Compartimentation microscopique: depuis les microchambres femtolitriques jusqu'aux particules pseudo-virales

Guillaume Tresset

▶ **To cite this version:**

Guillaume Tresset. Compartimentation microscopique: depuis les microchambres femtolitriques jusqu'aux particules pseudo-virales. Matière Molle [cond-mat.soft]. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. tel-00848365

HAL Id: tel-00848365

https://theses.hal.science/tel-00848365

Submitted on 26 Jul 2013

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

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

Université Paris-Sud
Faculté des Sciences

Habilitation à Diriger des Recherches

Discipline : Physique

soutenue publiquement par

Guillaume TRESSET

le 3 juin 2013

COMPARTIMENTATION MICROSCOPIQUE : DEPUIS LES MICROCHAMBRES FEMTOLITRIQUES JUSQU'AUX PARTICULES PSEUDO-VIRALES

_____

JURY

M. Loïc AUVRAY	Directeur de recherche, Université Paris Diderot	Rapporteur
M. Martin CASTELNOVO	Chargé de recherche, ENS Lyon	Rapporteur
Mme Brigitte PANSU	Professeure, Université Paris-Sud	Présidente
M. Félix REY	Directeur de recherche, Institut Pasteur	Examinateur
M. Johan VAN DER MAAREL	Associate Professor, National University of Singapore	Rapporteur
M. Jean-Louis VIOVY	Directeur de recherche, Institut Curie	Examinateur

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement Messieurs Loïc Auvray, Martin Castelnovo, et Johan van der Maarel pour avoir accepté le rôle de rapporteur. Je remercie tout aussi vivement Madame Brigitte Pansu qui a présidé le jury ainsi que Messieurs Félix Rey et Jean-Louis Viovy pour leur évaluation et leur participation.

Les travaux présentés dans ce mémoire sont le fruit de collaborations et de réflexions collectives avec des chercheurs, ingénieurs, techniciens et étudiants de tous horizons et auxquels je voudrais rendre hommage à travers la liste ci-dessous :

- Hideyuki Arata
- Cécile Barbier
- Jérôme Boulaire
- Stéphane Bressanelli
- Jean-François Bryche
- Annie Charpilienne
- Davy Cheong
- Doru Constantin
- Vincent Decouche
- Hiroyuki Fujita
- Ciprian Iliescu
- Yasuyuki Kato-Yamada
- Yeng Ming Lam
- Yves Lansac
- Clémence Le Cœur
- Catalin Marculescu
- Takako Nakashima
- Ming Ni
- Hiroyuki Noji
- Didier Poncet
- Guillaume Romet-Lemonne
- Yannick Rondelez
- Anniina Salonen
- Gaëlle Squires
- Kazuhito Tabata
- Shireen Tan
- Shoji Takeuchi
- Mouna Tatou
- Mehdi Zeghal

TABLE DES MATIÈRES

Préambule 5

1 Vésicules lipidiques manipulées dans des canaux microfluidiques 7
- 1.1 Architecture des Vésicules Lipidiques 7
  - 1.1.1 Généralités sur les Lipides 7
  - 1.1.2 Bicouches Lipidiques et Phases Lamellaires 8
  - 1.1.3 Liposomes 10
  - 1.1.4 Vésicules Exotiques 11
  - 1.1.5 Nanotubes Lipidiques 14
- 1.2 Utilisation des Vésicules Lipidiques comme Capsules 16
  - 1.2.1 Motivation pour la Microanalyse Totale 16
  - 1.2.2 Encapsulation de Matériaux 17
  - 1.2.3 Transport de Liposomes 21
- 1.3 Manipulation et Stimulation par Champ Electrique 22
  - 1.3.1 Exemples de Dispositifs Microfluidiques 22
  - 1.3.2 Alignement des Vésicules 24
  - 1.3.3 Electroporation des Membranes 25
  - 1.3.4 Electrofusion de Vésicules 27

2 Microchambres femtolitriques pour des etudes en molécule unique 33
- 2.1 Activité d'Enzymes Uniques Isolées dans des Chambres Microfabriquées 33
  - 2.1.1 Introduction 33
  - 2.1.2 Procédé de Fabrication 34
  - 2.1.3 Evaluation de l'Etanchéité 35
  - 2.1.4 Mesure de l'Activité Enzymatique 37
  - 2.1.5 Conclusion et Discussion 39
- 2.2 Application des Microchambres au Moteur Moléculaire Rotatif F_1-ATPase 40
  - 2.2.1 Activité du F_1-ATPase dans sa Fonction d'Hydrolyse de l'ATP 40
  - 2.2.2 Efficacité de Couplage Mécanicochimique sur la Synthèse d'ATP 43
  - 2.2.3 Discussion 45

3 Assemblages supramoléculaires de polyélectrolytes enrobés par des lipides 47
- 3.1 Structures Lipidiques Complexes 47
  - 3.1.1 Phases Lipidiques Pures Non Lamellaires 47
  - 3.1.2 Complexes Lipidiques 50
- 3.2 Phospholipoplexes Assemblés par des Cations Multivalents pour le Transfert de Gènes 54
  - 3.2.1 Rappels sur le Transfert de Gènes 54
  - 3.2.2 Auto-Assemblage de Complexes Phospholipide-ADN 56
  - 3.2.3 Transfert de Gènes et Toxicité 63

3.2.4 Facteurs Affectant la Transfection 66
3.2.5 Remarques de Conclusion 68
3.3 Architecture Tridimensionnelle des Assemblages de Polyélectrolytes Enrobés de Lipides 69
3.3.1 Introduction 69
3.3.2 Etude par Cryomicroscopie Electronique à Haute Résolution de la Structure des Assemblages 69
3.3.3 Simulations Monte Carlo sur un Modèle de Tubes Semi-Flexibles 75
3.3.4 Conclusions 84
4 MÉCANISMES D'AUTO-ASSEMBLAGE DE PARTICULES PSEUDO-VIRALES ISSUES D'UN NOROVIRUS 87
4.1 Propriétés Inusuelles d'Auto-Assemblage de Particules Pseudo-Virales du Norovirus Newbury2 87
4.1.1 Introduction 87
4.1.2 Les NB2-VLPs Peuvent Etre Désassemblées et Réassemblées en Assemblages Plus Grands et Homogènes 89
4.1.3 Le Pseudo Diagramme de Phase d'Auto-Assemblage en Fonction du pH et de la Force Ionique Confirme la Tendance des NB2-VP1 à se Réassembler en Particules plus Grandes que 44 nm 90
4.1.4 La NB2-VLP $T = 3$ Est Capable d'Encapsuler des Nanoparticules Chargées Négativement 92
4.1.5 Mobilité Electrophorétique des Assemblages de NB2-VP1 en Fonction du pH 93
4.1.6 Analyse cinétique du réassemblage des VLPs $T = 3$ 94
4.1.7 Chimère de NB2-VLP avec une Spicule d'un Calicivirus Apparenté 96
4.1.8 Discussion 96
4.2 Cinétique d'Auto-Assemblage de Protéines Capsidiques de Norovirus : Modélisation Globale et Reconstruction des Espèces 98
4.2.1 Introduction 98
4.2.2 NB2-VP1 se Présente Initialement sous Forme de Dimères 100
4.2.3 Le Processus Comporte un Nombre Réduit d'Espèces en Solution 100
4.2.4 Modélisation Globale de la Cinétique 102
4.2.5 Reconstruction *ab initio* de l'Espèce Intermédiaire 104
4.2.6 Evaluation Prédictive du Modèle Cinétique 105
4.2.7 Conclusion 106
PERSPECTIVES : VERS L'AUTO-ASSEMBLAGE CONTRÔLÉ DE SYSTÈMES VIRO-INSPIRÉS 109

PRÉAMBULE

Avec l'avènement de la microélectronique et des techniques de miniaturisation, de nouveaux domaines transdisciplinaires sont nés au confluent des sciences de l'ingénieur, de la matière et du vivant. La technologie a désormais investi l'échelle du nanomètre ; elle parvient à sonder, mais aussi surtout à façonner les constituants élémentaires de la matière synthétique et organique, depuis les atomes jusqu'aux complexes macromoléculaires.

La nécessité d'isoler des molécules et des assemblages supramoléculaires est motivée par leur découplage du milieu environnant avec lequel ils interagissent. Des stratégies de compartimentation se sont devéloppées pour répondre aux besoins grandissants d'isolement de ces entités, en particulier à travers deux approches classiques en nanotechnologie : *top-down* et *bottom-up*.

L'approche *top-down* consiste à "sculpter" la matière pour lui conférer des dimensions compatibles avec les objets à confiner. La lithographie et les techniques de microfabrication en général rentrent typiquement dans cette catégorie. Les deux premiers chapitres présentent des stratégies microfluidiques destinées à manipuler spécifiquement des assemblages supramoléculaires soit en vu d'applications pour la microanalyse totale, soit pour des études biophysiques fondamentales.

Dans l'approche *bottom-up*, des molécules de natures différentes sont agencées pour former l'entité qui va confiner les objets d'intérêt. La chimie et le vivant procèdent par cette approche pour synthétiser des assemblages supramoléculaires et des organismes. Le troisième chapitre est ainsi consacré à la compaction de polyélectrolytes par des agents lipidiques en particules nanométriques. Cette stratégie permet en particulier de transférer des gènes au sein des cellules.

Enfin, toujours dans le cadre d'une approche *bottom-up* de la compartimentation, le dernier chapitre qui s'inscrit dans les perspectives immédiates, présente une méthodologie résolument bio-inspirée qui exploite les propriétés naturelles d'auto-assemblage des virus. Cette autre statégie ouvre la voie à l'encapsulation d'une large variété de molécules et de nano-objets. Elle tire avantage de l'extraordinaire précision moléculaire de l'assemblage d'un virus et vise à tirer profit de ses propriétés circulatoires dans l'organisme.

C'est dans cet esprit que se clôt ce mémoire avec une présentation succinte des perspectives à long terme orientées autour de l'assemblage de systèmes viro-inspirés. Les objectifs seront d'élucider les mécanismes moléculaires sur des systèmes de complexité croissante, et en parallèle de maîtriser ces mécanismes via le développement de méthodologies d'auto-assemblage dirigé.

1

VÉSICULES LIPIDIQUES MANIPULÉES DANS DES CANAUX MICROFLUIDIQUES

1.1 ARCHITECTURE DES VÉSICULES LIPIDIQUES

1.1.1 *Généralités sur les Lipides*

Les lipides sont les briques élémentaires des compartiments cellulaires. Par auto-assemblage en bicouches, ils forment des membranes fluides qui agissent comme des barrières relativement imperméables au passage de la plupart des molécules hydrosolubles. Les membranes lipidiques compartimentent la machinerie cellulaire et la protège de l'environnement extracellulaire. Elles maintiennent de même les différences caractéristiques entre les contenus de chaque compartiment et le cytosol. Elles abritent également un certain nombre de molécules spécialisées qui assurent des fonctions essentielles à la vie de la cellule : ils s'agit par exemple des canaux ioniques qui pompent des protons à travers la membrane plasmique [1], des pores nucléaires qui contrôlent l'accès vers et depuis le noyau cellulaire [2, 3], ou encore des moteurs rotatifs qui synthétisent l'ATP [4, 5]. Plusieurs protéines membranaires ainsi que des glycosphingolipides sont utilisés comme récepteurs par des virus et d'autres agents pathogènes, y compris par exemple le peptide amyloïde associé à la maladie d'Alzheimer [6, 7].

Les lipides partagent avec d'autres molécules amphiphiles la faculté de s'auto-assembler en solution en agrégats plus ou moins complexes [8], pourvu que leur densité excède une certaine concentration micellaire critique (cmc) qui dépend de leur structure chimique et des ions présents [9, 10]. Les valeurs typiques de la cmc pour des lipides formant des bicouches s'échelonnent de 10^{-10} à 10^{-6} M alors que les lipides formant des micelles requièrent de 10^{-5} jusqu'à 10^{-2} M pour s'agréger en solution aqueuse [11]. La vision classique de l'agrégation de molécules amphiphiles est basée sur la faible solubilité des chaînes hydrocarbonées dans l'eau, conduisant à ce qui est connu comme l'effet hydrophobe [12]. La présence de résidus hydrocarbonés induit la formation d'une cavité dans la structure de l'eau qui provoque une augmentation du degré d'ordre et en conséquence une baisse significative de l'entropie de l'eau [13, 14]. Lorsque les résidus hydrocarbonés se retrouvent suffisamment proches les uns des autres [15, 16], les cavités fusionnent et évacuent l'eau aux interfaces relarguant ainsi de l'entropie vers la solution. Ceci conduit à la formation spontanée d'agrégats stables [17].

La partie hydrophile - bien que n'intervenant pas dans l'agrégation - est responsable de la formation d'une interface avec l'eau, et contribue à déterminer, en principe, la taille et la forme des agrégats à travers les interactions entre les molécules. De simples considérations d'arrangement géométrique permettent de prédire la configuration de

l'agrégat final à partir de quelques informations structurales élémentaires sur les molécules amphiphiles [18]. Dans ce but, on utilise un paramètre géométrique sans dimension défini par $p \equiv v/a_0 l_c$ où v est le volume de la molécule, a_0 l'aire du groupement hydrophile, et l_c la longueur critique au-delà de laquelle la chaîne hydrocarbonée ne peut plus être considérée comme fluide. Ce paramètre détermine si les amphiphiles formeront des micelles sphériques ($p < 1/3$), des micelles non-sphériques ($1/3 < p < 1/2$), des vésicules ou des bicouches ($1/2 < p < 1$)), ou bien des structures inverses ($p > 1$). Cette vision heuristique se maintient tant qu'un seul composant amphiphile entre dans le système. Autrement, les interactions entre les composants - interactions électrostatiques, forces de van der Waals, ou liaison hydrogène - peuvent réorganiser le système selon un diagramme de phase complexe. Par exemple, le mélange en l'absence de sel ajouté de tensioactifs cationiques et anioniques comprenant différents paramètres p produit une ségrégation des amphiphiles et donne lieu à des agrégats inattendus tels que des nanodisques et des icosaèdres facettés selon la stœchiométrie [19, 20, 21, 22].

Du fait de leur présence naturelle dans les organismes vivants, les lipides et les assemblages qu'ils génèrent présentent un intérêt particulier non seulement pour la compréhension des nombreuses fonctions biologiques dans lesquels ils sont impliqués, mais aussi par rapport à leurs applications comme vecteurs biocompatibles de médicaments et de gènes dans les domaines pharmaceutique et biomédical [23, 24]. Une autre raison pour cet intérêt provient d'un fort potentiel dans les sciences des matériaux et les nanobiotechnologies, par exemple, à travers la construction de réseaux nanométriques de réacteurs enzymatiques [25, 26], ou encore par l'arrangement de matériaux inorganiques avec la régularité cristal-liquide de complexes lipidiques utilisés comme gabarit [27].

1.1.2 *Bicouches Lipidiques et Phases Lamellaires*

Les bicouches sont certainement les structures lipidiques les plus courantes et sont présentes dans tous les organismes cellulaires. Elles peuvent prendre différentes formes dans la cellule : plutôt plates dans la membrane plasmique, sphériques et tubulaires pour les composants impliqués dans le transport vésiculaire, ou bien avec une géométrie intriquée dans le reticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Dans cette section, nous nous focaliserons sur l'organisation à courte échelle - sur quelques nanomètres - des bicouches lipidiques.

Le schéma 1A représente une membrane lipidique plane assemblée en bicouche. Ce type de membrane plane se forme avec des lipides dont la paramètre p est proche de 1, ce qui signifie qu'une molécule de lipide individuelle s'apparente à un cylindre (schéma C). Certains phospholipides - une des plus abondantes familles de lipides dans la nature [28, 29] - ont tendance à former des membranes en bicouche comme c'est le cas du palmitoyloléoylphosphatidylcholine (POPC) dont la structure chimique est donnée sur le schéma 1B. Les propriété-

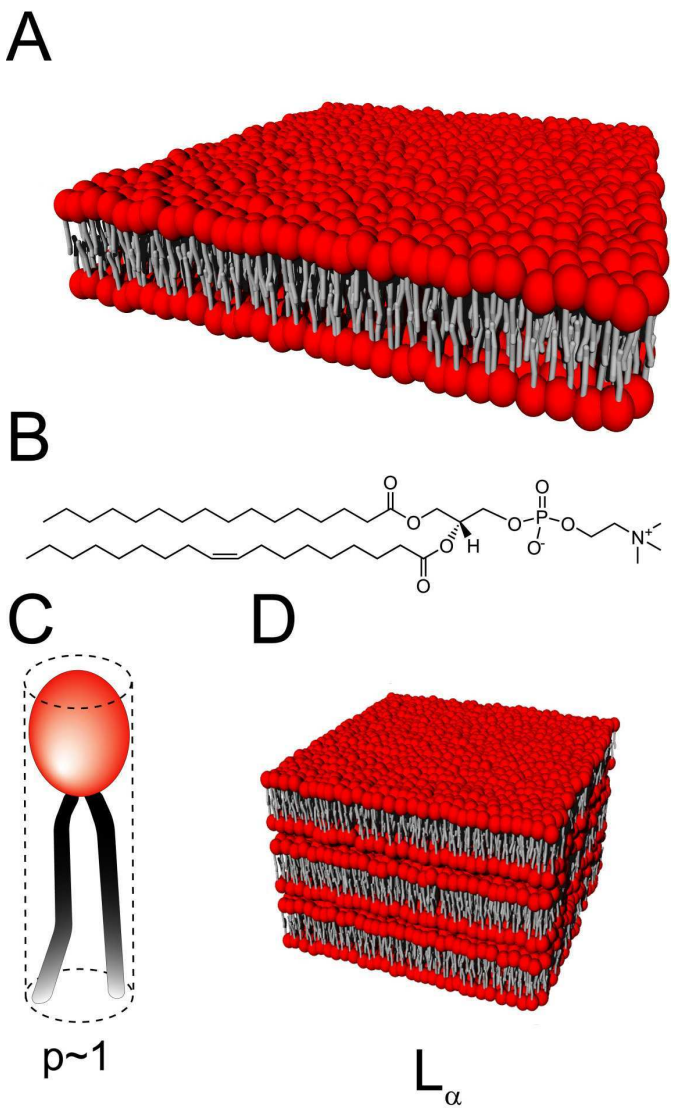

FIG. 1: Bicouche lipidique. (A) Une membrane plane de lipides assemblés en bicouche. (B) Structure chimique du palmitoyloléoylphosphatidylcholine, un phospholipide courant avec $p \sim 1$ et qui forme de ce fait des bicouches planes. Un schéma de la molécule est représenté en (C), avec le groupement hydrophile en rouge et la double chaîne hydrocarbonée en gris. La molécule prend la forme générale d'un cylindre rendant son paramètre p proche de 1. (D) Phase lamellaire L_α de bicouches lipidiques fluides. Figure tirée de [8].

tés élastiques des membranes planes sont souvent décrites par leur module de courbure moyen κ et leur courbure spontanée c_0 [30, 31]. La vaste majorité des bicouches dans un contexte biologique ont une asymétrie - l'intérieur et l'extérieur des compartiments cellulaires - ce qui résulte en une courbure spontanée finie. Pourtant, de récentes études effectuées par diffusion des rayons X et des neutrons aux petits angles montrent que les monocouches internes et externes de vésicules sont indiscernables, même pour des vésicules fortement courbées avec des diamètres descendant à 62 nm [32]. Le module de courbure moyen donne une mesure de la rigidité de la membrane. La plupart

des membranes biologiques ont $\kappa \approx 30 k_B T$, où k_B est la constante de Boltzmann et T la température, ce qui les rend essentiellement planes à l'échelle moléculaire. κ dépend de la température et de la composition de la bicouche - particulièrement à cause des interactions entre les chaînes hydrocarbonées des lipides [33, 34] -, et contribue à l'amplitude des fluctuations membranaires [35].

Les bicouches faites purement de lipides sont fluides à hautes températures mais subissent une transition de phase quand la température descend en-dessous d'une valeur critique [36]. La température de transition de phase est -2 °C pour le POPC représenté sur le schéma 1B. Selon son état, une bicouche lipidique est dite :

- En phase cristal-liquide L_α lorsqu'elle est fluide avec ses chaînes hydrocarbonées désordonnées ;
- En phase gel L_β en-dessous de la température de transition de phase ;
- En phase inclinée L'_β quand la phase gel est inclinée par rapport à l'axe normal à la bicouche ;
- En phase P'_β pour les phases inclinées modulées par des oscillations périodiques avec une longueur d'onde de l'ordre de 100 Å[37, 38].

La fluidité de la bicouche lipidique permet à la membrane de se réorganiser spontanément sur des temps courts à la suite de stimulations externes : par exemple, en réponse à un champ électrique externe intense, les membranes biologiques forment des pores nanométriques à condition que leur potentiel transmembranaire excède une valeur critique [39, 40]. Une fois les stimulations électriques arrêtées, les pores se referment sur une période s'étalant de plusieurs millisecondes à quelques secondes selon la dynamique de la membrane. Cette technique, connue sous le nom d'électroporation [41], est utilisée pour injecter de l'ADN plasmidique à travers la membrane plasmique des cellules.

Il faut remarquer que plusieurs bicouches peuvent s'empiler avec une fine couche de solution aqueuse les séparant les unes des autres ; une telle structure est dénommée phase lamellaire, notée L_α lorsque les bicouches sont fluides (schéma 1D). Elles se retrouvent communément avec les lipides de type phosphatidylcholine (PC) [36].

1.1.3 *Liposomes*

Lorsque les lipides sont dispersés dans un excès de solvant aqueux, ils ne sont plus capables de former une phase continue et forment à la place une suspension d'agrégats de dimension finie. Pour un composé lipidique ayant un paramètre p compris entre 1/2 et 1, les agrégats qui résultent sont des vésicules sphériques comprenant une ou plusieurs bicouches, et sont appelés "liposomes" [24, 42, 43]. Les liposomes se présentent avec des tailles et des lamellarités variables (Figure 2) [44] : la nomenclature généralement distingue les petites vésicules unilamellaires (SUV, 10-100 nm), les grandes vésicules unilamellaires (LUV, 100-1000 nm), les vésicules multilamellaires (MLV, avec une

membrane structurée en oignons), les vésicules oligovésiculaires (OVV, avec des petites vésicules incorporées dans une plus grande), et les vésicules unilamellaires géantes (GUV, > 1 µm), mais d'autres morphologies dérivées se présentent fréquemment. Les liposomes peuvent être préparés par le gonflement spontané d'un film lipidique hydraté avec un excès de la solution aqueuse voulue [45]. Après formation, ils sont en général colloïdalement instables et s'agrègent lentement puis fusionnent en des structures plus grandes ou plus lamellaires.

