dérivée de la troisième hélice de l'homeodomaine de la protéine Antennapedia. Ce peptide a déjà permis de véhiculer des inhibiteurs d'interactions protéine-protéine ou de traduction d'ARN messager. Afin d'améliorer l'efficacité des peptides vecteurs, il est donc primordial de comprendre avec précision les interactions qui ont lieu avec les membranes.

Afin d'étudier l'interaction de la pénétratine avec des lipides, nous avons utilisé des membranes modèles qui peuvent se trouver dans différentes phases : liquide, gel-ondulée et gel. L'action du peptide sur la membrane induit des changements dans l'organisation et la dynamique des lipides. Ces changements sont caractérisés en combinant les résultats provenant de plusieurs expériences : diffraction de rayons-X aux petits (SAXD) et grands angles (WAXD), calorimétrie différentielle et spectroscopie de fluorescence. Le SAXD permet de mesurer l'épaisseur de la membrane, la calorimétrie d'observer les différentes températures de transition de phases membranaires et de voir si le peptide favorise ou non cette transition. Enfin, la fluorescence permet de déterminer l'effet du peptide sur la compacité membranaire.

Les membranes, très hétérogènes, présentent des domaines lipidiques enrichis en certains lipides et notamment en glycérophospholipides et en cholestérol. Ces domaines étant impliqués dans la signalisation et le trafic cellulaire, il est important de déterminer s'ils influent sur les modes d'action des peptides vecteurs. Le cholestérol, qui représente

30 à 50 % des lipides membranaires, a un rôle très important dans les membranes car il module certaines de leurs propriétés. Ainsi dans cette thèse, nous cherchons également à mettre en évidence les effets des peptides vecteurs sur l'organisation du cholestérol. La sonde fluorescente cholestérol-pyrène permet de déterminer la distribution du cholestérol dans les différents domaines de la membrane, en particulier dans les domaines appelés radeaux. Cette sonde est très miscible dans les membranes lipidiques et est structurellement très proche du cholestérol. On trouve, par exemple, ces domaines en radeaux dans les membranes plasmiques des cellules épithéliales. Il est très important de connaître l'organisation de la membrane après l'entrée en action du peptide vecteur. En effet, les radeaux agiraient comme des plateformes de signalisation pour permettre le recrutement des partenaires de part et d'autre de la membrane.

Nous avons trouvé des longueurs d'onde spécifiques pour caractériser le cholestérol-pyrène dans les domaines ordonnés et désordonnés de la membrane et, grâce à cela, nous avons étudié l'effet des différents peptides (pénétratine, R9 et RW9) sur la distribution du cholestérol.

En résumé, l'étude de l'hétérogénéité de l'organisation de la membrane au cours de l'interaction peptide/membrane a pour but d'améliorer à la fois la pénétration du peptide dans les cellules ainsi que sa spécificité pour un meilleur ciblage. La membrane biologique agit comme une barrière hydrophobe qui empêche le passage, par diffusion passive, de bon nombre de bio-polymères et de macromolécules, tant en thérapeutique comme en cosmétique. Afin d'envisager un transport plus efficace, il est primordial de définir avec précision les mécanismes d'action des peptides vecteurs. L'interaction peptide/membrane apparaît comme l'étape clé à partir de laquelle va se déclencher le reste du processus d'internalisation des molécules d'intérêt. Une meilleure compréhension de l'organisation de la membrane offrira donc la possibilité à des molécules d'intérêt de la franchir. Le potentiel pharmacologique de cette stratégie est très important car les champs d'application sont nombreux : thérapie génique et protéine thérapeutique notamment.

Introduction

Chapitre 1

Membranes cellulaires

Les membranes biologiques délimitent les cellules ainsi que les organites intracellulaires et les protègent de l'extérieur. Ainsi la membrane plasmique qui sépare les milieux intracellulaire et extracellulaire permet de maintenir des compositions chimiques différentes entre le cytosol et le milieu externe (Figure 1). Les membranes sont composées principalement de deux espèces moléculaires : les lipides et les protéines. Dans les membranes se trouvent également des glucides associés de manière covalente aux lipides et aux protéines sous forme de glycolipides et de glycoprotéines. Les lipides membranaires exercent un rôle primordial par leur capacité à former seuls, une structure en bicouche stable.

Les lipides constituant les membranes sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire possédant une partie polaire et une partie apolaire. En milieu aqueux, ils peuvent s'organiser en bicouche. Cette organisation en bicouche a été modélisée pour la première fois par Danielli et Davson en 1935 (Danielli and Davson 1935). Leur modèle proposait une membrane statique, avec une distribution de lipides symétrique, sans protéines intégrées à l'intérieur de la membrane. En 1960, Robertson établit que la membrane était effectivement composée d'une bicouche dont l'épaisseur était d'environ 75 angströms (Robertson 1960). Aujourd'hui, le modèle adopté est celui qui a été proposé par Singer et Nicolson (1972) (Singer and Nicolson 1972). Ce modèle, appelé modèle de la mosaïque fluide, apporte l'idée que les protéines peuvent être intégrales ou périphériques et qu'elles sont distribuées de manière asymétrique à la surface des membranes. Il apporte aussi la notion essentielle de fluidité membranaire en suggérant une diffusion permanente des protéines et des lipides au sein de la membrane. La structure en bicouche lipidique minimise les interactions entre les parties hydrophobes, donc apolaires, et les molécules d'eau. La partie apolaire est située au centre de la bicouche où l'eau n'a pas accès alors que la partie polaire est exposée au milieu aqueux

de part et d'autre de la bicouche. En se refermant sur elle-même, une structure en bicouche peut créer une vésicule. Celle-ci sépare un compartiment interne aqueux du milieu externe aqueux.

La membrane cellulaire a aussi pour rôle d'empêcher le libre passage de macromolécules d'un compartiment à un autre. La partie apolaire, située au centre de la bicouche, interdit presque toute diffusion d'ions inorganiques tels que les ions potassium, calcium, sodium et ralentit celle de petits solutés organiques polaires (sucres, acides aminés). Seuls certains solutés hydrophobes ont la possibilité de diffuser dans la bicouche, comme par exemple les hormones stéroïdes.

Les échanges entre les cellules et le milieu extracellulaire sont nécessaires à la survie de la cellule et ont donc lieu en permanence. Ils sont rendus possibles grâce à l'action de diverses protéines. On distingue deux grandes catégories de protéines membranaires : les protéines extrinsèques, dites également périphériques, et les intrinsèques ou intégrales.

Les protéines extrinsèques sont des chaînes polypeptidiques associées à la membrane par des interactions principalement électrostatiques avec les parties polaires des lipides. En contact avec le milieu aqueux, elles prennent part à des réactions ayant lieu à l'interface entre la membrane et les compartiments.

Les protéines intrinsèques sont associées à la membrane grâce à des interactions hydrophobes avec les parties apolaires des lipides. Certaines protéines peuvent être transmembranaires et ainsi accessibles des deux côtés de la membrane. Elles participent alors à des réactions qui s'effectuent de part et d'autre de la membrane et ont une fonction de transport de matière et/ou de transduction de signaux (Schechter 1990).

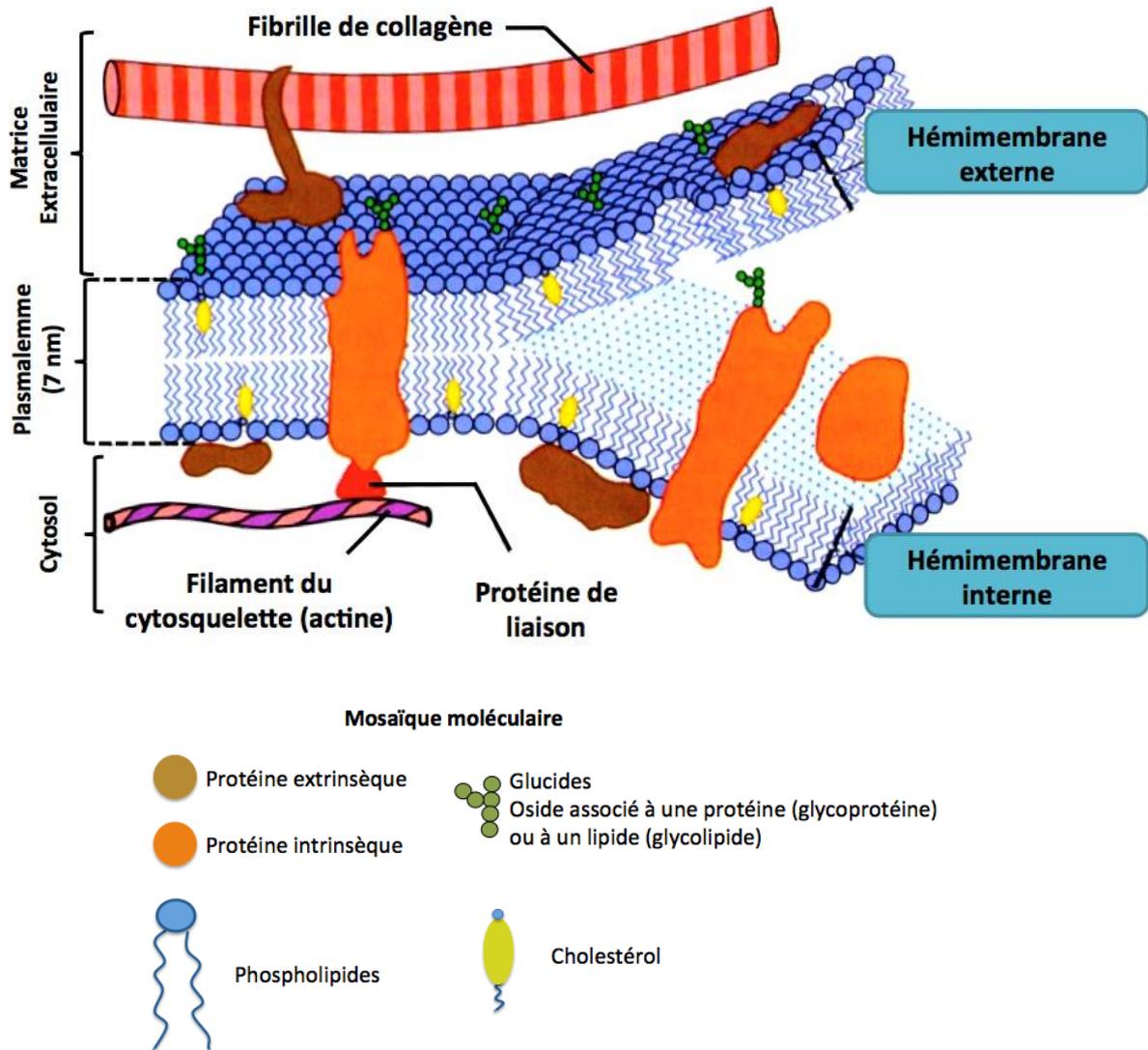


Figure 1. Le modèle de la mosaïque fluide (adaptée de (Singer and Nicolson 1972)).

C'est dans la membrane plasmique que se font les échanges entre les milieux extra et intra cellulaires, puisqu'elle les sépare. Le transfert de matériel est permis par des récepteurs, fixant des messagers extracellulaires comme des hormones, des neurotransmetteurs ou des facteurs de croissance. Le transfert de matière (solutés organiques, ions organiques) est effectué par des transporteurs et/ou des canaux ioniques. Les membranes sont également le lieu de production d'énergie, comme par exemple la membrane interne des mitochondries.

Transport de matière, transfert d'information et production d'énergie sont ainsi les trois fonctions principales des protéines membranaires.

La majorité des interactions entre les différents constituants d'une membrane (lipides, protéines) ne sont pas covalentes. Les interactions hydrophobes se matérialisent au centre de la membrane et les interactions polaires aux interfaces. Grand nombre d'interactions entre les constituants de la membrane sont dynamiques, et se font et se défont continuellement. Ce sont des interactions dynamiques car les liaisons physiques dans l'eau sont de l'ordre de quelques kT (où k est la constante de Boltzman et T la température absolue) ce qui entraîne beaucoup de fluctuations. La membrane a aussi un caractère dynamique dû aux mouvements propres des lipides et des protéines.

1. Les lipides membranaires

Le rôle principal des lipides est d'abord structural. Leur organisation en bicouche lipidique est à la base de la structure membranaire. Certains lipides ont également des propriétés fonctionnelles importantes et peuvent notamment avoir un rôle de seconds messagers intracellulaires, comme les phosphatidylinositols. Dans les sections suivantes nous présentons quelques-unes des différentes familles de lipides membranaires.

1.1 Diacylphosphoglycérides (phospholipides)

Les diacylphosphoglycérides, appelés généralement phospholipides, sont les lipides les plus répandus dans les membranes biologiques. La partie hydrophobe est formée d'acides gras associés au glycérol par des liaisons esters sur ses fonctions alcool en positions 1 et 2. Les têtes polaires des phospholipides contiennent un groupement glycérol estérifié par un acide phosphorique en position 3. Ce groupe acide phosphorique peut former une liaison avec différents groupements chimiques et ainsi participer à la formation de diverses têtes polaires.

C'est donc la nature du substituant fixé sur l'acide phosphorique qui détermine la nature du phosphoglycéride. L'acide phosphatidique est le phospholipide le plus simple dans lequel l'acide phosphorique n'est estérifié qu'une fois sur le glycérol. Il ne s'agit pas d'un

phospholipide membranaire mais d'un intermédiaire dans la biosynthèse d'autres phospholipides possédant un substituant sur l'acide phosphorique. Les plus fréquents sont : la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS), le phosphatidylglycérol (PG), et le phosphatidylinositol (PI) (Figure 2). La nature du substituant détermine la charge globale du phospholipide à pH physiologique.

Les phosphoglycérides sont tous des molécules amphiphiles possédant donc une partie apolaire et une partie polaire. La partie apolaire influe sur leur solubilité en la limitant très fortement dans l'eau. L'association des lipides induite par des interactions hydrophobes leur permet de limiter au maximum le contact des parties apolaires avec l'eau (Figure 1).

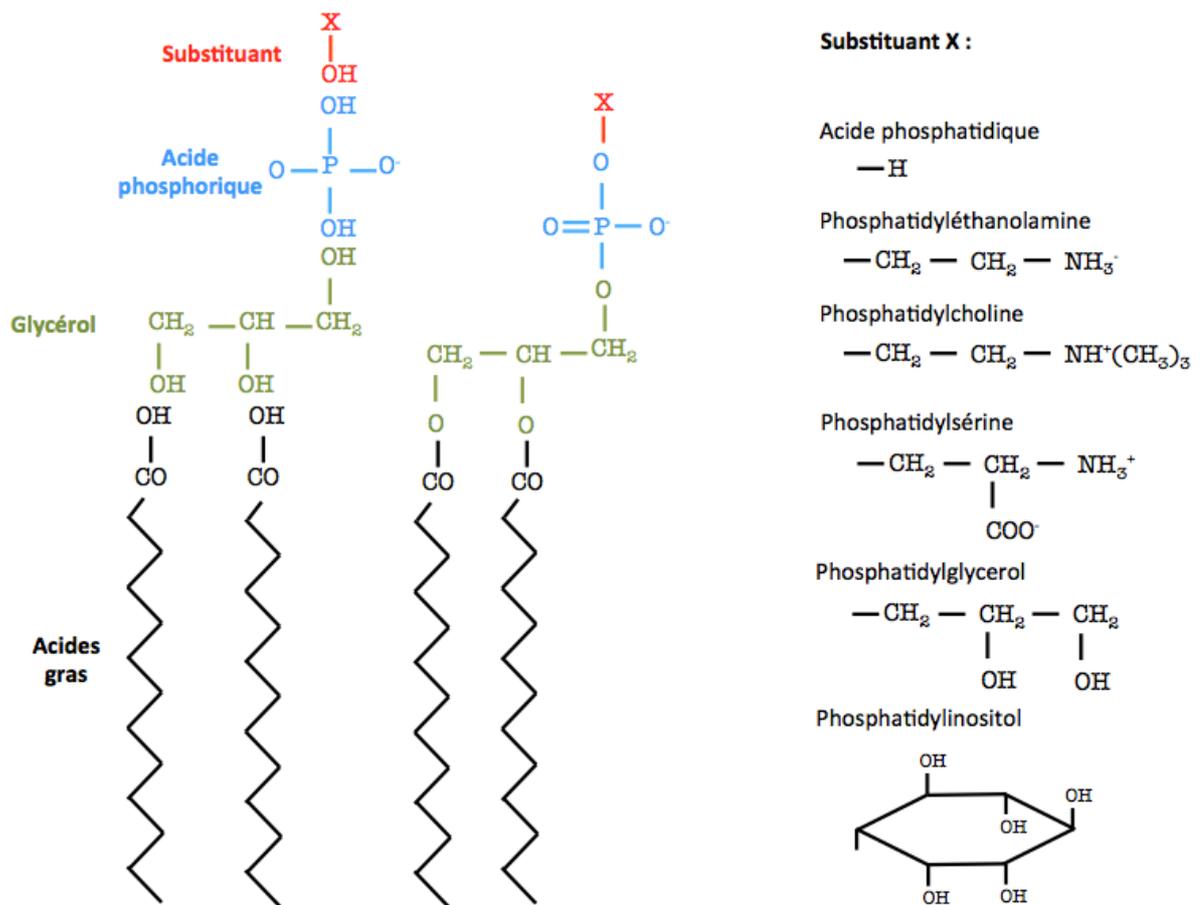


Figure 2. Structure chimique des diacylphosphoglycérolipides (Schechter 1990).

1.2 Diacylglycoglycérides (glycolipides)

Les diacylglycoglycérides dérivent également du glycérol. La liaison de la troisième fonction alcool du glycérol se fait avec des sucres tels que le galactose par une liaison glycosidique (Figure 3). La partie glycosidique donne à ces lipides amphiphiles un caractère d'autant plus polaire qu'elle est importante. Ces lipides sont rares dans le règne animal, mais sont présents dans les membranes photosynthétiques des plantes.

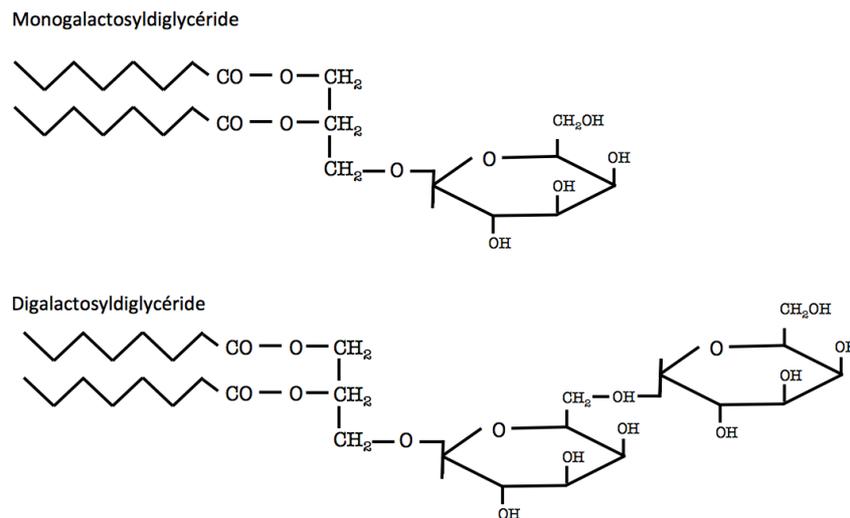


Figure 3. Formules de deux glycolipides (adaptée de Schechter 1990).

1.3 Sphingolipides

Le constituant de base des sphingolipides est la sphingosine (Figure 4) ou l'un de ses dérivés. L'amidification qui a lieu sur la fonction amine (NH_2) par un acide gras, dont la longueur et le degré d'insaturation sont variables, conduit au céramide. Ce dernier est à la base de tous les sphingolipides. Ils sont obtenus par l'addition d'un substituant sur la fonction alcool primaire du céramide. A l'instar des phosphoglycérades et des glycoglycérades, les sphingolipides sont des molécules amphiphiles.

Sphingophospholipides

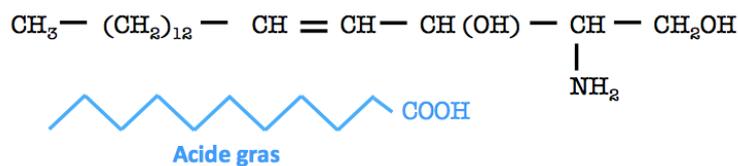
Les sphingophospholipides possèdent les mêmes types de parties polaires que les phospholipides. Ainsi, la sphingomyéline (SM) est un sphingophospholipide substitué sur l'alcool primaire du céramide par un groupement phosphorylcholine.

Sphingoglycolipides

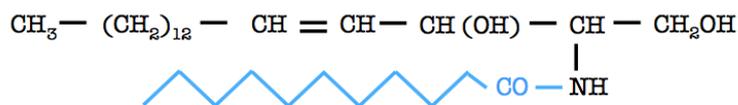
Les sphingoglycolipides sont des dérivés du céramide associés à des sucres grâce à une liaison glycosidique sur l'alcool primaire du céramide. Ces sucres peuvent être un simple monosaccharide ou des oligosaccharides. Certains possèdent des molécules d'acide sialique liées à la chaîne d'oligosaccharides.

Les sphingoglycolipides se situent essentiellement dans le feuillet externe des membranes plasmiques. Leur partie saccharide qui reste à l'extérieur de la cellule les implique dans de nombreuses fonctions de reconnaissance moléculaire. À titre d'exemple, les sphingoglycolipides des globules rouges sont responsables de la spécificité des groupes sanguins A, B, O. Certains virus se servent également de la partie saccharide comme d'un ancrage, préalable à l'infection de la cellule.

Sphingosine



Céramide



Sphingophospholipide

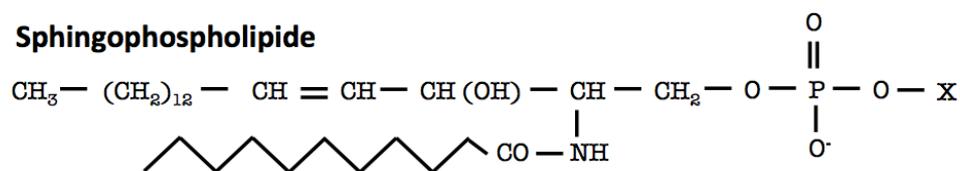


Figure 4. Formules de sphingolipides (adaptée de Schechter 1990).

1.4 Stérols

Les stérols, molécules plus compactes que les lipides vus précédemment, dérivent du perhydropentanophénantrène, un hydrocarbure tétracyclique.

Le cholestérol (Chol) (Figure 5) qui nous intéressera tout particulièrement dans ce travail, se retrouve principalement dans les membranes animales : les membranes plasmiques, lysosomiales, endosomiales et golgiennes. Il constitue environ 30 % de l'ensemble des lipides présents dans les membranes plasmiques. La partie polaire est constituée par le groupement alcool sur le carbone 3. Le cholestérol s'insère dans la bicouche en présentant son groupement alcool à l'interface avec le milieu aqueux.

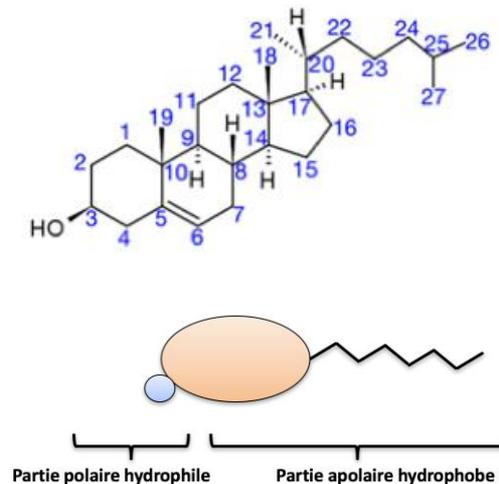


Figure 5. Molécule de cholestérol (adapté de (Sezgin et al. 2016)).

1.5 Composition lipidique des membranes : l'asymétrie

Dans de nombreuses membranes, on remarque une asymétrie de composition lipidique (Figure 6). L'asymétrie dans la distribution des lipides entre les deux monocouches de la membrane d'érythrocytes a été montrée par Bretscher en 1972. La monocouche interne est riche en phosphatidyléthanolamine et en phosphatidylsérine, cette dernière étant chargée négativement (Bretscher 1972; Bretscher MS 1972). La phosphatidylcholine et la sphingomyéline sont principalement situées sur la monocouche externe et sont électriquement neutres. L'asymétrie de composition lipidique induit donc une asymétrie de charge, qui participe au potentiel de repos de la membrane plasmique.

L'asymétrie de composition lipidique est accompagnée d'une asymétrie de composition des chaînes hydrocarbonées. La monocouche interne comporte davantage de lipides avec acides gras insaturés, la rendant plus fluide et plus souple, ce qui est important

pour les mouvements de la membrane cellulaire. La monocouche externe, avec la sphingomyéline, est la seule à posséder des motifs osidiques, qui sont des marqueurs cellulaires.

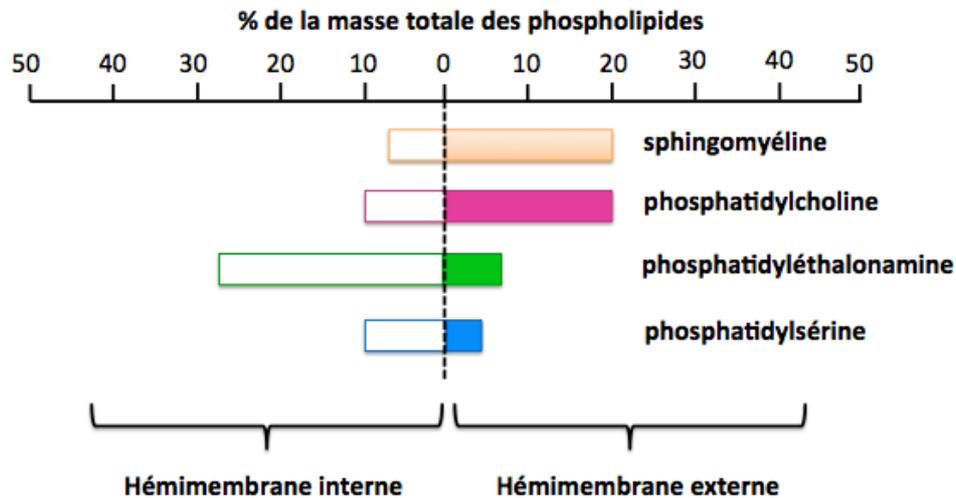


Figure 6. Asymétrie membranaire illustrée par la comparaison de la composition en phospholipides des deux héli-membranes d'un érythrocyte (Zachowski 1993).

La composition des membranes plasmiques diffère selon les organismes et le type cellulaire. Les lipides des membranes eucaryotes sont globalement zwitterioniques alors que ceux des membranes procaryotes sont anioniques. Par exemple, dans la membrane plasmique de la myéline (eucaryote) ou de l'érythrocyte, on retrouve les lipides suivants dans différentes proportions : PS, PE, SM, Chol et PC. Dans le cas de bactéries comme *E. coli* ou *S. aureus*, on ne retrouve aucun de ces lipides à l'exception de PE pour *E. Coli*, mais il y en a d'autres comme le PG et la cardiolipine (CL).

Le cholestérol, qui peut constituer jusqu'à 50 % en mole (en moyenne 30%) de tous les lipides des membranes eucaryotes, s'insère dans la bicouche lipidique avec son grand axe perpendiculaire au plan de la membrane. Le groupement alcool entre alors en interaction avec les parties polaires des têtes des lipides membranaires. Le noyau tétracyclique rigide interagit lui avec les chaînes hydrocarbonées. La courte chaîne hydrocarbonée du cholestérol se trouve à proximité du centre de la bicouche. Cette chaîne est plus flexible que la partie tétracyclique plane qui est rigide.

Les lipides membranaires ont la possibilité de passer d'une monocouche à l'autre grâce à une diffusion transversale également appelée « flip-flop ». La diffusion d'un lipide dans un sens s'accompagne le plus souvent de la diffusion d'un autre lipide dans l'autre sens, pour des raisons d'encombrement stérique dans la membrane (Figure 7). Cependant, ce passage est peu fréquent car la partie hydrophobe est alors exposée à l'eau et la partie hydrophile au cœur hydrophobe. Dans les cellules, le mouvement transversal des phospholipides est catalysé par des enzymes membranaires appelées translocases et nécessite généralement un apport d'énergie. Les « floppases » sont responsables du passage des lipides de la monocouche interne vers la monocouche externe alors que les « flippases » permettent le mouvement inverse (feuillet externe vers feuillet interne) (Daleke 2003). Il s'agit donc d'un transport actif.

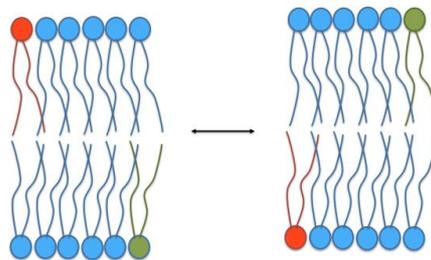


Figure 7. Diffusion transverse des lipides (adaptée de Shechter (Schechter 1990)).

La diffusion transversale des lipides est souvent très lente avec un temps caractéristique de l'ordre de 10⁵ secondes (Alberts et al. 2002). Le maintien de l'asymétrie est assuré par les translocases. Dans ces conditions, le temps de résidence d'un lipide sera plus important dans une hémimembrane que dans l'autre. De ce fait, l'asymétrie résulte en part d'un transport actif, un lipide particulier étant préférentiellement transporté d'une hémimembrane donnée où sa concentration est faible vers l'autre hémimembrane où sa concentration est plus élevée.

Au sein de chaque hémimembrane une diffusion latérale est aussi possible, qui est plus rapide, de l'ordre de 10⁻⁹ cm².s⁻¹. Elle a été mise en évidence dès 1970 (Frye and Edidin 1970). La vitesse de diffusion latérale va dépendre notamment de la température.

1.6 L'Hétérogénéité membranaire

La fluidité membranaire est fortement dépendante de la conformation des chaînes. Lorsqu'elles sont bien ordonnées, l'interaction entre les chaînes acyle est forte, les mouvements sont alors limités et la fluidité de la membrane est réduite. La membrane de type ordonnée est composée majoritairement de lipides à longues chaînes saturées. Inversement, un état plus désordonné s'accompagne d'une augmentation importante de la fluidité. Dans une membrane désordonnée, nous retrouvons plutôt des acides gras avec des chaînes insaturées.

2. Systèmes modèle des membranes biologiques

Les systèmes modèles membranaires sont essentiellement constitués de lipides.

2.1 Liposomes

Les liposomes sont des structures en bicouches lipidiques refermées sur elles-mêmes. Ils séparent un milieu aqueux intérieur d'un milieu aqueux extérieur. On distingue deux grands types de liposomes : les unilamellaires et les multilamellaires. Les multilamellaires sont appelés MLV (*Multi Lamellar Vesicles*). Il y a plusieurs catégories de liposomes unilamellaires classés selon leur taille : les SUV (*Small Unilamellar Vesicles*), les LUV (*Large Unilamellar Vesicles*) et les GUV (*Giant Unilamellar Vesicles*) qui sont représentés sur la Figure 8.

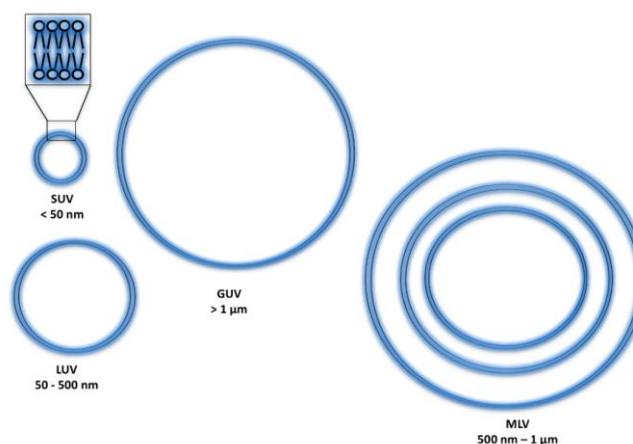


Figure 8. Liposomes unilamellaires et multilamellaires.

2.1.1 Vésicules multilamellaires (MLV)

La méthode pour les préparer consiste à évaporer le solvant organique dans lequel sont dissous les lipides, puis à les remettre en suspension dans un solvant aqueux en agitant. Il se forme alors des liposomes multilamellaires (MLV). Ils sont constitués d'un empilement concentrique de bicouches dont le diamètre varie de 500 nm à 1 μm (Figure 8).

Les MLV sont utilisées dans des expériences de calorimétrie, de RMN et de Diffraction des rayons X. En effet, à forte concentration, leur structure en multi-couches comprenant des distances répétitives constantes permet au faisceau de rayons-X de diffracter.

2.1.2 Vésicules unilamellaires de petite taille (SUV)

Un traitement physique des liposomes multilamellaires par ultrasons ou à pression élevée permet de former des vésicules de taille homogène constituées d'une seule bicouche lipidique. Ces vésicules (SUV) ont un diamètre inférieur à 50 nm.

Leur petite taille est avantageuse pour certaines mesures optiques car les artefacts liés à la diffusion de la lumière sont atténués. Ces vésicules sont donc utilisées pour la spectroscopie et notamment en dichroïsme circulaire.

Les SUV sont métastables et leur forte courbure peut perturber l'arrangement lipidique. Leurs propriétés mécaniques diffèrent de celles d'une membrane cellulaire.

2.1.3 Vésicules unilamellaires de taille moyenne (LUV)

Les LUV sont obtenues par « extrusion » d'une solution de MLV à travers un filtre de polycarbonate. Leur diamètre dépend du filtre utilisé. Pour obtenir des vésicules unilamellaires il faut, en général, les générer à un diamètre de 100 nm.

En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques et mécaniques, celles des LUV sont plus proches de celles des membranes biologiques (en particulier des endosomes et certaines vésicules de sécrétion) que les SUV car ces dernières, trop petites, ont une courbure trop importante entraînant une forte tension de surface. Les LUV ont des

rayons de courbure plus importants que les SUV et sont relativement stables dans le temps. Malgré une diffusion de la lumière plus importante, elles constituent un bon compromis pour mener des études en spectroscopie. Elles peuvent être aussi observées en microscopie électronique tout comme les SUV et les MLV.

2.1.4 Vésicules géantes unilamellaires (GUV)

Les vésicules géantes peuvent être préparées de différentes façons. Une méthode dite spontanée consiste à hydrater un film de lipides avec un tampon aqueux. Dans ce cas, de petites vésicules sont régulièrement présentes à l'intérieur des vésicules géantes formées. Une autre méthode, l'électroformation, consiste à hydrater un film de lipides séché au-dessus de la température de transition de la phase gel (voir partie 5) vers la phase fluide T_m (T_m : température en dessous de laquelle le lipide est en phase gel). Puis, on fait croître les GUV en utilisant un champ électrique. Par cette méthode d'électroformation, les vésicules géantes ne contiennent pas d'autres vésicules à l'intérieur.

La taille de ces vésicules est voisine de celle de cellules : entre 10 et 100 μm environ. Elles sont donc visualisables en microscopie optique (contraste de phase, fluorescence ou confocale). La première observation directe de domaines lipidiques fut faite avec des GUV (Korlach et al. 1999, Dietrich et al. 2001).

Elles peuvent être formées à partir de lipides extraits de membranes cellulaires (De La Serna et al. 2004) et on peut également y incorporer des protéines membranaires fonctionnelles (Girard 2004). Les GUV ont notamment été utilisées pour l'étude des microdomaines de membranes et mettre en valeur la coexistence de phases (Korlach et al. 1999, Dietrich et al. 2001).

Ces membranes restent cependant éloignées des membranes biologiques puisqu'elles ne présentent pas d'asymétrie membranaire et il est difficile d'y insérer des protéines membranaires ou d'y associer un cytosquelette.

3. Les géométries membranaires possibles

Dans une membrane, les lipides sont organisés en bicouche mais cette organisation peut être amenée à changer en fonction des conditions expérimentales comme le degré d'hydratation ou la température. En dessous d'une concentration appelée concentration micellaire critique (CMC), les lipides sont sous forme de monomères. Au-delà de la CMC, les lipides se trouvent sous forme de micelles, en équilibre avec des monomères (s'ils ne sont pas trop concentrés). Il faut également que la température soit supérieure à une température appelée température de Krafft. Les lipides peuvent aussi s'auto-organiser pour former différentes mésophases, à plus forte concentration, comme des phases hexagonales, hexagonales inverses, cubiques, micellaires ou en bicouche. Certaines de ses organisations sont représentées dans la figure 9.

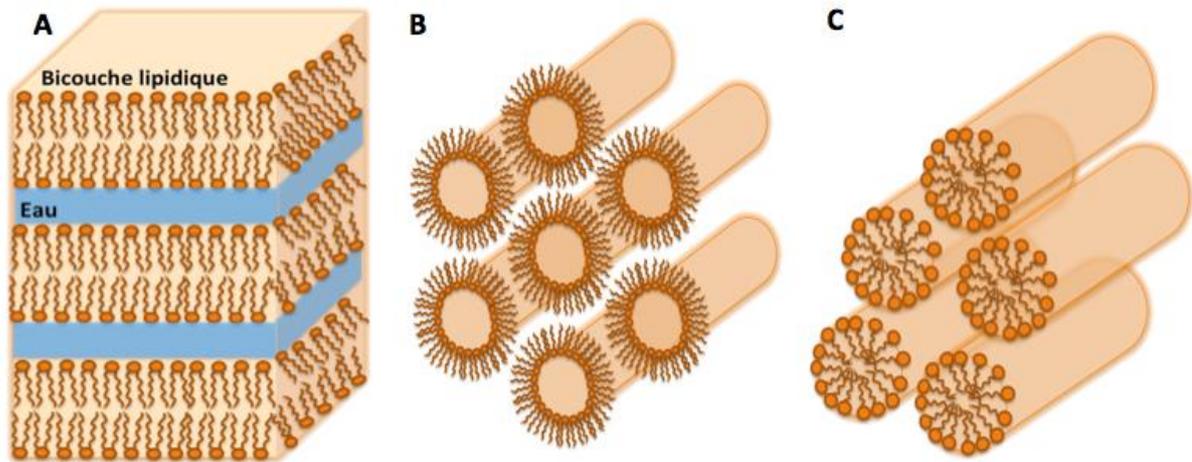


Figure 9. Organisation des phases lipidiques. (A) Organisation lamellaire ; (B) organisation hexagonale inverse H_{II} ; (C) organisation hexagonale H_I (adaptée de Schechter 1990).

La phosphatidylcholine (PC) s'organise en bicouche lipidique en milieu aqueux et forme des liposomes tant que la concentration en lipides est inférieure à 50% en masse. Les lipides maintiennent une organisation en bicouche et se trouvent au sein de lamelles très fines par rapport à leur surface. Ces lamelles parallèles sont séparées par des couches d'eau dont l'épaisseur bien définie est fonction de la quantité d'eau dans le système. Cette organisation lamellaire, appelée $L\alpha$, est caractéristique des membranes

composées de lipides à géométrie cylindrique de type PC, SM et PS. Pour ces lipides, la forme lamellaire de la bicouche est maintenue même à de hautes températures (Figure 9A) (Luzzati, Tardieu, and Gulik-Krzywicki 1968).

L'épaisseur de la couche d'eau diminue si la concentration en lipide augmente encore et dépasse 50%. Dès lors, les contacts entre les bicouches sont plus étroits puisqu'il y a un rapprochement des lamelles. En déshydratant les bicouches, on observe alors un enroulement des monocouches autour de la faible quantité d'eau qui est alors emprisonnée. Des cylindres pleins d'eau sont ainsi formés et leur surface est tapissée des têtes polaires des lipides tandis que les chaînes hydrocarbonées sont renvoyées vers l'extérieur. Ces cylindres s'organisent alors en une phase hexagonale appelée H_{II} (Figure 9B). En particulier, il a été remarqué que la phosphatidyléthanolamine (PE) insaturée, avec sa forme conique, induit des structures hexagonales inverses. Ce type de structure rappelle l'organisation des lipides dans certains modèles de mécanismes cellulaires nécessitant une forte courbure négative comme lors de la fusion de vésicules. Le passage d'une phase $L\alpha$ à une phase hexagonale est favorisé par la diminution de la concentration en eau. Cette transition peut également s'effectuer suite à une augmentation de la température dans le cas où le contact entre les lamelles de la phase $L\alpha$ est déjà assez étroit. La transition de $L\alpha$ vers une phase hexagonale demande de franchir une barrière énergétique qui peut l'être grâce à l'agitation thermique. La nature des lipides joue sur les domaines de température et de quantité d'eau pour lesquelles a lieu le passage $L\alpha \rightarrow H_{II}$. Plus un lipide a tendance à adopter une organisation de type H_{II} , plus la température de transition (température au-dessus de laquelle le lipide se trouve en phase hexagonale inverse) est basse et plus la quantité d'eau à laquelle la transition se produit est élevée.

Soumis à des conditions de concentration et de température différentes, certains lipides s'organisent différemment. Ils peuvent notamment adopter une structure hexagonale H_I . Dans ce cas, ils forment des cylindres ordonnés suivant une symétrie hexagonale, mais avec les chaînes hydrocarbonées à l'intérieur des cylindres, l'eau séparant les cylindres (Figure 9C).

Les lipides ont aussi la capacité d'adopter différentes structures cubiques qui sont représentées sur la Figure 10. Des canaux d'eau sont formés et des phases cubiques bicontinues sont ainsi créées.

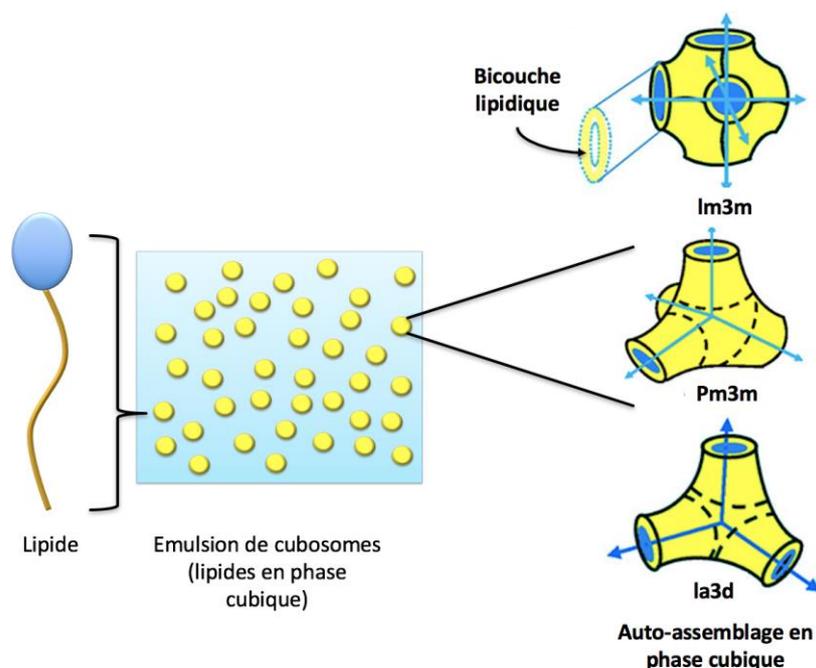


Figure 10 : Phases cubiques bicontinues de types $Im3m$, $Pn3m$ et $Ia3d$ avec respectivement 6, 4 et 3 canaux aqueux représentés en bleu. En jaune est représenté la phase continue de lipide formée par une bicouche hautement courbée, en bleu la phase aqueuse (adapté de (Kulkarni et al. 2017)).

D'un point de vue énergétique, les phases cubiques se situent à un niveau intermédiaire entre la structure hexagonale et la structure lamellaire. Les courbures moyennes interfaciales des phases hexagonales et cubiques ont des valeurs assez proches. Les phases cubiques sont aussi des précurseurs des phases hexagonales.

Il est possible de déterminer les différentes phases par diffraction des rayons X aux petits angles. A forte résolution, il est possible d'avoir accès aux caractéristiques structurales : l'épaisseur de la lamelle lipidique et de la couche aqueuse dans une organisation lamellaire, la distance entre cylindres et le diamètre de ces derniers dans le cas de l'organisation hexagonale.

Les lipides adoptent préférentiellement un type d'organisation en fonction de leur structure (Tableau 1). Par exemple, la phosphatidyléthanolamine adopte facilement une organisation hexagonale H_{II} en présence d'eau.

Lipides	Phases
Phosphatidylcholine	L
Sphingomyéline	L
Phosphatidyléthanolamine*	H_{II}
Phosphatidylsérine	L
Lysophosphatidylcholine	H_I
Insaturation	$L \rightarrow H_{II}$
Déshydratation	$L \rightarrow H_{II}$
Augmentation de T	$L \rightarrow H_{II}$

Tableau 1. Organisation préférentielle de différents lipides à 37°C (adaptée de (Schechter 1990)). *à un bas degré d'hydratation.

C'est la balance entre les géométries des parties polaires et hydrophobes des lipides qui détermine les différentes organisations lipidiques. Lorsque la conformation moyenne du lipide s'inscrit dans un cylindre, on a une organisation à courbure moyenne nulle comme la phase lamellaire (Figure 11 A). Si l'aire de la surface projetée de la partie polaire est plus faible que celle de la partie apolaire, le lipide s'inscrit dans un cône et on a alors affaire à une organisation hexagonale H_{II} (Figure 11 B). L'organisation H_{II} provient d'un changement de courbure, qui est alors non nulle et négative. Enfin, une surface de la partie polaire supérieure à celle de la partie apolaire implique que le lipide s'inscrit dans un cône inversé et l'organisation à courbure positive obtenue est alors de type H_I (Figure 11 C).

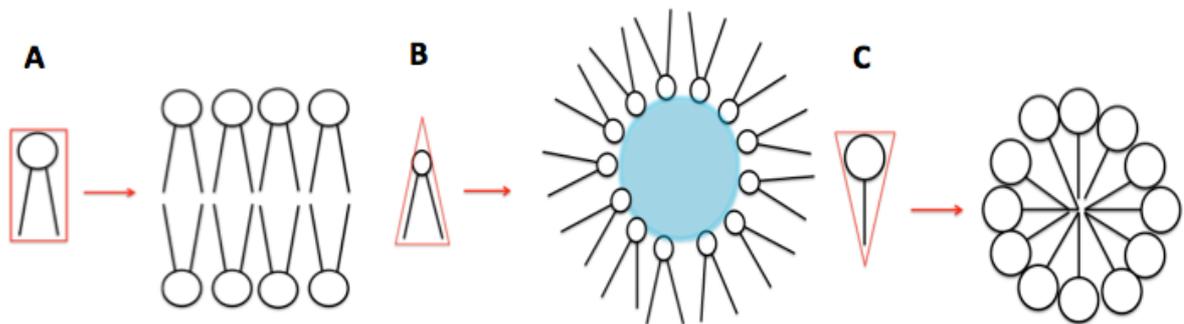


Figure 11. Géométrie et organisation lipidique. (A) Lipides en forme de cylindre, organisation lamellaire ; (B) lipides en forme de cône, organisation en micelle inversée ; (C) lipides en forme de cône inversé, organisation de type micellaire (adaptée de Schechter 1990).

Ainsi, l'organisation acquise par les lipides en fonction des différentes conditions expérimentales peut être expliquée grâce à un facteur de forme. Suite à une augmentation de température, le mouvement des chaînes est plus important et une déshydratation provoque une diminution du volume de la partie polaire. Ceci favorise une organisation hexagonale inverse de type H_{II} . L'insaturation des chaînes qui favorise la forme conique joue donc en faveur de l'organisation de type H_{II} .

4. Fluidité membranaire

Même piégés dans la membrane, les constituants d'une membrane biologique sont animés de divers mouvements. Les lipides tournent autour de leur axe perpendiculairement au plan de la membrane alors que les chaînes hydrocarbonées qui ont la propriété d'être flexibles adoptent un mouvement de balancier. À courte échelle, ces mouvements sont responsables de la fluidité membranaire.

La Figure 12 illustre les différents mouvements des constituants membranaires. Au sein de la membrane ont lieu des mouvements de rotation et de balancier qui n'entraînent pas le déplacement des molécules dans la membrane. Il peut y avoir un déplacement de la molécule au sein de la même héli-membrane par diffusion latérale. Une molécule peut aussi passer d'une héli-membrane à l'autre par « flip-flop » (Figure 7).

Ainsi, les déplacements des diverses molécules contenues dans la membrane montrent que l'ensemble n'est pas figé et qu'elles sont capables de se déplacer dans la structure

qu'elles forment. Le dynamisme membranaire existe grâce aux liaisons faibles qui peuvent s'établir et se défaire facilement. On peut préciser ici que le coefficient de diffusion latérale, noté D_L d'un lipide est d'environ $10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ce qui signifie qu'en moyenne une molécule peut couvrir dans ses déplacements latéraux une surface de $1 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

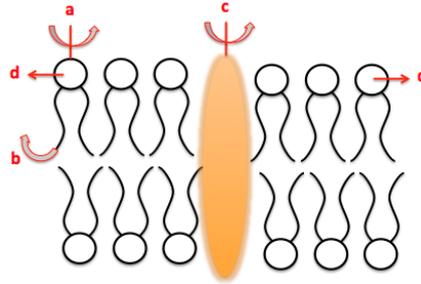


Figure 12. Les différents mouvements des constituants membranaires. (a) Rotation des lipides ; (b) mouvement de balancier des chaînes hydrocarbonées ; (c) rotation des protéines ; (d) diffusion latérale des lipides (adapté de (Alberts et al. 2002)).

La viscosité caractérise la résistance au déplacement. Dans un milieu homogène et isotrope, cette résistance est identique dans toutes les directions. Or, la membrane étant un milieu anisotrope et hétérogène, la résistance au déplacement diffère selon les directions de l'espace.

Différents facteurs ont une influence sur la fluidité membranaire :

La température

Une augmentation de température entraîne une plus forte agitation moléculaire ce qui provoque la rupture de liaisons faibles. La fluidité est ainsi augmentée.

La composition lipidique

En particulier, c'est le degré d'insaturation des chaînes carbonées qui est en jeu. L'écartement des chaînes voisines est augmenté par les chaînes aliphatiques des acides gras insaturés. Leurs chaînes sont coudées, ceci a pour conséquence de faire chuter le nombre de liaisons de Van der Waals. En conséquence, un degré d'insaturation élevé rend la température de gélification plus basse. Le cholestérol a également un rôle qui sera discuté plus loin dans ce chapitre.

Autres facteurs

Il existe d'autres facteurs cruciaux pour la capacité de mouvement des molécules parmi lesquels on peut distinguer la masse de la molécule qui a une influence directe sur sa mobilité ainsi que la position de la protéine au sein de la membrane et les liaisons qu'elle établit avec les molécules à proximité comme par exemple le cytosquelette cortical.

Différents processus biologiques dépendent de la fluidité membranaire comme la transduction de messages, l'écoulement des flux d'électrons des réactions d'oxydoréduction qui ont lieu dans les membranes et qui sont important pour la chaîne respiratoire et la photosynthèse. En outre, la vitesse des réactions est intimement liée à la vitesse de diffusion des complexes enzymatiques dans les bicouches lipidiques.

4.1 Fluidité et conformation des chaînes hydrocarbonées

Dans le cas où toutes les liaisons C-C sont de type trans (t), configuration la plus stable, la chaîne hydrocarbonée est étirée au maximum. Nous parlons alors d'une configuration « tout-trans ». La rotation est libre autour des liaisons C-C au sein d'une chaîne mais le passage d'une configuration trans (t) à une configuration gauche (g) nécessite tout de même un apport d'énergie, que l'agitation thermique est capable de fournir.

Une séquence de configurations « ttgtgt » a un impact sur le parallélisme des chaînes. En effet, ce type de configuration entraîne des changements de direction de la chaîne. Nous noterons également qu'une double liaison en configuration cis, ce qui est généralement le cas dans les membranes biologiques, entraîne un changement de direction à la différence d'une double liaison en configuration trans comme montré sur la Figure 13.

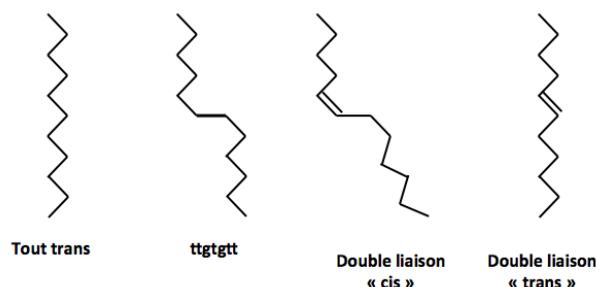


Figure 13. Les différentes configurations d'une chaîne hydrocarbonée.

5. Les phases lamellaires dans les membranes : gel, liquide et gel-ondulée

Les conditions physicochimiques (température, composition lipidique) auxquelles sont soumises les bicouches lamellaires ont une influence sur la dynamique des lipides. On distingue différents types de phases : les phases lamellaires gel (qui sont ordonnées), les phases lamellaires liquides (pouvant être désordonnées ou ordonnées) et la phase lamellaire gel ondulée. Si l'on considère deux possibilités pour la phase liquide, on peut donc distinguer 4 phases différentes : une **phase gel ($L\beta$ ou $L\beta'$)**, une **phase liquide désordonnée (L_d)** ainsi qu'une **phase liquide ordonnée L_o** et une **phase gel-ondulée ($P\beta'$)**. Dans la phase gel les chaînes des lipides ont tendance à être parallèles entre elles et perpendiculaires ou inclinées (dans le dernier cas on parle de phase $L\beta'$) par rapport au plan de la bicouche. Par exemple, dans la phase gel de la phosphatidylcholine, les chaînes lipidiques sont inclinées ce qui n'est pas le cas dans la phase gel de la phosphatidyléthanolamine (McIntosh, 1980). Ceci laisse penser que l'inclinaison est liée à la nature de la tête polaire. La surface occupée par les lipides est plus petite et les mouvements sont limités. Dans les phases liquides, les lipides diffusent plus facilement que dans les phases gel. Les phases liquides apparaissent à une température supérieure à la température de transition gel-liquide qui diffère selon les espèces moléculaires. Dans la phase gel-ondulée, il y a des ondulations régulières de la bicouche. Ces phases seront décrites plus précisément dans les paragraphes suivants (Figure 14).

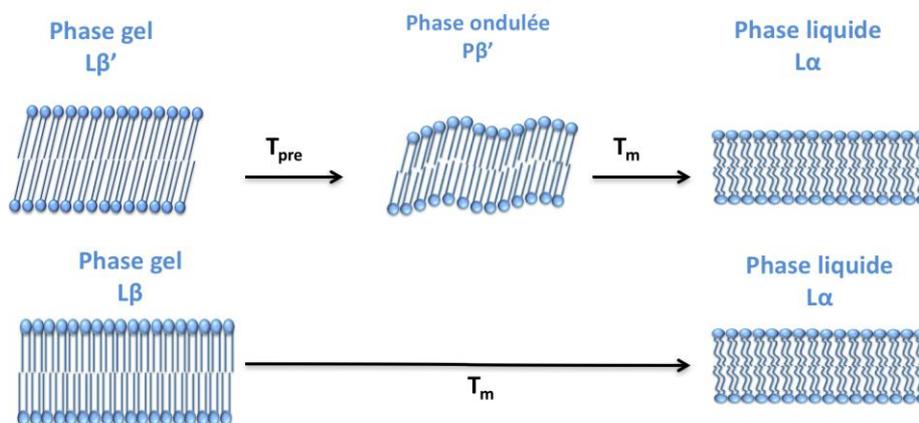


Figure 14. Représentation schématique des phases gel, gel ondulée et liquide.

Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour obtenir des informations sur la conformation des chaînes, la quantité de chaînes en phase liquide ou gel en fonction de la température ou encore la température où a lieu la transition. Par exemple, la diffraction des rayons X repère des modifications dans l'ordre des lipides durant la transition. Des techniques calorimétriques permettent de repérer l'absorption de chaleur consécutive à la « fusion » des chaînes. D'autres techniques comme la RPE utilisent les variations de propriétés de sondes spectroscopiques pour étudier le mouvement et les interactions moléculaires.

L'agitation thermique est faible à basse température. Dans ce cas, les chaînes lipidiques adoptent une configuration « tout-trans ». Dans une bicouche, on a alors une conformation ordonnée des chaînes car elles sont parallèles, étirées au maximum et sont très proches les unes des autres.

À plus haute température, la mobilité autour des liaisons C-C est augmentée. Ainsi, l'isomérisation trans → gauche devient plus probable. En outre, au-dessus d'une certaine température, il y a une transition coopérative où les chaînes passent d'un état ordonné à un état plus désordonné. La température de transition de phase (transition de la phase gel vers la phase liquide, T_m) est fonction de la longueur des chaînes hydrocarbonées, du nombre de leurs insaturations et aussi de la nature des têtes polaires (Figure 15).

Dans une phase gel ordonnée l'épaisseur de la double couche lipidique est plus importante que dans les phases fluides où les chaînes ne sont pas étirées au maximum. En effet, en phase liquide, les chaînes acyle oscillent autour d'une orientation normale par rapport au plan de la membrane. Cela implique que les lipides laissent d'avantage d'espace entre eux. Lors de la transition, à T_m , on constate une expansion latérale des lipides qui occupent alors plus de place à l'interface.

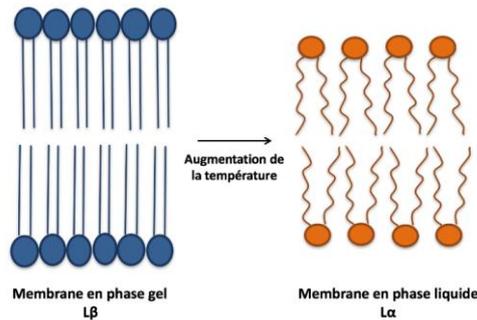


Figure 15. Membrane en phase gel ($L\beta$) et liquide ($L\alpha$).

5.1 Phase lamellaire gel $L\beta$

La **phase lamellaire gel ($L\beta$)** est constituée des chaînes acyle exclusivement en conformation « trans ». Cette organisation n'est rendue possible qu'à une température assez faible, inférieure à la température de transition. L'épaisseur d'une bicouche qui se trouve en phase gel est plus grande de 3 à 4 Å que quand elle se trouve en phase liquide L_d . La membrane, très compacte, a une diffusion latérale limitée des lipides. En outre, quand les longueurs des chaînes acyle sont très différentes, il apparaît un phénomène d'interdigitation.

5.2 Phases lamellaires liquides

La **phase liquide désordonnée (L_d)** est formée par un arrangement de phospholipides dont les chaînes acyle se trouvent à une température supérieure à celle de leur transition de phase. L'épaisseur de la membrane qui est d'environ 4 nm, diminue donc avec une augmentation de température. Les chaînes carbonées sont plus mobiles qu'en phase gel.

La **phase liquide ordonnée L_o** est constituée d'un ou de plusieurs types de lipides souvent associés à du cholestérol. Les chaînes acyle saturées très étirées comme par exemple celles de la sphingomyéline sont typiques des phases ordonnées. L'organisation de ces chaînes peut être modifiée du fait de la présence de cholestérol. En effet, les stérols possèdent des quatre cycles qui ont la propriété d'être rigides. L'intercalation du cholestérol entre les chaînes acyle fait qu'elles occupent moins de place. L'épaisseur de la bicouche est plus importante que pour la phase L_d . En effet elle

est plus épaisse d'un ou deux angströms. Le cholestérol a aussi une influence sur l'écartement des têtes polaires, le groupement hydroxyle ayant tendance à les écarter.

5.3 Passage d'une phase gel à la phase liquide

Pour un lipide pur, la transition de l'état gel à l'état liquide dépend de la nature des chaînes acyle. Il y a un lien entre la température de fusion des acides gras formant les chaînes hydrocarbonées des lipides et la température de transition de ces derniers.

Lors du passage de la phase gel (ordonnée) à la phase liquide (désordonnée), il y a une expansion latérale des lipides. Plus les interactions entre les lipides sont fortes plus la transition se fera à haute température. Les températures de transition des lipides augmentent donc avec la longueur des chaînes. En effet, plus les chaînes sont longues, plus l'interaction hydrophobe entre les chaînes est forte et celle-ci s'oppose à l'expansion latérale des lipides. En outre, les insaturations en conformation « cis » provoquent des changements de direction dans les chaînes ce qui rend plus difficiles les interactions entre des chaînes proches. Ceci fait qu'une augmentation d'insaturations en « cis » entraîne une baisse de la température de transition des lipides. Cependant, les insaturations « trans » n'ont que très peu d'influence sur les températures de transition car elles n'introduisent pas de changement de direction dans les chaînes.

5.4 Phase ondulée

Le concept de micro-domaines et de radeaux dans la membrane a été développé durant la dernière vingtaine d'années et le rôle de l'arrangement de lipides dans les fonctions cellulaires a aussi été démontré (Kai Simons and Gerl 2010; Kai Simons and Sampaio 2011; Tardieu, Luzzati, and Reman 1973). Une caractéristique remarquable des lipides est leur capacité à combiner en une phase ordonnée ou désordonnée des propriétés spécifiques avec des répercussions sur les fonctions des membranes biologiques. Les diagrammes de phases donnent de nombreuses informations. Ils permettent de déterminer dans quelles conditions de température et d'hydratation les lipides sont miscibles (phase unique) ou non-miscibles, ce qui implique la coexistence de plusieurs phases. La Figure 16 montre une partie du diagramme de phase de la

phosphatidylcholine (PC) extraite de l'œuf qui contient diverses chaînes acyle. Dans ce cas particulier, la PC peut se trouver en phase $L\alpha$ ou $L\beta$ en fonction de la température et du degré d'hydratation (Figure 16).

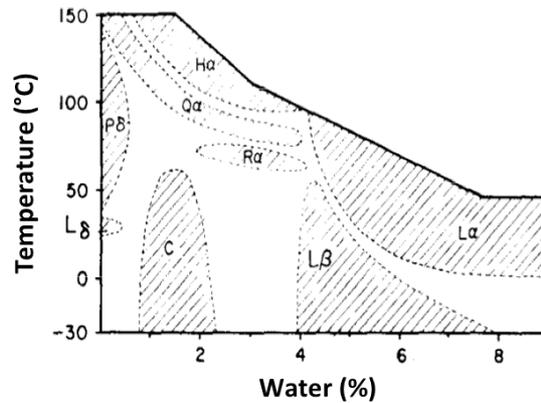


Figure 16. Diagramme de phase de PC d'œuf. Les régions représentant une phase sont hachurées. (Tardieu, Luzzati, and Reman 1973). La phase C est une phase cristalline tridimensionnelle, la phase Q est cubique, la phase R rhomboédrique, la phase H hexagonale, et les phases L sont lamellaires.

Dans de mélanges de lipides, la coexistence d'états gel et liquide a été décrite dans différents articles (Heimburg 2000; Leibler and Andelman 1987; Marder et al. 1984; Rappolt et al. 2000). La coexistence de domaines désordonnés et ordonnés au sein d'une même vésicule a également été observée par de nombreux auteurs (Bagatolli and Gratton 2000; Feigenson and Buboltz 2001; Korch et al. 1999). Les phases gel-ondulées, pouvant apparaître entre les phases homogènes gel et liquide de la membrane sont caractérisées par des fluctuations locales (Leibler and Andelman 1987).

Heimburg décrit la phase gel-ondulée comme une pré-transition qui se fait à faible enthalpie entre l'état gel et l'état liquide et précède la fusion des chaînes acyle. Il affirme que cette transition est liée à l'apparition d'ondulations périodiques à la surface des membranes. La période spatiale de ces ondulations est généralement comprise entre 100 et 300 Å. L'intervalle de température entre la pré-transition et la transition principale dépend surtout de la longueur des chaînes. Par exemple, il est d'environ 10°C pour DPPC (C16) et tombe à environ 3,1°C pour DSPC (C18) (Jorgensen et al. 1995).

La pré-transition peut être observée aussi bien dans des systèmes multi-lamellaires qu'uni-lamellaires. La formation des ondulations dépend de l'hydratation et n'a pas lieu dans des membranes lipidiques déshydratées. En effet, les phases ondulées semblent

être plus hydratées que les phases gel et liquides correspondantes (Le Bihan and Pezolet, 1998). Durant la pré-transition, toutes les variables thermodynamiques, y compris l'enthalpie, changent. Heimburg (Heimburg 2000) propose un modèle de la phase ondulée. Il part du principe que les lipides dans la phase gel sont organisés suivant une maille triangulaire avec donc trois directions principales. Lorsque la fusion a lieu, la surface occupée par les lipides augmente ce qui induit une rupture dans l'organisation de la maille si les lipides fondent individuellement. Il appelle ceci un défaut ponctuel. Cependant, si ces défauts ponctuels s'organisent linéairement selon une des directions principales, la ligne résultante n'a pas d'effet sur l'ordre cristallin. Il en déduit ainsi que les lignes de défauts doivent être énergétiquement favorisées par rapport aux défauts ponctuels. En outre l'apparition d'une ligne de défauts dans une monocouche entraîne une asymétrie de surface dans une bicouche et, par conséquent, une courbure locale (Heimburg 2000) (Figure 17).

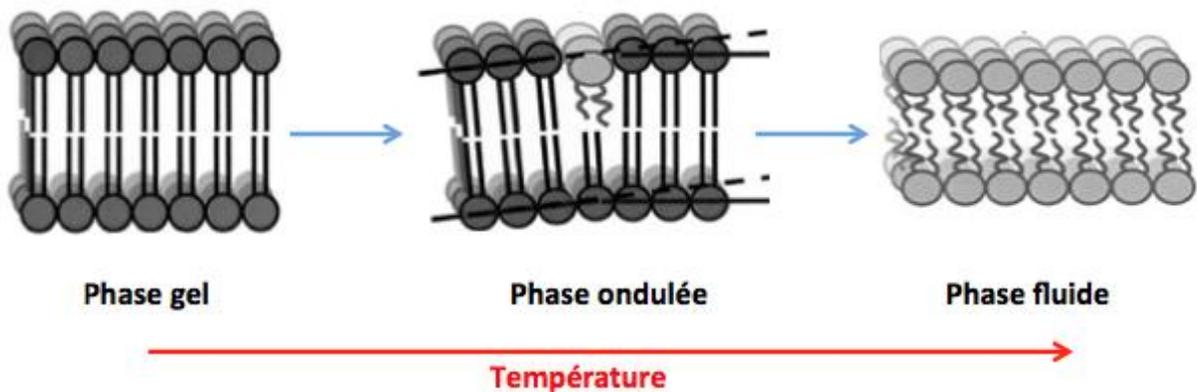


Figure 17. Représentation schématique de deux monocouches lipidiques couplées à l'état gel. En augmentant la température apparaît un défaut de ligne lipidique. La conséquence de l'asymétrie en surface est une courbure locale responsable de l'aspect ondulé (Heimburg 2000).

Rappolt (2000) parle aussi de la phase ondulée comme une phase lamellaire intermédiaire (Figure 18.).

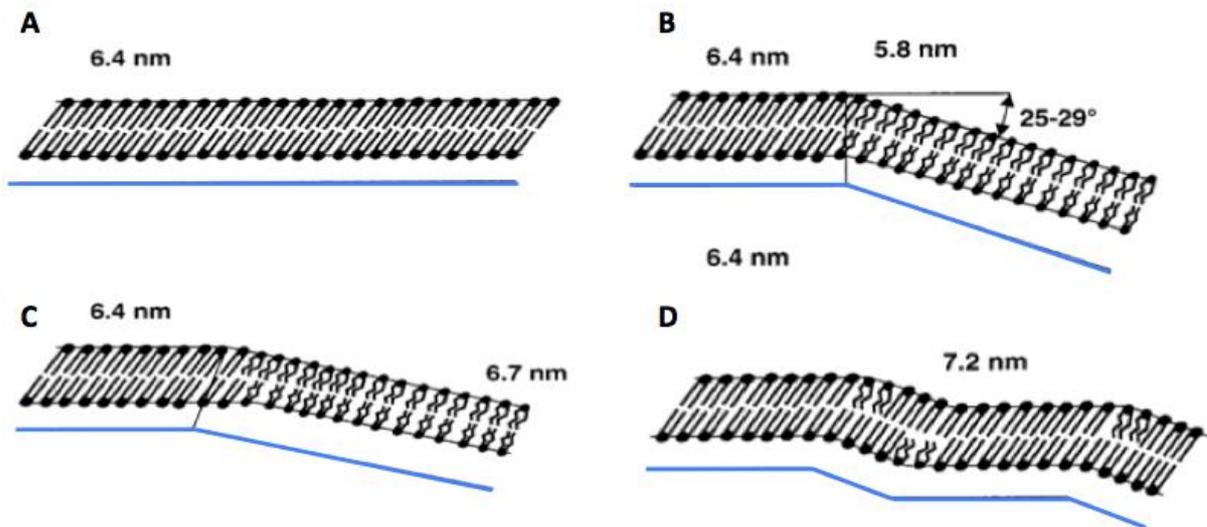


Figure 18. Schéma des événements principaux pendant la pré-transition de DPPC. (A) Le point de départ est la phase gel (chaînes droites). (B) La phase liquide cristalline $L\alpha$ (chaînes acyle pliées) coexiste avec la phase gel d'origine. (C et D) Dans une deuxième étape, les chaînes acyle de la phase $L\alpha$ se détendent à la conformation « tout-trans » et apparaît la phase de discontinuité stable $P\beta'$ (Rappolt et al. 2000).

La Figure 18 tente d'expliquer la formation de la phase ondulée. L'arc-cosinus entre la phase gel et la phase liquide est compris entre 25° et 29° quand la température de transition est atteinte. Cette valeur est proche de l'angle d'inclinaison des chaînes hydrocarbonées dans la phase gel qui est de 30° (Kirchner and Cevc 1994). Kirchner *et al.* suggèrent que la première étape de la transition (pré-transition) est causée par une dislocation du système multi-lamellaire. Ensuite, un peu plus loin dans la pré-transition, il y aurait un gonflement de la membrane par entrée d'eau. Ce processus se ferait dans le même temps qu'une augmentation de la fraction de phase liquide. Quand le gonflement de la phase liquide se rapproche du maximum, les phases qui coexistent deviennent une phase ondulée stable $P\beta'$. En même temps, la concentration en eau s'équilibre entre les bicouches. Ainsi, la rotation des têtes polaires dans la phase gel implique l'absorption d'eau, et dans les domaines liquides, le durcissement des chaînes a lieu avec une perte d'eau. La phase ondulée comporterait alors à la fois des zones en phase gel alternées avec des zones en phase liquide (Heimburg 2000; Kirchner and Cevc 1994).

Leidy (Leidy et al. 2002) s'est également intéressé aux phases ondulées notamment en utilisant la microscopie à force atomique. Comme Heimburg, il précise qu'en dehors des

domaines ondulés, la surface est localement plane. Les ondulations disparaissent lors de la transition principale pour des membranes ne comportant qu'un composant (Tenchov, Yao, and Hatta 1989) mais dans le cas de certaines membranes plus complexes, les températures de fusion des différents composants étant différentes et parfois éloignées, on arrive à une coexistence de domaines ordonnés et désordonnés. Des expériences de cryofracture ont laissé supposer la coexistence dans certaines plages de température de phases ondulées et de phases fluides. Leidy (2002) a utilisé la microscopie à force atomique (AFM) sur des membranes composées de DMPC/DSPC dont les températures de fusion sont assez éloignées. Ces deux lipides sont également connus pour former des phases ondulées. La microscopie est faite sur des doubles bicouches. Cela permet d'étudier plus précisément les propriétés des membranes et en particulier la formation des domaines. Aussi, cela permet d'étudier dans un environnement isolé et à la haute résolution de l'AFM, des propriétés de membrane sensibles aux interactions de surface. Il montre que la coexistence de phases ordonnées et de régions fluides est fortement influencée par la présence des ondulations (Figure 19). La température est de 24°C donc 5°C en dessous de la ligne de solidus (cette ligne sépare une température où seule la phase gel est présente d'une température où les phases gel et liquide peuvent coexister).

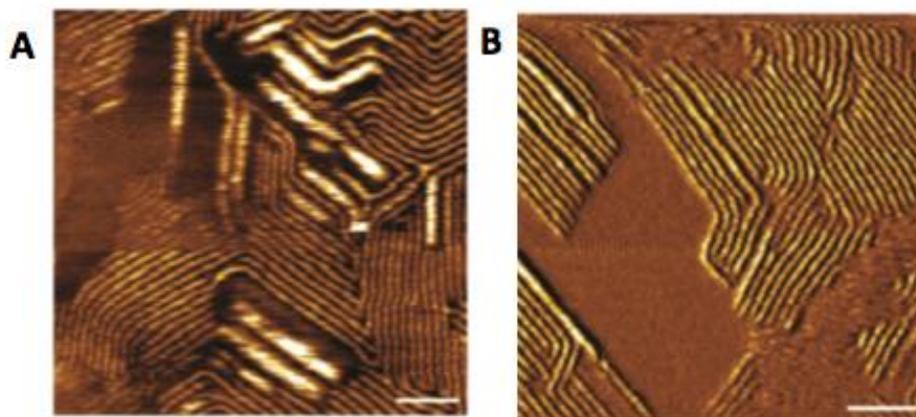


Figure 19. Images AFM montrant la formation d'une phase ondulée dans un mélange équimolaire DMPC/DSPC en double bicouche à une température de 24°C. (A) Image à hauteur constante (sans contact) montrant des orientations caractéristiques de 60° et 120° entre des domaines ondulés. (B) Image montrant une région ondulée de 12,5 nm (phase ondulée stable) dans une région de 25 nm (Leidy et al. 2002).

La Figure 19 montre la structure caractéristique des ondulations avec des angles de 60 et 120° entre les régions ondulées. L'AFM réalisée sur les membranes DMPC/DSPC dans une plage de température où peuvent coexister les deux domaines montre la présence de phase ondulée dans les domaines ordonnés ce qui indique que les phases ondulées, dans les mélanges, peuvent exister même après la transition principale. Leidy affirme également que la présence de phases ondulées dans la gamme de température où coexistent domaines liquides et gel affecte la formation et la croissance des domaines liquides.

6. Cholestérol

Le cholestérol possède 27 atomes de carbone organisés en quatre cycles et une chaîne hydrocarbonée en position C17. C'est une molécule amphipatique (Figure 5) puisqu'un groupe hydroxyle est positionné en C3.

En plus d'être un des constituants les plus importants des membranes plasmiques animales, il a aussi un rôle de précurseur des hormones stéroïdes et de la vitamine D qui sont impliquées dans le contrôle de l'expression de certains gènes. Différentes fonctions sont régies par les stéroïdes. Notamment, l'excrétion de Na⁺ et K⁺ est contrôlée par l'hormone hyperglycémiant favorisant l'apport en énergie et donc impliquée dans le métabolisme énergétique des cellules. Enfin, la testostérone, les œstrogènes et la progestérone sont les hormones sexuelles des mammifères.

Les cellules responsables de la biosynthèse des stéroïdes sont par exemple les cellules de Leydig localisées dans le tissu interstitiel des testicules ou encore les cellules folliculaires des ovaires. Ces cellules sont dites stéroïdogènes.

Le cholestérol peut être synthétisé dans le foie et l'intestin mais il est majoritairement apporté par l'alimentation. Ce sont des lipoprotéines telles que les LDL (*Low Density Lipoprotein*) et les HDL (*High Density Lipoprotein*) qui apportent, sous forme d'esters d'acides gras, le cholestérol aux cellules cibles. Les LDL sont formées par l'association de molécules de cholestérol sous leurs formes estérifiée et non estérifiée, ainsi que par des phospholipides et par une protéine désignée B-100. Les HDL, de forme discoïde, sont formées suite à l'hydrolyse de triglycérides et sont riches en phospholipides.

La protéine B-100 a un rôle primordial pour le transport du cholestérol. Elle permet de fixer les LDL sur des récepteurs spécifiques se trouvant dans les cavéoles (invaginations) des membranes plasmiques. Ces récepteurs ont un rôle très important puisqu'ils permettent de contrôler la concentration extracellulaire du cholestérol.

Les gènes codant pour des récepteurs de LDL peuvent être déficients et donc les LDL peuvent ne pas être fixées, internalisées, ou recyclées. Dans ce cas, la concentration de LDL et du cholestérol associé circulant devient alors très élevée, ce qui conduit à augmenter le risque d'athérosclérose.

6.1 Cholestérol : influence sur l'organisation des phospholipides

Le cholestérol a un impact sur la disposition des lipides. Dans les membranes, la partie polaire du cholestérol est en contact avec les têtes polaires et la partie hydrophobe avec les chaînes hydrocarbonées dans le cœur de la bicouche. Le cholestérol peut moduler les propriétés physiques et la dynamique des membranes où il se trouve. Dans les membranes riches en acides gras saturés (AGS), l'écartement entre les chaînes acyle engendré par le cholestérol fait baisser les interactions de Van der Waals. Cela provoque une augmentation de la fluidité membranaire.

Dans le cas d'une membrane riche en acides gras insaturés (AGI), le cholestérol a un effet opposé. Il interagit avec la partie proximale des chaînes aliphatiques des AGI et la partie distale des chaînes aliphatiques des AGS. Le résultat est une augmentation des liaisons intermoléculaires d'où une baisse de la fluidité (Figure 20).

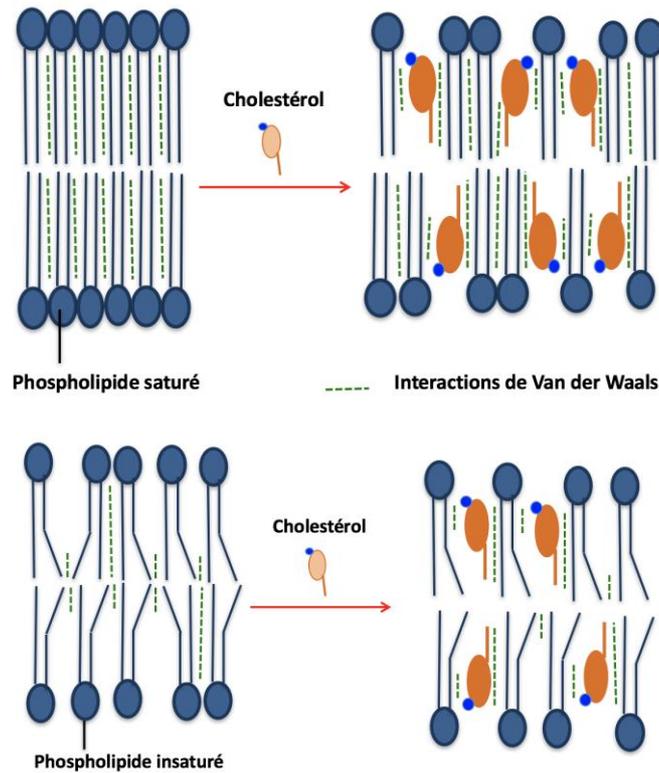


Figure 20. Effets du cholestérol sur la fluidité membranaire.

Les transitions des phases de suspensions multilamellaires de DPPC avec des concentrations en cholestérol variables ont été analysées par Sanakaram (M B Sankaram and Thompson 1991). La Figure 21 montre que pour de faibles concentrations en cholestérol (<7 mol%) apparaît la transition S_o-L_d . Il y a coexistence de ces deux phases au voisinage de 41,2°C. À des concentrations comprises entre 7 et 27 mol% il y a coexistence des phases S_o-L_o et L_d-L_o , suivant que l'on est en-dessous ou au-dessus de la température de transition de phase gel-liquide (environ 1 degré inférieur à T_m). Au-delà de 30 mol% de cholestérol, seule la phase L_o persiste peu importe la température. Par microcalorimétrie, il a aussi été observé qu'à des concentrations en cholestérol inférieures à 5 mol%, il y a immiscibilité des phases L_o-L_d (McMullen et McElhaney 1995).

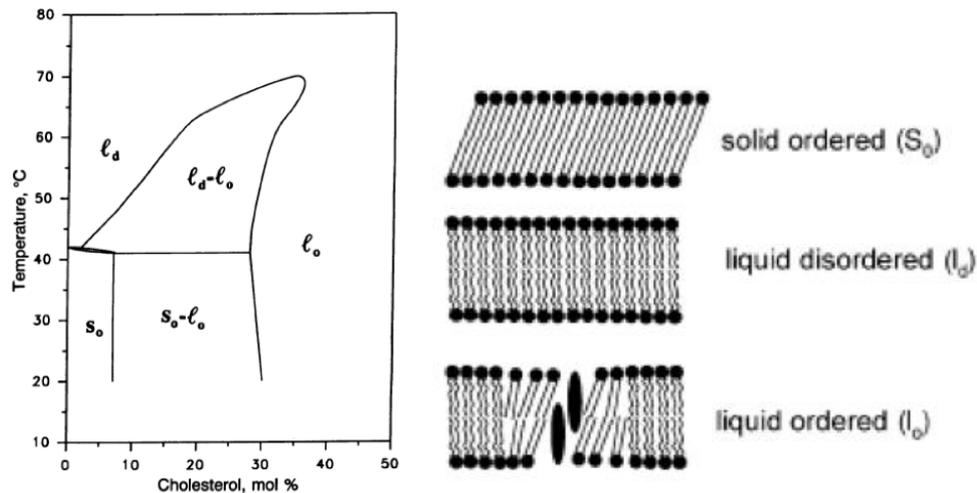


Figure 21. Influence du cholestérol sur la structure lipidique de la bicouche (M B Sankaram and Thompson 1991).

6.2 Rôle du cholestérol dans la formation de phase liquide ordonnée au sein des membranes lipidiques

Il apparaît que généralement, les membranes cellulaires ayant une organisation liquide ordonnée L_o sont riches en sphingomyéline et cholestérol. En effet, l'affinité du cholestérol pour les sphingolipides est souvent meilleure que pour les glycérophospholipides. Sankaram (M B Sankaram and Thompson 1991) a étudié l'interaction du cholestérol avec différents glycérophospholipides et différentes sphingomyélines avec des compositions de chaînes variables par ESR (Résonance paramagnétique électronique). Il remarque que la composition des chaînes acyle ne semble pas avoir d'influence sur l'association du cholestérol avec les sphingomyélines. De plus, le cholestérol interagit plus fortement avec les sphingomyélines qu'avec les phosphatidylcholines. C'est probablement la liaison amide des sphingomyélines, présentant un caractère dipolaire plus fort que la liaison ester correspondante dans les glycérophospholipides, qui est responsable de la plus forte interaction du cholestérol avec les sphingomyélines. Il se peut également qu'une liaison hydrogène entre l'atome d'hydrogène de l'amide et l'oxygène du groupement hydroxyle du cholestérol vienne renforcer cette interaction (Figure 22) (Mantripragada B Sankaram and Thompson 1990).

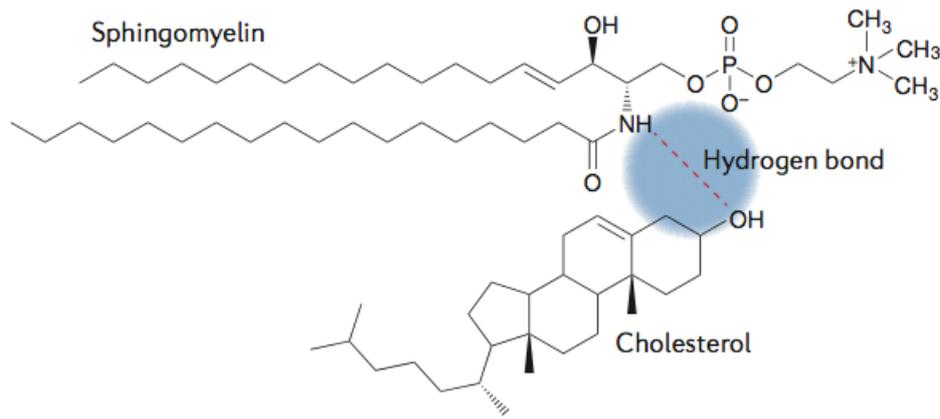


Figure 22. Les interactions lipide-lipide et en particulier la liaison préférentielle du cholestérol avec les sphingolipides aide à former des domaines ordonnés au sein de la membrane. L'interaction préférentielle des sphingolipides avec les stérols est due à la saturation de la chaîne hydrophobe des sphingolipides, et à la formation de liaisons hydrogènes entre ces deux espèces (Sezgin et al. 2017).

7. Nanodomains des membranes

Du fait des affinités entre les lipides et de la fluidité des bicouches phospholipidiques, les différents composants des membranes peuvent s'arranger latéralement de façon non homogène. Ceci entraîne la création de régions qui diffèrent du reste de la membrane par leur composition lipidique ou protéique. L'hétérogénéité latérale dans les membranes existe à l'échelle sub-micrométrique et nanométrique. Les micro et nanodomains membranaires sont en général caractérisés par la présence d'ensembles spécifiques de protéines. Cela signifie que certaines protéines ne sont pas sujettes à la diffusion latérale mais restent confinées dans des micro-domaines (Jacobson, Sheets, and Simson 1995). Dans leur description des membranes, Singer et Nicholson (Singer and Nicholson 1972) affirment que certains lipides ne sont pas entièrement libres de diffuser dans la bicouche mais qu'ils interagissent fortement avec des protéines membranaires créant ainsi une hétérogénéité latérale sur une distance de l'ordre de 100 nm. L'étude de l'effet de la température sur des lipides membranaires permet de supposer que le comportement de phase des mélanges lipidiques est responsable de l'organisation latérale des membranes biologiques. Cela suggère donc que les propriétés d'agrégation des lipides membranaires sont une des principales causes menant à la

formation d'un ordre latéral (Karnovsky et al. 1982; A. G. Lee et al. 1974; Wunderlich et al. 1975). L'idée de l'existence de plusieurs phases dans la membrane remonte à 1982 (Karnovsky et al. 1982). Celle que la capacité des lipides à s'organiser en domaines dans les membranes cellulaires est liée à la solubilité limitée des lipides vient de Simons et Van Meer (Simons, Kai and van Meer 1988). Ils cherchaient à expliquer la différence de composition lipidique entre les domaines apicaux et basolatéraux des membranes de cellules épithéliales et posaient les bases du concept de domaines radeaux (*rafts*) (Figure 23).