Les liposomes submicrométriques peuvent être obtenus avec une distribution de taille étroite. Etant donné que leur membrane est biocompatible et imperméable aux molécules hydrophiles, ils peuvent être utilisés comme nano-capsules. En conséquence, les liposomes submicrométriques ont attiré un fort intérêt dans les secteurs biomédical et pharmaceutique en raison de leurs applications pour l'administration de médicaments [23, 46, 47, 48]. Les liposomes ne sont pas juste des capsules purement passives transférant des substances dans les cellules, leur membrane peut être modifiée pour par exemple délivrer leur cargaison à l'intérieur d'un environnement de faible pH tel que l'endosome [49]. De nombreuses sortes de ligands tels que des anticorps, des récepteurs et des peptides peuvent être ancrés sur la membrane pour diriger la cargaison vers des types cellulaires spécifiques [50]. Le greffage de poly(éthylène glycol) (PEG) à la surface du liposome permet de prolonger la durée de vie du vecteur dans le corps [51]. D'autres applications incluent l'utilisation de liposomes comme marqueurs pour la détection ultra sensible de toxines biologiques [52, 53], ou encore dans les analyses d'affinité de peptides vis-à-vis de récepteurs membranaires [54, 55].

Les vésicules géantes occupent une place privilégiée en biophysique car leur taille micrométrique permet leur observation directe par microscopie optique. Elles peuvent être utilisées pour modéliser la membrane cellulaire en vue d'étudier des processus biologiques en environnement contrôlé, ainsi que pour des applications bioanalytiques [26, 56]. La fusion induite électriquement de vésicules géantes fournit des informations sur la réponse des membranes biologiques aux champs électriques ; ces expériences révèlent par exemple l'existence d'un seuil d'intensité relié au potentiel transmembranaire critique [39, 57, 58, 59, 60]. L'activité de canaux ioniques particuliers incrustés dans des liposomes géants peut être enregistré via des méthodes dites de "patch-clamp" [61]. Les vésicules géantes constituent aussi un bon environnement biomimétique pour suivre des réactions enzymatiques [62, 63], et plus fondamentalement, elles sont parfois perçues comme le système minimal pour construire un assemblage cellulaire artificiel exprimant des gènes [64, 65, 66].

1.1.4 *Vésicules Exotiques*

La forme des vésicules lipidiques n'est pas limitée à la sphère. Une grande variété de déformations sont possibles en changeant les contraintes externes sur la membrane, à savoir la différence de pres-

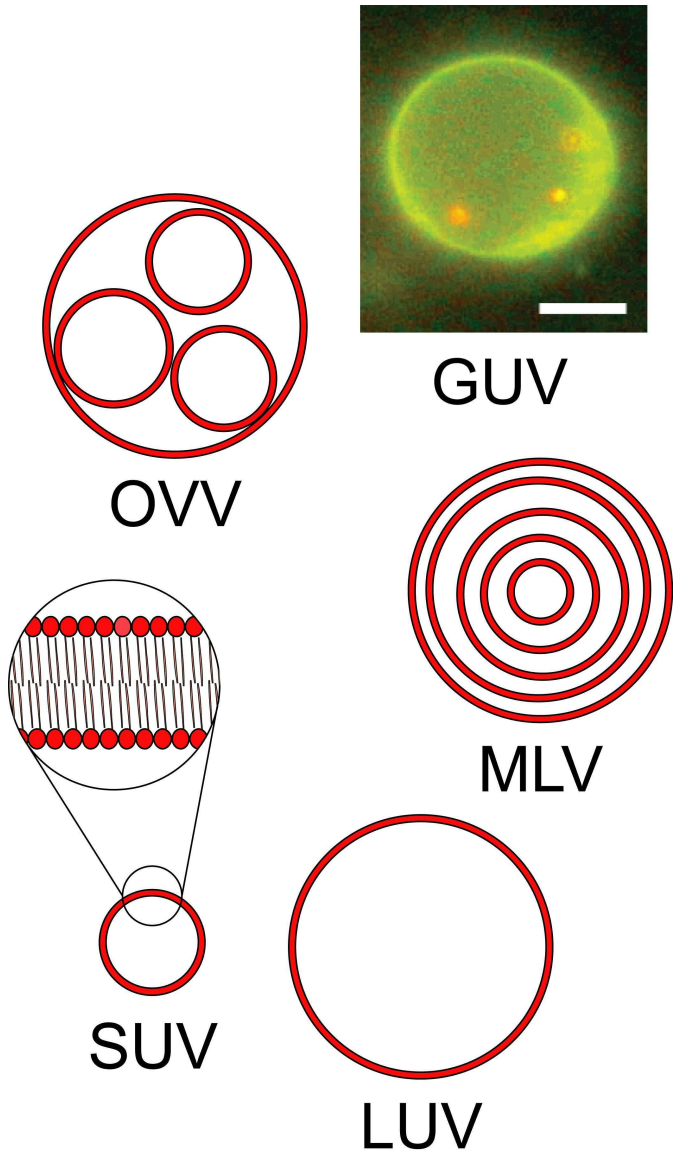

Fig. 2: Morphologies des liposomes. Les liposomes sont présentés selon leur forme, leur taille et le nombre de bicouches. SUV = "Small Unilamellar Vesicle", LUV = "Large Unilamellar Vesicle", MLV = "Multilamellar Vesicle", GUV = "Giant Unilamellar Vesicle", OVV = "Oligovesicular Vesicle". La structure moléculaire d'une bicouche lipidique est montrée en agrandissement. Le GUV sur l'image obtenue par microscopie de fluorescence est constitué d'un mélange de phospholipides et d'un marqueur fluorescent, et contient par ailleurs trois billes de 200 nm également fluorescentes qui parcourent librement l'intérieur de la vésicule. La barre d'échelle vaut 5 µm. Figure tirée de [8].

sion osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule [67] et la température [68]. La conformation à l'équilibre de la vésicule peut être entièrement déterminée par le modèle de différence d'élasticité entre surfaces, ou encore "Area Difference Elasticity" (ADE) [69, 70], qui implique un terme additionel à l'énergie de courbure de la membrane. Ce terme energétique provient du biais introduit par la différence des aires entre les monocouches intérieure et extérieure. En minimisant

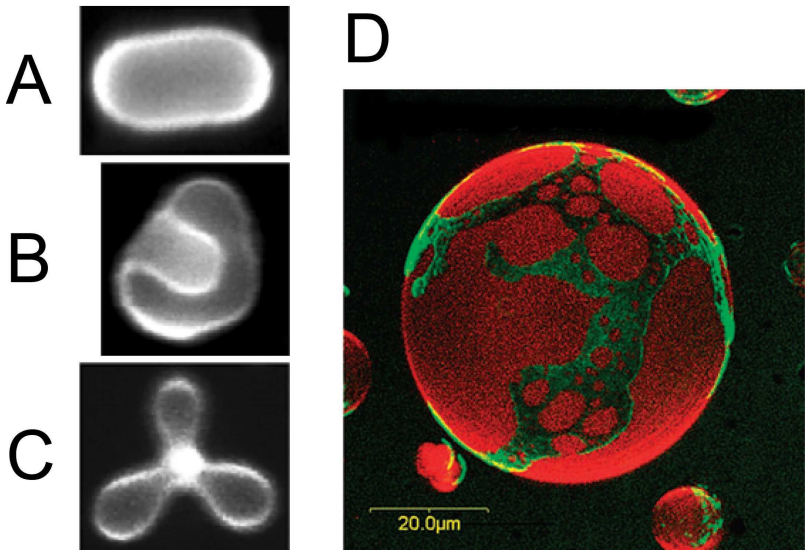

Fig. 3: Vésicules exotiques. (A) Vésicule prolate, (B) stomatocyte, et (C) en étoile faites d'un mélange ternaire de phospholipides saturés et insaturés et de cholestérol, en présence de 1 mM de sorbitol à 60 °C. (D) Image tridimensionnelle en microscopie confocale d'une vésicule géante marquée avec deux colorants fluorescents qui marquent respectivement les phases liquides ordonnée et désordonnée d'un mélange ternaire de lipides. Figure tirée de [8].

l'énergie libre ainsi obtenue, on aboutit à la forme finale de la vésicule. Des diagrammes de phase complexes à deux dimensions peuvent être calculés, et la morphologie des vésicules est alors obtenue en fonction d'une mesure sans dimension du rapport des volumes aux aires et de la différence intrinsèque des aires qui indique la courbure préférée par les vésicules [70].

Pour les phospholipides, de tels calculs prédisent une hiérarchie structurale de formes inattendues telles que des raquettes, des boomerangs et des étoiles [71, 72], et mettent en évidence l'existence d'un point critique dans le diagramme de phase où d'infimes variations des paramètres de la membrane induisent de fortes transformations de forme. D'autres conformations incluent les stomatocytes, les discocytes, les prolates et les poires (images A, B et C de la Figure 3) ; elles ont été observées expérimentalement avec des mélanges ternaires de lipides en phase liquide en ajoutant du sel dans la solution extravésiculaire afin d'appliquer une différence de pression osmotique [73].

Dans le cas où la membrane des vésicules subit une séparation de phase en radeaux, un terme provenant de la tension de ligne à la séparatrice doit être ajouté à l'énergie libre [74]. Il en résulte des morphologies compliquées dans lesquelles les radeaux imposent localement leur courbure préférentielle et génèrent des portions protubérantes à la surface des vésicules [75, 76, 77]. La microscopie de fluorescence à deux photons sur des vésicules géantes fournit un moyen direct de visualiser les domaines lipidiques marqués avec des colorants fluorescents distincts. Elle donne des information sur les déforma-

tions induites sur les vésicules (Figure 3D) [78, 79, 80, 81] et permet d'évaluer quantitativement la dynamique des radeaux [73, 82, 83].

1.1.5 *Nanotubes Lipidiques*

La microscopie électronique a révélé l'existence d'éléments tubulo-vésiculaires interposés entre le reticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi dans des cellules pancréatiques de rats [84]. Il a été suggéré que ces nanotubes lipidiques, abondants aux alentours du complexe de Golgi, interconnectent les éléments adjacents au Golgi et sont impliqués dans le transport de membrane vers l'extérieur le long des microtubules [85]. Le transport dirigé de ces morceaux de membranes le long de nanotubes lipidiques a été également observé dans les globules rouges [86], ce qui supporte l'idée d'une interconnexion générale des compartiments cellulaires par des nanotubes lipidiques.

Les nanotubes lipidiques consistent en de multiples bicouches enroulées en un long cylindre [87, 88]. Leur diamètre interne varie d'environ 10 nm avec des lipides synthétiques à plusieurs centaines de nanomètres pour les phospholipides naturels, et leur longueur peut atteindre plusieurs centimètres [89].

Parce que la plupart des phospholipides ne s'auto-assemblent pas en structures tubulaires par simple dispersion, les nanotubes de phospholipides doivent être obtenus par exemple en tirant avec une micropipette sur la membrane d'une vésicule géante immobilisée [90, 91]. En procédant ainsi, des réseaux tubulo-vésiculaires complexes, dans lesquels le transport de molécules spécifiques entre compartiments est assuré par diffusion contrôlée, peuvent être construits en vue d'applications bioanalytiques [25, 26, 91]. Dans d'autres protocoles, la croissance de tube lipidique est induite par un écoulement fluide

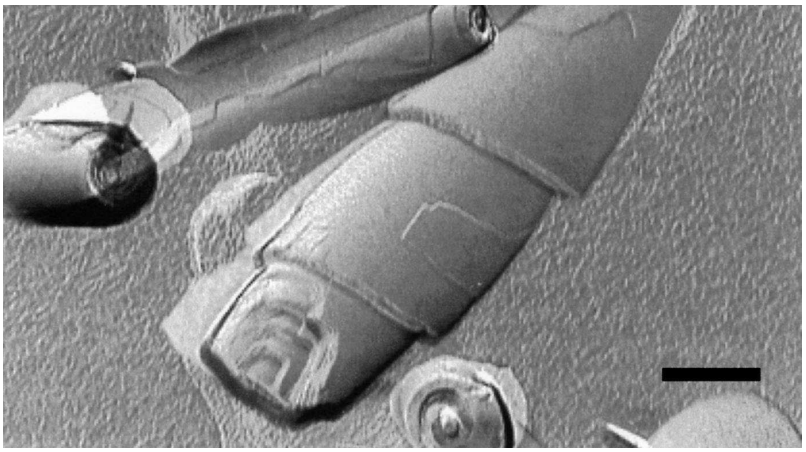

FIG. 4: Vésicules cochléaires en microscopie électronique à transmission. Cette image a été réalisée par cryofracture sur des vésicules cochléaires préparées à partir de phosphatidylsérine (PS) anionique et d'ions calcium. La structure multicouche est nettement visible. La barre d'échelle vaut 200 nm. Figure tirée de [8].

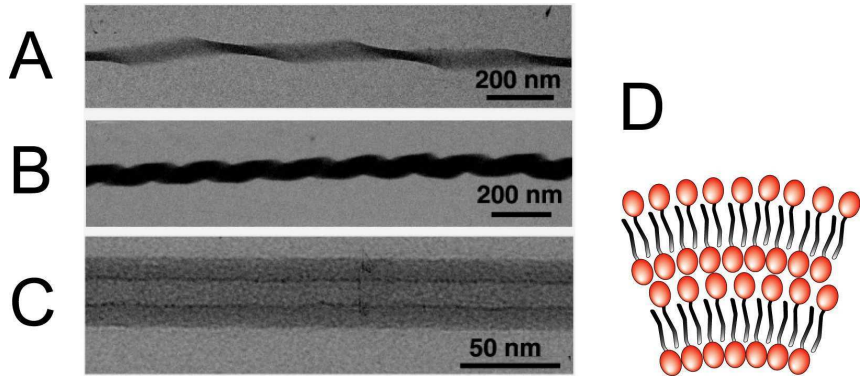

Fig. 5: Morphologies des nanotubes de glycolipides. Images en microscopie électronique à transmission d'assemblages de glycolipides (A) torsadés, (B) enroulés et (C) tubulaires. (D) Schéma en coupe montrant des couches lamellaires de glycolipides avec une simple chaîne hydrocarbonée dans la membrane d'un nanotube. La tête des glycolipides est représentée en rouge et la chaîne hydrocarbonée en gris. Figure tirée de [8].

guidé dans des canaux microfluidiques [89, 92], ou bien par l'ancrage de streptavidine à des membranes préalablement biotinylées [93].

Il faut ici remarquer que les phospholipides synthétiques polymérisables ont permis l'assemblage spontané de nanotubes avec des diamètres d'approximativement 500 nm par refroidissement sous la température de transition de phase gel-liquide [94, 95]. Par ailleurs, des assemblages alongés avec un structure cochléaire ont été dérivés du dioléoylphospatidylsérine (DOPS), simplement par addition de chlorure de calcium dans une dispersion de liposomes. Ces vésicules cochléaires consistent en structures spiralées et multicouches maintenues par des ponts cationiques (Figure 4). Elles ont été beaucoup utilisées pour l'administration de médicaments [96].

Dans l'esprit des recherches menées sur les nanotubes de carbone, des études portant sur les nanotubes lipidiques avec des volumes intérieurs de l'ordre de l'attolitre ont été entreprises. Le diamètre typique du nanotube doit être d'environ 10 nm, ce qui mène à une courbure inaccessible pour la plupart des bicouches lipidiques. En revanche, des glycolipides synthétiques présentant une unique chaîne hydrocarbonée sont capables de s'auto-assembler en couches de molécules interdigitées et stabilisées par un mécanisme de π-stacking. Le diamètre interne est d'environ 10~15 nm, et l'épaisseur de la paroi peut atteindre 15 nm [97] ce qui confère une longueur de persistance tubulaire d'environ 5 cm, soit cinquante fois plus élevée que celle des microtubules [98]. Il est intéressant de noter que ces glycolipides produisent des nanotubes ayant différentes morphologies selon le degré d'insaturation de leur chaîne hydrocarbonée : ils peuvent former des rubans torsadés ou enroulés ainsi que des nanotubes sans caractère hélicoïdal (Figure 5). Il a par ailleurs été montré que l'eau confinée dans ces nanotubes est considérablement plus structurée qu'en solution libre [99].

1.2.1 *Motivation pour la Microanalyse Totale*

Les avancées technologiques pour explorer les micro- et nanomondes ont permis d'accomplir ces dernières années des progrès incomparables dans la connaissance scientifique [100]. Les techniques de microfabrication dérivées de l'industrie de la microélectronique ont donné lieu à un intérêt croissant pour les dispositifs nanométriques, ouvrant la voie à de nouvelles applications en chimie et dans les sciences de la vie. L'immobilisation de molécules d'ADN entre des électrodes [101] et leur manipulation avec des nanopinces [102], ou encore l'imagerie de complexes protéiques par microscopie à force atomique avec des sondes faites de nanotubes de carbone [103] constituent une fraction infime des possibilités offertes par les micro- et nanotechnologies. Parallèlement aux investigations sur des systèmes bien ciblés, les "besoins en information" dans le domaine de la biochimie analytique ont considérablement augmenté avec la complexité des espèces traitées, telles que dans la génomique fonctionnelle, la protéomique, la métabolomique, l'analyse cellulaire et la conception de médicaments. Des méthodes à haut rendement, avec une capacité analytique de meilleure qualité, plus rapide, et sans surcoût, sont de plus en plus requises. Il est communément admis que la miniaturisation constitue le chemin le plus direct pour atteindre ce but, et une riche activité scientifique se consacre désormais au développement de composants micrométriques tels que valves, pompes, systèmes de chromatographie, et bien plus encore, donnant ainsi naissance à un nouveau domaine scientifique s'articulant autour de la microanalyse totale [104, 105, 106].

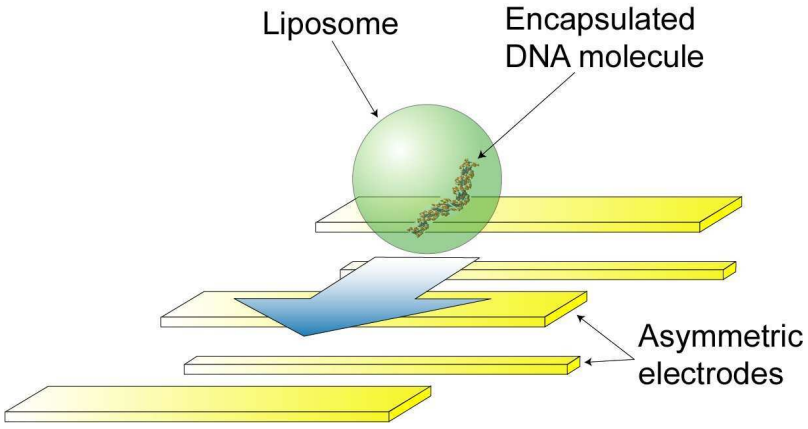

FIG. 6: Schéma conceptuel pour la manipulation de macromolécules par vésicule lipidiques. Une ou plusieurs molécules - de l'ADN dans le cas présent - sont enfermées à l'intérieur d'un liposome micrométrique qui est lui-même mis en mouvement par un réseau d'électrodes asymétriques induisant un écoulement électroosmotique à travers un canal fluidique. Figure tirée de [59].

C'est dans ce cadre que la manipulation, le traitement et l'analyse de nano-objets et de macromolécules dans un système microfluidique présentent un intérêt majeur. Un grand nombre de dispositifs originaux ont d'ores et déjà été proposés pour piéger, mélanger et séparer des molécules et des particules. Beaucoup de ces méthodes sont fondées sur l'électrocinétique. Par exemple, une bille micrométrique unique peut être piégée par effet diélectrophorétique [107]. Cependant, puisque la force diélectrophorétique f_{DEP} varie comme $f_{DEP} \propto R^3 \nabla E^2$, où R est le rayon des billes et E le champ électrique appliqué, et étant donné que la force de friction $f_{friction}$ varie seulement comme $f_{friction} \propto R$, une tension croissante est nécessaire à mesure que la taille de l'objet à piéger diminue, ce qui est susceptible d'interférer avec la viabilité de matériaux biologiques. De plus, un grand nombre d'objets sont manipulés ensemble et des interactions indésirables peuvent avoir lieu. Les pincettes optiques qui s'avèrent très efficace pour manipuler des objets uniques ne permettent pas de traiter des processus en parallèle.

Pour tirer profit des systèmes de microanalyse totale tout en s'affranchissant d'outils trop élaborés, nous proposons d'encapsuler des objets submicrométriques dans des vésicules lipidiques géantes. La Figure 6 illustre le concept que nous avons développé expérimentalement. Une capsule biocompatibe contenant un médicament, des macromolécules ou encore des nano-objets synthétiques, est déplacée au-dessus d'un microréseau d'électrodes à travers un canal fluidique. Cette capsule est suffisamment grande pour être détectée par des moyens conventionnels impliquant par exemple la fluorescence.

1.2.2 *Encapsulation de Matériaux*

Différents objets biologiques et synthétiques ont été encapsulés dans des liposomes pour évaluation. Les photographies A et B de la Figure 7 montrent un liposome marqué avec une molécule amphiphile fluorescente appelée DiO et qui contient des billes de polystyrène submicrométriques fluorescentes rouge. Les billes parcouraient l'intérieur du liposome sans pouvoir s'en évader, même après un temps très long. Pour une caractérisation plus quantitative du confinement, nous avons défini un "temps d'évasion" τ_E qui représente le temps typique nécessaire à une particule pour s'évader par mouvement Brownien si aucune membrane n'était présente,

$$\tau_E = \frac{\phi^2}{4D} \tag{1.1}$$

où ϕ représente le diamètre du liposome et D la diffusivité de l'objet encapsulé. La diffusivité était estimée en utilisant l'approximation de Stokes-Einstein,

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \tag{1.2}$$

avec η la viscosité de l'eau, k_B la constante de Boltzmann, r le rayon de l'objet, et T la température prise égale à 300 K. Dans le cas de nos

billes, $r = 100$ nm, avec $\eta = 0.89$ mPa.s et $k_B T = 4.12 \times 10^{-21}$ J, on obtient $D = 2.46 \times 10^{-12}$ $m^2.s^{-1}$. Ainsi, d'après la Figure 7 nous avons $\phi = 14$ µm, on en déduit alors $\tau_E = 19.9$ s. Puisqu'aucune des trois particules n'a traversé la membrane pendant $\sim 8\tau_E$, le confinement peut être considéré comme bon et la membrane du liposome est hermétique aux objets ayant une taille d'au moins quelques centaines de nanomètres.

GFP = Green Fluorescent Protein en anglais

La possibilité de transporter de la GFP a été testé. La photographie C de la Figure 7 montre en fluorescence une vésicule remplie de GFP. Aucune fuite n'a été enregistrée sur plusieurs minutes (des centaines de τ_E). Dans ce cas particulier, la dialyse constituait un moyen efficace d'évacuer la protéine libre en solution et le procédé peut être généralisé pour toute sorte de matériaux. D'autres méthodes impliquent des centrifugations à faible vitesse [45], mais après plusieurs essais infructueux avec des billes, nous pensons que les particules sont propulsées à travers la membrane et détruisent ainsi la majorité des liposomes. Néanmoins, ce procédé devrait s'avérer viable pour des objets très flexible et légers comme les protéines ou l'ADN.

La manipulation de l'ADN est sûrement l'un des domaines les plus prometteurs du fait des nombreuses applications en génie génétique ou plus généralement dans le secteur biomédical. Nomura *et al* [108] ont décrit l'encapsulation d'ADN dans des liposomes géants et ont souligné la nécessité d'utiliser de vastes capsules pour incorporer de l'ADN génomique naturel contenant $10^5 - 10^8$ paires de base. Nous sommes parvenus à améliorer la qualité de l'imagerie en terme de résolution en utilisant la microscopie de fluorescence conventionnelle. Sur l'image D de la Figure 7, une unique molécule d'ADN λ est piégée à l'intérieur d'une vésicule géante. Les lipides et l'ADN λ sont marqués avec des molécules qui fluorescent à des longueur d'ondes différentes. En conséquence, puisque la tâche pointée sur l'image D est visible en fluorescence verte mais pas en rouge (Figure 7E), elle ne peut être un résidu lipidique mais forcément une molécule d'ADN λ unique. Un autre exemple peut-être même plus convaincant est donné sur la Figure 7F où apparaissent simultanément des liposomes en rouge et de l'ADN λ en vert.

Le SYBR Green est un intercalant vert fluorescent des acides nucléiques

Nous introduisons maintenant une expérience destinée à démontrer l'excellent confinement de l'ADN piégé dans un liposome. Deux solutions de liposomes non marqués ont été préparées : la solution A contenait de l'ADN λ marqué avec du SYBR Green localisé à l'intérieur et à l'extérieur des liposomes. La solution B contenait de l'ADN λ marqué localisé à l'extérieur des liposomes seulement. Les deux solutions avaient les mêmes quantités totales d'ADN, à savoir 2×10^{11} molécules. De la DNase a été alors injectée dans chaque solution afin de digérer les molécules d'ADN λ accessibles. Les spectres d'émission en fluorescence sont représentés sur la Figure 8. On peut en déduire que les molécules d'ADN λ piégées ont été protégées des enzymes par la membrane lipidique, alors que les molécules en-dehors des vésicules ont été entièrement digérées. Il faut noter qu'une fois l'équilibre atteint, les spectres d'émission ne variaient plus sur plusieurs heures ce qui représente plus de $100.000\tau_E$ (Equation 1.1, $\phi = 10$ µm,

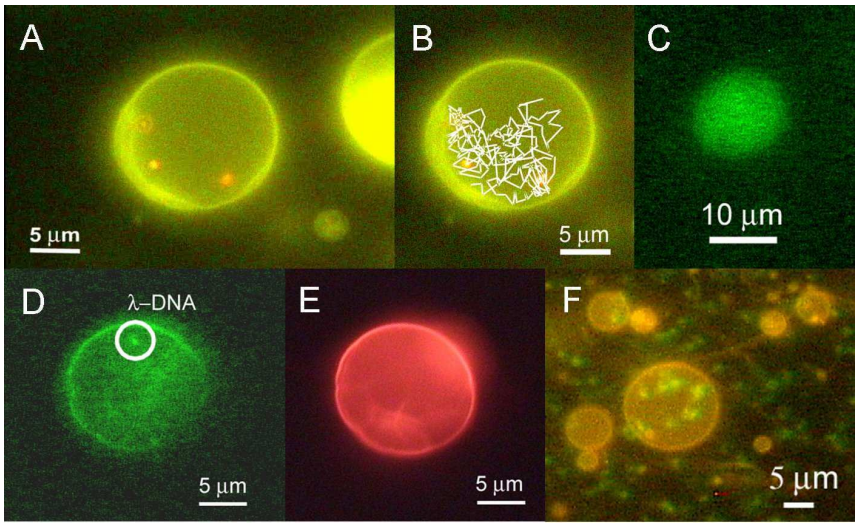

FIG. 7: (A) Encapsulation de trois billes rouges fluorescentes de diamètre 200 nm dans un liposome géant marqué avec du DiO. Un filtre d'excitation ultraviolet large bande a été utilisé pour l'observation simultanée de ces deux espèces colorées différemment. Les images numérisées ont été traitées pour équilibrer les couleurs et ajuster leur luminosité à des niveau égaux. (B) Trajectoires des particules pendant $\sim 8\tau_E$. Les particules étaient libres de se déplacer mais n'ont pas pour autant franchi la membrane. (C) GFP piégée dans un liposome géant. Pour se débarasser des protéines extravésiculaires, la solution a été filtrée par dialyse de telle façon que le niveau de fluorescence de l'arrière-plan devienne négligeable par rapport à l'intérieur du liposome. (D) Image par fluorescence d'ADN λ emprisonné dans un liposome. L'ADN λ a été coloré avec du SYBR Green tandis que du DiI (émission dans le rouge) a été incorporé dans la membrane du liposome. Le liposome était observé avec un filtre d'excitation bleu à bande étroite adapté pour le SYBR Green. (E) Même système que précédemment avec un filtre d'excitation vert large bande adapté au DiI. A cause de la faible réponse en fluorescence, la partie (D) a été numériquement retouchée en terme de luminosité et de contraste. En comparaison, la partie (E) a été assombrie pour présenter un niveau similaire à celui de la partie (D). Ces images ont été prises à un intervalle de ~ 1 s, juste le temps de changer de filtre. (E) Image en fluorescence de liposomes contenant de l'ADN λ. Les points verts représentent les molécules d'ADN λ tandis que les lipides sont colorés en rouge. Un filtre d'excitation bleu large bande a été utilisé pour cette image bicolore, ainsi qu'une caméra CCD couleur haute sensibilité. Figure tirée de [59].

$D = 10^{-9}$ $m^2.s^{-1}$). En bref, la membrane des liposomes agit comme une paroi infranchissable et protège le contenu de l'environnement exactement comme le fait la membrane des compartiments cellulaires. La fraction d'ADN λ encapsulé a pu être estimée directement à partir de la Figure 8 : soient F_A^i, F_B^i, F_A^f et F_B^f les intensités de fluorescence prises à la longueur d'onde d'émission maximale du SYBR Green, soit

520 nm, des solutions A et B aux temps initial et final respectivement. La fraction d'ADN piégé f_{DNA} s'exprime alors simplement par :

$$f_{DNA} = \frac{F_A^f - F_B^f}{F_A^i - F_B^f} \tag{1.3}$$

En prenant $F_A^i (\approx F_B^i) = 541$, $F_B^f = 56$, et $F_A^f = 142$, nous obtenons $f_{DNA} = 18\%$, ou bien en termes de nombre de molécules, $3,6 \times 10^{10}$. Il faut noter ici que la méthode de préparation des liposomes ne nous permet pas de contrôler la fraction de matériel encapsulé. En revanche, nous sommes en mesure d'ajuster la quantité absolue en ajustant la concentration du matériel dans la solution liposomale en cours de préparation.

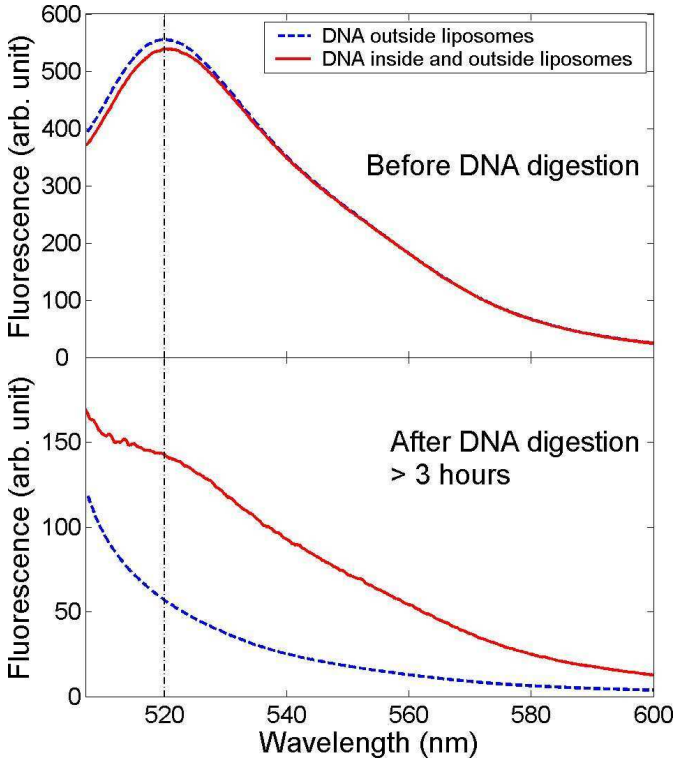

FIG. 8: Spectres d'émission en fluorescence des solutions A (rouge) et B (bleu). La longueur d'onde d'excitation est de 497 nm tandis que la longueur d'onde d'émission maximale attendue pour ce marqueur de l'ADN est de 520 nm. Haut : spectres initiaux avant l'ajout d'enzyme. Les deux spectres sont presque superposés du fait des mêmes quantités d'ADN λ dans chaque solution. 0,1 mg/mL de DNase a ensuite été injecté dans les deux solutions. Bas : spectres finaux bien après que l'état d'équilibre soit atteint (> 3 h). La solution A présente encore un épaulement à 520 nm ce qui est caractéristique de la présence d'ADN λ. En comparaison, le spectre de la solution B décroit exponentiellement indiquant que la totalité des molécules d'ADN λ ont été digérée. Figure tirée de [59].

1.2.3 *Transport de Liposomes*

Un grand nombre de méthodes ont été développées pour pomper des fluides et pour manipuler des objets micrométriques dans des dispositifs MEMS, tels que des micropompes mécaniques ou encore des systèmes de diélectrophorèse à onde propagative [109]. Nous avons choisi une technique récente très attractive et relativement simple à mettre en œuvre. Elle consiste en un réseau micrométrique d'électrodes asymétriques qui pompe un fluide par un effet d'électroosmose alternative. La principe a été initialement proposé par Ajdari [110] ; un modèle théorique conforté par des données expérimentales a été ensuite établi peu après [111]. Par application d'une tension alternative, le fluide est tiré par les charges de la double couche créées au-dessus de chaque paire d'électrodes. Les directions sont opposées pour deux électrodes adjacentes à cause de leur polarité différente. Seulement grâce à la géométrie asymétrique, l'écoulement net est non nul. Au voisinage des électrodes, la dynamique du fluide est complexe et comprend des tourbillons et des cisaillements. A une distance du substrat plus grande que la périodicité du réseau d'électrodes, l'écoulement devient stable et unidirectionnel [112].

MEMS = Micro Electro Mechanical System

La Figure 9 montre une photographie agrandie du réseau d'électrodes. Pour évaluer précisément son efficacité, nous avons utilisé ce dispositif avec des billes fluorescentes de 0,2 µm de diamètre dans des solutions aqueuses de glucose avec différentes concentrations de chlorure de potassium. Nous nous attendions à ce que la vitesse du fluide varie fortement avec la conductivité, bien que cet effet ait été peu étudié pour les électrodes asymétriques. La Figure 10 présente les vitesses mesurées en fonction de la fréquence pour trois conductivités. Comme reporté par d'autres groupes [111, 112], il existe une fréquence optimale qui maximise la vitesse. De même, les vitesses deviennent plus rapides à mesure que la conductivité diminue, et la fréquence optimale se décale vers les faibles valeurs. Cet effet peut être qualitativement expliqué en considérant la partie diffuse de la double couche. L'épaisseur de celle-ci est donnée par la longueur de Debye qui varie comme l'inverse de la racine carrée de la conductivité. En conséquence, la couche diffuse devient plus fine lorsque la conductivité augmente et ainsi un volume ionique plus petit contribuera à entrainer le fluide. La vitesse doit ainsi décroitre avec une conductivité croissante, comme observé expérimentalement.

Nous avons déduit de cette dernière figure que la solution liposomale usuelle (138 mS/m) n'était pas bien adaptée à l'électroosmose alternative. Les liposomes ont donc été préparés dans une solution de 200 mM de glucose (156 µS/m) sans altération significative de leur qualité. Il faut remarquer ici la simplicité du montage - source de puissance standard, microscopie de fluorescence conventionnelle, objectifs à grandissement modéré - et son efficacité à suivre les liposomes en temps réel. La dépendance de la vitesse en fonction de la conductivité de la solution présente une grande importance pour la manipulation de liposomes chargés. La charge peut exiger un tampon spécifique avec un pH précis, et la conductivité peut ne pas toujours

s'accorder avec les conditions requises par l'électroosmose alternative. Dans ce cas, il sera alors indispensable d'échanger le tampon après encapsulation avec une solution adaptée soit par centrifugation ou bien par dialyse comme nous l'avons montré pour le cas avec la GFP (voir 1.2.2). Notons toutefois qu'une grande différence de pression osmotique sur les deux faces de la membrane des liposomes peut provoquer la destruction des vésicules.

1.3 MANIPULATION ET STIMULATION PAR CHAMP ELECTRIQUE

1.3.1 *Exemples de Dispositifs Microfluidiques*

L'objectif qui sera développé dans la suite consiste à manipuler et à stimuler des liposomes par des champs électriques intenses. Contrairement aux approches qui utilisent des électrodes en fibres de carbone positionnées par des micromanipulateurs [113], nous voulions utiliser des électrodes miniaturisées qui soient pleinement intégrées dans un dispositif microfluidique de manière à accomplir les tâches de façon routinière tout en garantissant une faible consommation énergétique.

Afin d'assurer une bonne uniformité du champ électrique à travers le canal microfluidique, les électrodes se devaient d'avoir un rapport d'aspect élevé et nous ne pouvions pas nous contenter d'électrodes gravées dans une couche métallique fine. Une façon simple de fabriquer de telles électrodes avec une hauteur parfaitement bien définie était d'utiliser un wafer SOI gravé ensuite par deep-RIE. Malheureusement, à cause de l'effet capacitif produit par la couche d'oxyde isolante entre les électrodes et le substrat de silicium, l'impédance d'entrée du dispositif était beaucoup trop faible à la fréquence requise pour que la source de puissance puisse délivrer le courant nécessaire. En bref, il fallait que le dispositif présente une impédance d'entrée supérieure à 1 kΩ aux fréquences comprises entre 100 kHz et 1 MHz.

SOI = Silicon On Insulator. Le wafer est constitué d'un substrat de silicium (~500 µm), puis d'une très fine couche d'oxyde de silicium (~1 µm) et d'une couche de silicium dopé d'épaisseur bien contrôlée.
RIE = Reactive Ion Etching. Procédé de gravure du silicium par plasma.

Le procédé de fabrication retenu fut finalement le suivant : un wafer de silicium dopé d'épaisseur 250 µm (résistivité inférieure à

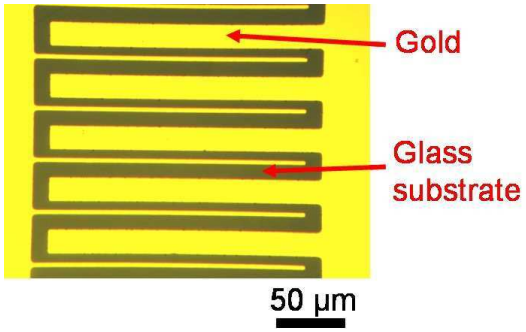

FIG. 9: Vue agrandie d'un réseau d'électrodes en or microfabriquées pour l'électroosmose alternative. Le électrodes larges et étroites ont une largeur de 20 et 5 µm respectivement. Les séparation entre elles sont de 10 et 5 µm. En conséquence, la périodicité du réseau est de 40 µm. Figure tirée de [59].

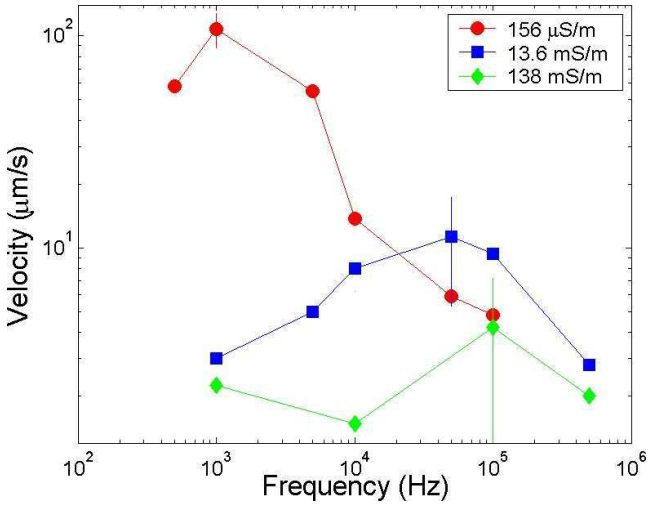

FIG. 10: Vitesse du fluide par électroosmose alternative en fonction de la fréquence pour trois solutions ayant différentes conductivités. Les vitesses sont estimées en analysant le mouvement des billes sur des séquences vidéo. La tension alternative appliquée est de 2 V_{rms}. La conductivité la plus élevée correspond à la solution usuelle utilisée pour la préparation des liposomes, c'est à dire 200 mM de glucose et 10 mM de KCl. A basse fréquence (< 1 kHz) et particulièrement à forte conductivité, la formation de bulles est observée due à des réactions électrochimiques qui se produisent au niveau des électrodes. Les mesures dans cette plage de fréquence ont donc été écartées. Figure tirée de [59].

0,01 Ω.cm) était assemblé sur un substrat de verre en utilisant une résine photosensible négative (mrL-6005, Microresist Technology) puis gravé par deep-RIE. La distance entre les électrodes variait de 30 à 500 µm. Des structures à fort rapport d'aspect ont ainsi pu être fabriquées efficacement sans avoir eu recours à des procédures lourdes comme l'électrodéposition. Cette technique peut être mise en œuvre aisément et répond à notre cahier des charges. Le canal était ensuite simplement couvert avec une plaque de verre fine recouverte de PDMS. La Figure 11 présente une photographie en microscopie électronique à balayage des électrodes ainsi fabriquées.

PDMS = PolyDiMéthylSiloxane

Un autre dispositif très similaire a été employé pour plusieurs des expériences décrites par la suite. La Figure 12 montre le dispositif dont la fabrication a été adapté d'un procédé décrit ailleurs [114]. Brièvement, un wafer de silicium dopé de 200 µm d'épaisseur était collé sur un wafer en Pyrex puis abrasé jusqu'à atteindre une épaisseur finale de 60 µm. Les électrodes ont été définies par lithographie optique et la couche de silicium a été gravée par deep-RIE sur toute l'épaisseur. Un second wafer en Pyrex scellait le dispositif de façon permanente. Des connexions fluidiques étaient pratiquées dans le verre par acide fluorhydrique avant l'assemblage final du dispositif [115]. Plusieurs dispositifs ont été ainsi fabriqués avec des distances entre électrodes comprises entre 20 et 100 µm. En ce qui concerne le protocole expérimental, les solutions liposomales étaient introduites à travers les connexions fluidiques et pénétraient spontanément dans les canaux

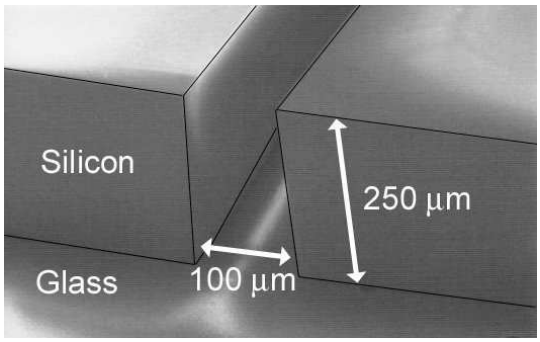

FIG. 11: Image en microscopie électronique à balayage d'électrodes à fort rapport d'aspect en silicium dopé collées sur un substrat de verre. Figure tirée de [58].

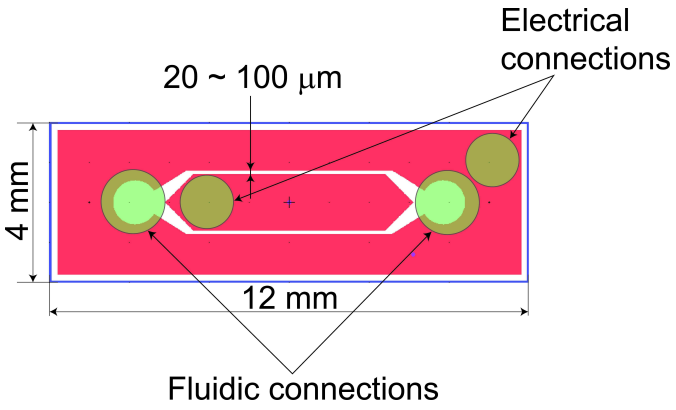

FIG. 12: Vue de dessus d'un dispositif microfluidique pour la manipulation par champ électrique de vésicules lipidiques. Les électrodes sont faites de silicium fortement dopé et gravées par deep-RIE. Elles sont scellées entre deux plaques de verre pour assurer l'étanchéité du canal microfluidique. Figure tirée de [40].

par effet de la force capillaire. Les connexions fluidiques étaient ensuite recouverte d'huile minérale pour empêcher l'évaporation de la solution.