7.1 Les domaines radeaux

L'existence de domaines de membrane appelés radeaux lipidiques ou radeaux est encore sujette à controverse. Néanmoins, ces radeaux font référence à des domaines enrichis en cholestérol, sphingomyéline et glycérophospholipides. Ces composants peuvent s'assembler de façon compacte grâce à des interactions intermoléculaires. L'isolement de fractions lipidiques des membranes en utilisant des détergents comme le triton X-100 a permis leur découverte (Brown 2001) d'où aussi leur appellation DRM (*detergent resistant membranes*).

Ainsi, le critère initial de définition d'un radeau lipidique était un domaine de la membrane résistant à l'extraction dans du triton X-100 1%. Ces radeaux contiennent 3 à 5 fois plus de cholestérol que le reste de la membrane qui représente d'un tiers à la moitié de l'ensemble des lipides (Deborah A Brown and Rose 1992; Pike et al. 2002; Prinetti et al. 2000). Il en va de même pour la sphingomyéline qui représente 1 à 15% du total des lipides dans les radeaux. 10 à 20% des autres lipides sont des glycosphingolipides tels que les cérébrosides et les gangliosides (Deborah A Brown and Rose 1992; Prinetti et al. 2000). Les glycérophospholipides tels que la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine représentent moins de 30% des lipides dans les radeaux alors qu'ils représentent environ 60% des lipides dans la membrane. Les radeaux contiennent donc peu de glycérophospholipides.

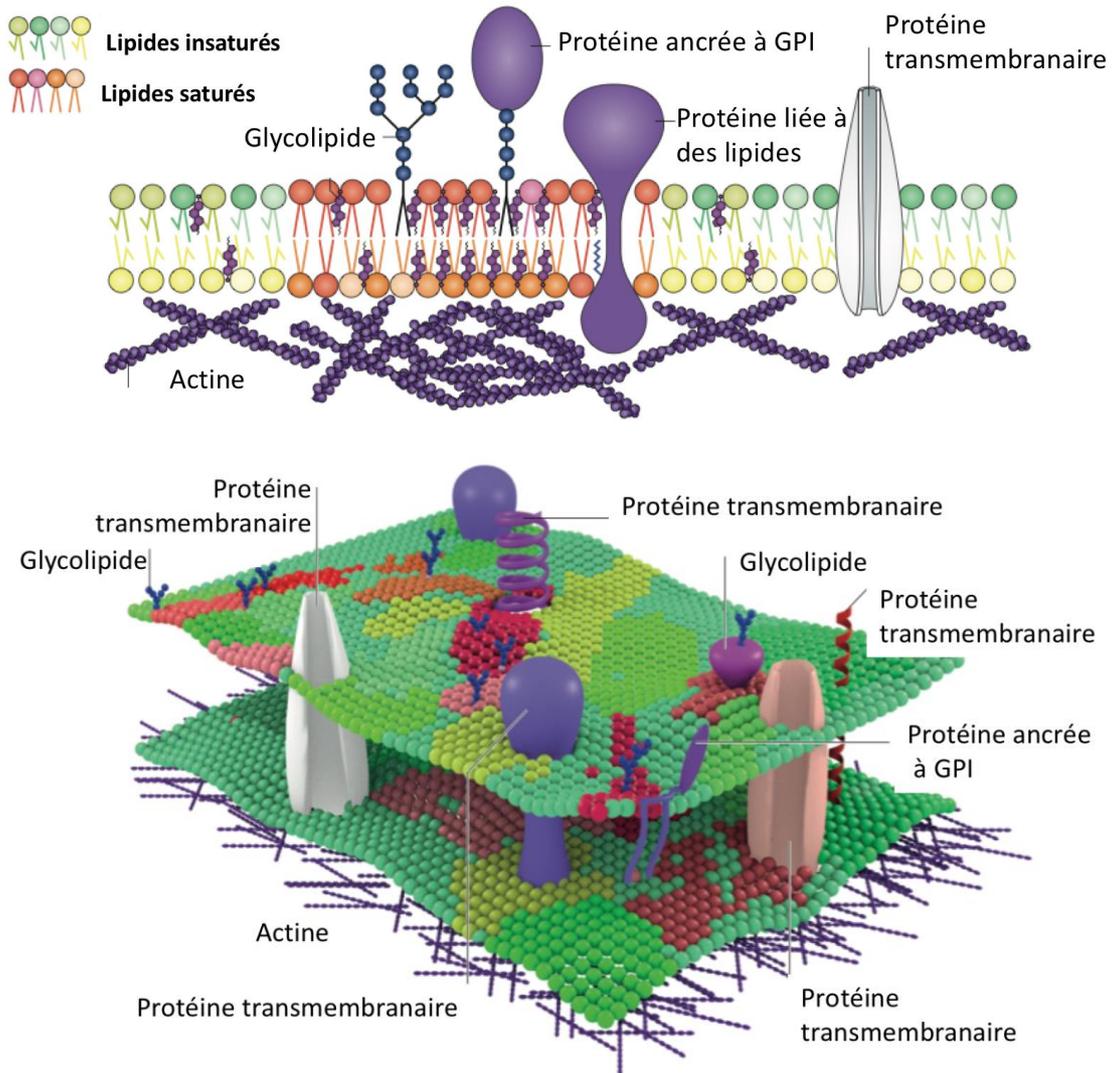


Figure 23. Représentation de l'hétérogénéité latérale de la membrane. Les domaines radeaux sont définis comme aillant petite taille mais très dynamiques, enrichis en cholestérol, phospholipides saturés, sphingolipides, glycolipides et en protéines couplées au GPI notamment. Ces domaines ont des propriétés physiques particulières. La fluidité y est plus faible. Ces domaines sont présents à la fois dans les feuillettes interne et externe et sont répartis probablement de manière aléatoire dans la membrane (Sezgin et al. 2017).

Ces radeaux peuvent exister également dans des membranes modèles qui miment les membranes biologiques puisque comme mentionné précédemment, les sphingomyélines interagissent avec le cholestérol en formant des liaisons hydrogène et grâce à l'interaction lipophile entre les chaînes du cholestérol et des sphingolipides. La Figure 24 représente la définition initiale des radeaux.

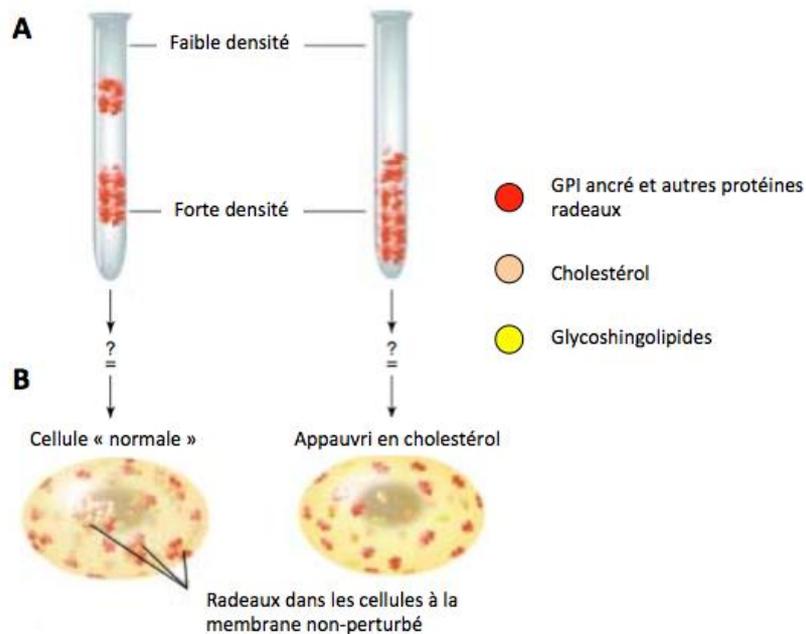


Figure 24. Définition des radeaux lipidiques (membranes résistantes aux détergents, DRM). Les radeaux et leurs composants peuvent être isolés en utilisant des détergents. Ce sont les fragments de faible densité. On ne retrouve que peu, voir pas de ces fragments dans les membranes pauvres ou sans cholestérol (Edidin 2001).

Le cholestérol semble stabiliser ces domaines radeaux (Gibson Wood et al. 2011). Il est abondant dans ces domaines et son interaction préférentielle avec les sphingolipides est primordiale pour leur formation (K Simons and Ikonen 1997). Il interagit également avec les gangliosides ce qui provoque la formation de domaines riches en cholestérol dans les membranes modèles (Lozano et al. 2013). D'une manière générale, les domaines radeaux ont pour effet de réduire la mobilité latérale des molécules et ont une composition chimique différente du reste de la membrane ainsi que des épaisseurs différentes. Ceci est commun avec d'autres types de domaines qu'on appelle les cavéoles, qui sont principalement définies comme des domaines invaginés de la membrane plasmique contenant la cavéoline. Les domaines radeaux pourraient avoir comme fonction de séparer des éléments spécifiques dans le but de réguler leur interaction avec d'autres éléments de la membrane et donc leur activité. Ils peuvent induire une augmentation de la concentration de certaines molécules et ainsi avoir une fonction catalytique. Par exemple des enzymes pourraient rencontrer plus facilement leur substrat et déclencher des réactions (transduction du signal par exemple) (Sezgin et al. 2017). En outre des interactions avec les lipides majoritaires des radeaux comme

le cholestérol ou les glycosphingolipides pourraient changer la conformation des protéines présentes dans ces domaines et donc leur activité (Laganowsky et al. 2014; Daniel Lingwood et al. 2011). La formation de phases liquide ordonnée (L_o) et liquide désordonnées (L_d) est en grande partie provoquée par l'action du cholestérol sur les phospholipides. En effet, le cholestérol conduit préférentiellement à la condensation de la phase L_o par rapport à la phase L_d . L'addition de sphingolipides entraîne un enrichissement en sphingomyéline dans la phase ordonnée qui contient jusqu'à 35% de cholestérol (en mol). Cela favorise la formation de domaines. À très forte concentration de cholestérol (au-delà de 50% en mol), seule la phase L_o existe. Plusieurs auteurs ont étudié le procédé de formation de radeaux dans des membranes consistant en un mélange de phospholipides, cholestérol et sphingolipides (Grainger et al. 1990; Y. H. Hao and Chen 2001; Holopainen et al. 2001; Korlach et al. 1999). Dietrich et al (Dietrich et al. 2001) et Korlach et al. (Korlach et al. 1999) ont étudié des vésicules unilamellaires géantes par microscopie confocale. Ils incorporent du Laurdan (lipide fluorescent expliqué plus en détails au chapitre Matériels et Méthodes) dans une bicouche composée de DOPC/cholestérol/sphingomyéline et de 1% en mol de ganglioside. L'émission du Laurdan dépend de l'état d'hydratation du milieu environnant avec un décalage vers le bleu de 50 nm observé dans la phase L_o relativement à la phase L_d . Les GUV sont alors observés en microscopie d'absorption à deux photons. Des zones d'environ 10 μm sont visibles à la surface des vésicules ce qui indique une séparation de phase et la formation de radeaux (Figure 25) (W. H. Binder, Barragan, and Menger 2003). Ces zones disparaissent quand la température s'élève au-delà de la température de transition de phase. D'autres méthodes permettent d'étudier les radeaux. L'AFM peut être utilisée pour mesurer l'épaisseur des membranes contenant plusieurs phases. Des différences dans l'épaisseur de la membrane peuvent signifier un changement de phase et l'existence d'un domaine particulier ou d'un radeau (Milhiet et al. 2002). Le SAXD (Diffraction de rayons X aux petits angles) permet également de déterminer l'épaisseur des membranes (Majewski et al. 2001). Afin d'étudier la mobilité latérale des molécules dans les radeaux il est possible d'utiliser la technique SPT (*single particle tracking*). Dans cette technique une sonde à laquelle est greffée une particule d'or (40 nm) est incorporée à un mélange contenant des radeaux. La microscopie confocale est utilisée pour identifier les domaines (Bagatolli and Gratton 2000). La technique permet de

déterminer le coefficient de diffusion dans les différentes phases de la membrane : le coefficient de diffusion est deux fois plus petit dans la phase L_o par rapport à la phase L_d . Dans une autre étude, le TOF-SIMS (spectroscopie de masse à ionisation secondaire) est utilisé pour étudier la composition des radeaux dans des membranes de DPPC/DOPS (Ross et al. 2001).

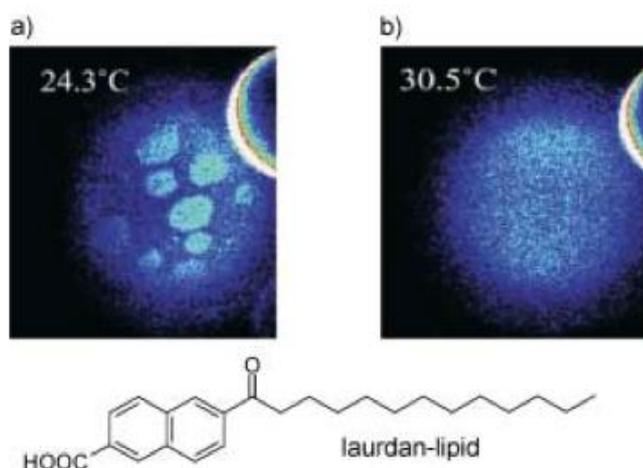


Figure 25. Formation de domaines dans des vésicules unilamellaires géantes (GUV) composées de DOPC/cholestérol/SM (1/1/1). (A) Formation des GUV 24,3°C contenant deux types de domaines. (B) Destruction des radeaux en élevant la température à 30,5°C (W. H. Binder, Barragan, and Menger 2003).

La taille des radeaux est difficile à évaluer mais les études par AFM et SPT suggèrent qu'elle se situe entre 10 et 100 nm. Cependant, d'autres études menées par microscopie et TOF-SIMS donnent des valeurs allant jusqu'à plusieurs micromètres. En outre, le nombre de molécules associées aux radeaux varie entre 100 et plusieurs centaines de milliers. Mesurer précisément la taille des radeaux est complexe car ce sont des systèmes dynamiques dans lesquels les différents composants sont à même d'être en mouvement. La microscopie de fluorescence a montré en effet que les frontières entre les radeaux et les lipides environnants bougent dans une échelle de temps de l'ordre de quelques secondes. D'après L. Pike (Pike 2006), on peut définir les radeaux comme de petits domaines hétérogènes, très dynamiques, de l'ordre de 10 à 200 nm enrichis en cholestérol, en sphingolipides et en phospholipides saturés. Les domaines radeaux peuvent parfois être stabilisés pour former des plateformes plus importantes grâce à des interactions protéines-protéines et protéines-lipides. En effet des protéines

transmembranaires sont présentes dans ces domaines et elles peuvent posséder des sites de liaison du cholestérol ou de sphingolipides (Sezgin et al. 2017). Cependant, les radeaux ne contiennent pas forcément de sphingolipides (Larocca et al. 2010, 2013).

Le concept de radeaux est aussi conforté par le fait que les membranes lipidiques sont hétérogènes à l'échelle nanométrique, ce que montrent les résultats expérimentaux obtenus par microscopie à haute résolution (Owen et al. 2012; Wit et al. 2015). Dans des membranes composées de plusieurs lipides, les lipides peuvent se grouper par affinités ou se mélanger. Le premier diagramme de phase d'une membrane composée de plusieurs lipides a été obtenu pour un mélange de DPPC et de cholestérol en 1989 (Vist and Davis 1989). Des regroupements à l'échelle nanométrique ont été observés dans ces membranes. Ces regroupements sont aussi observés dans des simulations pour des membranes planes sans tension (Meinhardt, Vink, and Schmid 2013; Topozini et al. 2014). La Figure 26 montre des domaines L_0 de différentes tailles, obtenus avec des simulations de Monte-Carlo dans le cas de bicouches lipidiques binaires (Schmid 2017a). Les domaines L_0 se réarrangent en fonction du temps et en fonction de la température, en particulier du refroidissement (la vitesse de refroidissement a un rôle dans le réarrangement des domaines L_0). Ces réarrangements semblent dépendre de la cinétique de la formation de ces domaines ainsi que la façon dont ils grandissent (Rosetti, Mangiarotti, and Wilke 2017; Tessier et al. 2009).

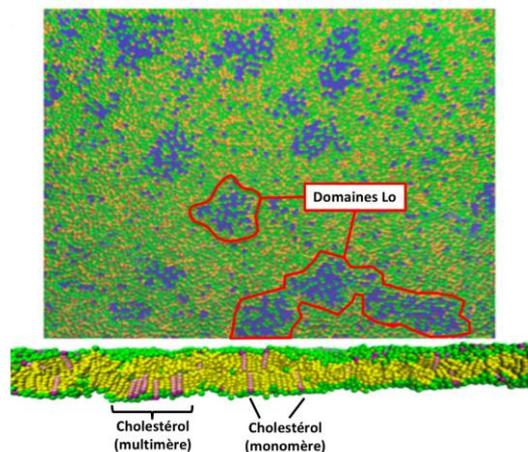


Figure 26. Vue de dessus et de côté de petits regroupements du cholestérol obtenus avec des simulations pour des membranes binaires. Les molécules de cholestérol sont en bleu et rose et les phospholipides en vert et jaune (adapté de (Schmid 2017)).

7.2 Radeaux et pathologies

Les domaines radeaux peuvent agir comme modulateurs de l'interaction hôte-pathogène et il a récemment été découvert que l'enveloppe du VIH notamment (Lorizate et al. 2013) contient beaucoup de lipides saturés, surtout des sphingolipides, et du cholestérol. Des domaines ordonnés ont aussi été trouvés dans des membranes de microorganismes pathogènes (Farnoud et al. 2015). Ce sont les glycolipides des radeaux qui lient les exotoxines bactériennes. Il semble que les radeaux soient également des sites d'entrée pour certaines bactéries intracellulaires et pour certains virus (Huttner, Wieland and Zimmerberg 2001; Scheiffele et al. 1999). Cela est lié au fait que les lipides des radeaux sont nécessaires pour la fusion ou parce que les récepteurs ancrés au glycosylphosphatidylinositol (GPI) pour les virus sont associés aux radeaux. Les lipides des radeaux sont probablement impliqués dans l'apparition de virus matures des cellules infectées, notamment le virus de la grippe et le VIH (Edidin 2001).

Références

- Alberts, B et al. 2002. *Journal of Chemical Information and Modeling Molecular Biology of the Cell*.
- Bagatolli, Luis A, and Enrico Gratton. 2000. "A Correlation between Lipid Domain Shape and Binary Phospholipid Mixture Composition in Free Standing Bilayers : A Two-Photon Fluorescence Microscopy Study." *Biophysical Journal* 79(July): 434–47.
- Binder, Wolfgang H., Veronique Barragan, and Fredric M. Menger. 2003. "Domains and Rafts in Lipid Membranes." *Angewandte Chemie - International Edition* 42(47): 5802–27.
- Bretscher, Mark S. 1972. "Phosphatidyl-Ethanolamine: Differential Labelling in Intact Cells and Cell Ghosts of Human Erythrocytes by a Membrane-Impermeable Reagent." *Journal of Molecular Biology* 71(3): 523–28.
- Bretscher MS. 1972. "Asymmetrical Lipid Bilayer Structure for Biological Membranes." *Nature New Biology* 236: 11–12. <https://www.nature.com/nature-newbio/journal/v236/n61/pdf/newbio236011a0.pdf>.
- Brown, Deborah A, and John K Rose. 1992. "Sorting of GPI-Anchored Proteins to Membrane Subdomains during Transport to the Apical Cell Surface." 66: 533–44.
- Daleke, David L. 2003. "Regulation of Transbilayer Plasma Membrane Phospholipid Asymmetry." *Journal of Lipid Research* 44(2): 233–42. <http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.R200019-JLR200>.

- Danielli, James Frederic, and Hugh Davson. 1935. "A Contribution to the Theory of Permeability of Thin Films." *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 5(4): 495–508. <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.1030050409>.
- Dietrich, C. et al. 2001. "Lipid Rafts Reconstituted in Model Membranes." *Biophysical Journal* 80(3): 1417–28. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349501761140>.
- Eididin, Michael. 2001. "Shrinking Patches and Slippery Rafts: Scales of Domains in the Plasma Membrane." *Trends in Cell Biology* 11: 492–96.
- Farnoud, Amir M. et al. 2015. "Raft-Like Membrane Domains in Pathogenic Microorganisms Amir." *Curr Top Membr* 347(6224): 882–86.
- Feigenson, Gerald W, and Jeffrey T Buboltz. 2001. "Ternary Phase Diagram of Dipalmitoyl-PC / Dilauroyl-PC / Cholesterol : Nanoscopic Domain Formation Driven by Cholesterol." 80(June).
- Frye, L. D., and M. Eididin. 1970. "The Rapid Intermixing of Cell Surface Antigens After Formation of Mouse-Human Heterokaryons." *Journal of Cell Science* 7(2): 319–35. <http://jcs.biologists.org/content/7/2/319%5Cnhttp://jcs.biologists.org/content/7/2/319.full.pdf%5Cnhttp://jcs.biologists.org/content/7/2/319.short%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4098863>.
- Gibson Wood, W, Urule Igbavboa, Walter Muller, and Gunter Eckert. 2011. "Cholesterol Asymmetry in Synaptic Plasma Membranes." *j neurochem* 116(5): 684–89.
- Grainger, David W, Anke Reichert, Helmut Ringsdorf, and Christian Salesse. 1990. "Hydrolytic Action of Phospholipase A 2 in Monolayers in the Phase Transition Region : Direct Observation of Enzyme Domain Formation Using Fluorescence Microscopy." 1023: 365–79.
- Hao, Y H, and J W Chen. 2001. "Influence of Cholesterol on the Biophysical Properties of the Sphingomyelin/DOPC Binary System." 92: 85–92.
- Heimburg, Thomas. 2000. "A Model for the Lipid Pretransition: Coupling of Ripple Formation with the Chain-Melting Transition." *Biophysical Journal* 78(3): 1154–65. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349500766732>.
- Holopainen, Juha M, Howard L Brockman, Rhoderick E Brown, and Paavo K J Kinnunen. 2001. "Interfacial Interactions of Ceramide with Dimyristoylphosphatidylcholine : Impact of the N-Acyl Chain." *Biophysical Journal* 80(February): 50–60.
- Huttner, Wieland and Zimmerberg, Joshua. 2001. "Implications of Lipid Microdomains for Membrane Curvature, Budding and Fission." *Elsevier Science* 13: 478–84.
- Jacobson, Ken, Erin D Sheets, and Rudolf Simson. 1995. "Revisiting the Fluid Mosaic Model of Membranes Published by : American Association for the Advancement of Science Revisiting the Fluid Mosaic Model of Membranes." 268(5216): 1441–42.
- Jorgensen, Henrik S, Hirofumi Nakayama, Hans O Raaschou, and Tom S Olsen. 1995.

- “Recovery of Walking Function in Stroke Patients : The Copenhagen Stroke Study.” *EPL (Europhysics Letters)* 28(1): 27–32.
- Karnovsky, Morris J, Alan M Kleinfeld, Richard L Hoover, and Richard D Klausner. 1982. “The Concept of Lipid Domains in Membranes.” *The journal of cell biology* 94(17).
- Kirchner, S, and G Cevc. 1994. “On the Origin of Thermal L β ' \rightarrow P β ' Pretransition in the Lamellar Phospholipid Membranes S.” *EPL (Europhysics Letters)* 28(1): 28.
- Korlach, Jonas, Schwille Petra, Watt W Webb, and Gerald W Feigenson. 1999. “Characterization of Lipid Bilayer Phases by Confocal Microscopy.” *PNAS* 96: 8461–66.
- Kulkarni, Chandrashekhar V. et al. 2017. “Self-Assembled Lipid Cubic Phase and Cubosomes for the Delivery of Aspirin as a Model Drug.” *Langmuir* 33(38): 9907–15.
- De La Serna, Jorge Bernardino, Jesus Perez-Gil, Adam C. Simonsen, and Luis A. Bagatolli. 2004. “Cholesterol Rules: Direct Observation of the Coexistence of Two Fluid Phases in Native Pulmonary Surfactant Membranes at Physiological Temperatures.” *Journal of Biological Chemistry* 279(39): 40715–22.
- Laganowsky, Arthur et al. 2014. “Membrane Proteins Bind Lipids Selectively to Modulate Their Structure and Function.” *Nature* 510(7503): 172–75. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature13419>.
- Larocca, Timothy J et al. 2010. “Cholesterol Lipids of *Borrelia burgdorferi* Form Lipid Rafts and Are Required for the Bactericidal Activity of a Complement-Independent Antibody.” *Cell Host and Microbe* 8(4): 331–42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2010.09.001>.
- Larocca, Timothy J et al. 2013. “Proving Lipid Rafts Exist : Membrane Domains in the Prokaryote *Borrelia burgdorferi* Have the Same Properties as Eukaryotic Lipid Rafts.” *PloS one* 9(4): 331–42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2010.09.001>.
- Lee, A G et al. 1974. “Clusters in Lipid Bilayers and the Interpretation of Thermal Effects in Biological Membranes.” *Biochemistry* 13(18): 3699–3705.
- Leibler, S., and D. Andelman. 1987. “Ordered and Curved Meso-Structures in Membranes and Amphiphilic Films.” *J. Physique* 48: 2013–18.
- Leidy, Chad et al. 2002. “Ripples and the Formation of Anisotropic Lipid Domains : Imaging Two- Component Supported Double Bilayers by Atomic Force Microscopy.” 83(November): 2625–33.
- Lingwood, Daniel et al. 2011. “Cholesterol Modulates Glycolipid Conformation and Receptor Activity.” *Nature Chemical Biology* 7(5): 260–62. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nchembio.551>.
- Lorizate, Maier et al. 2013. “Comparative Lipidomics Analysis of HIV-1 Particles and Their Producer Cell Membrane in Different Cell Lines.” *Cellular Microbiology* 15(2): 292–304.
- Lozano, Mónica M. et al. 2013. “Colocalization of the Ganglioside GM1 and Cholesterol

- Detected by Secondary Ion Mass Spectrometry." *Journal of the American Chemical Society* 135(15): 5620–30.
- Luzzati, Vittorio, A Tardieu, and T Gulik-Krzywicki. 1968. "Polymorphism of Lipids." *Nature* 217: 652–56. <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/bj2940001>.
- Majewski, J, T L Kuhl, K Kjaer, and G S Smith. 2001. "Packing of Ganglioside-Phospholipid Monolayers : An X-Ray Diffraction and Reflectivity Study." *Biophysical Journal* 81(July): 2707–15.
- Marder, M, H L Frisch, J S Langer, and H M McConnell. 1984. "Theory of the Intermediate Rippled Phase of Phospholipid Bilayers." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81(20): 6559–61. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=391965&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Meinhardt, Sebastian, Richard L C Vink, and Friederike Schmid. 2013. "Monolayer Curvature Stabilizes Nanoscale Raft Domains in Mixed Lipid Bilayers."
- Milhiet, Pierre-emmanuel et al. 2002. "Spontaneous Insertion and Partitioning of Alkaline Phosphatase into Model Lipid Rafts." *EMBO* 3(5): 485–90.
- Owen, Dylan, Astrid Magenau, David Williamson, and Katharina Gaus. 2012. "The Lipid Raft Hypothesis Revisited – New Insights on Raft Composition and Function from Super-Resolution Fluorescence Microscopy." (d): 739–47.
- Pike, Linda J. 2006. "Report Rafts Defined : A Report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function." 47: 1597–98.
- Pike, Linda J, Xianlin Han, Koong-nah Chung, and Richard W Gross. 2002. "Lipid Rafts Are Enriched in Arachidonic Acid and Plasmenylethanolamine and Their Composition Is Independent of Caveolin-1 Expression : A Quantitative Electrospray Ionization / Mass Spectrometric Analysis †." *Biochemistry*: 2075–88.
- Prinetti, Alessandro, Vanna Chigorno, Guido Tettamanti, and Sandro Sonnino. 2000. "Sphingolipid-Enriched Membrane Domains from Rat Cerebellar Granule Cells Differentiated in Culture." *The Journal of Biological Chemistry* 275(16): 11658–65.
- Rappolt, M et al. 2000. "New Evidence for Gel-Liquid Crystalline Phase Coexistence in the Ripple Phase of Phosphatidylcholines." *European biophysics journal : EBJ* 29: 125–33.
- Robertson, J. 1960. *The Molecular Structure and Contact Relationships of Cell Membranes*.
- Rosetti, Carla M, Agustín Mangiarotti, and Natalia Wilke. 2017. "Biochimica et Biophysica Acta Sizes of Lipid Domains : What Do We Know from Artificial Lipid Membranes ? What Are the Possible Shared Features with Membrane Rafts in Cells ?" *BBA - Biomembranes* 1859(5): 789–802. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.01.030>.
- Ross, Michaela, Claudia Steinem, Hans-joachim Galla, and Andreas Janshoff. 2001. "Visualization of Chemical and Physical Properties of Calcium-Induced Domains in

- DPPC / DPPS Langmuir - Blodgett Layers." *Langmuir* 17(18): 2437–45.
- Sankaram, M B, and T E Thompson. 1991. "Cholesterol-Induced Fluid-Phase Immiscibility in Membranes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(19): 8686–90.
- Sankaram, Mantripragada B, and Thomas E Thompson. 1990. "Interaction of Cholesterol with Various Glycerophospholipids and Sphingomyelin1-." *Biochemistry* 29: 10670–75.
- Schechter, E. 1990. "Biochimie et Biophysique Des Membranes." 27: 4412.
- Scheiffele, Peter, Anton Rietveld, Thomas Wilk, and Kai Simons. 1999. "Influenza Viruses Select Ordered Lipid Domains during Budding from the Plasma Membrane *." *The Journal of biological chemistry* 274(4): 2038–44.
- Schmid, Friederike. 2017. "Physical Mechanisms of Micro- and Nanodomain Formation in Multicomponent Lipid Membranes." *BBA - Biomembranes* 1859(4): 509–28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.10.021>.
- Sezgin, Erdinc et al. 2016. "A Comparative Study on Fluorescent Cholesterol Analogs as Versatile Cellular Reporters." *Journal of Lipid Research* 57(2): 299–309. <http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.M065326>.
- Sezgin, Erdinc, Ilya Levental, Satyajit Mayor, and Christian Eggeling. 2017. "The Mystery of Membrane Organization: Composition, Regulation and Roles of Lipid Rafts." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18(6): 361–74. <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrm.2017.16>.
- Simons, Kai and van Meer, Gerrit. 1988. "Lipid Sorting in Epithelial Cells." *Biochemistry* 27.
- Simons, Kai, and Mathias J. Gerl. 2010. "Revitalizing Membrane Rafts: New Tools and Insights." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11(10): 688–99. <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrm2977>.
- Simons, Kai, and JI Julio L Sampaio. 2011. "Membrane Organization and Lipid Rafts." *Cold Spring Harbor ...* 3(10): 1–18. <http://cshperspectives.cshlp.org/content/3/10/a004697.full%5Cnhttp://cshperspectives.cshlp.org/content/3/10/a004697.short>.
- Simons, K, and E Ikonen. 1997. "Functional Rafts in Cell Membranes." *Nature* 387(6633): 569–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9177342>.
- Singer, Author S J, and Garth L Nicolson. 1972. "The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/1733071> REFERENCES Linked References Are Available on JSTOR for This Article : Structure." *Science* 175(4023): 720–31.
- Tardieu, A., Vittorio Luzzati, and F.C. Reman. 1973. "Structure and Polymorphism of the Hydrocarbon Chains of Lipids: A Study of Lecithin-Water Phases." *Journal of Molecular Biology* 75(4): 711–33.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283673903033>.

- Tenchov, Boris G, Haruhiko Yao, and Ichiro Hatta. 1989. "Time-Resolved X-Ray Diffraction and Calorimetric Studies at Low Scan Rates Sample Preparation." *Biophysical Journal* 56(4): 757–68. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(89\)82723-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(89)82723-7).
- Tessier, Cedric et al. 2009. "Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Liquid – Liquid Immiscibility under Non-Equilibrium Conditions in a Model Membrane : An X-Ray Synchrotron Study." *Biointerfaces* 74: 293–97.
- Topozini, Laura et al. 2014. "Structure of Cholesterol in Lipid Rafts." *American Physical Society* 113(22): 1–5.
- Vist, Margus, and James Davis. 1989. "Phase Equilibria of Cholesterol / Dipalmitoylphosphatidylcholine Mixtures : ²H Nuclear Magnetic Resonance and Differential Scanning Calorimetry *." (1971): 451–64.
- Wit, Gabrielle De, John S H Danial, Philipp Kukura, and Mark I Wallace. 2015. "Dynamic Label-Free Imaging of Lipid Nanodomains." 112(40): 12299–303.
- Wunderlich, Frank et al. 1975. "Thermotropic Lipid Clustering in Tetrahymena Membranes." *Biochemistry* 14(17).
- Zachowski, A. 1993. "Phospholipids in Animal Eukaryotic Membranes: Transverse Asymmetry and Movement." *Biochemical Journal* 294(1): 1–14. <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/bj2940001>.

Chapitre 2

Peptides pénétrants ou « *Cell-Penetrating Peptides* » (CPP)

La découverte de plusieurs petits peptides capables de traverser les membranes plasmiques remonte au début des années 90. Ces peptides ont été baptisés peptides pénétrants ou CPP (*cell-penetrating peptide*) car ils peuvent pénétrer dans le cytoplasme en passant à travers les membranes plasmiques, pourtant considérées comme imperméables aux molécules hydrophiles. Tout a commencé avec la découverte en 1988 de la protéine Tat du virus de l'immunodéficience humaine qui pouvait être internalisée par les cellules quand elle était ajoutée au milieu de culture (Frankel and Pabo 1988; Green and Loewenstein 1988). Les travaux de recherche focalisés sur la séquence peptidique responsable du phénomène d'internalisation ont conduit au peptide Tat qui correspond à une partie basique de la protéine (Vivès et al. 1997). En 1991, il a été trouvé que l'homéo-domaine de la protéine Antennapedia était capable d'être internalisé dans des cellules sans l'intermédiaire de récepteurs (A Joliot et al. 1991). Par la suite, il a été montré que c'est la troisième hélice de l'homéo-domaine (résidus 43 à 58) qui est nécessaire et suffisante pour le passage à travers la membrane. Ceci conduisit au développement de la pénétratine (Derossi et al. 1994) dont il sera souvent question dans cette thèse. Les CPP ont un fort potentiel thérapeutique. Généralement, certaines molécules comme les polypeptides et les oligonucléotides ont un intérêt thérapeutique limité à cause de leur rapide dégradation et leur faible capacité à passer à travers les membranes pour se trouver dans leur site d'action, le cytosol. Ainsi, les CPP ouvrent de nouvelles perspectives car ils permettraient de transporter à l'intérieur de la cellule différents types de molécules « cargaisons », incapables de pénétrer seules, tels que des peptides conjugués, des protéines, des oligonucléotides ou des nanoparticules (Dissanayake et al. 2017).

Ce chapitre présente certains des principaux CPP comme la pénétratine, régulièrement utilisée durant cette thèse, le peptide Tat ou encore divers peptides synthétiques. Le grand nombre de CPP ne nous permet pas de tous les présenter. Il sera également

question des différents modes d'internalisation de ces peptides dans une deuxième partie du chapitre.

1. Définition et classification

Il y a désormais plusieurs familles connues de CPP, la plupart dérivant de protéines naturelles dont est extraite la séquence minimale nécessaire à l'internalisation. Des peptides synthétiques non naturels capables de passer à travers la membrane ont également pu être découverts. Nous distinguerons 3 classes principales de CPP en fonction de leur origine. Il y a des peptides qui dérivent de protéines, des peptides chimériques qui sont formés par la fusion de deux séquences naturelles et des peptides synthétiques (Tableau 2). Il y a eu aussi des tentatives de classer les CPP en fonction de leur propriétés physico-chimiques (Milletti 2012; Ziegler 2008) ou de leur hydrophobicité (Madani et al. 2011).

Il existe différents types de CPP, mais il est possible de dégager certaines caractéristiques. Ce sont des peptides courts, qui n'excèdent généralement pas 30 résidus d'acides aminés et qui ont la capacité de traverser les membranes cellulaires. Leur internalisation dans la cellule semble se faire indépendamment de récepteurs. La plupart des CPP sont chargés positivement même si certains sont anioniques ou hydrophobes tels que HIV-gp41. La structure spatiale des CPP, en particulier leur structure secondaire, qui peut leur conférer un caractère amphipatique peut jouer en faveur d'une internalisation mais ceci n'est pas absolument nécessaire.

Peptide	Origine	Séquence	Référence
Peptides dérivés de protéines			
Pénétratine	Antennapedia (Drosophile)	RQIKIWFQNRRMKWKK	(Derossi et al. 1994)
Tat	Tat VIH-1	GRKKRRQRRPPQC	(Vivès et al. 1997)
pVEC	Cadhérine	LLIILRRRIRKQAHASK	(Elmqvist and Langel 2003)
Peptides chimères			
Transportan	Galanine/ Mastoparan	GWTLNSAGYLLKINLKAL AALAKKIL	(Pooga, Hallbrink, et al. 1998)
Pep-1	Transcriptase Reverse (VIH)/ Lien-antigène T (SV40)	KETWWETWWTEWSQP KKKRKV	(May C Morris et al. 2001)
MPG	gp41 (VIH)-lien- antigène T (SV40)	GALFLGFLGAAGSTMGA WSQPKKKRKV	(M. C. Morris et al. 1997)
Peptides d'origine synthétique			
Polyarginine	Tat	$(R)_n$ avec $6 < n < 12$	(Futaki et al. 2001; Mitchell et al. 2000)
RW9	RW16	RRWWRRWRR-NH ₂	(Delaroche et al. 2007)
Model Amphipatic Peptide (MAP)	Peptides antimicrobiens	KLALKLALKALKKAALKLA- NH ₂	(Oehlke et al. 1998)

Tableau 2. Exemples des CPP les plus étudiés.

Plusieurs mécanismes d'entrée des CPP ont été proposés et seront décrits plus loin dans ce chapitre. Les CPP diffèrent d'autres peptides utilisés comme molécules thérapeutiques en particulier des peptides reconnus par des récepteurs à la surface des cellules. En effet, ils peuvent être capturés par la cellule sans être reconnus par un récepteur y compris lorsque l'endocytose a été bloquée. Cette différence se révèle être très importante dans le cas où il faut libérer une molécule cargaison (c'est-à-dire la molécule qui est transportée par le peptide). Il faut signaler que les CPP et leur cargaison ne se retrouvent pas dans les lysosomes mais accèdent à d'autres compartiments moins sensibles à la dégradation, comme le noyau par exemple. Les paragraphes qui suivent présentent divers CPP ayant des propriétés variées.

2. Les peptides dérivés de protéines

2.1 La pénétratine

La pénétratine a été découverte suite à des expériences cherchant à analyser le rôle des homéo-domaines dans la morphogénèse des neurones. La pénétratine est une séquence de 16 acides aminés issue de la troisième hélice de l'homéodomaine d'Antennapedia. Cet homéodomaine est constitué de 60 résidus d'acides aminés répartis en trois hélices. La pénétratine correspond à la séquence composée des résidus 43 à 58 de l'homéodomaine. Tout l'homéodomaine est capable d'être internalisé mais la séquence minimale nécessaire pour l'internalisation est celle correspondant à la pénétratine. Il a été montré qu'elle peut adopter une structure en hélice α (Magzoub, Eriksson et al. 2002; Letoha, Gaal et al. 2003; Lindberg, Biverstahl et al. 2003; Christiaens, Grooten et al. 2004; Caesar, Esbjorner et al. 2006) à la différence d'autres peptides qui seront décrits plus loin comme les polyarginines ou Tat qui n'ont pas de structure particulière. La pénétratine adopte une structure en hélice α seulement dans un environnement hydrophobe (Derossi et al. 1994). Un récepteur chiral de membrane n'est pas nécessaire pour le passage à travers les membranes (Derossi, Calvet, and Trembleau 1996). En effet, Derossi et collaborateurs ont observé l'internalisation à la

fois de la séquence 43-58D et de la séquence 58-43. Il est très peu probable que ces deux peptides interagissent spécifiquement avec un récepteur qui reconnaîtrait une séquence précise d'acides aminés. La séquence du peptide 43-58D est identique à celle du peptide 43-58 mais est uniquement composée de D-énantiomères. Quant au peptide 58-43, il contient les mêmes résidus que la pénétratine mais la séquence des résidus est inversée. En outre ces deux peptides sont internalisés à 37°C et à 4°C ce qui suggère au moins un mécanisme non-endocytique.

D'après certains auteurs, la structure secondaire en hélice α de la pénétratine serait importante pour l'internalisation. Fisher *et al.* (Fischer et al. 2000) ont analysé l'importance de la structure secondaire en modifiant la conformation du peptide. Ils ont pu obtenir des peptides cycliques en additionnant des cystéines aux extrémités N et C puis en faisant une oxydation à pH élevé. La forme linéaire de la pénétratine était internalisée alors que la forme cyclique ne l'était pas. En greffant deux phénylalanines à la place des tryptophanes en position 48 et 56, le peptide n'est plus internalisé (Derossi et al. 1994). Cela signifie qu'au moins un des deux tryptophanes a un rôle crucial pour favoriser l'internalisation. Ainsi, de manière analogue, une étude (Mainguy et al. 2000) sur l'homéodomaine de la protéine Engrailed (un facteur de transcription qui intervient dans le développement embryonnaire) a montré qu'il est capable de pénétrer dans les cellules sans le tryptophane en position 56 si celui en position 48 est présent, ce qui révèle l'importance de ce résidu.

La pénétratine peut être internalisée entre 4°C et 37°C par un ou plusieurs mécanismes qui peuvent nécessiter ou non de l'énergie métabolique. Elle a accès au cytoplasme ainsi qu'au noyau (Derossi et al. 1994). L'internalisation de la pénétratine a été observée dans un grand nombre de types cellulaires et ne dépend pas de la concentration (entre 10 pM et 100 μ M). Ce peptide a des propriétés basiques grâce à la présence de trois résidus d'arginine (R) et de quatre de lysine (K) qui lui confèrent un point isoélectrique supérieur à 12.

Il a aussi été montré que sans ses extrémités N et C elle n'était pas internalisée (Derossi, Calvet, and Trembleau 1996; Derossi et al. 1994). Cela suggère que les résidus des extrémités sont très importants pour l'internalisation. Fisher *et al.* ont étudié l'impact de diverses troncations dans la séquence 43-58 de la pénétratine. La troncation de

l'extrémité C-terminale et le retrait du dernier résidu de lysine ont un effet négatif sur l'internalisation. Cependant, les troncations à l'extrémité N-terminale se sont révélées moins perturbantes comparées à la troncation de la lysine en C-terminal puisque 60 % de la pénétratine tronquée à l'extrémité N-terminale a été internalisée en comparaison avec la pénétratine entière. Plusieurs études ont confirmé le rôle important des résidus basiques de la pénétratine : Lys 58, Lys 57, Lys 55, Arg 53, Arg 52 et Lys 46. Le rôle des résidus hydrophobes est moins clair (Drin et al. 2001; Fischer et al. 2000). La plupart des études suggèrent que les résidus basiques et un tryptophane (au minimum) sont impliqués et nécessaires pour permettre l'internalisation cellulaire de façon efficace.

La pénétratine est un peptide capable d'induire différents changements dans les membranes selon la nature des lipides qui les composent. Un exemple a été étudié par Maniti *et al.* sur les phospholipides majoritaires du feuillet extracellulaire de la membrane plasmique des cellules eucaryotes (PC), du feuillet intracellulaire (PE) et des membranes microbiennes (PG et PE) (Ofelia Maniti et al. 2010). Le peptide, non-structuré en solution, était capable d'adopter différentes structures (hélice α et feuillet β) selon l'interaction avec les différents phospholipides. Avec les membranes PC et PE, la pénétratine est capable de se lier par des interactions électrostatiques et non électrostatiques en deux étapes. Dans la première étape, le peptide sépare les lipides puis dans la deuxième étape, les phospholipides se redistribuent dans une bicouche où les phospholipides sont plus compacts probablement grâce au changement structurel du peptide (Figure 27B, C). Dans le cas des membranes PC, la membrane reste assez fluide et le peptide reste « non structuré » (Figure 27B). Pour les membranes PE, la pénétratine acquiert une structure en hélice α permettant une plus grande compaction de la membrane. En solution, le peptide relativement peu structuré peut interagir avec différents phospholipides et adopter différentes structures. Dans le cas de phospholipides chargés négativement (PG), la pénétratine se lie en une seule étape, principalement par des interactions électrostatiques. La liaison du peptide au phospholipide entraîne une baisse de la mobilité de ce dernier qui provoque ainsi une baisse de la compaction membranaire (Figure 27). Dans le même temps, le peptide se structure et on trouve des contributions d'hélice α et de feuillet β .

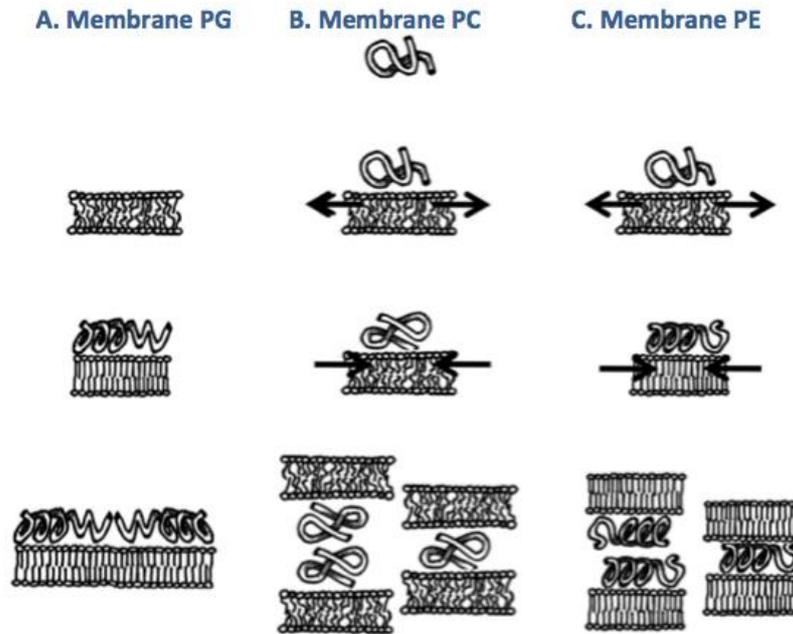


Figure 27. Modèle pour les interactions membrane-pénétratine. (A) L'association de la pénétratine avec les membranes de PG entraîne le changement conformationnel du peptide avec des contributions hélice α et feuillet β et une diminution de la fluidité de la membrane. (B) Pour les membranes PC, le peptide s'associe dans un processus en deux étapes mais demeure non structuré et ne change pas de façon notable la fluidité de la membrane. (C) Pour les membranes PE, la pénétratine interagit avec la membrane dans un processus en deux étapes avec un changement structurel (principalement hélice- α). Il en résulte une diminution de la fluidité de la membrane. Les flèches indiquent les mouvements de phospholipides induits par la pénétratine (Maniti 2010).

L'interaction de la pénétratine avec la membrane plasmique a été analysée par Maniti *et al.* (Ofelia Maniti et al. 2012) sur des vésicules géantes de membrane plasmique (GPMV). La pénétratine est capable de passer à l'intérieur des GPMV et d'induire des invaginations de la membrane (endocytose physique) par un mécanisme qui ne dépend pas de l'énergie métabolique.

La pénétratine utilise le processus d'endocytose des cellules mais peut aussi passer directement à travers la membrane. Des études biophysiques démontrent qu'elle affecte l'organisation supramoléculaire des lipides (généralement rendue plus importante par la présence de lipides anioniques) entraînant des changements dans la courbure de la membrane. Une telle courbure ou invagination de la membrane peut entraîner la formation de tubes ou de micelles inversées qui piègeront le peptide à

l'intérieur ou créeront un environnement propice pour traverser les bicouches lipidiques par translocation directe (I. D. Alves et al. 2010).

Plusieurs études ont montré l'internalisation cellulaire efficace de molécules hydrophiles liées à la pénétratine (Allinquant et al. 1995; F. Perez et al. 1994; Théodore et al. 1995). Différentes applications ont donc été développées grâce à l'homéodomaine d'Antennapedia, sa troisième hélice et d'autres variantes (Derossi, Chassaing, and Prochiantz 1998; Prochiantz 2000). Ainsi, la pénétratine et ses dérivés ont permis l'internalisation de molécules, de protéines, d'oligonucléotides ou encore d'oligopeptides à l'intérieur de cellules *in vivo* et *in vitro*. Une des premières applications a été de lier des oligonucléotides portant un groupe thiol à la cystéine présente entre la deuxième et la troisième hélice de l'homéodomaine d'Antennapedia (Troy and Greene 1996). Cet homéodomaine a aussi été utilisé pour transporter des polypeptides recombinants de différentes tailles. Dans le cas de la pénétratine, on peut la synthétiser avec une cystéine à l'extrémité N-terminale ce qui facilite la formation d'un pont disulfure avec le thiol présent dans la cargaison. Avec cette méthode, la cargaison est relâchée dans le cytoplasme suite à la rupture du pont disulfure dans le milieu réducteur du cytoplasme (Figure 28).

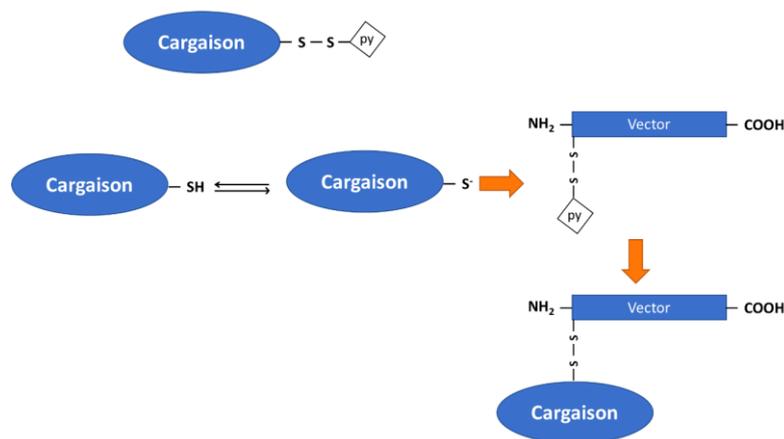


Figure 28. Mode de couplage de la pénétratine avec des cargaisons à l'aide un groupe thiol (Ü. Langel 2007).

La pénétratine est capable de transporter des acides nucléiques peptidiques (ANP) qui sont naturellement très peu internalisés par les cellules. L'internalisation *in vitro* de ces acides nucléiques peptidiques (les bases sont similaires à celle de l'ADN) a été constatée

dans des cellules tumorales de prostate (Simmons et al. 1997) et dans des cellules de mélanome (Villa et al. 2000). Il est également possible de transporter des molécules de haut poids moléculaire dans des cellules (*in vitro*) comme Engrailed, HoxA-5, HoxB-4 et Pax-6 (Chatelin et al. 1996; A Joliot et al. 1998; Maizel et al. 1999). La pénétratine a aussi été utilisée pour transporter des principes actifs comme la doxorubicine, médicament anti-cancéreux. En effet, Mazel *et al.* (Mazel et al. 2001) ont lié de façon covalente la doxorubicine à l'extrémité N-terminale de la pénétratine. Ce système s'est montré 20 fois plus efficace pour tuer les cellules K562 que la doxorubicine seule.

2.2 Le peptide Tat

La protéine régulatrice Tat codée par le VIH est essentielle pour la réplication du virus (Dayton et al. 1988). Elle est constituée de 86 acides aminés, favorise la maturation de l'ARN polymérase et la transcription en s'associant à d'autres protéines. Le groupe d'Eric Vivès et Bernard Lebleu ont synthétisé un peptide contenant les acides aminés 38 à 60. Ce peptide est assez court pour éviter la toxicité liée aux longs peptides dérivés de la protéine Tat (A. Perez et al. 2001; Sabatier et al. 1991). La zone qui s'étend des acides aminés 37 à 72 contient deux régions structurales importantes :

- La portion N-terminale (résidus d'acides aminés 39 à 49) qui adopte une configuration en hélice α amphipatique ;
- Une zone de résidus d'acides aminés basiques (49 à 59).

Le peptide contenant les acides aminés 38 à 60 possède donc ces domaines et peut être internalisé dans différents types de cellules (Fawell et al. 1994). L'importance de la région basique a été montrée par la très faible internalisation d'un peptide contenant toute l'hélice α mais avec des délétions dans le domaine C-terminal contenant les résidus basiques (38 à 54). Les différentes études ont montré que la séquence riche en résidus basiques (Arg – Lys – Lys – Arg – Arg – Gln – Arg – Arg - Arg) était nécessaire et suffisante pour permettre l'internalisation. Différentes équipes (Frankel and Pabo 1988; Green and Loewenstein 1988) ont montré que la protéine Tat purifiée pouvait être internalisée dans les cellules. Plusieurs applications réussies d'internalisation cellulaire avec ce peptide ont été réalisées. Notamment la prévention de l'apoptose *in vivo* par

l'association Tat-FLIP (un inhibiteur de la caspase 8) (Sugioka et al. 2003), ou l'induction de l'apoptose dans des cellules cancéreuses par des mutants de la survivine (protéine appartenant à la famille des inhibiteurs d'apoptose et qui inhibe l'activation de la caspase) liés au peptide Tat. L'effet anti-tumeur de Tat conjugué au peptide P15 (inhibiteur de la caséine kinase 2 (CK2)) a aussi été démontré sur différentes lignées de cellules tumorales en induisant leur apoptose (Bolhassani, Jafarzade, and Mardani 2017; Kristensen, Birch, and Nielsen 2016; Perea et al. 2004). Fawell *et al.* (Fawell et al. 1994) ont montré que des protéines recombinantes pontées à un peptide Tat contenant la séquence basique de la protéine Tat (résidus d'acides aminés 37 à 72) pouvaient être internalisées dans différents types cellulaires. De la même manière, une séquence plus courte (résidus d'acides aminés 37 à 62) a permis l'internalisation d'un fragment d'anticorps Fab (Anderson et al. 1993).

3. Les peptides chimères

3.1 Le transportan

Le transportan fait partie des peptides chimères. Le précurseur du transportan, le galapran, est formé par un fragment du neuropeptide galanine (résidus 1 à 13) et par le mastoparan qui est un peptide contenu dans le venin des guêpes. Le but était de créer un ligand pour les récepteurs de la galanine. Le mastoparan (H-Ile-Asn-Trp-Lys-Gly-Ile-Ala-Ala-Met-Ala-Lys-Leu-Leu-NH₂) a la capacité d'interagir avec les lipides des membranes plasmiques. Le mastoparan pénètre dans la membrane cellulaire où il engendre des pores transitoires, il inhibe le transport vésiculaire de l'appareil de Golgi et facilite la création de pores dans les mitochondries (Pooga, Hällbrink, et al. 1998). La fusion à l'extrémité C-terminale avec le galapran a permis donc d'améliorer l'affinité du peptide pour les membranes (U. Langel et al. 1996). C'est la substitution d'une proline par une lysine dans la séquence de la galanine qui a permis de passer du galapran au transportan (Tableau 2). Il peut rapidement se retrouver à l'intérieur des cellules (cellules de mélanome de Bowes) à basse et haute température, sans utiliser l'endocytose ou un transport actif (Pooga, Hällbrink, et al. 1998).

Le groupe de Margus Pooga et Ulo Langel ont montré, en incubant des cellules avec du transportan couplé à la biotine qu'une minute à 37°C était suffisante pour que le transportan soit inséré dans la membrane plasmique. Après 5-10 min, le transportan se retrouve dans l'enveloppe nucléaire, à l'intérieur du noyau et dans les structures membranaires intracellulaires. En baissant la température, l'internalisation est moins rapide mais elle n'est pas inhibée. Le mécanisme d'entrée du transportan reste cependant inconnu. Il a été montré que la partie C-terminale du transportan (mastoparan) pénètre rapidement dans les membranes cellulaires (Soomets et al. 1997). De plus, la partie mastoparan du transportan semble importante pour l'internalisation du peptide. En retirant deux résidus de la partie N-terminale du mastoparan, l'internalisation est similaire dans des cellules de Bowes. Cependant, en retirant un des résidus de lysine, il n'y a plus d'internalisation ce qui montre l'importance de la présence de charges positives pour la pénétration cellulaire (Soomets et al. 2000).

Le transportan permet non seulement le transport de petites biomolécules hydrophiles telles que des peptides ou des oligonucléotides mais aussi d'autres protéines à l'intérieur des cellules (Schwarze, Hruska, and Dowdy 2000). Tsien *et al.* (Tsien 1998) ont utilisé un pont disulfure pour greffer sur le transportan la protéine GFP (*Green Fluorescent Protein*) (26,9 kDa). L'incubation des cellules COS-7 pendant 10 min avec le peptide et sa cargaison à une concentration 0,5 µM a été suffisante pour que la GFP s'insère dans la membrane et se retrouve dans le cytosol. En 1h, presque la totalité de la fluorescence de la GFP était localisée dans la membrane plasmique. Le transportan s'est aussi montré capable de transporter des molécules plus grosses comme l'avidine (70 kDa) et des anticorps (environ 150 kDa). Dans ces cas, l'agent pontant SMCC (succinimidyl 4-(N-maléimidométhyl)-cyclohexane-1-carboxylate) (Peeters et al. 1989) a été utilisé pour lier le peptide à la cargaison.

Islam *et al.* (2017) ont montré que la tension mécanique peut induire une augmentation de la perméabilité des membranes aux substances telles que les CPP, sans formation de pores. Ils ont pu voir que le CF-TP10 (transportan 10, un analogue tronqué du transportan de séquence : AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH₂) pénètre dans le lumen de GUV (composées de DOPG et de DOPC au rapport molaire 2/8) avant la perméabilisation de la membrane par de l'Alexa Fluor hydrazide 647 (AF647) et donc avant la formation

de pores. La fraction de CF-TP10 qui entre avant la formation de pores et la vitesse de rupture de la membrane augmentent avec la tension. L'étirement de la membrane dû à une tension appliquée accroît les fluctuations thermiques et ainsi augmente la formation de pré-pores transitoires. Islam et ses collaborateurs ont suggéré que l'internalisation de CPP peut se faire à travers des pré-pores hydrophiles transitoires dans la bicouche. Dans les bicouches lipidiques, des fluctuations thermiques entraîneraient la formation de zones de faible densité qui peuvent être considérées comme des pré-pores (Levadny et al. 2013; Sharmin et al. 2016). Ceci serait le principal facteur responsable de l'augmentation du passage de CF-TP10 de la monocouche externe à la monocouche interne. Les auteurs ont proposé que le déséquilibre dans la concentration de CF-TP10 entre les deux monocouches provoquerait un étirement de la monocouche interne, ce qui favoriserait la formation de pré-pores, et ainsi CF-TP10 passerait de la monocouche externe à la monocouche interne en diffusant à travers les parois des pré-pores hydrophiles de structure toroïdale (Islam et al. 2017).

3.2 Pep-1

Le peptide Pep-1 (*Synthetic peptide carrier Pep-1*) est l'un des CPP les plus étudiés. Il est proche d'un autre peptide appelé MPG qui comporte deux séquences particulières : une hydrophobe provenant de la protéine gp41 du VIH (GALFLGFLGAAGSTMGA, formant le côté N-terminal) et l'autre provenant de l'antigène T du virus SV40 (KKKRKV, hydrophile, du C-terminal). Pour obtenir Pep-1, une séquence riche en tryptophane (KETWWETWWTE) qui vient de la transcriptase inverse du VIH, prend la place du domaine hydrophobe de gp41. Les deux parties sont liées par une suite de quatre acides aminés : WSQP. Pep-1 présente une grande efficacité d'internalisation cellulaire et une faible toxicité (May C Morris et al. 2001). Alors que beaucoup d'autres CPP forment des liaisons covalentes avec leur cargaison, Pep-1 peut former des complexes non-covalents avec différents peptides, protéines et nanoparticules (Gros et al. 2006).

Des recherches utilisant des membranes modèles ont suggéré que Pep-1 pourrait pénétrer directement à travers la membrane cellulaire plutôt que par un mécanisme d'endocytose (Sebastien Deshayes et al. 2004). Ce peptide a une affinité importante pour les membranes neutres comme pour celles chargées négativement.

Pep-1 en contact avec les membranes peut adopter une conformation en hélice- α quand sa concentration est suffisante (à partir de 3mg/mL). Ceci a été montré par dichroïsme circulaire. La RMN a ensuite permis de définir que le segment 4-13 (région N-terminale hydrophobe) adopte une structure hélicoïdale- α (Sebastien Deshayes et al. 2004). Cette structure en hélice du Pep-1 est importante pour comprendre le processus de passage à travers la membrane de ce peptide. En se basant sur des résultats de fluorescence, Heitz *et al.* ont d'abord proposé que la translocation implique la formation d'une structure transitoire transmembranaire en forme de pores (Sebastien Deshayes et al. 2004). Ils en ont déduit que les résidus de tryptophane de l'hélice α sont intégrés dans un environnement hydrophobe, ce qui serait compatible avec les interactions Pep-1-membrane qui placent l'axe hélicoïdal perpendiculairement au plan de la membrane. Cependant, les études par RMN de Weller *et al.* avec une sonde radicalaire ont révélé une périodicité de trois acides aminés dans l'atténuation du signal, ce qui les a amenés à conclure que ce CPP est parallèle à la surface des micelles DPC/SDS (dodécylphosphatidylcholine deutérée et dodécylsulfate de sodium) (Weller et al. 2005). Ding *et al.* ont démontré que sur des bicouches lipidiques en phase gel, les molécules Pep-1 sont adsorbées à la surface avec notamment des structures de type feuillet- β , et sur des bicouches lipidiques en phase fluide, avec une structure en hélice- α (Ding and Chen 2012). Ainsi, comme la pénétratine, le peptide pep-1 change de conformation en fonction de l'environnement et des conditions. Ils montrent également que le comportement de pep-1 (avec des membranes de POPG) dépend de la concentration. A forte concentration (7 μ M) l'orientation de la partie hélicoïdale de pep-1 est aléatoire alors qu'à plus basse concentration (0,28 μ M), ce domaine hélicoïdal est orienté plutôt perpendiculairement à la bicouche (Figure 29).

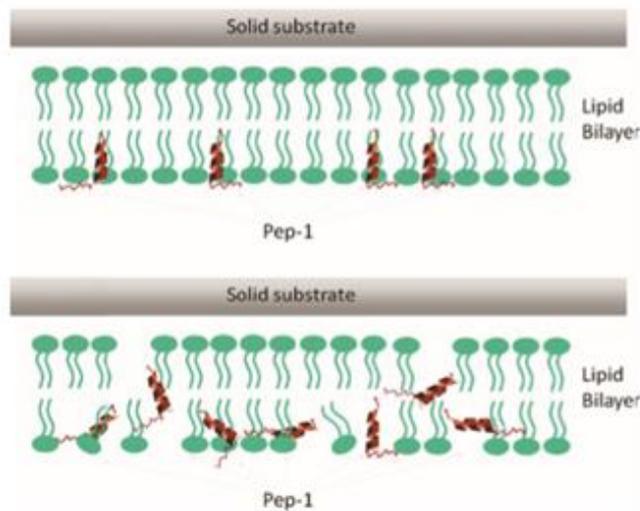


Figure 29. Illustration du comportement différent de pep-1 en fonction de la concentration. A des concentrations faibles le domaine hélicoïdal est orienté perpendiculairement au plan de la bicouche alors qu'à fortes concentrations, son orientation est aléatoire (Ding and Chen 2012).

4. Les peptides synthétiques

4.1 Les polyarginines et dérivés

Une étude menée par Wender et collaborateurs (Wender et al. 2000) sur la séquence 49-57 du peptide Tat a montré l'importance de certains résidus pour l'internalisation. Premièrement, ils constatent l'importance des résidus basiques : substituer un résidu basique par une alanine entraîne une moins bonne internalisation. Deuxièmement, supprimer les résidus en position N-terminale ou C-terminale (RK ou RR, respectivement) a aussi un effet négatif sur l'internalisation. Mitchell *et al.* ont utilisé la microscopie confocale pour montrer l'internalisation d'oligomères de D et L-arginine dans des cellules de Jurkat. Les oligomères composés d'autres acides aminés basiques tels que la lysine ou encore l'histidine n'ont pas cette capacité. Ils ont également déterminé que l'internalisation n'est possible qu'avec au moins six résidus d'arginines. Cependant, une trop grande quantité d'arginine nuit aussi à l'internalisation (Mitchell et al. 2000).

L'internalisation des peptides riches en arginine est similaire à celle obtenue avec le peptide Tat. Il existe différents peptides riches en arginines comme R4, R6 et R8 ou encore R9 et RW9. Ce dernier (dont la séquence est RRWWRRWRR) n'est donc pas constitué exclusivement de résidus d'arginines, mais également de résidus de tryptophane dont on a vu précédemment l'importance pour l'internalisation. Cependant l'internalisation de ces différents peptides n'est pas toujours identique. En effet, des observations en microscopie de fluorescence ont montré des différences dans l'efficacité d'internalisation dans des macrophages de souris RAW264.7 pour trois polyarginines différents. R4 semble avoir une faible capacité d'internalisation alors que R6 et R8 présentent une internalisation et une accumulation dans le noyau. Le degré d'internalisation diminue au fur et à mesure que le nombre de résidus augmente. Pour le peptide R16, l'internalisation n'est plus significative (Futaki et al. 2001).

Comme nous l'avons dit précédemment, l'internalisation de R9 semble suivre le même mécanisme d'action que celui décrit pour le peptide Tat ce qui est logique puisque les polyarginines ont été synthétisés en simplifiant la séquence de Tat. Ainsi, il a été montré que le peptide R9 perturbe fortement la membrane des GUV (Lamazière 2007). Herce et ses collaborateurs (Herce et al. 2009) ont émis l'hypothèse que ce peptide, après s'être lié à la surface de la bicouche via les groupes phosphate des phospholipides, produirait de grandes distorsions locales menant à la formation d'un pore toroïdal transitoire. Une fois le pore formé, les peptides se déplaceraient en diffusant à la surface du pore (Herce et al. 2009).

Witte *et al.* ont également montré des différences dans l'internalisation de RW9 et RL9. Si les deux peptides augmentent la flexibilité de la membrane, l'effet est plus important pour RW9 sur des membranes POPG. En raison de leur placement à l'interface lipide/eau, ils augmentent le volume disponible pour les chaînes acyle étroitement liées des phospholipides voisins. La réduction des paramètres d'ordre qui a alors lieu augmente la flexibilité de la membrane (Witte et al. 2013). Un autre paramètre important semble être la quantité de calcium intracellulaire. En effet, l'augmentation de la quantité de calcium intracellulaire permet d'augmenter la perméabilité de la membrane plasmique au peptide R9-TAMRA (Melikov et al. 2015). Walrant *et al.* (2011) ont montré que R9 et RW9 présentent la même capacité d'internalisation à 4°C et 37°C

(à 4°C la seule voie d'internalisation est le passage direct) alors que RL9 n'est pas internalisé. Les peptides riches en arginine étant positivement chargés, ils se lient aux membranes avec le groupe guanidinium qui a une forte affinité pour les têtes polaires des lipides. R9 et RW9 ont plus d'affinité pour les membranes chargées négativement que RL9 et augmentent davantage la fluidité de la bicouche. En quantifiant l'internalisation par spectrométrie de masse MALDI-TOF, Walrant *et al.* (Walrant et al. 2013) ont montré que le peptide RW9 peut traverser différents types de membranes modèles (POPG et POPC/POPG) à la différence de RL9 qui ne rentre pas, mais qui reste piégé dans la membrane.

Derossi *et al.* (Derossi, Chassaing, and Prochiantz 1998) ont pu synthétiser un peptide analogue de la pénétratine, formant une hélice α et contenant 16 résidus d'acides aminés, RW16. Ce peptide peut former une hélice α amphipatique avec les arginines chargées d'un côté et les tryptophanes de l'autre. Williams *et al.* (Williams et al. 1997) ont montré que RW16 est internalisé dans des myoblastes.

4.2. Le peptide amphipatique modèle (MAP)

Le terme MAP (*Model amphipathic peptides*) désigne un groupe de peptides dérivés du peptide modèle en hélice α amphipatique KLALKLALKLAAALKLA-NH₂ (Krause et al. 1995; Steiner et al. 1991). Il a été montré que le caractère amphipathique de MAP favorise son passage à travers les membranes à l'aide d'un mécanisme non-endocytaire (Oehlke et al. 1998), mais il n'est pas non plus absolument nécessaire à l'internalisation. En effet, les analogues non-amphiphiles des MAP sont également internalisés. Cependant, les propriétés amphipathiques favorisent la liaison des MAP. Le peptide MAP a montré son efficacité dans le transport d'oligonucléotides et de PNA dans les cellules (Oehlke et al. 2004, 2005).

Enfin, il existe un autre type de système développé par Okuyama (Okuyama et al. 2007) et Prochiantz (Alain Joliot and Prochiantz 2008) qui ont synthétisé des molécules mimant une hélice α amphipatique. Ces molécules sont appelées SMOc (*Small-Molecule Carriers*). Ces petites molécules, rentrent dans la cellule par un mécanisme d'endocytose

dépendant de la clathrine. En effet, les SMOc ne sont pas internalisées à basse température ni avec de la chlorpromazine qui dégrade la clathrine.

5. Les peptides antimicrobiens

Ces peptides, assez proches des CPP, sont constitués généralement d'une séquence de 20 à 30 résidus d'acides aminés et le plus souvent chargés positivement. Au voisinage des membranes, ils se structurent majoritairement en hélice α amphipatique (Brogden 2005). Leur affinité pour les membranes est bonne et ils peuvent les déstabiliser en provoquant la formation de pores. Ceci fait que certains peptides antimicrobiens peuvent traverser les membranes (Hara et al. 2001; L. Zhang, Rozek, and Hancock 2001). Pour qu'un peptide antimicrobien puisse agir comme CPP, il faut que les pores formés soient transitoires pour que la membrane puisse se reformer et pour que la cellule ne perde pas son contenu cellulaire, provoquant sa mort. Il existe plusieurs peptides antimicrobiens capables d'être internalisés comme les magainines ou encore les dermaseptines. Il a notamment été montré que la magainine 2, composée de 23 résidus et structurée en hélice α , entraîne une forte perméabilisation des membranes de cellules HeLa et de fibroblastes. Cependant, ce peptide, en entrant dans le cytoplasme, cause la mort des cellules quand sa concentration est supérieure à 10 μM (Takeshima et al. 2003).

6. Modes d'internalisation

La membrane cellulaire est une barrière sélective qui régule les flux de molécules entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Cette barrière sépare les régions intracellulaires de l'environnement extracellulaire pour maintenir l'homéostasie cellulaire. Ainsi, les molécules hydrophiles extracellulaires, comme les peptides, les protéines et acides nucléiques, ont difficilement accès à l'intérieur de cellules. L'exception est le passage d'ions et de petites molécules transportés par des canaux spécifiques et des

transporteurs lors de la stimulation avec des ligands. Les CPP se sont montrés capables de transporter des molécules bioactives dans la cellule, en particulier des acides nucléiques et des principes actifs (J. Lee, Kennedy, and Waugh 2015; Takeuchi and Futaki 2016).

Les premières études concernant la pénétratine, le peptide Tat ou encore R9 indiquent que ces peptides rentrent dans les cellules par une voie passive indépendante de la température, ne nécessitant pas de récepteurs (Derossi et al. 1994; Futaki et al. 2001; Vivès et al. 1997). L'inhibition de l'endocytose avec différents inhibiteurs classiques (chloroquine, cytochalasine D, nocodazole, colchicine et nystatine par exemple) n'empêche pas le passage à travers la membrane (Suzuki et al. 2002). Ainsi, il a été suggéré que les peptides entreraient par passage direct en perturbant physiquement la membrane. Plusieurs études ont rapporté que la visualisation de l'internalisation des CPP par les cellules peut être affectée par des artefacts causés par la fixation des cellules en microscopie confocale (Lundberg and Johansson 2002; Richard et al. 2003). Ainsi, en commençant à observer des cellules non fixées, l'hypothèse d'un mécanisme d'endocytose faisant intervenir des domaines radeaux a été suggéré (Wadia, Stan, and Dowdy 2004). Divers mécanismes de pénétration cellulaire ont été proposés pour les CPP, certains se produisant simultanément, pour faire entrer les différents types de systèmes peptide/cargaison (Khandia et al. 2017). Khandia et collaborateurs distinguent différents types de mécanismes indépendants de l'endocytose comme le modèle des tapis, des micelles inverses et des pores en tonneau ou toroïdaux. Dans le modèle des tapis, les résidus hydrophobes font face à la membrane plasmique et l'accumulation locale entraîne des perturbations dans la charge électrique de la membrane, puis des micelles se forment. Elles sont ensuite internalisées à travers un pore transitoire. Le modèle des micelles inverses est indépendant de l'énergie, et la structure micellaire, temporaire, atteint le cytosol. Le CPP est entouré par un environnement hydrophile. Dans le modèle du pore toroïdal, le peptide est associé aux têtes des lipides environnants. Le modèle des pores tonneaux est décrit pour les structures amphipatiques en hélice α . Ces pores font moins de 10 nm de diamètre.

Généralement, les processus d'internalisation sont dictés par les propriétés physico-chimiques des molécules et par la biologie de la cellule comme par exemple les

mécanismes d'endocytose. Mais il y a également des processus qui font intervenir des interactions directes avec la membrane plasmique comme ceux décrits pour les peptides antimicrobiens. Certains auteurs suggèrent des mécanismes qui agissent de la même manière que les virus et qui font intervenir différentes voies d'endocytose (Pelkmans and Helenius 2003). D'autres auteurs ont proposé des mécanismes qui impliquent également la courbure des lipides et la formation de pores transitoires dans la membrane (M. T. Lee et al. 2005). Quelques travaux suggèrent aussi des mécanismes qui font intervenir des récepteurs. Ezzat et al. ont montré que le peptide PepFect14 qui forme des complexes non-covalents avec des oligonucléotides entre dans les cellules HeLa grâce à des récepteurs SCARA (Ezzat et al. 2017).

Plusieurs paramètres ont une influence sur l'internalisation comme le poids moléculaire de la cargaison, la nature des liaisons entre le CPP et la cargaison, le type cellulaire, la concentration locale en peptide, la composition lipidique locale, la température ou encore le temps d'incubation (Duchardt et al. 2007; El-andaloussi, Arver, and Johansson 2007; Jiao et al. 2009; Kauffman et al. 2015; Tashima 2017). Les paragraphes suivants résument les principaux mécanismes proposés pour l'internalisation des peptides vecteurs.

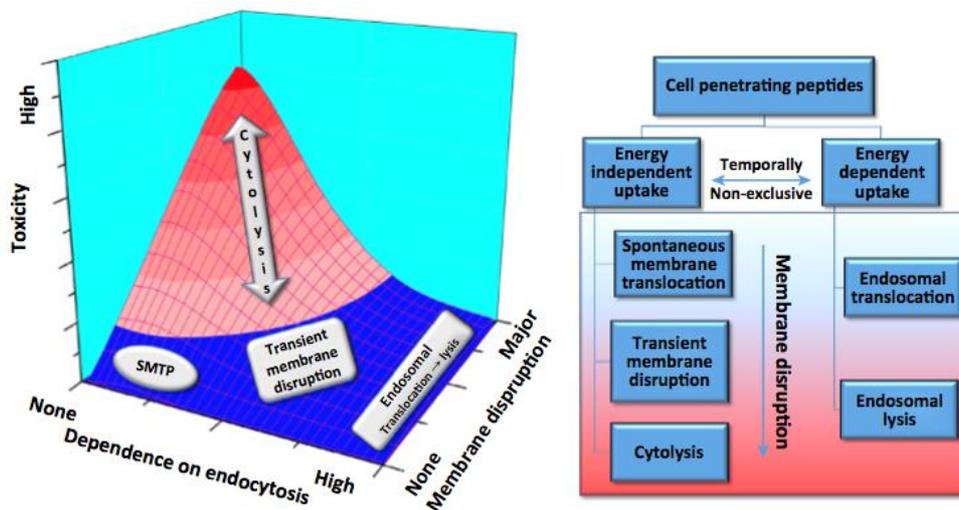


Figure 30. Un paysage putatif pour les processus d'internalisation de CPP en fonction de la façon dont ils interagissent avec les cellules. Les axes x et y représentent l'endocytose et la perturbation de la membrane respectivement. La toxicité (axe z) résulte de la perméabilisation de la membrane plasmique, mais pas de la perméabilisation endosomale. Pour cette raison, les régions à faible altitude du paysage (bleu) sont utiles pour les CPP (d'après (Kauffman et al. 2015)).

Pour décrire le mécanisme par lequel un peptide traverse les membranes et livre une cargaison, il est primordial de déterminer si son internalisation est active, c'est-à-dire dépendante de l'énergie cellulaire, ou passive (indépendante de l'énergie cellulaire) et dans quelle mesure il perturbe les membranes (Figure 30) (Kauffman et al. 2015).

Dans la figure 31 sont illustrées les différentes possibilités du devenir des CPP en fonction de leurs propriétés et des mécanismes cellulaires impliqués.

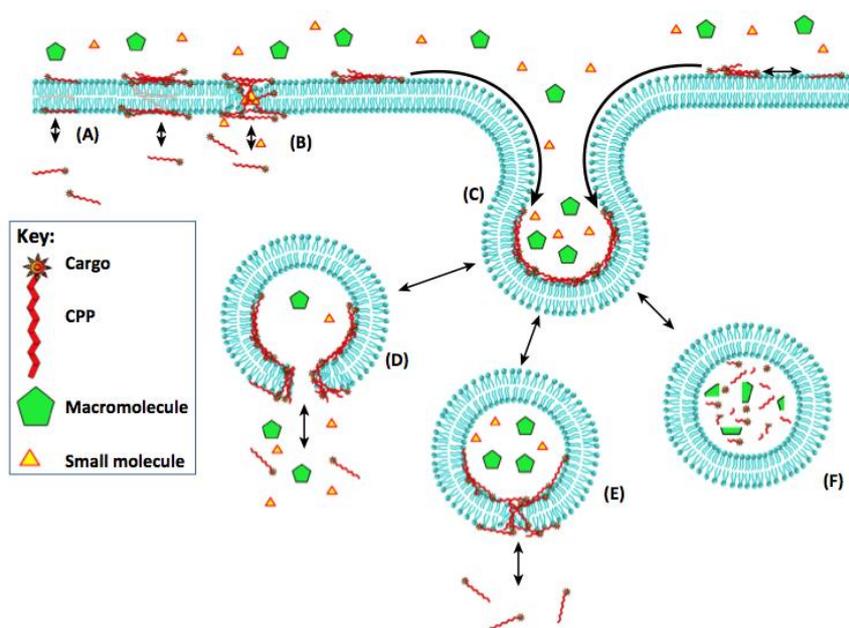


Figure 31. (A) Passage spontanée à travers la membrane plasmatique, qui se produit sans auto-assemblage peptidique ou perturbation (perméabilisation) de la membrane. (B) Passage à travers la membrane plasmatique par perméabilisation transitoire. (C) Endocytose du complexe peptide-cargaison lié à la membrane. (D) La lyse de la membrane endosomale, ou une perturbation à grande échelle, libère le conjugué CPP-cargaison et toutes les molécules co-encapsulées. (E) Le passage à travers la membrane endosomale fait passer le CPP et la cargaison attachée, mais pas les molécules co-encapsulées. (F) Si le CPP n'arrive pas à sortir de l'endosome il suivra la voie de dégradation lysosomale ou la voie de recyclage des endosomes (d'après (Kauffman et al. 2015)).

6.1 Endocytose

Les CPP classiques, hautement cationiques, interagissent probablement avec toutes les molécules anioniques qu'ils rencontrent, les glycoconjugués de la surface cellulaire, les lipides anioniques et les protéines membranaires. Au-delà d'une concentration seuil probablement unique pour chaque complexe peptide-cargaison, leur liaison à la surface

des cellules pourrait déclencher leur regroupement suivi par leur endocytose (Jiao et al. 2009; Palm-apergi, Lorents, and Pooga 2009).

Des images de microscopie confocale de cellules incubées avec R9 et marquées avec un colorant montrent que R9 est efficacement endocyté (Säälik et al. 2011). Une fois concentrés et internalisés dans les endosomes, les CPP pourraient passer à travers les membranes endosomales ou bien atteindre une concentration locale assez élevée pour causer la rupture de la membrane endosomale, ce qui entraînerait une libération des peptides et de leur cargaison dans le cytosol. Le passage à travers la membrane endosomale, ou sa perturbation voire sa rupture, peuvent être déclenchés ou aidés par d'importants changements dans la composition en lipides et dans la stabilité de cette membrane qui surviennent pendant la maturation de l'endosome (S. Yang et al. 2010), ou par d'autres facteurs environnementaux spécifiques à l'endosome tels que le pH luminal acide et donc le gradient de pH transmembranaire.

Il est également possible que le CPP et la cargaison restent piégés dans les endosomes et n'atteignent jamais le cytosol. D'autant plus que les CPP sont composés d'acides aminés L et peuvent donc être soumis à une dégradation protéolytique après internalisation. La dégradation des peptides peut commencer peu après l'absorption et peut être presque entièrement terminée en 1 à 2 heures. Si les conditions requises pour le passage à travers la membrane ou pour la perturbation de l'endosome ne sont pas atteintes pendant cette durée, le peptide et éventuellement la cargaison seront dégradés ou recyclés sans atteindre le cytosol (Y. Lee, Datta, and Pellois 2008; Palm et al. 2007).

Au-delà de la concentration en peptide nécessaire pour l'internalisation active, certains CPP peuvent atteindre une concentration locale suffisamment élevée sur la membrane plasmique pour former des zones riches en peptides (Duchardt et al. 2007). Ces groupements des peptides peuvent perturber de façon transitoire la membrane et favoriser le passage du peptide et de la cargaison vers le cytosol (Herce et al. 2009b). Par exemple, le peptide R9, marqué avec le colorant TAMRA (tétraméthylrhodamine), peut entrer dans les cellules en passant directement à travers la membrane plasmique pour des concentrations supérieures à 10 mM, mais pas à 5 mM ou moins (Melikov et al. 2015). Curieusement, la perméabilité transitoire de la membrane plasmique est

inhibée par l'appauvrissement en ATP cellulaire et par l'épuisement du calcium intracellulaire (Melikov et al. 2015), suggérant que la cellule, par un mécanisme inconnu, pourrait être un participant actif dans la perméabilisation transitoire de la membrane plasmique.

Le seuil à atteindre pour les concentrations locales en CPP qui permettent l'absorption ou la translocation du CPP à travers la membrane plasmique est variable, car il dépend de la séquence peptidique, de la cargaison et du type cellulaire.

L'endocytose est un phénomène naturel qui a lieu dans les cellules et qui peut être déclenché par des interactions avec les divers composants de la membrane plasmique. Quand les CPP se lient aux glycosaminoglycanes (GAG), ils entrent grâce au cycle de recyclage des GAG qui sont constamment internalisés (Belting et al. 2003). Ils peuvent aussi entrer en déclenchant l'endocytose en se liant aux GAG, en activant des signaux intracellulaires et un remodelage de l'actine (I. D. Alves et al. 2009; Poon and Gari 2007; Ziegler 2008).

La macropinocytose est contrôlée par la polymérisation d'actine qui est induite par l'activation de récepteurs à tyrosine kinase. Les protrusions membranaires formées vont s'effondrer et fusionner avec la membrane plasmique pour créer de grosses vésicules appelées des macropinosomes. Ces vésicules font entre 1 et 5 μm de diamètre (Figure 32). C'est donc une voie non sélective pour l'internalisation de macromolécules, de nutriments ou encore d'antigènes. La macropinocytose a été impliquée dans l'internalisation de polyarginines (Nakase et al. 2004a) et également dans celle de Tat (Wadia, Stan, and Dowdy 2004).

Il y a au moins deux mécanismes pour l'internalisation des polyarginines, l'endocytose et la translocation directe, qui dépendent fortement de la concentration et de la taille du peptide. Duchardt *et al.*, ont démontré que pour le peptide R9, la macropinocytose dans les cellules HeLa a lieu à des concentrations inférieures à 10 μM . Au contraire, la translocation directe est favorisée à plus haute concentration (Duchardt et al. 2007). Le peptide R8, quant à lui, est capable d'atteindre le cytosol et le noyau des cellules à 4°C donc dans un cas où les phénomènes cellulaires dépendants d'énergie, et en particulier l'endocytose, sont supprimés (Nakase et al. 2004).

Pour le peptide Tat, l'inhibition de la macropinocytose, par l'éthylisopropylamiloride, (EIPA) entraîne une diminution de l'internalisation ce qui conforte la macropinocytose comme une voie d'entrée importante (Kaplan, Wadia, and Dowdy 2005; Wadia, Stan, and Dowdy 2004). Mishra et collaborateurs (Mishra et al. 2011) ont proposé avec un système de GUV chargées en actine, que le peptide peut passer à travers la membrane et déclencher, grâce à sa capacité à interagir avec l'actine du cytosquelette, la macropinocytose. Ceci favoriserait l'entrée de cargaisons de grande taille. Cependant, d'autres études ont montré qu'après la liaison avec les protéoglycanes, les peptides entraînent l'activation d'une enzyme GTPase appelée Rac1, ce qui provoque un remodelage de l'actine et ainsi l'activation de la macropinocytose (Gerbal-chaloin, Gondeau, and Aldrian-herrada 2007; Nakase et al. 2007). En outre, Gump *et al.* ont confirmé que la macropinocytose est une voie d'entrée pour le peptide Tat (Gump, June, and Dowdy 2010). Ils démontrent la nécessité d'avoir des protéines actives de la membrane plasmique mais qu'il n'est pas nécessaire d'avoir des glycosaminoglycanes à la surface.