1.3.2 *Alignement des Vésicules*

Une particule diélectrique immergée dans un milieu et soumise à un champ électrique acquiert un moment dipolaire colinéaire au champ électrique $\mathbf{p} \propto \mathbf{E}$, le terme multiplicateur dépendant directement de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti $K(\omega)$ qui est fonction de la fréquence du champ électrique ω :

$$K(\omega) = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \tag{1.4}$$

$$\epsilon^* = \epsilon + \frac{\sigma}{i\omega} = \epsilon - \frac{i\sigma}{\omega} \tag{1.5}$$

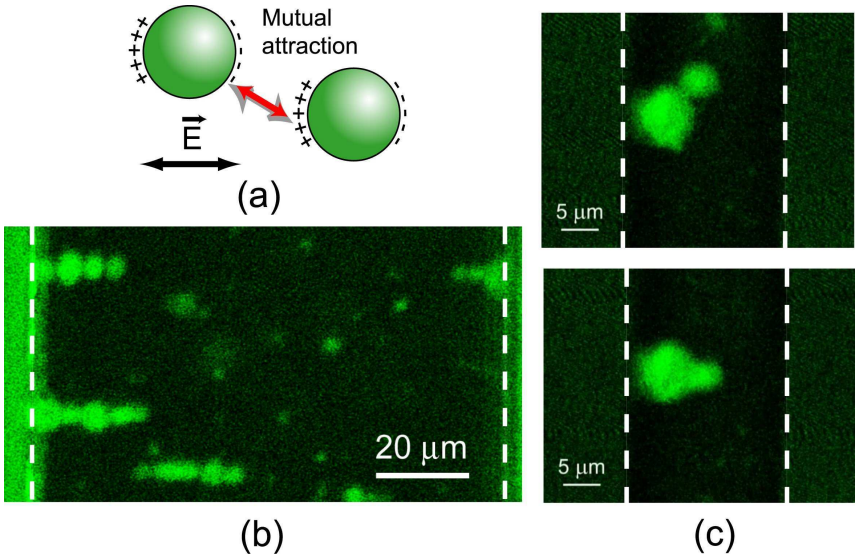

FIG. 13: Alignement de vésicules lipidiques chargées. (a) Principe d'attraction mutuelle induite entre des vésicules polarisées dans un champ électrique uniforme. (b) Vésicules formant des colliers de perles à l'intérieur d'un canal microfluidique de 100 µm de largeur. (c) Alignement de vésicules dans un canal étroit de 20 µm de large. Les images du haut et du bas sont prises à un intervalle de temps d'environ 5 s. Les tirets délimitent les bords des électrodes en silicium. Figure tirée de [40].

avec ϵ la permittivité, σ la conductivité, et les indices p et m se référant à la particule et au milieu respectivement. Lorsque plusieurs particules polarisées se rapprochent les unes des autres, elles subissent une interaction dipôle-dipôle attractive qui mène à un alignement en collier de perles. Il faut ici remarquer que l'alignement se produit plus efficacement dans un milieu à conductivité élevée. En effet, à faible fréquence (< 1 MHz) le facteur de Clausius-Mossotti augmente en valeur absolue avec la différence des conductivités des particules et du milieu. Dans le cas d'un milieu faiblement conducteur (σ < 100 µS/m), la force attractive tend vers zéro.

Deux exemples d'alignements de vésicules lipidiques obtenus avec un champ électrique d'intensité 0,5 $kV.cm^{-1}$ à 500 kHz transversalement à un canal microfluidique, sont montrés sur la Figure 13. Initialement, les vésicules étaient distribuées aléatoirement et leur charge intrinsèque négative les empêchait d'approcher les unes des autres. Lorsqu'une tension alternative d'amplitude suffisamment élevée pour surpasser à la fois leur répulsion électrostatique mutuelle et leur mouvement Brownien était appliquée, l'alignement prenait place en quelques secondes et perdurait aussi longtemps que le champ électrique était maintenu.

1.3.3 *Electroporation des Membranes*

En réponse à un champ électrique externe intense, les membranes biologiques forment des pores de dimension nanométrique, pourvu

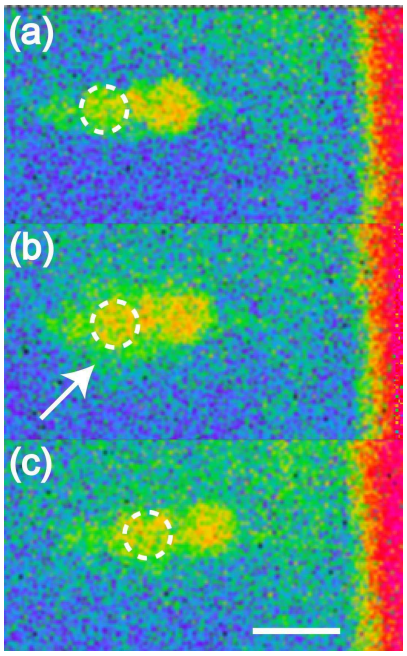

FIG. 14: Electroporation de vésicules lipidiques chargées. (a) Avant, (b) durant et (c) après l'application de 15 impulsions de 30 V. Les images sont en fausses couleurs et ont été acquises avec des intervalles d'environ 1 s. Le cercle en tirets symbolise la membrane d'une vésicule électroporée, et la flèche en (b) désigne le marqueur fluorescent diffusant hors de la vésicule. La bande rouge sur la droite représente une des électrodes. La barre d'échelle vaut 10 µm. Figure tirée de [40].

que leur potentiel transmembranaire $\Delta\Psi$ excède un certain seuil critique. En théorie, le potentiel transmembranaire induit par un échelon de champ électrique dépend du rayon R de la vésicule et de l'amplitude du champ électrique E [39] :

$$\Delta\Psi = 1.5RE\cos\theta\,[1 - \exp(-t/\tau)] \tag{1.6}$$

où θ est l'angle entre une ligne de champ et la normale à la surface de la membrane au point de formation d'un pore. Le temps de relaxation de la membrane est proportionnel au rayon de la vésicule, $\tau \propto R$, et dépend aussi des propriétés électriques de la membrane ; il est typiquement inférieur à 1 µs pour une vésicule de diamètre inférieur à 40 µm. En pratique, des champs électriques pulsés sont utilisés afin d'éviter des échauffements thermiques au sein de la solution. Nous avons par conséquent généré des impulsions carrées d'une durée de 10 µs et d'intensité 1 à 5 kV.cm^{-1} à 200 ms d'intervalle durant 2-3 s. La diffusion du marqueur fluorescent à travers la membrane de la vésicule a pu être observée en temps réel, ce qui atteste de la présence d'un pore (Figure 14). En l'absence de tension externe, les pores se referment sur une période de temps qui varie de la milliseconde à quelques secondes selon $\Delta\Psi$ [39]. Nous avons appliqué jusqu'à 50 impulsions pendant une durée totale approximative de 10 s sans dommages remarquables sur les vésicules pourvu que leur diamètre ne

dépasse pas environ 10 µm. Suite à une telle série d'impulsions, une telle quantité de colorant était relarguée dans le canal microfluidique que les vésicules pouvaient à peine être distinguées par fluorescence du reste de la solution. Cette procédure pourrait être exploitée pour obtenir le transfert contrôlé puis le mélange rapide de réactifs dans un dispositif microfluidique [116].

1.3.4 *Electrofusion de Vésicules*

Motivations et Principes

Des travaux précurseurs ont démontré l'électrofusion de vésicules en utilisant une paire d'électrodes en fibres de carbone positionées par un micromanipulateur [117, 118, 119, 113, 120]. Une autre approche originale utilise un laser pulsé ultraviolet focalisé sur le point de contact de membranes appartenant à deux vésicules distinctes pour initier la fusion and déclencher une réaction chimique [121]. Notre objectif ici était d'employer des électrodes microfabriquées intégrées au sein d'un dispositif microfluidique qui pourrait effectuer des fusions d'une façon routinière. Dans ce même esprit, Masuda *et al* ont mis au point une méthode pour fusionner des cellules dans un canal microfluidique [122].

Comme mentionné par Strömberg *et al* [113], l'électrofusion peut s'avérer être une technique de choix pour synthétiser des liposomes de manière combinatoire avec des compositions complexes. La membrane et le contenu pourraient être ajustés à la demande par des fusions séquentielles et leur propriétés biochimiques pourraient être modifiées en conséquence. Nous pensons qu'une telle technique pourrait être appliquée for exprimer des gènes en milieu confiné, pour transférer des médicaments, ou encore pour former des microréacteurs biomimétiques [117].

L'électrofusion de vésicules nécessite de mettre en contact les membranes de deux vésicules distinctes et de former des pores qui vont se reconnecter par relaxation, puis produire une vésicule hybride grâce à la tension de surface et à la fluidité des membranes (voir Figure 15).

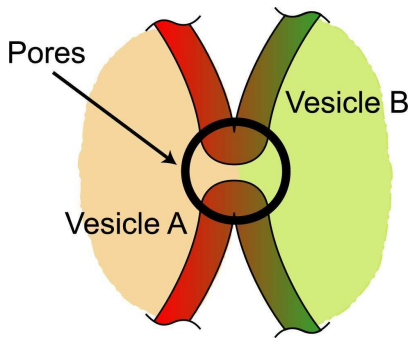

Fig. 15: Principe de l'électrofusion de vésicules illustrant la reconnexion des pores de chaque membrane en contact. Figure tirée de [40].

La probabilité de fusion Φ est souvent représentée par une équation de type Arrhenius [123],

$$\Phi \propto \exp\left(-\frac{\delta E}{k_B T}\right) \tag{1.7}$$

où $\delta E = \alpha \Delta\Psi + \beta(\kappa, ...)$ est l'énergie d'activation, avec α une constante, $\Delta\Psi$ le potentiel transmembranaire défini par l'Equation 1.6, β une fonction de la rigidité de courbure de la membrane κ, tandis que les autres termes représentent des paramètres structuraux. Cette croissance exponentielle de la probabilité de fusion est contre-balancée par la fragilité intrinsèque des vésicules qui sont davantage susceptibles d'éclater à mesure que l'intensité du champ électrique est élevée.

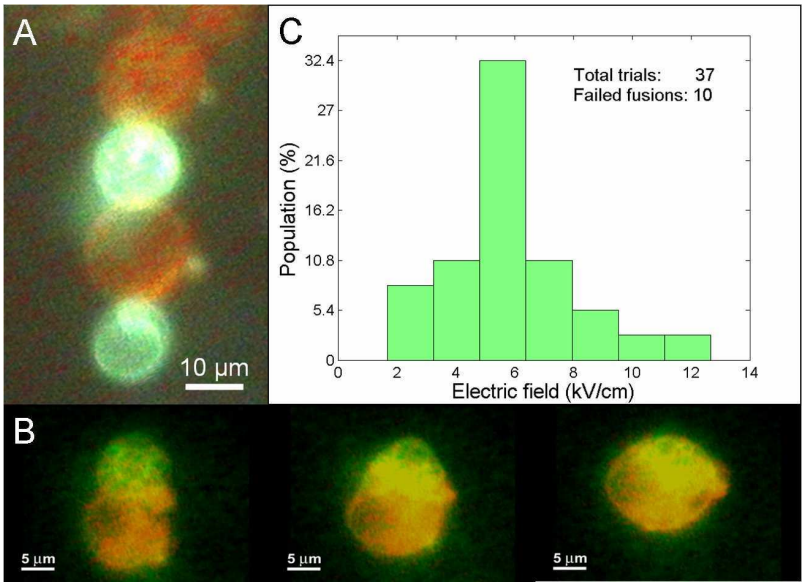

FIG. 16: (A) Alignement en collier de perles le long du champ électrique de liposomes marqués par DiI et DiO. Les électrodes sont situées en haut et en bas de l'image. Un filtre d'excitation ultraviolet large bande a été utilisé pour l'observation simultanée de ces liposomes en deux couleurs et les images ont été numériquement remaniées pour la clarté. (B) Séquence d'électrofusion de liposomes marqués par DiO et DiI (de la gauche vers la droite). Les conditions expérimentales sont les mêmes que précédemment. A la fin de la fusion (image la plus à droite), un léger changement de la couleur de la membrane (jaune) est visible, ce qui indique qu'à cet endroit, les composants lipidiques sont mélangés. (C) Distribution du champ électrique requis pour fusionner un couple de liposomes. Les liposomes avaient environ la même taille et étaient en contact avant l'application de 10 pulses haute tension. Sur les 37 expériences, 10 restèrent sans succès : les liposomes ne fusionnèrent pas, même à très haute tension. Parfois, les liposomes se détruisaient ; ces cas ont été comptabilisés comme infructueux. Figure tirée de [59].

Fusion Combinatoire de Liposomes

Une fois donc les vésicules en contact par la procédure décrite en 1.3.2 (voir Figure 16A), nous avons généré des impulsions de haute tension (jusqu'à ~200 V selon les distances entre électrodes) pour parvenir à excéder le potentiel transmembranaire critique et à maximiser le taux de fusion. Après relaxation, les lipides constitutifs des membranes et les contenus des liposomes étaient mélangés. La Figure 16B illustre une telle fusion combinatoire de vésicules géantes dont les membranes contenaient différents colorants lipophiles.

Nous avons caractérisé cette technique par le seuil du champ électrique nécessaire pour initier la fusion entre deux liposomes de taille similaire. La Figure 16C montre la distribution qui en résulte. On peut y voir une large fraction de liposomes (~32,4 %) qui fusionnent ensemble pour un champ électrique appliqué autour de 6 kV/cm. Cependant, quelques liposomes sont restés impossibles à fusionner : soit la déstabilisation de leur membrane ne se réalisait pas du tout, ou bien les membranes étaient irréversiblement détruites. Souvent, les plus petites vésicules (< 10 µm) étaient plus difficiles à fusionner tandis que les plus grandes vésicules se détruisaient toutes au-delà de 10 kV/cm. Nous pensons que du fait d'une surface de contact réduite entre deux petites vésicules ou bien parce que certaines membranes étaient multilamellaires, la déstabilisation de la membrane et sa reconnexion ne pouvaient pas être obtenues dans certains cas.

Transfert de Nanoparticule

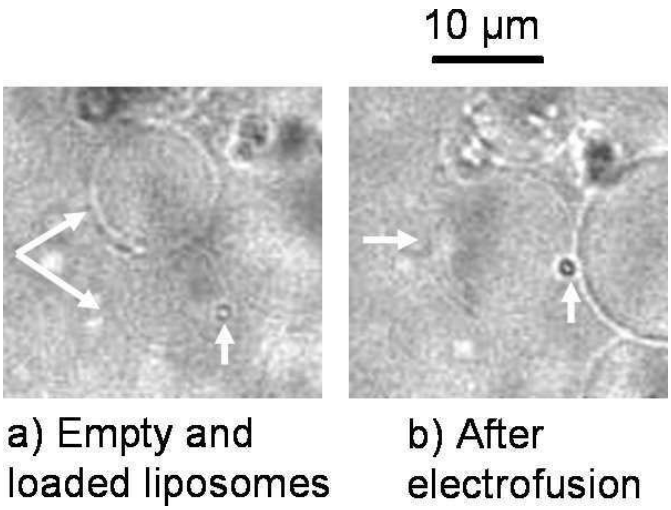

Fig. 17: Transfert par électrofusion d'une nanoparticule de 320 nm de diamètre encapsulée dans un liposome vers un second liposome vide. Le champ électrique était produit ici par des électrodes macroscopiques. Figure tirée de [58].

Dans le contexte du transfert de microstructure depuis un liposome vers une cellule, nous avons testé la possibilité de fusionner un liposome contenant une nanoparticule avec un liposome vide (voir Figure 17). Dans le cas où la solution contient une forte concentration de

nanoparticules diélectriques, les liposomes semblaient beaucoup plus sensibles à l'effet du champ électrique. Même à des tensions appliquées plutôt faibles - équivalentes à un champ électrique de 0,5 kV/cm - la destruction des membranes se produisait parfois de même que la fusion des vésicules durant la phase d'alignement à faible tension alternative. Nous pensons que ce surprenant phénomène est dû à la constriction des lignes de champ créee au voisinage du matériau diélectrique et qui amplifie localement l'intensité du champ électrique. En conséquence, les paramètres de fusion nominaux différaient des expériences précédentes : l'alignement était obtenu à 100 kHz avec un champ électrique de 0,05 kV/cm, et la fusion se réalisait avec une amplitude de 1,5 kV/cm. Les impulsions restaient de même durée.

Electrofusion de Vésicules Cellulaires

Nous nous sommes enfin efforcés de fusionner des vésicules autres que purement lipidiques en utilisant simplement des électrodes macroscopiques. Ces expériences ont révélé la difficulté de déstabiliser les membranes selon leur composition et leur structure. Nos très faibles taux de fusion obtenus avec des bactéries *E. coli* suggèrent que la fluidité des membranes est un des facteurs clés. La fusion entre liposomes qui n'ont pas de protéines ou de complexes macromoléculaires à leur surface et qui possède une bonne fluidité, était en comparaison très aisée. Pour les bactéries, à cause de la présence du cytosquelette derrière la membrane, celle-ci était moins susceptible de se déstabiliser et de se reconnecter avec une bactérie voisine.

Nous avons alors tenté de fusionner des vésicules d'origine cellulaire dont la membrane est suffisamment souple et fluide pour permettre la formation de pores et la réorganisation qui suit les stimulations électriques. La Figure 18 montre un exemple d'électrofusion de provacuoles extraites de bactéries *E. coli*. L'électrofusion nécessitait de plus nombreuses impulsions - une vingtaine - et chacune durait plus longtemps - 90 µs - que pour l'électrofusion de liposomes. Même si

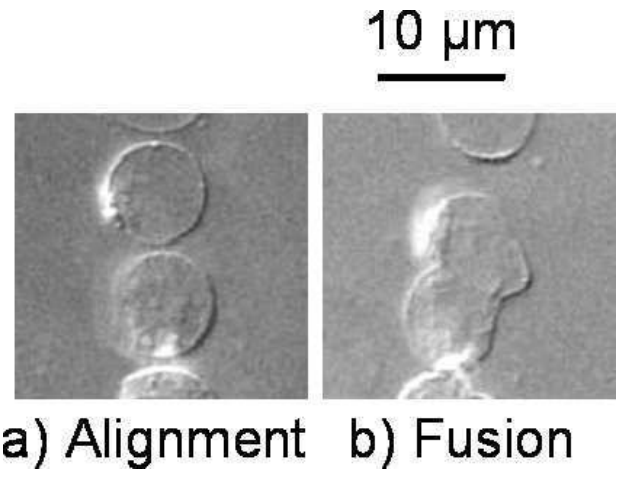

Fig. 18: Electrofusion de provacuoles extraites d'*E. coli* en utilisant des électrodes macroscopiques. Figure tirée de [58].

la reconnexion des membranes a bien eu lieu, on peut clairement voir que la réorganisation en sphéroïde reste gênée par la rigidité des membranes.

2

MICROCHAMBRES FEMTOLITRIQUES POUR DES ETUDES EN MOLÉCULE UNIQUE

2.1 ACTIVITÉ D'ENZYMES UNIQUES ISOLÉES DANS DES CHAMBRES MICROFABRIQUÉES

2.1.1 *Introduction*

La compréhension fine des fonctions biologique nécessite des outils de taille comparable à celle des composants de base du vivant [100, 124, 125, 126]. Des études de molécule unique ont révélé des comportements moléculaires qui sont en général occultés par les expériences réalisées sur un grand nombre de molécule et moyennées dans le temps [127, 128]. Bien que la plupart de telles approches s'appuie sur des statégies optiques sophistiquées pour limiter le volume de détection [129, 130], une autre approche prometteuse est de réaliser un criblage à l'intérieur de très petits compartiments. Des liposomes [131, 117], des émulsions d'huile [132, 133], des stratégies basées sur la microfluidique [134, 135] ou sur d'autres principes technologiques [136, 137] ont été utilisées pour confiner des échantillons aqueux de volume infime. A mesure que le volume est réduit, il devient difficile de contrôler :

- L'évaporation qui devient considérable au niveau du nanolitre [136, 133] ;
- Les dimensions et la monodispersité du volume réactionnel [137] ;
- Un positionnement bien défini des échantillons pour faciliter les observations [131, 138].

Les micro- et nanotechnologies permettent de concevoir de très petites structures répétitives et sont bien adaptées pour répondre à ces enjeux tout en autorisant une intégration à grande échelle [126]. En combinaison avec des techniques de microscopie avancées telles que la fluorescence à réflexion interne totale ou la microscopie confocale, des dispositifs microfabriqués ont été exploités pour la détection de molécules uniques [130, 134], permettant un confinement fin du volume d'observation. Cependant, leur utilisation pour enrayer la diffusion des produits de réaction à l'échelle de l'enzyme unique n'a pas encore été démontré.

Nous avons par conséquent développé un dispositif à base de silicone qui consiste en un déploiement de cavités micrométriques. Nous l'avons utilisé pour enfermer hermétiquement des volumes de solution allant jusqu'à quelques femtolitres seulement sur des longues périodes de temps. Le recours aux techniques de microfabrication assure que les cavités ou microchambres sont uniformes et précisément positionnées. Nous avons démontré la faisabilité de notre approche en mesurant l'activité de molécules individuelles de β-galactosidase et de péroxydase du raifort. Cette approche devrait s'avérer prometteuse

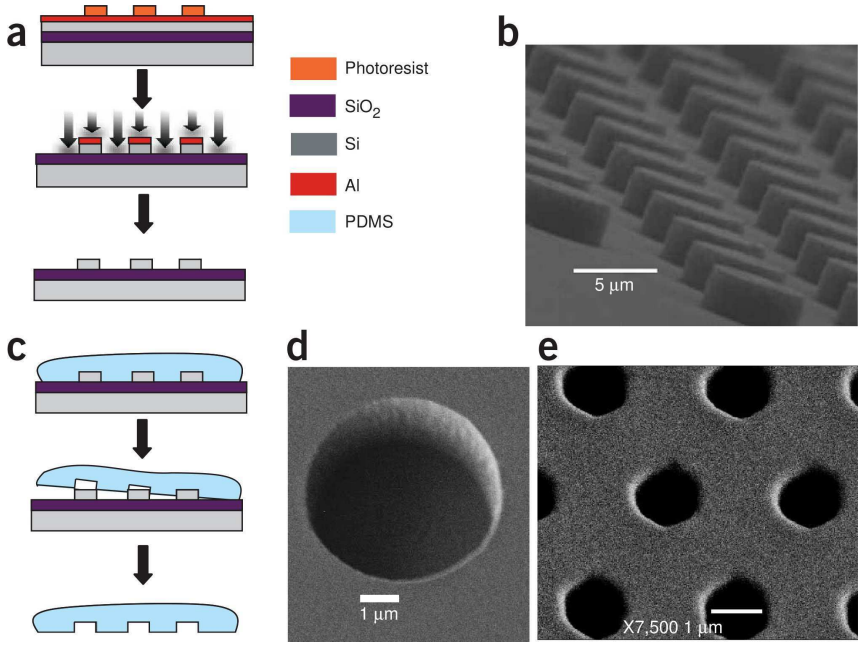

FIG. 19: Fabrication des microchambres en PDMS. (a) Fabrication du moule : un wafer SOI de 1,5 µm d'épaisseur était recouvert d'un masque en aluminium, lui-même texturé par lithographie optique. Après gravure et dissolution de la couche d'aluminium, la surface de silicium découvrait un déploiement régulier de plots cylindriques. (b) Image au MEB du moule de silicium, dans un région texturée avec des microstructures de 5 µm de diamètre. Cette technique permet un contrôle précis de la forme des chambres. (c) Après avoir recouvert le moule de Téflon, du PDMS liquide était versé, chauffé à 90 °C pour obtenir sa polymérisation, puis enfin démoulé. (d,e) Images au MEB de feuilles de PDMS : les motifs du moule ont été précisément reproduits pour des diamètres de chambre de 5 µm (d) et 1 µm (e) ce qui pour ces dernières représente un volume interne de 1,4 fL. Figure extraite de [140].

pour une vaste gamme de criblages biochimiques ultrasensibles à l'échelle de la molécule unique.

2.1.2 *Procédé de Fabrication*

PDMS = Poly(DiMéthylSiloxane)

Nous avons sélectionné comme matériau le PDMS, un élastomère de silicone qui est transparent à la lumière visible et qui adhère spontanément sur les surfaces lisses. La matrice du PDMS a une faible affinité pour les molécules hydrophiles et sa surface peut être traitée pour ne pas présenter d'interaction favorable avec les molécules biologiques [139]. Par ailleurs, ce matériau peut être aisément texturé par des techniques de moulage. Nous avons donc préparé un wafer de silicium texturé en plots cylindriques micrométriques (Figure 19) et nous l'avons utilisé comme moule pour produire des séries de feuillets identiques en PDMS. Des images par MEB ont montré des chambres cylindriques et uniformes, régulièrement espacées.

MEB = Microscopie Electronique à Balayage

Pour introduire la solution tampon à l'intérieur des cavités, nous avons pressé une goutte entre une plaque de verre et le feuillet en PDMS, nous permettant d'obtenir ainsi une distribution homogène par capillarité. Du fait de la pression, les bulles d'air et le liquide en excès étaient évacués, et les forces de van der Waals étaient suffisantes pour assurer une parfaite adhésion du PDMS sur la surface de verre. Comme démontré ci-après, cette étape permettait de distribuer la solution tampon dans chacune des 10^5 cavités par mm^2 contenant seulement quelques femtolitres de solution (Figure 20).

2.1.3 *Evaluation de l'Etanchéité*

Ces microchambres femtolitriques ont été inspectées pour parer à des fuites éventuelles et à l'évaporation. Pour cela, des billes fluorescentes (200 nm) ou bien des boîtes quantiques (6×12 nm) ont été enfermées dans des microchambres de tailles variées (de 1,4 à 100 fL). Leur mouvement brownien fut observé durant plus d'une heure démontrant la présence d'une phase liquide stable. De plus, aucune particules n'a quitté sa microchambre et la possibilité de connexion entre microchambres par des microcanaux a ainsi été écartée.

Le PDMS est connu pour avoir une affinité pour les molécules hydrophobes. Ainsi, des composés lipophiles peuvent être transportés à travers des membranes de PDMS [141]. Nous avons vérifié que les solutés hydrophiles ne pouvaient pas diffuser à travers la paroi des microchambres. La totalité des microchambres a été remplie de diverses solutions de colorants fluorescents chargés négativement et le feuillet de PDMS fut scellé. Ensuite, en utilisant une très petite ouverture, une des chambres était photoblanchie durant quelques secondes. L'enregistrement qui suivit montrait que le colorant ne pouvait pas diffuser depuis les microchambres non affectées vers celle qui avait été photoblanchie, cette dernière demeurant sombre durant la durée du test qui était de 20 min (Figure 20e). Dans une expérience inverse, nous avons activé la fluorescence de plusieurs microchambres, en utilisant un composé fluorescent en cage et une illumination UV sélective. A nouveau, aucune diffusion ne fut observée (Figure 20g). Il s'avère par conséquent que le PDMS se comporte comme une barrière imperméable pour les composés solubles dans l'eau, et qu'il permet d'assurer une bonne étanchéité pour chaque microchambre. Ces expériences montrent aussi que bien que toutes les microchambres contiennent la même solution de départ, chacune demeure adressable individuellement par des moyens simples, en l'occurence ici la lumière.

Quand le volume décroit, le rapport de la surface au volume - et par voie de conséquence les effets de surface - augmente considérablement et mène quelquefois à la dénaturation des biomolécules présentes dans l'échantillon [142]. Dans le cas du PDMS, cet effet peut être minimisé en recouvrant la surface avec un excès de BSA [143]. Afin de vérifier que les microchambres étaient bien adaptées à des études biologiques, nous avons utilisé une solution de départ contenant des

BSA = Bovine Serum Albumin

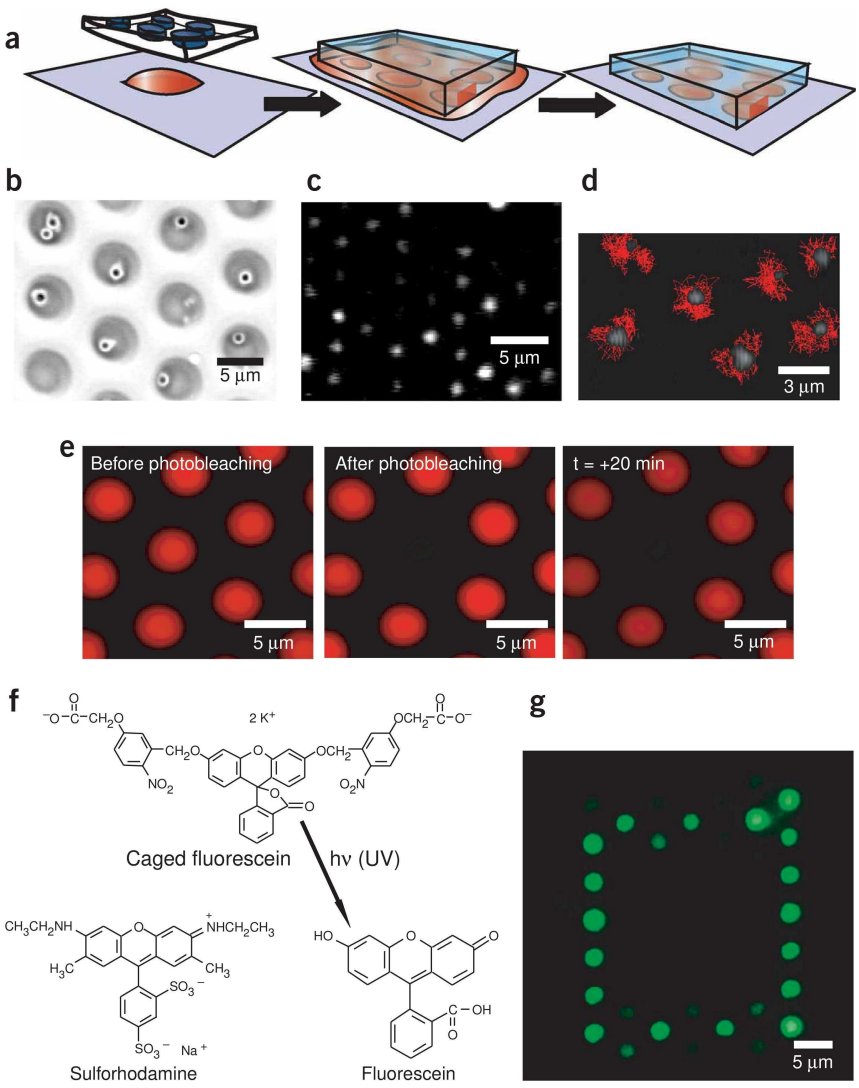

FIG. 20: Remplissage des microchambres et évaluation de l'étanchéité. (a) Processus de remplissage : la solution tampon qui contient les molécules d'intérêt est pressée entre une plaque de verre et un feuillet en PDMS. Du fait de la pression, le PDMS s'attache à la surface de verre et ferme les chambre empêchant la diffusion. (b-d) Encapsulation de microbilles de polystyrène (b), de boîtes quantiques (c) et de chaînes d'ADN-λ (d) dans des microchambres de différentes tailles. Pour cette dernière image, les trajectoires de molécules d'ADN enregistrées pendant 2 min et subissant un mouvement brownien ont été superposées. Aucun saut vers une chambre voisine n'a été observé. (e) Expérience de photoblanchiment utilisant de la sulforhodamine G (voir f). L'image de gauche et celle du milieu montrent la chambre centrale juste avant et juste après le photoblanchiment. L'image de droite était prise 20 min plus tard. La diffusion du colorant à travers le PDMS, qui résulterait en une augmentation de l'intensité de fluorescence dans la chambre centrale, ne fut pas observée. (g) Une fluorescéine en cage (voir f) peut être activée sélectivement à l'intérieur de quelques chambres en utilisant un faisceau de lumière UV focalisé. Dans le cas présent, un carré a été d'abord dessiné avant d'enregister l'intensité de fluorescence sous lumière visible. Figure extraite de [140].

fragments d'ADN et un intercalant fluorescent. Comme avec les billes, le mouvement brownien des fragments d'ADN pouvait être observé dans les microchambres, sans adsorption apparente sur les parois ou de diffusion vers une microchambre voisine (Figure 20d). Sous ces conditions, la dynamique usuelle des chaînes d'ADN était préservée, ce qui ouvre la possibilité d'utiliser ce dispositif comme puce à ADN individuel [135, 133].

2.1.4 *Mesure de l'Activité Enzymatique*

Dans le cas des enzymes, les microchambres permettent de piéger dans la même cavité à la fois les protéines et leur substrat/produit. Grâce au volume extrêmement petit, une infime quantité de produits enzymatiques est suffisant pour atteindre une concentration détectable, et nous pouvons par conséquent détecter directement les activités individuelles d'enzymes isolées. Nous avons démontré cette idée en utilisant la β-galactosidase (β-gal) ou la péroxydase du raifort (HRP) comme enzymes modèles. Une mixture fluorogénique commerciale [144] a été dispersé sur l'ensemble d'un réseau de microchambres de 30 fL. Après fermeture, nous avons mesuré l'intensité de fluorescence simultanément dans ~300 microchambres, en utilisant un microscope. Lorsque la solution enzymatique était diluée jusqu'à un rapport molaire proche d'une enzyme par microchambre, il s'est avéré que la luminosité dans le réseau n'était pas distribuée de manière homogène (Figure 21**a**). Plus précisément, l'intensité était quantifiée en quelques niveaux discrets : des microchambres sombres, moyennement illuminées et claires purent être distinguées. L'enregistement en temps réel de l'activité enzymatique dans chaque microchambre révélait aussi une quantification dans le taux d'augmentation de la fluorescence (Figure 21**b**). L'histogramme de l'incrément de fluorescence observé sur 60 s montre quatre pics bien définis que nous avons pu attribués à la présence de zéro, une, deux et trois enzymes respectivement, dans les microchambres correspondantes. Les pics sont régulièrement espacés, et le taux de réaction d'une enzyme unique a pu être dérivé à partir de la valeur de l'incrément (Figure 21**c**). Dans le cas de la β-gal, nous avons déterminé le taux comme étant de 20 s^{-1}, ce qui est en accord avec la valeur de 17 s^{-1} précédemment publiée [144]. L'aire sous chacun des pics correspond au nombre de microchambres contenant zéro, une, deux, ou trois enzymes. L'histogramme qui en résulte est cohérent avec la statistique de Poisson attendue pour une distribution aléatoire de molécules dans les microchambres. Le paramètre libre donne le nombre moyen d'enzymes par microchambre, ce qui renseigne ensuite sur la véritable concentration d'enzyme active. Nous avons observé que plus de 70% de l'enzyme introduite restait active. Si les microchambres étaient ouvertes puis fermées de nouveau, l'activité était observée à une position différente et aléatoire (Figure 22). Ceci montre que les enzymes ne sont pas liées à la surface mais sont bel et bien libres de circuler à travers le réseau. Ainsi, le dispositif

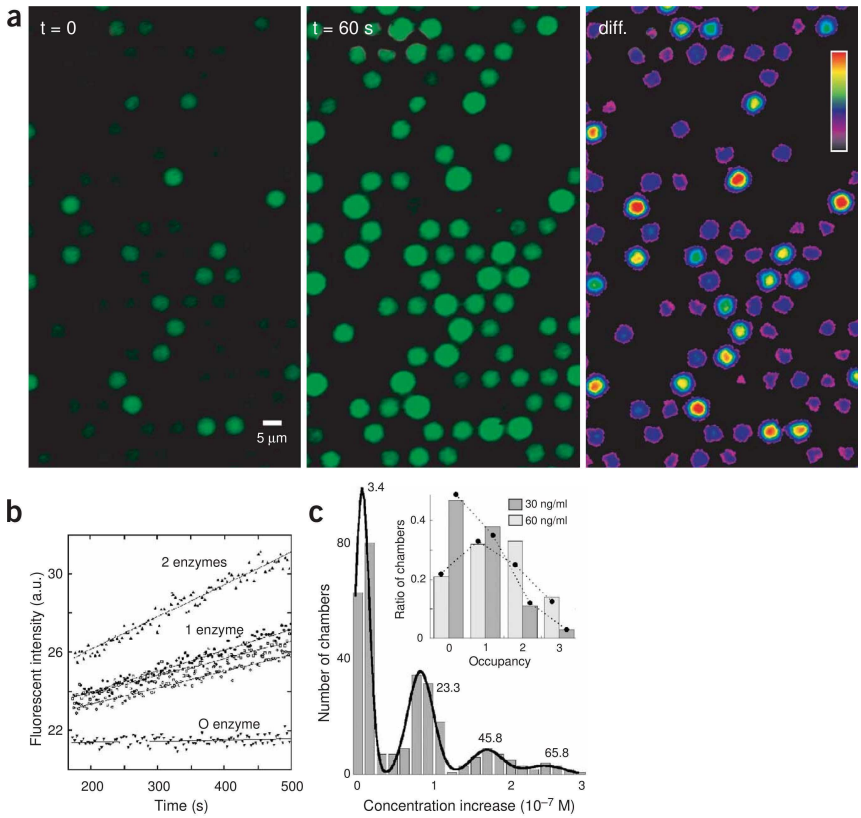

FIG. 21: Détection de l'activité de la β-galactosidase. (**a**) Images en fluorescence de l'activité enzymatique dans les microchambres : la β-gal hydrolyse la fluorescéine-di-β-D-galactopyranoside en fluorescéine. Les images en fluorescences étaient enregistrées juste après fermeture des microchambres (panneau de gauche), et une minute plus tard (panneau du milieu). Le panneau de droite montre la différence d'intensité entre ces deux images sous la forme d'un gradient de couleur. (**b**) Après avoir moyenné l'intensité sur une seconde, cinq microchambres représentatives ont été sélectionnées. Alors que (▼) ne semble pas contenir d'enzyme, (●), (□) et (○) ont une molécule de β-gal et (▲) en a deux. Sur cette période de temps, l'activité consiste en une augmentation continue de la concentration du produit, montrant que les enzymes ne sont pas temporairement inactivées du fait d'interactions de surface. (**c**) Le nombre de microchambres est tracé en fonction de l'augmentation de concentration sur 60 s (expérience en **a**). Les quatres pics peuvent être attribués à 0, 1, 2 ou 3 enzymes par microchambre. Ils ont été affinés par une somme de fonctions gaussiennes. Les valeurs indiquées près de chaque pic sont les centres des gaussiennes convertis en mesure d'activité spécifique (s^{-1}). L'insert montre une distribution tirée de l'expérience en **a** (β-gal 30 ng/mL, en gris), avec une autre expérience utilisant une concentration double de l'enzyme (60 ng/mL, gris clair). Les barres montrent le rapport x de microchambres contenant N enzymes ($N = 0, 1, 2, 3$). Les points résultent d'une statistique de Poisson $x = \mu^N e^{-\mu}/N!$, où le paramètre μ donne le nombre moyen d'enzymes par microchambre. La cohérence dans les valeurs de μ (0,72 en gris et 1,51 en gris clair, correspondant à 71% et 75% de la concentration introduite) confirme cette interprétation. Figure extraite de [140].

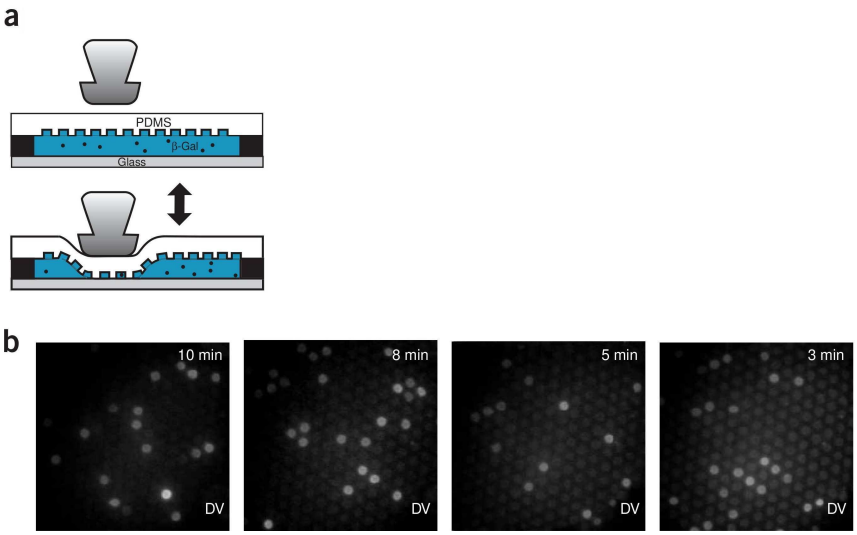

FIG. 22: Détection de l'activité de la β-galactosidase (suite). (**a**) En pressant une petite zone du feuillet de PDMS avec une aiguille en verre. Des cycles successives d'ouverture/fermeture ont pu être réalisés, permettant l'échange du contenu entre chaque microchambre. (**b**) Quatre cycles successifs montrant qu'après fermeture, l'activité de β-gal apparaissait à des positions aléatoires, écartant de ce fait la possibilité d'une adsorption non spécifique. Figure extraite de [140].

détecte les produits catalytiques d'enzymes uniques sans interférer dans leur activité.

2.1.5 *Conclusion et Discussion*

Nous avons démontré la formation de volumes aqueux femtolitriques obtenus en enfermant une solution liquide entre un feuillet de silicone microtexturé et une plaque de verre. A partir d'observations en microscopie sur des billes de polystyrène, des boîtes quantiques et des colorants fluorescents, nous avons évalué la stabilité et l'étanchéité des cavités aqueuses. Nous avons montré que le PDMS est suffisamment imperméable pour empêcher l'évaporation ou la diffusion du liquide sur les temps requis pour les expériences. Dans le cadre de l'isolation de réseaux de cavités aqueuses stables et réguliers, cette technique représente une amélioration de plusieurs ordres de grandeurs en comparaison des résultats précédents [135].

Une telle réduction des volumes opératoires repousse les limites de la détection en fluorescence vers des valeurs extrêmement petites. Avec ce dispositif simple, nous avons obtenu une limite de détection de 10 molécules seulement dans les plus petites microchambres de 1,4 fL (correspondant à 10 nM de fluorescéine). Nous avons utilisé ces avantages pour effectuer des analyses d'activités enzymatiques au niveau de la molécule unique. En effet, lorsqu'elles sont piégées dans une microchambre femtolitrique, les molécules uniques de β-gal et de HRP ont besoin de seulement quelques réactions pour accumuler une concentration détectable de produits fluorescents. La plupart des

techniques de molécule unique sont aveugles au produit de réaction enzymatique ; elles enregistrent les changements conformationnels de l'enzyme elle-même [127, 145], ou bien les évènements d'adsorption/-désorption, mais sans discriminer le produit catalytique du substrat [129, 146]. Ici au contraire, nous avons directement détecté le produit catalytique. Une telle information est essentielle lorsqu'on étudie par exemple l'efficacité de couplage de processus enzymatiques [147]. En outre, le positionnement précis de microchambres homogènes nous a donné facilement accès à une analyse statistique. De ce fait, nous avons obtenu indépendamment à la fois le taux de réaction et la concentration en enzymes qui sont actives. De telles valeurs sont difficiles à obtenir autrement.