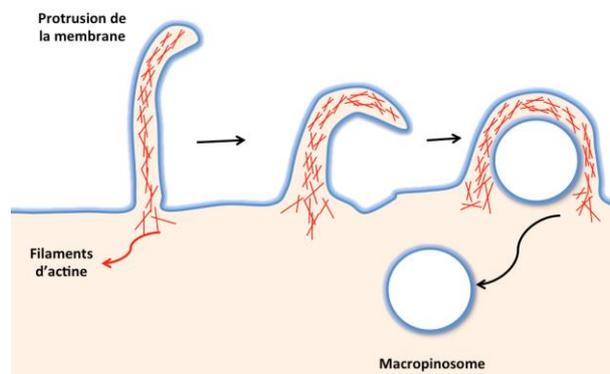


Figure 32. La macropinocytose implique une importante déformation de la membrane cellulaire par l'actine qui polymérise à la surface. Le macropinosome formé peut faire jusqu'à quelques micromètres de diamètre (adapté de (Mayor, Pagano, and Gtpase 2007)).

Il a été montré, par inhibition de la clathrine en incubant les cellules avec un milieu hyperosmolaire, que l'endocytose dépendante de la clathrine (Figure 33) est impliquée dans l'internalisation de la pénétратine, du peptide Tat et des polyarginines (Saalik et al. 2004). L'endocytose dépendante de la clathrine a lieu dans les cellules des mammifères et module la transduction des signaux et l'homéostasie du sérum en important des nutriments et des facteurs de croissance. Les vésicules formées font entre 100 et 150

nm de diamètre. Cependant, alors que quelques études ont démontré l'implication de l'endocytose dépendante de la clathrine pour l'internalisation du peptide Tat (Cells et al. 2006; Richard et al. 2005), d'autres auteurs suggèrent que l'internalisation de Tat n'est pas affectée par la dynamine1 qui est une protéine inhibitrice de ce type d'endocytose (Kaplan, Wadia, and Dowdy 2005). De même, dans des cellules où la clathrine a été inactivée, l'internalisation de Tat n'a pas été affectée selon Ter-Avetisyan *et al.* (Ter-avetisyan et al. 2009).

L'internalisation par des cavéoles (Figure 33) a aussi été montrée pour différents CPP comme le peptide Tat qui a été trouvé colocalisé avec la protéine marqueur de cavéoles caveoline-1 (Ferrari et al. 2003). Cependant, des études donnent des résultats contradictoires. Par exemple, Richard *et al.* (Richard et al. 2005) ont traité des cellules Hela et CHO avec des inhibiteurs d'endocytose dépendant des cavéoles (nystatine et flipine III) et ils ont remarqué que l'internalisation de Tat n'était pas affectée. Enfin, des mécanismes d'endocytose dépendante de domaines radeaux sont impliqués dans l'internalisation de la pénétratine et du peptide Tat (S. W. Jones et al. 2005).

Il apparaît ainsi, que le mécanisme d'entrée du peptide Tat n'est pas clairement établi et reste encore sujet à débat, ou que Tat utilise plusieurs mécanismes pour rentrer à l'intérieur des cellules.

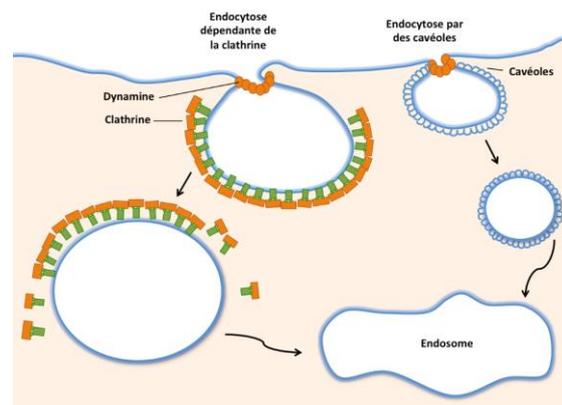


Figure 33. Endocytose dépendante de clathrine : la polymérisation de la clathrine provoque la déformation de la membrane cellulaire. Une cavité recouverte de clathrine est alors formée. Ensuite la dynamine (une enzyme) induit, en se polymérisant au niveau du « cou » de la cavité, la scission de la vésicule. Endocytose par des cavéoles : cette voie d'endocytose dépend de la cavéoline et entraîne la formation de cavéosomes. Les cavéoles sont riches en cholestérol et sphingolipides. C'est encore la dynamine qui permet la scission des cavéoles (adapté de (Mayor, Pagano, and Gtpase 2007)).

Endocytose physique

Plusieurs CPP ont la capacité de se lier à la surface de la membrane et d'en perturber la structure. L'augmentation de la concentration locale en peptides sur la surface membranaire peut conduire à une courbure négative de la membrane induisant des invaginations et la formation de vésicules et/ou de tubes. Ce phénomène a été observé dans des membranes modèle (GUV) et dans des vésicules issues de membrane plasmique des cellules épithéliales (PMS, *plasma membrane spheres* ou GPMV, *giant plasma membrane vesicles*) (Lamazière et al. 2007, 2008, 2009, 2010; Ofelia Maniti et al. 2012). Ce mécanisme qui forme des invaginations dans la membrane est indépendant de l'énergie métabolique et a été dénommé « endocytose physique ». Il pourrait être lié à l'internalisation des peptides. Avec R9, sur des vésicules géantes (GUV), des tubes fins ont été observés (Lamazière et al. 2007) avec une courbure négative plus importante comparé à la pénétratine qui a montré la formation de tubes de diamètre intermédiaire ou encore par rapport à RW9 qui forme les tubes de plus gros diamètre. Il n'a cependant pas été possible de mesurer ces diamètres par microscopie.

Il a été suggéré que la séparation des domaines dans la membrane était importante pour ce processus de formation de tubes de vésicules. Dans les membranes composées de PC (phase liquide désordonnée L_d) les peptides provoquaient facilement la formation de tubes tandis que des tubes n'ont jamais pu être mis en évidence avec les membranes SM/Chol (phase liquide L_o). Ceci est appuyé par le fait que la pénétratine, R9, RW9 et RW16 provoquent différents réarrangements lipidiques en raison de leurs différentes affinités avec les lipides (Ofelia Maniti, Piao, and Ayala-Sanmartin 2014) et leurs propriétés structurales.

En outre, les CPP riches en arginine se lient de manière efficace aux charges négatives comme celles des protéoglycanes héparane-sulfate qui se trouvent à la surface de la cellule en formant des interactions bidentées et induisent une courbure (Tashima 2017). Ces CPP ont un meilleur potentiel pour former des réticulations par rapport aux CPP riches en lysine, et entraînent un signal de transduction qui déclenche l'endocytose (Tashima 2017).

6.2 Passage direct à travers la membrane plasmique

Le passage direct implique une déstabilisation de la membrane sans énergie métabolique. Le passage direct était d'abord considéré comme le seul moyen pour les CPP d'entrer dans les cellules mais cette idée a par la suite été contestée. Il a été attribué à un artefact suite à la fixation des cellules. Cependant, ce phénomène a de nouveau été observé par fluorescence dans des cellules vivantes à 4°C (Jiao et al. 2009; Nakase et al. 2004), et en l'absence d'endocytose grâce à l'utilisation d'inhibiteurs d'endocytose comme l'EIPA (5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride) (M. Fretz et al. 2006) et la méthyl- β -cyclodextrine (M. M. Fretz et al. 2007). Les paragraphes suivants décrivent les principaux mécanismes de passage direct à travers la membrane plasmique.

Formation de micelles inverses

La formation de micelles inverses a été proposée pour expliquer le passage direct de la pénétratine (Derossi, Calvet, and Trembleau 1996). Dans ce mécanisme, les résidus basiques interagissent avec les phospholipides chargés de la membrane. Ensuite, la capacité des peptides à induire une forte courbure négative de la membrane et donc de s'entourer des phospholipides induirait une déstabilisation de la bicouche en formant une invagination de la membrane. La réorganisation concomitante des lipides voisins entraînerait la formation de la micelle inverse qui encapsulerait le peptide (I. Alves et al. 2008; Lamazière et al. 2007, 2010). Finalement, la membrane relâcherait le peptide du côté intracellulaire dans une séquence d'évènements inverse à celle de la formation de la micelle inverse (Figure 34).

Les résidus de tryptophane auraient un rôle important dans l'interaction de certains peptides avec la bicouche et dans la formation de micelles inverses. Pour la pénétratine, la substitution des résidus de tryptophane par de la phénylalanine inhiberait la formation de micelles inverses. Ceci a été suggéré par des expériences de RMN (Berlose et al. 1996).

La taille des micelles inverses formées pourrait dépendre du caractère amphipathique des peptides. Un étude avec R6/W3 (RW9) et R9 (6 et 9 charges positives) de Swiecicki

(J.-M. Swiecicki 2014) a suggéré que les chaînes latérales du tryptophane participent probablement à la lipophilie des structures en micelles inverses.

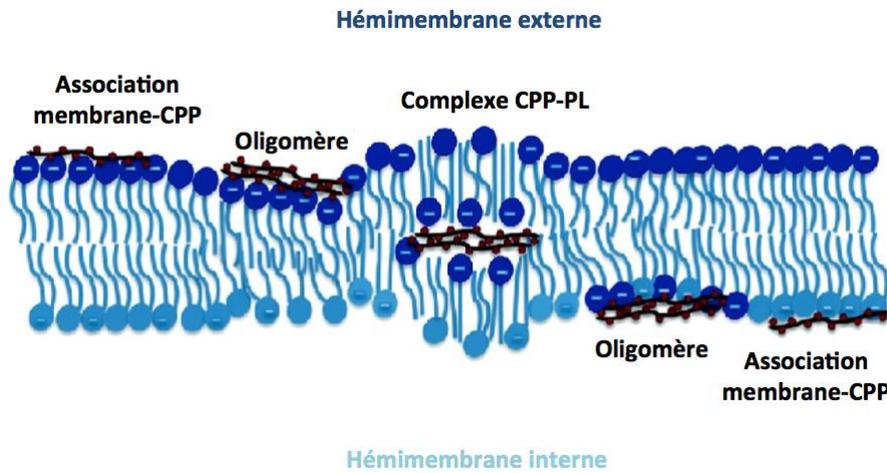


Figure 34. Modèle de passage à travers la membrane par la formation de micelles inverses (J. Swiecicki et al. 2014).

Diffusion adaptative à travers la membrane

Dans l'hypothèse de la diffusion adaptative, les groupes guanidinium des arginines peuvent former des liaisons hydrogène avec les phosphates des phospholipides ce qui peut donner aux oligoarginines un caractère hydrophile variable. Ainsi, les interactions entre les peptides riches en guanidinium et les phosphates des têtes des lipides masqueraient la charge du peptide. Cela atténuerait donc sa polarité et rendrait possible sa diffusion adaptative dans la membrane (Figure 34) (Wender et al. 2008). Ce mécanisme est proche de celui des micelles inverses.

Le potentiel membranaire pourrait être important pour l'internalisation des peptides car il favoriserait leur accumulation sur la membrane plasmique, ce qui déclencherait des zones de nucléation (Wallbrecher et al. 2017). Il y aurait deux modes de passage différents pour que le peptide puisse être internalisé : soit la membrane est dans un état résistant ne permettant pas une perméabilisation directe laissant place à une endocytose métabolique ou physique, soit elle est dans un état permissif grâce auquel le passage direct se produirait. De plus, en modifiant la composition lipidique de la

membrane, notamment la conversion de la sphingomyéline en céramide, l'état résistant pourrait être converti en un état permissif (Wallbrecher et al. 2017).

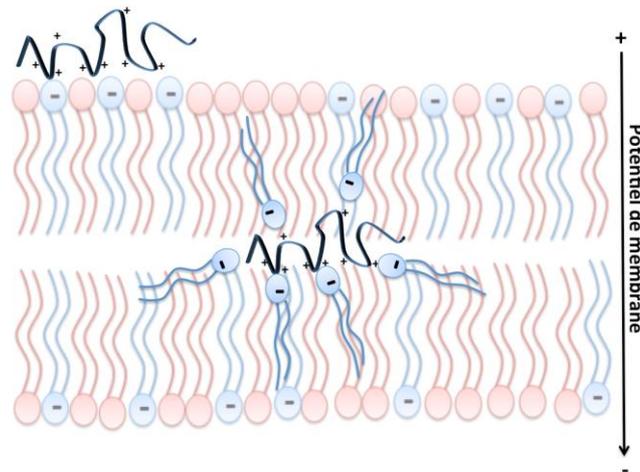


Figure 35. Mécanisme de diffusion adaptative. Durant toute sa traversée, le peptide est accompagné par les lipides qui le neutralisent. Ainsi, il y a un appauvrissement en lipides dans le feuillet externe et un enrichissement donc dans le feuillet interne (adapté de (Wender et al. 2008)).

Il a été montré que le remplacement des résidus d'arginine par des résidus de lysine diminue la capacité d'internalisation des CPP : les résidus d'arginine, grâce à leur groupe guanidinium, sont plus efficaces pour l'internalisation (Mitchell et al. 2000; Wender et al. 2000). Ces mêmes auteurs ont également déterminé qu'un nombre de 7 à 15 résidus d'arginine est optimal pour l'internalisation. Ils forment des liaisons bidentées avec les charges négatives des phosphates alors que les résidus de lysines forment des liaisons monodentées. Ainsi, l'interaction électrostatique entre les CPP et les charges négatives sont certainement essentielles pour l'internalisation. En se liant à des charges négatives comme celles des phosphates des phospholipides dans le feuillet externe de la bicouche lipidique, les CPP riches en arginine seraient capables d'induire une courbure négative de la membrane cellulaire à travers les interactions bidentées. Cela provoquerait une distorsion de la membrane qui permettrait le passage direct du CPP (Herce et al. 2009).

Les CPP riches en lysine ne semblent pas induire de courbure de la membrane mais la pénétratine, R9 et RW9 en induisent une (Lamazière et al. 2008, 2010).

Le peptide R12, conjugué avec un fluorophore hydrophobe Alexa488 (R12-Alexa488) a été internalisé dans des cellules HeLa, *in vitro*, au niveau de sites spécifiques par passage

direct, indépendamment de l'énergie mais dépendant du potentiel membranaire. La détection a été faite par microscopie confocale et corroborée par microscopie électronique. De manière similaire à ce qui a été observé pour la perméabilisation de la membrane avec le peptide Tat (Christianson and Belting 2014), le transport de R12-Alexa488 dans les cellules n'a pas été inhibé par les inhibiteurs d'endocytose tels que le 5-(N-éthyl- N-isopropyl)amiloride (EIPA) (Christianson and Belting 2014).

Formation de pores

Les modèles de formation de pores furent à l'origine utilisés pour expliquer l'action des peptides anti-microbiens.

Des simulations dynamiques moléculaires et des expériences d'électrophysiologie (Herce et al. 2009) ont proposé la formation de pores temporaires toroïdaux qui rendraient possible la diffusion passive de Tat et de peptides riches en arginine à travers la membrane. Dans le modèle de pore toroïdal des interactions ont lieu entre le peptide et les têtes polaires des phospholipides à la surface de la membrane, induisant alors une importante courbure de la bicouche de telle sorte que le pore est tapissé par les têtes polaires associées aux peptides. Dans ce modèle, les peptides ne sont pas assez longs pour traverser l'épaisseur de la bicouche (Figure 36B) (Lamazière et al. 2007). L'interaction entre les chaînes latérales d'arginine chargées positivement et les groupes phosphate entraînerait l'accumulation des peptides dans le feuillet externe. Cette accumulation provoquerait un amincissement de la bicouche pour certains peptides. Aussi, l'attraction entre les chaînes latérales des arginines et des lysines et les têtes des lipides provoquerait la formation d'un pore temporaire à travers lequel les peptides pourraient diffuser entraînant avec eux les phospholipides attachés. Il apparaît que la longueur de la chaîne latérale des résidus d'arginine contribuerait à une meilleure insertion et à un meilleur passage comparé aux chaînes des lysines plus courtes (Wender et al. 2000). Des études conduites avec d'autres CPP ont aussi suggéré la formation de pores comme mécanisme de passage direct (Barany-Wallje et al. 2007; Deshayes et al. 2006; Yandek et al. 2007).

Il existe deux autres types de pores, les pores en tonneau et avec formation de tapis. Dans le cas des pores en tonneau (Figure 36), les peptides forment une structure transmembranaire qui a la forme d'un cylindre sans intervention des lipides. Le nombre de peptides impliqués dans cette structure peut être de 3 à 11 (L. Yang et al. 2001). Dans ce modèle, le peptide est assez long pour traverser la longueur de la bicouche. Ces pores en tonneau ont été mis en évidence avec l'alaméthicine. Spaar et al. (Salditt, Spaar, and Mu 2004) ont montré que l'intérieur du pore est formé par la partie hydrophile du peptide alors que la partie hydrophobe est face aux chaînes aliphatiques des lipides. De leur côté, les pores tapis nécessitent une accumulation de peptides à la surface de la membrane. Pouny *et al.* (Pouny et al. 1992) ont proposé ce modèle de pore pour le peptide antimicrobien dermaseptine. Les peptides, au départ, sont accumulés et orientés perpendiculairement aux chaînes acyle des lipides (Brogden 2005). Ensuite, l'interaction latérale entre les peptides et avec les phospholipides conduit à la formation de pores (Figure 36).

Pour les peptides RW9 et R9, à des concentrations en CPP élevées, des pores transitoires sont formés, ce qui avait déjà été noté alors qu'à concentrations plus faibles, il y a formation de micelles inverses (Kobayashi et al. 2004). La concentration critique pour la formation de ces pores est liée à la séquence peptidique et/ou à son caractère amphipathique et à la propension du CPP à former des agrégats à la surface des phospholipides (J.-M. Swiecicki 2014). Le peptide amphipathique RL16 se lie aux membranes à travers différents types d'interaction. Les résidus basiques présentent des interactions électrostatiques avec les groupes phosphate (chargés négativement) des phospholipides, et il y a aussi des interactions entre résidus hydrophobes et chaînes grasses de la bicouche. Ces interactions sont capables d'induire un réarrangement des lipides entre les deux feuilletts et les peptides provoquent un changement dans la courbure de la membrane. Ainsi RL16 est à l'origine d'une importante augmentation de l'épaisseur de la bicouche (Lamazière et al. 2007). Lamazière *et al.* (2007) indiquent que cette augmentation peut être importante pour la perméabilisation de la membrane observée pour RL16. Deux modèles pour l'internalisation ont été proposés : le premier est le modèle des pores tonneaux et le second celui du pore toroïdal (Figure 36B) (Lamazière et al. 2007).

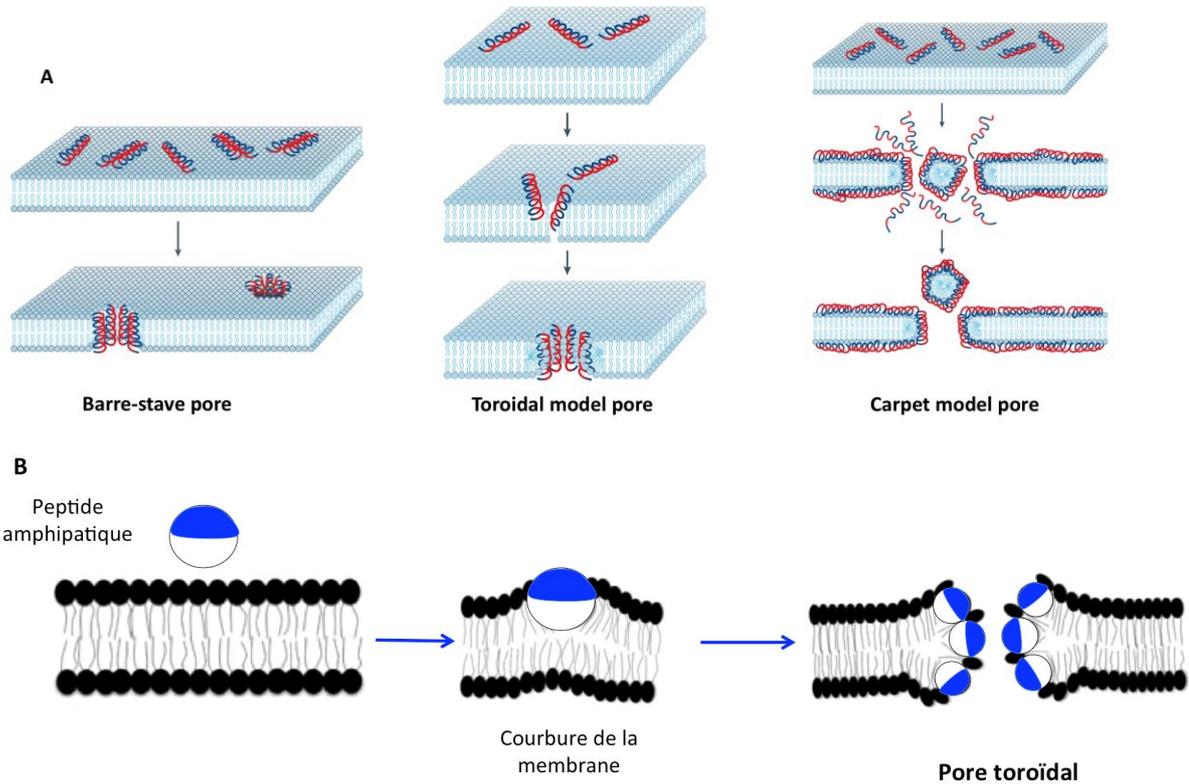


Figure 36. (A) Différents mécanismes de formation de pores (adapté de (Brogden 2005)). (B) Mécanisme de rentrée de petits peptides amphipatiques par un pore toroïdal (adapté de (Lamazière et al. 2007)).

Il a aussi été montré que l'entrée du peptide CF-TP10 dans des membranes de PG/PC (2/8) (GUV) a lieu avant la formation de pores, ce qui exclut donc le modèle de passage par formation de pores pour ce peptide. Dans ce cas, il s'agirait plutôt d'un passage par formation de micelles inverses. Que ce soit par micelles inverses ou par un pore toroïdal, les lipides chargés négativement ont été transférés du feuillet externe vers la couche interne pendant le passage de CPP tels que le peptide Tat ou l'oligoarginine (J. Swiecicki et al. 2014). Un autre modèle a été proposé pour expliquer ce passage de lipides, le modèle des pré-pores. Durant une translocation à travers des pré-pores, les CPP se lieraient aux lipides chargés négativement dans le feuillet externe et pourraient diffuser vers le feuillet interne à travers un pré-pore toroïdal (Abu S Karal et al. 2015), induisant alors le transfert de lipides chargés négativement (Islam et al. 2017).

Perméabilisation par électroporation

L'électroporation correspond à la formation de pores dans les membranes suite à l'action d'un champ électrique imposé. En fonction de la durée du champ électrique et du type cellulaire, une différence de potentiel électrique de plus de 200 mV à travers une membrane plasmique peut la perméabiliser (créer des « pores ») (Cahill 2009). Un mécanisme de type électroporation a été proposé par Binder et Lindblom pour expliquer le passage direct de la pénétratine à travers des membranes chargées négativement. Au-delà d'une certaine concentration en peptide, la distribution asymétrique des charges dans la membrane entre le feuillet externe et le feuillet interne causerait une tension électrique transmembranaire. La membrane serait alors perméabilisée de la même manière qu'avec une électroporation ce qui créerait des brèches temporaires qui permettraient aux peptides de passer à travers les deux feuillets (H. Binder and Lindblom 2003).

Ma et collaborateurs ont trouvé que l'électroporation peut augmenter la biodisponibilité du CPP-PNA (acide nucléique peptidique) à l'intérieur des macrophages et inhiber la Salmonelle intra-cellulaire. Cependant, une électroporation plus intense (avec une intensité de champ plus élevée, 1200 V. cm^{-1} , et une durée plus longue) conduit à une activité plus efficace, mais aussi à un taux de mortalité plus élevé chez les macrophages (Ma et al. 2014). En appliquant des champs d'intensités différentes à des macrophages infectés par la salmonelle et avec une concentration en CPP-PNA de $30 \mu\text{M}$, les auteurs ont constaté que sous électroporation (une impulsion de 800 V.cm^{-1} d'une durée de 5 ms) le nombre moyen de Salmonelle par macrophage avait énormément chuté en passant de 1,7 (sans CPP-PNA) à 0,2 (à $30 \mu\text{M}$ de CPP-PNA), tandis que la concentration en CPP-PNA internalisée augmentait.

Entrée de peptides par des microdomaines de membrane

Il est important ici de rappeler que la membrane est composée de différents domaines de composition lipidique différente et aux propriétés physico-chimiques particulières.

Les régions séparant ces domaines peuvent avoir des discontinuités structurales qui seraient plus favorables pour l'entrée des peptides ou qui pourraient agir comme des

sites de nucléation pour la formation de pores. Ces zones peuvent préexister dans la membrane ou bien pourraient être formées par l'interaction préférentielle du peptide avec des lipides particuliers, ce qui entraînerait une réorganisation de la membrane plasmique (Joanne et al. 2009). Autre possibilité de formation de domaines particuliers dans la membrane plasmique repose sur l'action de l'enzyme sphingomyélinase acide (ASMase) qui hydrolyse les sphingomyélines dans le feuillet extracellulaire. Ceci crée des domaines riches en céramide. Les CPP pourraient donc entrer à l'interface entre ces domaines et le reste de la membrane (Verdurmen et al. 2010).

Swiecicki *et al.* (J. M. Swiecicki et al. 2015) ont étudié l'internalisation des CPP dans des LUV constituées de phospholipides saturés de longueurs de chaîne différentes (C16:0 pour DPPG et C18:0 pour DSPG) et de divers mélanges de lipides ternaires contenant du cholestérol avec soit DOPC/DOPG soit sphingomyéline/DOPG (18:1 pour O), ce qui peut être considéré comme un modèle des domaines de membranes. Ces différentes compositions membranaires de phospholipides ont été utilisées pour tester différents environnements et leur effet lors du passage des CPP à travers les membranes. Un peptide cationique de contrôle (PKCi), qui n'entre pas dans des cellules eucaryotes, a été ajouté pour s'assurer que la composition de la membrane sondée reste sélective vis-à-vis des CPP. Cette étude suggère que la phase liquide (présence de domaines désordonnés) au milieu de la phase gel (ordonnée) est nécessaire pour que l'internalisation puisse avoir lieu. La présence d'un lipide anionique comme le DOPG semble également importante pour l'adsorption des CPP à la surface des LUV. Di Pisa et Swiecicki (Pisa and Swiecicki 2015) soutiennent que même si l'affinité pour les membranes est augmentée par la présence de phospholipides anioniques, l'interaction entre les CPP amphipatiques et les membranes est surtout gouvernée par des interactions hydrophobes (Pisa and Swiecicki 2015; Schmid 2017; J. M. Swiecicki et al. 2015).

L'internalisation directe de peptides riches en arginine s'accompagne d'altérations locales sur la membrane. Pour le peptide R9, marqué avec une molécule fluorescente, la 5(6)-carboxyfluorescéine, la microscopie confocale a montré, lors de la première phase de l'internalisation, un fort signal fluorescent dans de petites zones de la membrane qui s'étendent et deviennent de plus en plus grandes en allant vers le cytosol

et le noyau (Duchardt et al. 2007). Les auteurs en déduisent que la translocation directe ne se produit pas uniformément dans la membrane mais dans certaines régions spécifiques de la membrane, appelées zones de nucléation. Ces régions spécifiques ont également été observées avec le peptide R12. Dans ce dernier cas, le peptide est d'abord localisé sur la membrane puis diffuse vers le cytosol (Hirose et al. 2012). Des images de microscopie à contraste interférentiel ont mis en évidence des régions transitoires d'environ 1 μm et la microscopie électronique a montré que ces zones contiennent un empilement des membranes probablement enroulées.

Le ganglioside GM1 et la sphingomyéline (SM) sont abondants dans les domaines radeaux. La toxine cholérique B (CTxB) et la lysénine sont des marqueurs du GM1 et de la SM respectivement. Leur accumulation a été détectée dans ces régions spécifiques en forme de particules (« *particle-like* » structures) c'est-à-dire dans la zone où s'effectue l'afflux de peptide vers l'intérieur de la cellule. Cela suggère que ces domaines radeaux peuvent être impliqués dans le passage direct du peptide R12 à travers la membrane (Takeuchi and Futaki 2016). Ces mêmes auteurs ont, par ailleurs, observé que la co-incubation de R8 avec du butyrate de pyrène augmente la fluidité locale de la membrane et induit une courbure négative, ce qui favorise la translocation directe de ce peptide (Takeuchi and Futaki 2016).

Le schéma suivant résume les principaux mécanismes suggérés pour l'internalisation de différents types de CPP.

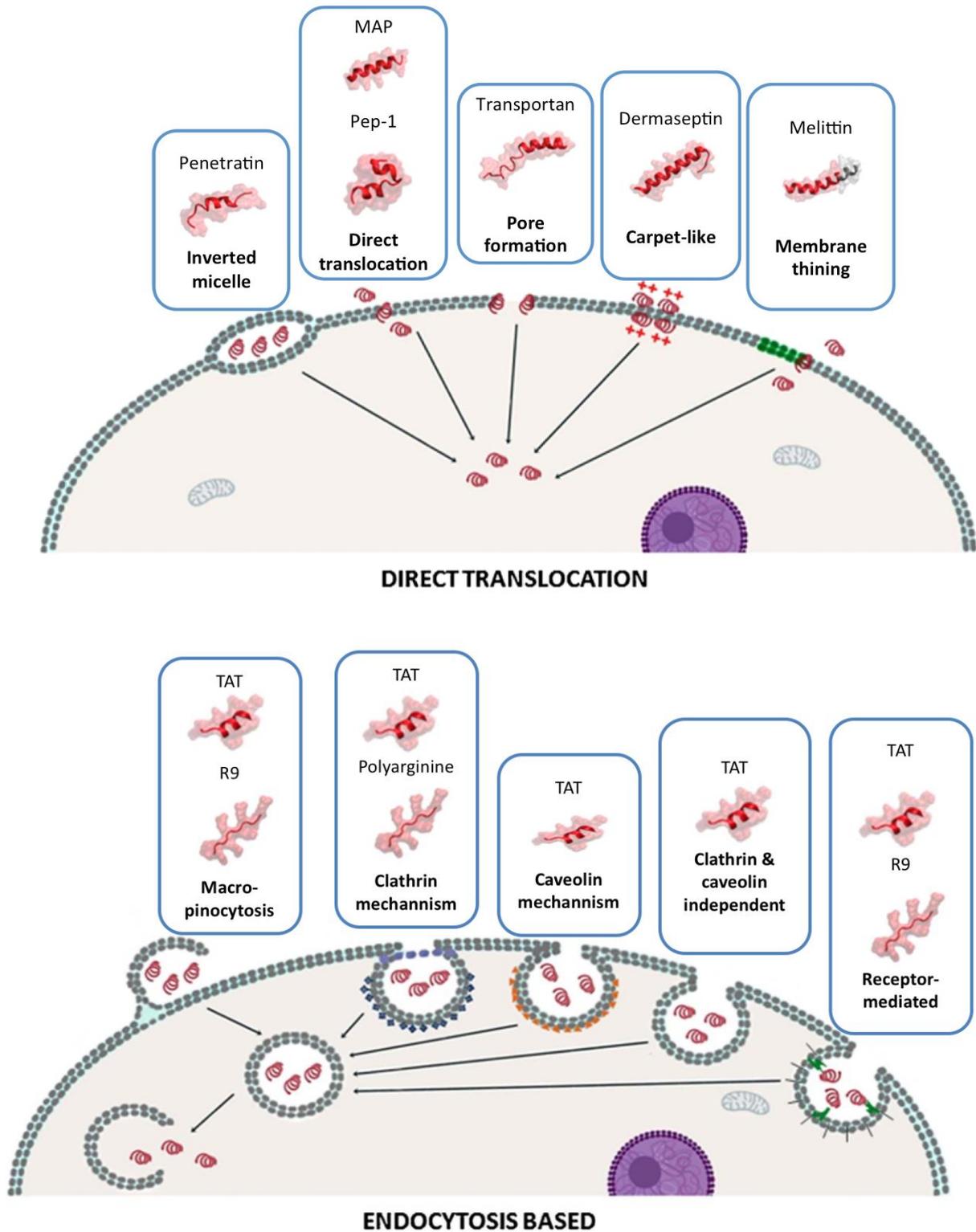


Figure 37. Vue d'ensemble des principaux mécanismes proposés pour l'internalisation de certains des principaux CPP et AMP. On distingue deux familles de mécanismes pour la pénétration cellulaire : le passage direct et l'internalisation basée sur des phénomènes d'endocytose (adaptée de (Rádis-Baptista et al. 2017)).

Références

- Abu S Karal, Mohammad et al. 2015. "Stretch-Activated Pore of the Antimicrobial Peptide , Magainin 2." *Lagmuir*.
- Allinquant, B et al. 1995. "Downregulation of Amyloid Precursor Protein Inhibits Neurite Outgrowth In Vitro." 128(5): 919–27.
- Alves, I et al. 2008. "Membrane Interaction and Perturbation Mechanisms Induced by Two Cationic Cell Penetrating Peptides with Distinct Charge Distribution." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1780(7–8): 948–59. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416508000998>.
- Alves, Isabel D et al. 2009. "The Interaction of Cell-Penetrating Peptides with Lipid Model Systems and Subsequent Lipid Reorganization: Thermodynamic and Structural Characterization." *Journal of Peptide Science* 15(3): 200–209.
- Alves, Isabel D et al. 2010. "Cell Biology Meets Biophysics to Unveil the Different Mechanisms of Penetratin Internalization in Cells." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1798(12): 2231–39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.02.009>.
- Anderson, D C et al. 1993. "1993 ANDERSON Tumor Cell Retention of Antibody Fab Fragments Is Enhanced by an Attached HIV Tat Protein-Derived Peptide.pdf."
- Barany-Wallje, Elsa et al. 2007. "Differential Membrane Perturbation Caused by the Cell Penetrating Peptide Tp10 Depending on Attached Cargo." 581: 2389–93.
- Belting, Mattias et al. 2003. "Glypican-1 Is a Vehicle for Polyamine Uptake in Mammalian Cells." 278(47): 47181–89.
- Berlose, Jean-philippe et al. 1996. "Conformational and Associative Behaviours of the Third Helix of Antennapedia Homeodomain in Membrane-Mimetic Environments." 386: 372–86.
- Binder, Hans, and Göran Lindblom. 2003. "Charge-Dependent Translocation of the Trojan Peptide Penetratin across Lipid Membranes." *Biophysical Journal* 85(2): 982–95.
- Bolhassani, Azam, Behnaz Sadat Jafarzade, and Golnaz Mardani. 2017. "In Vitro and in Vivo Delivery of Therapeutic Proteins Using Cell Penetrating Peptides." *Peptides* 87: 50–63.
- Brogden, Kim A. 2005. "ANTIMICROBIAL PEPTIDES : PORE FORMERS OR METABOLIC INHIBITORS IN BACTERIA ?" 3(February): 238–50.
- Cahill, Kevin. 2009. "Molecular Electroporation and the Transduction of Oligoarginines." *Phys Biol*.
- Cells, Eukaryotic et al. 2006. "Probing the Impact of Valency on the Routing of Arginine-Rich Peptides into." : 1116–27.
- Chatelin, Laurent et al. 1996. "Transcription Factor Hoxa-5 Is Taken up by Cells in Culture and Conveyed to Their Nuclei." *Mechanisms of Development* 55: 111–17.

- Christianson, Helena C, and Mattias Belting. 2014a. "Heparan Sulfate Proteoglycan as a Cell-Surface Endocytosis Receptor." *Matrix Biology* 35: 51–55.
- Dayton, Andrew I et al. 1988. "The Trans-Activator Gene of the Human T Cell Lymphotropic Virus Type III Is Required for Replication." 44: 941–47.
- Delaroche, Diane et al. 2007. "Tracking a New Cell-Penetrating (W/R) Nonapeptide, through an Enzyme-Stable Mass Spectrometry Reporter Tag." *Analytical Chemistry* 79(5): 1932–38.
- Derossi, Daniele, Sophie Calvet, and Alain Trembleau. 1996. "Cell Internalization of the Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Is Receptor-Independent *." 271(30): 18188–93.
- Derossi, Daniele, Gerard Chassaing, and Alain Prochiantz. 1998. "Trojan Peptides : The Penetratin System for Intracellular Delivery." 8(February).
- Derossi, Daniele, Alain Joliot, Gerard Chassaing, and Alain Prochiantz. 1994. "The Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Translocates through Biological Membranes." *J Biol Chem* 269(14): 10444–50.
- Deshayes, Sebastien et al. 2004a. "Insight into the Mechanism of Internalization of the Cell-Penetrating Carrier Peptide Pep-1 through Conformational Analysis † Se." *Biochemistry* 43: 1449–57.
- Deshayes, Sébastien et al. 2006. "Formation of Transmembrane Ionic Channels of Primary Amphipathic Cell-Penetrating Peptides . Consequences on the Mechanism of Cell Penetration." 1758: 1846–51.
- Ding, Bei, and Zhan Chen. 2012. "Molecular Interactions between Cell Penetrating Peptide Pep-1 and Model Cell Membranes." *The Journal of Physical Chemistry* 116: 2545–52.
- Dissanayake, Shama, William A Denny, Swarna Gamage, and Vijayalekshmi Sarojini. 2017. "Recent Developments in Anticancer Drug Delivery Using Cell Penetrating and Tumor Targeting Peptides." *Journal of Controlled Release* 250: 62–76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.02.006>.
- Drin, Guillaume et al. 2001. "Physico-Chemical Requirements for Cellular Uptake of pAntp Peptide Role of Lipid-Binding Affinity." 1314: 1304–14.
- Duchardt, Falk, Mariola Fotin-mleczek, Heinz Schwarz, and Rainer Fischer. 2007. "A Comprehensive Model for the Cellular Uptake of Cationic Cell-Penetrating Peptides." (18): 848–66.
- El-andaloussi, Samir, Peter J Arver, and Henrik J Johansson. 2007. "Cargo-Dependent Cytotoxicity and Delivery Efficacy of Cell-Penetrating Peptides : A Comparative Study." 292: 285–92.
- Elmqvist, Anna, and Ülo Langel. 2003. "In Vitro Uptake and Stability Study of P VEC and Its All-D Analog." 384(March): 387–93.
- Ezzat, Kariem et al. 2017. "Scavenger Receptor-Mediated Uptake of Cell-Penetrating Peptide Nanocomplexes with Oligonucleotides." 26(3): 1172–80.

- Fawell, S. et al. 1994. "Tat-Mediated Delivery of Heterologous Proteins into Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(2): 664–68. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.91.2.664>.
- Ferrari, Aldo et al. 2003. "Caveolae-Mediated Internalization of Extracellular HIV-1 Tat Fusion Proteins Visualized in Real Time." *Molecular Therapy* 8(2): 284–94. [http://dx.doi.org/10.1016/S1525-0016\(03\)00122-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1525-0016(03)00122-9).
- Fischer, P M et al. 2000. "Structure ± Activity Relationship of Truncated and Substituted Analogues of the Intracellular Delivery Vector Penetratin." : 163–72.
- Frankel, Alan D, and Carl O Pabo. 1988. "Cellular Uptake of the Tat Protein from Human Lmmunodeficiency Virus." 55: 1189–93.
- Fretz, Marjan et al. 2006. "Effects of Na + / H + Exchanger Inhibitors on Subcellular Localisation of Endocytic Organelles and Intracellular Dynamics of Protein Transduction Domains HIV – TAT Peptide and Octaarginine." *Science Direct* 116: 247–54.
- Fretz, Marjan M et al. 2007. "Temperature-, Concentration- and Cholesterol-Dependent Translocation of L- and D-Octa-Arginine across the Plasma and Nuclear Membrane of CD34+ Leukaemia Cells." *Biochemistry* 342: 335–42.
- Futaki, Shiroh et al. 2001. "Arginine-Rich Peptides." *The Journal of biological chemistry* 276(8): 5836–40.
- Gerbal-chaloin, Sabine, Claire Gondeau, and Gudrun Aldrian-herrada. 2007. "First Step of the Cell-Penetrating Peptide Mechanism Involves Rac1 Remodelling." 99: 223–38.
- Green, Maurice, and Paul M Loewenstein. 1988. "Autonomous Functional Domains of Chemically Synthesized Human Lmmunodeficiency Virus Tat Trans-Activator Protein." 55.
- Gros, Edwige et al. 2006. "A Non-Covalent Peptide-Based Strategy for Protein and Peptide Nucleic Acid Transduction." *BBA - Biomembranes* 1758: 384–93.
- Gump, Jacob M, Ronald K June, and Steven F Dowdy. 2010. "Revised Role of Glycosaminoglycans in TAT Protein Transduction Domain-Mediated Cellular Transduction □." 285(2): 1500–1507.
- Hara, Toshiaki et al. 2001. "Heterodimer Formation between the Antimicrobial Peptides Magainin 2 and PGLa in Lipid Bilayers : A Cross-Linking Study †." : 12395–99.
- Herce, H D et al. 2009a. "Arginine-Rich Peptides Destabilize the Plasma Membrane , Consistent with a Pore Formation Translocation Mechanism of Cell-Penetrating Peptides." *Biophysj* 97(7): 1917–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2009.05.066>.
- Hirose, Hisaaki et al. 2012. "By Arginine-Rich Peptides Leads to Their Direct Penetration into Cells." *Molecular Therapy* 20(5): 984–93.
- Islam, Zahidul et al. 2017. "E Ff Ects of Mechanical Properties of Lipid Bilayers on the Entry of Cell- Penetrating Peptides into Single Vesicles."

- Jiao, Chen-yu et al. 2009. "Translocation and Endocytosis for Cell-Penetrating." 284(49): 33957–65.
- Joanne, Pierre et al. 2009. "Lipid Reorganization Induced by Membrane-Active Peptides Probed Using Differential Scanning Calorimetry." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1788(9): 1772–81.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.05.001>.
- Joliot, A et al. 1998. "Identification of a Signal Sequence Necessary for the Unconventional Secretion of Engrailed Homeoprotein." 8: 856–63.
- Joliot, A, C Pernelle, Deagostini-Bazin H, and A Prochiantz. 1991. "Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis." 88(March): 1864–68.
- Joliot, Alain, and Alain Prochiantz. 2008. "Homeoproteins as Natural Penetratin Cargoes with Signaling Properties." *Advanced Drug Delivery Reviews* 60(4–5): 608–13. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X07002943>.
- Jones, Simon W et al. 2005. "Characterisation of Cell-Penetrating Peptide-Mediated Peptide Delivery." : 1093–1102.
- Kaplan, Ian M, Jehangir S Wadia, and Steven F Dowdy. 2005. "Cationic TAT Peptide Transduction Domain Enters Cells by Macropinocytosis." 102: 247–53.
- Kauffman, W. Berkeley, Taylor Fuselier, Jing He, and William C. Wimley. 2015. "Mechanism Matters: A Taxonomy of Cell Penetrating Peptides." *Trends in Biochemical Sciences* 40(12): 749–64.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2015.10.004>.
- Khandia, Rekha, Ashok Munjal, Arvind Kumar, and Gaurav Singh. 2017. "Cell Penetrating Peptides : Biomedical / Therapeutic Applications with Emphasis as Promising Futuristic Hope for Treating Cancer." *International Journal of Pharmacology*.
- Kobayashi, Satoe et al. 2004. "Membrane Translocation Mechanism of the Antimicrobial Peptide Buforin 2 †." *Biochemistry*: 15610–16.
- Krause, Eberhard et al. 1995. "Location of an Amphipathic -Helix in Peptides Using Reversed-Phase HPLC Retention Behavior of O-Amino Acid Analogs." *Analytical Biochemistry* 67(2): 252–58.
- Kristensen, Mie, Ditlev Birch, and Hanne Mørck Nielsen. 2016. "Applications and Challenges for Use of Cell-Penetrating Peptides as Delivery Vectors for Peptide and Protein Cargos." *International Journal of Molecular Sciences* 17(2).
- Lamazière, Antonin. 2007. "Mécanismes D'action de Peptides Basiques Sur Des Membranes Modèles et Biologiques". Thèse.
- Lamazière, Antonin et al. 2007. "Non-Metabolic Membrane Tubulation and Permeability Induced by Bioactive Peptides." *PloS one* 2(2): e201.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1790702&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Lamazière, Antonin et al. 2008. "The Homeodomain Derived Peptide Penetratin

- Induces Curvature of Fluid Membrane Domains." *PloS one* 3(4): e1938.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2276244&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Lamazière, Antonin et al. 2010. "Lipid Domain Separation, Bilayer Thickening and Pearling Induced by the Cell Penetrating Peptide Penetratin." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1798(12): 2223–30.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.12.024>.
- Lamazière, Antonin, Gérard Chassaing, Germain Trugnan, and Jesus Ayala-Sanmartin. 2009. "Tubular Structures in Heterogeneous Membranes Induced by the Cell Penetrating Peptide Penetratin." *Communicative integrative biology* 2(3): 223–24.
- Langel, Ulo et al. 1996. "A Galanin-Mastoparan Chimeric Peptide Activates the Na⁺,K⁺-ATPase and Reverses Its Inhibition by Ouabain." 62: 47–52.
- Langel, Ülo. 2007. Handbook of cell penetrating peptides. 2ème ed.
- Lee, Jane, Phil Kennedy, and Jacob M Waugh. 2015. "Experiences with CPP-Based Self Assembling Peptide." *Cell-Penetrating Peptides: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* 1324: 397–415.
- Lee, Ming-Tao, Wei-Chin Hung, Fang-Yu Chen, and Huey W Huang. 2005. "Many-Body Effect of Antimicrobial Peptides : On the Correlation Between Lipid ' S Spontaneous Curvature and Pore Formation." *Biophysical Journal* 89(December): 4006–16.
- Lee, Ya-jung, Silpi Datta, and Jean-philippe Pellois. 2008. "Real-Time Fluorescence Detection of Protein Transduction into Live Cells." 3: 2398–99.
- Levadny, Victor, Taka Aki Tsuboi, Marina Belaya, and Masahito Yamazaki. 2013. "Rate Constant of Tension-Induced Pore Formation in Lipid Membranes." *Langmuir* 29(12): 3848–52.
- Lundberg, Mathias, and Magnus Johansson. 2002. "Positively Charged DNA-Binding Proteins Cause Apparent Cell Membrane Translocation." 371: 367–71.
- Ma, Sai et al. 2014. "Electroporation-Based Delivery of Cell-Penetrating Peptide Conjugates of Peptide Nucleic Acids for Antisense Inhibition of Intracellular Bacteria." *Integrative Biology*. <http://dx.doi.org/10.1039/C4IB00172A>.
- Madani, Fatemeh et al. 2011. "Mechanisms of Cellular Uptake of Cell-Penetrating Peptides." 2011.
- Mainguy, Gaëll et al. 2000. "An Induction Gene Trap for Identifying a Homeoprotein-Regulated Locus." 18(July): 16–19.
- Maizel, Alexis, Olivier Bensaude, Alain Prochiantz, and Alain Joliot. 1999. "A Short Region of Its Homeodomain Is Necessary for Engrailed Nuclear Export and Secretion." 3190: 3183–90.
- Maniti, Ofelia et al. 2012a. "Metabolic Energy-Independent Mechanism of Internalization for the Cell Penetrating Peptide Penetratin." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 44(6): 869–75.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2012.02.010>.

- 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): e15819. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3012702&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Maniti, Ofelia, Hong Rong Piao, and Jesus Ayala-Sanmartin. 2014. "Basic Cell Penetrating Peptides Induce Plasma Membrane Positive Curvature, Lipid Domain Separation and Protein Redistribution." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 50(1): 73–81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2014.02.017>.
- Mayor, Satyajit, Richard E Pagano, and Rab Gtpase. 2007. "Pathways of Clathrin-Independent Endocytosis." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8(August): 603–12.
- Mazel, Martine et al. 2001. "Doxorubicin ± Peptide Conjugates Overcome Multidrug Resistance." : 107–16.
- Melikov, Kamran et al. 2015. "Efficient Entry of Cell-Penetrating Peptide Nona-Arginine into Adherent Cells Involves a Transient Increase in Intracellular Calcium." : 221–30.
- Milletti, Francesca. 2012. "Cell-Penetrating Peptides: Classes, Origin, and Current Landscape." *Drug Discovery Today* 17(15–16): 850–60. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644612000839>.
- Mishra, Abhijit et al. 2011. "Translocation of HIV TAT Peptide and Analogues Induced by Multiplexed Membrane and Cytoskeletal Interactions." 108(41).
- Mitchell, D.J. et al. 2000. "Polyarginine Enters Cells More Efficiently than Other Polycationic Homopolymers." *Journal of Peptide Research* 56(5): 318–25. <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1399-3011.2000.00723.x>.
- Morris, M. C. et al. 1997. "A New Peptide Vector for Efficient Delivery of Oligonucleotides into Mammalian Cells." *Nucleic Acids Research* 25(14): 2730–36.
- Morris, May C et al. 2001. "A Peptide Carrier for the Delivery of Biologically Active Proteins into Mammalian Cells." *Nature* 19(December): 1173–76.
- Nakase, Ikuhiko et al. 2004. "Cellular Uptake of Arginine-Rich Peptides : Roles for Macropinocytosis and Actin Rearrangement." *Molecular Therapy* 10(6): 1011–22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.08.010>.
- Nakase, Ikuhiko et al. 2007. "Interaction of Arginine-Rich Peptides with Membrane-Associated Proteoglycans Is Crucial for Induction of Actin Organization and Macropinocytosis †." : 492–501.
- Oehlke, Johannes et al. 1998. "Cellular Uptake of an Alpha-Helical Amphipathic Model Peptide with the Potential to Deliver Polar Compounds into the Cell Interior Non-Endocytically." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1414(1–2): 127–39.
- Oehlke, Johannes et al. 2004. "Enhancement of Intracellular Concentration and

- Biological Activity of PNA after Conjugation with a Cell-Penetrating Synthetic Model Peptide." 3049(March): 3043–49.
- Oehlke, Johannes, Dorothea Lorenz, Burkhard Wiesner, and Michael Bienert. 2005. "Studies on the Cellular Uptake of Substance P and Lysine-Rich , KLA-Derived Model Peptides Y." (September 2004): 50–59.
- Okuyama, Masahiro et al. 2007. "Small-Molecule Mimics of an α -Helix for Efficient Transport of Proteins into Cells." *Nature Methods* 4(2).
- Palm-apergi, Caroline, Annely Lorents, and Margus Pooga. 2009. "The Membrane Repair Response Masks Membrane Disturbances Caused by Cell-Penetrating Peptide Uptake." 23(1): 214–23.
- Palm, Caroline, Mala Jayamanne, Marcus Kjellander, and Mattias Hällbrink. 2007. "Peptide Degradation Is a Critical Determinant for Cell-Penetrating Peptide Uptake." 1768: 1769–76.
- Peeters, J M, TG Hazenddonk, EC Beuvery, and G I Tesser. 1989. "Comparison of Four Bifunctional Reagents for Coupling Peptides to Proteins and the Effect of the Three Moieties on the Immunogenicity of the Conjugates." 120: 133–43.
- Pelkmans, Lucas, and Ari Helenius. 2003. "Insider Information : What Viruses Tell Us about Endocytosis." (Figure 1): 414–22.
- Perea, S E et al. 2004. "Antitumor Effect of a Novel Proapoptotic Peptide That Impairs the Phosphorylation by the Protein Kinase 2 (Casein Kinase 2)." *Cancer Research* 2: 7127–29. <http://europepmc.org/abstract/med/15466209>.
- Perez, Aleida, Albert W Probert, Kevin KW Wang, and Lamia Sharmeen. 2001. "Evaluation of HIV-1 Tat Induced Neurotoxicity in Rat Cortical Cell Culture." *Journal of NeuroVirology* (November 1999): 1–2.
- Perez, Franck et al. 1994. "Peptides Are Both Potent and Specific Inhibitors of Prolactin Release by Rat Cultured Anterior Pituitary Cells." (September): 1278–87.
- Pisa, Margherita Di, and Jean-marie Swiecicki. 2015. "Translocation Mechanism(s) of Cell-Penetrating Peptides: Biophysical Studies Using Artificial Membrane Bilayers."
- Pooga, Margus, Mattias Hallbrink, Matjal Zorko, and Ulo Langel. 1998. "Cell Penetration by Transportan." *The FASEB Journal* 12(1): 67–77.
- Poon, K, and J Gari. 2007. "Cell-Surface Proteoglycans as Molecular Portals for Cationic Peptide and Polymer Entry into Cells." 35: 35–37.
- Pouny, Yehonathan et al. 1992. "Interaction of Antimicrobial Dermaseptin and Its Fluorescently Labeled Analogues." : 12416–23.
- Prochiantz, Alain. 2000. "Messenger Proteins : Homeoproteins , TAT and Others." : 400–406.
- Rádis-Baptista, Gandhi et al. 2017. "Cell-Penetrating Peptides (CPPs): From Delivery of Nucleic Acids and Antigens to Transduction of Engineered Nucleases for

- Application in Transgenesis." *Journal of Biotechnology* 252(May): 15–26.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.05.002>.
- Richard, Jean Philippe et al. 2003. "Cell-Penetrating Peptides." *The Journal of biological chemistry* 278(1): 585–90.
- Richard, Jean Philippe et al. 2005. "Cellular Uptake of Unconjugated TAT Peptide Involves Clathrin- Dependent Endocytosis and Heparan Sulfate Receptors *." *Journal of Biological Chemistry* 280(15): 15300–306.
- Saalik, Pille et al. 2004. "Protein Cargo Delivery Properties of Cell-Penetrating Peptides. A Comparative Study." *Bioconjugate Chemistry*: 1246–53.
- Säälik, Pille et al. 2011. "Penetration without Cells: Membrane Translocation of Cell-Penetrating Peptides in the Model Giant Plasma Membrane Vesicles." *Journal of Controlled Release* 153(2): 117–25.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.03.011>.
- Sabatier, Jean-marc, Eric Vives, Kamel Mabrouk, and Abdelaziz Benjouad. 1991. "Evidence for Neurotoxic Activity of Tat from Human Immunodeficiency Virus Type 1." *AIDS* 5(6): 661–67.
- Salditt, Tim, Alexander Spaar, and Christian Mu. 2004. "Conformation of Peptides in Lipid Membranes Studied by X-Ray Grazing Incidence Scattering." *Biophysical Journal* 87(July): 396–407.
- Schmid, Friederike. 2017. "Physical Mechanisms of Micro- and Nanodomain Formation in Multicomponent Lipid Membranes." *BBA - Biomembranes* 1859(4): 509–28.
- Schwarze, Steven, Keith A Hruska, and Steven F Dowdy. 2000. "Protein Transduction : Unrestricted Delivery into All." *Journal of Cell Science* 113(July): 290–95.
- Sharmin, Sabrina et al. 2016. "Effects of Lipid Composition on the Entry of Cell-Penetrating Peptide Oligoarginine into Single Vesicles." *Biochemistry* 55(30): 4154–65.
- Simmons, Carla G et al. 1997. "Synthesis and Membrane Permeability of P N a - Peptide Conjugates." *Journal of Biological Chemistry* 272(23): 3001–6.
- Soomets, Ursel et al. 2000. "Deletion Analogues of Transportan." *Biochimica et biophysica acta* 1467.
- Soomets, Ursel, Mattias Hällbrink, Matjal Zorko, and Ülo Langel. 1997. "From Galanin and Mastoparan to Galparan and Transportan." (June 2015).
- Steiner, Verena, Martin Schar, Olaf Bornsen, and Manfred Mutter. 1991. "Retention Behaviour of a Template-Assembled Synthetic Protein and Its Amphiphilic Building Blocks on Reversed- Phase Columns." *Journal of Chromatography* 586: 43–50.
- Sugioka, Rie et al. 2003. "BH4-Domain Peptide from Bcl-xL Exerts Anti-Apoptotic Activity in Vivo." *Oncogene* 22(52): 8432–40.
<http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.onc.1207180>.

- Suzuki, Tomoki et al. 2002. "Possible Existence of Common Internalization Mechanisms among Arginine-Rich Peptides *." *277(4)*: 2437–43.
- Swiecicki, Jean-Marie. 2014. "Étude Des Mécanismes D'internalisation Des Peptides Pénétrants." : 1–304. Thèse.
- Swiecicki, Jean-marie, Annika Bartsch, Julien Tailhades, and Di Pisa. 2014. "The Efficacies of Cell-Penetrating Peptides in Accumulating in Large Unilamellar Vesicles Depend on Their Ability To Form Inverted Micelles." *ChemBioChem*: 884–91.
- Swiecicki, Jean Marie et al. 2015. "Accumulation of Cell-Penetrating Peptides in Large Unilamellar Vesicles: A Straightforward Screening Assay for Investigating the Internalization Mechanism." *Biopolymers* 104(5): 533–43.
- Takeshima, Kenta et al. 2003. "Translocation of Analogues of the Antimicrobial Peptides Magainin and Buforin across Human Cell Membranes *." *278(2)*: 1310–15.
- Takeuchi, Toshihide, and Shiroh Futaki. 2016. "Current Understanding of Direct Translocation of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides and Its Internalization Mechanisms." *Chem Pharm Bull* 64(10): 1431–37.
- Tashima, Toshihiko. 2017a. "Intelligent Substance Delivery into Cells Using Cell-Penetrating Peptides." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 27(2): 121–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.11.083>.
- Ter-avetisyan, Gohar et al. 2009. "Cell Entry of Arginine-Rich Peptides Is Independent." *284(6)*: 3370–78.
- Théodore, Laurent et al. 1995. "Intraneuronal Delivery of Protein to Growth Cone Collapse Leads." (November).
- Troy, Carol M, and Lloyd A Greene. 1996. "Downregulation of Cu / Zn Superoxide Death v & the Nitric Oxide-Peroxynitrite Dismutase Pathway Leads to Cell." *16(1)*: 253–61.
- Tsien, Roger Y. 1998. "The green fluorescent protein." *Annu Rev Biochem.* 67:509-44.
- Verdurmen, Wouter P R et al. 2010. "Cationic Cell-Penetrating Peptides Induce Ceramide Formation via Acid Sphingomyelinase : Implications for Uptake." *Journal of Controlled Release* 147(2): 171–79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.06.030>.
- Villa, Raffaella et al. 2000. "Inhibition of Telomerase Activity by a Cell-Penetrating Peptide Nucleic Acid Construct in Human Melanoma Cells." *FEBS Letters* 473: 241–48.
- Vives, Eric et al. 1997. "A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus *." *272(25)*: 16010–17.
- Wadia, Jehangir S, Radu V Stan, and Steven F Dowdy. 2004. "Transducible TAT-HA Fusogenic Peptide Enhances Escape of TAT-Fusion Proteins after Lipid Raft

- Macropinocytosis." *Nature Medicine* 10(3): 310–15.
- Wallbrecher, Rike et al. 2017a. "Membrane Permeation of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides Independent of Transmembrane Potential as a Function of Lipid Composition and Membrane Fluidity." *Journal of Controlled Release* 256(April): 68–78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.04.013>.
- Walrant, Astrid et al. 2013. "Direct Translocation of Cell-Penetrating Peptides in Liposomes: A Combined Mass Spectrometry Quantification and Fluorescence Detection Study." *Analytical Biochemistry* 438(1): 1–10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2013.03.009>.
- Weller, K et al. 2005. "Biophysical and Biological Studies of End-Group-Modified Derivatives of Pep-1." *Biochemistry*: 15799–811.
- Wender, Paul A et al. 2000. "The Design , Synthesis , and Evaluation of Molecules That Enable or Enhance Cellular Uptake : Peptoid Molecular Transporters." 97(24): 13003–8.
- Wender, Paul A et al. 2008. "The Design of Guanidinium-Rich Transporters and Their Internalization Mechanisms." *Advanced Drug Delivery Reviews* 60: 452–72.
- Williams, Emma J et al. 1997. "Selective Inhibition of Growth Factor-Stimulated Mitogenesis by a Cell-Permeable Grb2-Binding Peptide." 272(35): 22349–54.
- Witte, Kristina et al. 2013. "Structure and Dynamics of the Two Amphipathic Arginine-Rich Peptides RW9 and RL9 in a Lipid Environment Investigated by Solid-State NMR and MD Simulations." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1828(2): 824–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.11.014>.
- Yandek, Lindsay E et al. 2007. "Mechanism of the Cell-Penetrating Peptide Transporter 10 Permeation of Lipid Bilayers." 92(April): 2434–44.
- Yang, Lin et al. 2001. "Barrel-Stave Model or Toroidal Model ? A Case Study on Melittin Pores." *Biophysical Journal* 81(3): 1475–85. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75802-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75802-X).
- Yang, Sung-tae, Elena Zaitseva, Leonid V Chernomordik, and Kamran Melikov. 2010. "Cell-Penetrating Peptide Induces Leaky Fusion of Liposomes Containing Late Endosome-Specific Anionic Lipid." *Biophysj* 99(8): 2525–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2010.08.029>.
- Zhang, Lijuan, Annett Rozek, and Robert E W Hancock. 2001. "Interaction of Cationic Antimicrobial Peptides with Model Membranes." *The Journal of Biological Chemistry*. 276(38): 35714–22.
- Ziegler, André. 2008. "Thermodynamic Studies and Binding Mechanisms of Cell-Penetrating Peptides with Lipids and Glycosaminoglycans." *Advanced Drug Delivery Reviews* 60: 580–97.

Résultats

Chapitre 3

Réarrangements membranaires induits par la pénétratine

1. Introduction

L'étude de l'interaction des CPP avec la membrane présente un intérêt pour des applications pharmaceutiques, en particulier pour la vectorisation. Pour mieux élucider la capacité des CPP à traverser les membranes et ensuite promouvoir une réponse biologique appropriée, la compréhension du réarrangement des lipides dans la membrane induite par les CPP est primordiale. Cette partie du travail se concentre sur la pénétratine, peptide capable d'induire des invaginations dans la membrane conduisant à la formation de structures tubulaires (Lamazière et al. 2007, 2008, 2009). Le peptide induit donc une courbure négative de la membrane qui pourrait être cruciale pour une internalisation en tube (endocytose physique) et pour la formation de micelles inverses (Derossi et al. 1994; Lamazière et al. 2007). Il a aussi été montré que la pénétratine est capable d'acquérir une structure en hélice- α , en feuillet- β et une conformation en bobine dans différentes conditions (Bellet-Amalric et al. 2000; Caesar et al. 2006; Christiaens et al. 2002; Eiríksdóttir et al. 2010; Lamazière et al. 2010; Magzoub, Go, and Gra 2002; Ofelia Maniti, Alves, Trugnan, and Ayala-Sanmartin 2010; Su et al. 2008). Il semble cependant d'après Derossi et al. (1996) que la structure en hélice α n'est pas nécessaire pour une internalisation, mais certains auteurs (Sébastien Deshayes et al. 2008; Lundin et al. 2008; Milletti 2012) suggèrent que la structuration des peptides peut jouer un rôle dans la translocation.

Le premier objectif de mon travail de thèse a été de mieux comprendre les changements induits dans la membrane par la pénétratine :

- Induit-elle des réarrangements dans la membrane ?
- Quels sont ses effets sur la compaction des lipides ?

- A-t-elle une influence sur les transitions de phase dans les membranes modèles ?

Puisqu'il a été montré par diffraction des rayons X aux grands (WAXD) et aux petits angles (SAXD) que la pénétratine induit des réarrangements dans des membranes composées de lipides naturels, nous nous demandons donc si elle provoquait des changements dans la fluidité membranaire. Des membranes modèles avec des lipides synthétiques pourraient nous apporter cette information. De plus, si des changements ont lieu concernant la fluidité de la membrane, cela implique que la pénétratine peut avoir une influence sur les températures de transition de phase. Nous cherchons aussi à savoir pour quelle phase (liquide, gel-ondulée et gel) la pénétratine a le plus d'affinité, ce qui nous amènera à nous intéresser précisément à la phase gel-ondulée.

On souhaitait donc étudier les réarrangements lipidiques induits par la pénétratine car elle change leur organisation comme cela a été montré par diffraction des rayons X (Almeida et al. 2016). La question qui se pose alors est celle savoir quelle est l'influence de la pénétratine sur la compaction des lipides. Il faut alors aussi s'interroger sur l'effet de la pénétratine sur les différentes transitions de phases, ce qui pourra nous permettre de savoir si la pénétratine a plus d'affinité pour une phase en particulier. Même si les membranes modèles que nous avons utilisées et leur état n'existent pas dans les cellules, nos expériences pourraient tout de même nous permettre de comprendre l'effet de la pénétratine sur les différents domaines d'une membrane biologique.

Ainsi, après les résultats obtenus par diffraction des rayons X sur les réarrangements des lipides, nous avons caractérisé :

- la compaction des lipides par fluorescence du Laurdan, et
- les transitions de phase des lipides par calorimétrie différentielle à balayage.

Il a déjà été montré que la pénétratine est capable d'induire la séparation des phases dans les membranes fluides et ordonnées. Les effets de la pénétratine sur la séparation des phases des membranes lipidiques et leur stabilité thermique ont été étudiés par diffraction des rayons X aux petits angles (SAXD) dans des membranes composées de PC. Le choix s'est porté sur cette membrane car cela permet de :

- mimer les domaines ordonnés et désordonnés du feuillet externe, PC et SM/Chol (1/1) ;
- d'étudier l'effet de la charge négative et PC/PG (9/1), SM/Chol/PG (4/5/1) et PC/SM/Chol (1/1/1) ;
- d'étudier des membranes hétérogènes contenant des domaines ordonnés et désordonnés (Almeida et al. 2016) (annexe E). (*N.B.* la nomenclature utilisée sera avec le même pourcentage de lipides).

L'évolution de la distance entre deux membranes, en incluant la couche d'eau, et de la distance entre les têtes polaires (mesurées respectivement par SAXD par WAXD) en fonction de la température a déjà été étudiée. La Figure 38 illustre ces distances appelées période d . La variation des deux premiers ordres de diffraction (SAXD) dans le diffractogramme de membranes de PC, ainsi que la variation des périodes d , sont représentées en fonction de la température sur la Figure 1 de l'article 1 en Annexe E (Almeida et al. 2016).

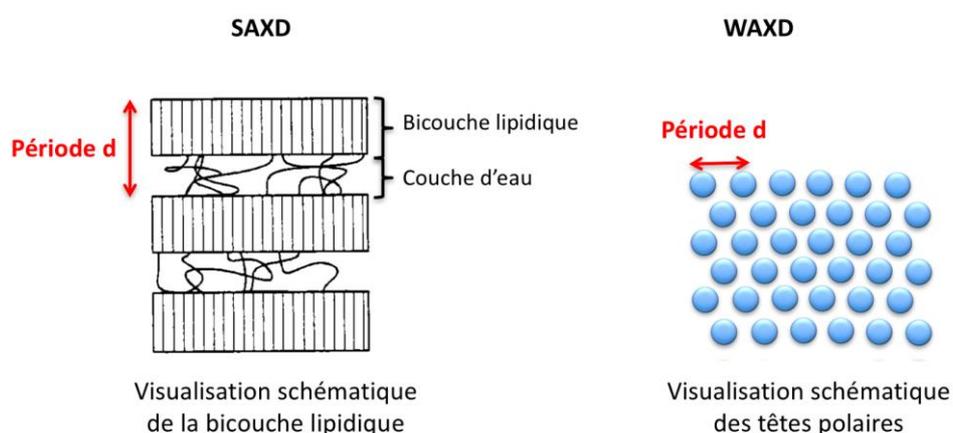


Figure 38. Distances (périodes d) mesurées par WAXD et SAXD.

L'effet de la pénétatine sur l'organisation latérale des phospholipides et sur leur stabilité thermique avait également été montré par diffraction des rayons X aux grands angles (WAXD). En l'absence de pénétatine, pour les cinq différents MLV étudiés (figure 2 en Annexe E) les pics dans les diffractogrammes sont symétriques et présentent un décalage vers de plus grandes valeurs de la période d avec l'augmentation de la température. À l'exception de la membrane SM/Chol en phase liquide ordonnée pure,

la présence de pénétратine a induit, dans tous les cas, la séparation du pic symétrique en un signal composé de deux ou trois différentes contributions. Ceci reflète la réorganisation des têtes polaires après l'interaction avec la pénétратine comme suggéré précédemment (W. Zhang and Smith 2005). Par exemple, pour les membranes de PC, lorsque la température croît, la distance entre les têtes polaires augmente. Après addition de la pénétратine, nous observons qu'au lieu d'avoir un pic de type gaussien, le diffractogramme montre un pic avec trois contributions (ou épaulements) situés aux positions : 4,72 Å ; 4,42 Å et 4,15 Å. L'une d'entre elles, celle située à 4,72 Å, montre une stabilité thermique plus importante car sa position ne change pas avec l'augmentation de la température. Les autres contributions changent de position dans le diffractogramme avec la température. Ces observations sont en accord avec la séparation de phases observée par SAXD car cela suggère une phase liquide désordonnée avec des distances entre les lipides de 4,15 Å et une phase plus ordonnée avec une distance de 4,72 Å stable avec la température. Ces distances pourraient être compatibles avec l'organisation des lipides dans une géométrie quasi hexagonale ou triangulaire ou hexagonale déformée (Heimburg 2000; Rappolt et al. 2000; Almeida et al. 2016) (Figure 39).

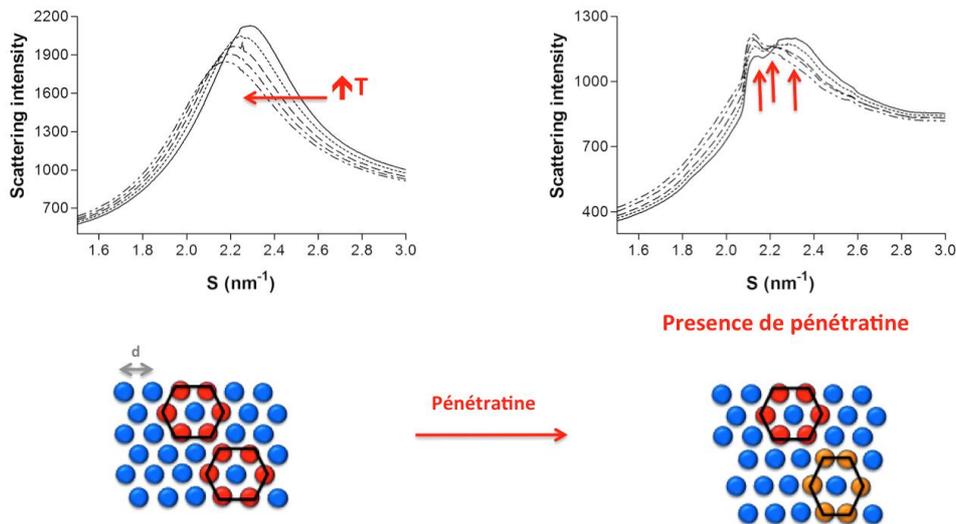


Figure 39. Diffractogramme aux grands angles des membranes PC à différentes températures (ligne continue : 5°C, ligne en pointillé : 15°C, ligne en tiret : 25°C, pointillé-tiret : 35°C et ligne double point-tiret : 45°C).

En résumé, les résultats de diffraction de rayons X aux petits angles montrent que :

1. À l'exception des membranes de SM/Chol (L_0), la pénétratine induit une séparation de phase dans la membrane. Ceci pourrait avoir une corrélation avec les résultats précédents montrant que la pénétratine ne peut pas induire la formation de tubes dans des membranes ordonnées (Lamazière et al. 2008) ;
2. Après l'ajout de la pénétratine, les phases lamellaires résultantes ne sont pas toutes impactées de la même façon par la température. En particulier, la phase lamellaire avec la période d la plus élevée (8,70 nm) a montré une plus grande résistance au changement de période lorsque la température évolue.

Ces effets induits par la pénétratine ont été confirmés par des analyses par diffraction aux grands angles montrant un pic dû à trois contributions différentes. Comme ces expériences reflètent l'arrangement des têtes polaires des phospholipides, cela reflète le fait que la pénétratine induit une réorganisation des lipides dans la membrane. En résumé, les résultats des expériences SAXD et WAXD sont corrélés car, après addition de pénétratine, il y a apparition d'un pic thermiquement stable à la fois dans la distance entre les têtes polaires (WAXD) et dans l'épaisseur de la bicouche lipidique (SAXD).

Pour étudier plus en détail l'organisation des lipides, leur compacité a été mesurée par fluorescence du Laurdan. En effet, cette sonde présente des longueurs d'onde d'émission caractéristiques pour les lipides moins compacts (L_d) et plus organisés (gel et L_0) (Figure 40). La polarité de l'environnement du Laurdan augmente avec l'augmentation de la distance entre les têtes polaires, entraînant un décalage du spectre de fluorescence vers le rouge.

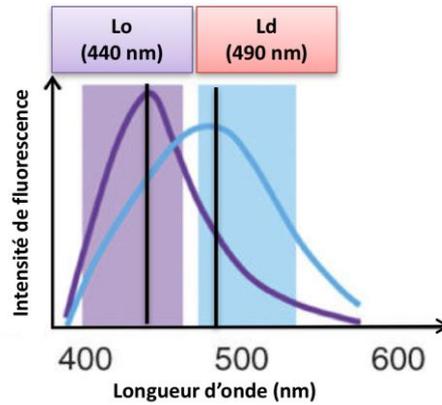


Figure 40. Spectres de fluorescence du Laurdan dans deux membranes de compacité différente.

Des lipides synthétiques ont été utilisés (DMPC et DMPC/DMPG (9/1)) pour obtenir des données sur l'interaction de la pénétratine avec des phases spécifiques de membranes caractéristiques et qui sont stables à des températures différentes (phase gel $L\beta'$, phase gel ondulé $P\beta'$ et phase fluide $L\alpha$) (Figure 41).

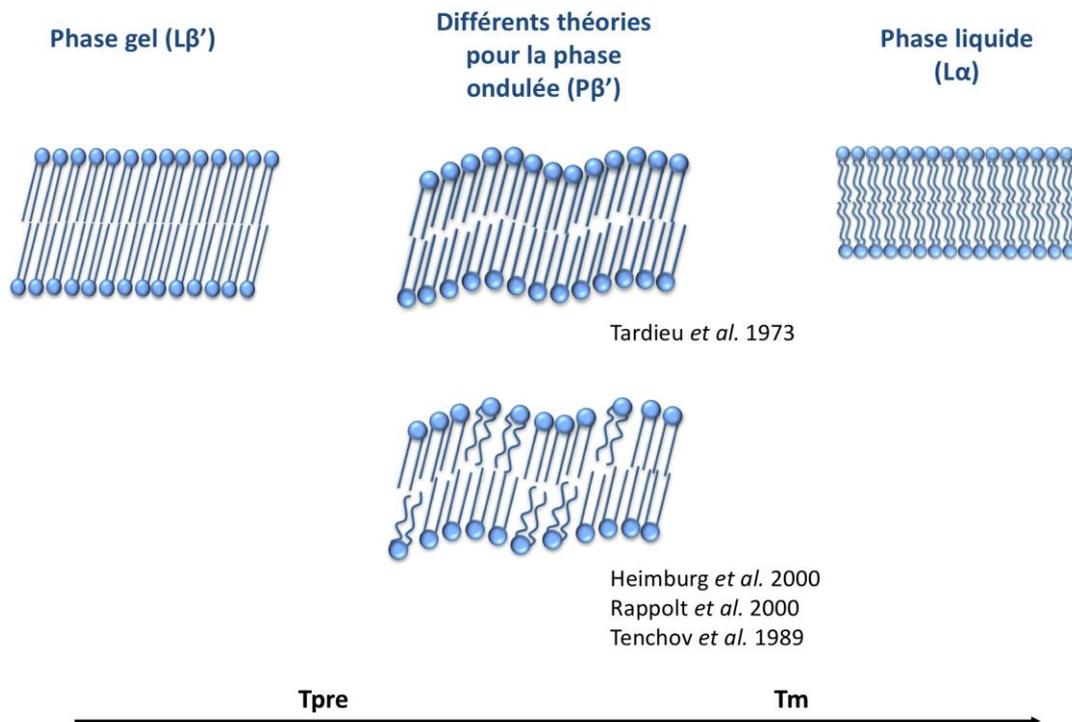


Figure 41. Différentes phases pour les membranes modèles avec des lipides synthétiques.

Nos résultats montrent que la pénétratine induit un changement assez faible sur les membranes de DMPC. En fait, le peptide diminue la compaction seulement pour des ratios élevés peptide/lipide (1/10). Les changements ont été très faibles pour les phases gel et gel ondulé mais plus importants pour la phase liquide. En présence de 10% DMPG, qui augmente l'affinité de la pénétratine pour la membrane, l'effet de la pénétratine sur la compacité/empaquetage des lipides était plus clair : la pénétratine induit une forte baisse de la compaction des lipides dans la phase liquide. Les effets ont été modérés sur la phase gel et plus faibles pour la phase gel-ondulée. Ces résultats suggèrent que l'interaction de la pénétratine avec la phase $P\beta'$ a lieu naturellement. C'est-à-dire que la pénétratine s'adapte facilement à cette organisation entraînant seulement un faible changement de la compacité des lipides, alors qu'elle induit des changements plus importants de la compacité sur d'autres phases lors de son interaction avec elles.

2. Augmentation de la compacité des lipides des membranes induite par la pénétratine : étude par fluorescence du Laurdan

Dans l'objectif d'étudier l'effet de la pénétratine sur la compacité des membranes lipidiques, nous avons utilisé la sonde d'environnement Laurdan.

Précédemment, il avait été montré que la pénétratine était capable d'induire la rigidité des phospholipides sur les membranes PG et PE, mais pas sur les membranes PC (Ofelia Maniti, Alves, Trugnan, and Ayala-Sanmartin 2010). Afin de mieux comprendre l'effet observé de la pénétratine sur l'organisation des lipides, nous avons étudié l'interaction de la pénétratine sur des membranes avec des lipides synthétiques bien caractérisées comme la DMPC qui sont capables de s'organiser de manière stable en trois différentes phases :

- à 9°C (phase gel),
- à 19°C (phase gel ondulée),
- à 30°C (phase liquide)

en présence ou en absence d'un phospholipide chargé négativement (DMPC et DMPC/DMPG (9/1)).

La Figure 42 représente un exemple de spectre de fluorescence du Laurdan d'une membrane DMPC/DMPG LUV à 30°C (phase liquide) avec et sans pénétratine.

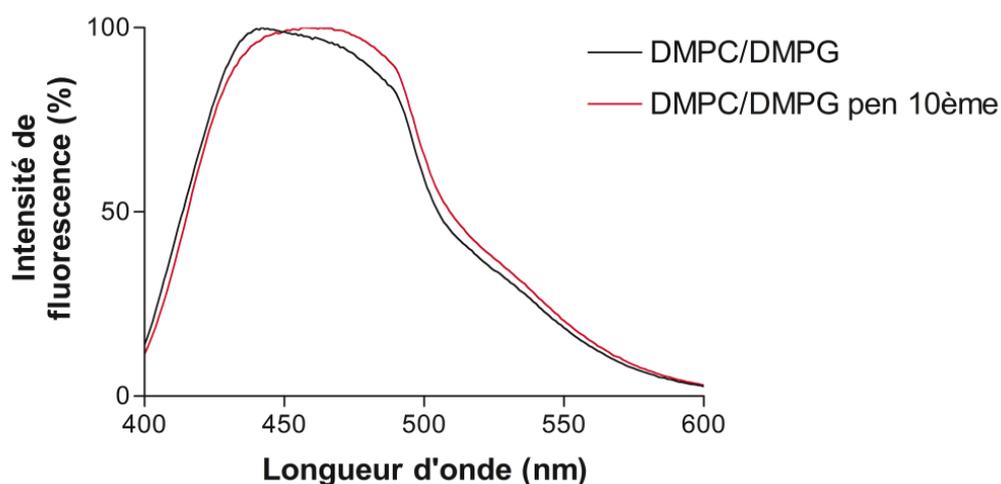


Figure 42. Effets de la pénétratine sur la compacité des membranes. Spectres de fluorescence du Laurdan dans des LUV DMPC/DMPG (9/1) à 30°C en l'absence (bleu) et en présence de pénétratine au rapport P/L 1/10 (rouge).

Sur les membranes DMPC, la pénétratine a montré un effet modéré sur la compacité des lipides qui dépend des phases lipidiques. Comme exposé sur la Figure 43A, pour un faible rapport P/L (Peptide/Lipide) (1/50), la pénétratine a montré une petite diminution de la compacité des lipides uniquement pour la phase liquide (30°C). Pour de fortes valeurs du rapport P/L (1/10), l'effet sur la compacité des lipides est visible dans les trois phases : gel (9°C), gel ondulé (19°C) et liquide (30°C).

En présence du lipide chargé négativement DMPG qui augmente l'affinité des membranes pour la pénétratine, l'effet du peptide sur la compacité des lipides est plus marqué. Sur la Figure 43B, la diminution de la compacité a été observée pour les deux ratios P/L, mais il est apparu que les changements induits par le peptide sont plus forts en phase liquide et moins importants en phase gel ondulée. Afin d'étudier davantage l'effet de la pénétratine sur l'organisation des lipides, nous avons étudié la

thermodynamique des transitions de phase des lipides (gel-gel ondulée et gel ondulée-liquide) par calorimétrie différentielle (DSC).

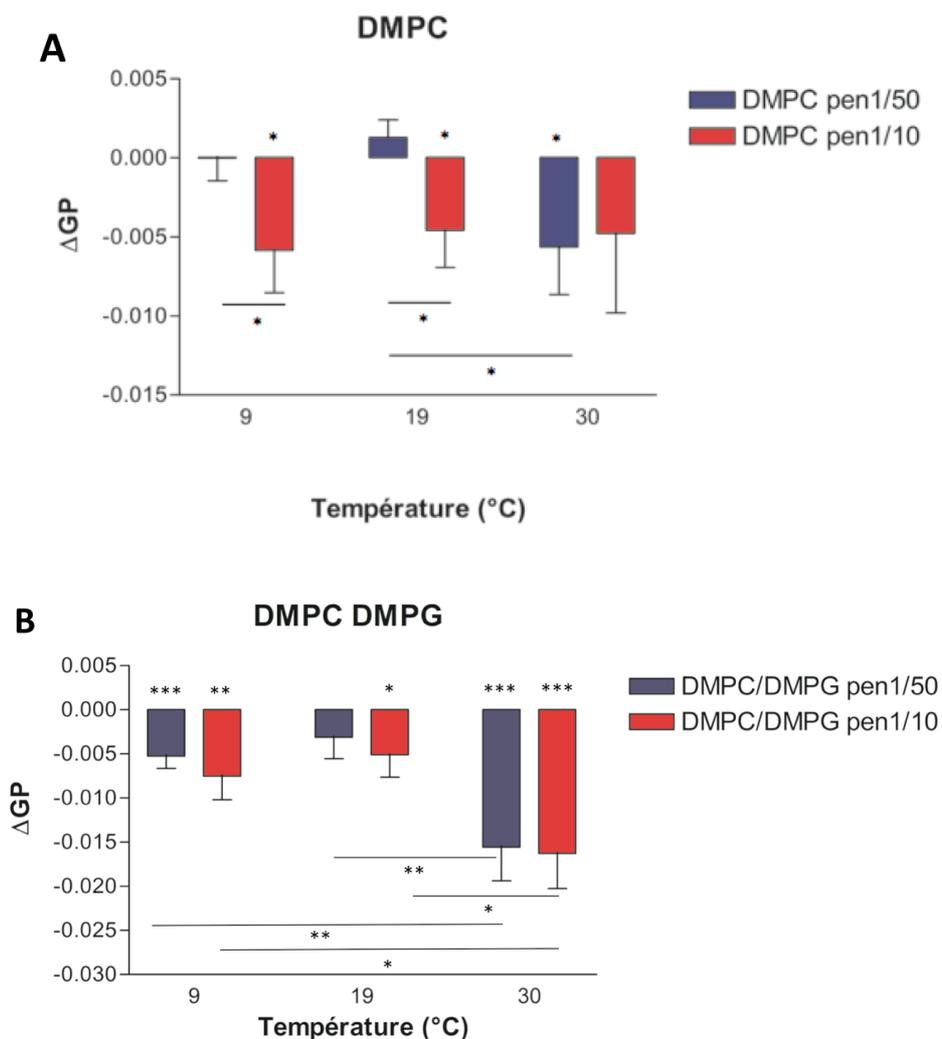


Figure 43. Changements du paramètre GP (ΔGP) du spectre de fluorescence du Laurdan induits par la pénétratine. (A) ΔGP des membranes DMPC. (B) ΔGP des membranes DMPC/PG (9/1). Les membranes après l'addition de la pénétratine à deux différents rapports molaires P/L et à trois températures correspondant aux phases gel (9°C), gel-ondulée (19°C) et liquide (30°C). Les expériences ont été effectuées de 17 à 19 fois. Les barres représentent les valeurs moyennes avec SE : * : $p < 0,05$. ** : $p < 0,01$. *** : $p < 0,001$. Étoiles à la base des barres sont liées à la différence entre GP avant et après addition de la pénétratine. Étoiles avec des lignes sont liées à la comparaison entre les différentes conditions.

3. La pénétratine favorise la transition vers la phase gel ondulée : étude par calorimétrie

Les résultats obtenus par la fluorescence de Laurdan et par diffraction des rayons X montrent que la pénétratine est capable d'induire une réorganisation des membranes lipidiques. Afin de mieux comprendre l'effet de la pénétratine sur la stabilité thermique des différentes phases lipidiques, nous avons effectué des expériences de calorimétrie avec des membranes (MLV) DMPC et DMPC/DMPG (9/1) en l'absence et en présence de pénétratine aux rapports molaires P/L 1/10 et 1/50. Les thermogrammes typiques ont montré deux pics correspondants aux transitions entre les phases gel-gel ondulée et gel ondulé-liquide (Figure 44). Les valeurs de température et d'enthalpie de transition sont indiquées dans le Tableau 3. Pour des membranes DMPC, un pic pour la température de pré-transition (T_{pre}), transition de la phase gel $L\beta'$ vers la phase gel ondulée $P\beta'$, a été observé à partir de 12,5°C. Pour la température de transition (T_m) (phase $P\beta'$ vers la phase liquide $L\alpha$) nous avons observé la transition à 23,6°C, en accord avec les valeurs publiées (I. Alves et al. 2008; Janiak, Small, and Shipley 1976; Walrant et al. 2013). Après l'addition de pénétratine, nous n'avons pas observé de variation importante pour les températures de transition à faible rapport peptide/lipide (1/50). Cependant, à un rapport peptide/lipide plus élevée (1/10), nous avons observé diminution de la température de pré-transition (T_{pre}) avec une valeur de 11,7°C. Les températures de transition (T_m) en présence du peptide sont restées stables par rapport à la DMPC seule.