Des volumes très petits sont préférables pour des applications biotechnologiques du fait de la faible quantité de produits requise et d'une détection rapide [100, 125]. Nous avons montré ici que de telles microchambres permettent la détection quantitative des produits de réaction d'une enzyme unique. Nous avons également réussi à mesurer l'efficacité de couplage d'un moteur moléculaire en suivant les produits de réaction réels au niveau de la molécule unique en utilisant cette technique [5]. Nous espérons aussi des applications dans le domaine de la détection ultrasensible, où l'approche avec des microchambres ne requiert pas les statégies usuelles d'immobilisation de surface et offre la possibilité de travailler directement en solution. Ceci permet l'étude de multiples protéines ou même de cellules vivantes uniques. Les réseaux de microchambres devraient aussi offrir la possibilité d'étudier des populations entières d'enzymes similaires ayant une activité inhomogène [127, 128], due par exemple, aux modifications post-transcriptionnelles.

2.2 Application des microchambres au moteur moléculaire rotatif F_1-ATPase

2.2.1 *Activité du F_1-ATPase dans sa Fonction d'Hydrolyse de l'ATP*

F_1-ATPase est le plus petit moteur rotatif connu. A mesure qu'il consomme de l'ATP, il tourne dans le sens inverse des aiguilles d'une montre [4, 148, 149, 150]. Des expériences de molécules uniques [145, 151, 152, 153] révèlent l'existence de trois évènements catalytiques par tour, ce qui est en accord avec la structure moléculaire du complexe [154]. La fonction physiologique du F_1 est la synthèse d'ATP. Dans le complexe F_0F_1, cette réaction énergétique est gouvernée par F_0, le moteur partenaire de F_1, qui force la rotation de F_1 en sens inverse (dans le sens horaire), menant à la synthèse d'ATP [155, 156, 147].

Des molécules unique de F_1 génétiquement modifiées ont été ancrées sur un substrat de verre, et la rotation anti-horaire issue de la consommation d'ATP a été observée sous un microscope optique en couplant le sous-domaine γ à un filament fluorescent ou bien à une bille plastique nanométrique [153, 158]. Nos expériences utilisaient une procédure similaire avec quelques différences : une bille magné-

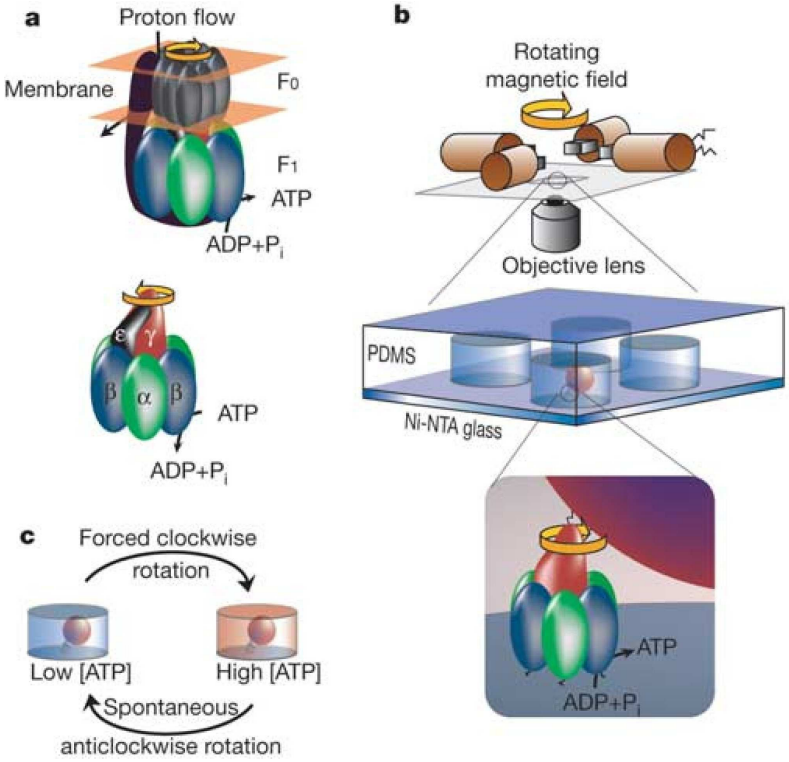

FIG. 23: Synthèse d'ATP par F_1-ATPase. **a** Vue schématique du complexe F_0F_1-ATP synthase encastré dans une membrane cellulaire. La partie F_0 actionnée par un flux de protons entraîne la partie F_1 dans le sens horaire pour synthétiser de l'ATP. Des molécules isolées de F_1 seules hydrolysent l'ATP d'où l'appellation F_1-ATPase. F_1-ATPase comprend cinq sous-unités différentes, $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$, à partir desquelles le sous-complexe $\alpha_3\beta_3\gamma$ constitue la partie fonctionnelle minimale de l'ATPase [157]. L'hydrolyse de l'ATP se déroule séquentiellement sur les trois sous-unités β qui induit la rotation anti-horaire de $\gamma\epsilon$ (ou γ si ϵ est absent). **b** Pour forcer la synthèse d'ATP, une bille magnétique était attachée sur la sous-unité γ d'un F_1 immobilisé, et animée d'un mouvement de rotation horaire en utilisant des pincettes magnétiques. Un unique complexe bille-enzyme était enfermé dans une cavité en PDMS afin de piéger les molécules d'ATP synthétisées. **c** La synthèse d'ATP était détectable via l'enzyme elle-même : après l'extinction du champ magnétique, l'enzyme reprenait sa fonction d'hydrolyse d'ATP en tournant dans le sens anti-horaire à une vitesse proportionnelle à la concentration d'ATP dans la microchambre. Figure extraite de [5].

tique était attachée au sous-domaine γ afin de forcer la rotation par rapport à la partie $\alpha_3\beta_3$ fixée sur le substrat de verre en utilisant des pincettes magnétiques [159]. Nous avons développé une technique de microfabrication pour confiner ce système dans des cavités transparentes en PDMS d'environ 6 fL de volume (Figure 23**b**). Grâce au volume extrêmement petit, le nombre de molécules d'ATP produites par une unique enzyme F_1 atteignait une concentration micromolaire détectable dans les premières minutes de rotation horaire forcée. Une fois le champ magnétique éteint, cette concentration d'ATP pouvait être aisément déterminée en suivant la vitesse de l'enzyme dans sa ro-

tation anti-horaire spontanée. En comparant le nombre de tours dans les deux directions avec le changement de concentration en ATP, nous avons pu évaluer directement l'efficacité de couplage mécanochimique du F_1.

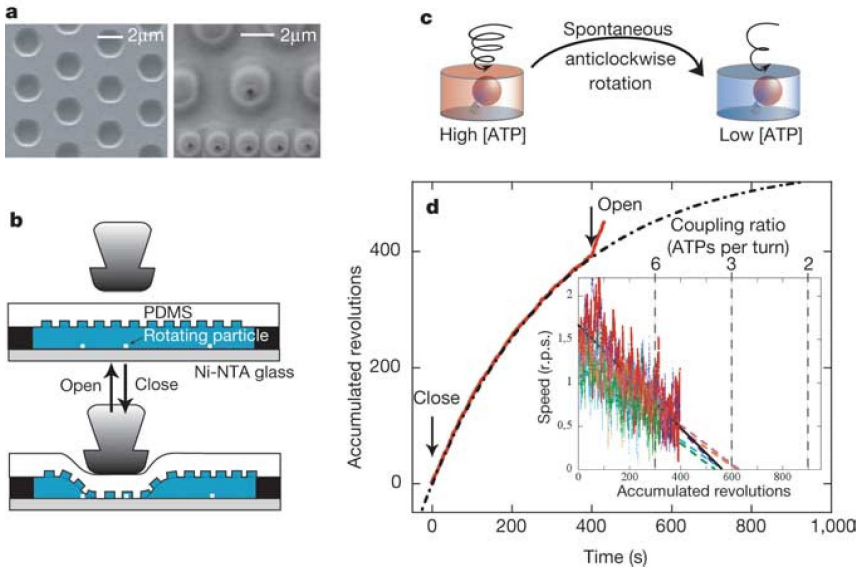

FIG. 24: Détermination de l'efficacité de couplage de l'hydrolyse de l'ATP. **a** Image MEB d'un feuillet de PDMS avec des cavités cylindriques de 1,1 µm de rayon et 1,5 µm de hauteur (gauche), et vue en microscopie optique après avoir enfermé une bille en rotation (droite) avec des images successives du mouvement de rotation. **b** Les propriétés élastiques du PDMS permettent la fermeture/ouverture de la microchambre en pressant partiellement un feuillet suspendu contre le substrat de verre. **c** Le volume de la microchambre était suffisamment petit pour garantir qu'une unique enzyme consommait la majeure partie de l'ATP disponible (1.800 molécules) en quelques minutes. **d** Evolution temporelle des révolutions accumulées montrant une décroissance exponentielle après fermeture de la microchambre, puis le retour à la vitesse initiale après ouverture de la microchambre. L'encart montre les vitesses de rotation en fonction des rotations accumulées pour six molécules différentes de F_1. La décroissance linéaire était extrapolée pour donner le nombre maximal de tours possibles et le rapport de couplage entre l'hydrolyse de l'ATP et la rotation mécanique. Figure extraite de [5].

En premier lieu, nous nous sommes focalisés sur l'enzyme se comportant comme un moteur, c'est à dire hydrolysant l'ATP. Des molécules de F_1 étaient immobilisées sur un substrat de verre avec une densité inférieure à une molécule pour 4 μm^2 (l'aire de la base d'une microchambre). Un feuillet de PDMS avec des microchambres sur sa surface (Figure 24**a**, gauche) était suspendu au-dessus d'un substrat de verre et partiellement pressé contre celui-ci à l'aide d'une petite aiguille en verre afin d'enfermer une molécule de F_1 en rotation dans une microchambre (Figure 24**b**). La taille de la microchambre était suffisamment grande pour éviter d'entrer en conflit avec la bille en rotation (Figure 24**a**, droite) et pouvait contenir seulement 1.800 $\pm$ 200 molécules d'ATP à une concentration de 500 nM (l'erreur est estimée

à partir de l'écart-type sur le volume des microchambres évalué à 10%). Parce que le moteur consommait des molécules d'ATP dans la microchambre, la vitesse de rotation était une fonction décroissante du temps (Figure 24**c**). Sous ces conditions de faible concentration en ATP où l'adsorption de l'ATP est l'étape limitante, la vitesse décroît linéairement avec la concentration d'ATP et une décroissante exponentielle était observée sur les rotations accumulées (Figure 24**d**). Nous avons réouvert la microchambre lorsque la vitesse approchait zéro renvoyant ainsi le système à sa condition initiale (Figure 24**b**). L'enzyme a repris immédiatement sa vitesse initiale montrant que le moteur était encore actif. En extrapolant la vitesse de rotation en fonction du nombre de rotations accumulées (Figure 24**d**), on a obtenu le nombre maximal de tours qu'une enzyme unique peut effectuer en consommant les 1.800 molécules d'ATP disponibles. Nous avons estimé ce nombre à 580 $\pm$ 100 tours (moyenne $\pm$ écart-type), ce qui correspond à un rapport de couplage de 3,15 $\pm$ 0,5 molécules d'ATP par tour. Un résultat similaire était obtenu pour le complexe $F_1^{+\epsilon}$ du F_1 avec la sous-unité ϵ. Un rapport de couplage aussi élevé a été proposé précédemment [152, 160], mais jusqu'à présent seule une preuve indirecte a été fournie parce que le travail mécanique et la consommation réelle en ATP n'ont pas pu être mesurés simultanément. En particulier, la possibilité que le moteur se grippe et hydrolyse l'ATP sans rotation ne pouvait être écartée. Des pas de rotation inverse [152] pouvaient aussi affecter le rapport de couplage ; cependant, cet évènement était très rare (moins de 1% d'occurrence dans notre cas) ce qui peut être considéré comme négligeable. La présente expérience démontre que $F_1^{+\epsilon}$ et $F_1^{-\epsilon}$ ne gaspillent pas d'ATP et travaillent comme des moteurs avec des efficacités de couplage mécanochimique proches de la perfection.

2.2.2 *Efficacité de Couplage Mécanicochimique sur la Synthèse d'ATP*

Dans une seconde série d'expériences, nous nous sommes orientés vers la question de la synthèse de l'ATP. Le tampon incorporait cette fois-ci des concentrations physiologiques d'ADP et de phosphate inorganique Pi, ainsi que 200 nM d'ATP afin d'identifier les molécules actives en rotation. Comme précédemment, une microchambre était fermée sur une enzyme unique mais sa rotation fut cette fois forcée dans le sens horaire en utilisant un champ magnétique rotatif et une bille magnétique fixée sur l'enzyme. La taux maximal de synthèse d'ATP pour cette enzyme thermophile F_0F_1 a été estimée biochimiquement autour de 30 molécules par seconde à température ambiante. Par conséquent, nous avons sélectionné une vitesse de 10 rotations par seconde (rps). Le champ magnétique était appliqué en séquences répétitives de 1 minute avec un intervalle d'environ 1 minute également (Figure 25**a** et **b**). Lorsque le champ magnétique était éteint, la bille reprenait sa rotation dans le sens anti-horaire à une vitesse proportionnelle à la concentration en ATP.

Si on suppose un couplage mécanique parfait, l'enzyme devrait produire trois molécules d'ATP par tour dans le sens horaire. L'incrément

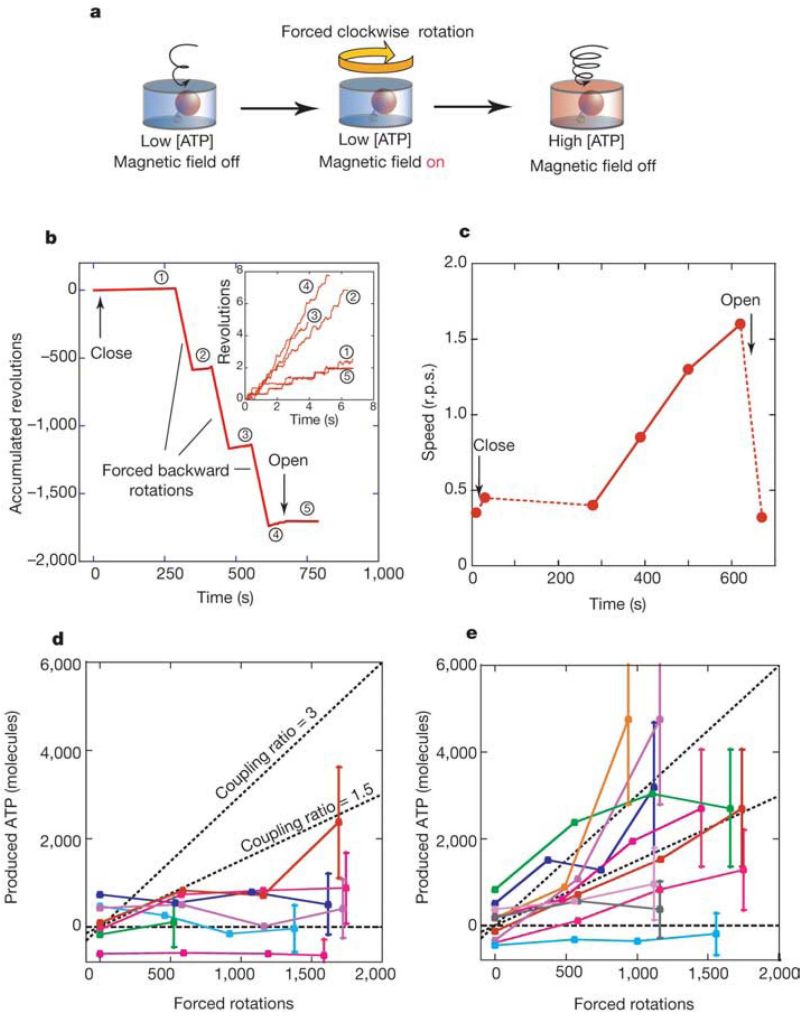

FIG. 25: Détermination de l'efficacité de couplage de la synthèse d'ATP. **a, b** La rotation d'un complexe enzymatique $F_1^{-\epsilon/+\epsilon}$ auquel est lié une bille magnétique était forcée dans le sens horaire par des pincettes magnétiques à l'intérieur d'une microchambre en présence d'ADP, de Pi et d'une faible quantité d'ATP. L'ATP synthétisé était ainsi accumulé dans la microchambre. Avant et après le forçage de la rotation, la rotation spontanée anti-horaire était enregistrée comme un moyen de détecter la synthèse d'ATP à travers la vitesse de rotation qui augmente (voir encart). **c** Les vitesses de rotation anti-horaire à chacune des étapes expérimentales en **a** sont montrées. Entre le deuxième et le troisième point, le moteur était laissé au repos afin de confirmer l'absence de résidus d'ATP synthétisé. **d, e** Les vitesses de rotation anti-horaires étaient converties en nombre total d'ATP synthétisés pour $F_1^{-\epsilon}$ (**d**) et $F_1^{+\epsilon}$ (**e**). Chaque tracé correspond à une molécule individuelle de F_1. Les lignes pointillées indiquent la production d'ATP attendue pour les rapports de couplage mécanochimiques suivant : 3 pour 100% d'efficacité ; 1,5 pour 50% ; et 0 pour 0%. L'erreur de mesure estimée à partir de l'incertitude sur la vitesse de rotation (30%) et sur le volume des microchambres (10%) est indiquée au bout de chaque tracé seulement pour des raisons de clarté. Figure extraite de [5].

de concentration après 1 minute de rotation à 10 Hz correspond à 500 nM d'ATP dans 6 fL. Il s'agit là d'une concentration significativement plus élevée que la concentration initiale d'ATP de 200 nM, ce qui aurait dû se traduire par une accélération marquée de la rotation anti-horaire après extinction du champ magnétique. Ce ne fut pas le cas pour $F_1^{-\epsilon}$: la vitesse des billes n'augmentait presque pas. L'analyse de ces expériences (Figure 25**d**) a donné un rapport de couplage de 0,5 ± 0,4 (moyenne ± écart-type) molécules d'ATP produites par tour. Ce chiffre est en accord avec de précédentes expériences macroscopiques [147], ce qui représente une très faible efficacité de couplage mécanicochimique du complexe $F_1^{-\epsilon}$ à 10 Hz.

Les résultats furent différents pour $F_1^{+\epsilon}$ reconstitué à partir de $F_1^{-\epsilon}$ et de la sous-unité ϵ. Dans ce cas, les rotations forcées conduisaient dans la plupart des expériences à une forte augmentation de la vitesse de rotation (Figure 25**b** et **c**). Ces tendances très reproductibles confirmaient la production d'ATP à l'intérieur de la microchambre. Pour calculer la production d'ATP à partir de la vitesse de rotation, des courbes de calibration de la vitesse en fonction de la concentration en ATP (entre 200 nM et 2 mM) ont été établies par des expériences indépendantes dans le même tampon. Nous avons ainsi montré que l'enzyme suit une cinétique de Michaelis-Menten. Nous avons alors calculé le nombre de molécules d'ATP produites à partir de l'incrément en concentration et du volume d'une microchambre, et nous l'avons comparé au nombre de rotations horaires forcées (Figure 25**e**). La majorité des courbes se situe entre les lignes pointillées symbolisant des rapports de couplage de 3 et 1,5. Nous avons obtenu une valeur de 2,3 ± 1,6 (moyenne ± écart-type) molécules d'ATP par tour, soit une efficacité de couplage de 77%, après avoir exclu les courbes qui étaient manifestement aberrantes (courbes bleue et grise sur la Figure 25**e**). Cette valeur constitue probablement une limite basse, parce que la plupart des artefacts tels que les fuites transitoires hors de la microchambre, les défauts de liaison dans l'ensemble substrat/F_1/streptavidine/bille, ou bien encore la contamination par d'autres moteurs libres, devraient diminuer cette valeur. Par conséquent, nos données expérimentales révèlent une excellente efficacité de couplage mécanochimique. Dans les meilleurs cas, nous avons même observé la valeur postulée de trois molécules d'ATP synthétisées par tour.

2.2.3 *Discussion*

L'efficacité de moteurs moléculaires est généralement difficile à estimer parce que cela requiert des informations mécaniques précises - disponibles seulement au niveau de la molécule unique - tout en mesurant simultanément des quantités infimes de produits réactionnels [160]. De plus, il est plus facile de détecter une activité mécanique provenant d'une réaction chimique que le contraire. La synthèse mécanique d'ATP en forçant la rotation des molécules F_1 a été démontré précédemment [147], mais aucune mesure quantitative n'en a été déduite. Si une bonne compréhension de l'enzyme F_1 dans sa fonction

d'hydrolyse de l'ATP a été acquise [4, 149, 150], très peu de choses sont connues sur sa fonction biologique réelle qui est de synthétiser l'ATP [148]. Dans notre approche, nous avons tiré parti de cavités transparentes si petites que l'activité chimique d'une seule enzyme se traduit rapidement par des changements de concentrations détectables [140]. Nos expériences montrent qu'à la fois $F_1^{-\epsilon}$ et $F_1^{+\epsilon}$ consomment strictement trois molécules d'ATP par rotation anti-horaire, alors que seul $F_1^{+\epsilon}$ est assez efficace pour produire de l'ATP quand sa rotation est forcée dans le sens horaire.

La présente étude révèle l'importance inattendue de la sous-unité ϵ dans la synthèse de l'ATP. Son rôle régulatoire pour l'hydrolyse de l'ATP est bien reconnu [161, 162, 163] mais sa fonction exacte dans la synthèse reste encore débattue. Nos résultats suggèrent que la sous-unité ϵ est nécessaire pour une synthèse d'ATP hautement efficace. Il était déjà connu que l'absence de sous-unité ϵ inhibait la capacité de synthèse du complexe F_0F_1 des chloroplastes [164] même si l'enzyme demeurait structurellement intacte. Des études biochimiques récentes ont suggéré que ϵ peut insérer son domaine hélicoïdal à l'intérieur de l'anneau $\alpha_3\beta_3$, dans une fissure le long de la sous-unité γ [165, 166, 167]. Ceci pourrait être la base structurale d'un commutateur de l'enzyme vers son fonctionnement en synthèse d'ATP [166], et/ou un changement dans l'équilibre d'affinité ATP/ADP [148]. Une autre alternative, serait que, comme le montre la structure cristalline de $F_1^{+\epsilon}$ [168], la sous-unité ϵ stabiliserait la partie protubérante de la sous-unité γ sur laquelle le couple mécanique est exercé. Dans ce cas, elle aurait principalement une fonction structurale. Le rôle précis de la sous-unité ϵ dans la synthèse de l'ATP reste à établir. Le montage expérimental décrit ici peut aussi être utilisé pour investiguer les paramètres de la transduction mécanochimique originale produite par F_1, tels que la vitesse maximale, le couple, les barrières d'énergie et les affinités pour certains substrats.

3

ASSEMBLAGES SUPRAMOLÉCULAIRES DE POLYÉLECTROLYTES ENROBÉS PAR DES LIPIDES

3.1 STRUCTURES LIPIDIQUES COMPLEXES

3.1.1 *Phases Lipidiques Pures Non Lamellaires*

Les lipides qui ont un paramètre $p \sim 1$ forment préférentiellement des bicouches, ou plus généralement, une phase lamellaire faite de bicouches empilées. Pour d'autres classes de lipides et de mélanges de lipides, le polymorphisme tridimensionnel peut être très divers, accompagné d'un diagramme de phase complexe dépendant de la température, de la pression, de la structure moléculaire et de la concentration des composants [169]. Les travaux précurseurs dans ce domaine ont été effectués par Luzzati sur des systèmes lipide-eau par des techniques de diffusion des rayons X. Ces travaux mirent en évidence un grand nombre d'arrangements non lamellaires cristal-liquides qui peuvent être catégorisés en phases hexagonale et cubique [170, 171, 172].

Les phases hexagonales sont faites de cylindres lipidiques avec un rayon de quelques nanomètres et arrangés sur un réseau hexagonal bidimensionnel (Figure 26). Lorsque la tête polaire des lipides est orientée vers l'espace interne du cylindre qui est rempli d'eau, la structure est appelée phase hexagonale inverse ou H_{II} [173]. En contrepartie, quand le volume interne est rempli avec les chaînes hydrocarbonées, la phase est dite hexagonale micellaire H_I. La phosphatidyléthanolamine (PE) est une classe de lipides abondamment présents dans les membranes biologiques et tend à former spontanément une phase hexagonale inverse [174]. A 20 °C le rayon du cœur aqueux dans le cylindre est de 15,9 Å pour 1,2-dioléoyl-*sn*-glycérophosphoéthanolamine (DOPE) dont la longueur moléculaire est de 20,8 Å d'après les reconstructions en diffraction des rayons X [175]. En dessous de 20 °C, DOPE peut former une phase lamellaire fluide L_α en coexistence ou non avec une phase hexagonale inverse H_{II} à mesure que la fraction en eau varie au-delà d'environ 10 % (w/w) [176, 177]. La tendance qu'ont les lipides de type PE à former une phase inverse pourrait être de la plus haute importance pour les phénomènes de fusion membranaire. Les lipides PE pourraient aider leur membrane hôte à former des structures intermédiaires fortement courbées durant la fusion, ce qui est énergétiquement favorable au processus [178, 179].

L'autre catégorie de structures non lamellaires est faite de phases cubiques tridimensionnelles qui sont subdivisées en classes micellaire et bicontinue [180, 181]. Les phases cubiques bicontinues inverses consistent en une bicouche lipidique continue repliée en un réseau tridimensionnel cubique et séparant deux compartiments aqueux disjoints. En s'appuyant sur l'argument mathématique des surfaces pério-

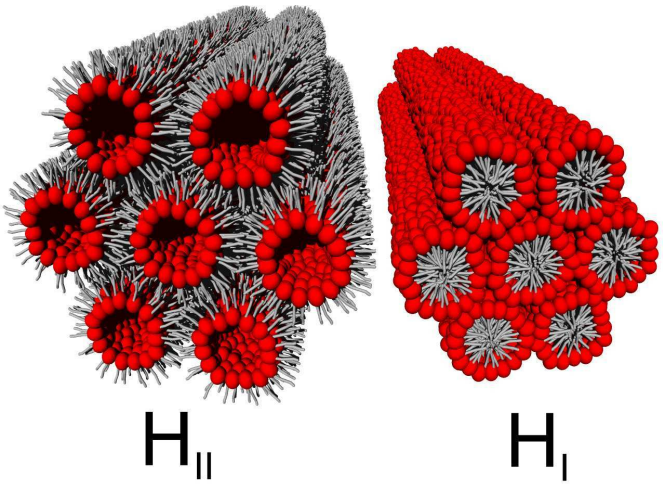

FIG. 26: Illustration de phases lipidiques hexagonales : hexagonale inverse (H_{II}) et hexagonale micellaire (H_I). Les lipides sont représentés avec les mêmes conventions que sur la Figure 1, la partie hydrophile en rouge et les chaînes hydrocarbonées en gris. Figure extraite de [8].

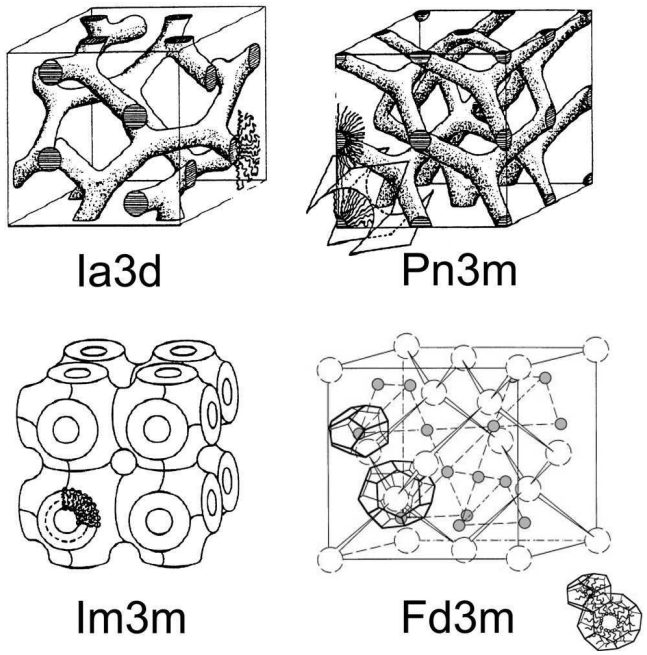

FIG. 27: Structures schématiques de phases cubiques lipidiques. Ia3d, Pn3m et Im3m sont les phases cubiques bicontinues inverses observées jusqu'à présent expérimentalement. Fd3m est une phase cubique micellaire inverse trouvée dans des mélanges de DOPC et de glycérol. Les deux types de micelle inverse (sphères creuses et grisées) avec leurs formes polyédriques sont indiqués sur chaque sommet du réseau cubique. Figure extraite de [8].

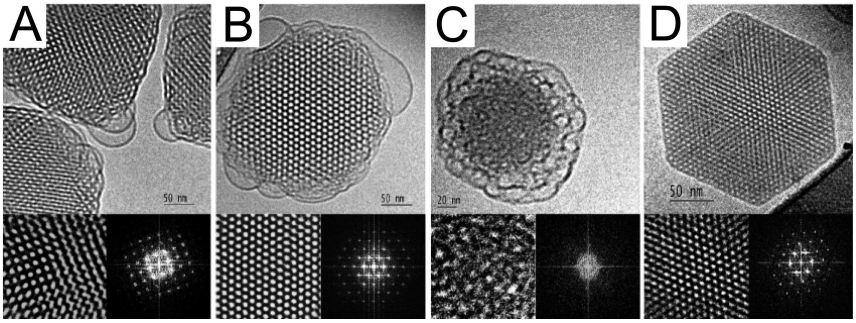

FIG. 28: Cryomicroscopie électronique en transmission de nanoparticules lipidiques en phases non lamellaires. Nanoparticules en phase cubique bicontinue inverse vues le long des axes [001] (A) et [111] (B). Les transformées de Fourier des zones agrandies montrées dans les encarts en bas à droite de chaque image sont cohérentes avec une phase cubique centrée Im3m. Les nanoparticules sont faites d'une dispersion de monooléate de glycérol (GMO), de tensioactifs et de stabilisateurs polymériques. (C) Nanoparticules en phase éponge L_3 contenant du monooléate de diglycérol (DGMO) et du dioléate de glycérol (GDO). (D) Nanoparticules en phase hexagonale inverse H_{II} basée également sur DGMO et GDO mais avec une fraction différente en stabilisateur. Figure extraite de [8].

diques minimales [181, 182], les phases bicontinues inverses peuvent présenter trois morphologies distinctes [183, 184] notées Ia3d, Pn3m et Im3m (Figure 27), cette dernière n'étant pas bien établie expérimentalement. La phase éponge (L_3) peut être vue quant à elle comme une phase cubique fondue car elle partage les propriétés des phases cubiques bicontinues mais ne possède pas d'ordre à grande échelle [185]. Dans la phase cubique micellaire, la structure est faite de micelles inverses disjointes arrangées sur un réseau cubique. Les micelles sont en réalité distribuées en deux populations de tailles différentes pour permettre une occupation efficace de l'espace. Ceci est le cas pour des mélanges de glycérol et de phosphatidylcholine qui forment une phase cubique micellaire Fd3m [186]. La Figure 28 fournit des vues à fort grandissement sur la structure interne de nanoparticules lipidiques avec des phases cubique bicontinue, éponge, et hexagonale inverse.

Il existe de nombreuses preuves expérimentales sur l'existence de phases cubiques dans les membranes biologique. Elles ont été observées dans la membrane plasmique des archées [170], ainsi que dans le réticulum endoplasmique et les mitochondries de cellules de mammifères [187]. En biologie structurale, les phases lipidiques cubiques peuvent être employées comme matrices pour cristalliser des protéines membranaires, ce qui permet des reconstructions à haute résolution par diffraction des rayons X [188, 189, 190].

3.1.2 *Complexes Lipidiques*

Les lipides peuvent être complexés virtuellement avec toutes sortes de matériaux pourvu que les interactions soient favorables. Il est par conséquent impossible de passer en revue toutes les structures existantes de manière exhaustive. Nous nous limiterons aux systèmes qui ont été étudiés intensivement ou à ceux qui présentent un intérêt particulier pour les biophysiciens.

Complexes Lipide-ADN ou Lipoplexes

Les assemblages mésoscopiques faits de lipides et d'ADN sont sans doute les complexes lipidiques auto-assemblés les plus documentés car ils constituent un cas d'école pour l'étude des interactions moléculaires entre les lipides et les polyélectrolytes, et surtout parce qu'ils recèlent un formidable potentiel pour la thérapie génique et le transfert de protéines dans les cellules [191, 192, 193, 194, 195, 196]. Les complexes lipide-ADN, également appelés lipoplexes, ont été introduits il y a 25 ans en mélangeant des liposomes cationiques avec de l'ADN, et ont permis le transfert et l'expression efficace de gènes dans des cultures cellulaires [197]. L'encapsulation de l'ADN par ce moyen était de loin plus efficace que les techniques précédentes impliquant des liposomes car dans ce cas la charge cationique portée par les lipides synthétiques permettait une association de la totalité des molécules d'ADN négativement chargées.

Plusieurs des structures cristal-liquides listées précédemment au §3.1.1 sont retrouvées avec les lipoplexes (Figure 29). La phase lamellaire complexée L_α^C consiste en une alternance de monocouches de barreaux d'ADN et de bicouches lipidiques [198, 199, 200]. L'intervalle entre les barreaux d'ADN condensés bidimensionnellement est extrêmement régulier et varie depuis l'empilement compact (24 Å) jusqu'à environ 60 Å selon la densité de charge lipidique [201] et les ions qui écrantent la répulsion électrostatique créee par les barreaux [202]. De plus, il existe une corrélation trans-bicouche dans l'organisation de l'ADN qui peut être contrôlée par la rigidité de la membrane qui varie avec la température [203]. Une autre stucture souvent rencontrée est la phase hexagonale inverse complexée H_{II}^C dans laquelle les barreaux d'ADN sont enrobés d'une monocouche lipidique et arrangés sur un réseau hexagonal bidimensionnel. En comparaison avec la phase lamellaire L_α^C, cette structure est obtenue soit en augmentant la courbure spontanée de la membrane, ou bien en réduisant son module de courbure moyen jusqu'à des valeurs de quelques k_BT [204]. Une phase hexagonale micellaire complexée H_I^C a été également observée ; les barreaux d'ADN sont arrangés sur un réseau en nid d'abeilles dans les interstices d'un arrangement de micelles lipidiques [205].

Les lipides cationiques n'existent que très rarement dans la membrane cellulaire ; ils sont présents uniquement en quantités infimes dans les tissus neuronaux sous forme de glycosphingolipides cationiques par exemple [206]. Il en résulte que l'injection de lipides synthétiques cationiques dans les cellules induit un effet toxique, souvent

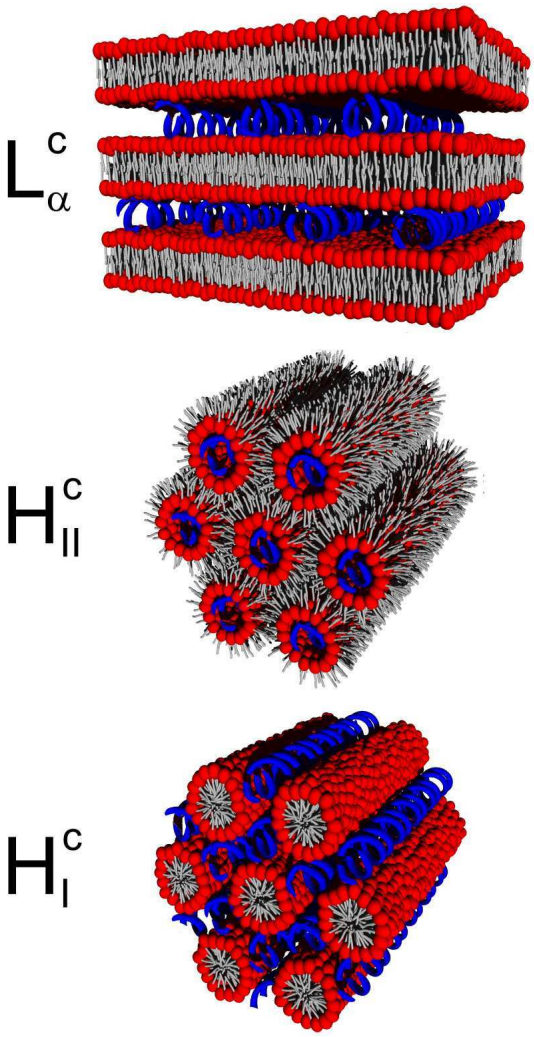

FIG. 29: Représentations schématiques des phases de complexes lipide-ADN : lamellaire complexée L_α^C, hexagonale inverse complexée H_{II}^C, et hexagonale micellaire complexée H_I^C. Les lipides sont figurés en rouge (tête hydrophile) et gris (chaîne hydrocarbonée), tandis que les molécules d'ADN sont en bleu. Figure extraite de [8].

léthal, d'autant plus que le rapport de charge lipide/ADN des lipoplexes est élevé [207]. Pour pallier à cette difficulté, des phospholipides non cationique ont été utilisés en association avec des cations multivalents. En se fixant à la tête polaire des lipides, les cations multivalents sont capables de transformer la charge globale des lipides en charge positive [208], et de rendre leur complexation avec des molécules d'ADN anioniques électrostatiquement favorable. En faisant cela, les structures cristal-liquides complexées usuelles sont retrouvées, à savoir les phases lamellaires [209, 210, 211] et hexagonales inverses [212, 213], les cations étant intercalés afin de faire le lien entre les têtes polaires des phospholipides et les barreaux d'ADN. De tels systèmes se sont révélés aussi efficaces que ceux dérivés des lipides cationiques pour transférer des gènes dans des cellules en culture selon la concentration et la valence des cations [213]. Des simulations Monte Carlo ont montré en outre que les complexes phospholipide-ADN sont plus stables

en terme d'énergie à mesure que la valence des cations augmente mais cette stabilisation sature au-delà de +4 [214].

L'efficacité de transfection dans les cellules dépend d'un grand nombre de variables et jusqu'à présent il n'a pas été possible d'identifier clairement les conditions requises pour un transfert optimal des gènes. Il est couramment admis que les lipoplexes sont internalisés par endocytose après leur fixation sur la surface négativement chargée des cellules grâce à leur charge cationique [215]. La charge peut aussi jouer un rôle en promouvant la fusion nécessaire à la sortie hors de l'endosome. Cependant, aux rapports de charge lipide/ADN élevés, l'ADN peut être si fortement couplé aux lipides qu'il ne peut pas être relargué vers le noyau [216]. La structure cristal-liquide semble être cruciale pour un relarguage efficace de l'ADN. Une bonne configuration s'avère être de partir de lipoplexes en phase lamellaire L_α^C qui transitent vers une phase non lamellaire au contact avec les lipides anioniques de la membrane endosomale [217, 218].

Autres Complexes Lipide-Polyélectrolyte

Des mélanges de lipides neutres et cationiques qui produisent des membranes en phase lamellaire ont été utilisés en association avec le bactériophage M13 - un virus filamenteux de charge négative - et des filaments d'actine (actine F). Les deux polyélectrolytes ont des diamètres similaires, ~6,5 nm pour le M13 et 7,5 nm pour l'actine F, mais portent des densités de charge surfacique différentes, à savoir 1 $e^-/256$ Å^2 et 1 $e^-/625$ Å^2 respectivement. Comme l'ADN, le virus M13 et les lipides forment une phase lamellaire complexée L_α^C avec un espace inter-viral de 8,2 nm, soit légèrement plus grand que le diamètre du virus lui-même [219]. En revanche, l'actine F et les lipides donnent lieu à la formation de structures en ruban d'une largeur moyenne de 250 nm et de longueur pouvant atteindre 100 µm, et qui consistent en des bicouches lipidiques prises en sandwich entre deux couches d'actine F [220]. Cette différence structurale est attribuée au mécanisme d'équilibrage des densités de charge : parce que le réseau d'actine F de faible densité de charge ne peut pas compenser la densité de charge d'une membrane lipidique (1 $e^+/251$ Å^2), le système s'auto-assemble en un super-réseau dans lequel une membrane est associée avec deux couches d'actine F.

Une autre structure lamellaire complexée non conventionnelle est obtenue avec des polypeptides de poly(acide-L-glutamique) (PGA). La diffusion centrale des rayons X a révélé un structure lamellaire "pincée" où le PGA anionique et les lipides cationiques formaient des régions pincées bien localisées ; entre ces régions, les bicouches adjacentes quasi neutres gonflaient en forme de larges poches d'eau stabilisées par la répulsion d'hydratation [221].

La structure finale des complexes lipide-polyélectrolyte que nous présenterons ici résulte du jeu des interactions électrostatiques, ainsi que de la courbure spontanée c_0 et du module de courbure moyen κ de la membrane lipidique, le polyélectrolyte lui-même étant considéré comme suffisamment rigide pour ne pas se tordre sur des longueurs

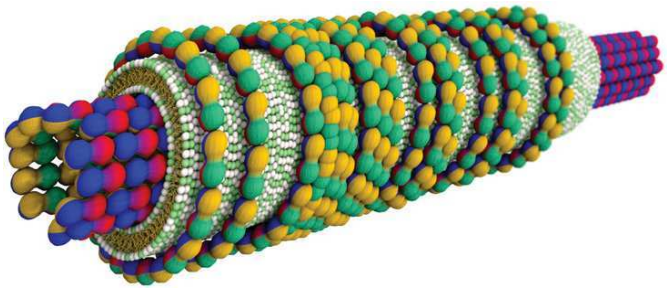

FIG. 30: Nanotube lipide-microtubule. Nanotube complexé consistant en un microtubule (~ 26 nm de diamètre) fait de sous-unités protéiques de tubuline (sphères rouges, bleues, jaunes et vertes) recouvert d'une bicouche lipidique cationique (tête polaire en vert et blanc, chaîne hydrocarbonée en jaune). Une troisième couche d'oligomères de tubuline enrobe la bicouche dans le plan perpendiculaire à l'axe du nanotube. L'arrangement est déduit de données aux rayons X et de microscopie électronique à transmission. Figure extraite de [8].

comparables aux périodicités cristal-liquides. Lorsque la courbure de surface du polyélectrolyte est beaucoup plus grande que c_0, le complexe termine soit en phase L_α^C soit en H_{II}^C. Si les courbures sont du même ordre de grandeur comme c'est le cas avec les microtubules négativement chargés (~26 nm de diamètre), les lipides forment alors soit une structure en collier de perles le long du polyélectrolyte à $\kappa >> 10k_BT$, ou bien alors à faible κ ($< 10k_BT$), ils l'enveloppent dans une bicouche pour faire un nanotube lipidique par moulage (Figure 30) [222, 223, 224].

Association avec des Matériaux Inorganiques

Les bicouches lipidiques immobilisées sur des supports solides sont très populaires pour mimer les processus fondamentaux se déroulant au sein d'une membrane cellulaire réelle et trouvent également des applications dans les biotechnologies [225, 226]. Plusieurs techniques de couplage ont été développées au cours des dernières décennies dont les bicouches lipidiques soutenues par un coussin de polymères [227, 228], les bicouches hybrides [229], les bicouches lipidiques ancrées [230] et les monocouches lipidiques physiquement auto-assemblées [231], avec aussi la possibilité de texturer les membranes à l'échelle micrométrique par photolithographie [232]. La voie la plus simple reste toutefois d'étaler des petites vésicules lipidiques sur des substrats hydrophiles [233], en employant si nécessaire des cations divalents pour ponter les charges de même signe des lipides et du substrat [234, 235].