Pour étudier l'effet d'une charge négative dans les membranes, des MLV ont été préparées avec DMPC/DMPG (9/1). L'effet de la pénétratine dans ces membranes a été similaire, bien que plus prononcée par rapport aux membranes DMPC. Le peptide induit un décalage plus important du pic de pré-transition ce qui se traduit par une diminution de la température de pré-transition de deux degrés (10,5°C) (Figure 45A et Tableau 3). De plus, nous avons observé une très faible, mais constante et significative, augmentation de la température de transition (quelques dixièmes de degré) (Figure 45B). Ces effets ont été observés à basse et à haute concentration de pénétratine, mais étaient plus importants avec une forte concentration de pénétratine (ratio molaire peptide/lipide de 1/10) avec un abaissement de température de 1,9°C pour la transition

de phase $L\beta'$ - $P\beta'$. En ce qui concerne l'enthalpie, nous avons observé une diminution significative pour les MLV avec une grande concentration de pénétratine pendant la pré-transition. Cette diminution de l'enthalpie est probablement due à l'hétérogénéité induite par le peptide dans l'échantillon (introduction de différentes structures lamellaires dans le système).

Afin d'étudier davantage l'effet du peptide dans les membranes, nous avons préparé des membranes de DPPC/DPPG car la présence de DMPG avait induit des effets plus importants avec les chaînes carbonées palmitoyl (16C) et myristoyl (14C). Les résultats présentés dans le Tableau 3 montrent un comportement similaire pour DPPC/DPPG par rapport aux MLV de DMPC/DMPG. A un rapport P/L 1/10, la pénétratine réduit la température de pré-transition de 2,1°C. Nous avons observé de la même façon une baisse de l'enthalpie pour la transition de phase $L\beta'$ - $P\beta'$.

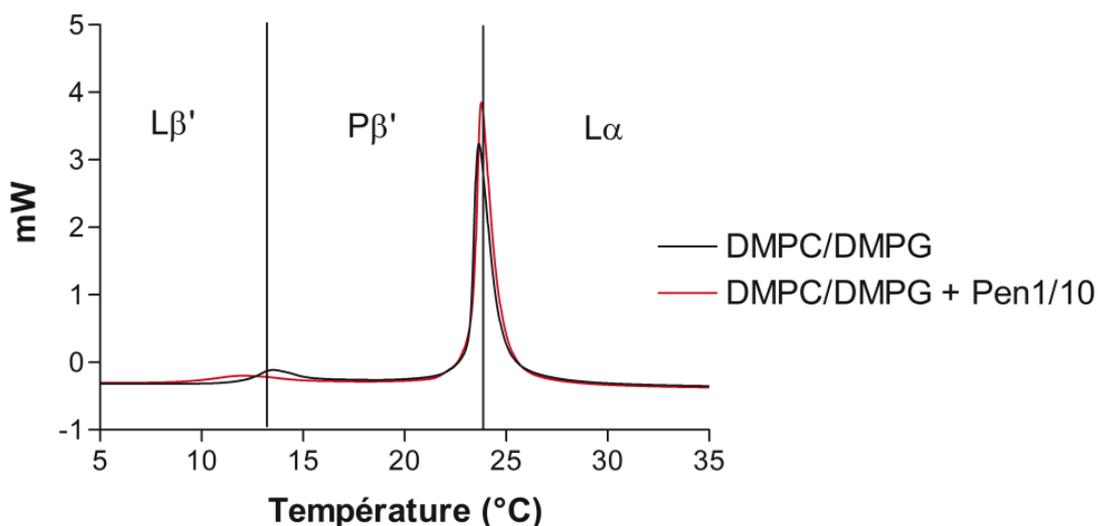


Figure 44. Effets de la pénétratine sur les températures de transition des membranes DMPC/DMPG. Le profil DSC du MLV avant (noir) et après l'addition de pénétratine (rouge) au rapport molaire P/L 1/10. Les signaux endothermiques pointent vers le haut.

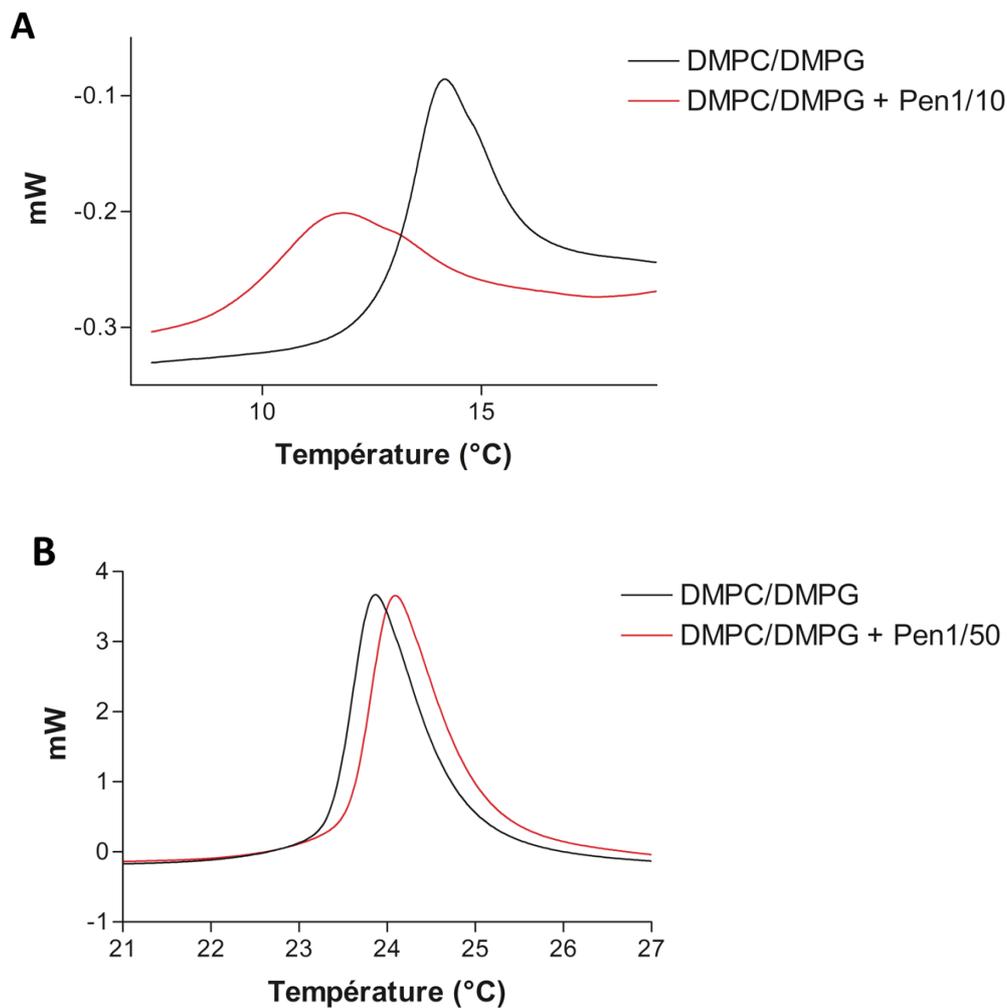


Figure 45. Effets de la pénétratine sur les températures de transition des membranes DMPC/DMPG. (A) Détail des températures de pré-transition (gel $L\beta'$ à gel-ondulée $P\beta'$) des MLV en l'absence et en présence de pénétratine pour le rapport P/L 1/10. (B) Détail des températures de transition (gel-ondulée $P\beta'$ à liquide $L\alpha$) des MLV en absence et en présence de pénétratine pour le rapport P/L 1/50. MLV avant (noir) et après addition pénétratine (rouge). Les signaux endothermiques pointent vers le haut.

Comme le montre le Tableau 3, le peptide réduit de manière significative la température de pré-transition et augmente légèrement la température de transition. De même que pour les expériences avec le Laurdan, les effets du peptide ont été plus forts avec les membranes de DMPC/DMPG qu'avec les membranes de DMPC. Les résultats sont similaires pour les membranes de DPPC/DPPG. Ainsi, la pénétratine semble favoriser la transition vers la phase gel ondulée de manière à la stabiliser. Un comportement

similaire a été remarqué pour le peptide S4 (13)-PV avec des membranes de DPPC (Cardoso et al. 2012).

Type de MLV	Rapport peptide/lipide (P/L)	T _{pre} (°C)	ΔH _{pre} (kJ/mol)	T _m (° C)	ΔH _m (kJ/mol)
DMPC	0	12,5 ± 0,37	2,7 ± 0,19	23,6 ± 0,24	21,0 ± 1,6
	1/50	12,4 ± 0,38	2,6 ± 0,23	23,6 ± 0,24	22,0 ± 1,0
	1/10	11,7 ± 0,33*	2,2 ± 0,18*	23,5 ± 0,15	19,4 ± 1,4
DMPC/DMPG (9/1)	0	12,4 ± 0,19	1,9 ± 0,25	23,6 ± 0,15	18,0 ± 1,0
	1/50	11,5 ± 0,34*	1,2 ± 1,6*	23,7 ± 0,16**	18,0 ± 1,4
	1/10	10,5 ± 0,34***	1,0 ± 1,8**	23,7 ± 0,16*	19,5 ± 1,6
DPPC/DPPG (9/1)	0	31,8 ± 0,30	1,9 ± 0,12	40,6 ± 0,17	22,7 ± 1,4
	1/50	32,0 ± 0,10	1,5 ± 0,20 ***	41,0 ± 0,10*	21,7 ± 1,7*
	1/10	29,7 ± 0,30***	1,1 ± 0,06 ***	40,5 ± 0,10	20,4 ± 0,9*

Tableau 3. Paramètres thermodynamiques mesurés par DSC pour l'interaction de la pénétratine avec les différents MLV. Les valeurs sont les moyennes ± écart-type. Des expériences ont été réalisées de 7 à 11 fois pour les membranes DMPC et DMPC/DMPG et de 3 à 5 expériences pour DPPC/DPPG. La signification statistique a été réalisée par comparaison des membranes seules ou en présence de pénétratine (* p < 0,05. ** p < 0,01. *** p < 0,001).

4. Conclusion

Nos résultats montrent que la pénétratine est capable de séparer les phases lamellaires dans les membranes et que ces nouvelles phases acquièrent de nouvelles propriétés thermiques. La pénétratine induit une certaine stabilité thermique de la phase gel-ondulée et diminue la compacité des lipides saturés. Les expériences concernant la compacité des lipides (Laurdan) ont montré que le peptide perturbe moins la phase gel-ondulée ce qui est en accord avec les résultats de l'expérience de DSC qui montrent que la pénétratine semble favoriser l'apparition et stabiliser cette phase. Deux modèles ont

été proposés pour l'organisation des lipides de la phase gel ondulée. Dans le premier, il a été proposé que les lipides sont inclinés par rapport à la normale à la membrane avec des ondulations périodiques (Tardieu, Luzzati, and Reman 1973). Cependant, Tenchov (Tenchov, Yao, and Hatta 1989) a montré l'existence de deux différents types de phase gel ondulée $P\beta'$, l'une étant métastable. Plus récemment, deux groupes ont publiés des résultats expérimentaux et des simulations suggérant que la phase $P\beta'$ pourrait être constituée de deux différentes structures, l'une étant une phase gel inclinée, coexistant avec une phase plus fluide responsable des ondulations (Heimburg 2000; Rappolt et al. 2000).

Nos données sont en accord avec cette hypothèse puisque la pénétratine stabilise la phase ondulée et en même temps induit la décompaction ainsi qu'une séparation de phases (Figure 46). La capacité de la pénétratine à modifier l'organisation des lipides peut être un facteur important pour sa capacité à traverser les membranes plasmiques.

Les effets de la pénétratine ne signifient pas que la phase ondulée est indispensable pour la translocation (cette phase n'existant pas *in vivo* dans les membranes cellulaires). Une hypothèse, basée sur nos résultats, suggère que les changements induits par la pénétratine dans l'organisation des lipides entraînant une séparation des structures lamellaires (augmentation de l'hétérogénéité de la membrane) sont importants pour la translocation du peptide. En effet, la pénétratine pourrait tirer parti de la présence de mésappariements, ou de discontinuités sur la membrane entre les phases préexistantes et celles induites par le peptide (les domaines de la membrane) de différentes épaisseurs et de différentes propriétés physiques.

Séparation de phase dans la membrane (par rayons-X)

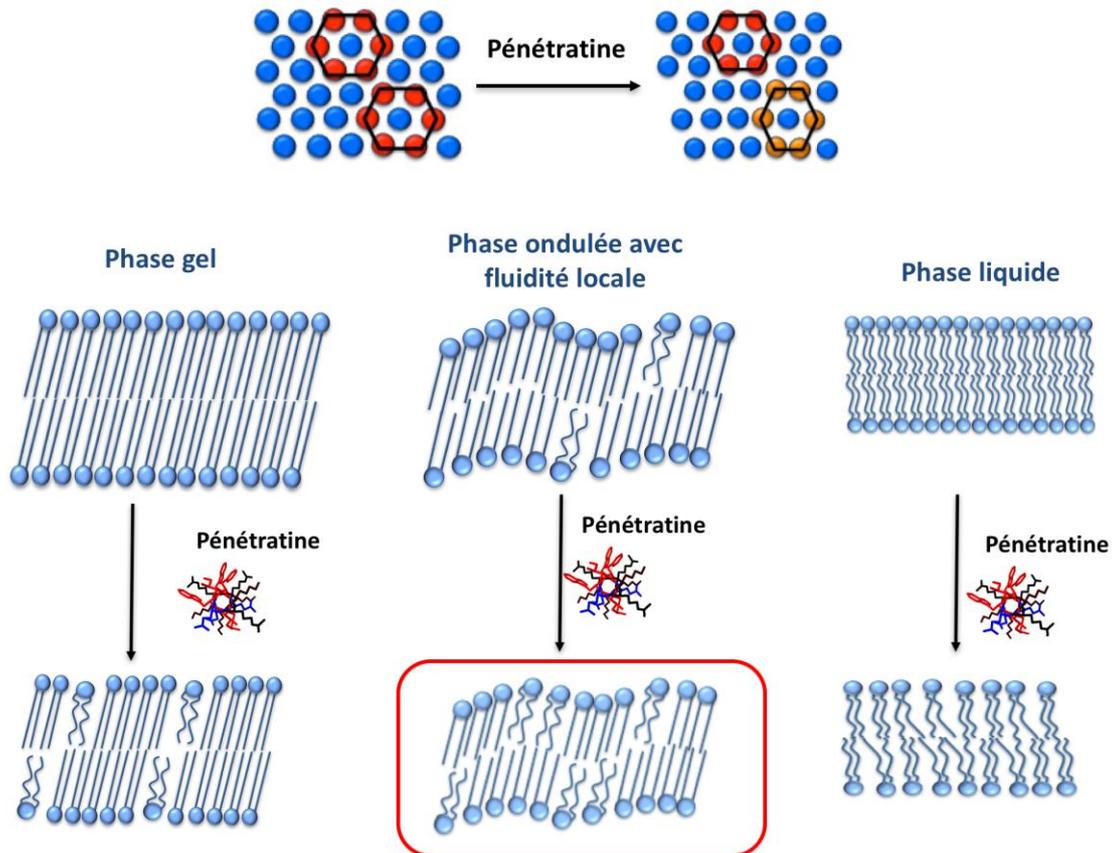


Figure 46. Schéma global qui illustre l'effet de la pénétratine sur les membranes lipidiques. Interaction de la pénétratine avec la phase ondulée avec fluidité locale dans la membrane.

Références

Almeida, Claudia et al. 2016. "Membrane Re-Arrangements and Rippled Phase Stabilisation by the Cell Penetrating Peptide Penetratin." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1858(11): 2584–91.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.07.012>.

Alves, I et al. 2008. "Membrane Interaction and Perturbation Mechanisms Induced by Two Cationic Cell Penetrating Peptides with Distinct Charge Distribution." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1780(7–8): 948–59.

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416508000998>.

- Bellet-Amalric, E et al. 2000. "Interaction of the Third Helix of Antennapedia Homeodomain and a Phospholipid Monolayer , Studied by Ellipsometry and PM-IRRAS at the Air ^ Water Interface." 1467.
- 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.
- Cardoso, Ana M S et al. 2012. "S4(13)-PV Cell-Penetrating Peptide Induces Physical and Morphological Changes in Membrane-Mimetic Lipid Systems and Cell Membranes: Implications for Cell Internalization." *Biochimica et biophysica acta* 1818(3): 877–88.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273611004597>.
- Christiaens, Bart et al. 2002. "Tryptophan Fluorescence Study of the Interaction of Penetratin Peptides with Model Membranes." *Eur J Biochem* 269(12): 2918–26.
- Derossi, Daniele, Alain Joliot, Gerard Chassaing, and Alain Prochiantz. 1994. "The Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Translocates through Biological Membranes." *J Biol Chem* 269(14): 10444–50.
- Deshayes, Sébastien, Marc Decaffmeyer, Robert Brasseur, and Annick Thomas. 2008. "Structural Polymorphism of Two CPP : An Important Parameter of Activity." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778(5): 1197–1205.
- Eiríksdóttir, Emelía et al. 2010. "Biochimica et Biophysica Acta Secondary Structure of Cell-Penetrating Peptides Controls Membrane Interaction and Insertion." *BBA - Biomembranes* 1798(6): 1119–28.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.03.005>.
- Heimburg, Thomas. 2000. "A Model for the Lipid Pretransition: Coupling of Ripple Formation with the Chain-Melting Transition." *Biophysical Journal* 78(3): 1154–65.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349500766732>.
- Janiak, M J, D M Small, and G G Shipley. 1976. "Nature of the Thermal Pretransition of Synthetic Phospholipids: Dimyristoyl- and Dipalmitoyllecithin." *Biochemistry*

15(21): 4575–80.

- Lamazière, Antonin et al. 2007. “Non-Metabolic Membrane Tubulation and Permeability Induced by Bioactive Peptides.” *PloS one* 2(2): e201.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1790702&tool=pmc&rendertype=abstract>.
- Lamazière, Antonin et al. 2008. “The Homeodomain Derived Peptide Penetratin Induces Curvature of Fluid Membrane Domains.” *PloS one* 3(4): e1938.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2276244&tool=pmc&rendertype=abstract>.
- Lamazière, Antonin et al. 2010. “Lipid Domain Separation, Bilayer Thickening and Pearling Induced by the Cell Penetrating Peptide Penetratin.” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1798(12): 2223–30.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.12.024>.
- Lamazière, Antonin, Gérard Chassaing, Germain Trugnan, and Jesus Ayala-Sanmartin. 2009. “Tubular Structures in Heterogeneous Membranes Induced by the Cell Penetrating Peptide Penetratin.” *Communicative integrative biology* 2(3): 223–24.
- Lundin, Per et al. 2008. “Distinct Uptake Routes of Cell-Penetrating Peptide Conjugates.” *Bioconjug Chem* 19(12): 2535–42.
- Magzoub, Mazin, L E Go, and Astrid Gra. 2002. “Conformational States of the Cell-Penetrating Peptide Penetratin When Interacting with Phospholipid Vesicles : Effects of Surface Charge and Peptide Concentration.” 1563: 53–63.
- 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): e15819.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3012702&tool=pmc&rendertype=abstract>.
- Milletti, Francesca. 2012. “Cell-Penetrating Peptides: Classes, Origin, and Current Landscape.” *Drug Discovery Today* 17(15–16): 850–60.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644612000839>.

- Rappolt, M et al. 2000. "New Evidence for Gel-Liquid Crystalline Phase Coexistence in the Ripple Phase of Phosphatidylcholines." *European biophysics journal : EBJ* 29: 125–33.
- Su, Yongchao et al. 2008. "Reversible Sheet-Turn Conformational Change of a Cell-Penetrating Peptide in Lipid Bilayers Studied by Solid-State NMR." *Journal of molecular biology* 381(5): 1133–44.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4127321&tool=pmc&rendertype=abstract>.
- Tardieu, A., Vittorio Luzzati, and F. C. Reman. 1973. "Structure and Polymorphism of the Hydrocarbon Chains of Lipids: A Study of Lecithin-Water Phases." *Journal of Molecular Biology* 75(4): 711–33.
- Tenchov, Boris G, Haruhiko Yao, and Ichiro Hatta. 1989. "Time-Resolved X-Ray Diffraction and Calorimetric Studies at Low Scan Rates Sample Preparation." *Biophysical Journal* 56(4): 757–68. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(89\)82723-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(89)82723-7).
- Walrant, Astrid et al. 2013. "Direct Translocation of Cell-Penetrating Peptides in Liposomes: A Combined Mass Spectrometry Quantification and Fluorescence Detection Study." *Analytical Biochemistry* 438(1): 1–10.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2013.03.009>.
- Zhang, Wenyi, and Steven O Smith. 2005. "Mechanism of Penetration of Antp (43 - 58) into Membrane Bilayers †." *Biochemistry* 44(30): 10110–18.

Chapitre 4

Utilisation de la sonde cholestérol-pyrène pour déterminer la distribution du cholestérol dans la membrane

1. Le cholestérol-pyrène comme sonde fluorescente

Nous avons vu précédemment que la pénétratine, sur membranes modèles, induit un changement d'organisation locale ou globale des bicouches lipidiques. Le problème avec les techniques utilisées *in vitro* avec des espèces lipidiques pures est qu'elles sont soumises à des contraintes qui limitent la compréhension des processus que nous pouvons trouver dans les membranes *in vivo*. Il est ainsi important d'étudier des membranes complexes pour mieux cerner les modifications induites par les peptides sur les différentes membranes. Dans le chapitre précédent nous avons utilisé un fluorochrome senseur d'environnement, le Laurdan. Ce dernier donne accès à un aperçu global de la membrane puisqu'il est réparti dans les domaines L_o et L_d . En revanche, la sonde cholestérol-pyrène permet de suivre uniquement l'environnement autour du cholestérol dans la membrane. En effet, le cholestérol-pyrène au sein de la membrane, a un comportement similaire au cholestérol. Toutes les sondes pour suivre le cholestérol qui sont présentées en Annexe C semblent moins adéquates que le cholestérol-pyrène car elles sont structurellement plus éloignées du cholestérol (Sezgin et al. 2016). Le cholestérol-pyrène est donc ce qu'il y a de plus adapté pour mimer le cholestérol et l'étudier dans les membranes.

Afin de comprendre le mouvement du cholestérol dans son environnement naturel, à l'aide des membranes composées des lipides naturels hétérogènes mimant les membranes cellulaires, nous avons étudié les spectres de fluorescence du cholestérol-pyrène dans des LUV en phase liquide ordonnée et en phase liquide désordonnée. Tout d'abord, il a fallu définir les longueurs d'onde « caractéristiques » qui permettent de

différencier les domaines de la membrane, ainsi que de déterminer le point constant de référence spectrale. Ce point a la même intensité de fluorescence, indépendamment de la proportion des excimères et monomères, quelle que soit la membrane utilisée.

Nous avons donc effectué des expériences avec des membranes composées de lipides provenant de sources naturelles :

- **PC** (phase liquide désordonnée L_d)
- **SM/Chol** (1/1) (phase liquide ordonnée L_o).

Le choix des lipides naturels a été fait afin de mieux comprendre le comportement du cholestérol dans les conditions biologiques normales, c'est à dire, avec membranes composées de lipides avec des chaînes acyles hétérogènes (saturées et insaturées). Nous avons utilisé le cholestérol-pyrène (Py-met-Chol) à deux concentrations (1,8 et 3,6 mol%) qui sont dans la gamme recommandée dans la littérature (Figure 47) (Le Guyader, Le Roux, Mazères, et al. 2007).

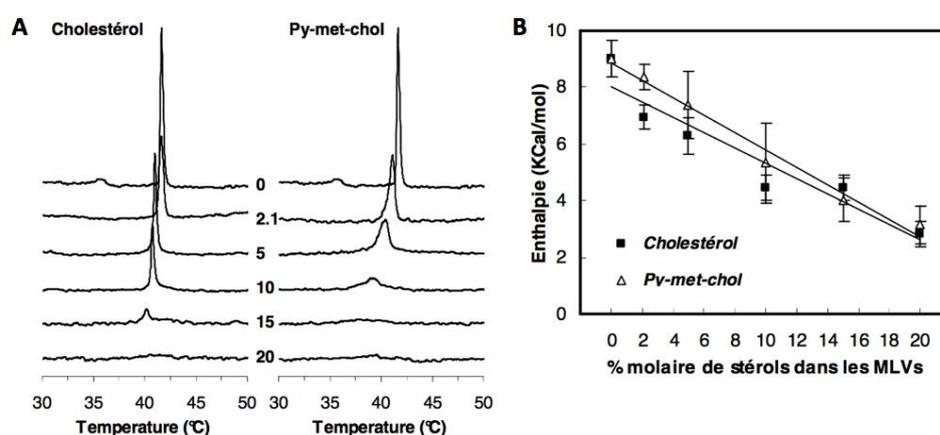


Figure 47. Étude comparative de DSC sur des suspensions de MLV de DPPC contenant 0 ; 2,1 ; 5 ; 10 ; 15 et 20 mol% de cholestérol ou de Py-met-chol. (A) Thermogrammes. (B) évolution de l'enthalpie de la transition gel-fluide du DPPC en fonction de la concentration de stérols (Laurent Le Guyader, Le Roux, Maze, et al. 2007).

Des expériences de calorimétrie avec des MLV de DPPC contenant différentes fractions molaires de cholestérol ou de Py-met-chol ont montré que le cholestérol et le Py-met-chol ont un comportement membranaire très proche pour des concentrations faibles (en-dessous de 5 mol%) (Le Guyader, Le Roux, Mazères, et al. 2007).

Les membranes en phase L_d sont très sensibles aux variations de température comme cela a déjà été mentionné au chapitre 1. Les membranes en phase L_o , qui est moins fluide, montrent de faibles changements de l'épaisseur de la membrane induits par la température (D A Brown and London 1998; Chachaty et al. 2005; Tessier et al. 2009). Par conséquent, pour mieux comprendre le comportement du cholestérol-pyrène, les expériences ont été réalisées à différentes températures en utilisant des protocoles de chauffage et de refroidissement (les détails sont donnés dans le chapitre Matériaux et méthodes).

La sonde cholestérol-pyrène a été étudiée préalablement dans des membranes modèles et des membranes biologiques (Le Guyader, Le Roux, Mazères, et al. 2007). Ces auteurs ont proposé d'étudier la polarité de l'environnement de la sonde en mesurant le pic de fluorescence du pyrène à 376 nm, et la densité du cholestérol en mesurant la formation d'excimères identifié par un pic à 475 nm. De plus, ils ont suggéré que le pic à 388 nm pouvait être utilisé en tant que marqueur constant : son intensité ne dépendrait que de la concentration de la sonde. Cependant, pour étudier la fluorescence du pyrène dans différents environnements, d'autres auteurs ont utilisé des longueurs d'onde différentes. Certains auteurs suggèrent par exemple 376 et 378 nm comme des marqueurs de la polarité et les diverses longueurs d'onde dans l'intervalle 460 - 500 nm pour la contribution des excimères. Les longueurs d'onde de 393 à 398 nm et 421 nm ont été utilisées pour la quantification du "monomère" (Yechezkel Barenholz et al. 1996; Chong, Tang, and Sugar 1994; Laurent Le Guyader, Le Roux, Mazères, et al. 2007; Kim and Torkelson 2002; Wilson-Ashworth et al. 2006; F. M. Winnik et al. 1992). La partie du spectre dans la gamme de 360 à 420 nm se compose d'au moins cinq pics principaux présentant un comportement complexe dans les solvants de différente polarité et constante diélectrique, ce qui rend difficile le classement des pics en fonction de la « polarité ». Cette partie du spectre est spécifique de la molécule du pyrène dans son état monomère. La Figure 48 et le Tableau 5 présentent les longueurs d'onde caractéristiques trouvées par différents auteurs.

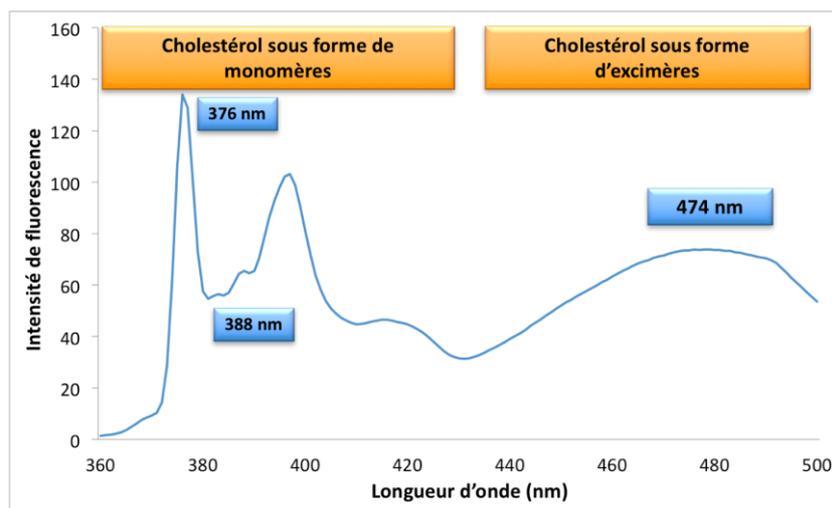
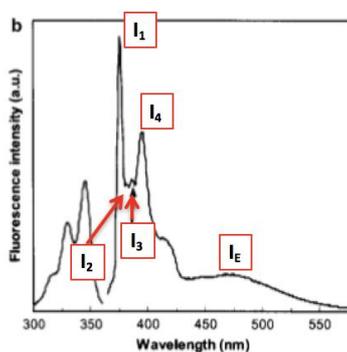


Figure 48. Spectre du cholestérol-pyrène avec les longueurs d'onde d'intérêt citées par Le Guyader (Le Guyader et al. 2007).



Références	I ₁ (nm) Polarité	I ₃ (nm) Constant	I _ε (nm) Excimère	I ₄ (nm) Monomère
Le Guyader (Laurent Le Guyader, Le Roux, Maze, et al. 2007)	376	388	475	374-377
Wilson (Wilson-Ashworth et al. 2006)			479-488	396
Kim (Kim and Torkelson 2002)			480	396
Barenholz (Yechezkel Barenholz et al. 1996b)			480	393
Chong (Chong, Tang, and Sugar 1994)	378		478	
Winnik (F. M. Winnik et al. 1992b)	376		470-480	397

Tableau 4. Tableau avec différentes longueurs d'onde caractéristiques suggérées par la littérature pour l'étude de la fluorescence du pyrène.

Kalyanasundaram et collaborateurs (Kalyanasundaram and Thomas 1977) ont défini cinq pics très sensibles qui correspondent à certaines des 16 bandes vibroniques trouvées dans la région du spectre comprise entre 370 et 397 nm (Tableau 5).

Bandes vibroniques

Peak	λ , nm	ν , cm^{-1}	Distance from 0-0 line	Assignment (IR/Raman active)	Vibrational mode and symmetry type	
373 nm	I	372.51	26 845	0	0-0	
		378.23	26 439	406	0-406 (R)	$a_g(\omega)$
379 nm	II	378.95	26 389	456	0-456 (IR)	$b_{1g}(\tau)$
		379.58	26 345	500	0-500 (IR)	$b_{1g}(\tau)$
III		383.03	26 108	737	0-737 (IR)	$b_{1g}(\kappa)$
		384.00	26 042	803	0-803	$a_g(\kappa)$
		387.99	25 774	1071	0-1071 (R)	$a_g(\delta)$
IV		388.55	25 737	1108	0-1108 (R)	b_{1g}
		389.08	25 702	1143	0-1143 (R)	$a_g(\delta)$
		390.42	25 613	1232	0-1232 (R)	$a_g(\delta)$
		391.80	25 523	1322	0-1322 (R)	$(a_g + b_{1g})(\kappa)$
		392.49	25 478	1367	0-1367 (R)	b_{1g}
		392.85	25 455	1390	0-1390 (R)	$a_g(\omega)$
V		393.09	25 439	1406	0-1406 (R)	$a_g(\omega)$
		395.34	25 295	1551	0-1551 (R)	a_g
		396.04	25 250	1595	0-1595 (R)	$b_{1g}(\omega)$

Tableau 5. Bandes vibroniques, pics et paramètres associés à la fluorescence du Pyrène (Kalyanasundaram and Thomas 1977).

Comparaison du comportement spectral du cholestérol-pyrène après chauffage et refroidissement des membranes

Pour faire une étude comparative entre les différentes expériences réalisées, nous avons normalisé tous les spectres par leur intégrale. La Figure 49 montre les spectres moyennés des LUV PC et SM/Chol (1/1) à trois températures après chauffage et refroidissement. Pour une température spécifique, la forme du spectre change légèrement en fonction des cycles de chauffage ou de refroidissement. Par exemple, la quantité d'excimères (474 nm) à 10°C est plus élevée avant de chauffer et est plus faible après refroidissement. Au contraire, à 55°C, le signal de l'excimère est plus faible après chauffage et est plus élevé avant le refroidissement. Cependant, à 35°C, la différence spectrale entre les protocoles de chauffage et de refroidissement est faible. Il avait déjà été décrit le comportement thermique des membranes PC/SM/Chol où les domaines ordonnés de la membrane (SM/Chol) sont plus résistants à la température par rapport à des domaines désordonnés (PC) (Tessier et al. 2009) (Figure 50).

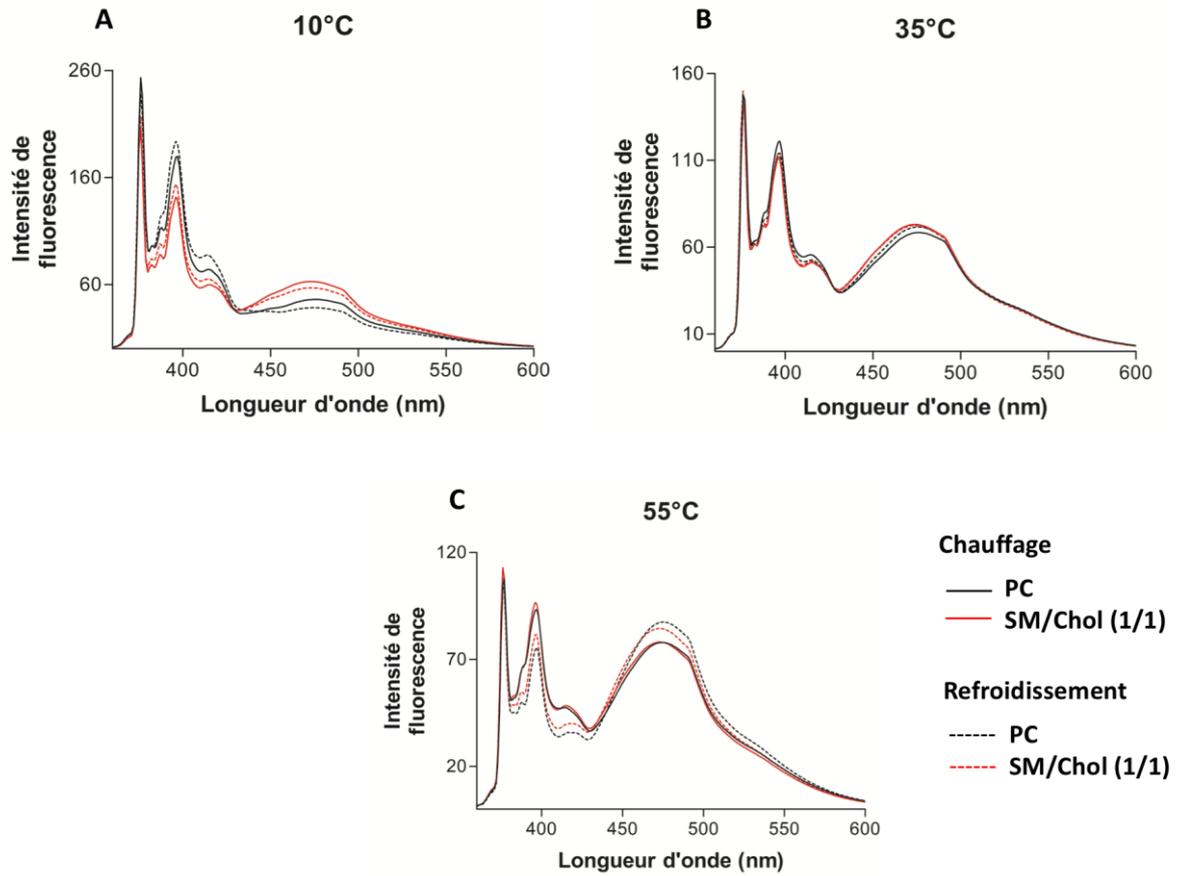


Figure 49. Spectres moyennés des LUV PC et SM/Chol (1/1) à différentes températures pour les protocoles du chauffage (ligne continue) et refroidissement (ligne pointillée) à (A) 10°C (B) 35°C et (C) 55°C. Lignes noires : LUV PC, lignes rouges : LUV SM/Chol. Chaque ligne est le spectre moyenné d'expériences indépendantes (sept pour les LUV PC et huit pour les LUV SM/Chol).

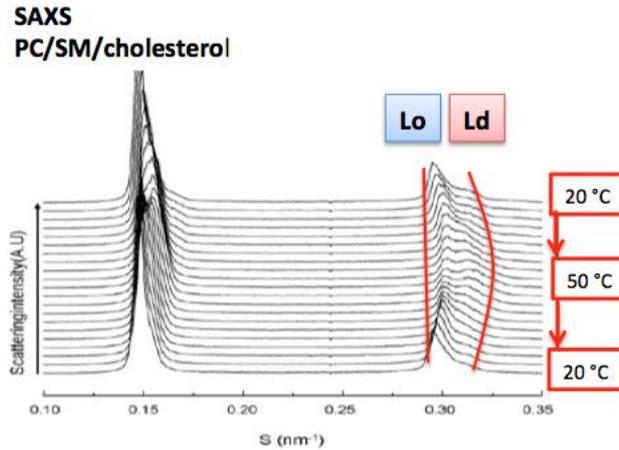


Figure 50. SAXD réalisé sur des membranes de PC/SM/Chol (45/45/10 mol/mol/mol) montrant que les domaines L₀ sont plus stables thermiquement par rapport aux domaines L_d (Tessier et al. 2009).

Différences entre les membranes L₀ et L_d

Une manière d'identifier les longueurs d'onde qui permettent de différencier la sonde Py-met-Chol dans les membranes L₀ et L_d est de soustraire les spectres. Nous avons effectué des soustractions à différentes températures après chauffage ou refroidissement (Figure 51). La soustraction de spectres permet d'identifier des longueurs d'onde intéressantes pour les membranes de type L₀ et L_d mais, en raison de l'amplitude des conditions expérimentales utilisées, il s'avérait difficile de définir les longueurs d'onde significatives du point de vue statistique. Nous avons donc décidé de chercher les longueurs d'onde optimales pour le suivi du comportement de la sonde cholestérol-pyrène dans des membranes ordonnées et désordonnées par une analyse multivariée en composante principale qui permet de trouver les variables les plus pertinentes et statistiquement significatives dans les différentes conditions testées.

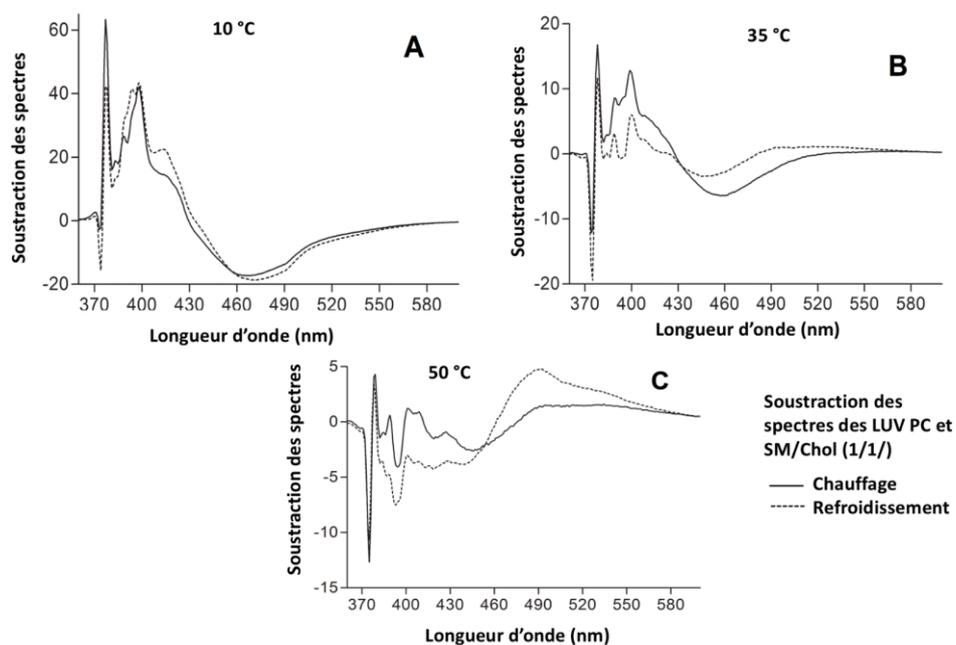


Figure 51. Soustraction des spectres du Py-met-Chol dans des membranes L_o (SM/Chol) et L_d (PC) avec Py-met-Chol 3,6 % v/v. Spectre moyenné du PC moins le spectre moyenné du SM/Chol à (A) 10°C, (B) 35°C et (C) 55°C. Ligne continue pour le protocole du chauffage et ligne pointillée pour celui du refroidissement. Moyenne de sept expériences indépendantes pour PC et huit pour SM/Chol.

A la vue du grand nombre de variables (longueurs d'onde) et du nombre important de spectres dans les différentes conditions, nous avons utilisé une approche d'analyse multivariée. La Figure 52 montre les spectres du cholestérol des LUV PC en cycle de chauffage. La soustraction des spectres et la détermination de bandes vibroniques peuvent donner des informations pour les différentes conditions, mais ceci reste difficile à interpréter pour l'ensemble des conditions envisagées. C'est pourquoi nous avons utilisé l'analyse multivariée qui possède plusieurs avantages. En effet elle permet de :

- Gérer une matrice des données avec un grand nombre de variables et peu d'observations ;
- Traiter des matrices carrées quelle que soit leur taille ;
- D'analyser la multi-colinéarité ;
- D'obtenir un bon rapport signal sur bruit ;
- Séparer les régularités du bruit.

Pour notre analyse avec 186 longueurs d'onde (variables) et 480 observations (spectres), l'analyse multivariée est un outil rationnel pour sélectionner les longueurs d'onde qui caractérisent les membranes avec la sonde cholestérol-pyrène.

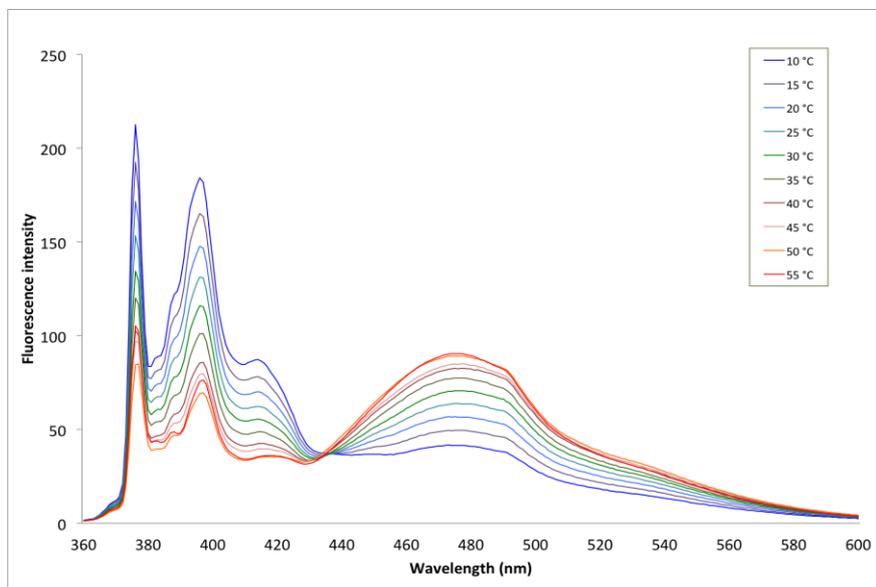


Figure 52. Spectres normalisés de fluorescence du cholestérol-pyrène pour des LUV PC à différentes températures après chauffage.

Détermination des longueurs d'onde spécifiques pour les membranes L_o et L_d

Afin de définir les longueurs d'onde spécifiques pour les phases L_o et L_d , nous avons comparé les spectres de Py-met-Chol dans les membranes PC et SM/Chol (1/1) à des températures allant de 10 à 55°C en utilisant des protocoles de chauffage et de refroidissement présentés dans le chapitre Matériaux et méthodes. La concentration en Py-met-Chol est de 1,8 ou 3,6 mol%.

Nous avons soumis à l'analyse spectrale en conditions de chauffage et refroidissement (10 températures par condition) les échantillons suivants :

- LUV PC avec Py-met-Chol à 1,8 mol% (quatre préparations indépendantes) ;
- LUV SM/Chol avec Py-met-Chol à 1,8 mol% (cinq préparations indépendantes) ;
- LUV PC avec Py-met-Chol à 3,6 mol% (sept préparations indépendantes) ;
- LUV SM/Chol avec Py-met-Chol à 3,6 mol% (huit préparations indépendantes).

Les variables sont les longueurs d'onde normalisées par l'intégrale de 365 à 550 nm (186 variables). Chaque condition de LUV est une observation. Nous avons effectué les analyses en composantes principales (PCA) et des analyses discriminantes par les moindres carrés partiels ((O)PLS-DA). En utilisant différents outils du programme SIMCA tels que l'importance des descripteurs dans la projection (*variable importance projection VIP*), *biplot (scores + loadings)*, *S-plots* (covariance et corrélation) et en comparant les groupes des membranes LUV PC et SM/Chol, nous avons pu sélectionner les longueurs d'onde dont les variations d'intensité étaient les plus significatives pour différencier les membranes de types L_o (SM/Chol) et L_d (PC).

La Figure 53 montre les graphes *score* et *loading representation* issus de l'analyse SIMCA. L'analyse montre la séparation de deux populations différentes (PC et SM/Chol). Premièrement, pour chaque composition de membrane, les points correspondant aux protocoles de refroidissement et de chauffage appartiennent à la même population (Figure 53A). Deuxièmement, la séparation entre les populations PC et SM/Chol suit un axe qui sépare les quadrants : gauche en bas et droite en haut. La Figure 53B montre le plan de corrélation des variables pour les points des membranes PC et SM/Chol correspondant aux composantes principales de la Figure 53A.

Chapitre 4 : Utilisation de la sonde cholestérol-pyrène pour déterminer la distribution du cholestérol dans la membrane

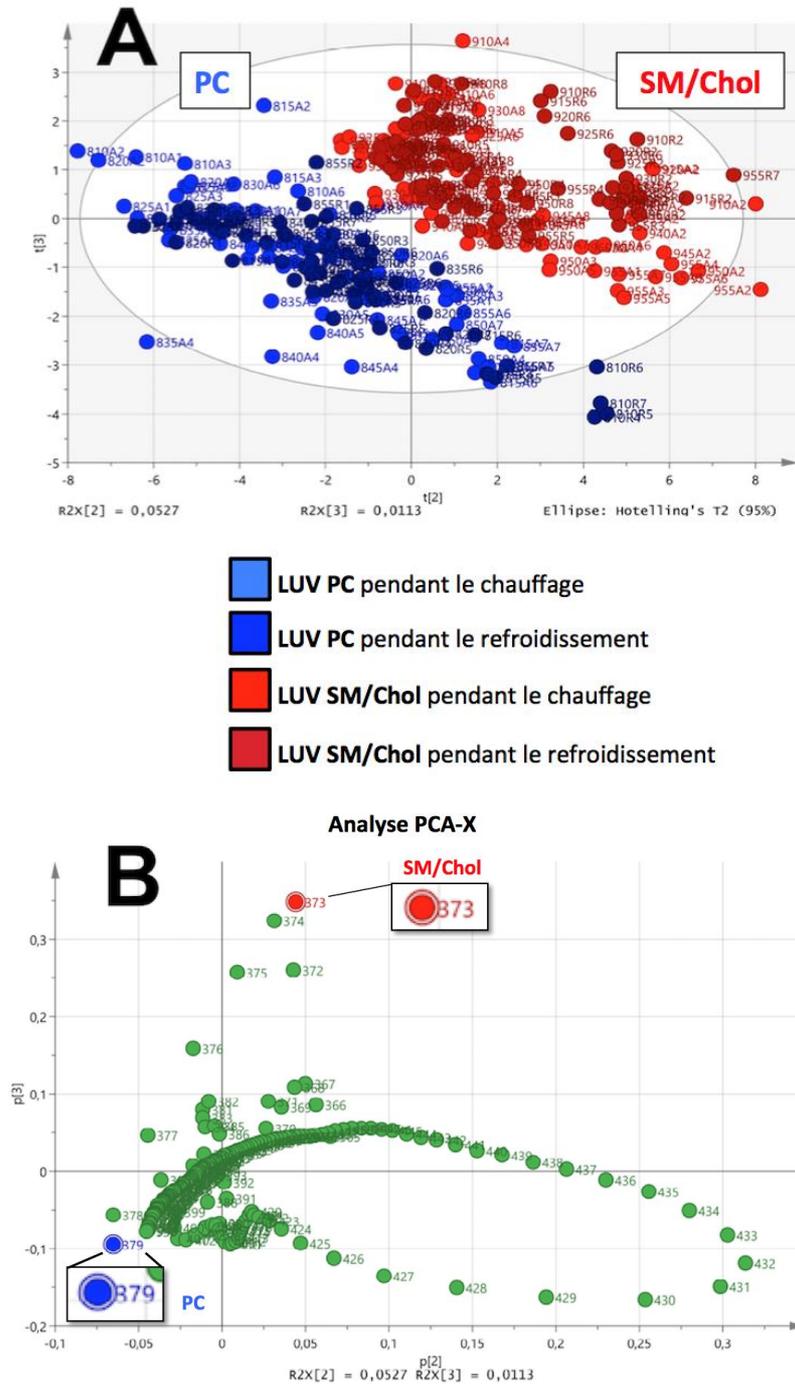


Figure 53. Analyse des principaux composants des expériences indépendantes (spectres) et des variables (longueur d'onde). (A) Distribution des données. Chaque point représente un spectre à partir des protocoles de refroidissement et de chauffage (PC et SM/Chol). (B) Corrélation des variables (*loading scatter plot*). Les variables fortement anti-corrélées dans la direction de l'axe séparant les quadrants gauche-bas et droite-haut sont 379 et 373 nm.

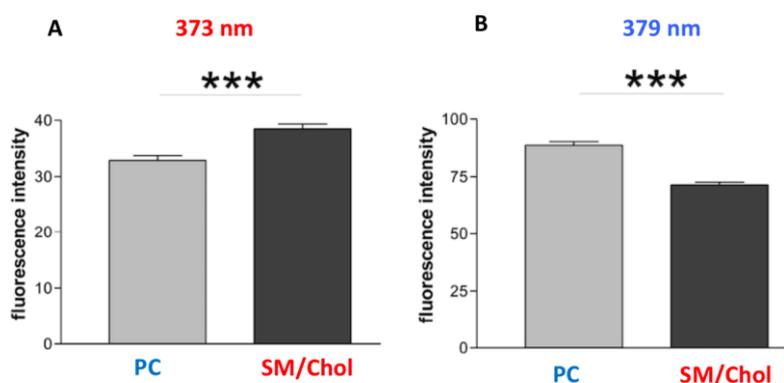


Figure 54. Analyses statistiques montrant la différence de la totalité des intensités de fluorescence des LUV PC et SM/Chol dans toutes les conditions testées. (A) Pour la longueur d'onde de 373 nm. (B) Pour la longueur d'onde de 379 nm. Moyennes \pm l'écart type, *** $P < 0,001$.

Dans la représentation de la Figure 53B, les variables (longueurs d'onde) opposées suivant les axes sont anti-corrélées. Dans notre cas, cela signifie que la population de points du cadran bas en gauche (PC) est corrélée avec la longueur d'onde de 379 nm et inversement, les points du cadran haut droit (SM/Chol) le sont avec une longueur d'onde de 373 nm. Cette corrélation est confirmée par l'analyse statistique de la Figure 54. Ces deux longueurs d'onde ne correspondent pas à un pic de spectre conventionnel mais plutôt aux bandes vibroniques spécifiques 372,51 et 378,99 nm (Kalyanasundaram and Thomas 1977). Le pic situé à 376 nm précédemment utilisé comme marqueur de polarité ne correspond pas à une bande vibronique unique mais à la contribution de quatre bandes vibroniques dans le pic de fluorescence. Nos analyses suggèrent que ces longueurs d'onde peuvent être considérées comme des marqueurs des membranes de type L_o pour 373 nm et de type L_d pour 379 nm et qui seront désormais appelées : **CPyLo** et **CPyLd** respectivement. Par conséquent, pour valider ces longueurs d'onde comme outil de mesure, nous avons effectué des comparaisons détaillées de ces paramètres pour les membranes L_o (SM/Chol) et L_d (PC) avec les longueurs d'onde tirées de la littérature (Tableau 6 et Figure 55).

Longueur d'onde (nm)	Interprétation	Abréviation
373	Marqueur de la phase liquide ordonnée (Lo) (longueur d'onde sélectionné par PCA)	CPyLo
376	« Polarité » (Laurent Le Guyader, Le Roux, Mazères, et al. 2007)	I ₁
379	Marqueur de la phase liquide désordonnée (Ld) (longueur d'onde sélectionné par PCA)	CPyLd
388	« Constant » (Laurent Le Guyader, Le Roux, Mazères, et al. 2007)	I ₃
401	“Polarité” ou environnement (longueur d'onde sélectionné par PCA)	pol
432	Constant, Point iso-émissive (longueur d'onde sélectionné par PCA)	iso
474	Assemblage de Py-met-Chol, excimères	exc

Tableau 6. Des longueurs d'ondes d'intérêt pour l'étude des phases membranaires avec Py-met-Chol obtenues par analyse multivariée et citées dans la littérature.

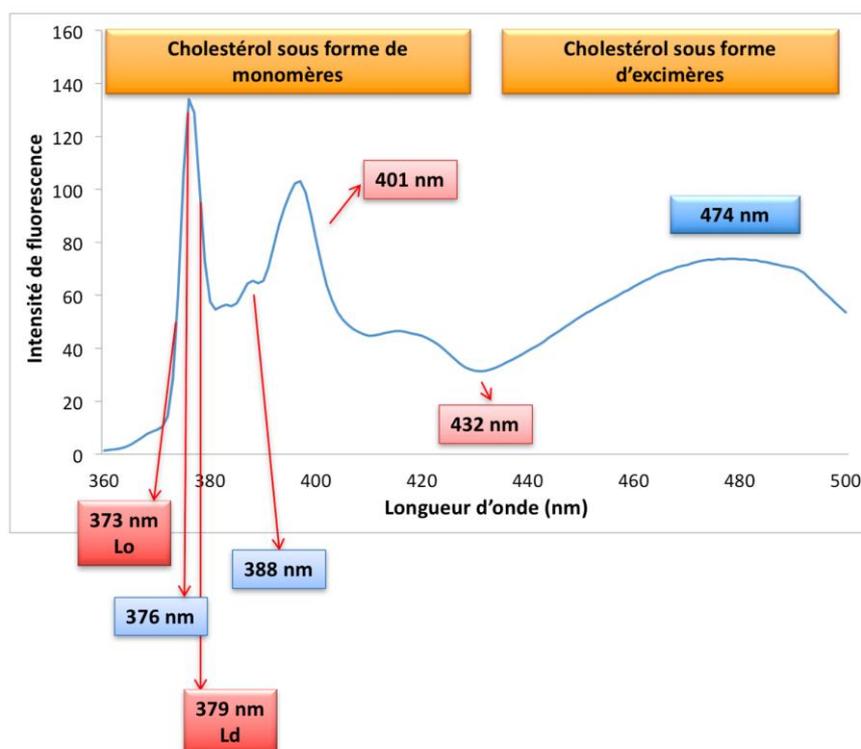


Figure 55. Des longueurs d'onde d'intérêt pour l'étude des phases membranaires avec Py-met-Chol obtenues par analyse multivariée (rouge) et citées dans la littérature (bleu).

Nous avons donc trouvé des longueurs d'onde d'intérêt, qui n'étaient pas indiquées dans la littérature et qui seraient « cachées », d'une certaine manière, dans le spectre. L'analyse des composantes principales est une manière rationnelle d'observer des variations. Le problème est que nous ne pouvons pas tester la pertinence et la qualité discriminante avec l'analyse en composantes principales. Cette méthode est essentiellement descriptive. En effet, nous décrivons le comportement des relations des variables entre elles (corrélées, anti-corrélées, indépendantes) et le degré de similarité et « dissimilarité » des observations par leurs signatures spectrales (de fluorescence), mais cela n'indique pas qu'un groupe donné est différent d'un autre. Pour pallier ce problème, nous passons par une réduction du nombre de variables : on choisit celles qui sont les plus discriminantes et il est ensuite possible de faire des tests statistiques (Figure 54).

2. Comparaison des membranes de types L_o et L_d

Les figures de cette section montrent les variations de l'intensité des différentes longueurs d'onde d'intérêt pour les LUV PC et SM/Chol en présence de Py-met-Chol à 3,6 mol%. Un comportement similaire a été observé pour les LUV avec une concentration de sonde de 1,8 mol% (Annexe F).

Dans les spectres du cholestérol-pyrène, la partie comprise entre 365 et 430 nm correspond à l'émission des molécules dans un état monomérique tandis que la partie entre 430 à 550 nm est émise par des molécules de cholestérol-pyrène proches (dimères, trimères...). Quand il y a augmentation de la contribution des excimères, il y a alors une diminution de la contribution du monomère et vice-versa (Figure 56).

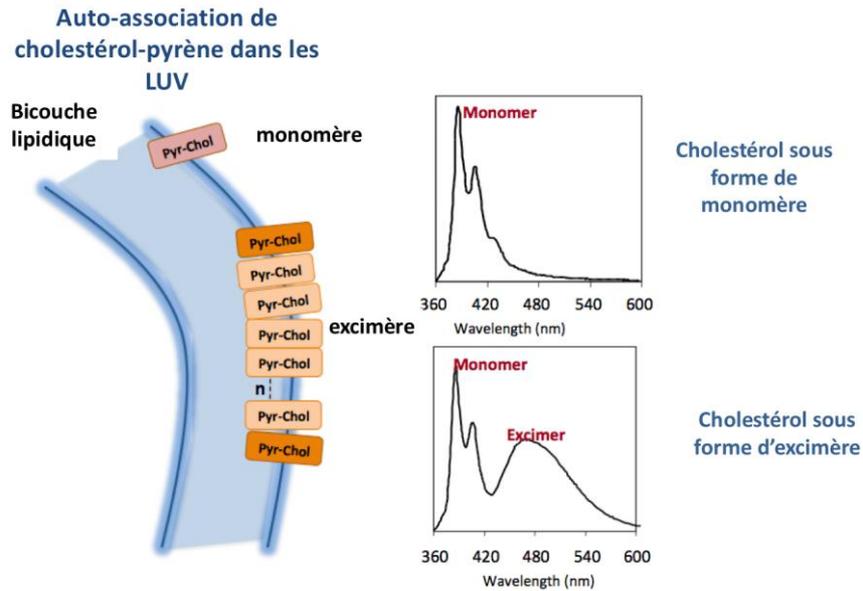


Figure 56. Spectre du cholestérol-pyrène montrant en haut la partie de ce cholestérol sous forme de monomère et en bas avec contribution d'excimères (modifié de (Le Guyader, Le Roux, Maze, et al. 2007)).

Pour le marqueur CPyLd (379 nm), nous avons observé qu'à basse température, les valeurs sont plus importantes pour PC et plus faibles pour les membranes SM/Chol, mais à haute température les valeurs sont proches (Figure 57A). La diminution des valeurs du marqueur CPyLd avec la montée en température est due à la diminution de la contribution des monomères, causée par une augmentation des excimères. En effet, quand la température augmente, nous observons une diminution de la fluorescence au début du spectre (entre 365 et 430 nm) et une augmentation de l'intensité de fluorescence des excimères (entre 430 et 550 nm), après le point iso-émissif. Dans le cas du marqueur CPyLo (373 nm), l'augmentation de la température, qui augmente la fluidité de la membrane, induit une diminution de la valeur du marqueur.

L'évolution du marqueur de phase CPyLo (373nm) (Figure 57) montre que les valeurs pour les membranes SM/Chol sont plus importantes que pour les membranes PC à toutes les températures. Ceci est en accord avec le fait que les membranes SM/Chol ont un caractère CPyLo plus fort que les membranes de PC à chaînes acyle hétérogènes.

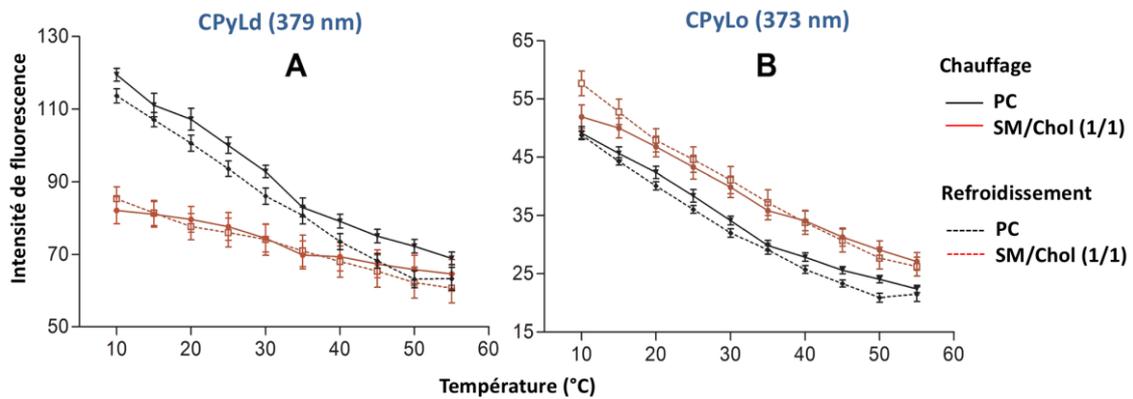


Figure 57. Evolution de l'intensité de fluorescence des longueurs d'onde du Py-met-chol en fonction de la température. La concentration de la sonde dans les LUV est de 3,6% v/v. (A) Marqueur CPyLd (379 nm). (B) Marqueur CPyLo (373 nm). Lignes noires LUV PC, lignes rouges LUV SM/Chol. Protocole de chauffage : ligne continue et protocole de refroidissement : ligne pointillée. Moyennes \pm écart type de sept expériences indépendantes pour PC et huit pour SM/Chol.

Pour le pic « constant » (388 nm) d'après la littérature, il dépendrait seulement de la concentration de sonde (Figure 58A), nous avons observé qu'il n'est pas parfaitement « constant » puisqu'à même concentration dans nos conditions, son comportement était différent pour les LUV PC et SM/Chol indiquant qu'il est également sensible à d'autres facteurs environnementaux tels que la polarité. Au contraire, le point iso-émisif (432 nm) (Figure 58B) a montré moins de variations d'intensité et peut être donc considéré comme le point le plus constant du spectre.

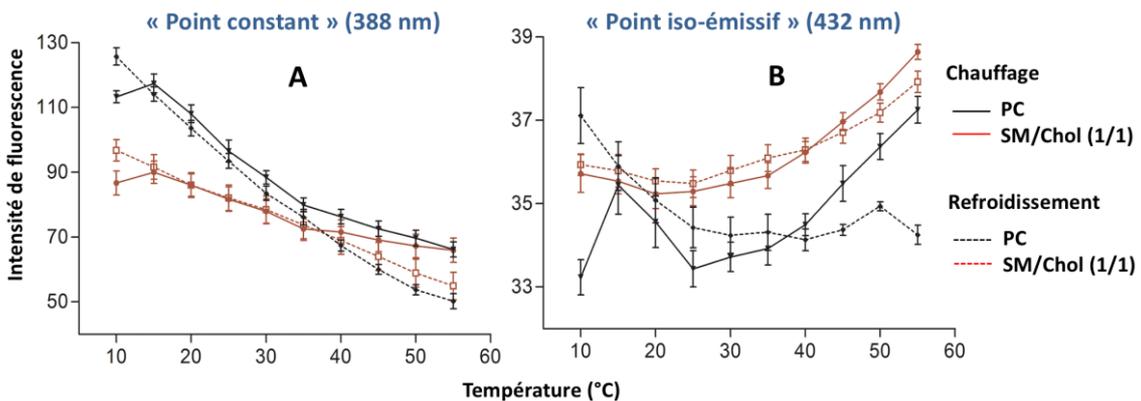


Figure 58. Evolution de l'intensité de fluorescence des longueurs d'onde du Py-met-chol en fonction de la température. La concentration de la sonde dans les LUV est de 3,6% v/v. (A) 388 nm (I_3) « point constante ». (B) 432 nm point iso-émisif « constant ». Lignes noires LUV PC, lignes rouges LUV SM/Chol. Protocole de chauffage : ligne continue et protocole de refroidissement : ligne pointillée. Moyennes \pm écart type de sept expériences indépendantes pour PC et huit pour SM/Chol.

Le "marqueur" de polarité précédemment signalé dans d'autres articles (376 nm) (Figure 59A) a été comparé à la longueur d'onde obtenue dans ce projet (401 nm) plus sensible aux différentes phases (Figure 59B). Nous notons que 401 nm est capable de différencier PC et SM/Chol. Le comportement du pic à 376 nm est similaire pour les deux membranes ce qui serait en contradiction avec la propriété de détection de polarité. De plus, le comportement de la longueur d'onde 401 nm en fonction de la température est similaire à celui de 388 nm, ce qui remet en question la validité de 388 nm en tant que pic « constant ».

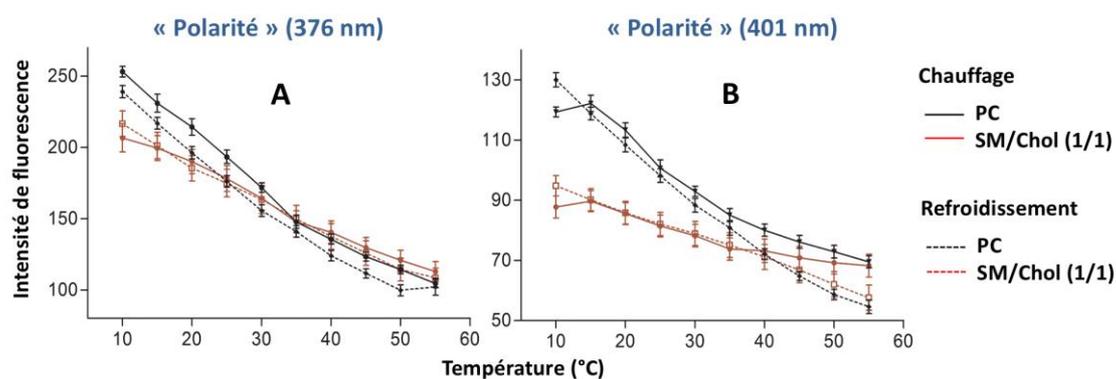


Figure 59. Evolution de l'intensité de fluorescence des longueurs d'onde du Py-met-chol en fonction de la température. La concentration de la sonde dans les LUV est de 3,6% v/v. (A) 376 nm (I_1) « polarité ». (B) 401 nm « polarité ». Lignes noires LUV PC, lignes rouges LUV SM/Chol. Protocole de chauffage : ligne continue et protocole de refroidissement : ligne pointillée. Moyennes \pm écart type de sept expériences indépendantes pour PC et huit pour SM/Chol.

Enfin, l'évolution des excimères (474 nm) (Figure 60) montre qu'à basse température, la quantité de multimères de Py-met-Chol dans les membranes SM/Chol est plus élevée que dans les membranes PC. Avec l'augmentation de la température il y a une augmentation d'excimères pour les deux membranes.

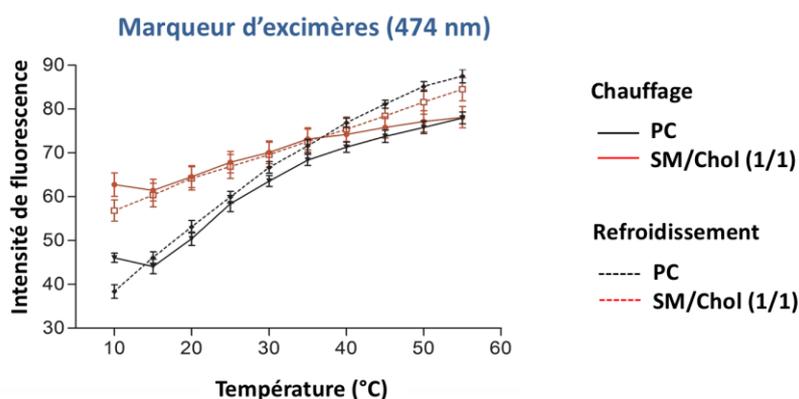


Figure 60. Evolution de l'intensité de fluorescence de la longueur d'onde du Py-met-chole 474 nm en fonction de la température. La concentration de la sonde dans les LUV est de 3,6% v/v. Marqueur d'excimères 474 nm. Lignes noires LUV PC, lignes rouges LUV SM/Chol. Protocole de chauffage : ligne continue et protocole de refroidissement : ligne pointillée. Moyennes \pm écart type de sept expériences indépendantes pour PC et huit pour SM/Chol.

Nous avons aussi utilisé le point iso-émissif (432 nm) pour comparer des rapports entre les longueurs d'onde. Les rapports d'évolution des intensités en fonction de la température $\frac{CPyLd}{iso}$ et $\frac{CPyLo}{iso}$ pour Py-met-Chol 3,6 mol% (Figure 61) et 1,8 mol% (Annexe F) sont similaires à ceux de CPyLo et CPyLd (Figure 57). Cela montre l'importance de choisir le point iso-émissif à la place du point « constant » suggéré dans la littérature pour comprendre le comportement du cholestérol dans des vésicules.

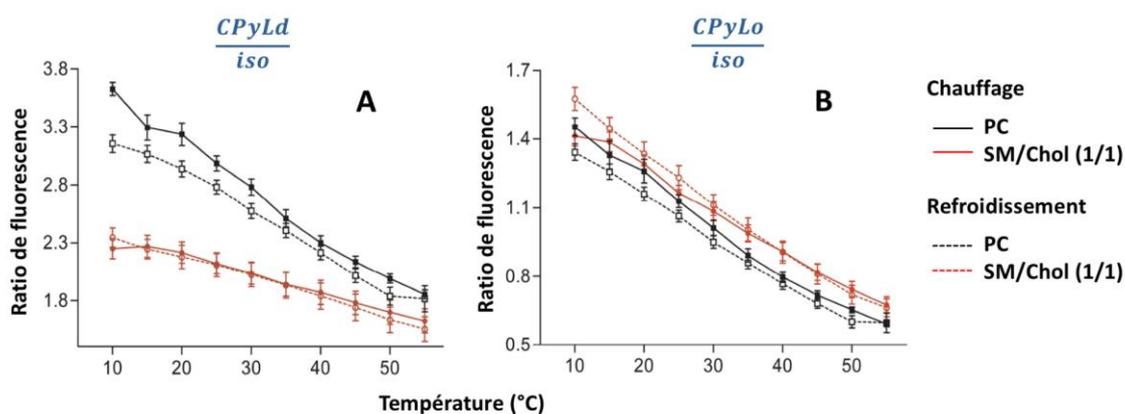


Figure 61. Ratios de l'intensité de fluorescence des longueurs d'onde du Py-met-chole en fonction de la température. La concentration de la sonde dans les LUV est de 3,6% v/v. (A) CPyLd/iso. (B) CPyLo/iso. Lignes noires (■, □) : LUV PC, lignes rouges (●, ○) : LUV SM/Chol. Protocole de chauffage : lignes continues et protocole de refroidissement : lignes pointillées. Moyennes \pm écart type de sept expériences indépendantes pour PC et huit pour SM/Chol.

Nous pouvons observer une différence en comparant les rapports $\frac{I_1}{I_3}$ qui devrait caractériser l'évolution de la polarité (selon Le Guyader *et al.*) et $\frac{pol}{iso}$ (Figure 62). Comme nous l'avons souligné, le pic I_3 , suggéré par la littérature, ne dépend pas exclusivement de la concentration de la sonde et son intensité varie en fonction de l'environnement. La pente de la courbe de $\frac{I_1}{I_3}$ en fonction de la température est inférieure à celle de la courbe $\frac{pol}{iso}$ (401 nm) dont l'allure est similaire à celle de la courbe $\frac{CPyL_d}{iso}$. Par conséquent, nous suggérons que la correction avec le point iso-émissif est plus adaptée pour représenter un point spectral constant, indépendant de la concentration.

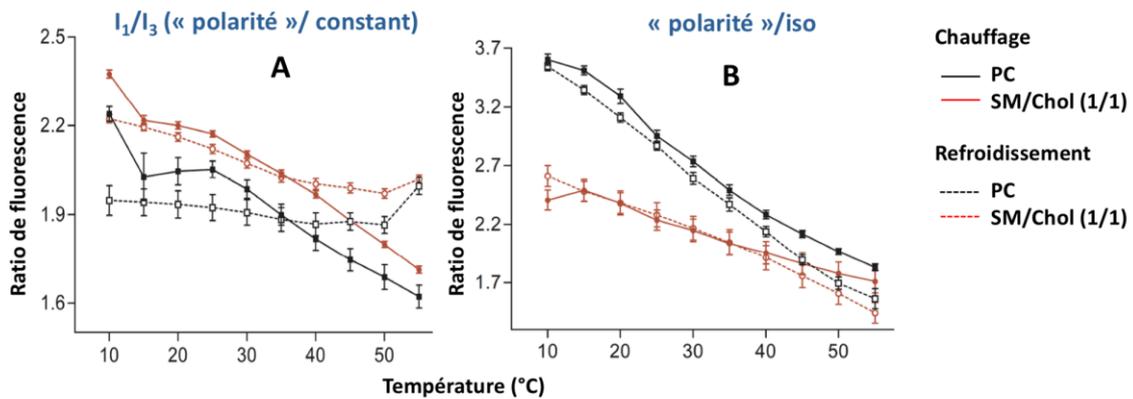


Figure 62. Ratios de l'intensité de fluorescence des longueurs d'onde du Py-met-chol en fonction de la température. La concentration de la sonde dans les LUV est de 3,6% v/v. (A) I_1/I_3 (« polarité » / « constant »). (B) 401/432 (« polarité » / iso). Lignes noires (■, □) : LUV PC, lignes rouges (●, ○) : LUV SM/Chol. Protocole de chauffage : lignes continues et protocole de refroidissement : lignes pointillées. Moyennes \pm écart type de sept expériences indépendantes pour PC et huit pour SM/Chol.

En comparant les rapports $\frac{exc}{I_3}$ et $\frac{exc}{iso}$, il apparaît que le point iso-émissif est plus adapté pour suivre la multimérisation de la sonde (Figure 63). En utilisant le paramètre $\frac{exc}{I_3}$, nous mettons en évidence que la formation d'excimères augmente continuellement avec la température. Au contraire, le rapport $\frac{exc}{iso}$ montre que la formation d'excimères tend à stagner à mesure que la température augmente. Ce comportement d'assemblage de cholestérol-pyrène avec le rapport $\frac{exc}{iso}$ est celui qui ressemble le plus à celui avec le marqueur d'excimères seul (474 nm) (Figure 60).

Le point iso-émissif (432 nm) est plus stable comparé au pic I₃ considéré comme « constant » dans la littérature (388 nm) et c'est pourquoi nous avons utilisé ce point pour les analyses (Figure 58). Ainsi, nos expériences suggèrent que la caractérisation des domaines membranaires (ordonnée et désordonné autour du cholestérol-pyrène) passe par l'observation de l'évolution de : $\frac{CPyL_o}{iso}$, $\frac{CPyL_d}{iso}$ et $\frac{exc}{iso}$.

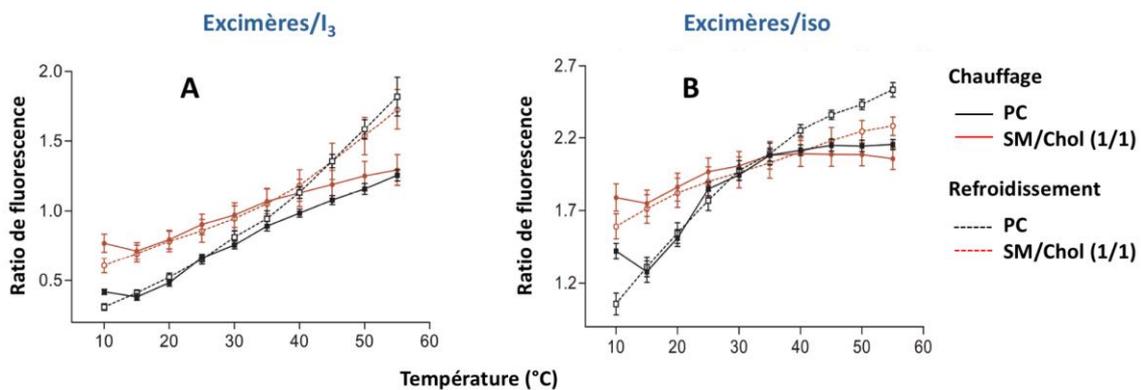


Figure 63. Ratios de l'intensité de fluorescence des longueurs d'onde du Py-met-chol en fonction de la température. La concentration de la sonde dans les LUV est de 3,6% v/v. (A) excimères/I₃. (B) excimères/iso. Lignes noires (■, □) : LUV PC, lignes rouges (●, ○) : LUV SM/Chol. Protocole de chauffage : lignes continues et protocole de refroidissement : lignes pointillées. Moyennes ± écart type de sept expériences indépendantes pour PC et huit pour SM/Chol.

Afin d'évaluer correctement le comportement du cholestérol-pyrène dans les membranes, il est possible de s'intéresser à deux paramètres :

- Le ratio $\frac{CPyL_o}{CPyL_d}$ qui indique la proportion des deux domaines (ordonné et désordonné) autour du cholestérol-pyrène dans la membrane ;
- Le ratio $\frac{exc}{iso}$ qui indique le degré d'assemblage du cholestérol-pyrène.

La formation d'excimères (Figure 63B) montre que, à basse température, la quantité d'excimères est plus importante dans les membranes SM/Chol que dans les membranes PC. L'augmentation de la température provoque la formation d'excimères dans les membranes SM/Chol en faible proportion (environ 15-20 %). En effet, seule une faible proportion de la phase L_o est convertie en une phase L_d suite à une augmentation de température. Par ailleurs, le cholestérol s'insère préférentiellement dans des domaines

plus ordonnés, donc plus résistants à la température puisqu'il a plus d'affinité pour les chaînes saturées.

En revanche, l'augmentation du nombre d'excimères dans les membranes PC est plus importante : elle est de 60% à une concentration en Py-met-Chol de 3,6 mol%, et de 100% à une concentration de 1,8 mol%. Cela confirme que l'augmentation de température fluidifierait une partie du domaine ordonné L_o (moins résistante à la température) et conduirait à la formation de domaines à caractère L_o composés probablement de lipides saturés où le cholestérol se concentrerait.

À une température donnée la valeur du signal de fluorescence peut différer selon qu'il a été acquis lors du chauffage ou lors du refroidissement. Cela est dû au fait que la membrane s'organise différemment lors du cycle de température. Lors de la montée en température, les domaines lipidiques préformés à 4°C se réorganisent graduellement. Lors de la diminution en température, le chauffage rapide jusque 55°C provoque une perturbation qui fait que les lipides prennent un peu plus de temps pour se réorganiser à haute température. Le cholestérol se concentrerait alors dans une faible proportion de membrane qui a un caractère L_o où il forme plus d'excimères à 55°C avant refroidissement.

La Figure 64 montre les courbes $\frac{CPyL_o}{CPyL_d}$ en fonction de la température pour les membranes PC et SM/Chol. Le ratio diffère peu lors des phases de chauffage et de refroidissement, sauf aux basses températures pour les membranes SM/Chol. De plus, la diminution du ratio de fluorescence $\frac{CPyL_o}{CPyL_d}$ est plus importante pour les membranes SM/Chol que pour les membranes PC. Sachant que les changements d'organisation dans la phase L_o sont similaires pour les deux membranes (Figure 61B), le constat précédent peut s'expliquer par le changement plus important de l'évolution du paramètre L_d dans les membranes PC. Enfin, le faible écart type observé pour ce ratio indique que le rapport $\frac{CPyL_o}{CPyL_d}$ est, statistiquement, un très bon marqueur de domaines membranaires.

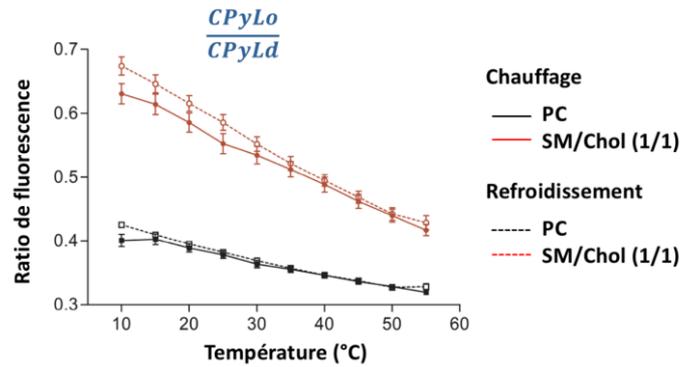


Figure 64. Rapport CPyLo/CPyLd en fonction de la température. La concentration de la sonde dans les LUV est de 3,6 % v/v. Lignes noires (■, □) : LUV PC, lignes rouges (●, ○) : LUV SM/Chol. Protocole de chauffage : lignes continues et protocole de refroidissement : lignes pointillées. Moyennes \pm écart type de sept expériences indépendantes pour PC et huit pour SM/Chol.

La Figure 65 présente la partie du spectre de fluorescence centrée sur 376 nm qui explique le comportement des marqueurs CPyLo et CPyLd. Nous constatons que lors du chauffage et du refroidissement les spectres des membranes ordonnées SM/Chol se superposent. Pour les membranes désordonnées PC, les spectres présentent un décalage vers la gauche. Ce décalage explique bien les résultats de la Figure 54.

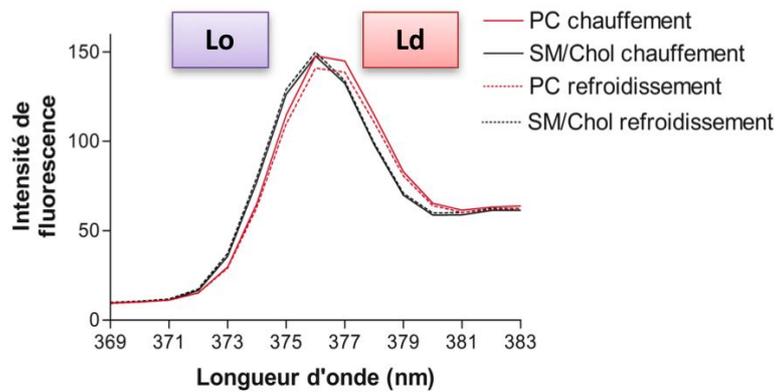


Figure 65. Partie centrée sur 376 nm du spectre de fluorescence de Py-met-Chol de la membrane PC (en rouge) et SM/Chol (en noir).

3. L'environnement de la sonde cholestérol-pyrène dans des LUV PC et SM/Chol : étude par l'anisotropie

Afin de mieux comprendre le mouvement de la sonde Py-met-Chol dans les différents domaines de la membrane, nous avons effectué des mesures d'anisotropie. La Figure 66 montre l'anisotropie du Py-met-Chol dans des LUV PC et SM/Chol à 35°C.

La partie droite des graphiques (450 - 550 nm) correspond au signal de l'excimère. Concernant cette partie du spectre, il n'y a pas de différence claire entre les membranes PC et SM/Chol. Ceci indique que le Py-met-Chol qui se trouve dans des domaines riches en cholestérol (domaines L_o , multimères) a un degré de mouvement similaire pour les membranes PC et SM/Chol. Nous avons observé ceci pour les trois températures étudiées (15°C, 35°C et 50°C).

La partie gauche du spectre (365 - 450 nm) correspond à la contribution du signal du cholestérol en tant que monomère. Pour les trois températures, les valeurs d'anisotropie sont plus élevées pour les membranes SM/Chol que pour les membranes PC. Cela indique que dans l'état monomérique, l'environnement de la sonde Py-met-Chol dans les membranes SM/Chol est plus rigide par rapport à celui des membranes PC. Ceci est en accord avec les propriétés du cholestérol dans les membranes SM/Chol à chaînes acyles plus saturées (par rapport aux membranes PC à chaînes acyle très hétérogènes).

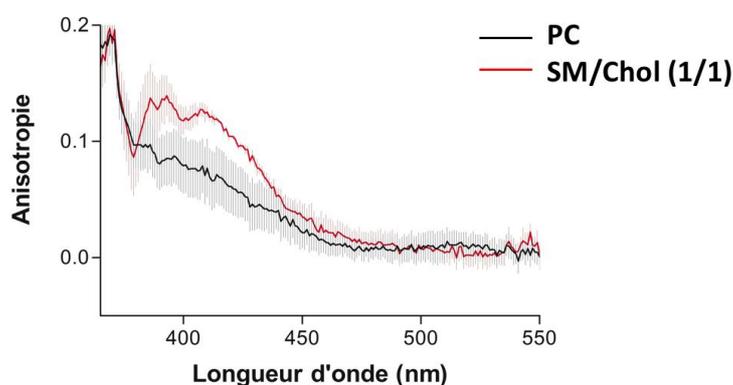


Figure 66. Anisotropie de fluorescence du Py-met-chol à 35°C. Py-met-chol à 3,6% v/v, LUV PC en noir et LUV SM/Chol en rouge. Moyenne \pm écart type (lignes grisées) de quatre expériences indépendantes.

4. Distribution du cholestérol dans les membranes avec coexistence des domaines L_o - L_d

Afin d'étudier le comportement de la sonde dans des membranes où les domaines L_o et L_d coexistent, nous avons effectué des études sur des membranes LUV PC/SM/Chol (1/1/1) (N.B. la nomenclature utilisée présente le même pourcentage de lipides). Comme le montre la Figure 67A, à 10°C, la valeur du rapport $\frac{CPyL_d}{iso}$ des membranes PC/SM/Chol est intermédiaire comparativement aux membranes PC et SM/Chol. Ceci est cohérent avec la coexistence de deux domaines différents dans lesquels le cholestérol est présent. La différence entre les trois membranes LUV est conservée dans l'intervalle de température 10 – 30°C. Cependant, à des températures plus élevées (35 – 55°C), au vu du marqueur du domaine L_d (Figure 21A), les membranes PC/SM/Chol et PC adoptent un comportement similaire, suggérant une fluidité supérieure de la membrane pour PC/SM/Chol par rapport à la membrane SM/Chol.

L'évolution du paramètre $CPyL_o$ en fonction de la température a également montré que le comportement des membranes PC/SM/Chol est intermédiaire entre les membranes PC et SM/Chol pour toutes les températures (Figure 67B et C). L'évolution du rapport $\frac{CPyL_o}{CPyL_d}$ montre une nette séparation entre les trois membranes à toutes les températures lors de l'augmentation et de la diminution de température (Figure 67D), ce qui indique que même à haute température (55°C), certains domaines de la membrane mixte PC/SM/Chol adoptent un comportement L_o (donc organisé). La Figure 67D montre aussi que le rapport $\frac{CPyL_o}{CPyL_d}$ différencie mieux les membranes PC, SM/Chol et PC/SM/Chol en comparaison avec les rapports $\frac{CPyL_d}{iso}$ et $\frac{CPyL_o}{iso}$. Cela nous a confirmé l'utilité du rapport $\frac{CPyL_o}{CPyL_d}$ pour mieux distinguer l'environnement, ordonné ou désordonné, autour du cholestérol-pyrène.

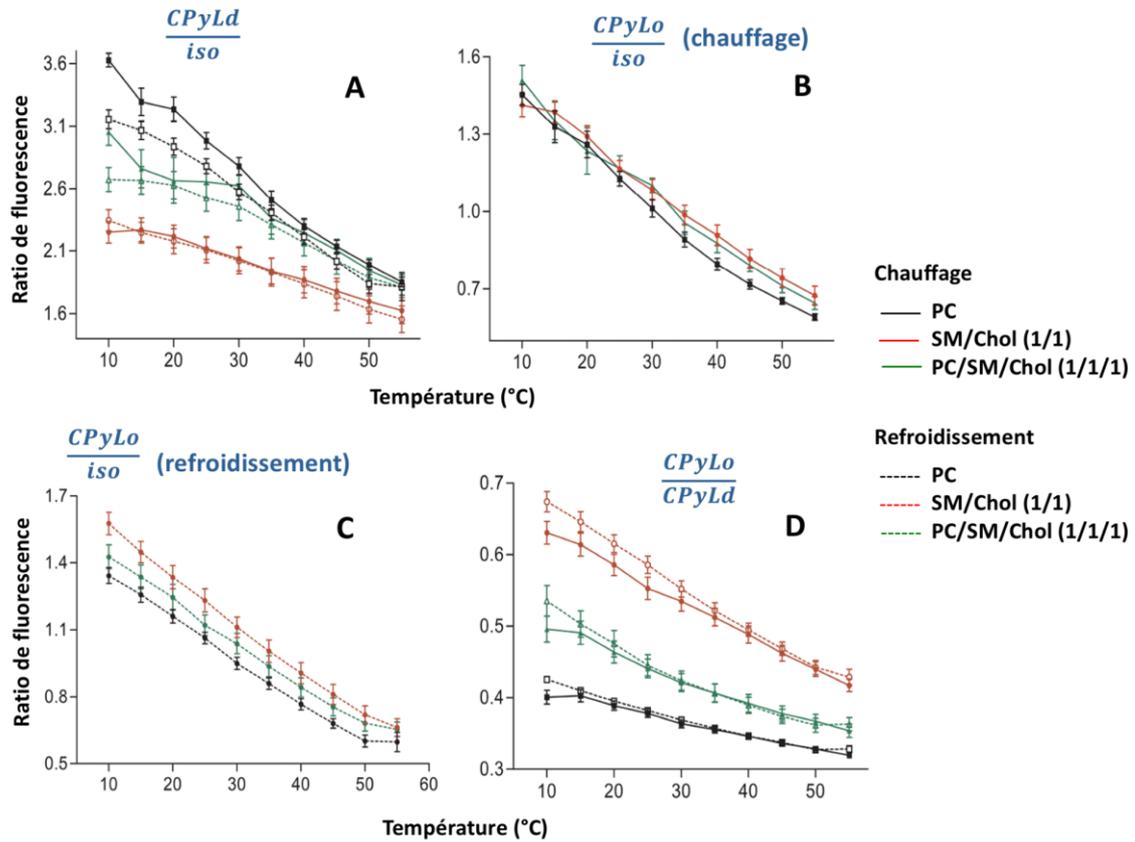


Figure 67. Rapports de fluorescence des longueurs d'onde du Py-met-chole en fonction de la température. La concentration de la sonde dans LUV est de 3,6% v/v. (A) CPyLd/iso pendant le chauffage et le refroidissement. (B) CPyLo/iso pendant le chauffage. (C) CPyLo/iso pendant le refroidissement. (D) CPyLo/CPyLd pendant le chauffage et le refroidissement. Lignes noires (■, □) : LUV PC, lignes rouges (●, ○) : LUV SM/Chol et lignes vertes (▲, Δ) : LUV PC/SM/Chol. Protocole de chauffage : lignes continues et protocole de refroidissement : lignes pointillées. Moyennes ± écart type de sept expériences indépendantes pour PC, huit pour SM/Chol et six pour PC/SM/Chol.

La formation d'excimères dans les membranes PC/SM/Chol est également intermédiaire par rapport aux membranes PC et SM/Chol. À 10°C, le rapport d'excimères est similaire à celui des membranes PC. Cependant, en augmentant la température, la courbe montre un changement du comportement de la membrane PC en raison d'une formation plus graduelle d'excimères qui arrivent à un plateau plus vite que dans le cas de la membrane PC (Figure 68A). Cette multimérisation graduelle est similaire à celle des membranes SM/Chol.

Lorsque les membranes sont chauffées rapidement à 55°C, le rapport d'excimères dans les membranes PC/SM/Chol est similaire à celui des membranes SM/Chol.

Le refroidissement des membranes provoque une séparation des courbes et le rapport d'excimères dans les membranes PC/SM/Chol s'approche de celui des membranes PC à 10°C (Figure 68B). La différence observée dans l'allure des courbes pendant le chauffage ou le refroidissement est dû à une cinétique de désorganisation (chauffage) et de formation (refroidissement) des domaines L_o et L_d est différente.

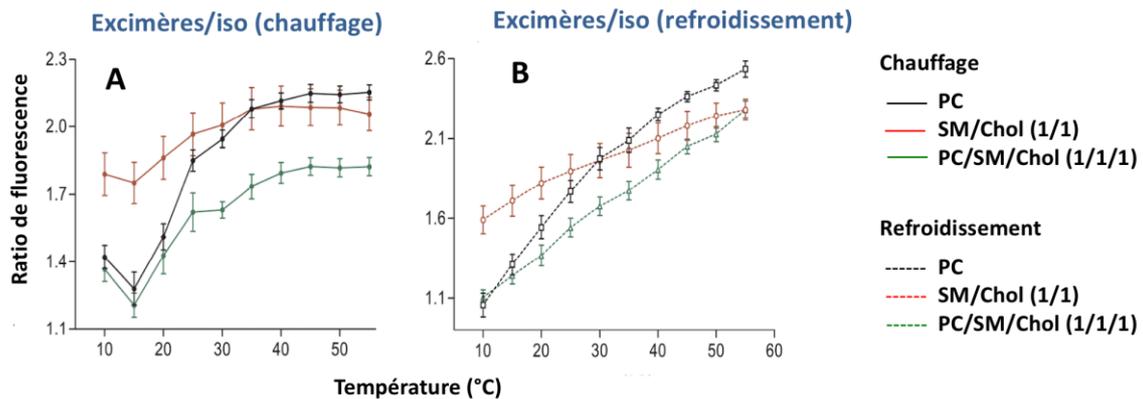


Figure 68. Rapports de fluorescence Py-met-chole en fonction de la température. La concentration de la sonde dans les LUV est de 3,6% v/v. (A) pendant le chauffage. (B) pendant le refroidissement. Lignes noires (■, □) : LUV PC, lignes rouges (●, ○) : LUV SM/Chol et lignes vertes (▲, Δ) : LUV PC/SM/Chol. Protocole de chauffage : lignes continues et protocole de refroidissement : lignes pointillées. Moyennes \pm écart type de sept expériences indépendantes pour PC, huit pour SM/Chol et six pour PC/SM/Chol.

En résumé, la distribution du cholestérol (formation d'excimères) dans les membranes PC/SM/Chol est similaire à celle rencontrée dans les membranes PC à basse température, et à celle des membranes SM/Chol à haute température.

Finalement, comme il apparaît que les domaines L_o sont moins sensibles à la température que les domaines L_d , nous pouvons en déduire que pendant le chauffage, le cholestérol s'insère préférentiellement dans les domaines restants qui conservent un certain caractère L_o .

5. Comportement de la sonde pour le mélange ternaire avec ajout de céramide

La conversion de la sphingomyéline (SM) en céramide entraîne une réorganisation de la membrane qui résulte de la compétition du cholestérol et du céramide pour la sphingomyéline (Silva, Futerman, and Prieto 2009). Par conséquent, nous avons testé si la sonde Py-met-Chol pouvait détecter cette différence d'organisation. Megha et London (London and London 2004) ont calculé que, après stimulation des cellules avec le TNF (*Tumor necrosis factor*), la sphingomyélinase transforme 80% de la SM de la membrane plasmique en céramide. Taniguchi et ses collaborateurs (Taniguchi et al. 2006) ont rapporté une conversion de 36% de SM en céramide. Étant donné qu'il existe une fraction de SM intracellulaire non exposée à la sphingomyélinase, la quantité de céramide dans la membrane plasmique devrait être plus élevée. Dans les modèles de membrane PC/SM/Chol, Silva *et al* (Silva, Futerman, and Prieto 2009) ont rapporté une conversion de 50% de SM en céramide. Ainsi, nous avons effectué des expériences avec des membranes PC/SM/Cer/Chol (1/0,5/0,5/1) pour imiter l'action de la sphingomyélinase. La Figure 69 montre les ratios de fluorescence en fonction de la température. Pour les membranes avec céramide, ces valeurs sont plus faibles que celles des membranes LUV sans céramide (PC/SM/Chol), indiquant qu'il y a une réorganisation du cholestérol.

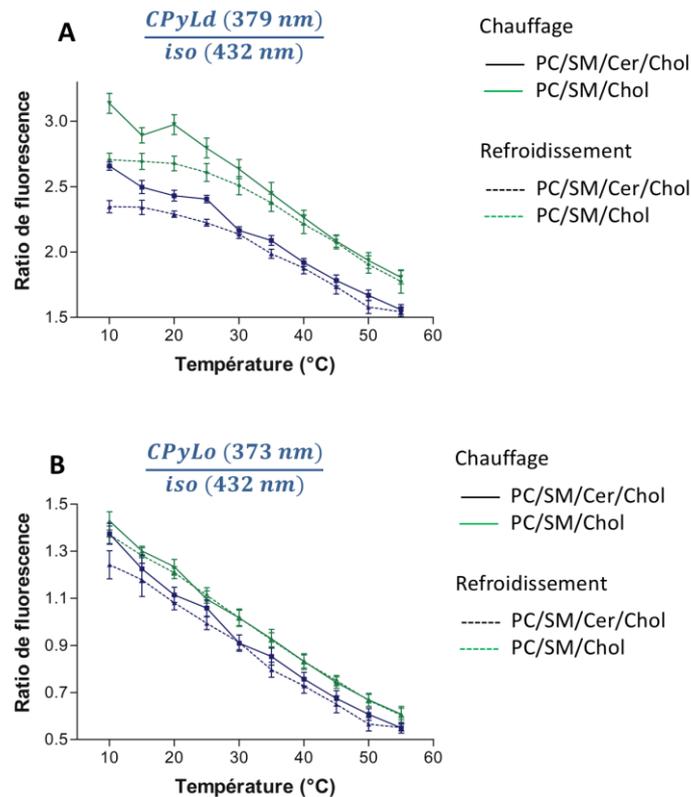


Figure 69. Effet de la présence du céramide sur l'évolution des longueurs d'onde de fluorescence Py-met-chole en fonction de la température. La concentration de la sonde dans les LUV est de 3,6% v/v. (A) CPyLd/iso. (B) CPyLo/iso. Lignes vertes (▲, Δ) : LUV PC/SM/Chol et lignes bleues (◆, ◇) LUV PC/SM/Cer/Chol. Protocole de chauffage en ligne continue et protocole de refroidissement : lignes pointillées. Moyennes plus ± écart type de trois expériences indépendantes.

Concernant le rapport $\frac{CPyLo}{CPyLd}$ en fonction de la température (Figure 70A), nous avons observé des valeurs plus élevées pour les membranes avec céramide pour toutes les températures.

Dès lors, en présence de céramide, le cholestérol s'insère dans une phase à caractère plus ordonnée (L_o) qu'en présence de SM seule. Ceci est en accord avec le fait que le céramide provoque la stabilisation des radeaux (London and London 2004) et la formation de domaines en phase gel (Busto et al. 2010; Pinto et al. 2013; Silva, Futerman, and Prieto 2009).

De plus, la formation d'excimères (Figure 70B) montre que le cholestérol en présence de céramide augmente sa tendance à s'accumuler et à former donc plus d'excimères.

Ceci est en accord avec le fait que le céramide est en compétition avec la sphingomyéline en ce qui concerne son interaction avec le cholestérol.

La coexistence dans la membrane de domaines dans les combinaisons suivantes **Cer/Chol**, **Cer/SM** et **SM/Chol** est donc possible.

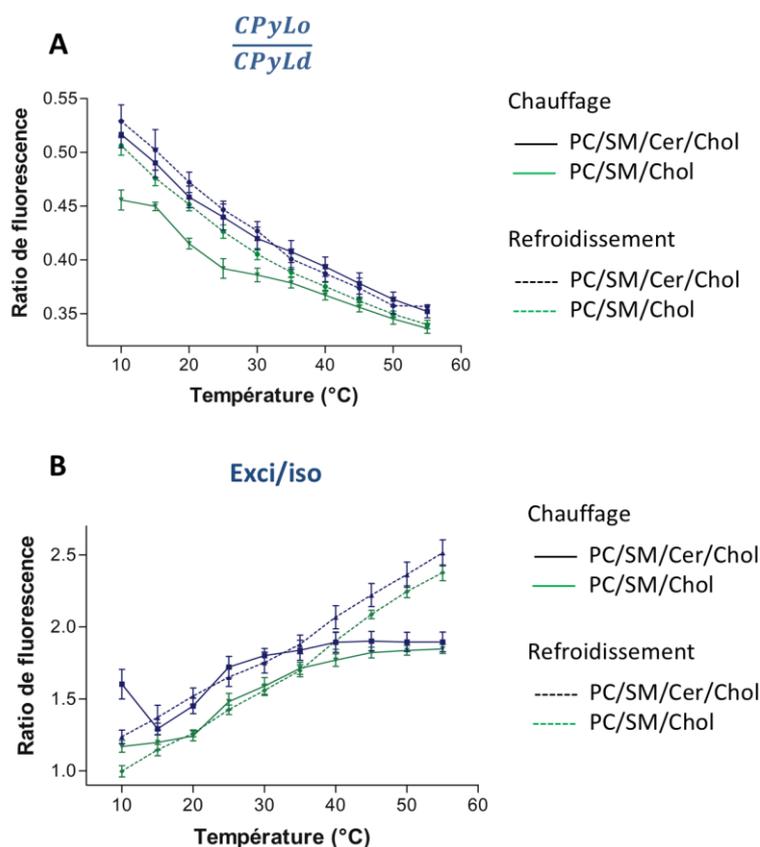


Figure 70. Effet de la présence du céramide sur l'évolution de ratios des longueurs d'onde de fluorescence Py-met-chole en fonction de la température. La concentration de la sonde dans les LUV est de 3,6% v/v. (A) CPyLo/CPyLd. (B) Exci/iso. Lignes vertes (▲, Δ) : LUV PC/SM/Chol et lignes bleues (◆, ◇) LUV PC/SM/Cer/Chol. Protocole de chauffage en ligne continue et protocole de refroidissement : lignes pointillées. Moyennes ± l'écart type de trois expériences.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons exploré les capacités de la sonde cholestérol-pyrène pour caractériser les domaines contenant du cholestérol dans les membranes. Nous avons identifié, par une analyse statistique en composante principale, puis validé

expérimentalement les longueurs d'onde les plus adéquates pour caractériser les domaines de types L_o et L_d dans les membranes :

- **373 nm : marqueur des domaines liquides ordonnés (CPy L_o) ;**
- **379 nm : marqueur des domaines liquides désordonnés (CPy L_d).**

Le marqueur pour l'agrégation du cholestérol-pyrène était déjà connu comme le pic des **excimères (474 nm)** et a été utilisé.

Pour réduire les variations expérimentales, nous avons suggéré l'utilisation du point iso-émisif (432 nm) en tant que point spectral de référence constant et qui permettrait d'éviter la normalisation systématique des spectres par l'intégrale.

Ces résultats nous ont permis d'observer la dynamique des domaines dans les membranes en augmentant et en diminuant la température en observant les rapports :

- $\frac{373}{379}$
- $\frac{474}{432}$

La distribution du cholestérol-pyrène dans différentes membranes L_o et L_d est représentée schématiquement dans la Figure 71. Dans les membranes L_o (SM/Chol) avec un fort caractère ordonné, le cholestérol-pyrène se présente sous forme de multimères, mais également sous sa forme de monomère, car le cholestérol-pyrène peut s'insérer entre les différentes chaînes majoritairement saturées en présence du cholestérol non marqué.

Lorsque la température augmente, les lipides deviennent plus fluides et diminuent le caractère L_o de la membrane. Le cholestérol-pyrène a donc tendance à augmenter la formation d'excimères. Cela impliquerait ainsi une réduction des domaines L_o où le cholestérol-pyrène aurait tendance à s'accumuler.

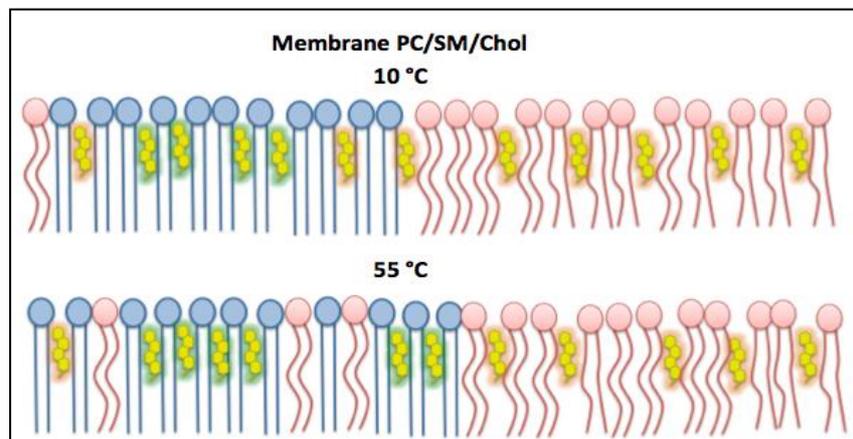
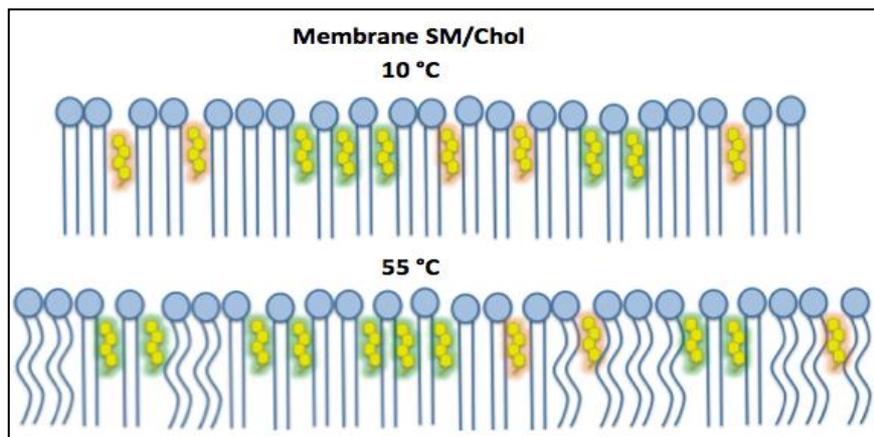
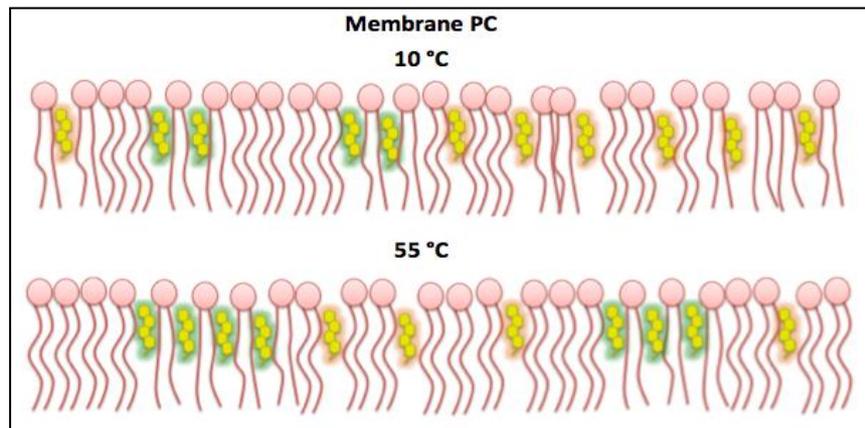
Dans les membranes de type L_d (PC) contenant des chaînes acyle hétérogènes saturées et insaturées, le cholestérol-pyrène est majoritairement présent sous forme de monomères, mais certains excimères sont présents. Ces derniers correspondent à des domaines « ordonnés » composés de cholestérol-pyrène et de lipides saturés qui sont en moindre proportion par rapport à la membrane globale.

L'augmentation de la température provoquerait l'accumulation de cholestérol dans des zones riches en phospholipides saturés.

Dans les membranes mixtes (PC/SM/Chol), le cholestérol-pyrène montre un comportement intermédiaire. À basse température, il a tendance à s'associer aux lipides saturés des domaines type- L_o , mais il est également présent dans les domaines désordonnés.

L'augmentation de la température entraîne l'augmentation de la multimérisation probablement par l'association avec les domaines L_o de la membrane qui sont plus résistants à la température. Nous pouvons penser que l'augmentation de la température, en augmentant la dynamique moléculaire, provoque la rencontre des molécules de cholestérol-pyrène avec une formation d'excimères indépendamment de la nature des domaines. D'une part, dans ce cas nous devrions observer une augmentation linéaire de la formation d'excimères et nos expériences montrent un plateau, notamment pour les membranes ordonnées. D'autre part, l'évolution des excimères dans les membranes L_o ou L_d est différente. Cela indique que la sonde permet de distinguer une réelle différence entre les domaines dans une gamme de températures incluant la température physiologique des mammifères et des oiseaux. Globalement, nous pouvons conclure que le comportement de la sonde est en accord avec les données de la littérature suggérant que le Py-met-Chol est une sonde adéquate pour l'étude de l'organisation du cholestérol dans les membranes.

La capacité de Py-met-Chol d'être utilisé comme sonde de cholestérol a été aussi testée par l'effet du céramide sur les membranes. Les expériences ont montré que le céramide augmente le caractère L_o de la membrane. Cet effet pourrait être la conséquence de la formation des domaines Cer/Chol et SM/Chol.



 Cholestérol
sous forme
d'excimère
(Exi/iso)

 Cholestérol
sous forme de
monomère
(L_o/L_d)

Figure 71. Schémas représentant la dynamique du cholestérol dans les membranes possédant un caractère L_o et L_d à haute et à basse température.

Ainsi, pour utiliser la sonde Py-met-Chol dans la gamme de concentration 1,8-3,6 mol% dans une membrane, nous suggérons que :

- L'assemblage du cholestérol-pyrène observé par :
 - L'augmentation du rapport $\frac{exi}{iso}$ indiquerait une réduction de la proportion des domaines type- L_o dans la membrane où le cholestérol-pyrène se concentrerait ;
 - Une diminution de ce rapport indiquerait :
 - Soit la dilution de la sonde due à une augmentation de la proportion des domaines type- L_o ;
 - Soit la sortie du cholestérol-pyrène de cette zone L_o pour aller dans une zone L_d . À basse température, cette dernière hypothèse est peu probable parce que le cholestérol crée de l'ordre, mais qui reste une possibilité à haute température.
- L'environnement du cholestérol-pyrène monomérique analysé par les changements du rapport $\frac{CPyL_o}{CPyL_d}$ indiquerait :
 - Une augmentation de ce rapport suggère le mouvement du cholestérol vers un environnement plus ordonné. Le déplacement vers une zone plus désordonnée résulterait en un taux $\frac{CPyL_o}{CPyL_d}$ qui diminue.
 - Ce paramètre tient compte de la sonde cholestérol-pyrène dans son état monomérique, mais les monomères peuvent aussi se trouver dans un assemblage avec du cholestérol non marqué (comme pour les membranes rencontrées dans le règne animal).

Références

- Barenholz, Yechezkel, Tina Cohen, Elisha Haas, and Michael Ottolenghi. 1996a. "Lateral Organization of Pyrene-Labeled Lipids in Bilayers as Determined from the Deviation from Equilibrium between Pyrene Monomers and Excimers." *Journal of Biological Chemistry* 271(6): 3085–90.
- Brown, D A, and E London. 1998. "Functions of Lipid Rafts in Biological Membranes." *Annu rev Cell Dev Biol* 14: 111–36.
- Busto, Jon B et al. 2010. "Cholesterol Displaces Palmitoylceramide from Its Tight Packing with Palmitoylsphingomyelin in the Absence of a Liquid-Disordered Phase." *Biophysical Journal* 99(August): 1119–28.
- Chachaty, C. et al. 2005. "Building Up of the Liquid-Ordered Phase Formed by Sphingomyelin and Cholesterol." *Biophysical Journal* 88(6): 4032–44.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349505734548>.
- Chong, P L, D Tang, and I P Sugar. 1994. "Exploration of Physical Principles Underlying Lipid Regular Distribution: Effects of Pressure, Temperature, and Radius of Curvature on E/M Dips in Pyrene-Labeled PC/DMPC Binary Mixtures." *Biophysical journal* 66(6): 2029–38.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1275928&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Le Guyader, L., C. Le Roux, S. Mazerès, et al. 2007. "Changes of the Membrane Lipid Organization Characterized by Means of a New Cholesterol-Pyrene Probe." *Biophys J* 93(12): 4462–73.
- Kalyanasundaram, K., and J. K. Thomas. 1977. "Environmental Effects on Vibronic Band Intensities in Pyrene Monomer Fluorescence and Their Application in Studies of Micellar Systems." *Journal of the American Chemical Society* 99(7): 2039–44.
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00449a004>.
- Kim, Sung Dug, and John M Torkelson. 2002. "Nanoscale Confinement and Temperature Effects on Associative Polymers in Thin Films : Fluorescence Study of a Telechelic , Pyrene-Labeled Poly (Dimethylsiloxane)." *Macromolecules* 35: 5943–52.
- London, Megha, and Erwin London. 2004. "Ceramide Selectively Displaces Cholesterol from Ordered Lipid Domains (Rafts): Implications for Lipid Raft Structure and Function." *Journal of Biological Chemistry* 279(11): 9997–10004.
- Pinto, Sandra N et al. 2013. "Biochimica et Biophysica Acta A Combined Fluorescence Spectroscopy , Confocal and 2-Photon Microscopy Approach to Re-Evaluate the Properties of Sphingolipid Domains." *BBA - Biomembranes* 1828(9): 2099–2110.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.05.011>.
- Sezgin, Erdinc et al. 2016. "A Comparative Study on Fluorescent Cholesterol Analogs as Versatile Cellular Reporters." *Journal of Lipid Research* 57(2): 299–309.
<http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.M065326>.
- Silva, Liana C., Anthony H. Futerman, and Manuel Prieto. 2009a. "Lipid Raft Composition Modulates Sphingomyelinase Activity and Ceramide-Induced Membrane Physical Alterations." *Biophysical Journal* 96(8): 3210–22.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2008.12.3923>.
- Taniguchi, Yukinori, Tetsuhiko Ohba, Hidetake Miyata, and Kazuo Ohki. 2006. "Rapid Phase

Chapitre 4 : Utilisation de la sonde cholestérol-pyrène
pour déterminer la distribution du cholestérol dans la membrane

Change of Lipid Microdomains in Giant Vesicles Induced by Conversion of Sphingomyelin to Ceramide." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1758(2): 145–53.

Tessier, Cedric et al. 2009. "Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Liquid – Liquid Immiscibility under Non-Equilibrium Conditions in a Model Membrane : An X-Ray Synchrotron Study." *Biointerfaces* 74: 293–97.

Wilson-Ashworth, Heather a et al. 2006. "Differential Detection of Phospholipid Fluidity, Order, and Spacing by Fluorescence Spectroscopy of Bis-Pyrene, Prodan, Nystatin, and Merocyanine 540." *Biophysical journal* 91(11): 4091–4101.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1635672&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Winnik, F M et al. 1992. "Temperature- Induced Phase Transition of Pyrene-Labeled (Hydroxypropyl)cellulose in Water: Picosecond Fluorescence Studies." *Journal of Physical Chemistry* 96(2): 1967–72.

Chapitre 5

Les effets des peptides vecteurs sur l'organisation du cholestérol et internalisation des peptides dans différentes LUV

Ce chapitre présente les résultats concernant les effets des peptides vecteurs sur l'organisation du cholestérol, ainsi que les études sur leur passage à travers différentes membranes. Nous souhaitons savoir comment les peptides passent à travers la membrane. Rentrent-ils à des endroits préférentiels, comme par exemple les zones frontières entre différents domaines ? Pour cela, nous étudions l'internalisation de différents peptides (R9, RW9 et pénétratine) dans des vésicules qui contiennent différents domaines de membranes.

La distribution du cholestérol-pyrène dans les différentes membranes (**PC**, **SM/Chol** (1/1) et **PC/SM/Chol** (1/1/1)) a été étudiée en analysant les spectres de fluorescence du cholestérol-pyrène (3,6 mol%) en gradient de température en présence et en absence de peptides. Nous avons vu au chapitre 4 que d'après des études menées sur des membranes modèles sans peptide et avec des mélanges de phases ternaires (de compositions différentes), les domaines L_o et L_d ont des comportements différents à la montée et à la descente de température (Tessier et al. 2009). En effet, les domaines L_o sont plus résistants au changement thermique. La manière dont nous avons conditionné la température sur les LUV (chauffage et refroidissement) montre une inertie dans la formation et la déformation des domaines L_o et L_d de la membrane.

Les peptides **R9**, **RW9** et la **pénétratine** ont été testés aux rapports peptide/lipide de 1/10 et 1/25 mol/mol.

A. Effet des peptides sur la distribution du cholestérol-pyrène dans les membranes

1. Effet des peptides sur la distribution du cholestérol-pyrène dans les membranes désordonnées L_d (PC)

Pour les membranes composées de phosphatidylcholine (PC), l'effet des peptides sur la formation d'excimères en fonction d'une augmentation et d'une diminution de température se traduit par une baisse de la quantité d'excimères après l'ajout des trois peptides (Figure 72.).

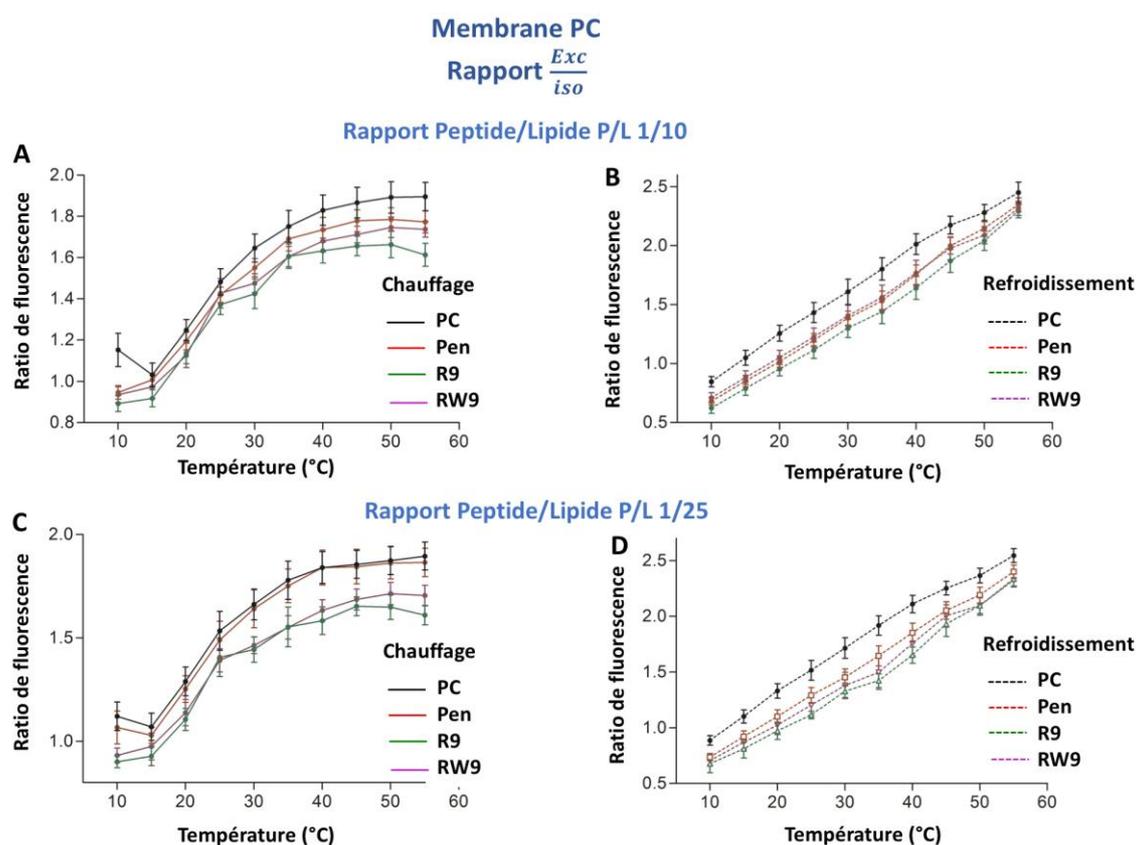


Figure 72. Rapport de fluorescence exc/iso en fonction de la température pour les membranes PC. Pour les peptides au ratio P/L 1/10 (A) en montée de température et (B) en descente de température. Et pour les peptides au ratio P/L 1/25 (C) en montée de température et (D) en descente de température. Noir, les membranes PC ; rouge, en présence de pénétратine ; vert, en présence de R9 et violet, en présence de RW9.

Le peptide R9 est celui qui réduit le plus la quantité d'excimères par rapport au témoin. Ensuite vient le peptide RW9 puis la pénétратine qui montre l'effet le plus faible. Les effets sont similaires pour les deux rapports peptide/lipide : 1/10 et 1/25 mol/mol. Lors du chauffage de 10°C à 35°C, il y a une augmentation du nombre d'excimères, puis on observe un plateau à partir de 35°C, alors qu'en refroidissement l'allure est plus linéaire.

L'analyse du rapport $\frac{CPyLo}{CPyLd}$ montre que lors du chauffage, au ratio 1/10 (P/L mol/mol), les peptides RW9 et R9 augmentent ce rapport $\frac{CPyLo}{CPyLd}$. Cependant, au rapport P/L de 1/25 (mol/mol), seul R9 montre un effet remarquable lors de la montée en température où le rapport $\frac{CPyLo}{CPyLd}$ augmente (Figure 73).

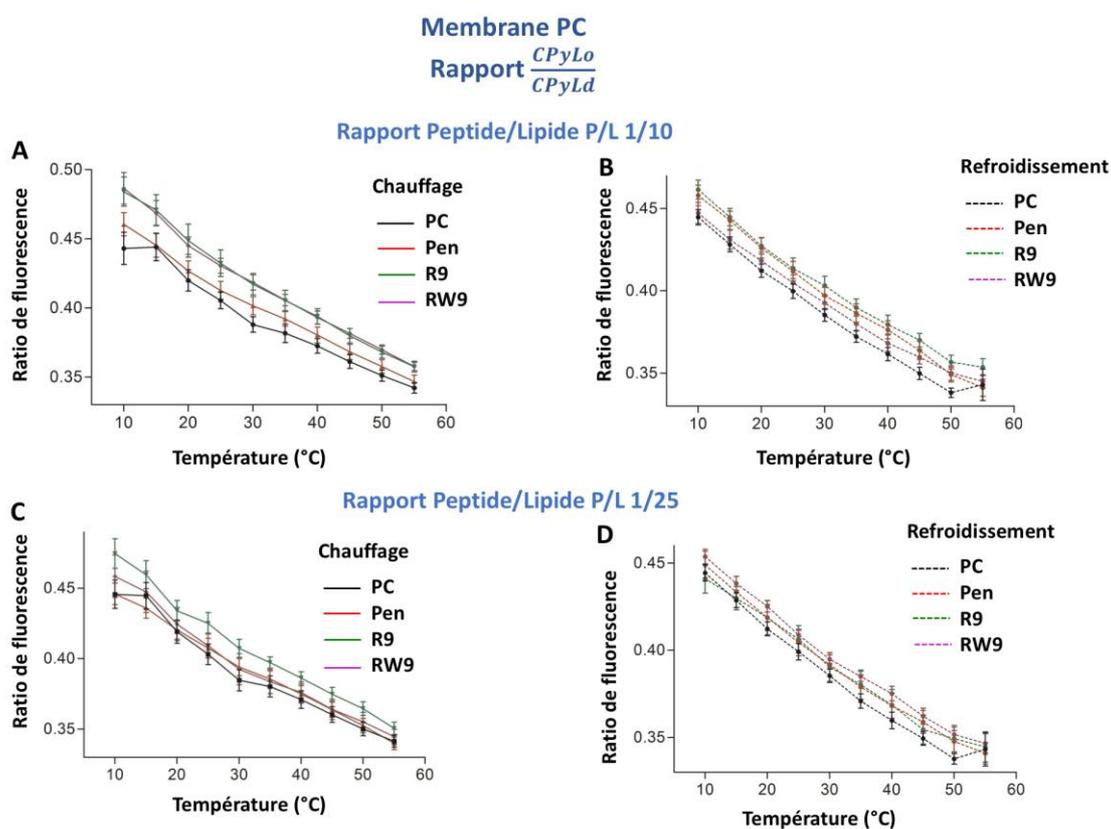


Figure 73. Rapport CPyLo/CPyLd en fonction de la température dans les membranes PC. Pour les peptides au ratio P/L 1/10 (A) en montée de température et (B) en descente de température. Et pour les peptides au ratio P/L 1/25 (C) en montée de température et (D) en descente de température. Noir, les membranes PC ; rouge, en présence de pénétратine ; vert, en présence de R9 et violet, en présence de RW9.

En ce qui concerne l'effet des peptides lors du refroidissement des membranes il apparaît qu'ils ont tous une légère tendance à augmenter le rapport $\frac{CPyLo}{CPyLd}$ sur les membranes PC. Au rapport P/L 1/10, R9 présente l'effet le plus fort en augmentant le rapport $\frac{CPyLo}{CPyLd}$ tandis qu'à basse concentration en peptide P/L 1/25, la plus forte augmentation est obtenue avec RW9.

2. Effet des peptides sur la distribution du cholestérol-pyrène dans les membranes ordonnées L_o (SM/Chol)

Dans les membranes SM/Chol, la formation d'excimères en fonction de la température (chauffage et refroidissement) a également montré que les peptides R9 et RW9 entraînent une diminution de la quantité relative d'excimères. En revanche, la pénétратine semble ne pas avoir d'effet (Figure 74).

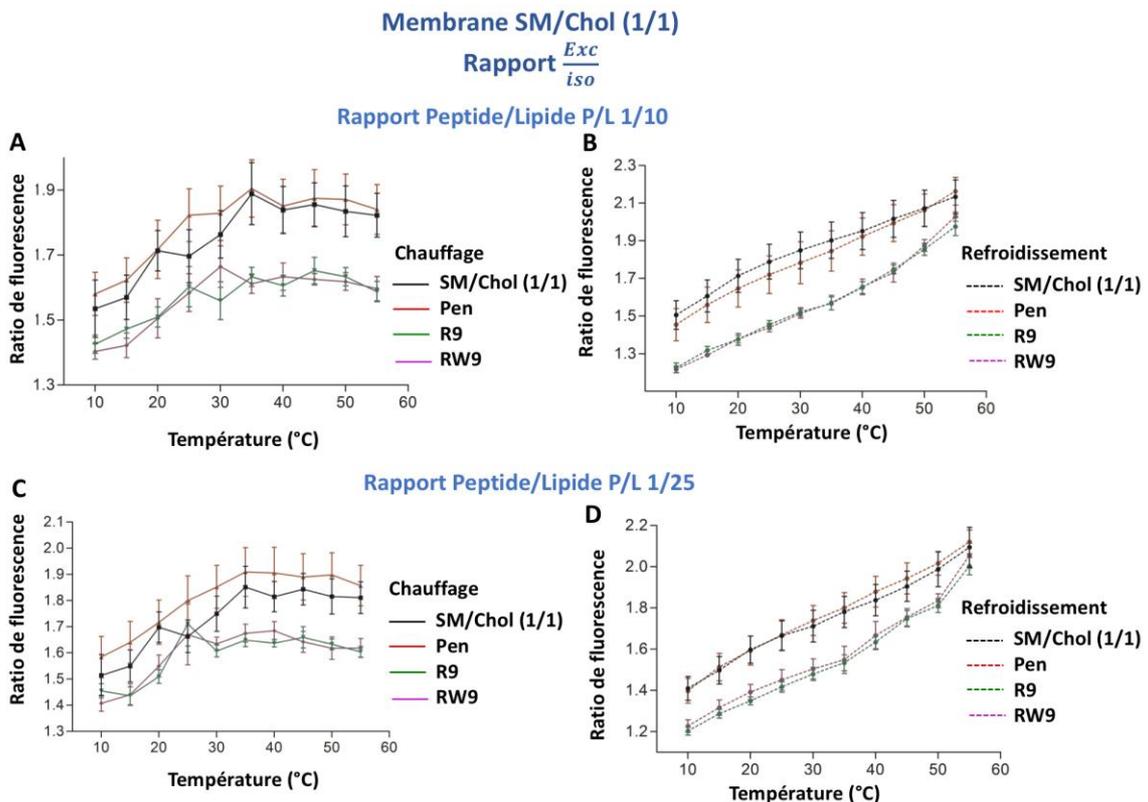


Figure 74. Rapport exci/iso en fonction de la température pour les membranes SM/Chol. Pour les peptides au ratio P/L 1/10 (A) en montée de température et (B) en descente de température. Et pour les peptides au ratio P/L 1/25 (C) en montée de température et (D) en descente de température. Noir, les membranes PC ; rouge, en présence de pénétратine ; vert, en présence de R9 et violet, en présence de RW9.

La Figure 75 montre des effets différents sur le rapport $\frac{CPyLo}{CPyLd}$ lors de la montée et de la descente en température. Lors du refroidissement, les peptides R9 et surtout RW9 au ratio P/L de 1/10 (mol/mol) ont entraîné une baisse du rapport $\frac{CPyLo}{CPyLd}$. Au ratio 1/25, l'effet persiste mais est de plus faible ampleur. Avec le protocole de chauffage, les effets des peptides ne sont pas très clairement définis. Au rapport 1/25, R9 et RW9 semblent augmenter le ratio $\frac{CPyLo}{CPyLd}$ à des températures inférieures à 35°C. Cependant, il est plus difficile de conclure sur les effets des peptides du fait d'une faible différence. Les membranes SM/Chol sont donc globalement plus résistantes aux effets des peptides.

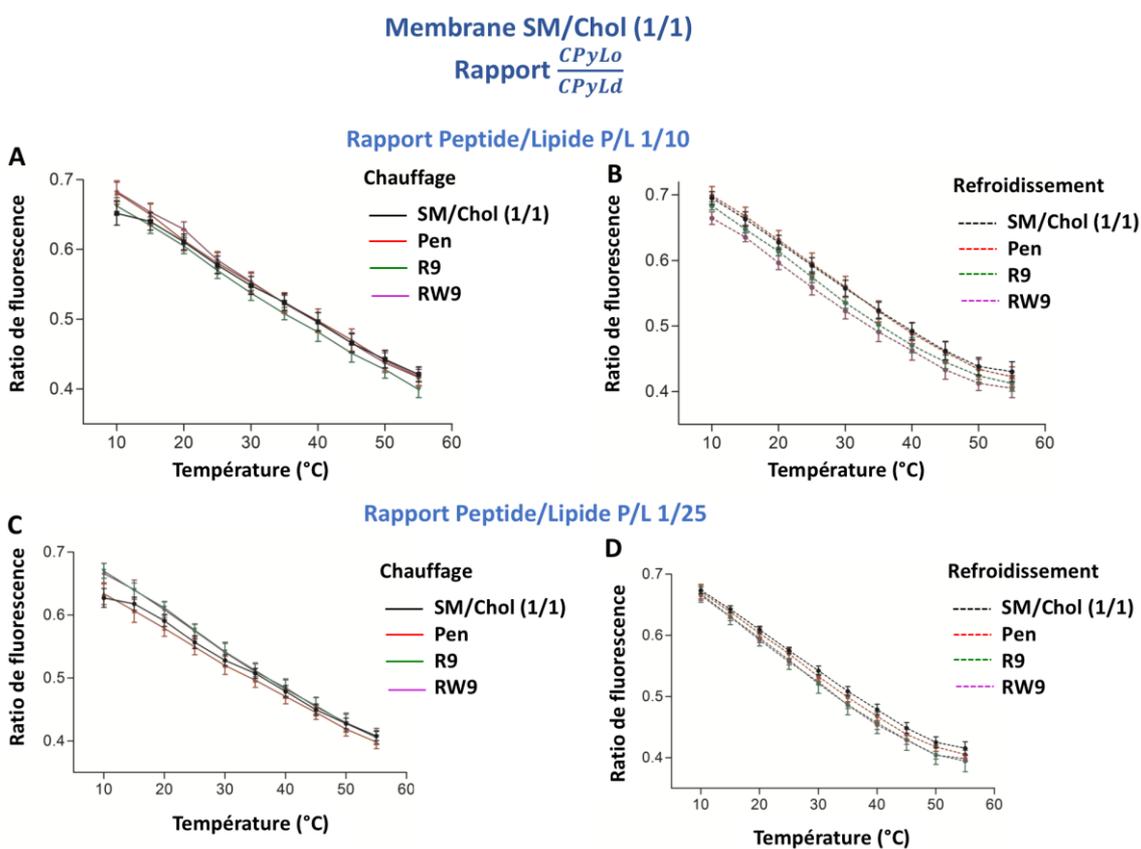


Figure 75. Rapport CPyLo/CPyLd en fonction de la température pour les membranes SM/Chol. Pour les peptides au ratio P/L 1/10 (A) en montée de température et (B) en descente de température. Et pour les peptides au ratio P/L 1/25 (C) en montée de température et (D) en descente de température. Noir, les membranes PC ; rouge, en présence de pénétратine ; vert, en présence de R9 et violet, en présence de RW9.

3. Effet des peptides sur la distribution du cholestérol-pyrène dans les membranes avec des domaines L_o et L_d (PC/SM/Chol)

Afin de nous rapprocher de l'environnement des membranes biologiques, des LUV avec des domaines L_o et L_d ont été utilisés (PC/SM/Chol). Une diminution de la quantité d'excimères pour tous les peptides a été constatée mais à différent niveau. Que ce soit en chauffant ou en refroidissant, aux rapports P/L 1/25 ou 1/10, la diminution d'excimères en fonction des peptides présentent des caractéristiques différentes. En effet, comme le montre la Figure 76, la plus forte diminution a été obtenue avec R9. RW9 a un effet un peu plus faible que celui de R9, et avec la pénétратine, la diminution du nombre d'excimères est encore moins importante (Figure 76).

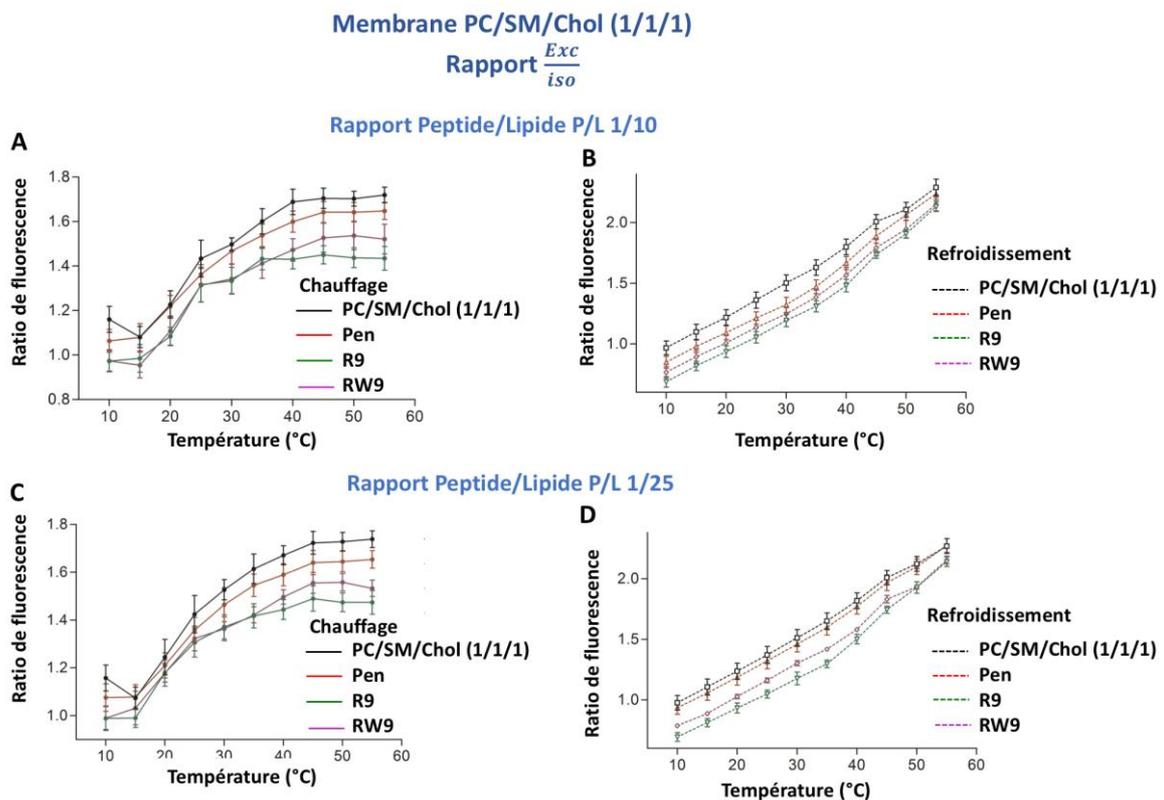


Figure 76. Rapport exi/iso en fonction de la température pour les membranes PC/SM/Chol. Pour les peptides au ratio P/L 1/10 (A) en montée de température et (B) en descente de température. Et pour les peptides au ratio P/L 1/25 (C) en montée de température et (D) en descente de température. Noir, les membranes PC ; rouge, en présence de pénétратine ; vert, en présence de R9 et violet, en présence de RW9.

Le comportement du rapport $\frac{CPyLo}{CPyLd}$ est plus complexe dans les membranes avec la coexistence des phases L_o et L_d (PC/SM/Chol) que dans les membranes PC et SM/Chol. Pour les membranes PC et SM/Chol (type L_d et L_o « pures »), les effets des peptides aux rapports P/L 1/10 et 1/25 sont cohérents, que ce soit en chauffant ou en refroidissant. Cependant, pour les membranes PC/SM/Chol les effets aux rapports P/L 1/10 et 1/25 sont différents. En comparant les courbes lors du refroidissement et lors du chauffage, il apparaît qu'au ratio P/L 1/10, les effets des peptides sur $\frac{CPyLo}{CPyLd}$ sont similaires à ceux observés dans les LUV SM/Chol (L_o). En revanche, il apparaît qu'au ratio 1/25, les effets des peptides sont similaires à ceux observés dans les membranes PC (L_d). Cela signifie qu'à basse concentration, les peptides modifient préférentiellement les domaines PC (L_d) tandis que pour modifier les domaines SM/Chol (L_o) il faut une plus grande concentration de peptides (Figure 77).

De plus, pour les peptides à haute concentration (1/10 mol/mol), le peptide R9 a un rapport $\frac{CPyLo}{CPyLd}$ plus petit pendant le chauffage. A basse concentration (1/25 mol/mol), R9 augmente le rapport $\frac{CPyLo}{CPyLd}$. Les peptides pénétratine et RW9 ne présentent pas d'effet lors du chauffage. Lors du refroidissement, le rapport $\frac{CPyLo}{CPyLd}$ augmente avec R9 et RW9. Nous pouvons aussi observer que le rapport $\frac{CPyLo}{CPyLd}$ est assez linéaire pour les membranes PC et SM/Chol ce qui n'est pas le cas pour les membranes PC/SM/Chol qui présentent une rupture de pente autour de 30°C suggérant une coexistence de phases contenant du cholestérol-pyrène.

Membrane PC/SM/Chol (1/1/1)

$$\text{Rapport } \frac{CPyLo}{CPyLd}$$

Rapport Peptide/Lipide P/L 1/10

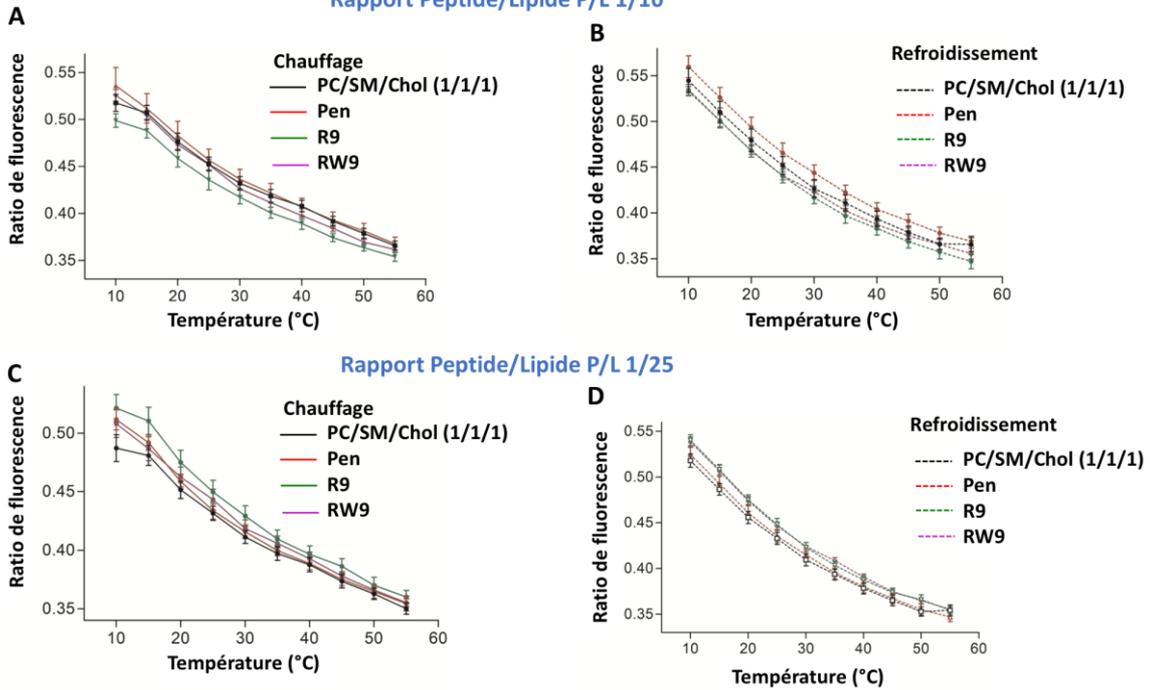


Figure 77. Rapport CPyLo/CPyLd en fonction de la température pour les membranes PC/SM/Chol. Pour les peptides au ratio P/L 1/10 (A) en montée de température et (B) en descente de température. Et pour les peptides au ratio P/L 1/25 (C) en montée de température et (D) en descente de température. Noir, les membranes PC ; rouge, en présence de pénétratine ; vert, en présence de R9 et violet, en présence de RW9.

Conclusion

Le Tableau 7 récapitule les effets globaux des peptides sur les différentes membranes :

Membrane	Peptide	$\frac{\text{Exc}}{\text{Iso}}$	$\frac{\text{CPyLo}}{\text{CPyLd}}$
PC	R9	↓↓↓	↑↑↑
	RW9	↓↓	↑ ou ≈
	Pénétratine	↓	↑↑
SM/Chol (1/1)	R9	↓↓↓	↓
	RW9	↓↓↓	↓
	Pénétratine	≈	≈
PC/SM/Chol (1/1/1)	R9	↓↓↓	BC : ↑↑
			HC : ↓↓
	RW9	↓↓	BC : ↑
			HC : ↓ ou ≈
	Pénétratine	↓	BC : ↑
			HC : ↑ ou ≈

Tableau 7. Tableau récapitulatif des résultats des effets des peptides sur la réorganisation du cholestérol-pyrène. BC : Basse concentration des peptides, ratio P/L 1/25 et HC : haute concentration P/L 1/10.

Nos expériences montrent que les peptides agissent différemment selon les propriétés physico-chimiques de la membrane puisque nous constatons des changements des domaines autour du cholestérol-pyrène. Nous voyons un changement dans le spectre de fluorescence du cholestérol-pyrène et de fait nous en déduisons que la membrane se réorganise, puisque le cholestérol-pyrène est mimétique du cholestérol. Nous avons

émis des hypothèses afin d'expliquer la baisse d'excimères ainsi que l'augmentation du ratio $\frac{CPyLo}{CPyLd}$. Une manière de déterminer la meilleure hypothèse pour chaque membrane est d'associer les rapports $\frac{Exc}{iso}$ et $\frac{CPyLo}{CPyLd}$.

Nous avons vu que la pénétratine présente un effet moindre dans le nombre d'excimères du cholestérol-pyrène, tandis que R9 et RW9 montrent une diminution d'excimères plus marquée. Pour interpréter cette diminution, trois hypothèses peuvent être proposées :

1. Soit la contribution des domaines riches en cholestérol (caractère Lo) augmente et le cholestérol-pyrène se dilue dans ces domaines (moins d'excimères) ;
2. Soit la contribution des domaines riches en cholestérol est constante et le cholestérol-pyrène devient monomère à l'intérieur de cette zone ;
3. Soit le cholestérol-pyrène quitte les domaines riches en cholestérol, avec une éventuelle réduction de ces zones.

Afin d'expliquer l'augmentation du ratio $\frac{CPyLo}{CPyLd}$ pour le cholestérol-pyrène sous forme de monomère, deux mécanismes sont envisageables :

- Soit un monomère se déplace vers une zone à caractère Lo plus importante que l'environnement dans lequel il se trouvait précédemment ;
- Soit un cholestérol-pyrène quitte un excimère pour se positionner dans une zone dont le caractère Lo est plus important que la moyenne pour des monomères.

L'approche suivie a ses limites qui nous empêchent de sélectionner une de ces hypothèses (schématisées dans la figure 78) et il serait nécessaire d'avoir une technique qui présente plus de finesse et de résolution dans le temps, comme par exemple des approches faisant intervenir la résonance paramagnétique électronique sur des phases à l'échelle de la nanoseconde, ou bien la fluorescence résolue dans le temps. Ainsi, afin de mieux comprendre les phénomènes ayant lieu dans la membrane avec cette sonde, nous avons étudié les variations d'anisotropie, l'objectif étant de mieux cerner le mouvement du cholestérol-pyrène dans la membrane.

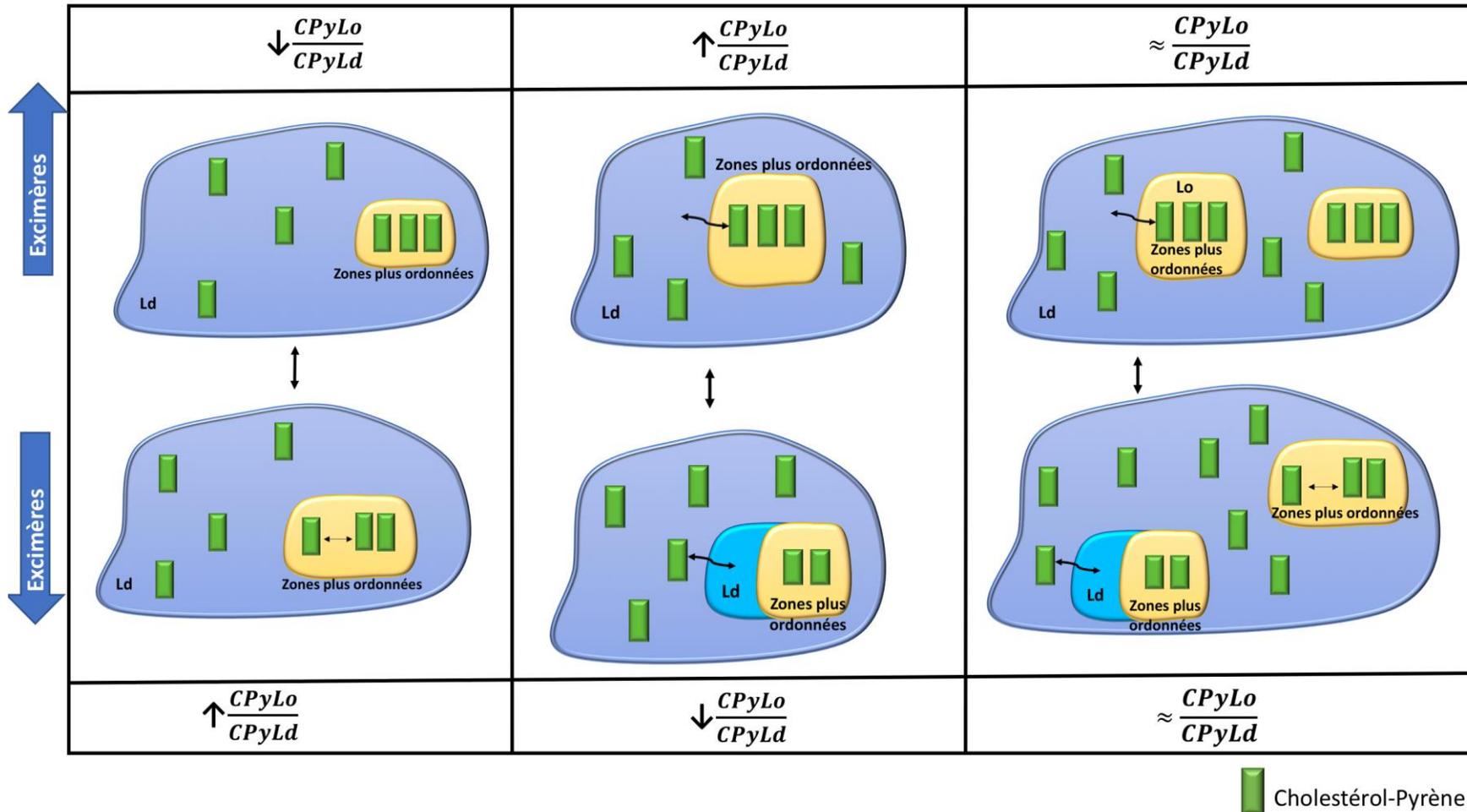


Figure 78. Modèle du mouvement du cholestérol-pyrène dans une situation d'augmentation d'excimères en haut et de diminution d'excimères en bas. Les différents modes de redistribution du cholestérol-pyrène peuvent avoir des conséquences sur le rapport $CPyLo/CPyLd$ comme illustré tout en haut et en bas des schémas.

B. Mouvement du cholestérol-pyrène après l'ajout des peptides : étude par l'anisotropie

L'anisotropie permet de caractériser l'amplitude du mouvement de la sonde Py-met-Chol dans les différentes membranes. Nous pouvons constater qu'à 35°C, le spectre des monomères et des excimères du cholestérol-pyrène en présence de RW9 présente une anisotropie plus basse qu'en présence de R9, c'est-à-dire que le Py-met-Chol a une amplitude de mouvement plus grande en présence de RW9 (Figure 79). Nous pouvons observer que RW9 provoque une baisse de l'anisotropie du cholestérol-pyrène sous forme monomère, mais pas sous forme d'excimère. D'un autre côté, R9 présente un effet opposé, l'anisotropie du monomère ne change pas, alors que celle de l'excimère augmente. En présence de pénétратine, nous avons observé un spectre d'anisotropie proche de celui de RW9 (Annexe D).

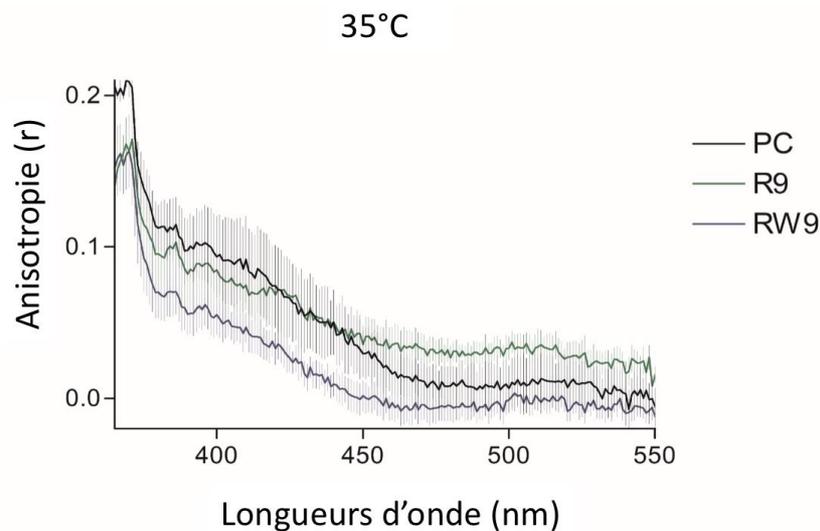


Figure 79. Effet des peptides (R9 en vert et RW9 en bleu) sur l'anisotropie du Py-met-chol en membranes PC à 35°C (Les écarts types sont représentés en traits fins).

C. Internalisation des peptides dans les LUV

L'internalisation des peptides R9, RW9 et pénétratine dans des LUV PC, SM/Chol et PC/SM/Chol a été étudiée avec un rapport molaire peptide/lipide de 1/100. La quantification de l'internalisation est basée sur la fluorescence des peptides marqués avec la sonde NBD. Le NBD, dont la taille est de l'ordre de grandeur d'une chaîne latérale d'un acide aminé, est fixée à l'extrémité N-terminale des peptides. Le NBD ne devrait pas perturber les propriétés du peptide auquel il est lié. L'ajout de dithionite (DT), un agent réducteur, réduit rapidement la sonde NBD et provoque l'extinction de la fluorescence. Dans une expérience de pénétration dans des LUV, la fluorescence résiduelle après l'addition du dithionite correspond au peptide internalisé qui a été protégé du dithionite. Pour éviter l'entrée du dithionite dans les LUV les réductions sont faites à 15°C (J. M. Swiecicki et al. 2015). Il est possible qu'une fraction du peptide inséré dans la bicouche qui n'est pas rentrée dans le lumen vésiculaire, ou qu'une fraction du peptide se trouvant entre deux membranes des vésicules agrégées ne soit pas accessible au dithionite. Pour mesurer la quantité de peptide dans le lumen des vésicules nous avons utilisé la melittine. Sur des membranes en phase liquide, la melittine forme des pores transitoires qui perméabilisent la membrane, ce qui permet la sortie des molécules des LUV comme pour le cas de la calcéine (Pan and Khadka 2017). L'action de la melittine permet donc l'entrée du dithionite dans les LUV et ainsi d'éteindre la fluorescence du peptide internalisé, rendant possible sa quantification (Figure 80).

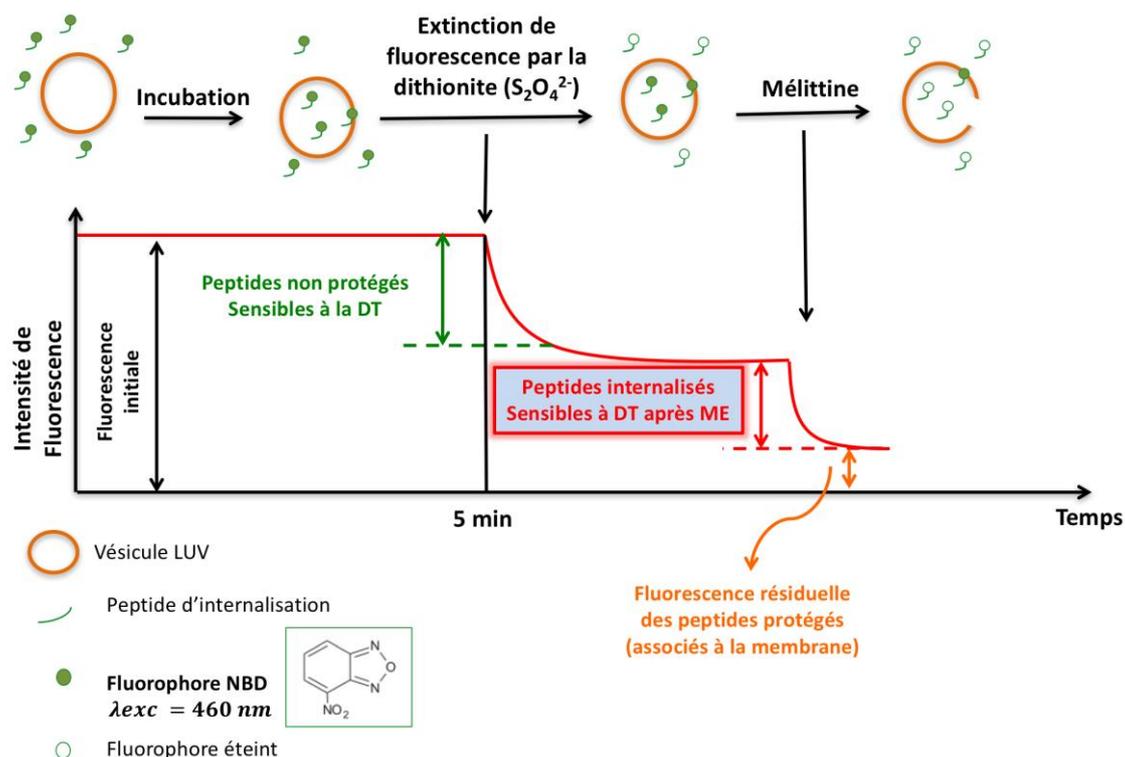


Figure 80. Schéma du protocole d'internalisation des peptides dans les LUV.

Initialement, les peptides ont été incubés avec les LUV à 37°C pendant 5 min et aucune internalisation n'a été observée. Ensuite nous les avons incubés à 37°C pendant 3h et nous avons obtenu une internalisation de 1,5 % (3 pmol) pour RW9 dans les membranes PC. Cependant, pour les membranes SM/Chol, aucun peptide n'a été internalisé (Figure 81B et Figure 82B). L'internalisation de RW9 ayant aussi été observée dans les membranes PC/SM/Chol (3 %, 6 pmol) (Figure 83) nous avons cherché à savoir si la fluidité de la membrane influe sur cette internalisation. Ainsi, nous avons augmenté davantage la température, de sorte que la membrane soit plus fluide.

À 50°C (5 min), nous avons obtenu une internalisation de 3 % (6 pmol) pour RW9 dans une membrane PC, mais pas pour les autres peptides (Figure 81A). Quand le temps d'incubation a été augmenté (60 min à 50°C), une internalisation de 5,5 % (11,4 pmol) a été observée. Cependant, pour les membranes PC/SM/Chol et SM/Chol, aucun peptide n'est internalisé à 50°C (Figure 82).

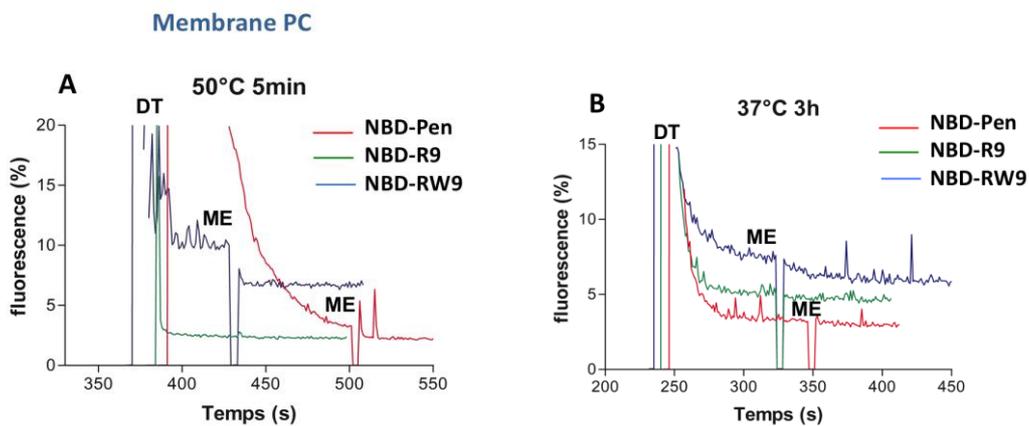


Figure 81. Essai d'Internalisation des peptides dans des LUV de PC. (A) 50°C, 5min. (B) 37°C, 3h. En rouge : pénétratine, en vert : R9 et en bleu : RW9. DT : ajout de dithionite et ME : ajout de melittine.

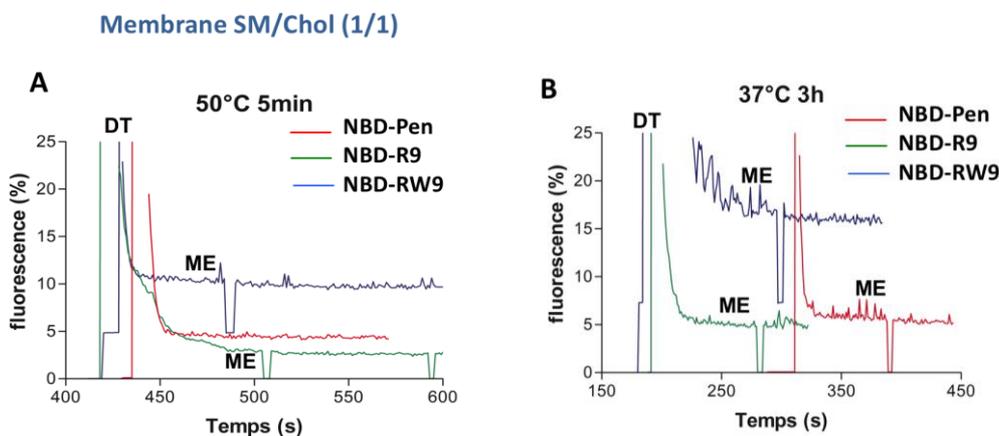


Figure 82. Essais d'Internalisation des peptides dans des LUV de SM/Chol. (A) 50°C, 5min. (B) 37°C, 3h. En rouge : pénétratine, en vert : R9 et en bleu : RW9. DT : ajout de dithionite et ME : ajout de melittine.

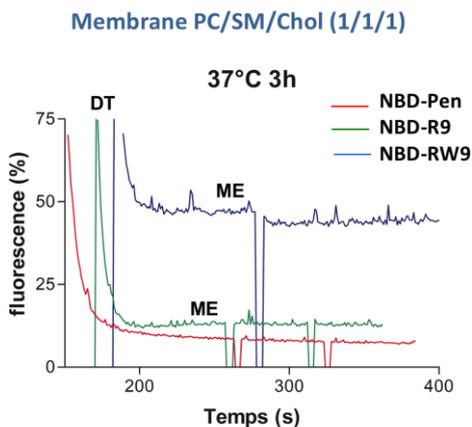


Figure 83. Internalisation des peptides dans des membranes de PC/SM/Chol à 35°C pendant 3h. En rouge : pénétratine, en vert : R9 et en bleu : RW9. DT : ajout de dithionite et ME : ajout de melittine.

Les résultats d'internalisation des peptides dans les différentes conditions est présenté dans le Tableau 8. Compte tenu du fait que les pourcentages sont faibles et que les expériences n'ont pas été faites en nombre suffisant pour une analyse statistique, nous sommes limités à montrer l'entrée, positive ou négative, dans les LUV. En résumé, dans nos conditions, le passage à travers les membranes a été observé essentiellement avec le peptide RW9 dans les membranes PC qui ont une organisation liquide désordonnée.

Conditions	Membrane PC		Membrane PC/SM/Chol
	37°C (3h)	50°C (1h)	37°C (3h)
Pénétratine	-	-	-
R9	-	-	-
RW9	+	++	+

Tableau 8. Internalisation de RW9 dans différentes conditions et dans différentes membranes.

Conclusion

Nous avons observé que l'internalisation du peptide RW9 dans les vésicules PC a eu lieu à 37°C et 50°C. Pour les membranes SM/Chol, aucun peptide n'a été internalisé, et concernant les membranes PC/SM/Chol, nous avons pu observer l'internalisation de RW9 à 37°C après 3h d'incubation.

Premièrement, dans nos conditions expérimentales, RW9 est le seul peptide à pouvoir traverser la membrane, même si dans d'autres conditions, l'internalisation de R9 et de la pénétratine a aussi été constatée (Simmons et al. 1997; Villa et al. 2000; Warrant et al. 2011). Des études ont montré que RW9 peut être internalisé efficacement dans un certain nombre de lignées cellulaires comme les cellules tumorales NIH 3T3 ou encore les cellules CHO-K1 (Delaroche et al. 2010). En outre, RW9, à la différence de R9, a

montré des propriétés antimicrobiennes (Walrant et al. 2011). La différence la plus visible entre les peptides étudiés est que RW9 peut se structurer en hélice α -amphipatique, ce qui n'est pas le cas des deux autres peptides (Ofelia Maniti, Alves, Trugnan, and Ayala-sanmartin 2010). Cette dernière propriété peut être fondamentale pour le passage de RW9 dans des membranes PC.

Le fait que RW9 est internalisé dans les LUV PC mais pas dans les LUV SM/Chol montre qu'une nature liquide désordonnée de la membrane est plus favorable pour son internalisation.

Concernant les mouvements du cholestérol-pyrène, nous avons constaté que la pénétration globalement cause moins de modifications dans la distribution du cholestérol (formation d'excimères) et du rapport $\frac{CPyLo}{CPyLd}$ comparé à R9 et RW9 pour les membranes PC, SM/Chol et PC/SM/Chol.

Pour la membrane PC, nous avons pu observer qu'après l'ajout des trois peptides, il y a eu une baisse de la quantité de cholestérol-pyrène sous forme d'excimères. Il faut noter que la plus grande diminution de la quantité d'excimères a été observée pour R9. Donc avec R9, les domaines L_o peuvent être plus importants dans l'hypothèse où il y a dilution du cholestérol-pyrène dans les domaines de type L_o (diminution d'excimères) puisque R9 augmente plus le rapport $\frac{CPyLo}{CPyLd}$ par rapport à la pénétration et à RW9. Ceci indique un effet plus « rigidifiant » sur la membrane (hypothèses 1 et 2) :

1. Les domaines au caractère L_o augmentent et le cholestérol-pyrène se dilue dans ces domaines ;
2. La contribution des domaines riches en cholestérol est constante et le cholestérol-pyrène devient monomère à l'intérieur de cette zone.

Le CPP RW9 provoque une diminution de la quantité d'excimères en membrane PC, et le rapport $\frac{CPyLo}{CPyLd}$ est différent aux rapports peptide/lipide 1/10 et 1/25. Au ratio 1/10 le peptide provoque une augmentation du rapport $\frac{CPyLo}{CPyLd}$ tout au long du chauffage. Mais en refroidissant, l'effet est moins important. En revanche, au ratio 1/25, le peptide modifie moins ce rapport. Il augmente la valeur du ratio et cette augmentation est

maintenue tout au long du refroidissement. Ce comportement peut être lié à sa structure amphipatique et il y aurait donc deux modes de liaison dépendant de la concentration. Un premier type de liaison, médié par l'arginine avec un comportement similaire à celui de R9, et un second type qui ferait intervenir les tryptophanes. D'après la comparaison entre R9 et RW9, sur une membrane à froid et à forte concentration de peptide, les effets sont similaires entre les deux peptides, suggérant une liaison par les arginines. Tandis qu'à chaud et à basse concentration, le peptide serait capable de s'insérer dans la membrane grâce à ses propriétés amphipatiques. Cette propriété des lipides pourrait être associée à une meilleure pénétration de RW9.

Pour la membrane SM/Chol, R9 et RW9 présentent une diminution d'excimères très nette montrant une action des peptides sur la distribution du cholestérol-pyrène. En revanche, les effets sur le rapport $\frac{CPyLo}{CPyLd}$ sont faibles lors du protocole de chauffage. Cependant, il y a une diminution de ce rapport en refroidissant pour un ratio P/L de 1/10. La membrane SM/Chol ayant un fort caractère L_o , les peptides engendrent moins de changement dans l'organisation des lipides. Pour cette membrane, dans tous les cas, la quantité d'excimères a diminué. Donc, l'augmentation dans la proportion des monomères va contribuer à des changements du caractère L_o ou L_d en fonction de leur environnement.

Pour la membrane PC/SM/Chol, quel que soit le peptide, une baisse du nombre d'excimères est constatée. Concernant le paramètre $\frac{CPyLo}{CPyLd}$, les effets des peptides changent en fonction de leur concentration. A faible concentration en peptide, l'effet est similaire à celui observé sur la membrane PC ce qui implique une baisse de $\frac{CPyLo}{CPyLd}$ pour R9 tandis que la pénétratine et RW9 n'ont pas provoqué de changement. En revanche, à forte concentration, les effets des peptides sont similaires à ceux obtenus sur des membranes SM/Chol.

Afin d'interpréter plus précisément l'action du peptide sur la membrane PC, nous avons réalisé des études d'anisotropie. Elles montrent que le cholestérol-pyrène monomérique a plus d'amplitude de mouvement avec RW9 qu'avec les autres peptides. Cette capacité à créer des espaces pourrait être liée au fait que dans ces conditions expérimentales, RW9 traverse la membrane.

A basse concentration et dans la membrane PC, le peptide RW9 entraîne une baisse de la quantité d'excimères et le rapport $\frac{CPyLo}{CPyLd}$ reste stable. Il y a donc un réarrangement lipidique durant lequel les monomères du cholestérol-pyrène se redistribuent dans des domaines à caractère L_o et L_d (Figure 84).

Nous pouvons suggérer que RW9 provoquerait une déstabilisation optimale de la membrane compatible pour un passage direct dans des domaines plus désordonnés. Ceci ne serait pas le cas ni pour R9, qui provoque une augmentation d'ordre, ni pour la pénétratine qui ne provoque pas assez de réarrangements dans la membrane dans ces conditions expérimentales.

Au vu de ces résultats, nous pouvons postuler que, dans nos conditions expérimentales, une membrane plus désordonnée serait nécessaire pour l'internalisation de RW9 dans les vésicules. Il apparaît que la distribution du cholestérol serait modifiée pour ou pendant l'internalisation de ce peptide. Un rapport critique d'interface entre les domaines de type L_o et L_d semblerait être important pour que le peptide RW9 puisse traverser la membrane des LUV ce qui ne serait pas le cas de la pénétratine ni de R9.

La structure amphipatique de RW9 pourrait également jouer un rôle en faveur de son passage à travers la membrane. Une liaison uniquement médiée par l'arginine ne serait pas suffisante (comme c'est le cas pour R9) dans nos conditions, alors qu'avec l'intervention du tryptophane, RW9 pourrait s'insérer d'une manière plus efficace pour traverser la membrane.

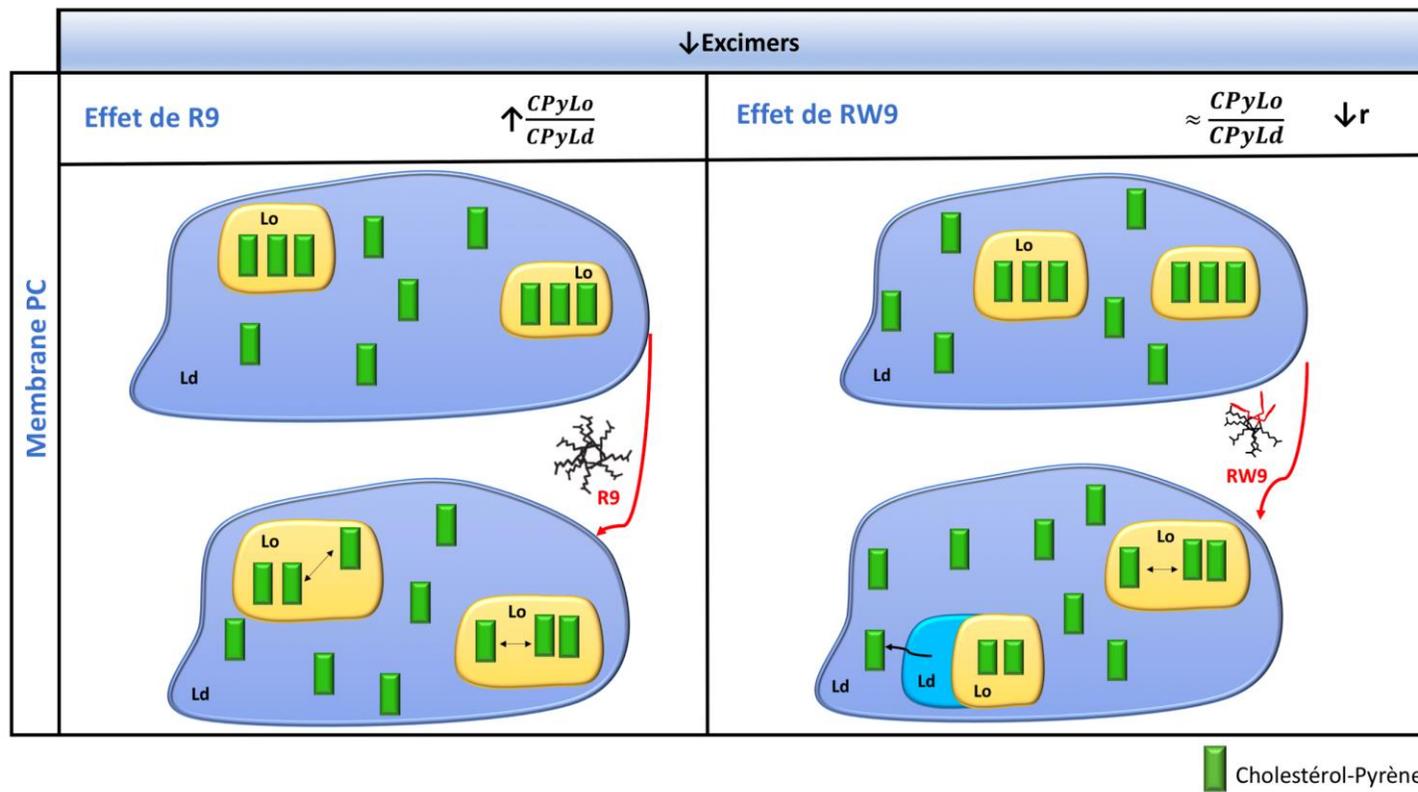


Figure 84. Effet global de R9 et RW9 sur les membranes PC. Lien entre les perturbations locales de la membrane et l'internalisation.

Le modèle membranaire que nous avons choisi au départ, avec des lipides de sources naturelles et donc avec différentes chaînes aliphatiques, prend en compte le fait que la membrane PC contient un certain pourcentage de lipides saturés. Le cholestérol peut donc se placer entre ces chaînes saturées. Les interfaces entre les domaines des types ordonné et désordonné peuvent être importantes pour l'internalisation du peptide comme serait le cas de RW9. L'importance d'avoir différents domaines pour avoir une internalisation a aussi été soulignée par Swiecicki et collaborateurs (J. Swiecicki et al. 2015). Les auteurs suggèrent que la phase fluide au milieu de la phase ordonnée est nécessaire pour que l'internalisation puisse avoir lieu. Ces interfaces sont aussi assimilées à des sites de nucléation suggérés par Joanne *et al.* (Joanne et al. 2009). La membrane est composée de différents domaines, aux propriétés et compositions différentes. Ainsi, ce que suggèrent nos résultats, c'est que les discontinuités séparant ces domaines pourraient être des structures plus favorables à l'entrée des peptides.

Références

- Delaroche, Diane et al. 2010. "Cell-Penetrating Peptides with Intracellular Actin-Remodeling Activity in Malignant Fibroblasts." *Journal of Biological Chemistry* 285(10): 7712–21.
- Joanne, Pierre et al. 2009. "Lipid Reorganization Induced by Membrane-Active Peptides Probed Using Differential Scanning Calorimetry." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1788(9): 1772–81.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.05.001>.
- 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).
- Pan, Jianjun, and Nawal K Khadka. 2017. "Kinetic Defects Induced by Melittin in Model Lipid Membranes: A Solution Atomic Force Microscopy Study." 120(20): 4625–34.
- Simmons, Carla G et al. 1997. "Synthesis and Membrane Permeability of PNa - Peptide

Conjugates." 7(23): 3001–6.

Swiecicki, Jean Marie et al. 2015. "Accumulation of Cell-Penetrating Peptides in Large Unilamellar Vesicles: A Straightforward Screening Assay for Investigating the Internalization Mechanism." *Biopolymers* 104(5): 533–43.

Tessier, Cedric et al. 2009. "Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Liquid – Liquid Immiscibility under Non-Equilibrium Conditions in a Model Membrane : An X-Ray Synchrotron Study." *Biointerfaces* 74: 293–97.

Villa, Raffaella et al. 2000. "Inhibition of Telomerase Activity by a Cell-Penetrating Peptide Nucleic Acid Construct in Human Melanoma Cells." *FEBS Letters* 473: 241–48.

Walrant, Astrid et al. 2011. "Different Membrane Behaviour and Cellular Uptake of Three Basic Arginine-Rich Peptides." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808(1): 382–93.

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000527361000324X>.

Conclusion

Conclusions générales et perspectives

Les travaux de cette thèse ont été menés afin de mieux comprendre les interactions entre différents peptides vecteurs et les membranes. Nous nous sommes intéressés aux effets des peptides sur l'organisation et la dynamique des lipides dans le but d'en savoir plus sur leur capacité d'internalisation. Nous avons donc mené des études biophysiques afin de collecter des données permettant d'en savoir plus sur les interactions entre les peptides vecteurs et les membranes. Nous avons d'abord cherché à comprendre l'action de la pénétratine sur l'organisation des phospholipides. C'est pourquoi nous nous sommes basés sur des résultats préalables de WAXD et de SAXD, complétés par des expériences de fluorescence du Laurdan et de calorimétrie. En second lieu, nous avons utilisé la sonde cholestérol-pyrène pour étudier la distribution du cholestérol dans des membranes et l'effet des peptides vecteurs (pénétratine, R9 et RW9) sur cette distribution. Devant la complexité des membranes biologiques, nous avons décidé, tout en ayant conscience des limitations, d'utiliser des modèles membranaires composés de lipides naturels (ce qui permet tout de même d'être proche des membranes *in vivo*) pour mimer différents domaines ordonnés et désordonnés de la membrane.

Réarrangements membranaires induits par la pénétratine

Dans la première partie de nos travaux, nous avons montré que la pénétratine est capable de séparer les phases lamellaires dans les membranes et que ces nouvelles phases acquièrent de nouvelles propriétés thermiques. Sur des membranes modèles composées de lipides synthétiques, les expériences de calorimétrie ont montré que la pénétratine semble favoriser l'apparition et la stabilité de la phase gel-ondulée, puisque la température de pré-transition diminue et la température de transition augmente. Par ailleurs, les expériences avec la sonde Laurdan montrent que ce peptide induit une diminution de la compacité des lipides en phase gel et en phase liquide, mais modifie peu la phase gel-ondulée. Ceci indique que la pénétratine favorise le passage vers la

phase gel-ondulée hétérogène, c'est à dire avec des zones de fluidité locales (Almeida et al. 2016).

Différents modèles d'organisation des lipides de la phase gel ondulée ont été proposés. Tardieu *et al.* ont proposé le premier modèle où les lipides sont inclinés par rapport à la normale de la membrane avec des ondulations périodiques (Tardieu, Luzzati, and Reman 1973a). Plus récemment, d'autres groupes ont suggéré que la phase gel ondulée est composée de deux arrangements lipidiques différentes. La phase gel ondulée serait donc hétérogène avec une partie gel inclinée et une partie plus fluide en alternance conduisant à la formation des ondulations (Heimburg 2000; Rappolt et al. 2000; Tenchov, Yao, and Hatta 1989). Ce dernier modèle de phase ondulée hétérogène est en accord avec nos résultats montrant que la pénétratine :

- Induit la séparation de phases lamellaires ;
- Favorise la transition vers la phase gel-ondulée.

Nos résultats suggèrent donc que la pénétratine préfère la phase ondulée hétérogène, une fois que la décompaction de la membrane a été augmentée et qu'une séparation de phases a eu lieu. La capacité de la pénétratine à modifier l'organisation des lipides peut être un facteur important pour traverser les membranes plasmiques.

Dans des membranes modèles, la pénétratine favorise la transition de la phase gel vers la phase gel-ondulée. Cependant, ce n'est pas la phase ondulée qui serait importante pour l'internalisation de la pénétratine, cette phase n'existant pas dans les membranes cellulaires *in vivo*, mais les changements induits par ce peptide dans l'organisation des lipides, qui entraînent une séparation des domaines dans la membrane.

La pénétratine en contact avec la membrane créerait donc des domaines et les interfaces entre ces domaines pourraient être importantes lors de son passage à travers la membrane.

Le peptide est suffisamment déstabilisant dans la bicouche lipidique ce qui pourrait engendrer des contraintes qui faciliteraient sa pénétration à travers la membrane plasmique. Pour une membrane biologique, la contrainte locale appliquée par la

pénétratine pourrait faciliter sa pénétration et l'interface entre les domaines radeaux, par exemple, pourrait être importante pour son internalisation.

La démarche pour comprendre le réarrangement des lipides induits par pénétratine nous a obligé à utiliser des modèles simplistes, avec des limitations. Cependant, cela a permis de voir que la pénétratine favorise la séparation des phases avec des domaines différents, dont certains sont plus fluides que d'autres. L'étape suivante a été d'étudier plus particulièrement le mouvement du cholestérol induit par la pénétratine et d'autres peptides.

Le cholestérol-pyrène comme sonde pour étudier la distribution du cholestérol dans la membrane

La capacité de la sonde cholestérol-pyrène à caractériser les domaines contenant du cholestérol dans les membranes a été étudiée dans ce projet, en analysant les spectres de fluorescence du pyrène. Différentes longueurs d'onde ont été déjà étudiées pour la sonde cholestérol-pyrène (Laurent Le Guyader 2007), mais notre projet montre également l'importance d'autres longueurs d'onde pour étudier la dynamique du cholestérol dans des membranes ordonnées (L_o) et désordonnées (L_d). Nous avons donc pu définir les longueurs d'onde les plus adéquates pour caractériser les domaines à caractère L_o (373 nm) et L_d (379 nm) de la membrane. Ces longueurs d'onde ont été déjà cités comme étant des bandes vibroniques (Kalyanasundaram and Thomas 1977). Ainsi, la dynamique de la distribution du cholestérol sur les membranes a pu être analysée. Le cholestérol-pyrène sous forme de monomère peut être étudié avec le rapport $\frac{373}{379}$, et sous forme d'excimères avec le rapport $\frac{474}{432}$.

Ainsi, nous avons observé la distribution du cholestérol-pyrène dans différentes membranes : L_o (SM/Chol), L_d (PC) et L_o - L_d (PC/SM/Chol). Pour les membranes plus ordonnées (SM/Chol), à froid, le cholestérol se trouve sous forme de multimères et monomères. Lors d'une augmentation de température, les lipides deviennent plus fluides et la membrane perd un peu de son caractère L_o . Il y a alors une faible montée

du nombre d'excimères car le cholestérol se concentrerait dans les zones L_o résistantes à la température.

Pour les membranes PC (L_d) avec des chaînes acyle insaturées et saturées hétérogènes (45% de chaînes saturées), le cholestérol-pyrène à froid, se présente davantage sous forme de monomères avec quelques excimères. Une augmentation de la température provoque l'accumulation du cholestérol probablement dans des domaines contenant des lipides à chaînes acyle plus saturées.

Par rapport aux membranes PC et SM/Chol, les membranes PC/SM/Chol présentent une coexistence des domaines L_o et L_d . Dans ces membranes, le cholestérol pyrène présente un comportement intermédiaire, ce qui est en accord avec la coexistence de domaines. Dans ces membranes, à basse température, le cholestérol-pyrène tendrait à s'insérer au niveau des lipides saturés des domaines L_o (formation d'excimères), mais il reste aussi dans des domaines plus fluides. À des températures plus élevées, le cholestérol-pyrène forme des excimères dans des zones plus ordonnées de la membrane.

À faible concentration, le cholestérol-pyrène a le même comportement que le cholestérol et est donc mimétique (Laurent Le Guyader, Le Roux, Maze, et al. 2007). Parmi les autres sondes de cholestérol disponibles, elle semble être la meilleure car les autres présentent des structures qui provoquent un encombrement stérique important et sont donc plus éloignées du cholestérol. Grâce aux expériences réalisées avec des membranes de propriétés différentes (caractère L_o et L_d) et aux expériences de compétition entre le céramide et la sphingomyéline pour le cholestérol, nous avons pu établir que le cholestérol-pyrène est une sonde fluorescente fiable pour étudier les mouvements du cholestérol au sein de la membrane.

Grâce au cholestérol-pyrène et à l'analyse multivariée, nous pouvons accumuler les données de différentes membranes de compositions connues. Ainsi il est d'abord possible d'accumuler ces données puis de générer un modèle afin de prédire la composition d'une membrane de composition inconnue, potentiellement une membrane cellulaire.

Pénétration des peptides pénétrants dans des LUV et leur effet sur l'organisation du cholestérol-pyrène dans les membranes

L'internalisation de peptides vecteur (R9, RW9 et pénétratine) dans des LUV a été étudiée avec les trois membranes déjà citées (PC, SM/Chol et PS/SM/Chol).

Dans nos conditions expérimentales, seule l'internalisation du peptide RW9 a eu lieu dans les LUV PC à 37°C et 50°C. RW9 a été internalisé dans les LUV PC/SM/Chol à 37°C après 3h d'incubation. Le degré de fluidité de la membrane semble être un paramètre important pour l'internalisation de RW9 car l'internalisation dans des LUV de PC/SM/Chol est similaire à celle ayant lieu dans des LUV PC alors que le peptide ne pénètre pas dans les vésicules SM/Chol. Les études d'anisotropie de fluorescence vont dans ce sens, montrant que RW9 est le peptide avec lequel le cholestérol-pyrène a une plus grande amplitude de mouvement.

Afin de comprendre les raisons pour lesquelles seul le peptide RW9 a été internalisé dans les vésicules PC, nous avons analysé les changements dans les spectres du cholestérol-pyrène induits par les peptides sur les différentes membranes. Nous avons vu une réduction dans la quantité de cholestérol sous forme d'excimères pour les trois peptides. Le peptide R9 présente le moins d'excimères et parallèlement, augmente le rapport $\frac{CPyLo}{CPyLd}$. R9 induirait donc la formation des domaines ordonnés les plus importants. En ce qui concerne RW9, il est celui qui a le plus augmenté le caractère désordonné de la membrane où se trouve le cholestérol. Il apparaît donc qu'une membrane plutôt fluide avec une réorganisation lipidique particulière peut être importante pour l'internalisation de RW9. Nous proposons que l'internalisation dans les LUV serait favorisée dans les membranes avec un rapport critique entre les domaines ordonnés et désordonnés. En effet, l'interface entre ces deux types de domaines pourrait être importante, et même être le site du passage de RW9 à travers la membrane.

Provenant de lipides naturels, les membranes que nous avons étudiées, présentent des chaînes aliphatiques différentes. Même la membrane PC qui est fluide présente 45 % de chaînes acyle saturées. Le cholestérol se placerait à proximité des chaînes les plus

saturées où il crée de l'ordre en formant des domaines avec un certain caractère L_o . (Sezgin et al. 2017). Comme souligné plus haut, les interfaces entre les domaines créés par le cholestérol peuvent être importantes pour l'internalisation du peptide comme dans le cas de RW9. Cette hypothèse de passage par des nanodomains, a été aussi suggérée dans la littérature où la présence de domaines désordonnés et ordonnés est nécessaire pour que l'internalisation puisse avoir lieu (Di Pisa, Chassaing, and Swiecicki 2015; J. Swiecicki et al. 2014; J. M. Swiecicki et al. 2015). Les membranes biologiques sont des systèmes complexes, contenant une grande variété de lipides avec des chaînes saturées et plus ou moins insaturées, de longueur variable, ainsi que diverses protéines. Des constituants membranaires interagissent temporairement avec des molécules du milieu environnant provoquant des changements sur la membrane. Ainsi, la ségrégation de phases à l'intérieur d'une membrane est une conséquence directe de la complexité de sa composition moléculaire. Nous trouvons donc différents domaines dans les membranes et certaines associations de lipides forment des domaines radeaux (Rosetti, Mangiarotti, and Wilke 2017; Schmid 2017). Ces domaines ont été impliqués dans le transport et la signalisation membranaire (Pike 2004; Rosetti, Mangiarotti, and Wilke 2017; Schmid 2017; Kai Simons and Gerl 2010) et pourraient être une voie d'entrée pour les CPP. Par exemple, Pae et collaborateurs ont montré que les CPP pénètrent plus efficacement dans les membranes quand elles sont dynamiques, et qui contiennent moins de cholestérol (Pae et al. 2014).

En ce qui concerne les peptides, seul RW9 a été internalisé alors que sa seule différence avec R9 est la présence de trois résidus de tryptophane à la place des arginines, ce qui lui donne un caractère amphipathique en conformation d'hélice- α . RW9 a un comportement similaire à R9 en dehors de la capacité d'augmentation de la fluidité de la membrane. Cette structure en hélice- α amphipathique pourrait être importante pour son internalisation. Witte et collaborateurs ont suggéré l'hypothèse que les chaînes latérales des tryptophanes peuvent interagir avec celles des résidus d'arginine afin de séparer ces dernières des têtes anioniques des lipides et ainsi de limiter leurs interactions. Ces interactions entre chaînes latérales des tryptophanes et des arginines pourraient accroître la flexibilité de la membrane, ceci ayant pour conséquence de générer des fluctuations amenant à un passage du peptide (Witte et al. 2013). De plus,

RW9 a montré son fort potentiel en tant que CPP comparé à R9 et à la pénétratine puisqu'il rentre efficacement dans différentes cellules, comme les cellules tumorales NIH 3T3 ou les cellules ovariennes de hamster (I. D. Alves et al. 2009; Delaroche et al. 2007, 2010; Witte et al. 2013).

De véritables membranes cellulaires doivent être utilisées pour confirmer ce que nous avons observé sur les systèmes modèles. Une possibilité est d'envisager des études sur des vésicules géantes de membrane plasmique (GPMV) ou des sphères de membranes plasmiques (PMS) (Ofelia Maniti et al. 2012a). Ces vésicules géantes d'origine cellulaire ne contiennent pas d'organelles et leur morphologie sphérique permet l'observation des déformations engendrées dans la membrane par les peptides. Leur composition est très proche de celle de la membrane plasmique, mais ne contiennent pas d'éléments du cytosquelette cortical. Ces GPMV sont également sujets à des séparations de phases liquide ordonnée et désordonnée (Baumgart et al., 2007; Keller et al., 2009; Lingwood et al., 2008). Ces vésicules ont été utilisés pour étudier la cinétique de pénétration de diverses CPP (Amand et al., 2011; Saalik et al., 2011) et leur utilisation pourrait constituer une suite logique dans ce projet. Un prochain objectif est d'observer si ces membranes deviennent plus ou moins fluides après l'ajout des peptides, localiser le lieu de l'interaction (domaines L_o ou L_d) et étudier leur pénétration. Ensuite nous pourrions étudier le rôle d'autres lipides comme le PIP2. En parallèle, lier le peptide à une molécule d'intérêt thérapeutique serait fort souhaitable.

Notre compréhension de l'internalisation de certains CPP

Nos premiers résultats nous amènent à la conclusion que la pénétratine crée une séparation de phases dans la membrane, qui devient moins compacte. En outre, les résultats de l'internalisation dans les vésicules montrent que le CPP RW9 est internalisé dans des LUV composées de domaines désordonnés. Les résultats avec le cholestérol-pyrène suggèrent que la membrane deviendrait plus fluide autour du cholestérol-pyrène avec RW9. Ces conclusions nous conduisent à l'idée que certains CPP réarrangent les lipides membranaires ce qui permettrait leur internalisation. Pour la

pénétration, comme RW9, la membrane deviendrait plus fluide. Ces réarrangements lipidiques en proportions adéquates créent différents domaines. Les interfaces entre les domaines pourraient être une porte d'entrée pour ces CPP, suite à la contrainte qu'ils engendrent sur la membrane (Figure 85).

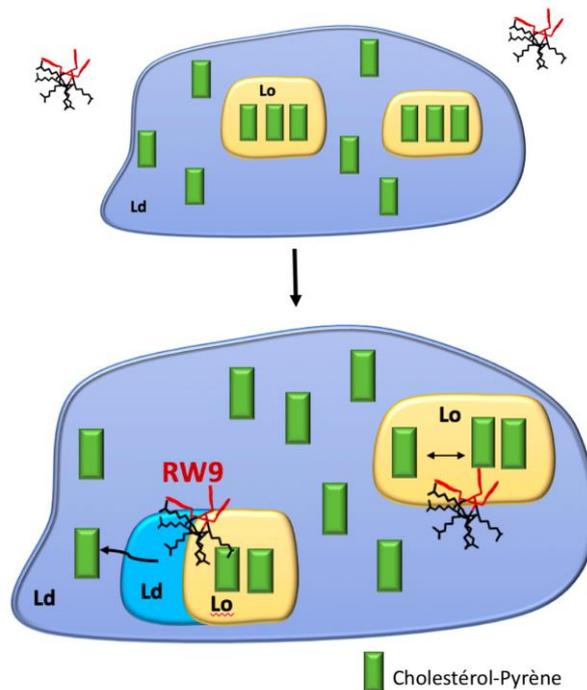


Figure 85. Représentation schématique de la réorganisation lipidique induite au préalable par RW9 pour l'internalisation du CPP en membrane PC.

Le comportement de RW9 diffère selon la concentration. À basse concentration, il s'avère que RW9 rend la membrane plus ordonnée que R9. Cette différence pourrait être due au fait que RW9 peut acquérir une conformation en hélice- α amphipatique et interagir avec la membrane par la partie hydrophobe. Une hélice- α amphipatique a la capacité de pénétrer dans la bicouche (Brattwall, Lincoln, and Norde 2003; Rydberg et al. 2012; Walrant et al. 2011; Witte et al. 2013). À haute concentration, RW9 est capable d'augmenter la proportion de membrane ordonnée comme R9. Ceci pourrait être due à une saturation de la capacité de RW9 à s'insérer comme une hélice- α amphipatique qui commencerait donc à s'associer aux lipides par le côté arginines comme R9.

Dans les conditions expérimentales d'internalisation dans les LUV, les peptides ont été utilisés à basse concentration (rapport P/L 1/100 mol/mol), donc le comportement de

RW9 s'éloignerait de celui de R9, ce qui pourrait expliquer leur différence d'internalisation.

Afin de comprendre les réarrangements lipidiques qui ont lieu lors de l'interaction des peptides vecteurs avec les membranes, nous avons utilisé des modèles membranaires avec des lipides naturels. Il faudrait dans l'avenir à la fois complexifier la membrane en la rendant plus proche de ce que nous trouvons *in vivo* et complexifier le peptide en l'associant à une molécule cargaison afin de ne pas perdre de vue que la finalité est d'utiliser ses vecteurs comme agents de transport pharmacologique.

Références

- Almeida, Claudia et al. 2016. "Membrane Re-Arrangements and Rippled Phase Stabilisation by the Cell Penetrating Peptide Penetratin." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1858(11): 2584–91.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.07.012>.
- Alves, Isabel D et al. 2009. "The Interaction of Cell-Penetrating Peptides with Lipid Model Systems and Subsequent Lipid Reorganization: Thermodynamic and Structural Characterization." *Journal of Peptide Science* 15(3): 200–209.
- Brattwall, Christina E B, Per Lincoln, and Bengt Norde. 2003. "Orientation and Conformation of Cell-Penetrating Peptide Penetratin in Phospholipid Vesicle Membranes Determined by Polarized-Light Spectroscopy." *JACS* 125: 14214–15.
- Delaroche, Diane et al. 2007. "Tracking a New Cell-Penetrating (W/R) Nonapeptide, through an Enzyme-Stable Mass Spectrometry Reporter Tag." *Analytical Chemistry* 79(5): 1932–38.
- Delaroche, Diane et al. 2010. "Cell-Penetrating Peptides with Intracellular Actin-Remodeling Activity in Malignant Fibroblasts." *Journal of Biological Chemistry* 285(10): 7712–21.
- Le Guyader, Laurent et al. 2007. "Changes of the Membrane Lipid Organization Characterized by Means of a New Cholesterol-Pyrene Probe." 93(December): 4462–73.
- Le Guyader, Laurent et al. 2007. "Utilisation de Sondes Pyréniques in Vivo Pour Caractériser L'état de Phase Global de La Membrane Plasmique de Cellules Eucaryotes. Application À La Détection de La Liaison D'agonistes Au Récepteur Δ opioïde Murin."
- Heimburg, Thomas. 2000. "A Model for the Lipid Pretransition: Coupling of Ripple Formation with the Chain-Melting Transition." *Biophysical Journal* 78(3): 1154–65.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349500766732>.

- Kalyanasundaram, K., and J. K. Thomas. 1977. "Environmental Effects on Vibronic Band Intensities in Pyrene Monomer Fluorescence and Their Application in Studies of Micellar Systems." *Journal of the American Chemical Society* 99(7): 2039–44.
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00449a004>.
- Maniti, Ofelia et al. 2012. "Metabolic Energy-Independent Mechanism of Internalization for the Cell Penetrating Peptide Penetratin." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 44(6): 869–75.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2012.02.010>.
- Pae, Janely et al. 2014. "Translocation of Cell-Penetrating Peptides across the Plasma Membrane Is Controlled by Cholesterol and Microenvironment Created by Membranous Proteins." *Journal of Controlled Release* 192: 103–13.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.07.002>.
- Pike, Linda J. 2004. "Lipid Rafts : Heterogeneity on the High Seas." *Biochemical Journal* 292: 281–92.
- Di Pisa, Margherita, Gérard Chassaing, and Jean-Marie Swiecicki. 2015. "Translocation Mechanism(s) of Cell-Penetrating Peptides: Biophysical Studies Using Artificial Membrane Bilayers." *Biochemistry* 54(2): 194–207.
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi501392n>.
- Rappolt, M et al. 2000. "New Evidence for Gel-Liquid Crystalline Phase Coexistence in the Ripple Phase of Phosphatidylcholines." *European biophysics journal : EBJ* 29: 125–33.
- Rosetti, Carla M, Agustín Mangiarotti, and Natalia Wilke. 2017. "Biochimica et Biophysica Acta Sizes of Lipid Domains : What Do We Know from Artificial Lipid Membranes ? What Are the Possible Shared Features with Membrane Rafts in Cells ?" *BBA - Biomembranes* 1859(5): 789–802.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.01.030>.
- Rydberg, Hanna A et al. 2012. "Effects of Tryptophan Content and Backbone Spacing on the Uptake Efficiency of Cell-Penetrating Peptides." *Biochemistry* 51: 5531–39.
- Schmid, Friederike. 2017. "Physical Mechanisms of Micro- and Nanodomain Formation in Multicomponent Lipid Membranes." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1859(4): 509–28.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.10.021>.
- Sezgin, Erdinc, Ilya Levental, Satyajit Mayor, and Christian Eggeling. 2017. "The Mystery of Membrane Organization: Composition, Regulation and Roles of Lipid Rafts." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18(6): 361–74.
<http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/nrm.2017.16>.
- Simons, Kai, and Mathias J. Gerl. 2010. "Revitalizing Membrane Rafts: New Tools and Insights." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11(10): 688–99.
<http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/nrm2977>.
- Swiecicki, Jean-marie, Annika Bartsch, Julien Tailhades, and Di Pisa. 2014. "The

Efficacies of Cell-Penetrating Peptides in Accumulating in Large Unilamellar Vesicles Depend on Their Ability To Form Inverted Micelles.” : 884–91.

Swieicki, Jean Marie et al. 2015. “Accumulation of Cell-Penetrating Peptides in Large Unilamellar Vesicles: A Straightforward Screening Assay for Investigating the Internalization Mechanism.” *Biopolymers* 104(5): 533–43.

Tardieu, A., Vittorio Luzzati, and F. C. Reman. 1973. “Structure and Polymorphism of the Hydrocarbon Chains of Lipids: A Study of Lecithin-Water Phases.” *Journal of Molecular Biology* 75(4): 711–33.

Tenchov, Boris G, Haruhiko Yao, and Ichiro Hatta. 1989. “Time-Resolved X-Ray Diffraction and Calorimetric Studies at Low Scan Rates Sample Preparation.” *Biophysical Journal* 56(4): 757–68. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(89\)82723-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(89)82723-7).

Walrant, Astrid et al. 2011. “Biochimica et Biophysica Acta Different Membrane Behaviour and Cellular Uptake of Three Basic Arginine-Rich Peptides.” *BBA - Biomembranes* 1808(1): 382–93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.09.009>.

Witte, Kristina et al. 2013. “Structure and Dynamics of the Two Amphipathic Arginine-Rich Peptides RW9 and RL9 in a Lipid Environment Investigated by Solid-State NMR and MD Simulations.” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1828(2): 824–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.11.014>.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

Ce chapitre s'organise autour de la présentation des matériaux et des méthodes utilisées dans cette thèse. Dans une première partie, nous allons préciser les protocoles de préparation des vésicules multi-lamellaires et unilamellaires. Nous préciserons ensuite les diverses techniques expérimentales comme la spectroscopie de fluorescence et les techniques calorimétriques. Nous en décrirons les éléments essentiels nécessaires à la bonne compréhension des résultats qui ont été présentés dans les chapitres précédents, et justifierons leur utilisation. Nous terminerons ce chapitre par une brève présentation du logiciel SIMCA® utilisé pour l'analyse de composants principaux des expériences réalisées.

1. Préparation des membranes

Les vésicules utilisées dans ce travail de thèse sont de deux types dépendant de l'utilisation qui en sera faite ultérieurement. Pour les expériences de calorimétrie différentielle, nous avons utilisé les vésicules multi-lamellaires alors que pour la spectrométrie de fluorescence, nous avons utilisé les vésicules uni-lamellaires.

1.1. Vésicules multi-lamellaires pour la calorimétrie

Les vésicules multi-lamellaires (MLV) pour les expériences de calorimétrie différentielle (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC) ont été réalisées à partir d'une solution contenant 2 mg de lipides dissout dans 250 μ L de chloroforme. Ensuite, les lipides ont été séchés sur un flux de diazote et placés 30 minutes sous un vide primaire. Puis, 2 ml de solution tampon HEPES (0,5 mM pH 7,4) ont été ajoutés en présence ou en absence de pénétratine avec le rapport de concentration peptide/lipide souhaité à savoir 1/50 ou 1/10.

Selon l'équipement utilisé pour les mesures de calorimétrie différentielle, deux protocoles différents ont été suivis :

- pour le calorimètre CSC, les échantillons sont fortement agités au Vortex pour obtenir une suspension de MLV de concentration 1 mg/mL prête à l'emploi,
- pour le calorimètre DSC 822 (Mettler Toledo) les suspensions de MLV ont été centrifugées dans une centrifugeuse Beckman pendant 30 minutes à 100 000g à 20°C. Les MLV sont ensuite récupérées dans un volume final de 40 μ L du tampon.

1.2. Vésicules unilamellaires pour la spectroscopie de fluorescence

Les LUV sont préparées à partir d'une suspension de MLV. La suspension lipidique MLV est passée 21 fois à travers une membrane en polycarbonate de porosité 100 nm avec un Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids) (Lamazière et al. 2010; Zibouche et al. 2008).

Les lipides ont été ajoutés dans les proportions souhaitées pour obtenir une suspension de 1 mg/mL dans la solution tampon. Pour la fluorescence du Laurdan, la concentration de la sonde était de 0,1% en poids. Pour les expériences de fluorescence avec du Cholestérol-Pyrène la concentration du Py-met-chol était de 1,8 ou 3,6 % en moles.

Pour analyser l'effet de la température sur la distribution du cholestérol-pyrène, deux protocoles ont été utilisés : l'un au chauffage, l'autre au refroidissement. Les échantillons, d'abord conservés à 4°C, ont été introduits dans une cuvette en quartz et placés dans le fluorimètre. Pour le protocole du chauffage, la température augmente de 10°C à 55°C : les spectres de fluorescence sont acquis à intervalles de 5°C. Pour le protocole de refroidissement, les échantillons ont d'abord été rapidement chauffés à 55°C puis refroidis par paliers de 5°C jusqu'à 10°C dans le fluorimètre. Les spectres ont été également acquis à chacun des paliers isothermes.

2. Spectroscopie de fluorescence

La spectroscopie de fluorescence est l'une des principales et plus prolifiques techniques utilisées dans ce travail de thèse. Aussi, nous allons présenter les points essentiels à la compréhension des développements et à l'analyse des résultats qui ont été présentés dans les chapitres précédents. Pour plus de précision sur la méthode, le lecteur est renvoyé en Annexe A où la théorie associée y est développée plus en profondeur.

2.1. Généralités

Suite à une excitation par absorption d'énergie, les molécules peuvent passer dans un état électronique d'énergie supérieure et émettre de la lumière au moment de retrouver leur état fondamental : il s'agit de la luminescence. L'excitation peut être par exemple engendrée par l'absorption de lumière ou provenir d'un mécanisme mécanique tel un frottement ou d'un mécanisme chimique. Si l'excitation provient de l'absorption d'un photon dont la longueur d'onde est dans le visible ou l'ultraviolet, il s'agit de photoluminescence. En fonction de la façon dont la désexcitation a lieu (retour à l'état fondamental), il y aura un phénomène de phosphorescence ou de fluorescence. La désexcitation par fluorescence est beaucoup plus rapide que celle par phosphorescence. Une molécule excitée par l'absorption d'un photon revient à son état fondamental spontanément ce qui peut provoquer ou non l'émission de fluorescence. En effet, l'émission de fluorescence n'est qu'une des voies de désexcitation parmi d'autres avec qui elle est en compétition et qui sont représentées sur la Figure 86.

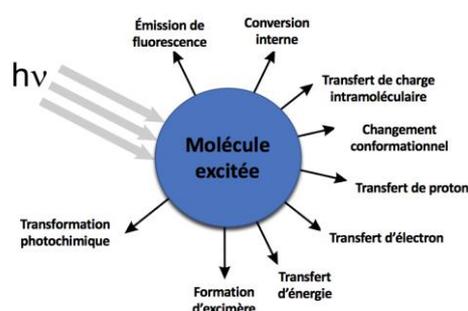


Figure 86 : Diverses voies de désexcitation après excitation d'une molécule par un photon d'énergie $h\nu$ (Valeur, 2001).

2.1.1. Les paramètres physiques liés au processus de fluorescence

Plusieurs caractéristiques liées au processus de fluorescence jouent un rôle essentiel dans les analyses des spectres de fluorescence :

- Le rendement quantique de fluorescence défini comme le rapport entre le nombre de photons de fluorescence émis sur le nombre de photons absorbés. Il rend compte aussi de la compétition entre les différentes voies de relaxation d'une molécule excitée. Ainsi, tout processus qui modifie la durée de vie de l'état excité va impacter le rendement quantique de fluorescence de la molécule.
- L'intensité de fluorescence idéale I_F est l'intensité pour laquelle ne sont pas comptées les pertes induites par les phénomènes de réabsorption de la radiation émise. Si on appelle A_T le facteur d'absorption totale, il est montré que pour des absorbances faibles, A_T , et donc l'intensité de fluorescence sont proportionnels à la concentration de l'échantillon.
- La durée de vie de fluorescence est également une caractéristique propre à chaque molécule. Elle est égale à la durée de vie moyenne de l'état excité singulet S_1 (voir Annexe A). Plus la durée de vie est courte, plus la sensibilité du fluorophore sera bonne car plusieurs excitations successives seront possibles car il va revenir rapidement dans son état fondamental pour être à nouveau excité.

D'autres éléments directement liés au milieu dans lequel l'interaction se déroule modifient les spectres de fluorescence :

- l'environnement des molécules,
- l'effet d'extinction de fluorescence (*quenching*).

2.1.2. Effet de l'environnement :

Tout ce qui perturbe les transitions électroniques comme par exemple une variation de pH (Rusinova et al. 2002), de la polarité du solvant (Casey and Quitevis 1988), ou encore les interactions intermoléculaires va avoir une influence sur la fluorescence (Valeur 2001). La viscosité (Moog et al. 1982) et la température vont aussi avoir une influence.

Ainsi, la fluorescence permet de s'intéresser à l'étude des structures en biologie (Diaspro et al. 2000) et des mécanismes cellulaires (Klonis et al. 2002). Le temps de corrélation permet entre autres de déterminer la viscosité intracellulaire (Fushimi and Verkman 1991). La fluorescence permet aussi d'étudier le confinement de chromophores dans des structures poreuses (Gavilan et al. 2005) ainsi que les interactions intermoléculaires (Alcala, Gratton, and Prendergast 1987; Hovius et al. 2000).

2.1.3. Extinction de fluorescence

L'extinction de fluorescence fait référence aux phénomènes qui entraînent une baisse de l'intensité de fluorescence voir une extinction. Les raisons de cette baisse d'intensité ont des origines diverses (Lakowicz 2006) :

- **cinétique (ou dynamique) :** Le rendement quantique et la durée de vie peuvent diminuer notamment quand l'une des constantes de vitesse du modèle cinétique de relaxation de l'état excité change ou quand un autre type de désexcitation a lieu comme une séparation de charges. Lorsque certains fluorophores entrent en contact avec une molécule telle que l'oxygène, il est possible d'observer ce type de phénomène (Hübner et al. 2001). L'extinction de fluorescence dépend alors de la probabilité de rencontre entre la molécule d'oxygène et le fluorophore. Une autre possibilité est un transfert d'énergie de fluorescence non radiatif (voir Annexe A).
- **non cinétique (ou statique) :** dans ce cas, c'est une baisse du nombre de molécules émettrices qui est la cause de la baisse d'intensité de fluorescence. Ceci est associé à une chute du rendement quantique de fluorescence. Cependant, les constantes cinétiques de relaxation de l'état excité restent inchangées tout comme la durée de vie de fluorescence. Ceci peut avoir lieu lors de la formation d'un complexe non fluorescent (Vaiana et al. 2003) comme entre une molécule de tryptophane et des dérivés de rhodamine ou de fluorescéine (Marmé et al. 2003). La diminution de la fluorescence peut aussi être causée par une photodégradation de l'échantillon mais ceci n'entraîne pas toujours une extinction totale de la fluorescence.

2.2. Les fluorophores

2.2.1. Définition

Les sondes de fluorescence représentent l'un des éléments majeurs de la spectroscopie de fluorescence. Les résolutions temporelles et en longueur d'onde requises pour les instruments sont déterminées par les propriétés spectrales des fluorophores. De même, les informations disponibles dans les expériences sont déterminées par les propriétés de ces sondes. Seules les sondes présentant une anisotropie non nulle peuvent être utilisées pour mesurer la diffusion en rotation et la durée de vie du fluorophore doit être comparable à la durée d'intérêt de l'expérience. Seules les sondes sensibles au pH peuvent être utilisées pour mesurer le pH. Et seules les sondes avec des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission raisonnablement longues peuvent être utilisées dans les tissus qui présentent une auto-fluorescence à de courtes longueurs d'onde d'excitation. On distingue deux catégories principales de fluorophores dont les propriétés spectrales jouent sur la résolution en longueur d'onde : les intrinsèques et les extrinsèques. Les premiers sont des molécules se trouvant naturellement dans l'échantillon comme par exemple des acides aminés aromatiques, des dérivés du pyridoxyle ou de la chlorophylle ou encore des flavines. Les fluorophores extrinsèques sont utilisés pour donner de la fluorescence à un échantillon qui n'en produit pas ou pour en changer les propriétés spectrales. On peut citer par exemple la fluorescéine, la rhodamine ou le pyrène (Lakowicz 2006).

2.2.2. La sonde Laurdan

Dans cette étude, la compacité des lipides des membranes a été évaluée en utilisant la sonde fluorescente Laurdan. Cette molécule, synthétisée en 1979 par Weber et Farris (A. T. Jones and Sayers 2012; Weber and Farris 1979) n'interagit pas avec les composants des membranes lipidiques à la différence des autres molécules alors utilisées.

La fluorescence du Laurdan provient de la présence d'un groupe naphthalène. Une chaîne acyle de 10 carbones est greffée sur ce groupe (Figure 87).

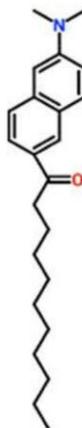


Figure 87. Structure du Laurdan.

2.2.3. Le Cholestérol-Pyrène

La fluorescence du pyrène (Figure 88) a été utilisée pour l'étude des modèles membranaires, des membranes biologiques et de cellules entières, et tout particulièrement pour l'étude de la microviscosité membranaire et des transitions des bicouches lipidiques.

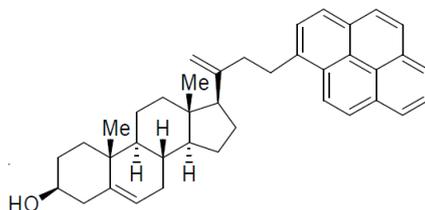
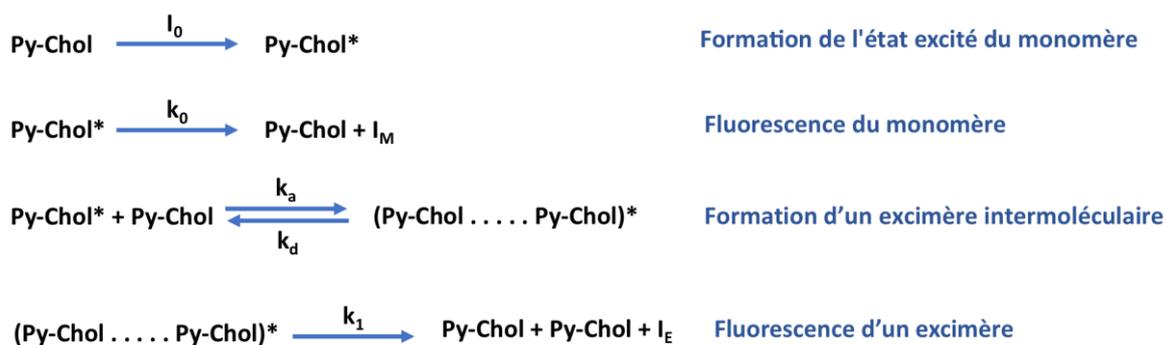


Figure 88. Représentation de la sonde Py-Met-Chol. Le pyrène est la partie composée de quatre anneaux aromatiques à droite.

Quand deux ou plusieurs molécules de pyrène s'approchent suffisamment, le pyrène peut former des excimères intermoléculaires (Parker 1968). Quand une molécule de pyrène dans un état excité entre en contact avec une deuxième molécule de pyrène stable, il peut former un excimère.

Lorsque l'excimère se désactive par émission de fluorescence, une large bande dont le maximum se situe autour de 480 nm est observée. Cette bande est très différente de celles obtenues par l'émission du monomère de pyrène. En effet celui-ci émet entre 365

et 420 nm avec une forme caractéristique. Le mécanisme de formation d'excimères du pyrène est schématisé sur la Figure 89.



Py-Chol : Cholestérol-pyrène ;

Py-Chol* : Cholestérol-pyrène excité (monomère) ;

(Py-Chol ... Py-Chol)* : excimère;

I_0 : lumière absorbée;

I_M et I_E : intensités de fluorescence du monomère et de l'excimère;

k_0 et k_1 : constantes de réaction liées au déclin radiatif du monomère et de l'excimère excités;

k_a et k_d : constantes d'association et de dissociation de l'excimère.

Figure 89. Mécanisme de fluorescence et de la formation d'excimères intermoléculaires du pyrène (cholestérol-pyrène utilisé dans cette étude).

Des processus non radiatifs peuvent désactiver les états excités Py-Chol^* et $(\text{Py-Chol} \dots \text{Py-Chol})^*$.

L'excimère $(\text{Py-Chol} \dots \text{Py-Chol})^*$ est un un complexe présent uniquement à l'état excité. La vitesse de formation de ce complexe est déterminée par la diffusion latérale d'un pyrène à l'état excité et de son rapprochement avec un pyrène à l'état fondamental. Ainsi sa formation est très influencée par la viscosité du milieu (Parker 1968).

Les excimères peuvent apparaitre sous différentes formes. Un monomère donné A_1 peut s'associer à n'importe lequel des complexes déjà formés parmi les A_i molécules présentes. Les espèces $A_1, A_2, A_3 \dots A_n$ correspondent aux différents états d'agrégation des molécules de l'espèce chimique A, soit : des monomères, dimères, trimères... n-mères.

Coefficient de diffusion du pyrène dans les bicouches lipidiques

Le coefficient de diffusion moyen peut être obtenu en mesurant les intensités de fluorescence de Py-Chol* et de (Py-Chol ... Py-Chol)*. En effet, comme nous l'avons rappelé, la réaction de Py-Chol* avec Py-Chol dépend de la viscosité du milieu. Moins le milieu est visqueux, plus la vitesse de rapprochement de Py-Chol vers Py-Chol* augmente et ainsi la désactivation de Py-Chol* par Py-Chol sera importante.

La durée de vie de la fluorescence du pyrène est assez grande pour permettre la formation d'excimères à des concentrations relativement faibles. La durée de vie de l'état excité est dépendente du rapport des concentrations entre les lipides membranaires et le pyrène.

Les coefficients de diffusion latérale dans les bicouches lipidiques peuvent ainsi être obtenus grâce au pyrène en utilisant le déclin de fluorescence (Dembo et al. 1978; Vanderkooi et al. 1975), les rapports d'intensité entre les excimères et les monomères (Galla et al. 1979) ou l'inhibition de fluorescence (Viallet, Serrou, and Rosenfeld 1985).

L'émission d'excimères du pyrène a été appliquée essentiellement à des membranes érythrocytaires (Donner, Andre, and Bouchy 1980; Schachter, Cogan, and Abbott 1982) ou à d'autres systèmes tels que les suspensions mitochondriales (Vekshin 1987), les lymphocytes (Kido et al. 1980) ou la membrane plasmique du foie de rat (Luly, Crifo and Strom 1979).

La fluorescence du pyrène a été utilisée pour étudier les interactions entre le virus de stomatite vésiculaire et des membranes synthétiques (Pal, Barenholz, and Wagner 1988) ou encore les échanges spontanés des phospholipides entre les deux bicouches de la membrane (Roseman and Thompson 1980).

La spectroscopie d'absorption et d'émission du pyrène

Les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence du pyrène monosubstitué (cas du Py-met-chole) sont similaires à ceux du pyrène. La Figure 90 présente le signal de fluorescence du pyrène alors que la Figure 91 présente les spectres d'absorption et d'émission de la sonde Py-met-chole dans du dioxane. On peut y observer les bandes

vibrationnelles des trois transitions électroniques des états singulets excités ($S_0 \rightarrow S_1$, $S_0 \rightarrow S_2$ et $S_0 \rightarrow S_3$).

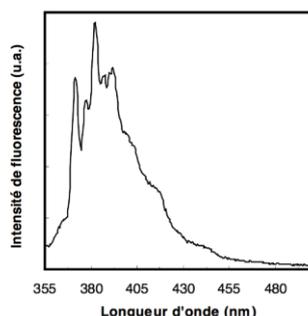


Figure 90. Spectre de fluorescence du pyrène 1 μ M dans du cyclohexane à 25°C. Excitation à 330 nm.

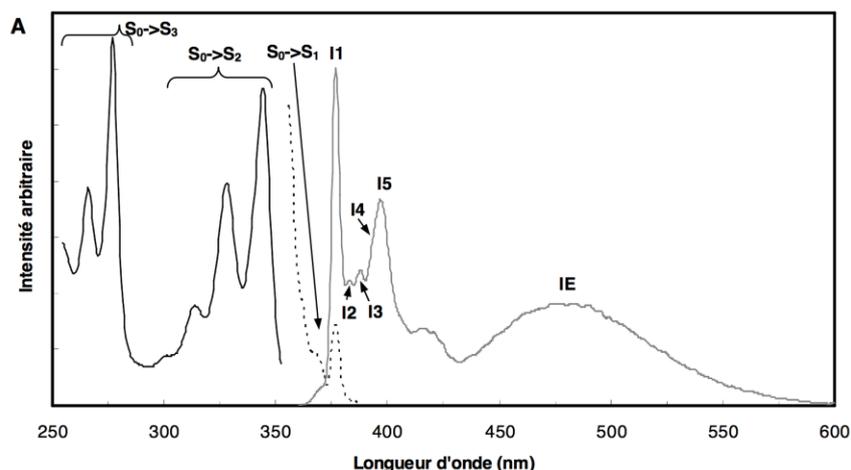


Figure 91. Spectres d'absorption (noir) et d'émission de fluorescence (gris) du Py-met-Chol 1 mM dans du dioxane à température ambiante. Le spectre d'absorption entre 353-389 nm (pointillé) est amplifié 10 fois (extrait de (Laurent Le Guyader 2007)).

Comme pour le pyrène, le spectre d'émission de fluorescence du cholestérol-pyrène possède différentes bandes vibrationnelles qui sont relatives aux désexcitations radiatives entre le premier état singulet excité et l'état fondamental du monomère de pyrène ($S_1 \rightarrow S_0$) et ses niveaux d'énergie vibrationnelles ν (Figure 91).

Seuls 5 pics résultant des 16 bandes vibroniques recensées dans le spectre du monomère du cholestérol-pyrène sont assez résolus (Kalyanasundaram and Thomas 1976). Ce sont les pics suivants : I_1 (~ 376 nm), I_2 (~ 384 nm), I_3 (~ 388 nm), I_4 (~ 393 nm) et I_5 (~ 399 nm).

L'intensité de la bande de plus haute énergie en fluorescence I_1 (transition radiative $S_1 \nu = 0 \rightarrow S_0 \nu = 0$ ou $0 - 0$) et qui coïncide avec la bande de la plus basse énergie en absorption (Bree and Vilkos 1964), varie avec la polarité (A. Nakajima 1976). Plus le solvant est polaire plus la structure vibrationnelle du spectre est perturbée (Kalyanasundaram and Thomas 1977). Kalyanasundaram et al. ont également remarqué, en utilisant 39 solvants différents, que la bande I_1 est celle qui présente la variation d'intensité la plus importante. La bande I_3 (transition radiative $S_1 \nu = 0 \rightarrow S_0 \nu = 2$ ou $0 - 2$) est beaucoup moins sensible. Ce qui impacte le plus les variations des bandes sont les interactions soluté-solvant de type dipôle-dipôle à l'état excité. En effet, ces interactions agissent sur la symétrie de la molécule ce qui a pour effet d'augmenter l'intensité de la bande I_1 . Des comportements semblables ont été observés pour des dérivés du pyrène comme le 1-méthylpyrène. Karpovitch et Blanchard (Karpovich and Blanchard 1995) ont montré que les variations d'intensité de la bande I_1 sont causées par un couplage vibrationnel entre l'état excité faiblement autorisé S_1 et l'état excité fortement permis S_2 . Ainsi la mesure du ratio d'intensité I_1/I_3 pourrait servir à évaluer la polarité de l'environnement du pyrène ou de ses dérivés dans des membranes.

En étudiant les durées de vie de fluorescence de l'excimère dans des liposomes de DODAC (chlorure de diestéaryldiméthylammonium) il a été montré (Pansu et al. 1993) que la probabilité d'avoir des excimères est plus importante si la concentration locale en pyrène augmente. En outre, l'intensité de la bande excimère I_E est d'autant importante que la probabilité de former des excimères est grande. La mesure du rapport I_E/I_3 dans des membranes permettrait ainsi d'avoir une information sur la diffusion du pyrène (dans le cas où la bande I_3 serait proportionnelle à la concentration en sonde). La formation d'excimères nécessite que les deux molécules de pyrène soient parallèles et proches d'environ 0,4 nm (F. Winnik 1993). C'est pourquoi la formation d'excimères est régulièrement observée dans les membranes. Les propriétés du pyrène ont permis de mesurer la diffusion latérale et transversale du 1-palmitoyl-2-pyrènedécanoyle-phosphatidylcholine et de l'acide pyrène-décanoïque dans des liposomes. De même les températures de transition de phase gel \rightarrow fluide ont également pu être déterminées (Galla and Hartmann 1980).

Solubilité dans les membranes modèles de phospholipides

Sensibilité du groupement pyrène à la polarité de l'environnement

Le solvant influe sur la vitesse des réactions, sur la position d'un équilibre chimique ou encore sur la position et la largeur des bandes spectrales.

Cela fait que les états fondamental et excité d'un fluorophore sont plus ou moins stabilisés par les molécules du solvant. Les interactions entre les molécules de soluté et de solvant sont déterminées par les moments dipolaires des molécules et par leur polarisabilité. Les interactions entraînées par la polarisabilité des molécules sont des interactions de type dipôle-dipôle induit. On rappelle que la polarisabilité consiste en la création d'un moment dipolaire induit (et temporaire) dans une molécule par une autre molécule. La polarité reflète tous les types d'interaction entre les molécules de solvant et de soluté. Ainsi, il existe diverses grandeurs pour caractériser la polarité (Laurent Le Guyader 2007).

Tab. 7.4. Solvent dependence of the ratio I_1/I_{III} of the fluorescence intensities of the first and third vibronic bands in the fluorescence spectrum of pyrene.

<i>Solvent</i>	<i>Dielectric constant</i>	<i>Py scale I_1/I_{III}^{a)}</i>
n-Hexane	1.89	0.58
Cyclohexane	2.02	0.58
Benzene	2.28	1.05
Toluene	2.38	1.04
Chloroform	4.80	1.25
Ethyl acetate	6.02	1.37
Acetic acid (glacial)	6.15	1.37
Tetrahydrofuran	7.6	1.35
Benzyl alcohol	13.1	1.24
Ethanol	25.1	1.18
Methanol	33.6	1.35
N,N-Dimethylformamide	36.7	1.81
Acetonitrile	37.5	1.79
Dimethyl sulfoxide	46.7	1.95

a) Data from Dong and Winnik, 1984.

Tableau 9. Valeurs dans un ordre croissant des rapports de fluorescence I_1/I_3 du pyrène dans différents solvants (extrait de (Laurent Le Guyader 2007)).

Effet de la polarité sur les bandes vibroniques

Les intensités des bandes vibroniques peuvent être fortement impactées par la polarité du solvant connu sous le nom d'effet Ham (Akira Nakajima 1971). En effet dans des

molécules telles que le benzène, le pyrène, le naphthalène ou encore le triphénylène, la transition de plus basse énergie ($S_0 \rightarrow S_1$) peut être interdite pour des raisons de symétrie, ces molécules étant aromatiques et présentant un haut degré de symétrie.

Comme nous l'avons rappelé précédemment, les spectres de fluorescence du pyrène permettent d'estimer la polarité des solvants en mesurant le rapport des intensités des bandes I_1/I_3 . Dans les composés hydrocarbonés ce rapport varie d'environ 0,6 et de 2 dans le diméthylsulfoxyde. Ces valeurs permettent de constituer une échelle de polarité, l'échelle Py (Valeur 2001). La Figure 92 illustre ces variations spectrales du pyrène pour divers solvants (Kalyanasundaran and Thomas 1977).

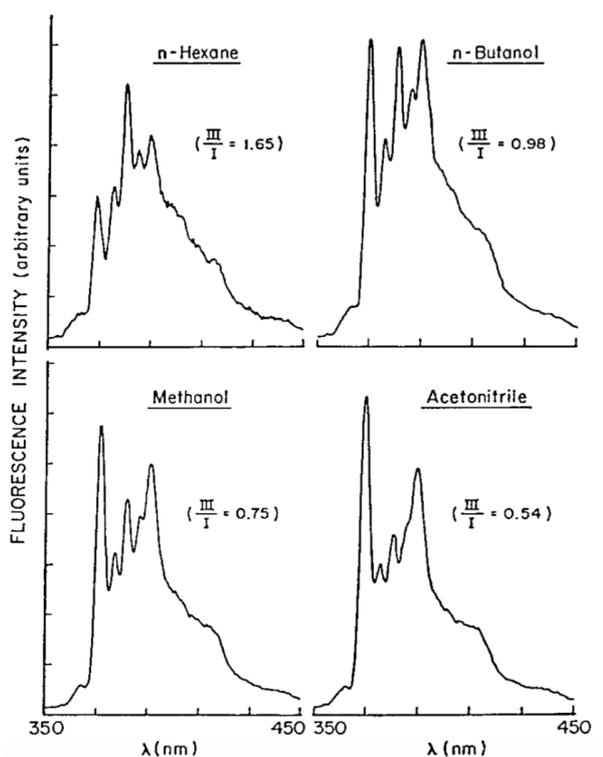


Figure 92. Spectres de fluorescence du pyrène dans l'hexane, le n-butanol, le méthanol et l'acétonitrile montrant l'influence de la polarité du solvant sur les intensités des bandes (longueur d'onde d'excitation 310 nm) (extrait de (Kalyanasundaran and Thomas 1977)).

Le Guyarder et al. ont montré que le cholestérol et le Py-met-chol ont un comportement membranaire très proche pour des concentrations faibles (typiquement en-dessous de 5 mol%). En effet, l'augmentation de la concentration en stérols dans une membrane entraîne une chute de la température de transition et la disparition de la pré-transition

par DSC (Figure 93.). Dans le cadre de cette thèse, les concentrations utilisées sont donc 1,8 mol% et 3,6 mol%. La réponse de la sonde Py-met-chol permet d'étudier l'environnement du cholestérol dans les membranes biologiques naturelles et les membranes modèles. Elle permet d'accéder à la distribution latérale du cholestérol.

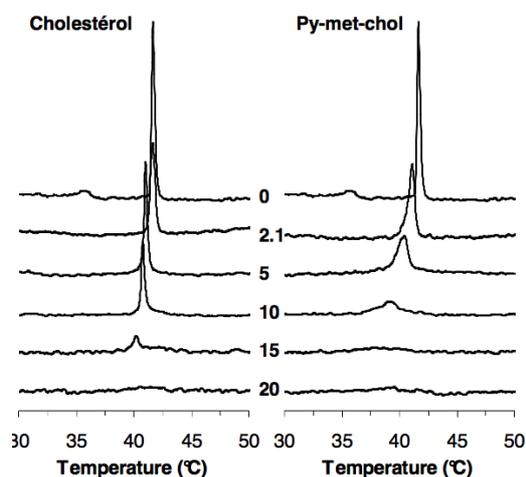


Figure 93. Étude comparative de DSC sur des suspensions de MLV de DPPC contenant 0 ; 2,1 ; 5 ; 10 ; 15 et 20 mol% de cholestérol ou de Py-met-chol (Laurent Le Guyader, Le Roux, Maze, et al. 2007).

2.2.3. La sonde fluorescente NBD

Pour choisir le fluorophore adapté pour étudier l'internalisation des CPP, il est important de tenir compte des longueurs d'ondes d'absorption et d'émission des acides aminés. Le fluorophore doit avoir des spectres d'absorption et d'émission qui ne chevauchent pas ceux des acides aminés.

La sonde NBD (4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole) (Figure 94) est couramment utilisée pour faire des études de fluorescence. Selon la littérature, les positions des principales raies des spectres d'absorption et d'émission du NBD sont respectivement d'environ 470 nm et 540 nm et dépendent de l'acide aminé auquel il est lié. Ces longueurs d'onde conviennent pour faire des études de fluorescence puisqu'elles ne se superposent pas à celles des acides aminés.

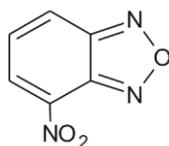


Figure 94 Structure de la sonde NBD.

2.3. La fluorescence comme outil d'investigation de la fluidité et de l'ordre membranaire

L'état de la compacité des lipides des vésicules lipidiques (LUV) formées en présence ou en absence de la molécule d'intérêt a été évalué en utilisant la sonde fluorescente Laurdan, et aussi, par la mesure de l'anisotropie du cholestérol pyrène.

2.3.1. Par fluorescence de la sonde Laurdan

Le Laurdan est une molécule fluorescente qui permet d'évaluer l'ordre dans les membranes. Il a la propriété d'avoir une fluorescence sensible à la polarité de son environnement et donc au degré d'hydratation des membranes (Jameson and Weber 1998). Sa fluorescence provient d'un groupement naphthalène qui est rattaché à une chaîne acyle de 10 carbones.

Cette chaîne acyle qui s'insère dans les bicouches lipidiques, permet au Laurdan de s'ancrer dans les membranes dans les phases gel et liquide. Les propriétés de fluorescence du Laurdan ainsi que son ancrage profond permettent d'évaluer la compacité au niveau des chaînes alcyle des membranes lipidiques.

Quand le Laurdan est excité, le dipôle s'accroît ce qui provoque une réorientation des dipôles des molécules d'eau autour du naphthalène. Le spectre d'émission de la sonde se décale alors vers le rouge. Ce décalage vers le rouge est d'autant plus important que l'accessibilité au solvant est importante.

Le Laurdan, excité à 360 nm, a deux longueurs d'onde d'intensité maximales d'émission (435 nm et 490 nm) relatives à une organisation de la membrane en phase gel pour 435 nm et à une organisation en phase liquide pour 490 nm. Parasassi et Gratton ont alors introduit le paramètre appelé Polarisation Généralisée (**GP**) (Parasassi and Gratton 1995) défini par :

$$GP = \frac{I_B - I_R}{I_B + I_R}$$

avec I_B et I_R étant les intensités de fluorescence respectivement dans le « bleu » et le « rouge » (435 et 490 nm). La valeur de GP varie d'une valeur maximale positive 1 qui dépend des hypothèses du modèle utilisé (pas d'effet de solvant, membrane en phase gel, très ordonnée) à une valeur négative minimale -1 (exposition complète à l'eau de l'environnement, membrane fluide, désordonnée) (Sanchez et al. 2007).

2.3.2. Par fluorescence polarisée :

Lorsqu'un fluorophore est excité par une lumière polarisée, il absorbe préférentiellement les ondes lumineuses dont le vecteur de polarisation est parallèle à son moment de transition dipolaire d'absorption. Il y a donc une photosélection quand une molécule est éclairée par une lumière polarisée. L'orientation des photons émis dépend aussi du moment dipolaire de la molécule ce qui fait que l'émission de fluorescence peut devenir anisotrope. La dépolarisation de fluorescence trouve son origine dans plusieurs mécanismes dont l'importance dépend du système étudié. Cependant, la principale cause de dépolarisation est la rotation par diffusion des fluorophores (Figure 95). En raison du mouvement brownien des molécules en solution, le système revient petit à petit dans un état isotrope.

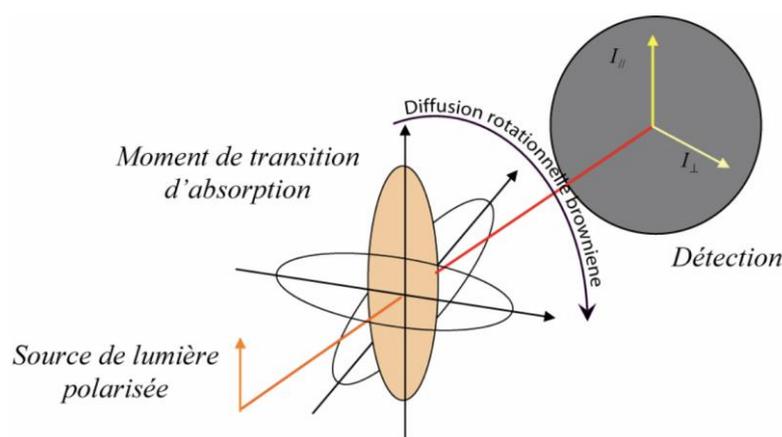


Figure 95. Effet de la rotation par diffusion sur la polarisation de la lumière.

En observant l'émission de fluorescence avec un polariseur, la quantité de molécules orientées suivant l'axe du polariseur peut être déterminée. Une mesure de polarisation de fluorescence consiste donc à exciter une molécule par une lumière polarisée et à observer l'émission le long des axes parallèle et perpendiculaire à la direction de polarisation de l'excitation.

Le degré de polarisation P et l'anisotropie r d'une molécule fluorescente sont définis par les relations :

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$$

Équation 1

et

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

Équation 2

avec I_{\parallel} et I_{\perp} l'intensité de fluorescence respectivement suivant l'axe parallèle et l'axe perpendiculaire à la direction de polarisation de l'excitation.

Ces rapports dépendent de la vitesse de réorientation des molécules en solution et donc l'anisotropie évolue avec le temps. L'anisotropie $r(t)$ en fonction du temps s'écrit :

$$r(t) = \frac{2}{5} e^{\frac{-t}{\theta_r}} \left(\frac{3 \cos^2 \xi - 1}{2} \right)$$

Équation 3

avec θ_r le temps de corrélation rotationnel de la molécule en solution, et ξ l'angle que font les moments de transition dipolaire, d'absorption et d'émission du chromophore.

Soit r_0 la polarisabilité que peut présenter la molécule :

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3 \cos^2 \xi - 1}{2} \right)$$

Équation 4

L'équation 3 peut alors s'écrire de la façon suivante :

$$r(t) = r_0 e^{\frac{-t}{\theta_r}}$$

Équation 5

r_0 est une propriété intrinsèque de la molécule, elle dépend de la valeur de ξ . Si les moments de transition d'absorption et d'émission sont parallèles ($\xi = 0^\circ$) ou perpendiculaires ($\xi = 90^\circ$), r_0 varie alors entre 0,4 et -0,2.

Dans le cas d'une sphère, le temps de corrélation θ_r est inversement proportionnel à la viscosité η du système, comme le montre l'Équation 6 :

$$\frac{1}{\theta_r} \propto \frac{k_B T}{8\pi\eta R^3}$$

Équation 6

avec :

- T la température,
- η la viscosité du milieu,
- R le rayon de la sphère,
- k_B la constante de Boltzman.

Cette équation montre qu'il est possible d'obtenir une information sur la viscosité du système car on peut mesurer le coefficient d'anisotropie $r(t)$.

Dans notre cas, nous avons analysé l'anisotropie de la sonde Cholestérol-Pyrène dans des membranes de différentes compositions lipidiques.

2.4. Mise en œuvre des techniques de spectroscopie de fluorescence :

2.4.1. Matériel utilisé :

Les mesures de fluorescence ont été réalisées avec un fluorimètre JASCO (modèle FP-8300 (Figure 96).

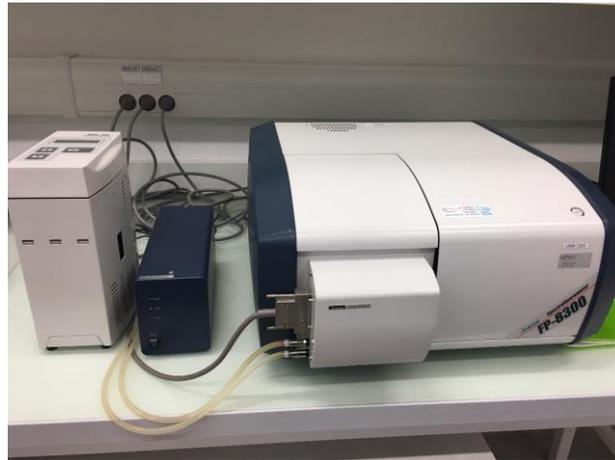


Figure 96. Fluorimètre JASCO.

2.4.2. Détails de l'expérience de fluorescence du Laurdan

La sonde Laurdan (Figure 97.B) a été utilisée afin d'étudier l'effet de la pénétratine sur la compacité des lipides dans la membrane.

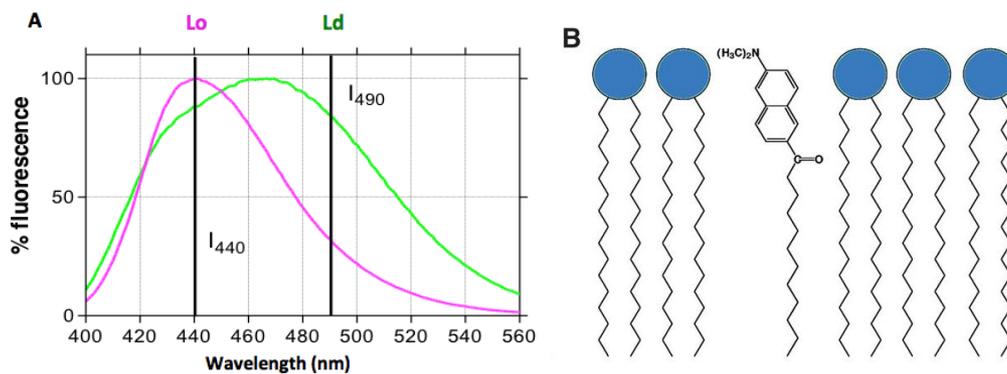


Figure 97. (A) Spectres d'émission du Laurdan. (B) Structure et orientation de la molécule de Laurdan à l'intérieur de la membrane.

La Figure 97.A présente le spectre d'émission du Laurdan dans deux conditions différentes. La courbe violette présente le pic d'émission d'une phase compacte (gel ou liquide très organisée), tandis que la courbe verte présente le pic d'émission d'une phase liquide désorganisée.

La longueur d'onde d'excitation a été fixée à 365 nm avec une bande passante de 5 nm. Pour les mesures des spectres d'émission, la largeur de bande passante a été fixée à 2,5 nm. Le spectre d'émission a été mesuré entre 400 et 650 nm en présence et en l'absence de pénétratine avec différents ratios molaires pénétratine/lipide (1/10 et 1/25) sur des

LUV de DMPC et DMPC/DMPG (9/1) contenant du Laurdan à 0,5 % mol. La température du système était contrôlée par un dispositif à effet Peltier.

La valeur du coefficient GP pour le Laurdan a été mesurée dans des LUV de différentes compositions lipidiques à une concentration de 110 µM.

La compacité de la membrane est analysée en calculant la valeur de GP grâce à l'équation :

$$GP = \frac{(I_{430} - I_{485})}{(I_{430} + I_{485})}$$

Dans cette équation, I_{430} et I_{485} représentent, respectivement, l'intensité de la raie située à 430 nm et 485 nm.

Et la variation ΔGP liée à la modification de GP en présence de pénétратine a été définie comme suit :

$$\Delta GP = GP_{avec\ pénétратine} - GP_{initial}$$

L'interaction de la pénétратine a donc été étudiée avec des membranes DMPC et DMPC/DMPG (rapport 9/1 avec DMPG qui apporte une charge négative) organisés en différentes phases :

T = 9°C	T=15°C	T=30°C
Phase gel	Phase gel ondulée	Phase liquide

En présence de DMPG, la charge négative augmentant l'affinité de la pénétратine avec la membrane, l'effet de la pénétратine sur la compacité est donc plus important.

2.4.3. Détails de l'expérience avec le Cholestérol-Pyrène

Les spectres d'émission ont été mesurés de 360 à 600 nm en utilisant une longueur d'onde d'excitation à 335 nm. Les bandes passantes d'excitation et d'émission ont été fixées à 5 nm et 2,5 nm respectivement. 140 µL de tampon contenant 10 µL de LUV (0,25 mg/mL) ont été ajoutés dans une cellule Hellma en quartz de haute précision. La

température est régulée par un dispositif à effet Peltier. Les spectres ont été obtenus en dupliquant les mesures et en réalisant leur moyenne, et le tampon a été soustrait. Les spectres ont ensuite été normalisés par l'intégrale.

L'anisotropie de fluorescence a été caractérisée en utilisant la relation :

$$r = \frac{I_{VV} - G I_{VH}}{I_{VV} + 2G I_{VH}}$$

dans laquelle le facteur de correction G défini par le rapport $\frac{I_{HV}}{I_{HH}}$ a été déterminé pour toutes les longueurs d'onde, et les intensités I_{VV} et I_{VH} sont les intensités d'émission avec des polariseurs dans différentes configurations (excitation-émission : V pour Vertical et H pour Horizontal, le 1er et le 2ème indices correspondent respectivement à l'orientation du polariseur à l'excitation et à l'émission) .

2.4.4. Internalisation des peptides dans des LUV

L'émission de fluorescence des peptides marqués au NBD ont été enregistrés à 555nm à la température de 35°C ou 50°C, contrôlée par un dispositif Peltier associé à un bain de mini-circulation JASCO MCB-100. Une lampe au xénon a été utilisée comme source d'excitation à 460 nm et les largeurs des bandes passantes d'excitation et d'émission ont été réglées à 5 nm. Pour éviter l'adsorption des peptides sur les parois de la cuve, des cuvettes en polystyrène ont été utilisées. Pendant les mesures, les solutions ont été agitées avec un barreau magnétique tournant à 800 rpm.

Pour les expériences d'internalisation, des LUV non marqués (10 μ M) ont été utilisés avec des CPP marqués avec du NBD (Figure 98.) à une concentration de 0,1 μ M.

Pour mesurer l'internalisation des peptides (R9, RW9 et pénétratine) dans des LUV, des peptides ont été incubés avec les LUV à 35°C ou 50°C pendant 5 min, 1h ou 3h. Les LUV ont été préparés comme nous l'avons expliqué dans ce chapitre. Les LUV étudiés pour l'internalisation sont : PC d'œuf pour mimer une phase liquide désordonnée, SM/Chol pour mimer une phase liquide ordonnée et PC/SM/Chol pour mimer une membrane avec coexistence de phases ordonnée et désordonnée. Pour ces expériences le rapport P/L est égal à 1/100.

Pour quantifier le peptide internalisé dans les LUV, nous avons utilisé le protocole décrit par (J. M. Swiecicki et al. 2015). Nous effectuons une réduction du NBD par addition de dithionite à 20°C pour éliminer la fluorescence des peptides non internalisés dans les LUV. Ensuite, la mellitine est ajoutée pour provoquer l'accès du dithionite à l'intérieur des vésicules et donc mesurer la perte de fluorescence des peptides vraiment internalisés. La fluorescence résiduelle correspond donc à des peptides restant associés aux membranes et protégés de l'action du dithionite (de Oliveira et al. 2017). Le schéma Figure 98. ci-dessous montre le protocole de l'expérience.

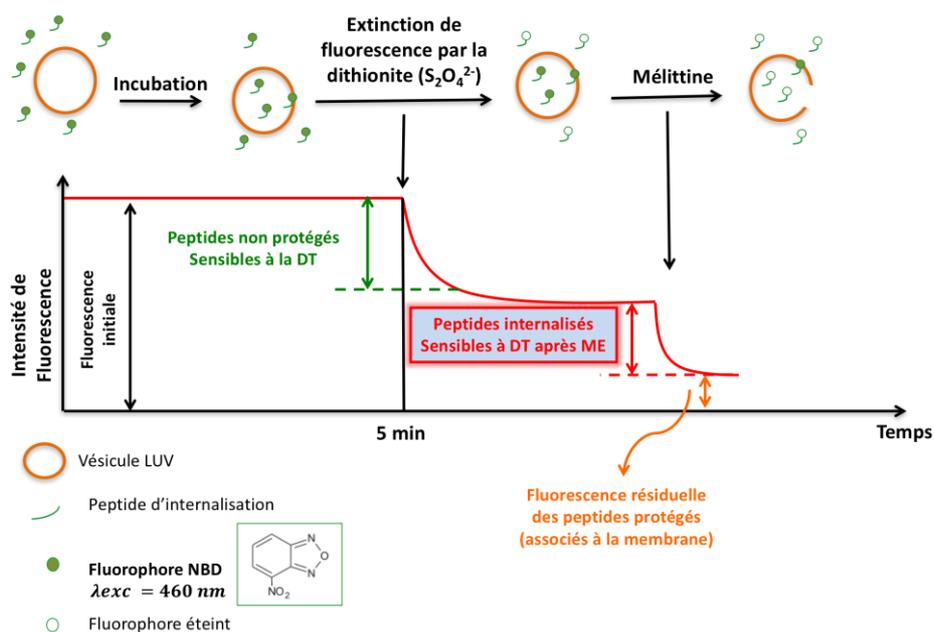


Figure 98. Schéma pour le protocole d'internalisation utilisé pour l'internalisation de peptides dans les LUV.

3. Diffraction des rayons-X

3.1. Introduction

Les expériences de diffraction aux grands angles (WAXD pour *Wide Angle X-Ray Diffraction*) et aux petits angles (SAXD pour *Small Angle X-Ray Diffraction*) présentées dans cette thèse ont été réalisées avant mon arrivée au laboratoire par le Dr Antonin Lamazière. Cependant, comme elles sont nécessaires pour comprendre la démarche de mes propres expériences et pour en analyser les résultats, ces techniques sont présentées en Annexe B.

3.2. Détails des expériences

Les expériences de diffraction (SAXD et WAXD) ont été effectuées au Synchrotron Radiation Source de Spring8 (Japon). Le but était d'étudier les effets de la pénétratine sur la séparation de phases des phospholipides et sur la stabilité thermique de la membrane. Les échantillons ont été préparés en dissolvant les lipides dans un mélange de chloroforme et méthanol (ratio 2/1 en volume). Le solvant organique a été évaporé sous un flux d'azote gazeux sans oxygène à 45°C, les dernières traces de solvant ont été éliminées en conservant les échantillons sous un vide secondaire pendant 2 jours à 20°C (Tessier et al. 2009).

Ensuite, les échantillons (20 μ L) ont été déposés entre deux fines fenêtres de mica et adaptés sur un système de contrôle de température, afin d'effectuer des mesures de 5°C à 45°C. Le temps d'exposition des échantillons a été fixé à 30 secondes afin d'obtenir des images de diffraction de bonne qualité. Les distances séparant les têtes des lipides de deux feuillettes de la membrane (épaisseur de la membrane) sont obtenues par SAXD et celles séparant les têtes polaires sur le plan de la membrane le sont par WAXD. Ces distances ont été déterminés à partir de l'intégration circulaire des images 2-D en utilisant le programme FIT 2D (programme développé par Andy Hammersley). Le béhénate d'argent a été utilisé pour étalonner l'axe des abscisses (en nm⁻¹). L'analyse des pics de diffraction a été réalisée avec les logiciels *Origin* et *PeakFit*.

Les membranes MLV utilisées pour ces expériences étaient constituées de :

- PC ;
- PC/PG (9/1) ;
- SM/Chol (1/1) ;
- SM/Chol/PG (4/5/1) ;
- PC/SM/Chol (1/1/1).

Afin de voir les effets de la pénétratine sur l'organisation des membranes, les expériences ont été réalisées en son absence et en sa présence.

4. Calorimétrie différentielle

4.1. Généralités

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC pour *Differential Scanning Calorimetry*) est une technique utilisée pour déterminer les paramètres thermodynamiques associés aux transitions de phase comme celles que l'on rencontre dans les membranes lipidiques. Cette technique permet de voir l'influence des peptides tels que les CPP (Bechara et al. 2013; Witte et al. 2013) et les peptides antimicrobiens (Mecke et al. 2005) sur des membranes modèles.

L'appareil de DSC comprend deux cellules et elles sont soumises à un gradient linéaire de température. La première, dans laquelle est placé le tampon pour l'expérience, sert de référence alors que dans la seconde se trouve l'échantillon. Quand a lieu une transition de phase qui peut être endothermique ou exothermique, il y a une absorption ou un dégagement de chaleur de la part de l'échantillon.

Ces transitions de phases provoquent alors une différence de température entre les cellules. C'est la différence de puissance calorifique (fournie par l'appareil) nécessaire pour compenser cet écart de température qui est représentée sur les thermogrammes.

Les transitions de phase des lipides varient avec leur structure. Grâce à la DSC, il est possible d'obtenir les températures de transition de phase des lipides ainsi que les variations d'enthalpie associées à ces transitions en présence de peptides (Figure 99).

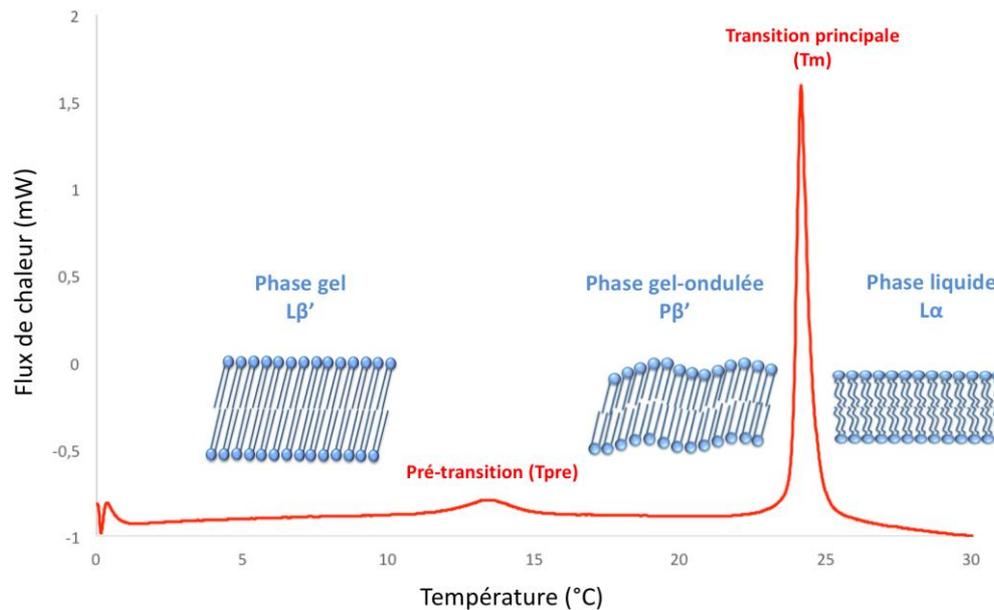


Figure 99. Thermogramme exothermique typique observé pour des transitions de phases lipidiques où les signaux de pré-transition (T_{pre}) et de transition principale (T_m) sont observés.

L'un des avantages de la DSC est que cette technique permet d'observer les températures auxquelles ont lieu les transitions de phase, de déterminer leur enthalpie de réaction ainsi que la coopérativité de la transition de phase. Cependant, il est nécessaire d'avoir des concentrations élevées en peptides et en lipides. En outre la sensibilité est limitée par le type de lipides puisque la température principale de transition T_m des bicouches lipidiques d'intérêt biologique en suspension aqueuse doit être supérieure à 0°C.

4.2. Détails de l'expérience

Les mesures de calorimétrie ont été effectuées sur un calorimètre à balayage différentiel à haute sensibilité (*Calorimetry Sciences Corporation, CSC*) et, également, sur un calorimètre Mettler-Toledo DSC 822.

La vitesse de balayage utilisée était de 1°C/min. Nous avons réalisé des balayages en montée de température (10°C à 55°C) et en refroidissement (55°C à 10°C). À chaque démarrage de balayage, un maintien de 10 minutes était fixé afin d'arriver à l'équilibre

thermique. La concentration totale de lipides utilisée est de 1 mg/ml pour le calorimètre CSC et de 2 mg/40 μ L pour le calorimètre DSC 822.

Pour le calorimètre CSC au moins trois balayages en chauffage et en refroidissement ont été réalisés.

6. Analyse statistique multivariée

Afin d'analyser les différences spectrales obtenues lors des expériences réalisées, nous avons utilisé une méthode s'appuyant sur l'analyse en composantes principales (ACP) à l'aide du logiciel SIMCA® (*Soft Independent Modelling of Class Analogy*).

SIMCA® est un logiciel d'analyse multivariée. Il permet de déterminer des relations entre les variables et les échantillons et de distinguer des groupes et des tendances avec une interface graphique. Dans le cadre de cette thèse, SIMCA a été utilisé afin de déterminer les longueurs d'ondes du spectre du cholestérol-pyrène qui apportent des informations sur l'organisation de la membrane.

L'Analyse en Composantes Principales (ACP)

L'Analyse en Composantes Principales a été développée et formalisée en 1933 par Hotelling (Hotelling 1933). Son principal but est de simplifier et de réduire des données à X_n variables initiales corrélées, en une nouvelle série de données avec un plus petit nombre de variables qui ne sont pas corrélées. Ce sont les composantes principales (CP_n). Ces composantes sont des combinaisons linéaires des variables initiales.

Soft Independent Modelling of Class Analogy (SIMCA)

SIMCA® est une méthode statistique descriptive supervisée de classement de données développée par Wold et al en 1976 (Wold 1976) et qui est basée sur l'analyse en composantes principales. Il nécessite un ensemble de données de calibration où

l'appartenance de chaque objet à une classe est définie au préalable. L'hypothèse de base est que la principale variabilité systématique qui caractérise les échantillons d'une classe, peut être analysée par un modèle obtenu avec une ou plusieurs composantes principales de dimensionnalité. Pour chaque classe, SIMCA génère un modèle.

Soit X_A la matrice qui correspond aux données des échantillons du groupe A. A partir de X_A SIMCA suppose que l'information importante en termes de similarité à travers les échantillons de cette classe, peut être obtenue avec un modèle en composantes principales à N composantes selon l'équation suivante :

$$X_A = T_A P_A + E_A$$

où T_A et P_A sont respectivement les matrices des *scores* et des *loadings* obtenus sur les N composantes des échantillons du groupe A et E_A la matrice contenant les résidus non modélisés de X_A .

Une fois la décomposition calculée par l'ACP, les résultats sont utilisés pour définir le modèle de la classe en question (Figure 100.).

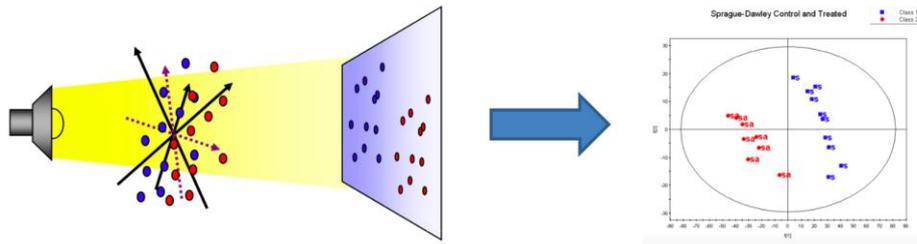


Figure 100. Décomposition en composantes principales et sa projection.

Références

- Alcala, J. R., E. Gratton, and F. G. Prendergast. 1987. "Fluorescence Lifetime Distributions in Proteins." *Biophysical Journal* 51(4): 597–604.
- Bechara, Chérine et al. 2013. "Tryptophan within Basic Peptide Sequences Triggers Glycosaminoglycan-Dependent Endocytosis." *The FASEB Journal* 27(2): 738–49. <http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.12-216176>.
- Bree, A, and V V B Vilkos. 1964. "Assignment of the {Two} {Lowest} {Singlet} {States} of {Pyrene}." *The Journal of Chemical Physics* 40(10): 3125–26. <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/jcp/40/10/10.1063/1.1724968>.
- Casey, Kelly G., and Edward L. Quitevis. 1988. "Effect of Solvent Polarity on Nonradiative Processes in Xanthene Dyes: Rhodamine B in Normal Alcohols." *The Journal of Physical Chemistry* 92(23): 6590–94. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100334a023>.
- Dembo, Micah, Victor Glushko, Mary Aberlin, and Martin Sonenberg. 1978. "A Method for Measuring Membrane Microviscosity." *Biochimica et biophysica acta* 522: 201–11.
- Diaspro, a, a Diaspro, M Robello, and M Robello. 2000. "Two-Photon Excitation of Fluorescence for Three-Dimensional Optical Imaging of Biological Structures." *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 55(1): 1–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10877060>.
- Donner, M., J Andre, and M Bouchy. 1980. "Kinetics of Partly Diffusion Controlled Reactions." *Biochemical and biophysical research communications* 97(3): 1183–91.
- Fushimi, K., and A. S. Verkman. 1991. "Low Viscosity in the Aqueous Domain of Cell Cytoplasm Measured by Picosecond Polarization Microfluorimetry." *Journal of Cell Biology* 112(4): 719–25.
- Galla, H. J., and W. Hartmann. 1980. "Excimer-Forming Lipids in Membrane Research." *Chemistry and Physics of Lipids* 27(3): 199–219.
- Galla, H. J., W. Hartmann, U Theilen, and E Sackmann. 1979. "On Two-Dimensional Passive Random Walk in Lipid Bilayers and Fluid Pathways in Biomembranes." *J. Membrane Biol.* 48: 215_236.
- Gavilan, Élisabeth et al. 2005. "One-Pot Synthesis of Fluorescent Porous Aluminosilicate Nanoparticles." *Comptes Rendus Chimie* 8(11–12): 1946–53.
- Le Guyader, Laurent et al. 2007. "Changes of the Membrane Lipid Organization Characterized by Means of a New Cholesterol-Pyrene Probe." 93(December): 4462–73.
- Le Guyader, Laurent et al. 2007. "Utilisation de Sondes Pyréniques in Vivo Pour Caractériser L'état de Phase Global de La Membrane Plasmique de Cellules Eucaryotes. Application À La Détection de La Liaison D'agonistes Au Récepteur Δopioïde Murin."
- Hotelling, H. 1933. "Analysis of a Complex of Statistical Variables into Principal Components." *Journal of Educational Psychology* 24(6): 417–41. <http://content.apa.org/journals/edu/24/6/417>.
- Hovius, Ruud, Pascal Vallotton, Thorsten Wohland, and Horst Vogel. 2000. "Fluorescence Techniques: Shedding Light on Ligand-Receptor Interactions." *Trends in Pharmacological Sciences* 21(7): 266–73.
- Hübner, C. G., A. Renn, I. Renge, and U. P. Wild. 2001. "Direct Observation of the Triplet

- Lifetime Quenching of Single Dye Molecules by Molecular Oxygen." *Journal of Chemical Physics* 115(21): 9619–22.
- Jameson, D. M., and Gregorio Weber. 1998. "Gregorio Weber, 1916-1997: A Fluorescent Lifetime." *Biophysical Journal* 75(1): 419–21.
- Jones, Arwyn T., and Edward J. Sayers. 2012. "Cell Entry of Cell Penetrating Peptides: Tales of Tails Wagging Dogs." *Journal of Controlled Release* 161(2): 582–91. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365912002441>.
- Kalyanasundaram, K., and J. K. Thomas. 1976. "Environmental Effects on Vibronic Band Intensities in Pyrene Monomer Fluorescence and Their Application in Studies of Micellar Systems." *Journal of the American Chemical Society* 2039(conformation D).
- Karpovich, D. S., and G. J. Blanchard. 1995. "Relating the Polarity-Dependent Fluorescence Response of Pyrene to Vibronic Coupling. Achieving a Fundamental Understanding of the Py Polarity Scale." *The Journal of Physical Chemistry* 99(12): 3951–58. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100012a014>.
- Kido, Nobuo, Fumio Tanaka, Norio Kaneda, and Kunio Yagi. 1980. "Pulse Fluorimetry of N-(1-Pyrenesulfonyl)dipalmitoyl-L- α -Phosphatidylethanolamine in Concanavalin A-Stimulated Human Lymphocytes." *BBA - Biomembranes* 603(2): 255–65.
- Klonis, Nectarios et al. 2002. "Fluorescence Photobleaching Analysis for the Study of Cellular Dynamics." *European Biophysics Journal* 31(1): 36–51.
- Lakowicz, Joseph R. 2006. Principles of fluorescence spectroscopy, Springer, New York, USA, 3rd edn, 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy Principles of Fluorescence Spectroscopy*.
- Lamazière, Antonin et al. 2010. "Lipid Domain Separation, Bilayer Thickening and Pearling Induced by the Cell Penetrating Peptide Penetratin." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1798(12): 2223–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.12.024>.
- Luly, P, C Crifo, and R Strom. 1979. "Effect of Insulin on Lateral Diffusion of Pyrene in Rat Liver Plasma Membrane." *Experientia* 35(January): 1–2.
- Marmé, Nicole, Jens Peter Knemeyer, Markus Sauer, and Jürgen Wolfrum. 2003. "Inter- and Intramolecular Fluorescence Quenching of Organic Dyes by Tryptophan." *Bioconjugate Chemistry* 14(6): 1133–39.
- Mecke, Almut et al. 2005. "Membrane Thinning Due to Antimicrobial Peptide Binding: An Atomic Force Microscopy Study of MSI-78 in Lipid Bilayers." *Biophysical Journal* 89(6): 4043–50. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349505730459>.
- Moog, R. S., M. D. Ediger, S. G. Boxer, and M. D. Fayer. 1982. "Viscosity Dependence of the Rotational Reorientation of Rhodamine B in Mono- and Polyalcohols. Picosecond Transient Grating Experiments." *Journal of Physical Chemistry* 86(24): 4694–4700.
- Nakajima, A. 1976. "Fluorescence Spectra of Pyrene in Chlorinated Aromatic Solvents." *Journal of Luminescence* 11(5–6): 429–32.
- Nakajima, Akira. 1971. "Solvent Effect on the Vibrational Structures of the Fluorescence and Absorption Spectra of Pyrene." *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 44(12): 3272–77. <http://www.journal.csj.jp/doi/10.1246/bcsj.44.3272>.
- de Oliveira, Raquel et al. 2017. "Electrochemical Quenching of the Fluorescence Produced by NBD-Labelled Cell Penetrating Peptides: A Contribution to the Study of Their

- Internalization in Large Unilamellar Vesicles." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 788: 225–31.
- Pal, Ranajit, Yechezkel Barenholz, and Robert R. Wagner. 1988. "Pyrene Phospholipid as a Biological Fluorescent Probe for Studying Fusion of Virus Membrane with Liposomes." *Biochemistry* 27(1): 30–36.
- Pansu, Robert B, Keitaro Yoshihara, Tatsuo Arai, and Katsumi Tokumaru. 1993. "Convolution Analysis of the Pyrene Excimer Formation in Membranes." *Journal of Physical Chemistry* 97: 1125–33.
- Parasassi, Tiziana, and Enrico Gratton. 1995. "Membrane Lipid Domains and Dynamics as Detected by Laurdan Fluorescence." *Journal of Fluorescence* 5(1): 59–69.
- Parker, CA. 1968. *Photoluminescence of Solutions*.
- Roseman, M. A., and T. E. Thompson. 1980. "Mechanism of the Spontaneous Transfer of Phospholipids between Bilayers." *Biochemistry* 19(3): 439–44.
- Rusinova, Elena et al. 2002. "Alexa and Oregon Green Dyes as Fluorescence Anisotropy Probes for Measuring Protein-Protein and Protein-Nucleic Acid Interactions." *Analytical Biochemistry* 308(1): 18–25.
- Sanchez, S A, M A Tricerri, G Gunther, and E Gratton. 2007. "Laurdan Generalized Polarization: From Cuvette to Microscope." *Modern Research and Educational Topics in Microscopy 2*: 1007–14.
- Schachter, David, Uri Cogan, and Richard E. Abbott. 1982. "Asymmetry of Lipid Dynamics in Human Erythrocyte Membranes Studied with Permeant Fluorophores." *Biochemistry* 21(9): 2146–50.
- Swiecicki, Jean Marie et al. 2015. "Accumulation of Cell-Penetrating Peptides in Large Unilamellar Vesicles: A Straightforward Screening Assay for Investigating the Internalization Mechanism." *Biopolymers* 104(5): 533–43.
- Tessier, Cedric et al. 2009. "Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Liquid – Liquid Immiscibility under Non-Equilibrium Conditions in a Model Membrane : An X-Ray Synchrotron Study." *Biointerfaces* 74: 293–97.
- Vaiana, Andrea C. et al. 2003. "Fluorescence Quenching of Dyes by Tryptophan: Interactions at Atomic Detail from Combination of Experiment and Computer Simulation." *Journal of the American Chemical Society* 125(47): 14564–72.
- Valeur, Bernard. 2001. *8 Molecular Fluorescence Principles and Applications*.
- Vanderkooi, J M et al. 1975. "Diffusion in Two Dimensions: Comparison between Diffusional Fluorescence Quenching in Phospholipid Vesicles and in Isotropic Solution." *J.Chem.Phys.* 63(1975): 3661–66.
- Vekshin, N. L. 1987. "On Measuring Biomembrane Microviscosity Using Pyrene Luminescence in Aerobic Conditions." *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 15(2): 97–104.
- Viallet, P, B Serrou, and Rosenfeld. 1985. *Fluorescent Techniques and Membranes Markers*.
- Weber, Gregorio, and Fay J Farris. 1979. "Synthesis and Spectral Properties of a Hydrophobic Fluorescent Probe : 6-Propionyl-2- (Dimethylamino) Naphthalenet." *American Chemical Society* 79.
- Winnik, Françoise. 1993. "Photophysics of Preassociated Pyrenes in Aqueous Polymer

Solutions and in Other Organized Media.” *Chemical Reviews* 93(2): 587–614.

Witte, Kristina et al. 2013. “Structure and Dynamics of the Two Amphipathic Arginine-Rich Peptides RW9 and RL9 in a Lipid Environment Investigated by Solid-State NMR and MD Simulations.” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1828(2): 824–33.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.11.014>.

Wold, Svante. 1976. “Pattern Recognition by Means of Disjoint Principal Components Models.” *Pattern Recognition* 8(3): 127–39.

Zibouche, Malik et al. 2008. “The N-Terminal Domain of Annexin 2 Serves as a Secondary Binding Site during Membrane Bridging.” *The Journal of biological chemistry* 283(32): 22121–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18508775>.

Annexes

ANNEXE A : La spectroscopie de fluorescence

A.1. Généralités

Selon l'approximation de Born-Oppenheimer, l'énergie totale d'une molécule est la somme de différentes énergies : l'énergie électronique, l'énergie de rotation et l'énergie de vibration. Ces différentes énergies sont quantifiées (Lakowicz 2006; Valeur 2001) :

- Si l'on considère des molécules hétéroplaires, entre deux niveaux rotationnels, l'énergie des transitions est de l'ordre de 10^{-3} eV (domaine des micro-ondes).
- Entre deux niveaux vibrationnels, l'énergie des transitions est de l'ordre de 10^{-1} eV (domaine des infra-rouges)
- Entre deux niveaux électroniques, l'énergie des transitions est comprise entre 1 eV (domaine visible) et 10 eV (domaine des ultra-violets)

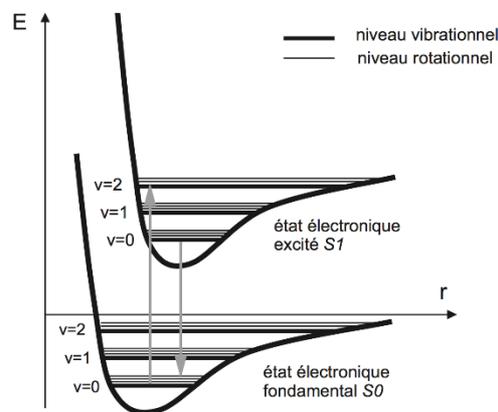


Figure A1. Niveaux d'énergie d'une molécule diatomique. r est la distance internucléaire. Les transitions radiatives correspondant à l'absorption et à l'émission de fluorescence sont représentées. Les transitions sont suffisamment rapides pour que r puisse être considéré comme constant : les transitions sont donc verticales (principe de Franck-Condon) (Lakowicz 2006).

La mécanique quantique régit l'absorption d'une onde électromagnétique par une molécule. L'absorption d'un photon d'énergie $h\nu$ nécessite que $h\nu$ soit au moins égale à la différence d'énergie entre le niveau électronique de plus faible énergie et un des niveaux excités de plus grande énergie. Aussi, la multiplicité des états doit être compatible c'est-à-dire qu'il doit y avoir une transition de type singulet-singulet ($S_0 \rightarrow$

S_n). Une fois que l'excitation a eu lieu, la molécule peut se relaxer soit selon un processus radiatif soit selon un processus non radiatif.

- Les **processus non radiatifs** sont des mécanismes de relaxation dans lesquels il n'y a pas d'émission de photon comme par exemple une relaxation vibrationnelle, un transfert d'électron, une séparation de charges ou une réaction chimique...
- Dans les **processus radiatifs**, il y a émission d'un photon d'énergie égale à la différence d'énergie entre les niveaux ce qui induit un retour à l'état fondamental (de l'état excité vers l'état fondamental après relaxation par vibration).

Dans le cas de la fluorescence, il y a un retour à l'état fondamental S_0 à partir de l'état excité de même multiplicité S_1 . Il s'agit d'un processus radiatif. En ce qui concerne la phosphorescence, il y a un retour à l'état fondamental à partir de l'état triplet T_1 . Le diagramme de Jablonski de la Figure A2 illustre ces phénomènes. Les phénomènes de fluorescence sont très rapides (de l'ordre de quelques picosecondes à quelques nanosecondes) car les transitions entre des niveaux de multiplicités différentes ne sont pas permises par la mécanique quantique. De même, la phosphorescence est très lente (de la microseconde à la milliseconde). Lorsque les phénomènes de fluorescence n'ont pas lieu à partir du premier niveau électronique excité S_1 , ils sont de faible intensité et assez rares. En général, quand une molécule est excitée à un niveau supérieur, elle retourne au niveau S_1 par relaxation vibrationnelle (Lakowicz 2006).

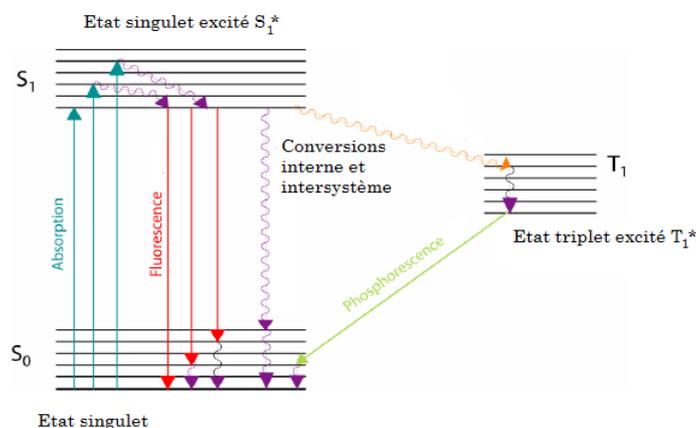


Figure A2. Diagramme de Jablonski.

Une molécule fluorescente est caractérisée par différents spectres : d'absorbance, d'excitation et d'émission.

Le spectre d'absorbance provient de la transition d'un électron de l'état fondamental, donc de plus basse énergie, vers des niveaux électroniques supérieurs de plus hautes énergies. Il y a une distribution d'électrons des différents niveaux de vibration des états excités, en fonction de la radiation initiale. On définit une probabilité de transition électronique pour la longueur d'onde associée au photon qui est absorbé. Le coefficient d'extinction molaire, ε_λ , associe l'énergie absorbée au nombre de molécules excitées (loi de Beer-Lambert, Figure A3). Pour une longueur d'onde, l'absorbance A varie de façon linéaire avec la concentration C selon l'équation :

$$A_\lambda = \log_{10} \frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)} = \varepsilon_\lambda C x$$

Équation 1. Loi de Beer-Lambert

avec :

- I_0 : l'intensité de la lumière incidente,
- I : l'intensité de la lumière transmise,
- C : la concentration de la molécule absorbante,
- ε_λ : coefficient d'extinction molaire,
- x : la longueur du trajet optique parcouru par la lumière dans la solution.

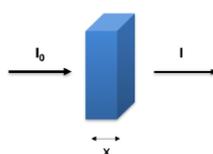


Figure A3. Loi de Beer-Lambert.

Le **spectre d'émission de fluorescence** (Figure A4) traduit la quantité de photons émis par un fluorophore à différentes longueurs d'onde d'observation qui sont associés à des transitions de l'état excité S_1 vers différents niveaux de vibration de l'état S_0 . Dans une solution, la molécule excitée est entourée des molécules du solvant qui s'organisent autour, ce qui fait que l'état S_1 a l'énergie la plus faible quand il est occupé par un électron. L'écart entre le maximum d'émission et le maximum d'absorbance correspond

au déplacement de Stokes. Le spectre d'émission de fluorescence (1', 2', 3', 4' Figure A4) est symétrique du spectre d'absorbance (1, 2, 3, 4, Figure A4) par rapport au point de croisement entre les spectres d'absorbance et d'émission. Le point de croisement correspond à la différence d'énergie entre les niveaux vibrationnels de plus faible énergie des états S_0 et S_1 (Lakowicz 2006; Valeur 2001).

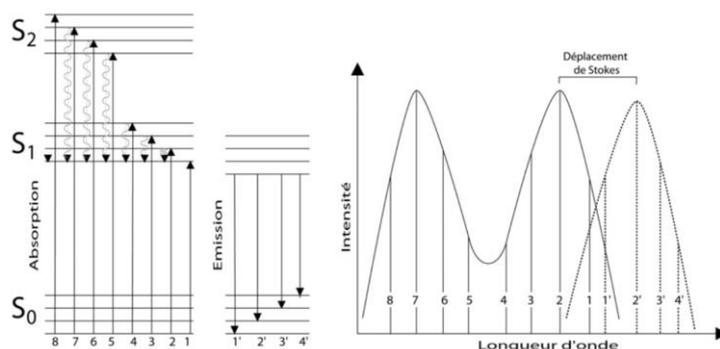


Figure A4. Relation entre les niveaux électroniques et les spectres d'absorbance et d'émission de fluorescence.

Concernant le **spectre d'excitation de fluorescence**, il est obtenu en mesurant le nombre de photons émis à une longueur d'onde du spectre d'émission, en général la longueur d'onde au maximum d'émission, quand la longueur d'onde d'excitation varie. Le spectre d'excitation est souvent symétrique du spectre d'absorbance de la molécule fluorescente quand on considère des molécules à un seul chromophore et quand il n'y a pas de phénomène photochimique à l'état excité.

A.2. Le rendement quantique de fluorescence

Le rendement quantique de fluorescence ϕ_F est défini comme le rapport entre le nombre de photons de fluorescence émis sur le nombre de photons absorbés. Ce rendement détermine l'efficacité de l'émission de lumière fluorescente pour une molécule et est compris entre 0 et 1.

Soit n_1 est le nombre de molécules d'état excité S_1 . A partir du diagramme de Jablonski (Figure A2), on a la relation suivante :

$$\frac{-dn_1}{dt} = (k_F + k_{ic} + k_{isc})n_1$$

Équation 2

où :

- k_f est la constante de vitesse de relaxation par fluorescence,
- k_{ic} est la constante de vitesse de relaxation par conversion interne,
- k_{isc} est la constante de vitesse de relaxation par conversion inter-système.

La solution de cette équation est donnée par :

$$n_1(t) = n_1(0) e^{\frac{-t}{\tau_F}}$$

Équation 3

avec :

- $n_1(0)$ le nombre de molécules dans l'état excité à l'instant $t=0$,
- et $\tau_F = \frac{1}{(k_F + k_{ic} + k_{isc})}$

La durée de vie de l'état excité est caractérisée par la constante de temps τ_F . L'évolution du nombre de photons émis pendant la relaxation par une molécule fluorescente est proportionnelle au nombre d'états excités. La distribution de ces photons dans le temps sera identique à la décroissance exponentielle de la population de l'état excité. Dans ce cas, τ_F correspond à la durée de vie de fluorescence de l'état excité.

Le rendement quantique de fluorescence ϕ_F illustre aussi la compétition entre les différentes voies de relaxation d'une molécule excitée. On peut le définir comme le rapport entre l'énergie re-émise par fluorescence et l'énergie totale absorbée. C'est-à-dire comme le rapport entre la constante de désactivation k_F et la somme des constantes de tous les processus de relaxation.

$$\phi_F = \frac{1}{(k_F + k_{ic} + k_{isc})}$$

Équation 4

ou encore,

$$\phi_F = \tau_F k_F$$

Équation 5

Ainsi, un processus qui modifie la durée de vie τ_F de l'état excité va impacter le rendement quantique de fluorescence de la molécule.

A.3. L'intensité de fluorescence

L'intensité de fluorescence idéale I_F est l'intensité pour laquelle ne sont pas comptées les pertes induites par les phénomènes de réabsorption de la radiation émise.

$$I_F = I_0 \omega \frac{\Omega}{4\pi} A_T \phi_F$$

Équation 6

avec :

- I_0 le flux radiant incident sur la surface de l'échantillon,
- ω le rayon du faisceau de la radiation incidente,
- Ω l'angle solide de collection de la fluorescence mesurée,
- A_T le facteur d'absorption totale.

Pour des absorbances faibles, A_T , et donc I_F sont proportionnels à la concentration de l'échantillon.

A.4. La durée de vie de fluorescence

La durée de vie de fluorescence est également caractéristique de chaque molécule. Elle est égale à la durée de vie moyenne de l'état excité S_1 . Généralement, la durée de vie d'un fluorophore est de l'ordre de la nanoseconde. Plus la durée de vie est courte, plus la sensibilité du fluorophore sera bonne car plusieurs excitations successives seront possibles comme il va revenir rapidement dans son état fondamental pour être à nouveau excité.

ANNEXE B : Diffraction des rayons-X

1. Éléments théoriques de la diffusion des rayons X

Cette annexe présente les deux techniques d'investigation par rayons X utilisées pour l'analyse des résultats présentés dans cette thèse.

La diffraction des rayons X aux grands angles (WAXD pour *Wide Angle X-Ray Diffraction*) permet d'obtenir des informations sur la structure à l'échelle de l'Angstrom, c'est à dire à l'échelle des têtes polaires et plus précisément sur l'ordre positionnel entre les chaînes voisines. La diffraction des rayons X aux petits angles (SAXD pour *Small Angle X-Ray Diffraction*) apporte quant à elle des informations sur l'organisation à une échelle plus grande, de l'ordre de la centaine d'Angstrom, soit de l'espace entre les bi-couches lipidiques. Les paragraphes suivants présentent un rappel sur la théorie de la diffusion des rayons X.

Dans la matière, les rayons X (RX) sont le résultat de l'interaction du rayonnement incident sur les électrons. Et Les informations sur la structure que l'on peut déduire des mesures de diffraction X sont liées à la distribution des électrons (densité électronique). Les interférences produites lors de la diffusion des rayons X régissent les caractéristiques des diffractogrammes qui représentent habituellement une intensité diffusée en fonction de l'angle de diffusion.

On considère un faisceau incident de rayons X de longueur d'onde λ traversant un volume dV de matière. Le faisceau émergent est diffusé à un angle 2θ . On note O le point d'origine défini de façon arbitraire dans le volume diffusant. Soient \vec{k}_0 et \vec{k} les directions respectives du faisceau incident et du faisceau diffusé à l'angle 2θ (Figure B101). On considère un élément de volume δV situé au point P à la position \vec{r} et avec une densité électronique $\rho(\vec{r})$. La différence de phase entre les ondes diffusées d'angle 2θ au point O et P est donné par la relation : $\frac{2\pi}{\lambda} \vec{r} \cdot (\vec{k} - \vec{k}_0)$.

En appelant \vec{Q} le vecteur qui définit la direction de l'onde diffusée (2), le module de \vec{Q} est fonction de l'angle de diffusion 2θ .

$$\|\vec{Q}\| = Q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta$$

Équation 1.

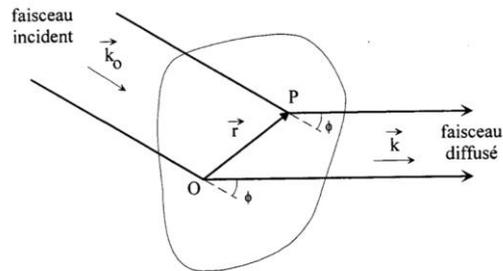


Figure B101. Faisceau incident monochromatique diffusé par un corps.

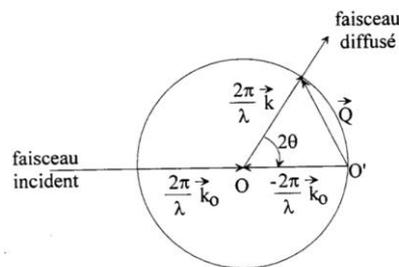


Figure B2. Définition de \vec{Q} .

L'onde diffusée dans la direction d'angle 2θ , du volume entier V est décrite, en amplitude et en phase, par la fonction d'onde suivante :

$$F_e(\vec{Q}) = \int_V \rho(\vec{r}) e^{i\vec{r} \cdot \vec{Q}} d\vec{r}$$

Équation 2.

$F_e(\vec{Q})$ représente la transformée de Fourier de la fonction $\rho(\vec{r})$.

L'intensité de l'onde représentée par la fonction d'onde $F_e(\vec{Q})$ s'écrit :

$$I(\vec{Q}) = F_e(\vec{Q})F_e^*(\vec{Q})$$

avec F_e^* le complexe conjugué de F_e .

2. Les méthodes particulières d'analyse

2.1. Analyse par diffusion aux grands angles d'un solide partiellement ordonné (WAXD) :

Dans ce paragraphe, nous traitons la question de la diffraction des rayons X par des solides qui présentent un ordre à grande distance comme les cristaux liquides par exemple (ordre bidimensionnel).

La diffraction est une diffusion cohérente particulière. En effet, elle n'existe que lorsqu'il y a une répétition de matière diffusante qui est du même ordre de grandeur que la longueur d'onde de l'onde incidente. Ainsi, la fonction d'interférence est discrète.

Lorsqu'il s'agit d'un cristal parfait, la matière diffusante qui correspond à l'ensemble des atomes, est organisée suivant un réseau tridimensionnel $(\vec{a}, \vec{b}, \vec{c})$. La matière peut être vue comme une suite de plans d'atomes parallèles et équidistants.

Dans le cas des membranes lipidiques, les plans diffusants sont constitués des têtes polaires de phospholipides agissant comme une suite de plans. Pour avoir une diffraction de l'onde incidente de direction \vec{k}_0 dans une direction \vec{k} , tous les plans doivent diffuser un rayonnement en phase dans la direction \vec{k} . Pour que les ondes diffusées par tous les atomes d'un même plan soient en phase, il est nécessaire de respecter la condition de Bragg. On note O et O' des sites diffusants appartenant à deux plans. Les plans d'onde (π_0) et (π) passant par O sont respectivement normaux aux ondes incidentes et diffractées. Ainsi la différence de chemin en passant par O' est $HO' + O'K$. H et K sont respectivement les points d'intersection du rayon diffusé avec les plans (π_0) et (π) . En notant d la distance séparant les plans diffusants, la Figure B3 montre que :

$$HO' + O'K = 2d \sin \theta$$

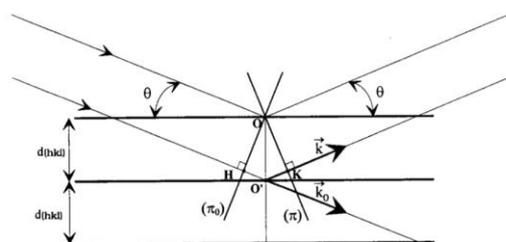


Figure B3. Schéma des rayons incident et diffracté régis par la loi de Bragg.

En appliquant la condition nécessaire pour avoir une diffraction suivant \vec{k} sur la phase du rayon diffusé, on obtient la loi de Bragg qui postule que : un rayon incident de longueur d'onde λ rencontrant des plans séparés par d sous l'angle θ , engendre un rayon diffracté dans la direction du rayon réfléchi par ces plans si :

$$n\lambda = 2 d \sin \theta \text{ où } n \text{ est un entier}$$

Équation 3.

L'angle de diffraction 2θ est dit angle de Bragg.

L'intensité du faisceau diffracté s'écrit :

$$I(\vec{Q}) = F_A(\vec{Q})F_A^*(\vec{Q})$$

Équation 4.

où $F_A(\vec{Q})$ est le facteur de diffusion atomique.

Dans notre étude, la distance d aux grands angles (WAXD) représente la distance séparant les têtes polaires sur le plan de la membrane.

2.2. Diffusion centrale des rayons X

La diffusion aux rayons X aux petits angles (SAXD) est une technique d'analyse où la diffusion élastique des rayons X (longueur d'onde 0,1 ... 0,2 nm) par un échantillon qui présente des inhomogénéités est enregistrée à des angles très faibles (typiquement 0,1 - 10 °). Dans cette plage angulaire on obtient des informations comme la forme et la dimension des macromolécules, certaines distances caractéristiques des matériaux partiellement ordonnés. Dans les homopolymères par exemple, ces hétérogénéités résultent des différences de densité massique dans le matériau. Ceci est causé par les différentes structures ou microstructures présentes, et c'est dans ce cas qu'apparaissent des interférences discrètes sur les clichés, liées à leur périodicité. Ces réflexions sont la conséquence de l'arrangement régulier de lamelles séparées par des zones amorphes non organisées. Cette distance répétée est appelée période L_p (Figure B4). Dans notre

cas, les distances séparant les têtes des lipides de deux feuilletts de la membrane (épaisseur de la membrane) sont obtenues par SAXD (longue période L_p).

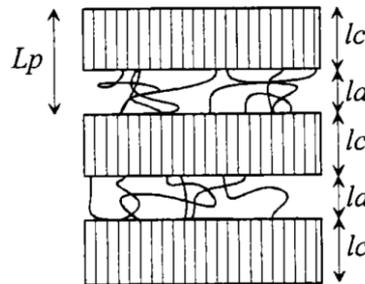


Figure B4. Définition de la longue période L_p .

Précédemment, on a vu l'expression de \vec{Q} en fonction de 2θ . Quand il s'agit de la diffusion centrale, l'expression de \vec{Q} s'écrit généralement :

$$\|\vec{Q}\| = Q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta = 2\pi q$$

Équation 5.

La longue période est obtenue à partir de la relation de Bragg adaptée aux petits angles :

$$L = \frac{\lambda}{2 \sin \theta} = \frac{1}{q}$$

où q est la position de la réflexion dans le diffractogramme.

2.3. La présentation des résultats

Les résultats des mesures WAXD sont présentés sur des graphes appelés diffractogrammes (Figure B5). Pour chaque mesure est représentée l'intensité mesurée ou corrigée en fonction de S en (nm^{-1}).

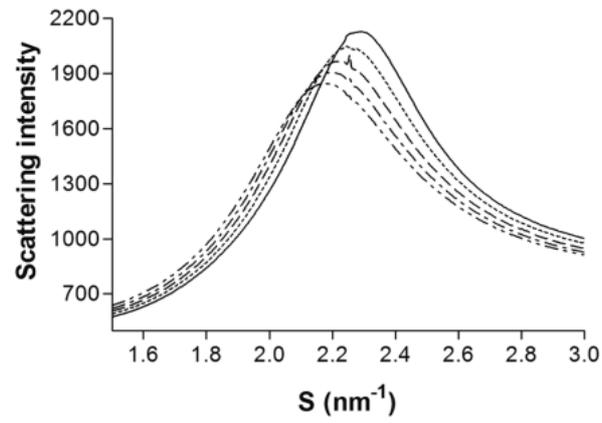


Figure B5. Diffractogrammes WAXD des membranes MLV PC à différentes températures (ligne continue : 5°C, ligne en pointillé : 15°C, ligne en tiret : 25°C, pointillé-tiret : 35°C et ligne double point-tiret : 45°C).

ANNEXE C :

Différentes sondes utilisées dans la littérature pour l'étude du cholestérol dans la membrane

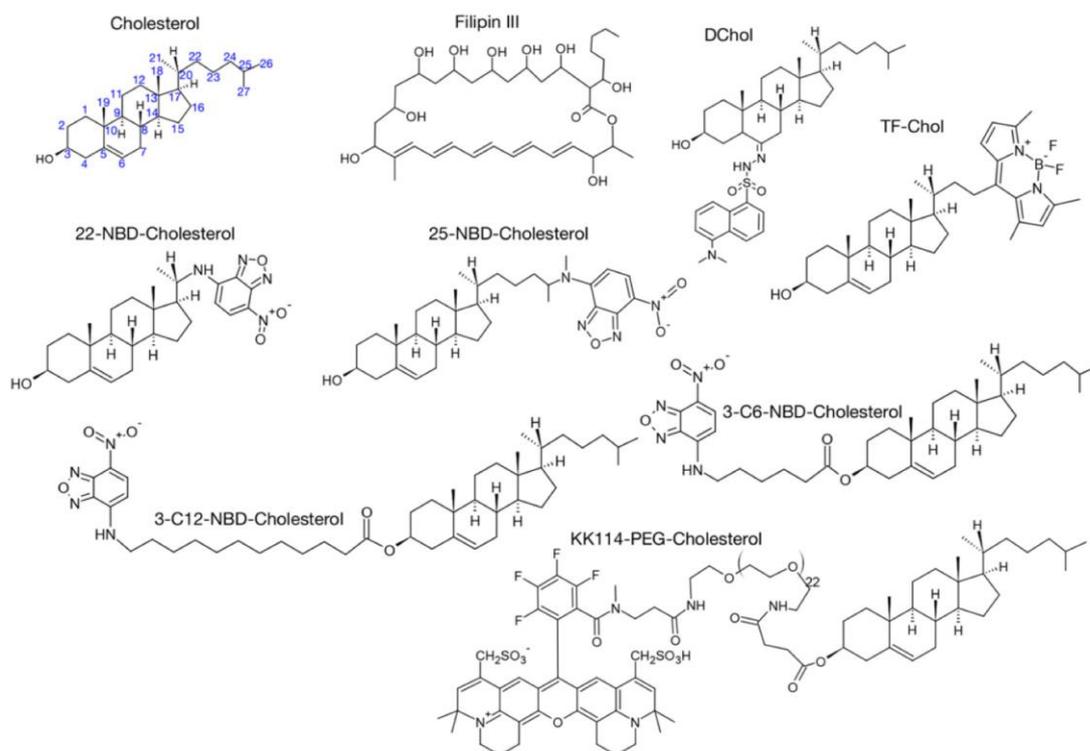


Figure C1. Structure moléculaire des différentes sondes fluorescentes analogues du cholestérol (Sezgin et al. 2016).

Sezgin, Erdinc et al. 2016. "A Comparative Study on Fluorescent Cholesterol Analogs as Versatile Cellular Reporters." *Journal of Lipid Research* 57(2): 299–309.

ANNEXE D : Anisotropie

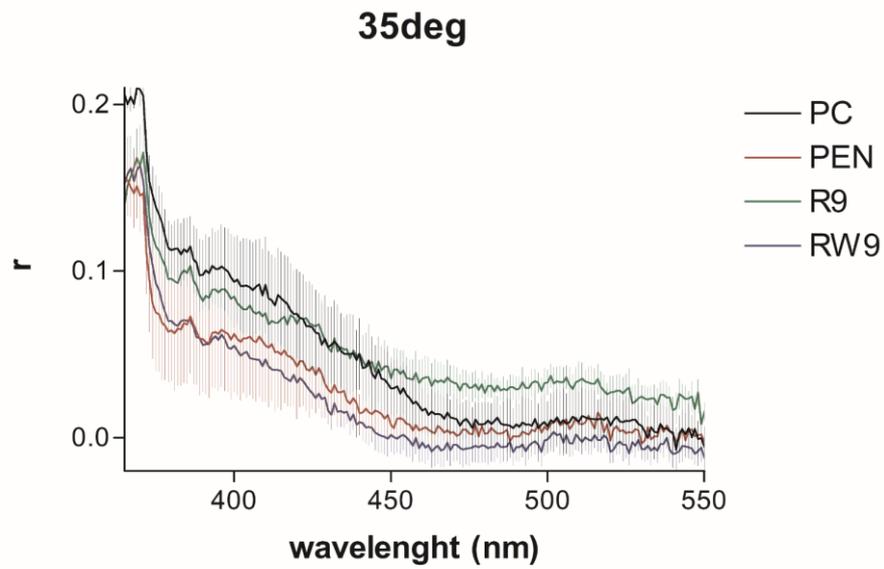


Figure D1. Effet des peptides (R9 en vert, RW9 en bleu et pénétratine en rouge) sur l'anisotropie (r) du cholestérol-pyrène en membranes PC à 35°C (Les écarts types sont représentés en gris).

ANNEXE E :

Article 1 :

Membrane re-arrangements and rippled phase stabilisation by the cell penetrating peptide penetratin



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamem

Membrane re-arrangements and rippled phase stabilisation by the cell penetrating peptide penetratin



Claudia Almeida^a, Antonin Lamazière^a, Angélique Filleau^a, Yohann Corvis^b,
Philippe Espeau^b, Jesus Ayala-Sanmartin^{a,*}

^a Sorbonne Universités, UPMC, École Normale Supérieure, CNRS, INSERM, APHP, Laboratoire des Biomolécules (LBM), Paris, France

^b Université Paris-Descartes, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 April 2016

Received in revised form 17 June 2016

Accepted 25 July 2016

Available online 28 July 2016

Keywords:

Lipids packing

Membrane organisation

Penetratin

Rippled phase

ABSTRACT

Cell penetrating peptides are promising vectors for molecular drug delivery in eukaryotic cells. Despite of their discovery 20 years ago, the mechanisms of peptide membrane crossing are still controversial. The different suggested penetration mechanisms reflect the high sequence and structural diversity of cell penetrating peptides. The fundamental step for peptide penetration into the cytosol is the crossing of the membrane lipid barrier at the level of the plasma membrane or the endosomes. Therefore, the study of the peptide-lipid interaction is the key for peptide penetration mechanisms understanding. In order to study the changes in lipid organisation induced by the cell penetrating peptide penetratin, several experiments by three different physicochemical approaches were performed. X-ray diffraction data shows that penetratin is able to induce membrane phase separation and lipid rearrangements observed by inter-lipid distances. These changes are accompanied by a temperature stable behaviour of some of the induced membrane domains. The membrane environment fluorescent probe laurdan showed that, in DMPC and DMPC/DMPG membranes, the peptide induces de-packing of lipids. Calorimetric analyses show that penetratin favours the gel phase to gel-like rippled phase transition. Overall, the data suggest both, that the rippled phase is a heterogeneous structure formed by gel-like and fluid-like coexisting components, and that the penetratin-induced membrane heterogeneity could be important for membrane destabilisation during cell penetration.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cell penetrating peptides (CPPs) are potential therapeutic vectors for delivery of molecules inside eukaryotic cells. Such peptides (*i.e.* TAT, penetratin) are usually rich in basic amino acid residues. Penetratin, a peptide derived from the homeodomain transcription factor Antennapedia was described to successfully carry active molecules inside cells and is one of the most studied CPPs [1–3].

Membrane binding and cell penetration of CPPs are modulated by the physicochemical properties of both the membrane and the peptide [4]. Cell penetration is known to use two pathways: the receptor- and

metabolic energy-independent pathway, and the endocytic pathway [5,6]. However, to reach the cytosol and the nucleus after cellular or “physical” endocytosis, the peptides must cross the plasma membrane or the endosomal membrane barrier. Therefore, a direct interaction with membrane lipids seems to be the most important factor for their translocation into the cytosolic or nuclear compartments.

Several mechanisms for CPP membrane translocation have been proposed including an “electroporation-like” mechanism [7], neutralisation of arginine residues by guanidinium-phosphate complex formation [8], inverted micelles [9] and also a direct translocation through the membrane bilayer [10] (for reviews see [11–15]). Experiments with model membranes showed that membrane translocation in large unilamellar vesicles (LUVs) is dependent on membrane potential including pH gradient and is modulated by the lipid composition [16–19]. However, one report showed that membrane potential is not strictly necessary for translocation in LUVs [20], and in giant unilamellar vesicles (GUVs), membrane translocation had also shown to be membrane potential-independent [21]. Membrane curvature and/or membrane tension which are higher in LUVs than in GUVs could be responsible of these differences.

Using membrane models, we have previously shown that penetratin and different basic peptides induce membrane invaginations, which

Abbreviations: Chol, cholesterol; CPP, cell penetrating peptide; DMPC, 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DMPG, 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol; DPPC, 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DPPG, 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol; DSC, differential scanning calorimetry; GUV, giant unilamellar vesicle; LUV, large unilamellar vesicle; MLV, multilamellar vesicle; PC, L- α -phosphatidylcholine; PG, L- α -phosphatidyl-DL-glycerol; SAXD, small angle X-ray diffraction; SM, sphingomyeline; WAXD, wide angle X-ray diffraction.

* Corresponding author at: CNRS, UMR 7203, Laboratoire des Biomolécules, 4 Place Jussieu, CP 182, 75252 Paris, France.

E-mail address: jesus.ayala-sanmartin@upmc.fr (J. Ayala-Sanmartin).

results in the formation of tubular structures [22–24]. Therefore, membrane negative curvature induced by basic peptides could be crucial for the mechanism of internalisation by tube formation (“physical endocytosis”) [22] and inverted micelles. Moreover, the capacity of peptides to induce tubes and either negative or positive curvature was also observed in membranes of biological origin [25,26]. Besides the capacity of peptides to modify the arrangements of membrane phospholipids, peptide structural changes might be important for membrane translocation. Penetratin has been extensively studied showing to acquire α -helix, β -sheet and coil conformations in different conditions [27–34].

The membrane domains and raft microdomains concepts have been developed in the last fifteen years, and the role of lipid arrangements in cellular membranes functions and organisation have been demonstrated [35]. The role of membrane microdomains in CPP binding and uptake is not well understood. Moreover, the role of membrane lipid charges in the penetratin binding ability has been a subject of controversy. Several studies have suggested that negatively charged phospholipids are required for binding [29,30,36], but others have shown that zwitterionic phospholipids are also able to bind the peptide [27,37]. It has also been shown that cholesterol (Chol) (an essential component of the so called membrane “rafts” microdomains) modulates CPP binding to phosphatidylcholine/phosphatidylglycerol (PC/PG) membranes [28]. Moreover, we demonstrated that membranes in a liquid ordered raft-like phase seems to block or reduce the peptide-induced effect on membrane curvature in comparison with membranes in the liquid disordered phase [23,38]. The mechanisms involved in the peptide interaction with different membrane domains and the modifications of membrane lipids organisation by CPPs are therefore important factors for the development of vector-mediated therapeutic strategies at both, the peptide (vector) and the lipid membrane (target) levels. Therefore, we have investigated the influence of the CPP penetratin on membranes with different phospholipid composition mimicking different microdomains of the eukaryotic plasma membranes. The influence of the membrane state on penetratin induced phospholipid organisation was studied by X-Ray diffraction, laurdan fluorescence and differential scanning calorimetry (DSC). The results indicate that penetratin is able to induce rearrangements of membrane lipids that favour phase separation and membrane heterogeneity as shown specifically by the stabilisation of the membrane rippled phase. The implications of the data in penetratin membrane activities are discussed.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Egg yolk L- α -phosphatidylcholine (PC), egg yolk L- α -phosphatidyl-DL-glycerol (PG), sphingomyeline (SM) and cholesterol (Chol) were purchased from Sigma. 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC), 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DMPG) and 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG) were purchased from Genzyme. Penetratin (RQIKIWFQNRRMKWKK) was synthesised using Boc solid phase strategy and was purified by HPLC as previously described [22]. Laurdan was from molecular probes.

2.2. Preparation of membranes

Multilamellar vesicles (MLVs) for X-ray diffraction were obtained as previously described [23]. Briefly, by dissolving 20 mg of lipids in the appropriate proportions in a mixture of chloroform and methanol, 2/1 (v/v), followed by solvent evaporation under nitrogen. Final traces of solvent were removed in a vacuum chamber attached to a liquid nitrogen trap for 3–4 h. Lipid films were hydrated with 25 μ l of buffer 10 mM HEPES pH 7.4 containing 2 mg of penetratin and mixed extensively. The lipid dispersion was thoroughly stirred, sealed under argon and kept until examination at 4 °C.

Large unilamellar vesicles (100 nm diameter LUVs) were prepared by extrusion in 0.5 mM HEPES buffer (pH 7.4) as described in [39]. The lipids were added at the desired proportions to obtain a suspension of 1 mg ml⁻¹ LUVs in buffer. Laurdan was present at 0.1% lipid weight ratio.

MLVs for DSC experiments were performed as follows: 2 mg of lipids on chloroform were dried and subjected to vacuum for 10 min. Then, 2 ml of buffer was added in the presence or the absence of penetratin at the desired Peptide/Lipid Molar Ratio (P/L) (1/50 or 1/10). The samples were strongly stirred to obtain the suspension of MLVs (1 mg ml⁻¹) ready to use for the CSC calorimeter. For the experiments performed with the DSC 822 calorimeter, the MLV suspensions (2 mg ml⁻¹) were centrifuged in a Beckman centrifuge at 100,000 g. The MLV pellets were recovered in a final volume of 40 μ l (MLV final concentration of 50 mg ml⁻¹).

2.3. Fluorescence spectroscopy

Fluorescence measurements were performed with a Jasco fluorimeter as previously described [40]. The excitation and emission band-pass were set at 5 nm. Spectra were recorded 7 min after addition of penetratin to LUVs in 0.5 mM HEPES buffer (pH 7.4). Laurdan emission spectra were recorded from 400 to 650 nm using a 365 nm excitation wavelength in the absence or presence of penetratin at different penetratin/lipid molar ratios. The temperature was regulated with a Peltier device.

The generalised polarisation (GP) was calculated with the equation:

$$GP = (I_{430} - I_{485}) / (I_{430} + I_{485})$$

and the ΔGP was defined as $GP_{\text{final (after penetratin addition)}} - GP_{\text{initial (before penetratin addition)}}$.

2.4. X-ray diffraction

Small angle and wide angle X-ray diffraction (SAXD, WAXD) measurements were performed at the Synchrotron Radiation Source of Spring8 (Japan) following the protocol described in [23]. Briefly, the samples (~20 μ l) were deposited between two thin mica windows and mounted on a programmable temperature stage. Samples were exposed for 30 second recordings. Spacing distances were determined from circular integration of 2-D images using FIT2D program (Andy Hammersley) and silver behenate was used as the x-axis calibration standard. Peak analysis was performed with Origin and PeakFit 4 programs.

2.5. Differential scanning calorimetry (DSC)

Calorimetry was performed on a high-sensitivity Differential Scanning Calorimeter (Calorimetry Sciences Corporation, CSC) and a Mettler-Toledo DSC 822 calorimeter. A scan rate of 1 °C min⁻¹ was used and a delay of 10 min between sequential scans in a series was set for thermal equilibration. Indium and zinc (purity higher than 99.9%) were used for temperature and enthalpy calibration of the DSC device. Data analyses were performed with the programs provided by the constructors. The total lipid concentrations used were 1 and 50 mg ml⁻¹ for the CSC and the Mettler-Toledo calorimeters, respectively. For peptide concentrations corresponding to peptide/lipid molar ratio (P/L) 1:10, no thermal events were observed over the temperature range of 0–100 °C. This indicates that the endothermic events observed in this study arise solely from phase transitions of the phospholipids vesicles. For the CSC calorimeter a minimum of three heating and cooling scans were performed.

2.6. Statistical analysis

The statistical significance of differences between experiments was determined by the Student's *t*-tests with GraphPad Prism software. For differences before and after peptide addition we used paired test, and for differences between different conditions the unpaired test was performed. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. Graphs are given as bar plots \pm standard error (SE).

3. Results

3.1. Membrane lipids rearrangements studied by X-ray diffraction

The penetratin effects on phospholipid phase separation and its thermal stability were studied by Small Angle X-ray diffraction (SAXD) in model membranes mimicking different domains of cellular plasma membranes. PC mimics the liquid disordered (Ld) membrane domains. PC/PG (9/1) mimics Ld domains but in the presence of a small proportion of negative lipids. These domains are present in several cancer cells. SM/Chol (1/1) mimics the liquid ordered (raft) domains. SM/Chol/PG (4/5/1) mimics the raft domains in the presence of negative charges, and finally, PC/SM/Chol (1/1/1) membrane mimics the overall heterogeneous plasma membrane with coexisting liquid ordered and liquid disordered domains. We previously showed that penetratin was able to induce phase separation in fluid membranes but not in liquid ordered membranes. Here we studied in more detail the temperature dependent variations on d-spacing, *i.e.* the distance between two membranes including the water layer (Fig. 1). The variation of the two first diffraction orders of diffractograms for PC as well as the variation of the corresponding d-spacing distances are represented as a function of the temperature in Fig. 1. As can be seen, for PC in the absence of penetratin, the d-spacing corresponding to one lamellar structure (L1) decreases with increasing the temperature. When penetratin is added to PC, diffraction peaks with higher d-spacing corresponding to two different lamellar structures (L2 and L3) were then observed (Fig. 1B). As previously reported [41], the electron density profiles show that the two SAXD peaks correspond to two different lamellar phases and not only to an increase of the hydration layer due to peptide accumulation. The L2 of similar thickness as the L1, but the L3 layer being thicker by about 0.5 nm [41]. This indicates that a real phase separation took place. As can be seen, the peak width is broadened. As for pure PC (L1), when the temperature increases, the d-spacing of the L2 phase decrease. On the contrary, for the L3 phase a thermal stability was observed (Fig. 1B and C).

The d-spacing obtained from SAXD experiments are gathered in Table 1 for the 5 MLV of different composition at 25 °C with and without penetratin.

In SM/Chol and PC/SM/Chol membranes, penetratin showed only moderate effect in phase separation (PC/SM/Chol as published previously [41]) and thermal stability (SM/Chol in Fig. 1C). However, as for PC, PC/PG and SM/Chol/PG, penetratin showed different lamellar structures with an increase in d-spacing. For comparison, Table 1 shows the d-spacing at 25 °C. It is evident the increase of d-spacing in liquid disordered phases and in the presence of PG as well as phase separation. After Penetratin addition the observed tendency was that the peptide did not modify the thermal behaviour of the thinner phase (L2), but induced thermal stability of the thickest phase (L3, d-spacing of about 8.7 nm).

The penetratin effect on the lateral phospholipid organisation and on their thermal stability was studied by Wide Angle X-ray Diffraction (WAXD). In the absence of penetratin, for the five different MLVs studied (three examples are shown in Fig. 2), the WAXD peaks were very symmetric and shifted to higher d-spacing with the increase of the temperature. At 25 °C the spacing distances were in the range of 4.39 to 4.63 Å (Fig. 2A–C and Table 1S of supplementary material). With the exception of SM/Chol liquid ordered MLVs (Fig. 2F and Table 1S), the

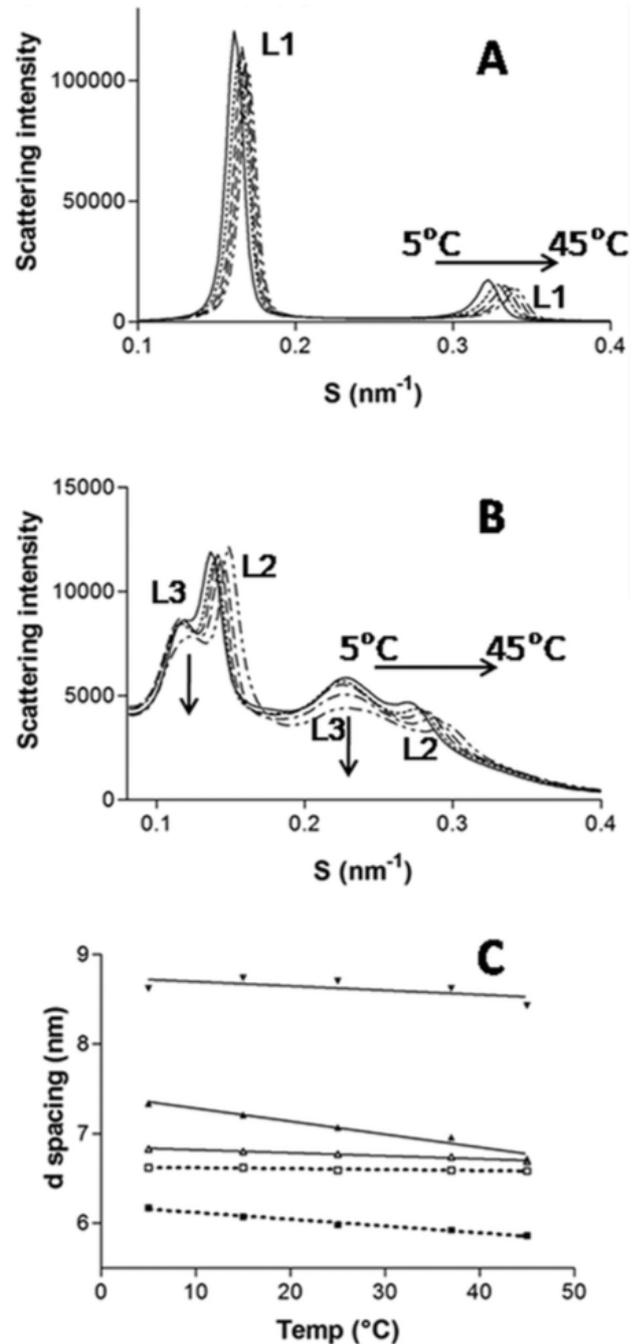


Fig. 1. Penetratin effects on membrane phase separation and thermal stability by SAXD. A; diffractograms of PC MLVs at different temperatures (5 °C continuous line, 15 °C dotted line, 25 °C dashed line, 35 °C dotted-dashed line and 45 °C bi-dotted-dashed line). Only the two first reflexions of the lamellar phase are shown. Notice the temperature-dependent d-spacing shift of the lamellar phase (L1). B; Diffractograms of the PC MLVs in the presence of penetratin at different temperatures as in (A). Notice the two lamellar phases: one thermal sensitive shifting to the right (L2, horizontal arrow) and one thicker thermally stable (L3, vertical arrows). C; d-spacing of different lamellar phases in function of the temperature. (□) SM/Chol (Δ) SM/Chol plus penetratin. (■) PC phase L1. (▲) phase L2 of PC plus penetratin. (▼) phase L3 of PC plus penetratin.

presence of penetratin induced, in all cases, the splitting of the symmetric WAXD peak into a signal composed by two or three different contributions (Fig. 2D,E and Table 1S). The analysis of WAXD signal for PC in the presence of penetratin at 25 °C showed to be formed by the contribution of three peaks at 4.72, 4.42 and 4.15 Å and for PC/SM/Chol two peaks at 4.70 and 4.47 Å. This fact reveals a rearrangement of head groups in interaction with penetratin as previously suggested [42]. These distances could be consistent with lipid organisation in a quasi

Table 1
SAXD d-spacing from MLVs at 25 °C in the absence and presence of penetratin.

	d-spacing of MLVs alone (nm) ^a	d-spacing of MLVs + penetratin (nm) ^a	
MLVs	Phase L1	Phase L2	Phase L3
PC	5.98	7.07	8.70
SM/Chol (1/1)	6.59	6.77	–
PC/SM/Chol (1/1/1)	6.71	6.69	5.96
PC/PG (9/1)	6.11	6.91	8.73
SM/Chol/PG (4/5/1)	6.41	–	8.20

^a Spacing values were obtained as the average of 3 to 5 orders.

hexagonal or a distorted triangular lattice [43–46]. Moreover (with the exception of SM/Chol), the position (spacing) of peaks remained thermally more stable compared to the peaks in the absence of the peptide, especially for the contribution around 4.7 Å (Fig. 2G,H,I). Two particular cases were observed: the spacing changes at low temperature from 5 to 15 °C for PC and from 5 to 25 °C for PC/SM/Chol (Fig. 2G and H) and at higher temperature the spacing remains stabilised by the peptide.

Overall, these data show that penetratin induces stronger changes in liquid disordered membranes compared to the liquid ordered (raft) domains.

3.2. Changes in membrane lipids packing induced by penetratin

In order to study the effect of penetratin on membrane lipids compactness we used the environment probe laurdan. We showed previously that penetratin was able to induce phospholipid rigidity in PG and PE but not in PC membranes [34]. Herein, and in order to better understand the observed effect of penetratin on head group organisation (WAXD data) we studied the interaction of penetratin on well characterised DMPC membranes which organise in different phases: at 9 °C (gel phase), at 19 °C (rippled phase) and 30 °C (liquid phase) in the absence or in the presence of a negatively charged phospholipid (DMPC and DMPC/DMPG (9/1) respectively).

Fig. 3A shows an example of laurdan spectra of DMPC/DMPG LUVs at 30 °C in the presence and in the absence of penetratin. In DMPC membranes, penetratin showed a moderate effect in lipid packing depending on the lipid phases. As shown in Fig. 3B at low P/L ratio (1/50), penetratin only showed a decrease in lipids packing in the liquid phase (30 °C) and at higher P/L ratio (1/10), the effect in lipid compactness was stronger in the gel (9 °C), rippled (19 °C) and liquid (30 °C) phases.

In the presence of DMPG, a negative charged lipid that increases the affinity of penetratin to membranes, the penetratin effect in lipid

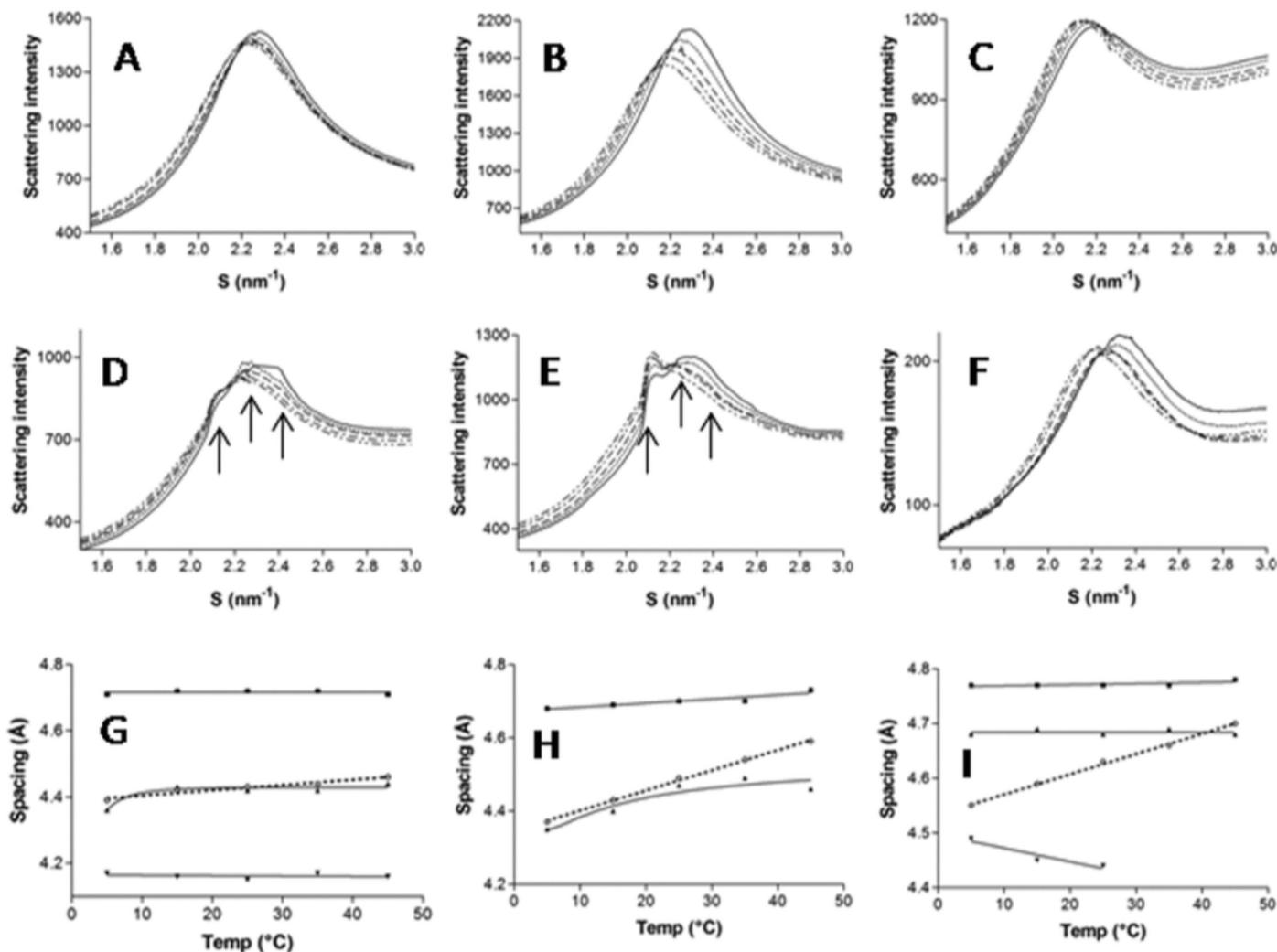


Fig. 2. WAXD profile as a function of the temperature in the presence and absence of penetratin. A; PC. B; PC/SM/Chol. C; SM/Chol/PG. D; PC in the presence of penetratin. E; PC/SM/Chol in the presence of penetratin. F; SM/Chol in the presence of penetratin at different temperatures (5 °C continuous line, 15 °C dotted line, 25 °C dashed line, 35 °C dotted-dashed line and 45 °C bi-dotted-dashed line). Notice the presence of three different contributions (arrows in D and E). G, H and I; spacing of the different contributions as a function of temperature in the absence of penetratin (○, dotted line) and the presence of the peptide. Peak a (■), Peak b (▲) and peak c (▼). G; PC. H; PC/SM/Chol and I; SM/Chol/PG.

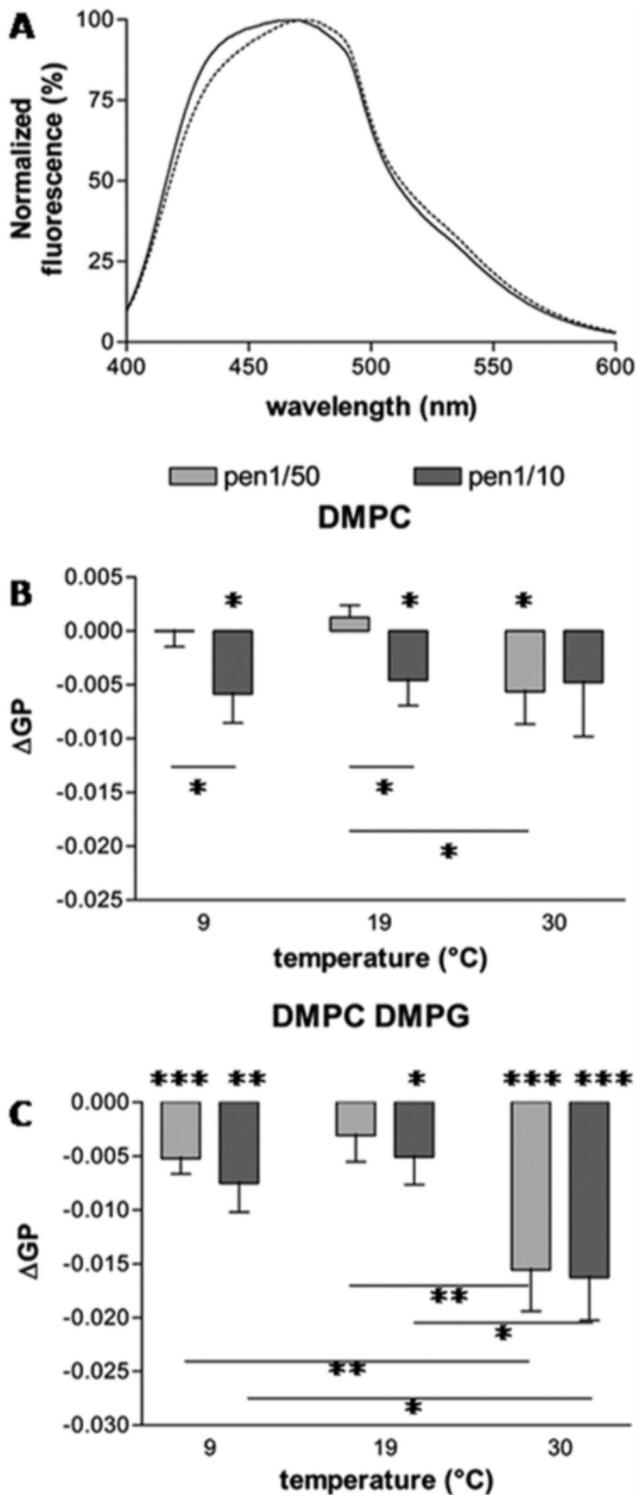


Fig. 3. Penetratin changes in membrane lipids compactness. A); Laurdan fluorescence spectrum of DMPC/DMPG (9/1) LUVs at 30 °C in the absence (continuous line) and the presence of penetratin at P/L ratio 1/10 (dotted line). B); Delta GPs of laurdan fluorescence spectra of DMPC. C); Delta GPs of laurdan fluorescence spectra of DMPC/PG (9/1). For B and C, membranes after penetratin addition at two different P/L (Peptide/Lipid) molar ratios and at three temperatures corresponding to the membranes in the gel (9 °C), rippled (19 °C) and liquid/phases (30 °C). The experiments were performed from 17 to 19 times. Bars represent the values with SE: *; $p > 0.05$. **; $p > 0.01$. ***; $p > 0.001$. Stars at the base of the bars are related to the difference between GP before and after addition of penetratin. Stars with lines are related to the comparison between different conditions.

packing was stronger. As shown in Fig. 3C, the decrease in compactness was observed for both P/L ratios but it was clear that the peptide-induced changes are stronger in liquid phase and are smaller in the

rippled phase. In order to further study the effect of penetratin on lipid organisation, we characterised the thermal lipid phase transitions: gel-rippled and rippled-liquid transition temperatures by DSC.

3.3. Penetratin induced changes in thermal transitions of the membrane

The results from the laurdan fluorescence and X-ray diffraction reveal that penetratin induces a different organisation in local regions of the phospholipid membranes. Thus, to clarify the penetratin effect on

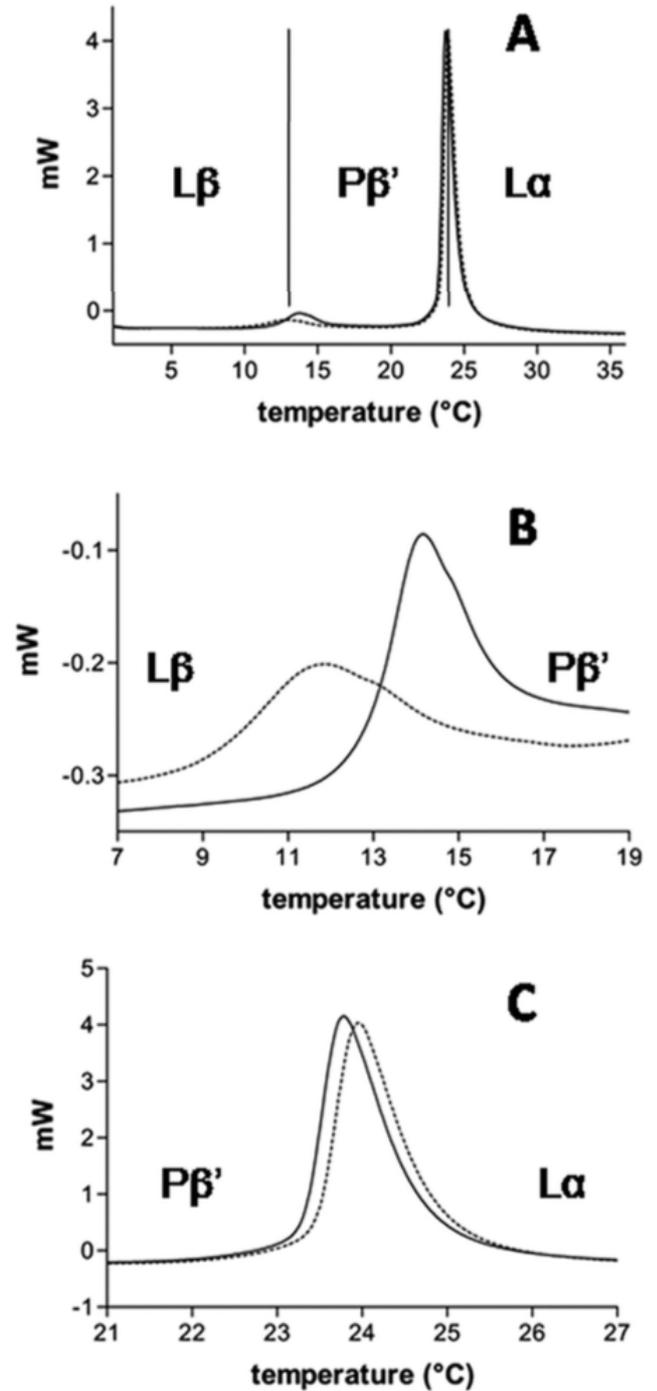


Fig. 4. Penetratin effects on the transition temperatures of DMPC/DMPG membranes. A); DSC profile of MLVs before and after addition of penetratin at P/L 1/50 molar ratio. B); Detail of the pre-transition temperatures (gel $L\beta$ to rippled $P\beta'$) of MLVs in the absence and the presence of penetratin at P/L 1/10. C); Detail of the transition temperatures (rippled $P\beta'$ to liquid $L\alpha$) of MLVs in the absence and the presence of penetratin at P/L 1/50. MLVs before (continuous lines) and after penetratin addition (dotted lines). The endothermic signals are pointing up.

Table 2
Thermodynamic parameters obtained by DSC for the interaction of penetratin with different MLVs^a.

MLV	P/L	T _{pre} (°C)	ΔH _{pre} (kJ/mol)	T _m (°C)	ΔH _m (kJ/mol)
DMPC	0	12.5 ± 0.37	2.7 ± 0.19	23.6 ± 0.24	21.0 ± 1.6
	1/50	12.4 ± 0.38	2.6 ± 0.23	23.6 ± 0.24	22.0 ± 1.0
	1/10	11.7 ± 0.33*	2.2 ± 0.18*	23.5 ± 0.15	19.4 ± 1.4
DMPC/DMPG	0	12.4 ± 0.19	1.9 ± 0.25	23.6 ± 0.15	18.0 ± 1.0
	1/50	11.5 ± 0.34*	1.2 ± 0.16*	23.7 ± 0.16**	18.0 ± 1.4
	1/10	10.5 ± 0.34***	1.0 ± 0.18**	23.7 ± 0.16*	19.5 ± 1.6
DPPC/DPPG	0	31.8 ± 0.30	1.9 ± 0.12	40.6 ± 0.17	22.7 ± 1.4
	1/50	32.0 ± 0.10	1.5 ± 0.20***	41.0 ± 0.10*	21.7 ± 1.7*
	1/10	29.7 ± 0.30***	1.1 ± 0.06***	40.5 ± 0.10	20.4 ± 0.9*

^a Values are mean values ± standard error. Experiments were performed from 7 to 11 times for DMPC and DMPC/DMPG membranes and from 3 to 5 experiments for DPPC/DPPG MLVs. Statistical significance were performed by comparison of membranes alone and in the presence of penetratin. (*p < 0.05. **p < 0.01. ***p < 0.001).

thermal stability on different lipid phases, we performed calorimetric experiments with DMPC, and DMPC/DMPG (9/1) membranes in the absence and in the presence of penetratin at 1/10 and 1/50 peptide/lipid molar ratios. The thermograms showed the typical two transition peaks (Fig. 4A). The temperature and enthalpy of transition values are reported in Table 2. For DMPC MLVs, a small peak for the pre-transition temperature (T_{pre}) (transition from Lβ' gel to the rippled Pβ' phases) was observed starting at 12.5 °C, and for the transition temperature (T_m) (Pβ' to Lα liquid state) at 23.6 °C, values in agreement with several reports [47–49]. After the addition of penetratin, there was no significant variation for the transition temperatures at low peptide concentration. However, for higher concentration, penetratin induced a significant shift in the pre-transition temperature to a lower value (11.7 °C). To figure out the effect of a negative charge in the membranes, MLVs were prepared with DMPC/DMPG (9/1). The transition temperatures in the absence of the peptide remained stable as compared with DMPC alone. Nevertheless, the penetratin effect was similar but more pronounced compared to DMPC membranes. The peptide induced a stronger shift of the pre-transition peak resulting in a decrease of the pre-transition temperature (10.5 °C) (Fig. 4B and Table 2). In addition, for DMPC/DMPG membranes we observed a very small but constant and significant increase in the transition temperature (Fig. 4B). These effects were observed at low and high concentration of penetratin, but were stronger at higher penetratin concentration (1/10 peptide/lipid molar ratio) with a temperature lowering of 1.9 °C for the Lβ'–Pβ' phase transition.

Concerning the enthalpy, we observed a significant decrease for MLVs with penetratin at high concentration during the pre-transition. This decrease in enthalpy is probably due to the increase in the peptide-induced heterogeneity of the sample by the introduction of different lamellar structures into the system.

In order to further study the peptide effect in the membranes, we prepared DPPC/DPPG membranes since the presence of DMPG induced stronger effects with DM-lipids. The results presented in Table 2 show a similar behaviour for DPPC/DPPG compared with DMPC/DMPG MLVs. Penetratin at higher concentration reduce the pre-transition temperature of 2.1 °C. We observed as well a lowering in enthalpy for the Lβ'–Pβ' phase transition.

4. Discussion

Studies of CPP-membrane interaction present a high appositeness in pharmaceutical application. To better elucidate the CPP capacity to translocate through membranes and then promote an appropriate biological response, the understanding of membrane lipid rearrangement induced by CPPs is relevant. This work is focused on penetratin peptide, which has been shown to induce membrane invaginations resulting in the formation of tubular structures [22,23,38]. The peptide induces

negative curvature of membrane, which could be crucial for cellular internalisation by tube and inverted micelles mechanisms [22]. Penetratin also had shown to acquire α-helix, β-sheet and coil conformations in different conditions [27–34,50,51].

To get more insight into the lipid rearrangements induced by penetratin, we analysed the physicochemical properties of membrane lipids after the addition of penetratin. Specifically, we characterised lipid rearrangements by X-ray diffraction, lipid packing by laurdan fluorescence and lipid phase transition by differential scanning calorimetry.

To perform the X-ray diffraction study, we chose different membranes. PC to mimic liquid disordered external leaflet domains, PC/PG (9/1) to study the effect of negative charge and SM/Chol (1/1), SM/Chol/PG (4/5/1) and PC/SM/Chol (1/1/1) to study pure raft, and heterogeneous cholesterol containing membranes. We observed, with the exception of SM/Chol membranes (raft), that penetratin induced membrane phase separation. This fact confirmed the precedent data showing that penetratin was unable to induce membrane tubulation in liquid ordered membranes [23]. A second interesting point from these experiments was the observation that after Penetratin addition, the resulting lamellar phases showed different temperature dependence. Particularly the lamellar phase of higher d-spacing showed to be more resistant to change the d-spacing in function of temperature. These penetratin effects were confirmed by WAXD analyses. The peptide induced a change in the WAXD signal from one single peak (probably a hexagonal lattice) to a peak containing three different contributions suggesting a distorted hexagonal organisation. Since WAXD experiment reflects the head polar group arrangement of phospholipids, we demonstrated that penetratin induce a re-organisation of lipids within the membranes. As for SAXD we observed that after a temperature increase, the lipid distances for one of the contributions induced by penetratin (around 4.7 Å) were more stable than the two others. In summary, the results from WAXD and SAXD experiments are correlated because after the penetratin addition, there were appearance of thermally stable peak in both, the polar head group distance (WAXD) and the lipid bilayer thickness (SAXD).

To study the lipid organisation thoroughly, we measured the compactness of the membrane lipids by laurdan fluorescence. Synthetic lipids were used here (DMPC and DMPC/DMPG) to obtain data of penetratin interaction on specific well-characterised membrane phases, which are stable at different temperatures (gel Lβ, rippled Pβ' and fluid Lα phases). The laurdan environment polarity increases with the increase of the polar head groups distance, producing a red shifted spectrum. Our data showed that penetratin induce a quite small change on DMPC membranes. In fact, the peptide decreases compactness only at a high peptide/lipid ratio. The changes were very small on the gel and rippled phases but stronger for the liquid phase. In the presence of 10% DMPG, which increases the affinity of penetratin for the membrane, the effect of penetratin on lipid packing was clear. We observed that penetratin induces a strong reduction of the lipids packing in the liquid phase. On the other hand, the effects were moderate for the gel phase and even smaller for the rippled phase. These results allow us to suggest that the interaction of penetratin with the Pβ' phase is naturally occurring. In other words penetratin adapts easily to this organisation inducing only a small change in lipid packing, since in the other phases penetratin trigger stronger changes in membrane compactness when interacting with them.

Then to better understand the penetratin effect on the different lamellar phases (gel, rippled and liquid), we performed DSC experiments, which allowed the study of the influence of the peptide on the transition temperatures between these different phases.

As shown in Table 2, the peptide decreased considerably the pre-transition temperature and slightly increased the transition temperature. As for the laurdan experiments, this perturbations in temperature were stronger for DMPC/DMPG than for DMPC membranes. These results were also observed for DPPC/DPPG membranes. Therefore, the peptide clearly favours the transition through the rippled phase in a

way to stabilise it. A very similar behaviour was also observed for the peptide S4(13)-PV with DPPC membranes [52].

The whole data presented here shows that penetratin is able to separate lamellar phases in a membrane and that these new phases acquire new thermal properties. Penetratin induces thermal stability of the “the novo” formed phases and the de-packing of saturated lipids. Moreover, the lipid packing experiments showed that the peptide perturbs the less the rippled phase which is in agreement with the calorimetry studies showing that the peptide seems to favour the rippled phase. Two models have been suggested for the lipid organisation of the rippled phase. The first proposed that the lipids were tilted with respect to the normal of the membrane with periodic ripples [53]. However, Tenchov [54] reported data showing the existence of two different P β ' phases, one being metastable. More recently, two groups published experimental and simulation data suggesting that the P β ' phase could be organised as two structurally related structures, one typically in the tilted gel state coexisting with a second more fluid responsible of the ripples within the lamella [44,45]. Our data is consistent with this hypothesis since penetratin seems to prefer the rippled phase and at the same time induces de-packing and phase separation. The capacity of the penetratin to modify the organisation of membrane lipids could be an important factor involved in its capacity to cross the plasma membrane. Notice that the penetratin effect reported does not indicate that the rippled phase is important for membrane translocation (this phase is not present in cellular membranes). We suggest that the penetratin-induced membrane heterogeneity when interacting with a homogeneous membrane could be involved in cell penetration. The stabilisation of the rippled phase deduced by the low effect on membrane compactness and the effect on transition temperatures support this hypothesis on the importance of membrane heterogeneity, because the rippled phase is a heterogeneous structure in which gel and liquid contributions coexist. How this membrane heterogeneity would be involved in cellular peptide penetration? The penetratin would take advantage of the presence of mismatches, defects or discontinuities on the membrane between the pre-existent or the peptide-induced membrane phases (*i.e.* membrane domains) of different thickness and physical properties. Further experiments with biological membranes will be necessary to test this interesting hypothesis.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmem.2016.07.012>.

Acknowledgements

Claude Wolf, Cedric Tessier and Ofelia Maniti for useful discussions, X-ray diffraction facility at Spring8 (Japan). This work was supported by CNRS and an ANR-PCV grant.

References

- [1] A. Joliot, C. Pernelle, H. Deagostini-Bazin, A. Prochiantz, Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (1991) 1864–1868.
- [2] F. Perez, P.M. Lledo, D. Karagogeos, J.D. Vincent, A. Prochiantz, J. Ayala, Rab3A and Rab3B carboxy-terminal peptides are both potent and specific inhibitors of prolactin release by rat cultured anterior pituitary cells, *Mol. Endocrinol.* 8 (1994) 1278–1287.
- [3] D. Derossi, A.H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz, The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 10444–10450.
- [4] A. Ziegler, Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 580–597.
- [5] G. Drin, S. Cottin, E. Blanc, A.R. Rees, J. Tamsamani, Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 31192–31201.
- [6] F. Duchardt, M. Fotin-Mleczek, H. Schwarz, R. Fischer, R. Brock, A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides, *Traffic* 8 (2007) 848–866.
- [7] H. Binder, G. Lindblom, Charge-dependent translocation of the Trojan peptide penetratin across lipid membranes, *Biophys. J.* 85 (2003) 982–995.
- [8] J.B. Rothbard, T.C. Jessop, R.S. Lewis, B.A. Murray, P.A. Wender, Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 9506–9507.
- [9] D. Derossi, S. Calvet, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassaing, A. Prochiantz, Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 18188–18193.
- [10] Y. Su, R. Mani, M. Hong, Asymmetric insertion of membrane proteins in lipid bilayers by solid-state NMR paramagnetic relaxation enhancement: a cell-penetrating peptide example, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 8856–8864.
- [11] G.P. Dietz, M. Bahr, Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach, *Mol. Cell. Neurosci.* 27 (2004) 85–131.
- [12] R. Fischer, M. Fotin-Mleczek, H. Hufnagel, R. Brock, Break on through to the other side—biophysics and cell biology shed light on cell-penetrating peptides, *ChemBiochem* 6 (2005) 2126–2142.
- [13] M. Mae, U. Langel, Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery, *Curr. Opin. Pharmacol.* 6 (2006) 509–514.
- [14] C.L. Murriel, S.F. Dowdy, Influence of protein transduction domains on intracellular delivery of macromolecules, *Expert Opin. Drug Deliv.* 3 (2006) 739–746.
- [15] M. Di Pisa, G. Chassaing, J.M. Swiecicki, Translocation mechanism(s) of cell-penetrating peptides: biophysical studies using artificial membrane bilayers, *Biochemistry* 54 (2015) 194–207.
- [16] D. Terrone, S.L. Sang, L. Roudaia, J.R. Silvius, Penetratin and related cell-penetrating cationic peptides can translocate across lipid bilayers in the presence of a transbilayer potential, *Biochemistry* 42 (2003) 13787–13799.
- [17] M. Magzoub, A. Pramanik, A. Graslund, Modeling the endosomal escape of cell-penetrating peptides: transmembrane pH gradient driven translocation across phospholipid bilayers, *Biochemistry* 44 (2005) 14890–14897.
- [18] F. Madani, A. Peralvarez-Marín, A. Graslund, Liposome model systems to study the endosomal escape of cell-penetrating peptides: transport across phospholipid membranes induced by a proton gradient, *J. Drug Delivery* 2011 (2011) 897592.
- [19] J. Bjorklund, H. Biverstahl, A. Graslund, L. Maler, P. Brzezinski, Real-time transmembrane translocation of penetratin driven by light-generated proton pumping, *Biophys. J.* 91 (2006) L29–L31.
- [20] J.M. Swiecicki, A. Bartsch, J. Tailhades, M. Di Pisa, B. Heller, G. Chassaing, C. Mansuy, F. Burlina, S. Lavielle, The efficacies of cell-penetrating peptides in accumulating in large unilamellar vesicles depend on their ability to form inverted micelles, *ChemBiochem* 15 (2014) 884–891.
- [21] P.E. Thoren, D. Persson, M. Karlsson, B. Norden, The antennapedia peptide penetratin translocates across lipid bilayers - the first direct observation, *FEBS Lett.* 482 (2000) 265–268.
- [22] A. Lamaziere, F. Burlina, C. Wolf, G. Chassaing, G. Trugnan, J. Ayala-Sanmartin, Non-metabolic membrane tubulation and permeability induced by bioactive peptides, *PLoS One* 2 (2007), e201.
- [23] A. Lamaziere, C. Wolf, O. Lambert, G. Chassaing, G. Trugnan, J. Ayala-Sanmartin, The homeodomain derived peptide Penetratin induces curvature of fluid membrane domains, *PLoS One* 3 (2008), e1938.
- [24] A. Lamaziere, G. Chassaing, G. Trugnan, J. Ayala-Sanmartin, Transduction peptides: structural-functional analyses in model membranes, *J. Soc. Biol.* 200 (2006) 229–233.
- [25] O. Maniti, E. Blanchard, G. Trugnan, A. Lamaziere, J. Ayala-Sanmartin, Metabolic energy-independent mechanism of internalization for the cell penetrating peptide penetratin, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44 (2012) 869–875.
- [26] O. Maniti, H.R. Piao, J. Ayala-Sanmartin, Basic cell penetrating peptides induce plasma membrane positive curvature, lipid domain separation and protein redistribution, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 50C (2014) 73–81.
- [27] E. Bellet-Amalric, D. Blaudez, B. Desbat, F. Graner, F. Gauthier, A. Renault, Interaction of the third helix of Antennapedia homeodomain and a phospholipid monolayer, studied by ellipsometry and PM-IRRAS at the air-water interface, *Biochim. Biophys. Acta* 1467 (2000) 131–143.
- [28] C.E. Caesar, E.K. Esbjorner, P. Lincoln, B. Norden, Membrane interactions of cell-penetrating peptides probed by tryptophan fluorescence and dichroism techniques: correlations of structure to cellular uptake, *Biochemistry* 45 (2006) 7682–7692.
- [29] B. Christiaens, S. Symoens, S. Verheyden, Y. Engelborghs, A. Joliot, A. Prochiantz, J. Vandekerckhove, M. Rosseneu, B. Vanloo, Tryptophan fluorescence study of the interaction of penetratin peptides with model membranes, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 2918–2926.
- [30] M. Magzoub, L.E. Eriksson, A. Graslund, Conformational states of the cell-penetrating peptide penetratin when interacting with phospholipid vesicles: effects of surface charge and peptide concentration, *Biochim. Biophys. Acta* 1563 (2002) 53–63.
- [31] M. Magzoub, K. Kilk, L.E. Eriksson, U. Langel, A. Graslund, Interaction and structure induction of cell-penetrating peptides in the presence of phospholipid vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* 1512 (2001) 77–89.
- [32] D. Persson, P.E. Thoren, P. Lincoln, B. Norden, Vesicle membrane interactions of penetratin analogues, *Biochemistry* 43 (2004) 11045–11055.
- [33] D. Persson, P.E. Thoren, B. Norden, Penetratin-induced aggregation and subsequent dissociation of negatively charged phospholipid vesicles, *FEBS Lett.* 505 (2001) 307–312.
- [34] O. Maniti, I. Alves, G. Trugnan, J. Ayala-Sanmartin, Distinct behaviour of the homeodomain derived cell penetrating peptide penetratin in interaction with different phospholipids, *PLoS One* 5 (2010), e15819.
- [35] K. Simons, M.J. Gerl, Revitalizing membrane rafts: new tools and insights, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11 (2010) 688–699.
- [36] D. Persson, P.E. Thoren, M. Herner, P. Lincoln, B. Norden, Application of a novel analysis to measure the binding of the membrane-translocating peptide penetratin to negatively charged liposomes, *Biochemistry* 42 (2003) 421–429.

- [37] A. Andersson, J. Almqvist, F. Hagn, L. Maler, Diffusion and dynamics of penetratin in different membrane mimicking media, *Biochim. Biophys. Acta* 1661 (2004) 18–25.
- [38] A. Lamaziere, G. Chassaing, G. Trugnan, J. Ayala-Sanmartin, Tubular structures in heterogeneous membranes induced by the cell penetrating peptide penetratin, *Commun. Integr. Biol.* 2 (2009) 223–224.
- [39] M. Zibouche, M. Vincent, F. Illien, J. Gallay, J. Ayala-Sanmartin, The N-terminal domain of annexin 2 serves as a secondary binding site during membrane bridging, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 22121–22127.
- [40] F. Illien, H.R. Piao, M. Coue, C. di Marco, J. Ayala-Sanmartin, Lipid organization regulates annexin A2 Ca²⁺-sensitivity for membrane bridging and its modulator effects on membrane fluidity, *Biochim. Biophys. Acta* 1818 (2012) 2892–2900.
- [41] A. Lamaziere, O. Maniti, C. Wolf, O. Lambert, G. Chassaing, G. Trugnan, J. Ayala-Sanmartin, Lipid domain separation, bilayer thickening and pearling induced by the cell penetrating peptide penetratin, *Biochim. Biophys. Acta* 1798 (2010) 2223–2230.
- [42] W. Zhang, S.O. Smith, Mechanism of penetration of Antp(43–58) into membrane bilayers, *Biochemistry* 44 (2005) 10110–10118.
- [43] K. Harlos, Pretransitions in the hydrocarbon chains of phosphatidylethanolamines. A wide angle X-ray diffraction study, *Biochim. Biophys. Acta* 511 (1978) 348–355.
- [44] T. Heimburg, A model for the lipid pretransition: coupling of ripple formation with the chain-melting transition, *Biophys. J.* 78 (2000) 1154–1165.
- [45] M. Rappolt, G. Pabst, G. Rapp, M. Kriechbaum, H. Amenitsch, C. Krenn, S. Bernstorff, P. Laggner, New evidence for gel-liquid crystalline phase coexistence in the ripple phase of phosphatidylcholines, *Eur. Biophys. J.* 29 (2000) 125–133.
- [46] W.P. Williams, B.A. Cunningham, D.H. Wolfe, G.E. Derbyshire, G.R. Mant, W. Bras, A combined SAXS/WAXS investigation of the phase behaviour of di-polyenoic membrane lipids, *Biochim. Biophys. Acta* 1284 (1996) 86–96.
- [47] I.D. Alves, N. Goasdoue, I. Correia, S. Aubry, C. Galanth, S. Sagan, S. Lavielle, G. Chassaing, Membrane interaction and perturbation mechanisms induced by two cationic cell penetrating peptides with distinct charge distribution, *Biochim. Biophys. Acta* 1780 (2008) 948–959.
- [48] M.J. Janiak, D.M. Small, G.G. Shipley, Nature of the thermal pretransition of synthetic phospholipids: dimyristoyl- and dipalmitoyllecithin, *Biochemistry* 15 (1976) 4575–4580.
- [49] M.L. Jobin, P. Bonnafous, H. Temsamani, F. Dole, A. Grelard, E.J. Dufourc, I.D. Alves, The enhanced membrane interaction and perturbation of a cell penetrating peptide in the presence of anionic lipids: toward an understanding of its selectivity for cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1828 (2013) 1457–1470.
- [50] E. Eiriksdottir, K. Konate, U. Langel, G. Divita, S. Deshayes, Secondary structure of cell-penetrating peptides controls membrane interaction and insertion, *Biochim. Biophys. Acta* 1798 (2010) 1119–1128.
- [51] Y. Su, R. Mani, T. Doherty, A.J. Waring, M. Hong, Reversible sheet-turn conformational change of a cell-penetrating peptide in lipid bilayers studied by solid-state NMR, *J. Mol. Biol.* 381 (2008) 1133–1144.
- [52] A.M. Cardoso, S. Trabulo, A.L. Cardoso, A. Lorents, C.M. Morais, P. Gomes, C. Nunes, M. Lucio, S. Reis, K. Padari, M. Pooga, M.C. Pedroso de Lima, A.S. Jurado, S4(13)-PV cell-penetrating peptide induces physical and morphological changes in membrane-mimetic lipid systems and cell membranes: implications for cell internalization, *Biochim. Biophys. Acta* 1818 (2012) 877–888.
- [53] A. Tardieu, V. Luzzati, F.C. Reman, Structure and polymorphism of hydrocarbon chains of lipids - study of lecithin-water phases, *J. Mol. Biol.* 75 (1973) 711–8.
- [54] B.G. Tenchov, H. Yao, I. Hatta, Time-resolved x-ray diffraction and calorimetric studies at low scan rates: I. Fully hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and DPPC/water/ethanol phases, *Biophys. J.* 56 (1989) 757–768.

ANNEXE F :

Article 2 :

Cholesterol-pyrene as a probe for cholesterol distribution on membranes: determination of spectral wavelengths by principal component analysis

Soumis

Cholesterol-pyrene as a probe for cholesterol distribution on membranes: determination of spectral wavelengths by principal component analysis

Claudia Almeida^a, Anaëlle De Wreede^a, and Jesus Ayala-Sanmartin^{a,*}

^a CNRS, Sorbonne Universités, École Normale Supérieure, Laboratoire des Biomolécules (LBM), Paris France.

* Corresponding author: J. Ayala-Sanmartin, CNRS, UMR 7203, Laboratoire des Biomolécules, 4 Place Jussieu, BP 182, 75252 Paris, France. Tel: 33 1 44 27 32 16. Fax: 33 1 44 27 71 50. E-mail: jesus.ayala-sanmartin@upmc.fr

Abstract. Biological membranes are heterogeneous with their lipids compartmentalized in different microdomains. Cholesterol promotes the formation of membrane ordered domains by its affinity for saturated lipids. Membrane domains had been studied with fluorescent probes linked to specific phospholipids and proteins. However, the cholesterol distribution and movement had been less studied due to the lack of efficient cholesterol probes. Herein, we describe the characterisation of a cholesterol-pyrene probe (py-met-chol) in heterogeneous phospholipids membranes. We characterised the pyrene fluorescent spectrum in liquid ordered (Lo) and liquid disordered (Ld) membranes and, by using a statistical principal component analyses, we have found the best wavelengths for membrane domains studies. 373 nm is the liquid ordered marker, and 379 nm the liquid disordered marker. For cholesterol multimers quantification we used the excimers peak (474 nm). The best parameter for cholesterol characterisation in Lo or Ld domains is the 373/379 ratio. In liquid ordered membranes, at low temperature cholesterol is found as multimers and as monomers. At high temperature, the Lo character of the membrane decreases and cholesterol tends to aggregate with a reduction of the Lo domains size. In liquid disordered membranes cholesterol is present mostly as monomers but excimers are present in small ordered domains. Rising the temperature provokes the accumulation of cholesterol in small Lo domains. The capacity of py-met-chol to be used as a cholesterol probe was tested by the ceramide effect on membranes which showed that ceramide increases the Lo character of the membrane suggesting the formation of Cer/Chol and SM/Chol domains.

Keywords: Ceramide, Cholesterol, marker wavelengths, membrane domains, principal component analysis, pyrene fluorescence.

Abbreviations: Cer, ceramide; Chol, cholesterol; Ld, liquid disordered membrane domain; Lo, liquid ordered membrane domain; LUV, large unilamellar vesicle; PC, L- α -phosphatidylcholine; py-met-chol, pyrene-labelled methyl cholesterol; SM, sphingomyelin.

1. Introduction

The cell membrane lipids are not randomly distributed but they form different membrane domains thanks to specific lipid-lipid and lipid-protein affinities. This membrane domains heterogeneity seems to have an important role in membrane organisation and in several cell functions as suggested by numerous experimental data (for reviews see (Goñi 2014; D. Lingwood et al. 2008; Pike 2004)). The modulatory effects of cellular functions by lipid composition and membrane domain separation seem to be directly related to the physico-chemical properties of the different domains such as lipid compaction and fluidity.

Upon different membrane lipids, cholesterol is the most important regulator and inducer of membrane domains separation. Its participation in the formation of the so called “raft domains” which are cholesterol and sphingomyelin rich membrane domains is strongly supported by different experimental data using membrane models as well as in cell membranes (D A Brown and London 1998b; Chachaty et al. 2005; Levental et al. 2009; Tessier et al. 2009b; Veatch and Keller 2002) and molecular dynamics simulations (Schmid 2017c; Wang et al. 2016). The cholesterol ability to induce the formation of membrane domains is related to its stronger affinity for saturated lipid acyl chains compared to that for non-saturated chains (Huster, Arnold, and Gawrisch 1998; Lagane et al. 2002; Shaikh et al. 2002). It has been demonstrated that cholesterol has a tendency to be excluded from cis-unsaturated PC and that its “ordering” effect is weaker compared to that with saturated PC (Huster, Arnold, and Gawrisch 1998; Pasenkiewicz-Gierula, Subczynski, and Kusumi 1991). “Rafts” are the best characterized membrane domains. They are rich in sphingomyelin and cholesterol. They are more “ordered” (liquid ordered domains, Lo) and the raft membrane bilayer is usually thicker than the surrounding liquid disordered domains (Ld).

These ordered domains are not only dependent on sphingomyelin and it has been reported a strong affinity of cholesterol for other saturated lipids including PC containing saturated acyl chains (Huster, Arnold, and Gawrisch 1998) and ceramide. Ceramide is the product of the enzymatic cleavage of sphingomyelin by the enzyme sphingomyelinase (SMase) which is secreted by the cells in pathologies involving apoptosis such as cancer. The substitution of sphingomyelin by ceramide in model membranes or by sphingomyelinase enzymatic activity results in the modification of Lo domains (Busto et al. 2010; Silva, Futerman, and Prieto 2009a; Taniguchi et al. 2006). It had been proposed that ceramide and cholesterol compete for raft association mainly to the limited capacity of raft lipids with large head-groups to accommodate ceramide or cholesterol which have small head-groups (London and London 2004).

The liquid ordered and liquid disordered membrane domains distribution has been studied by different approaches some of them including fluorescent probes “specific” for different domains. For example the fluidity has been studied with environmental probes as Laurdan (Almeida et al. 2016; Bagatolli 2006; Sezgin et al. 2015), and Lo Ld domains with fluorescent lipids (Di-Q, C6-NBD-SM, rho-DOPE) (M. Hao, Mukherjee, and Maxfield 2001; Lamaziere et al. 2009; Levental et al. 2009; Pinto et al. 2013b). However, the specific cholesterol distribution has been less studied because of the lack of good cholesterol probes. To our knowledge, the cholesterol-pyrene probe described by Le Guyader and collaborators (L. Le Guyader et al. 2007) is the less disturbing cholesterol-modified probe available. Pyrene is a fluorescent probe that is sensitive to both, the environment (polarity, dielectric constant of the solvent, etc.), and to probe clustering. When two probe molecules are close enough, a fluorescence signal peak rises at about 475 nm (430-550 nm spectral contribution of dimeric-multimeric pyrene molecules; excimer signal). Therefore it is possible to follow changes in environment and in molecular aggregation of lipids and has also been successfully used to detect protein-protein interactions (Ayala-Sanmartin et al. 2008; Y. Barenholz et al. 1996; Chong, Tang, and Sugar 1994). However the pyrene fluorescence spectra is quite complex. The 360-430 nm part of the spectrum is considered as the contribution of the pyrene molecule in its monomeric state. There are at least 16 vibronic bands in the interval 371-397 nm (Kalyanasundaram and Thomas 1977) which result in at least five peaks in conventional spectra. Pyrene probe has been studied by different groups with different conclusions and recommendations concerning the wavelengths used as markers. 376 and 383 nm have been used for solvent or environment “polarity” (L. Le Guyader et al. 2007; Kalyanasundaram and Thomas 1977). Other wavelengths have been considered as more “constant” or independent of the polarity of the environment such as 373, 376, 378, 388, 393 and 396 nm (Chong, Tang, and Sugar 1994; L. Le Guyader et al. 2007; Kalyanasundaram and Thomas 1977; Kim and Torkelson 2002; F. M. Winnik et al. 1992a) and had been used for

quantification of monomeric species. There is no obvious consensus because of the complex behaviour of the peaks intensities responding to the “polarity”, dielectric constant, dipole moment and geometries of the solvents and the environmental molecules in contact with pyrene and thermal agitation (Kalyanasundaram and Thomas 1977; Lianos and Georghiou 1979; Waris, Acree, and Street 1988).

Considering that the cholesterol-pyrene (Py-met-chol) membrane behaviour is similar to the cholesterol (L. Le Guyader et al. 2007), making the best cholesterol-labelled probe to our knowledge, and in order to study the cholesterol changes in membranes, we performed different spectral analyses on membranes in the liquid ordered as well as in the liquid disordered states at different temperatures. We used lipids from biological sources with heterogeneous acyl chains, to mimic the biological membranes. Instead of trying to look at changes in “polarity” by using spectral peak variations in intensity, we decided first to define the marker wavelengths corresponding specifically to the liquid ordered Lo or disordered Ld domains, to study cholesterol behaviour in heterogeneous membranes. In order to find the Lo and Ld markers, we performed a multivariate analysis using Lo (PC) and Ld (SM/Chol) membranes at different temperatures. Second, we analysed the behaviour of the ratios of this wavelengths and compared them to the previously suggested methods and the data from the literature. Third, we compared the parameters of the Lo and Ld membranes using mixed membranes in which Lo and Ld phases coexist. Fourth, we characterized the movement of the probe by anisotropy and finally, we studied the competition between sphingomyelin and ceramide for cholesterol. The presented data show that the py-met-chol is a very good molecule to study cholesterol multimerisation and distribution in lipid bilayers with the capacity to discern between Lo and Ld membranes by using the recommended wavelengths.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Egg yolk L- α -phosphatidylcholine (PC), egg sphingomyelin (SM) and cholesterol (Chol) were purchased from Sigma. Ceramide (Cer) was from Enzo life sciences, pyrene-labelled cholesterol (Py-met-chol) was a kind gift of Dr. André Lopez (Toulouse, France).

2.2. LUV preparation and incubation conditions

The appropriate amounts of lipids in a mixture of chloroform/methanol, 4/1 (v/v), were subjected to solvent evaporation. Large unilamellar vesicles (100 nm diameter LUVs) were prepared by extrusion in 0.5 mM HEPES buffer (pH 7.4) as described in (O. Maniti et al. 2010). The lipids were added at the desired proportions to obtain a suspension of 1 mg ml⁻¹ LUVs in buffer. Py-met-chol was present at 1.8 or 3.6% lipid weight ratio.

After LUV preparation, the samples were kept at 4°C for several hours or overnight. To analyse the cholesterol changes depending on temperature we used two protocols. The heating protocol started from samples at 4°C which were prepared in the quartz cell and measured in the fluorimeter from 10 to 55°C. Fluorescence spectra were recovered by 5°C steps. For the cooling protocol the samples were heated fast at 55°C and then cooled by 5°C steps to 10°C in the fluorimeter.

2.3. Fluorescence

Pyrene fluorescence spectra acquisitions were performed with a Jasco fluorimeter as previously described (O. Maniti, Piao, and Ayala-Sanmartin 2014). Emission spectra were recorded from 360 to 600 nm using a 335 nm excitation wavelength. The excitation and emission band-pass were set at 5 nm and 2.5 nm respectively. 150 μ l of buffer containing 2.5 μ g of LUVs were added to a Hellma high precision quartz cell. The temperature was regulated with a Peltier device. Spectra were obtained by duplicate and the buffer background was subtracted. The spectra were normalized by the integral. Fluorescence anisotropy was characterized as previously described (Ayala-Sanmartin et al. 2000) by using the equation

$$r = (v_v - Gv_h)/(v_v + 2Gv_h)$$

in which the v_v and v_h are the emission light intensities with the polarizers in different configurations (excitation-emission) and the G instrumental correction factor was defined as h_v/h_h and calculated for all wavelengths.

2.4. Data analysis

The principal component analysis (PCA) of integral-normalized spectra treated as a multivariate (wavelength) set of data was performed with SIMCA software.

The statistical treatment of experiments was performed with GraphPad Prism software. Graphs are given as means \pm standard error.

3. Results and discussion

The Py-met-chol probe has been studied in model and biological membranes (L. Le Guyader et al. 2007). These authors suggested to study the environmental polarity by measuring the peak at 376 nm and cholesterol aggregation by measuring the 475 excimers peak. Moreover, they suggested to use the peak at 388 nm as a constant marker because in their conditions it depends only on concentration of the probe. However, to study pyrene fluorescence other authors used different wavelengths. Briefly, the reports suggest 376 and 378 for polarity markers, wavelengths from 379 to 488 for excimer contribution. 388 as constant and 393 to 398 and 421 as “monomer” signal (Y. Barenholz et al. 1996; Chong, Tang, and Sugar 1994; L. Le Guyader et al. 2007; Kim and Torkelson 2002; Wilson-Ashworth et al. 2006; F. M. Winnik et al. 1992a). In fact, the part of the spectrum in the range of 360 to 420 nm is composed of at least five principal peaks presenting a very complex behaviour in solvents of different polarity and dielectric constant precluding a consensual hierarchical classification of peaks in function of “polarity”. This part of the spectrum is specific of the monomeric state of the pyrene molecule. Kalyanasundaram and collaborators (Kalyanasundaram and Thomas 1977) found at least 5 peaks very sensitive which correspond to some of the 16 vibronic bands found in the 370 to 397 nm region of the spectrum. Moreover, the fluorescence intensity changes due to thermal agitation are also different for the different pyrene bands (Waris, Acree, and Street 1988).

Considering this, and in order to study the cholesterol movement in its natural environment, thus inside cellular mimicking membranes, we decided to study first the spectra in liquid ordered and liquid disordered membranes to define the “marker” wavelengths that make the difference between these domains as well as the constant point. Therefore, we performed the experiments with PC (Ld phase) and SM/Chol (1/1) (Lo phase) membranes with lipids of natural sources. This is important to notice for two reasons; first, the fact that we try to understand the cholesterol behaviour in normal biological conditions, and second because the membranes are composed of lipids with heterogeneous acyl chains (saturated and unsaturated). We used Py-met-chol at

two concentrations (1.8 and 3.6%) which are in the range recommended in (L. Le Guyader et al. 2007). It is known that the Ld phase is quite fluid and therefore it is very sensitive to temperature changes (ie membrane thickness). The Lo phase which is less fluid shows only temperature-induced small changes in membrane thickness compared to Ld phases (D A Brown and London 1998b; Chachaty et al. 2005; Tessier et al. 2009b). Therefore, to better understand cholesterol behaviour, the experiments were performed at different temperatures using the heating and cooling protocols (see methods 2.2).

3.1. Comparison of spectral behaviour after heating and cooling

To avoid small artefacts comparing the different experiments we normalized all the spectra by their integral. Fig S1 (supplementary material) shows the mean spectra from PC and SM/Chol LUVs at different temperatures after heating and cooling. It is clear that for a specific temperature the spectrum shape changes depending on the heating or cooling protocols. For example, the quantity of excimers (474 nm) at 10°C is higher before heating and lower after cooling. At 55°C the excimer signal is lower after heating and higher before cooling. However, at 35°C the spectral difference between heating and cooling protocols are small.

One simple comparison method to observe the difference between the Py-met-chole probe in Lo and Ld membranes is based in spectra subtraction. We performed subtractions at different temperatures and after heating or cooling. This approach was not very conclusive because we did not find a constant pattern in the different conditions tested (Fig S2). Therefore, to find statistically significant specific marker wavelengths for Lo and Ld membranes in the conditions tested we performed a multivariate principal component analysis.

3.2. Definition of specific wavelengths for Lo and Ld membranes

In order to define specific wavelength markers for Lo and Ld phases we compared the spectra of Py-met-chole in PC and SM/Chol (1/1) membranes at temperatures from 10 to 55°C by heating and cooling procedures. Py-met-chole was present at 1.8 or 3.6%. We compared 4 independent preparations of PC LUVs and 5 for SM/Chol LUVs containing Py-met-chole at 1.8% and 7 independent preparations PC LUVs and 10 for SM/Chol LUVs containing Py-met-chole at 3.6% which result in comparison of 560 spectra, cooling and heating included. The variables were the spectral intensities of integral normalized wavelengths from 365 to 550 nm (185 variables). We performed both, principal components analysis (PCA) and orthogonal partial least square-discriminant analysis (OPLS-DA). Using the different tools of the program SIMCA such as component contribution of variables, variable importance of the projection (VIP), biplot (scores vs loadings), S-plots (covariance and correlation) and group-to-group comparisons we were able to obtain the candidate variables (wavelengths) that make the difference between the Lo and Ld membranes. After a first analysis, we choose 8 new variables corresponding to higher scores and the iso-emissive point and also the three variables recommended for py-met-chole. Fig 1 show the score and loading representations from SIMCA analysis for the 11 choose variables. Notice that two populations are clearly separated (PC vs SM/Chol) and that for each membrane composition the difference between cooling and heating protocols is small (Fig 1A). The separation of PC and SM/Chol points follows mainly the x-axis. Fig 1B shows the correlation plane of variables for the same components in Fig 1A. The variables (wavelengths) that are opposite in the x-axis direction are 373 and 379 nm this indicate that they are anti-correlated. This means that the population of PC correlates with an increase in 379 nm and a decrease in 373, and inversely, the SM/Chol with an increase of 373 and a decrease in 379. Moreover, these two wavelengths does not correspond to a conventional spectral peak but correspond to the specific vibronic bands 372.51 and 378.99 (Kalyanasundaram and Thomas 1977). In fact the peak

376 previously used as marker of “polarity” does not correspond to any vibronic band but is the result of four vibronic bands. Our analyses suggest that these wavelengths can be considered as markers of Lo and Ld environments. Therefore, to validate the markers we performed detailed comparisons of these parameters for the Lo (SM/Chol) and Ld (PC) membranes. The wavelengths chosen for the following comparisons of data are resumed in table 1.

3.3. Comparison between Lo and Ld membranes.

Fig 2 represents the temperature evolution of the wavelength intensities of interest for PC and SM/Chol LUVs in the presence of Py-met-cholesterol at 3.6%. Similar behaviour was observed for the LUVs with 1.8% probe concentration (Fig S3). For the Ld marker (379 nm) we observed that at low temperatures the values are high for PC and low for SM/Chol membranes (Fig 2A). This is expected for an Ld marker. However, the increase in temperature which increases membrane fluidity induces a diminution of the 379 intensity. This behaviour seems a paradox but is mainly due to the diminution of fluorescence in this zone of the spectra by the increase in excimer fluorescence intensity. The evolution of the Lo marker (373nm) (Fig 2B) shows that the values for SM/Chol membranes are high than for PC membranes at all temperatures in agreement with the fact that the Lo phases are more thermic-stable than the Ld phases. For the previously considered constant peak which was suggested to depend only on probe concentration (388 nm) (Fig 2C), we observed that its behaviour was quite different in PC and SM/Chol LUVs indicating that it is also sensitive to other environmental factors such as polarity. On the contrary, the iso-emissive point (432 nm) (Fig 2D) showed small variations in intensity and can be considered the constant point of the spectra. The polarity “marker” previously reported (376 nm) (Fig 2E) was compared with other wavelength more sensitive to phases (401 nm) (Fig 2F). We observed a similar behaviour with the difference that 401 nm is able to distinguish the difference in “polarity” between PC and SM/Chol whereas 376 nm behaviour is similar for both membranes in contradiction with his polarity sensing property. Notice also that the 401 nm is quite similar to the 388 nm a fact that questions the validity of 388 nm as a “constant” peak. Finally, the evolution of excimers (474 nm) (Fig 2G) shows that at low temperature the quantity of Py-met-cholesterol multimers in SM/Chol membranes is higher than in PC membranes. The increase in temperature induces an increase in excimers for both LUVs. To avoid misinterpretations due to thermic and excimer driven fluorescence diminution and other artefacts we performed ratiometric analyses of the data.

As shown in Fig 3A,B (see Fig 4S for py-met-cholesterol at 1.8%), the temperature evolution ratios Ld/iso and Lo/iso are very similar to those of Lo and Ld (compare with Fig 2). Strong differences are observed when we compared the I1/I3 which was supposed to characterize the evolution of polarity and pol/iso (Fig 3C,D and S4). In fact, the I3 peak is not really exclusively dependent on probe concentration and its intensity varies according to the environment. This is why the slope I1/I3 is smaller than that of pol/iso (401nm) which present a behaviour closer to the curve Ld/iso. Therefore, we suggest that the iso-emissive correction is more adequate to represent a constant concentration independent spectral point. The concept of polarity in the membrane bilayer is quite difficult to interpret and we did not use this parameter but “polarity” seems to be represented by the Ld/iso ratio (Fig 3A). When comparing the exci/I3 and exci/iso ratios it is evident also that the iso-emissive point is more accurate to follow the probe multimerisation (Fig 3E,F and S4). Using the exci/I3 parameter the excimer formation seems to increase continuously when increasing the temperature. On the contrary, the exci/iso ratio shows that the excimer formation arrives to a plateau, a fact more consistent with what we expect from membrane properties. Overall, the data suggest that to characterize the membrane domains it is necessary to look at the evolution of Lo/iso and Ld/iso and exci/iso markers.

To evaluate accurately the evolution of cholesterol in membranes we suggest to look at two principal parameters; the Lo/Ld ratio which indicates the proportion of the two domains in the membranes, and the exci/iso ratio that indicates the degree of cholesterol association or dissociation. The behaviour of excimer formation (Fig 3F and S4F) shows that at low temperature the quantity of excimers is higher in SM/Chol than in PC LUVs. After temperature increase, the amount of excimers in SM/Chol increase but in a small proportion (about 15-20%) because by heating, only a small proportion of Lo phase is converted to an Ld phase and because cholesterol is able to move to the temperature resistant Lo domains. This is consistent with the fact that the SM/Chol membranes show less temperature sensitivity compared to the PC membranes. In other words, the Lo domains resist to high temperature but became smaller and the cholesterol is thus concentrated presenting more excimers. The increase of excimers for the PC membranes is stronger, from 60% at 3.6% to about 100% (two fold) at 1.8% of the probe. This suggest that the increase in temperature provokes the disappearance of a proportion of “weak” Lo domains with the concomitant concentration of the cholesterol in the low proportion of temperature resistant Lo domains. It is important to note that the cooling and heating protocols show different behaviour. When heating by steps, the preformed domains at 4°C undergo lipid reorganisation gradually. In the cooling protocol the samples are fast heated to 55°C and therefore the lipids have no time to reorganise with the resulting brutal domains perturbation leading to only a small proportion of resting Lo domains in which cholesterol concentrate with the consequence of more excimers at 55°C before cooling protocol compared to the excimers amount at 55°C after heating protocol.

Fig 4 shows the Lo/Ld ratio for both PC and SM/Chol membranes. Several points must be discussed. First, the heating and cooling protocols result in almost the same behaviour. The only observed difference between heating and cooling protocols are small for SM/Chol membranes at low temperatures. Second, the temperature induced change for PC shows a low slope compared to the SM/Chol which shows stronger slope. Considering that the change in Lo phase are quite similar for both membranes (Fig 3B), the slope difference can be attributed to the fact that the Ld contribution is more temperature sensitive in PC than in SM/Chol membranes (Fig 3A). Third, the error bars for this ratio are very small indicating that this ratio is, statistically, very efficient as a marker of membrane domain environment. In fact the 373 and 379 nm are part of the ascending and descending parts of the peak centred at 376 nm analogous to the large spectrum of Laurdan in which the gel and liquid fluid markers are found at 440 and 490 nm.

3.4. Anisotropy

In order to characterize the py-met-cho movement in the different domains we performed anisotropy measurements. Fig 5 show the anisotropy of py-met-cho in PC and SM/Chol LUVs at 35°C. For 15 and 50°C see Fig S5. The right part of the graphics (450-550 nm) corresponds to the excimer signal. As observed, there is no net difference between the PC and SM/Chol membranes. This fact indicates that the Py-met-cho found in cholesterol rich domains (Lo) with similar degree of movement in PC and SM/Chol and this for the three temperatures. Notice that the Lo domains are less sensitive to temperature than the Ld domains. The left part of the graphics (365-450 nm) corresponds to the contribution of monomer signal. It is clear that at the three temperatures the anisotropy values are higher for the SM/Chol LUVs than for those of PC. This indicates that even in the monomeric state py-met-cho environment in SM/Chol is more rigid than the environment in PC. This is in agreement with the properties of cholesterol in SM/cho versus PC membranes and indicates also the existence of different types of low cholesterol-containing domains in the membranes with one head group but different acyl chains.

3.5. Cholesterol distribution in Ld-Lo mixed membranes.

In order to study the behaviour of the probe on membranes in which Lo and Ld coexist we performed studies in PC/SM/Chol (1/1/1) LUVs. As shown in Fig 6A and S6A, at 10°C the value of Ld/iso ratio of PC/SM/Chol membranes is intermediate between PC and SM/Chol ratios. This is consistent with the coexistence of two different domains in which cholesterol is present. The difference between the three LUVs is maintained with the increase in temperature to 25-30°C but at higher temperatures (35-55°C) the Ld parameter for PC/SM/Chol LUVs rejoins the PC indicating a higher global membrane fluidity for PC/SM/Chol membranes compared to SM/Chol. The cooling protocol showed the same behaviour with similar values of PC and PC/SM/Chol in the 55-35°C and a clear separation in the 30-10°C range (Fig 6A and S6B). The temperature evolution of the Lo parameter showed also that the PC/SM/Chol values are intermediate between the PC and SM/Chol at all temperatures (Fig 6B,C and S6C,D). The evolution of the Lo/Ld ratio show clear separation between the three membranes at all temperatures with both protocols (Fig 6D and S6E,F) indicating the existence of some proportion of Lo character in the LUVs even at 55°C.

The behaviour of excimer formation in PC/SM/Chol membranes was also intermediate compared to PC and SM/Chol membranes. At 10°C the excimers ratio is similar to the PC membranes but heating the sample, the curve show a separation from PC behaviour due to a slower increase in excimers (Fig 6E and S6G). This slow multimerisation is similar to that in SM/Chol membranes. When the membranes are fast heated to 55°C, the excimer ratio in PC/SM/Chol is similar to the SM/Chol membranes. Cooling the sample provokes a separation of the curves and the excimers ratio in PC/SM/Chol gets similar to the PC membranes at 10°C (Fig 6F and S6H). The observed difference in the shape of the curves during heating or cooling is due to the fact that the kinetics to disrupt the domains (heating) and to construct them (cooling) is not the same. In resume, concerning the cholesterol grouping (excimers formation) the PC/SM/Chol membranes are similar to the PC membranes at low temperature and similar to the SM/Chol at high temperature. Consistent with the fact that the Lo domains are “temperature resistant” compared to the Ld domains we can deduce that during heating cholesterol have a tendency to move to the remaining Lo resistant domains. In fact it is also possible that cholesterol induce the formation of small Lo domains containing the saturated phospholipids.

3.6. Displacement of cholesterol by Ceramide.

It had been reported that the conversion of sphingomyelin into ceramide induce a reorganisation of the membrane that result from the competition of cholesterol and ceramide for sphingomyelin. Therefore, we tested whether the Py-met-chol probe was able to detect such a reorganization. Megha and London (London and London 2004) calculated that after TNF stimulation the sphingomyelinase change 80% of the Plasma membrane SM into ceramide. Taniguchi and collaborators (Taniguchi et al. 2006) reported a conversion of 36% of SM into Ceramide, but considering that there is some pool of intracellular SM non exposed to the sphingomyelinase, the quantity of ceramide at the plasma membrane must be higher. In PC/SM/Chol membrane models, Silva et al (Silva, Futerman, and Prieto 2009a) reported a conversion of 50% of SM into ceramide. Considering these estimations, we performed experiments with PC/SM/Cer/Chol (1/0.5/0.5/1) membranes to mimic sphingomyelinase standard action. Fig S7 show that the Lo and Ld values are smaller when compared to the LUVs without Cer (PC/SM/Chol) indicating changes in cholesterol environment. When comparing the Lo/Ld ratio (Fig. 7), we observed higher values at all temperatures especially for the heating protocol. Thus in the presence of ceramide, the cholesterol is “moving” to a phase with strong ordered (Lo) character. This is in agreement with the fact that ceramide provokes the

stabilization of rafts (London and London 2004), and the formation of gel domains (Busto et al. 2010; Pinto et al. 2013b; Silva, Futerman, and Prieto 2009a). Cholesterol is then moving to the ceramide rich domains. At the same time, the evolution of the excimer formation in Fig. 7 show that cholesterol in the presence of ceramide increase its tendency to aggregate. These data are in agreement with the fact that ceramide competes with sphingomyelin for cholesterol. The association of ceramide with sphingomyelin provokes the displacement of cholesterol which concentrates then in sphingomyelin domains. In other words this data support the coexistence of Cer/Chol, Cer/SM and SM/Chol domains in the same membrane.

4. Conclusion

Membrane domains had been studied with the help of numerous fluorescent probes. However, the specific cholesterol distribution and movements had been less studied due to the lack of efficient cholesterol probes. In this work we have explored the abilities of a cholesterol-pyrene probe to characterise the cholesterol containing domains in phospholipid membranes. We characterised the pyrene fluorescent spectrum and by using a statistical principal component analyses, we have found that the best wavelengths for the characterisation of membrane domains are; 373 nm which is the marker of liquid ordered (Lo) domains, and 379 nm as a marker for the liquid disordered domain. The third marker used for cholesterol aggregation is the well known excimers peak (474 nm). Finally, to reduce the experimental variations, we recommended the use of the iso-emissive point (432 nm) as a constant reference spectral point.

By using the 373/376 and 474/432 ratios we observed that the kinetics of domains dynamics are slightly different when heating or cooling the membranes. The behaviour of cholesterol in different membranes is illustrated in Fig 8. In Lo membranes (SM/Chol) in which the ordered domains are large, cholesterol is found as multimers but also as monomers because cholesterol can dilute in the very numerous saturated acyl chains. When temperature rises, the acyl chains "melting" diminish the Lo character of the membrane and cholesterol tends to aggregate increasing the excimers. This implies a moderate reduction of the size of the Lo domains. In Ld membranes such as PC containing heterogeneous acyl chains, cholesterol is present mostly as monomers but some excimers are present corresponding to small ordered domains composed of cholesterol and saturated lipids. Rising the temperature provokes the accumulation of cholesterol in these zones rich in saturated phospholipids with exclusion of highly unsaturated lipids. In mixed membranes cholesterol shows intermediate behaviour. At low temperatures has tendency to associate with the saturated lipids of the Lo domains but is also present in the disordered domains as shown by its intermediate spectral behaviour. Rising the temperature provokes the increase of multimerisation probably by association with the temperature resistant Lo domains present in the membrane. All this behaviour is in agreement with the available data suggesting that the py-met-cholesterol is a very good cholesterol probe.

The capacity of py-met-cholesterol to be used as a cholesterol probe was tested by the ceramide effect on membranes which showed that ceramide increases the Lo character of the membrane with the formation of Cer/Chol and SM/Chol domains. In resume, for the interpretation rules for a membrane with a constant cholesterol content and with py-met-cholesterol at 3% we suggest that, 1) The increase in exci/iso ratio indicates a reduction in the size of Lo domains and inversely a decrease indicates an increase in Lo domain size. 2) An increase in Lo/Ld ratio indicates the movement of cholesterol to a more ordered environment and the inverse for a Lo/Ld ratio decrease.

Acknowledgments

Antonin Lamazière for useful discussions and help with SIMCA software.

References

- Almeida, C., Lamazière, A., Filleau, A., Corvis, Y., Espeau, P., and Ayala-Sanmartin, J. (2016). Membrane re-arrangements and rippled phase stabilisation by the cell penetrating peptide penetratin. *Biochim. Biophys. Acta* *1858*, 2584–2591.
- Ayala-Sanmartin, J., Vincent, M., Sopkova, J., and Gallay, J. (2000). Modulation by Ca(2+) and by Membrane Binding of the Dynamics of Domain III of Annexin 2 (p36) and the Annexin 2-p11 Complex (p90): Implications for Their Biochemical Properties. *Biochemistry (Mosc.)* *39*, 15179–15189.
- Ayala-Sanmartin, J., Zibouche, M., Illien, F., Vincent, M., and Gallay, J. (2008). Insight into the location and dynamics of the annexin A2 N-terminal domain during Ca(2+)-induced membrane bridging. *Biochim Biophys Acta* *1778*, 472–482.
- Bagatolli, L.A. (2006). To see or not to see: lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* *1758*, 1541–1556.
- Barenholz, Y., Cohen, T., Haas, E., and Ottolenghi, M. (1996). Lateral organization of pyrene-labeled lipids in bilayers as determined from the deviation from equilibrium between pyrene monomers and excimers. *J. Biol. Chem.* *271*, 3085–3090.
- Brown, D.A., and London, E. (1998). Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J. Membr. Biol.* *164*, 103–114.
- Busto, J.V., Sot, J., Requejo-Isidro, J., Goñi, F.M., and Alonso, A. (2010). Cholesterol displaces palmitoylceramide from its tight packing with palmitoylsphingomyelin in the absence of a liquid-disordered phase. *Biophys. J.* *99*, 1119–1128.
- Chachaty, C., Rainteau, D., Tessier, C., Quinn, P.J., and Wolf, C. (2005). Building up of the liquid-ordered phase formed by sphingomyelin and cholesterol. *Biophys J* *88*, 4032–4044.
- Chong, P.L., Tang, D., and Sugar, I.P. (1994). Exploration of physical principles underlying lipid regular distribution: effects of pressure, temperature, and radius of curvature on E/M dips in pyrene-labeled PC/DMPC binary mixtures. *Biophys. J.* *66*, 2029–2038.
- Goñi, F.M. (2014). The basic structure and dynamics of cell membranes: an update of the Singer-Nicolson model. *Biochim. Biophys. Acta* *1838*, 1467–1476.
- Hao, M., Mukherjee, S., and Maxfield, F.R. (2001). Cholesterol depletion induces large scale domain segregation in living cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 13072–13077.
- Huster, D., Arnold, K., and Gawrisch, K. (1998). Influence of docosahexaenoic acid and cholesterol on lateral lipid organization in phospholipid mixtures. *Biochemistry (Mosc.)* *37*, 17299–17308.
- Kalyanasundaram, K., and Thomas, J.K. (1977). Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. *J. Am. Chem. Soc.* *99*, 2039–2044.

- Kim, S.D., and Torkelson, J.M. (2002). Nanoscale Confinement and Temperature Effects on Associative Polymers in Thin Films: Fluorescence Study of a Telechelic, Pyrene-Labeled Poly(dimethylsiloxane). *Macromolecules* 35, 5943–5952.
- Lagane, B., Mazères, S., Le Grimellec, C., Cézanne, L., and Lopez, A. (2002). Lateral distribution of cholesterol in membranes probed by means of a pyrene-labelled cholesterol: effects of acyl chain unsaturation. *Biophys. Chem.* 95, 7–22.
- Lamaziere, A., Chassaing, G., Trugnan, G., and Ayala-Sanmartin, J. (2009). Tubular structures in heterogeneous membranes induced by the cell penetrating peptide penetratin. *Commun Integr Biol* 2, 223–224.
- Le Guyader, L., Le Roux, C., Mazeres, S., Gaspard-Iloughmane, H., Gornitzka, H., Millot, C., Mingotaud, C., and Lopez, A. (2007). Changes of the membrane lipid organization characterized by means of a new cholesterol-pyrene probe. *Biophys J* 93, 4462–4473.
- Levental, I., Byfield, F.J., Chowdhury, P., Gai, F., Baumgart, T., and Janmey, P.A. (2009). Cholesterol-dependent phase separation in cell-derived giant plasma-membrane vesicles. *Biochem J* 424, 163–167.
- Lianos, P., and Georghiou, S. (1979). Solute-Solvent Interaction and Its Effect on the Vibronic and Vibrational Structure of Pyrene Spectra. *Photochem. Photobiol.* 30, 355–362.
- Lingwood, D., Ries, J., Schwille, P., and Simons, K. (2008). Plasma membranes are poised for activation of raft phase coalescence at physiological temperature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10005–10010.
- Maniti, O., Alves, I., Trugnan, G., and Ayala-Sanmartin, J. (2010). Distinct behaviour of the homeodomain derived cell penetrating peptide penetratin in interaction with different phospholipids. *PLoS One* 5, e15819.
- Maniti, O., Piao, H.R., and Ayala-Sanmartin, J. (2014). Basic cell penetrating peptides induce plasma membrane positive curvature, lipid domain separation and protein redistribution. *Int J Biochem Cell Biol* 50C, 73–81.
- Megha, null, and London, E. (2004). Ceramide selectively displaces cholesterol from ordered lipid domains (rafts): implications for lipid raft structure and function. *J. Biol. Chem.* 279, 9997–10004.
- Pasenkiewicz-Gierula, M., Subczynski, W.K., and Kusumi, A. (1991). Influence of phospholipid unsaturation on the cholesterol distribution in membranes. *Biochimie* 73, 1311–1316.
- Pike, L.J. (2004). Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem. J.* 378, 281–292.
- Pinto, S.N., Fernandes, F., Fedorov, A., Futerman, A.H., Silva, L.C., and Prieto, M. (2013). A combined fluorescence spectroscopy, confocal and 2-photon microscopy approach to re-evaluate the properties of sphingolipid domains. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 2099–2110.
- Schmid, F. (2017). Physical mechanisms of micro- and nanodomain formation in multicomponent lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1859, 509–528.
- Sezgin, E., Waithe, D., Bernardino de la Serna, J., and Eggeling, C. (2015). Spectral Imaging to Measure Heterogeneity in Membrane Lipid Packing. *ChemPhysChem* 16, 1387–1394.

- Shaikh, S.R., Brzustowicz, M.R., Gustafson, N., Stillwell, W., and Wassall, S.R. (2002). Monounsaturated PE does not phase-separate from the lipid raft molecules sphingomyelin and cholesterol: role for polyunsaturation? *Biochemistry (Mosc.)* *41*, 10593–10602.
- Silva, L.C., Futerman, A.H., and Prieto, M. (2009). Lipid raft composition modulates sphingomyelinase activity and ceramide-induced membrane physical alterations. *Biophys. J.* *96*, 3210–3222.
- Taniguchi, Y., Ohba, T., Miyata, H., and Ohki, K. (2006). Rapid phase change of lipid microdomains in giant vesicles induced by conversion of sphingomyelin to ceramide. *Biochim. Biophys. Acta* *1758*, 145–153.
- Tessier, C., Staneva, G., Trugnan, G., Wolf, C., and Nuss, P. (2009). Liquid-liquid immiscibility under non-equilibrium conditions in a model membrane: an X-ray synchrotron study. *Colloids Surf. B Biointerfaces* *74*, 293–297.
- Veatch, S.L., and Keller, S.L. (2002). Organization in lipid membranes containing cholesterol. *Phys Rev Lett* *89*, 268101.
- Wang, Y., Gkeka, P., Fuchs, J.E., Liedl, K.R., and Cournia, Z. (2016). DPPC-cholesterol phase diagram using coarse-grained Molecular Dynamics simulations. *Biochim. Biophys. Acta* *1858*, 2846–2857.
- Waris, R., Acree, W.E., and Street, K.W. (1988). Py and BPe solvent polarity scales: effect of temperature on pyrene and benzo[ghi]perylene fluorescence spectra. *The Analyst* *113*, 1465–1467.
- Wilson-Ashworth, H.A., Bahm, Q., Erickson, J., Shinkle, A., Vu, M.P., Woodbury, D., and Bell, J.D. (2006). Differential detection of phospholipid fluidity, order, and spacing by fluorescence spectroscopy of bis-pyrene, prodan, nystatin, and merocyanine 540. *Biophys. J.* *91*, 4091–4101.
- Winnik, F.M., Tamai, N., Yonezawa, J., Nishimura, Y., and Yamazaki, I. (1992). Temperature-induced phase transition of pyrene-labeled (hydroxypropyl) cellulose in water: peakosecond fluorescence studies. *J. Phys. Chem.* *96*, 1967–1972.

Tables

Table 1. Wavelengths of interest for the study of membrane phases with Py-met-chol obtained by multivariate analysis and cited in the literature.

Wavelength (nm)	Interpretation	abbreviation
373	Liquid ordered (Lo) marker (this work)	Lo
376	“polarity” (from ref (L. Le Guyader et al. 2007))	I1
379	Liquid disordered (Ld) marker (this work)	Ld
388	“constant” (from ref (L. Le Guyader et al. 2007))	I3
401	“polarity” or environment (this work)	pol
432	constant, iso-emissive point (this work)	iso
474	Py-met-chol multimerisation, excimers	exci

Figure captions

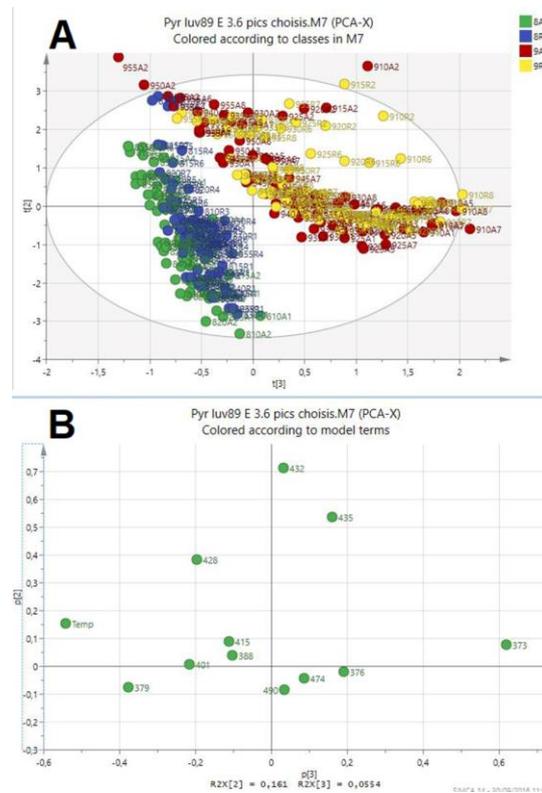


Fig 1. Principal component analysis of experimental individuals (spectra) and variables (wavelength). (A), Distribution of data in a plane of axis corresponding to two principal components (score scatter plot). Each point represents a spectrum from cooling and heating protocols. Green points are PC during heating, blue points PC during cooling, red points SM/Chol during heating and yellow points SM/Chol during cooling, notice the separation of LUVs in two populations (PC and SM/Chol). (B), Correlation of variables (loading scatter plot). The strong anti-correlated variables in the x-axis direction are 379 and 373 nm.

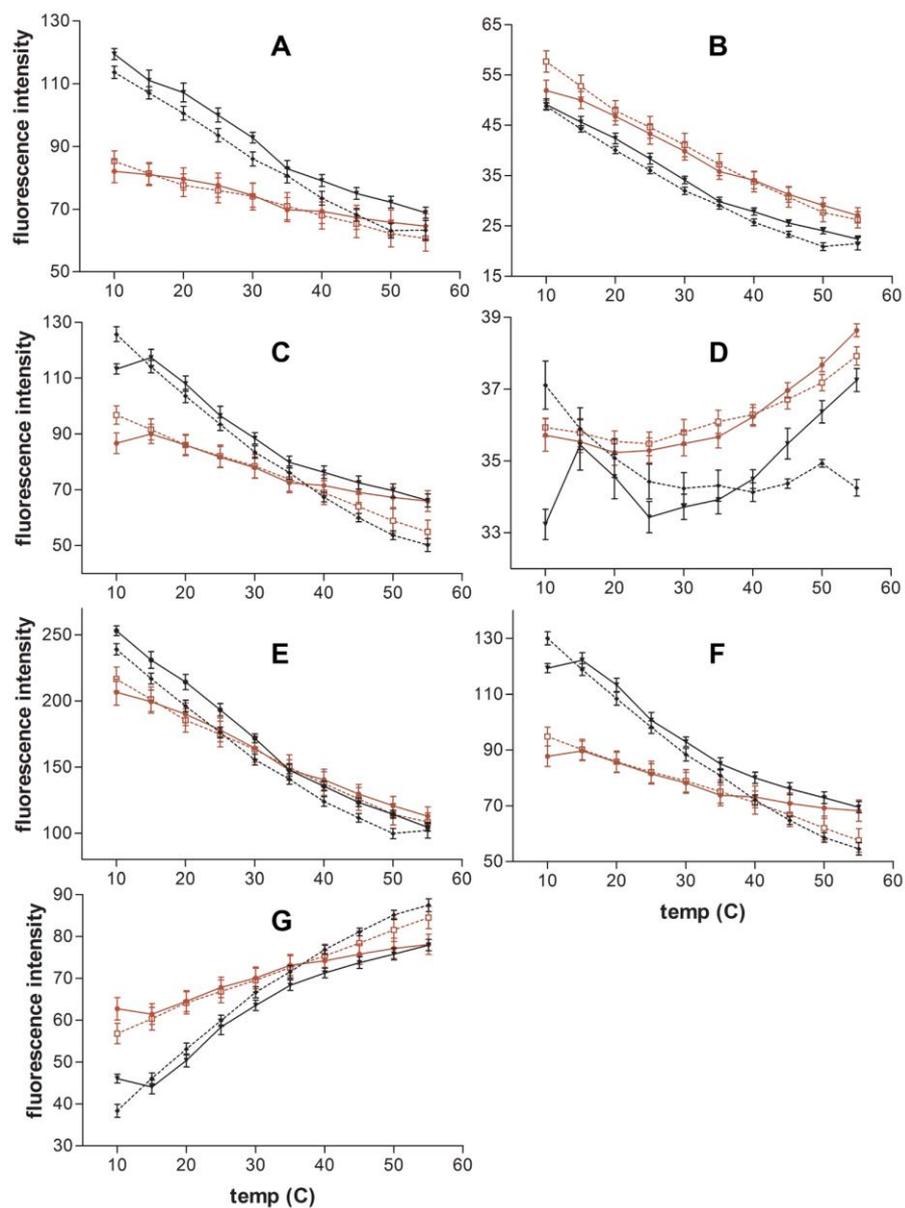


Fig 2. Evolution of Py-met-chol fluorescence intensity wavelengths in function of temperature. The probe concentration in LUVs is 3.6%. (A), 379 nm Ld marker. (B), 373 nm Lo marker. (C), 388 nm I3 "constant peak". (D), 432 nm iso-emissive "constant point". (E), 376 nm I1 "polarity peak". (F), 401 nm "polarity". (G), 474 nm excimer peak or multimer marker. Black lines PC LUVs, red lines SM/Chol LUVs. Continuous lines heating protocol and dotted lines cooling protocol. Means \pm SEM of 7 independent experiments for PC and 8 for SM/Chol.

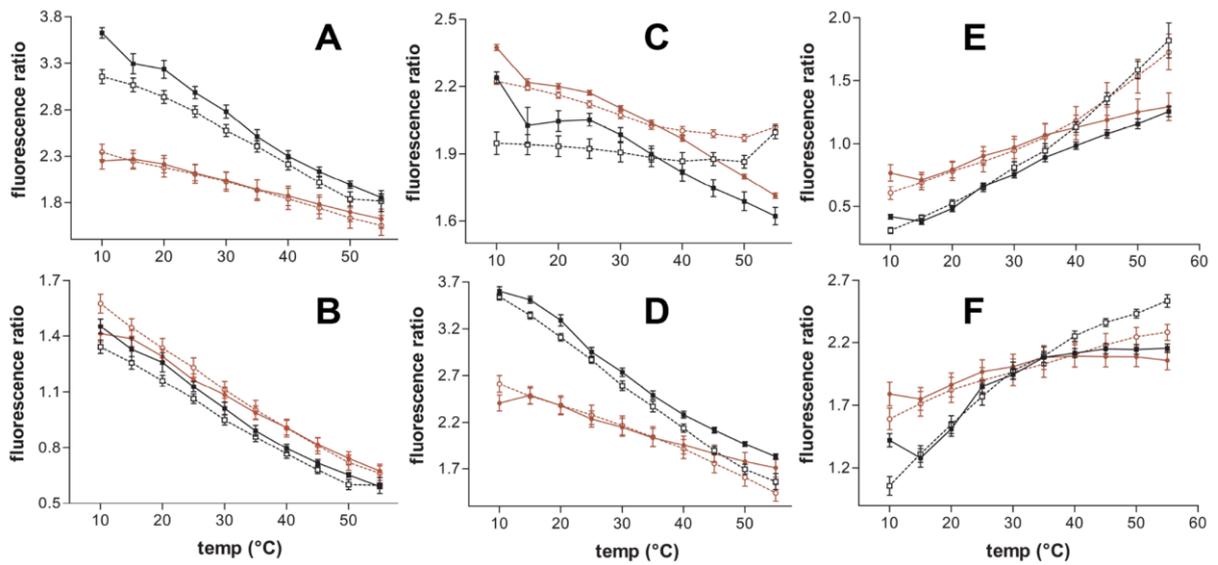


Fig 3. Ratios of Py-met-chol fluorescence wavelengths in function of temperature. The probe concentration in LUVs is 3.6%. (A), Ld/iso. (B), Lo/iso. (C), I1/I3 (“polarity/cte”). (D), pol/iso. (E), exci/I3. (F), exci/iso. Black lines (■,□) PC LUVs, red lines (●,○)SM/Chol LUVs. Continuous lines heating protocol and dotted lines cooling protocol. Means \pm SEM of 7 independent experiments for PC and 8 for SM/Chol.

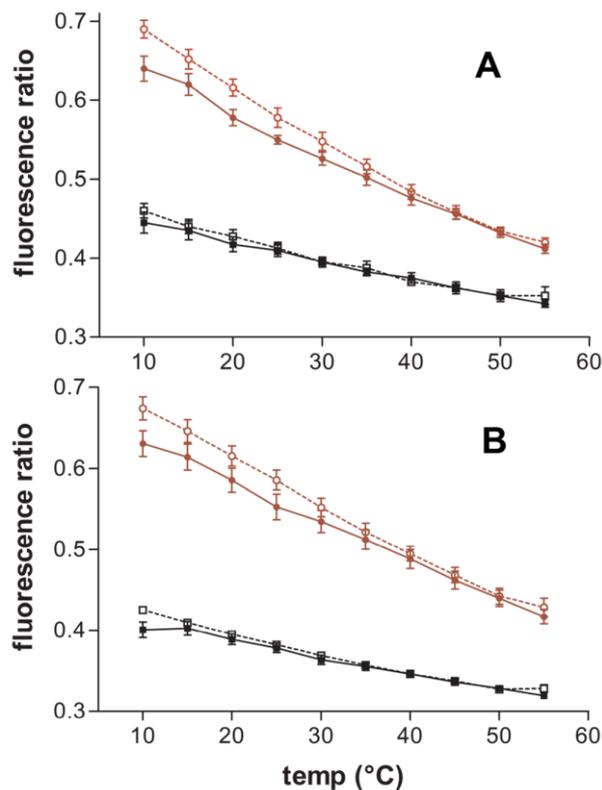


Fig 4. Lo/Ld ratios of Py-met-chol fluorescence as function of temperature. The probe concentration in LUVs is 1.8% for (A), and 3.6 in (B). Black lines (■,□) PC LUVs, red lines (●,○)

SM/Chol LUVs. Continuous lines heating protocol and dotted lines cooling protocol. Means \pm SEM of 4 and 7 independent experiments for PC and 5 and 8 for SM/Chol.

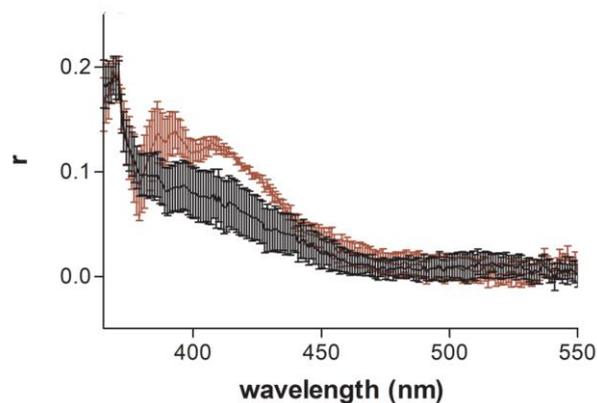


Fig 5. Fluorescence anisotropy (r) of py-met-chol. LUVs were incubated at (A) 15°C, (B) 35°C and (C) 50°C. Py-met-chol at 3.6%, PC LUVs in black and SM/Chol LUVs in red. Curves are the mean \pm SEM of four independent experiments.

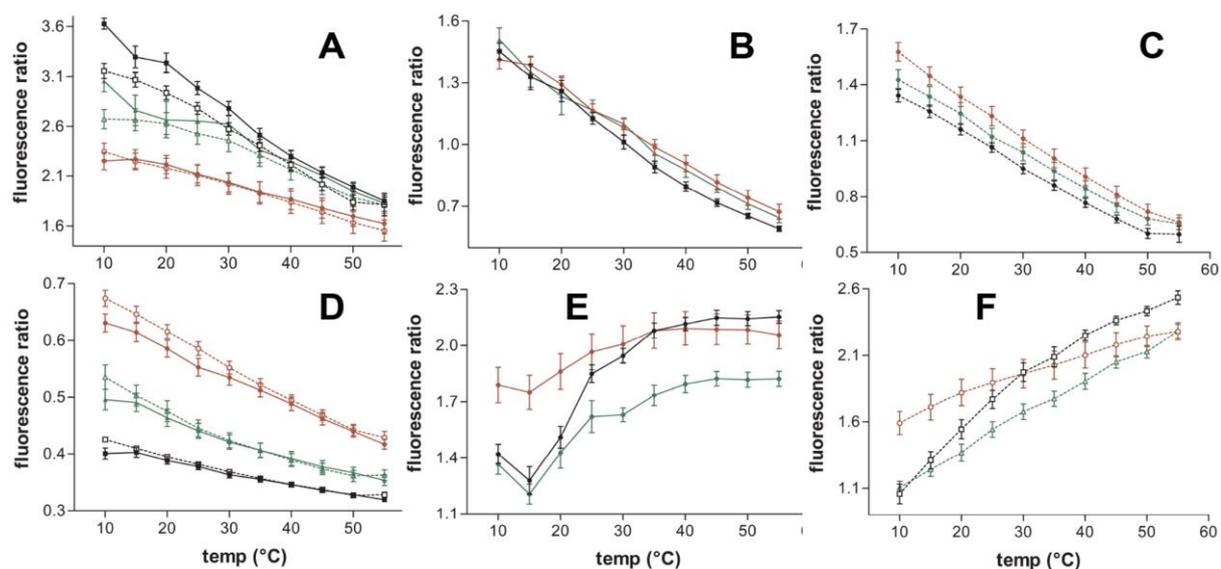


Fig 6. Ratios of Py-met-chol fluorescence wavelengths in function of temperature. The probe concentration in LUVs is 3.6%. (A), Ld/iso during heating and cooling. (B), Lo/iso during heating. (C), Lo/iso during cooling. (D), Lo/Ld during heating and cooling. (E) exci/iso during heating. (F) isci/iso during cooling. Black lines (■,□) PC LUVs, red lines (●,○) SM/Chol LUVs and green lines (▲,Δ) PC/SM/Chol LUVs. Continuous lines heating protocol and dotted lines cooling protocol. Means \pm SEM of 7 independent experiments for PC, 8 for SM/Chol and 6 for PC/SM/Chol.

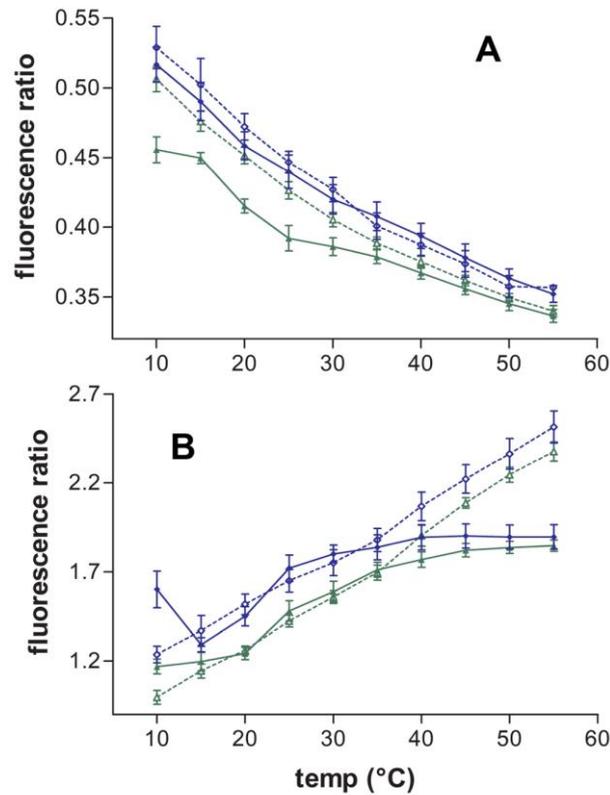


Fig 7. Ceramide effect on the evolution of Py-met-chol fluorescence wavelengths in function of temperature. The probe concentration in LUVs is 3.6%. (A), Lo/Ld ratio. (B), exci/iso ratio. Green lines ($\blacktriangle, \triangle$) PC/SM/Chol LUVs, blue lines (\blacklozenge, \lozenge) PC/SM/Cer/Chol LUVs. Continuous lines heating protocol and dotted lines cooling protocol. Means \pm SEM of 3 independent experiments.

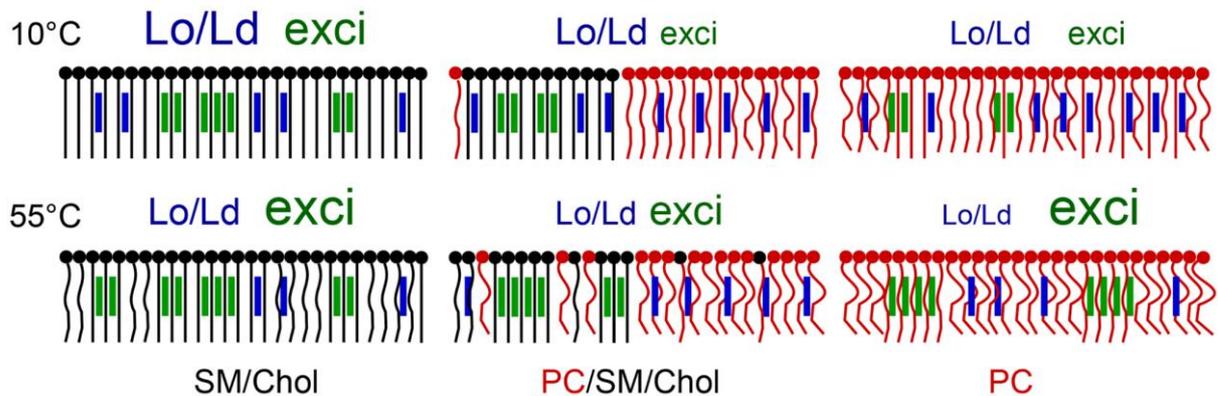


Fig 8. Schematic interpretation of cholesterol-pyrene probe behaviour in different membranes. Phospholipids and sphingolipids are represented by round-head-tail figures and cholesterol by thick small vertical bars. The different forms of tails represent the acyl chains which have different mobility and degree of unsaturation. Sphingomyelin black, PC red, multimeric cholesterol-probe green and monomeric cholesterol-probe blue. In top, the membranes at low temperature and in the bottom at high temperature. The size of the letters correspond to the observed relative experimental values of the parameters. Lo/Ld ratio mainly for the monomeric cholesterol. Exci is the exci/iso ratio characterising cholesterol multimerisation. See the text for detailed explanation.

Supplementary material

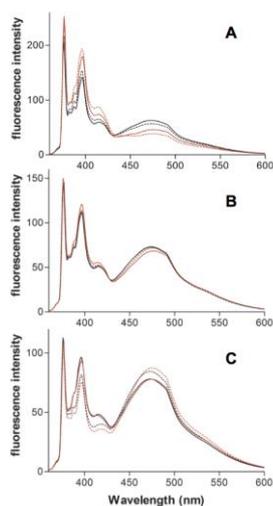


Fig S1. Mean spectra of LUV PC and SM/Chol at different temperatures after cooling and heating. (A) spectra at 10°C, (B) at 35°C and (C) at 55°C. Red lines PC LUVs, black lines SM/Chol LUVs. Continuous lines from heating protocol and dotted lines from cooling protocol. Each line is the mean of 7 (PC LUVs) and 8 (SM/Chol LUVs) spectra from independent experiments.

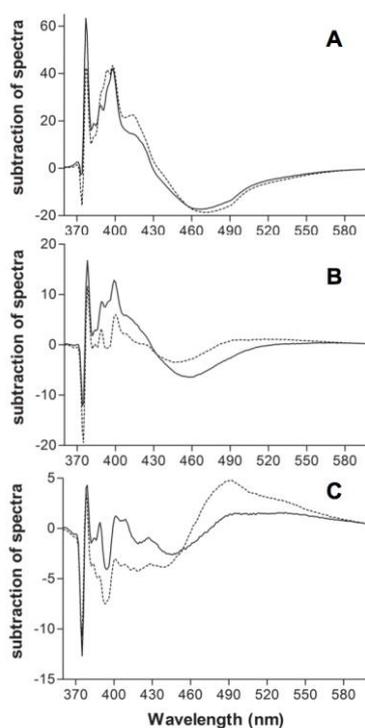


Fig S2. Subtraction of Ld-Lo Py-met-chol spectra (3.6%) at different temperatures. PC mean spectrum minus SM/Chol mean spectrum at (A) 10°C, (B) 35°C and (C) 55°C. Continuous lines for heating protocol and dotted line for cooling protocol. Mean of 7 independent experiments for PC and 8 for SM/Chol.

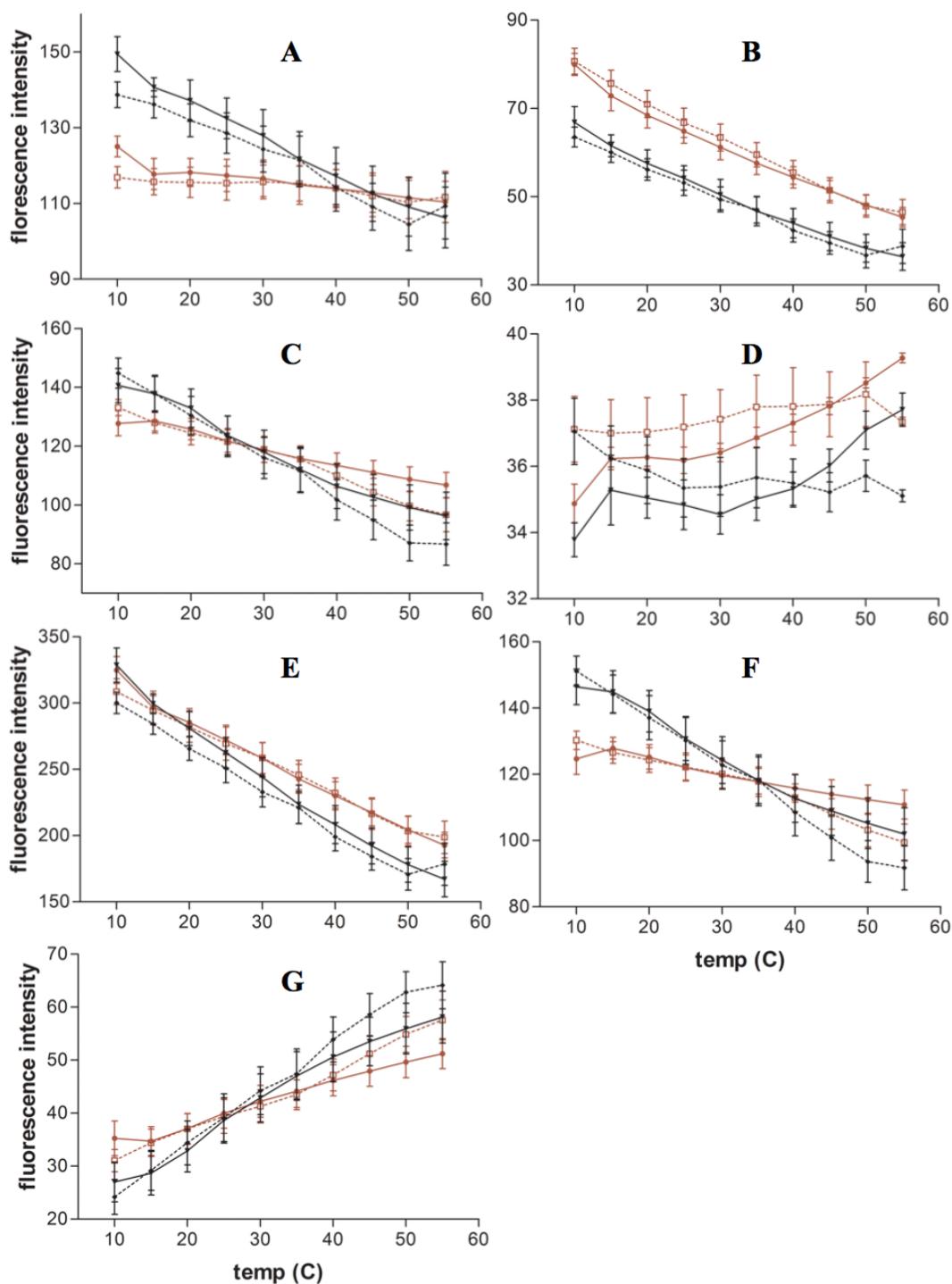


Fig S3. Evolution of Py-met-chol fluorescence wavelengths in function of temperature. The probe concentration in LUVs is 1.8%. (A), 379 nm Ld marker. (B), 373 nm Lo marker. (C), 388 nm I3 "constant peak". (D), 432 nm iso-emissive "constant point". (E), 376 nm I1 "polarity peak". (F), 401 nm "polarity". (G), 474 nm excimer peak or multimer marker. Black lines PC LUVs, red lines SM/Chol LUVs. Continuous lines heating protocol and dotted lines cooling protocol. Means \pm SEM of 4 independent experiments for PC and 5 for SM/Chol.

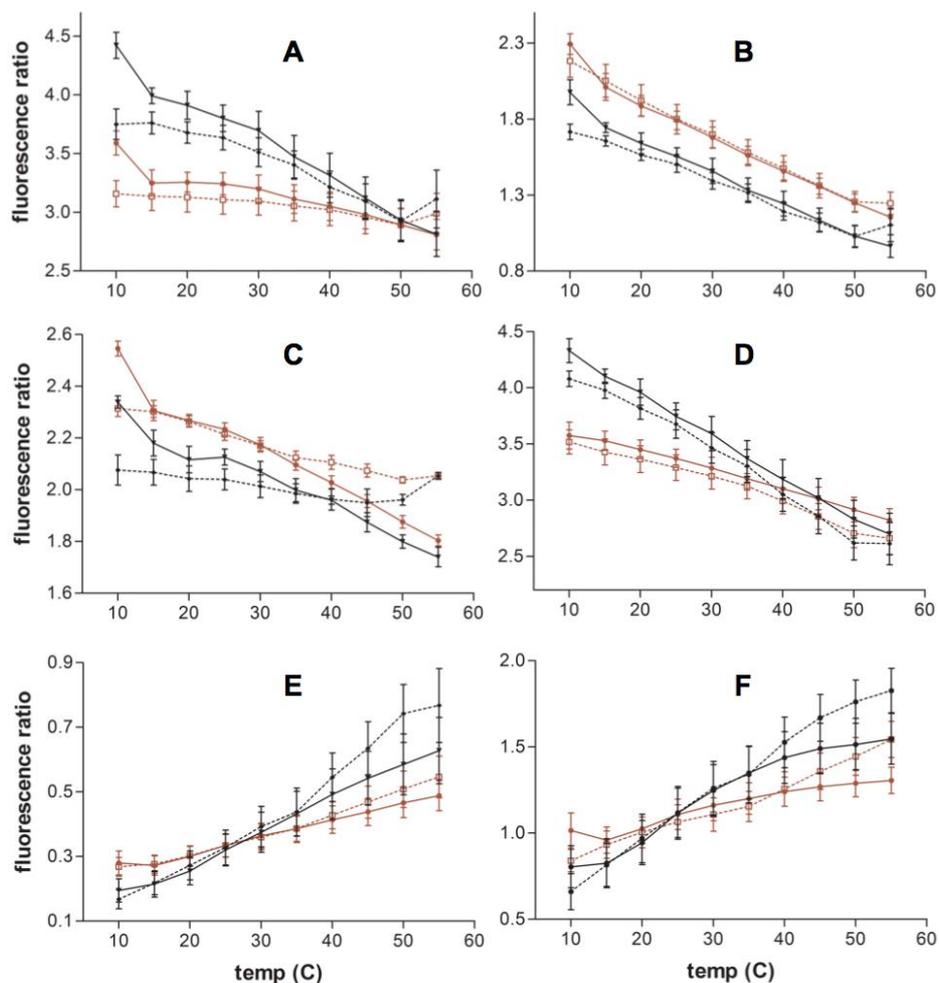


Fig S4. Ratios of Py-met-cho fluorescence wavelengths in function of temperature. The probe concentration in LUVs is 1.8%. (A), Ld/iso. (B), Lo/iso. (C), I1/I3 ("polarity/cte"). (D), pol/iso. (E), exci/I3. (F), exci/iso. Black lines PC LUVs, red lines SM/Chol LUVs. Continuous lines heating protocol and dotted lines cooling protocol. Means \pm SEM of 4 independent experiments for PC and 5 for SM/Chol.

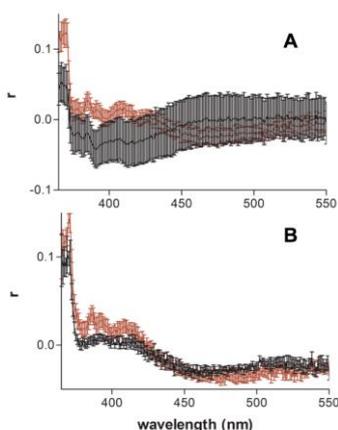


Fig S5. Fluorescence anisotropy (r) of py-met-cho. LUVs were incubated at (A) 15°C, (B) 50°C. Py-met-cho at 3.6%, PC LUVs in black and SM/Chol LUVs in red. Curves are the mean \pm SEM of four independent experiments.

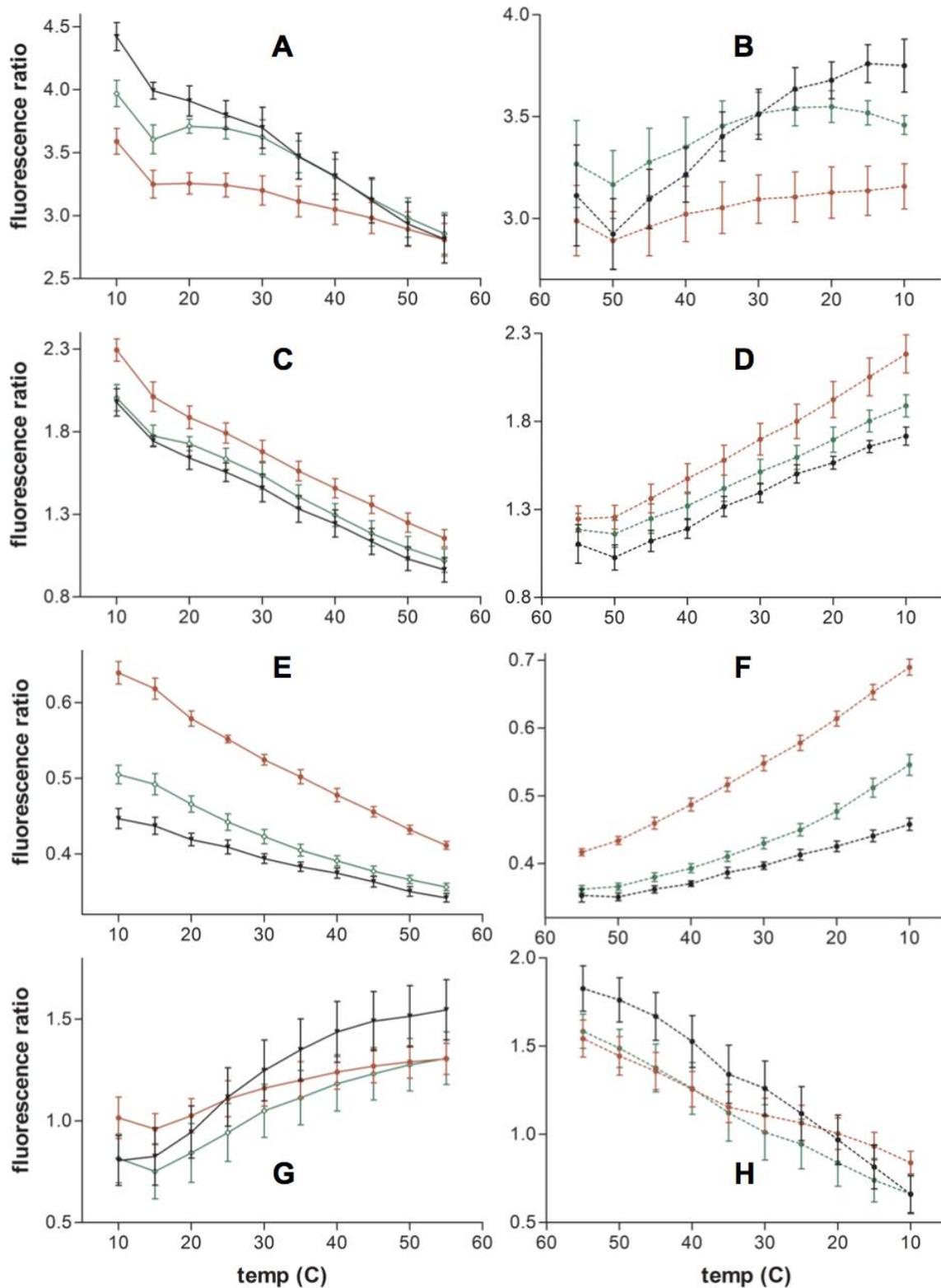


Fig S6. Ratios of Py-met-cholesterol fluorescence wavelengths in function of temperature. The probe concentration in LUVs is 1.8%. (A), Ld/iso during heating. (B), Ld/iso during cooling. (C), Lo/iso during heating. (D), Lo/iso during cooling. (E), Lo/Ld during heating. (F), Lo/Ld during cooling. Black lines PC LUVs, red lines SM/Chol LUVs and green lines PC/SM/Chol LUVs. Continuous lines heating protocol and dotted lines cooling protocol. Means \pm SEM of 4 independent experiments for PC, 5 for SM/Chol and 6 for PC/SM/Chol.

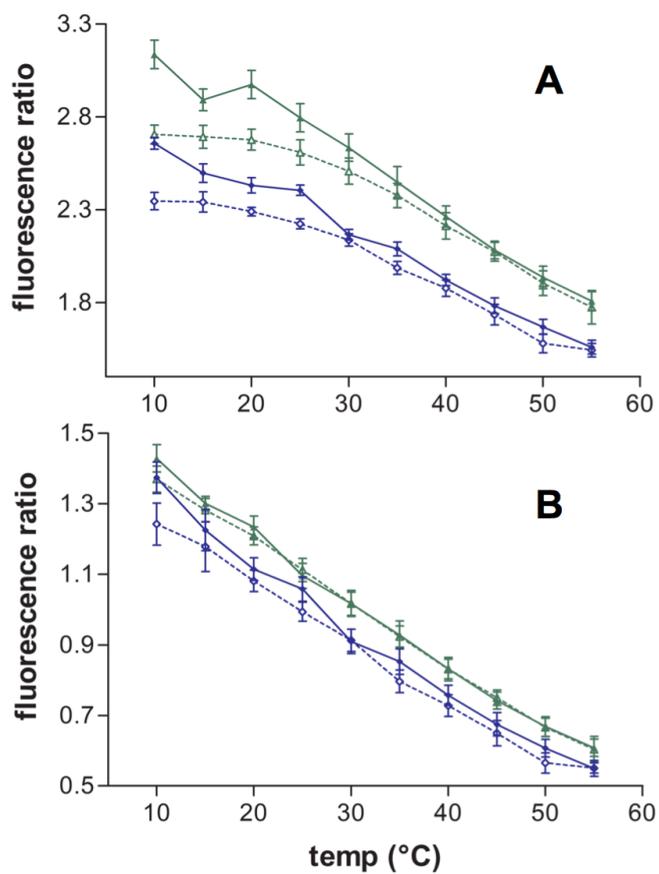


Fig S7. Ceramide effect on the evolution of Py-met-chol fluorescence wavelengths in function of temperature. The probe concentration in LUVs is 3.6%. (A), 379 nm Ld marker. (B), 373 nm Lo marker. Green lines ($\blacktriangle, \triangle$) PC/SM/Chol LUVs, blue lines (\blacklozenge, \lozenge) PC/SM/Cer/Chol LUVs. Continuous lines heating protocol and dotted lines cooling protocol. Means \pm SEM of 3 independent experiments.

Réorganisation des lipides des membranes par des peptides vecteurs d'internalisation cellulaire

Les peptides vecteurs (CPP) présentent un grand intérêt pour l'internalisation de principes actifs dans les cellules. Les mécanismes permettant aux peptides de traverser la membrane restent sujets à discussion. Mieux comprendre leurs interactions avec la membrane pourrait permettre d'améliorer leur efficacité. L'organisation des lipides après interaction avec le peptide pénétratine a été étudiée par DSC et par fluorescence du Laurdan, sur des membranes modèles composées de lipides naturels. La pénétratine a induit de l'hétérogénéité dans la membrane, ce qui pourrait être un élément important pour déstabiliser la membrane durant son internalisation dans la cellule. En outre, le cholestérol est un régulateur parmi les plus importants des domaines membranaires. En raison de son affinité pour les lipides saturés, il peut former des domaines ordonnés. Grâce au cholestérol-pyrène, une sonde fluorescente, nous avons étudié les domaines liquides ordonnés (Lo) et désordonnés (Ld) de la membrane. Nous avons, par analyse statistique en composante principale, déterminé les longueurs d'onde d'émission caractéristiques des domaines Lo et Ld. Les peptides pénétratine, R9 et RW9 diminuent l'assemblage du cholestérol et RW9 augmente la fluidité de la membrane. RW9 a été le seul peptide capable de traverser des membranes (Ld) sur de vésicules lipidiques dans nos conditions expérimentales. Nous pouvons ainsi en déduire que la distribution des lipides dans la membrane est un facteur important pour le passage des CPP. Notamment, l'interface entre les différents domaines semble jouer un rôle prépondérant pour l'internalisation.

Mots clés : organisation lipidique, cholestérol, domaines membranaires, fluorescence, peptides vecteurs.

Reorganisation of membrane lipids by peptides vector for cell internalisation

Cell penetrating peptides are promising vectors for molecular drug delivery in eukaryotic cells. Despite of their discovery 20 years ago, the mechanisms of peptide membrane crossing are still controversial. Understanding then how they modify the membrane will allow later on a more efficient internalisation into the cell. Lipid organisation after penetratin interaction was studied by DSC and Laurdan fluorescence. Penetratin was able to induce membrane heterogeneity, which could be important for membrane destabilisation during cell internalisation. Furthermore, cholesterol is one of the most important regulators of membrane domains. Due to its strong affinity with saturated lipids, cholesterol presents the ability to form "rafts" (ordered domains). By cholesterol-pyrene, which is a probe that mimics cholesterol, we studied the liquid ordered (Lo) and liquid disordered (Ld) domains of the membrane. Firstly, we determined the wavelengths that characterise each of these domains by multivariable analysis and then, we verify the peptide effect (R9, RW9 and penetratin) in the distribution of these domains. RW9 were the only CPP able to cross the membrane (Ld). We can deduce that lipid distribution in the membrane is important for the peptide internalisation and the interfaces between these domains may play an important role during this process.

Keywords: lipid organisation, cholesterol, membrane domains, fluorescence, cell penetrating peptides.