Dans le domaine des nanotechnologies, l'association des lipides avec des nanotubes de carbone a pour but de fonctionaliser des nano-objets inorganiques pour des applications biomédicales. Les nanotubes de carbone sont des assemblages tubulaires d'atomes de carbone avec un diamètre intérieur qui peut varier de 1 à 10 nm. Ils détiennent un certain nombre de propriétés électriques et mécaniques très at-

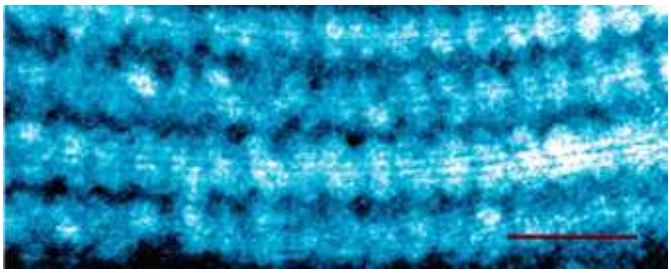

Fig. 31: Bicouches lipidiques moulées sur des nanotubes de carbone. Image en microscopie électronique à transmission de lysophospholipides monochaînes auto-assemblés sur des nanotubes de carbone monoparois. Les assemblages présentent une périodicité de striation de ~4,5 nm. La barre d'échelle vaut 15 nm. Figure extraite de [8].

tractives [236]. Intrinsèquement hydrophobes, ils sont peu solubles en solution aqueuse. Des lipides synthétiques monochaînes conçus pour l'immobilisation de protéines marquées à l'histidine peuvent recouvrir des nanotubes de carbone sous forme de monocouche [237]. Des lysophospholipides, c'est à dire des phospholipides monochaînes, forment des structures avec des striations d'une périodicité de ~4,5 nm [238] sur la surface des nanotubes de carbone monoparois (Figure 31), ce qui améliore considérablement leur solubilité [239]. Les bicouches lipidiques peuvent être aussi immobilisées sur des nanotubes en recouvrant ces derniers de couches de polyélectrolytes flexibles de charge opposée, avant la fusion de liposomes [240]. Ces systèmes sont perçus comme très prometteurs pour concevoir de nouveaux capteurs biomoléculaires ou des dispositifs fonctionnels photosensibles [241], et pourraient être utilisés pour des études de nanotoxicologie [242].

3.2 Phospholipoplexes assemblés par des cations multivalents pour le transfert de gènes

3.2.1 *Rappels sur le Transfert de Gènes*

La thérapie génique souffre d'un manque de vecteurs efficaces et non toxiques pour transférer des gènes dans les cellules [243]. L'ADN est traditionnellement transféré par des vecteurs soit d'origine virale soit synthétiques [193]. Les méthodes virales sont de loin les plus efficaces en termes de transfert et d'expression, et ce grâce aux composants hautement évolués et spécialisés des virus naturels [244, 245]. Ils présentent cependant un certain nombre de restrictions émanant de la toxicité et de la réponse immunitaire induites, de la taille de l'ADN qui peut être transféré, du manque de spécificité et du coût de production élevé [191]. Les "virus artificiels" sont considérablement plus faciles à préparer et plus sûrs ; ils sont généralement faits de complexes autoassemblés d'ADN avec des molécules chargées positivement tels que les lipides, les polymères, les peptides ou une combinaison de tous ces composés. Pourtant, deux difficultés sont venues limiter leur succès dans les essais cliniques [191, 192, 194] :

1. Les faibles efficacités de transfection (TE en anglais) en comparaison de celles obtenues par leurs homologues viraux.
2. Les problèmes liés à la toxicité du vecteur, son élimination et sa biodégradation, problèmes qui se posent particulièrement à fortes doses injectées lorsqu'on augmente la quantité totale d'ADN à transférer.

Un intérêt tout particulier a été porté aux lipides parce qu'ils sont les principaux constituants des membranes cellulaires et des organelles pour tous les organismes vivants ; par conséquent, de nombreux lipides cationiques ont été synthétisés à ce jour pour le transfert d'acides nucléiques dans des cellules en culture [216, 205, 197], ainsi que pour des essais cliniques [246, 247, 248]. En dépit de quelques tentatives fructueuses et prometteuses de transfert *in vivo*, la toxicité induite par ces matériaux synthétiques a beaucoup freiné leur utilisation dans l'industrie pharmaceutique. De fortes doses administrées et des charges lipidiques élevées sont généralement plus toxiques à une vaste majorité de types cellulaires y compris les lignées cellulaires cancéreuses. Déformations cellulaires, réactions inflammatoires et toxicité immunitaire sont parmi les nombreux effets néfastes associés aux lipides cationiques [207].

Contrairement aux lipides chargés positivement qui ne sont présents qu'en très faibles quantités dans certains tissus [206], les phospholipides, qu'ils soient anioniques ou zwittérioniques, sont fort répandus dans les membranes cellulaires et peuvent constituer de ce fait de meilleurs candidats pour des vecteurs à base de lipides. La difficulté est de parvenir à la complexation entre les acides nucléiques et les phospholipides étant donné leur faible affinité liée aux interactions électrostatiques défavorables. Plusieurs études par diffraction des rayons X ont révélé des phases ordonnées dans lesquelles l'ADN était complexé dans des structures cristal-liquides de phospholipides par la médiation de cations divalents [212, 209, 249, 211]. Curieusement, la géométrie de ces complexes était identique à celle observée avec des lipides cationiques, à savoir des structures lamellaires et hexagonales inverses [200]. Ces observations attestent de la capacité des phospholipides à compacter les acides nucléiques sous certaines conditions. Très récemment, de la phosphatidylcholine a transféré de l'ADN plasmidique dans des fibroplastes de souris en présence de cations métallique divalents. Malheureusement, l'efficacité de transfection fut trop faible pour envisager des applications pratiques [250].

Dans le travail qui va suivre, nous décrivons des complexes phospholipide-ADN assemblés en utilisant des cations multivalents dont des cations tri- et tétravalents. Nous essayons aussi d'élucider les mécanismes qui sous-tendent le processus d'auto-assemblage, et nous tâchons d'identifier les paramètres clés nécessaires pour aboutir à des performances de transfert élevées. Nous investigons tout d'abord les propriétés d'adsorption des cations multivalents sur des membranes de phospholipides et nous corrélons les affinités avec la complexation de l'ADN. Des expériences de diffraction par rayons X et des simulations Monte Carlo nous permettent ensuite de comprendre

l'assemblage des complexes au niveau moléculaire. Nous évaluons après cela les efficacités de transfection de complexes faits de différents phospholipides et de cations multivalents, et nous comparons ces efficacités avec celles obtenues pour des lipides cationiques ; la cytotoxicité sur des cellules en culture est également évaluée. Puis, nous recherchons les facteurs affectant la formation des complexes, et nous analysons leur influence sur les performances de transfection.

3.2.2 *Auto-Assemblage de Complexes Phospholipide-ADN*

Théorie sur l'Adsorption Ionique

L'adsorption spécifique de cations sur des membranes biologiques participe à de nombreux processus cellulaires tels que l'insertion de protéines dans les membranes, la fusion membranaire ou bien la transduction de signaux neuronaux [28]. Les propriétés d'adsoption de différents cations sur des membranes de phospholipides ont été investiguées par mobilité électrophorétique, RMN, calorimétrie et simulations dynamiques moléculaires [208, 251, 252, 253]. Les cations multivalents détiennent la faculté d'inverser la charge des membranes de phospholipides à partir d'une concentration seuil. Le potentiel de surface, et par voie de conséquence la densité surfacique de charge, des membranes lipidiques en présence de cations peut être décrit de manière satisfaisante par la théorie de Gouy-Chapman-Stern (GCS) [208, 254].

RMN = Résonance Magnétique Nucléaire

Le potentiel de surface ψ_s d'une membrane immergée dans un électrolyte est relié à sa densité surfacique de charge σ par l'équation [255],

$$\sigma = \mathrm{sgn}(\psi_s)\sqrt{2\epsilon\epsilon_0 k_B T \sum_k n_k(\infty)\left[\exp\left(-\frac{z_k e\psi_s}{k_B T}\right) - 1\right]} \quad (3.1)$$

où ϵ et ϵ_0 sont la constante diélectrique et la permittivité du vide respectivement, k_B la constante de Boltzmann et T la température, $n_k(\infty)$ sont les concentrations ioniques dans le réservoir de solution, z_k leurs valences, et e la charge électrique élémentaire. La somme est effectuée sur tous les ions en solution. En l'absence d'adsorption spécifique des ions sur la membrane, σ demeure constante quelle que soit la concentration ionique. Sinon, l'adsorption des ions induit des variations de la densité surfacique de charge qui dépend alors des concentrations ioniques à la surface de la membrane. En suivant la logique du modèle d'adsorption de Langmuir, la membrane possède un nombre fini de sites d'adsorption par unité de surface, et l'adsorption des ions peut être vue comme un équilibre entre les ions libres en solution à la surface de la membrane et les ions occupant un site d'adsorption. En notant N^+ et N^- les densités de sites d'adsorption pour les cations et les anions respectivement, K_i et K_j les constantes d'adsorption de chacun des cations et des anions susceptibles d'être adsorbé sur la membrane, et en posant σ_0 la densité surfacique de

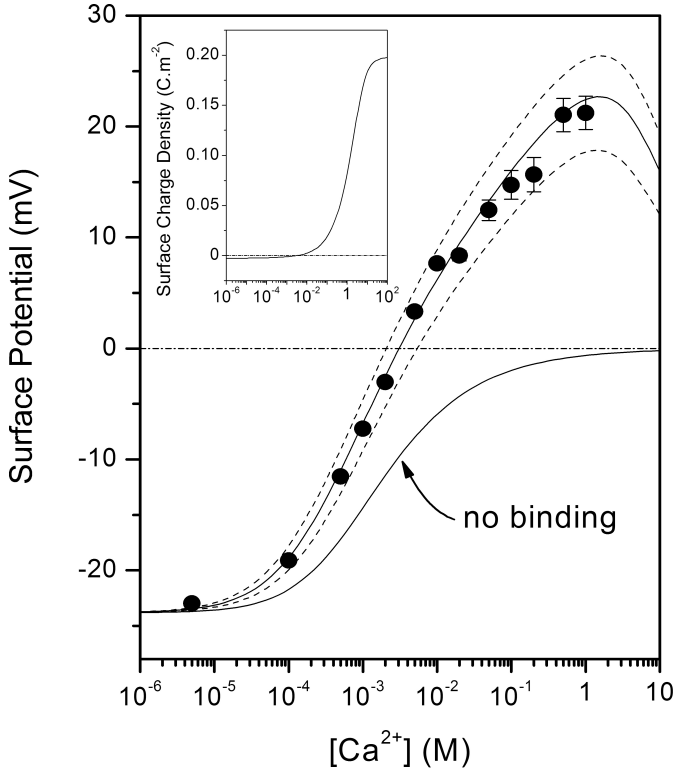

FIG. 32: Potentiels de surface de liposomes composés de DOPE en fonction de la concentration en Ca^{2+}. La solution contient un électrolyte 2 :1 ($CaCl_2$) et 2 mM de sel monovalent (Tris pH 7,0). Le potentiel de surface expérimental (disques) sont calculés à partir de mesures de potentiel ζ en résolvant l'équation de Poisson-Bolzmann avec une couche de Stern d'épaisseur δ = 1 Å. Les lignes en trait plein sont des solutions numériques des Equations 3.1 et 3.2 en considérant soit aucune adsorption des ions Ca^{2+} sur les lipides ou une adsorption avec une constante K = 4,02 M^{-1} et une densité de sites d'adsorption de N = 0,627 nm^{-2}. La densité surfacique de charge intrinsèque était de σ_0 = -0,0025 $C.m^{-2}$, ce qui correspond à environ une charge négative pour cent têtes polaires lipidiques de surface 70 $Å^2$. Les tirets délimitent une région dans laquelle les paramètres d'adsorption varient de $\delta K = \pm 1{,}1$ M^{-1} et $\delta N = \pm 0{,}148$ nm^{-2} autour des valeurs mentionnées ci-dessus. L'encart montre la densité surfacique de charge nette théorique des liposomes en fonction de la concentration en Ca^{2+} telle qu'elle est obtenue par les Equations 3.1 et 3.2. Figure extraite de [214].

charge intrinsèque, la densité surfacique de charge nette σ s'exprime par [208]

$$\sigma = \sigma_0 + N^+ e \frac{\sum_i z_i K_i n_i(\infty) \exp\left(-\frac{z_i e \psi_s}{k_B T}\right)}{1 + \sum_i K_i n_i(\infty) \exp\left(-\frac{z_i e \psi_s}{k_B T}\right)} + N^- e \frac{\sum_j z_j K_j n_j(\infty) \exp\left(-\frac{z_j e \psi_s}{k_B T}\right)}{1 + \sum_j K_j n_j(\infty) \exp\left(-\frac{z_j e \psi_s}{k_B T}\right)} \tag{3.2}$$

avec les notations décrites précédemment et les index i et j se rapportant aux cations et aux anions respectivement. En résolvant simultanément les Equations 3.1 et 3.2 avec un jeu de paramètres d'adsorption donné et les concentrations ioniques pour tous les ions ainsi que la densité surfacique de charge intrinsèque de la membrane lipidique, on peut calculer les variations du potentiel de surface en fonction de la concentration ionique et affiner les mesures déduites de mobilités électrophorétiques.

La Figure 32 représente le potentiel de surface de liposomes constitués de DOPE pour une concentration de Ca^{2+} variable ; le reste des ions en solution était supposé ne pas avoir d'affinité pour la membrane. A mesure que les cations furent ajoutés à la solution de liposome, le potentiel de surface augmentait plus rapidement que prédit théoriquement sans mécanisme d'adsorption, et culminait à une valeur positive. Les paramètres d'adsorption K et N pour Ca^{2+} ont été ajustés pour faire correspondre la prédiction GCS avec les données expérimentales. L'encart de la Figure 32 montre la densité surfacique de charge théorique débutant d'une valeur négative égale à σ_0 pour de faibles concentrations en Ca^{2+} et sature à une forte densité de charge positive en présence d'un excès de cations. La concentration ionique à laquelle l'inversion de densité surfacique de charge se produit peut être estimée par l'Equation 3.2 avec l'adsorption d'une seule espèce ionique :

$$n_{inv}(\infty) = -\frac{\sigma_0}{\sigma_0 + zeN}\frac{1}{K} \tag{3.3}$$

Avec les paramètres d'adsorption de Ca^{2+} obtenus par les données expérimentales, cela donne $n_{inv}(\infty) \approx 3{,}1$ mM.

La valence des cations joue un rôle prépondérant dans leur adsorption. Le Tableau 1 liste les propriétés d'adsorption de cations de différentes valences sur une membrane de DOPE. On peut y voir que les cations monovalents K^+ ne s'adsorbent pas sur la membrane et sont de ce fait incapables d'inverser la densité surfacique de charge nette. Les cations divalents ont en revanche une certaine affinité avec par ailleurs une densité de sites d'adsorption plus élevée pour les ions

Ion	K (M^{-1})	N (nm^{-2})
K^+	~ 0	$< 0{,}02$
Mg^{2+}	$4{,}4 \pm 1{,}4$	$0{,}29 \pm 0{,}09$
Ca^{2+}	$4{,}0 \pm 1{,}1$	$0{,}63 \pm 0{,}15$
La^{3+}	450 ± 30	$0{,}32 \pm 0{,}01$

TAB. 1: Constantes d'adsorption (K) et densité surfacique de sites d'adsorption (N) décrivant l'adsorption de cations inorganiques sur des membranes zwittérionique constituées de DOPE. Ces paramètres ont été déduits de données électrophorétiques affinées avec la théorie GCS. Table extraite de [214].

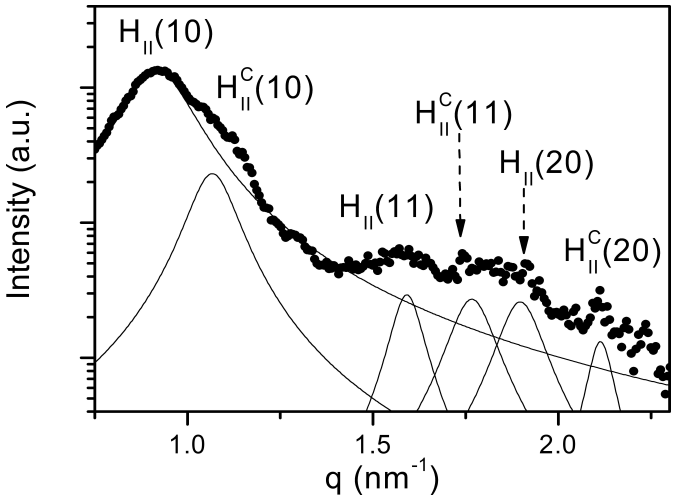

FIG. 33: Spectre par diffraction des rayons X de complexes DOPE-ADN avec 200 mM d'ions Ca^{2+} et L/D = 7. Les lignes continues sont des fonctions lorentziennes. Les entiers entre parenthèses sont les indices de Miller. Figure extraite de [214].

Ca^{2+} que pour les ions Mg^{2+}. Les cations trivalents La^{3+} ont quant à eux une forte affinité et sont à même d'inverser la densité surfacique de charge nette pour des concentrations de quelques centaines de µM.

Structure Cristalline par Diffraction des Rayons X

Puisque les phospholipides peuvent être rendus cationiques par adsorption de cations multivalents, ils présentent le potentiel d'être complexé avec des acides nucléiques de charge intrinsèque négative. La Figure 33 montre un spectre de diffraction des rayons X de DOPE complexé avec de l'ADN λ en présence de 200 mM d'ion Ca^{2+}. Le rapport de masse entre les lipides et l'ADN (L/D) était de 7. A [Ca^{2+}] = 200 mM, la densité surfacique de charge nette de DOPE calculée à partir des Equations 3.1 et 3.2 est de ≈+0,03 $C.m^{-2}$ (encart de la Figure 32), et en effet, les données aux rayons X ont révélé une structure ordonnée de type cristal liquide associant lipides, ADN et cations. Deux phases différentes furent distinguées, l'une dénotée H_{II} et correspondant à une phase pure en DOPE [175], et la seconde dénommée H_{II}^C se référant à la phase complexée DOPE-ADN. Les pics de Bragg des deux phases étaient positionnés selon les rapports $1:\sqrt{3}:2$ caractéristiques d'un arrangement hexagonal [256]. Le paramètre de maille a, déduit des positions des pics selon $q_{hk} = 4\pi\sqrt{h^2+kh+k^2}/\sqrt{3}a$, où h et k sont les indices de Miller, était de 78 et 69 Åpour les phases H_{II} et H_{II}^C respectivement. Dans ce dernier cas, le paramètre de maille correspondait bien à l'épaisseur d'une bicouche de DOPE (~45 Å) plus le diamètre d'une chaîne d'ADN (~20 Å) et deux couches de ~2 Å pour les cations.

En deçà de la concentration d'inversion de charge donnée par l'Equation 3.3, nous ne nous attendons pas à une quelconque complexation. Pour illustrer ce fait, nous avons considéré le cas de cations trivalents

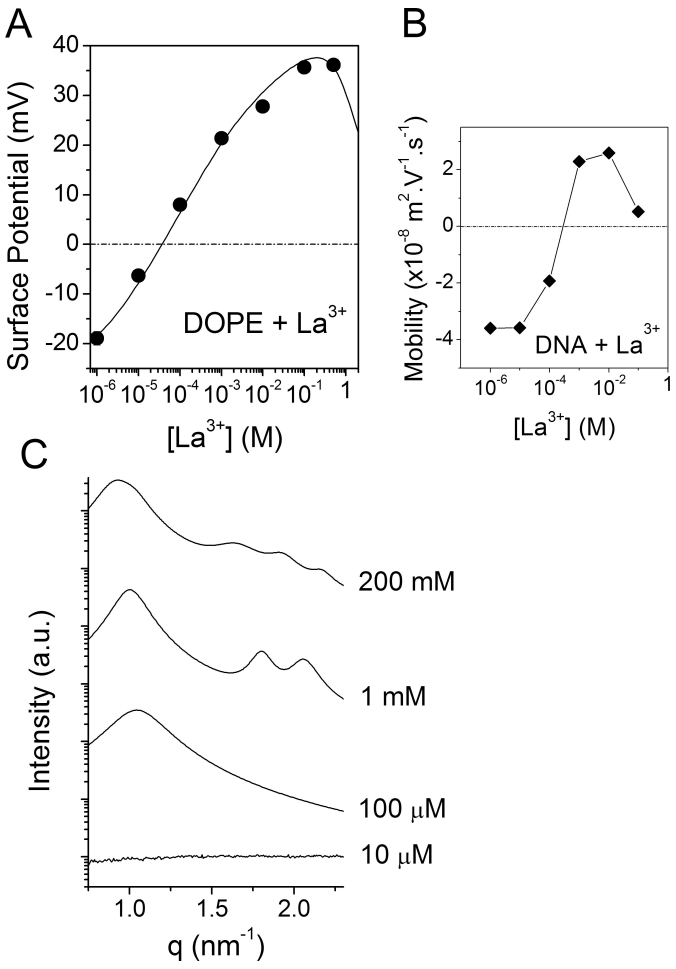

FIG. 34: Adsorption de La^{3+} sur DOPE et complexation avec l'ADN λ. (A) Potentiel de surface de liposomes de DOPE en présence de cations La^{3+}. Les données expérimentales (•) sont recalculées à partir du potentiel ζ mesuré en résolvant l'équation de Poisson-Boltzmann avec une couche de Stern de 1 Å d'épaisseur. La ligne en trait continu est la prédiction théorique tirée des Equations 3.1 et 3.2 avec K = 450 M^{-1}, N = 0,323 nm^{-2}, et σ_0 = -0,0025 $C.m^{-2}$. (B) Mobilité électrophorétique d'ADN λ en fonction de $[La^{3+}]$. (C) Spectres de diffraction aux rayons X de complexes DOPE-ADN avec différentes concentrations de La^{3+}. Les données expérimentales ont été affinées par une somme de fonctions lorentziennes. Figure extraite de [214].

La^{3+}. Il faut noter ici que contrairement aux cations monovalents et divalents [257, 258, 259], les cations trivalents peuvent aussi inverser la charge de l'ADN par adsorption spécifique et/ou par le jeu des corrélations électrostatiques [260, 261, 262, 263]. La Figure 34A présente les variations du potentiel de surface de liposomes de DOPE en présence de La^{3+}. La concentration d'inversion de charge était estimée à ~36 µM. La Figure 34B montre quant à elle que pour une concentration de 100 µM en La^{3+}, la mobilité électrophorétique de l'ADN était toujours négative et l'inversion de charge pour l'ADN se produisait pour une plus forte concentration (~300 µM). Pourtant, une phase complexée de lipide et d'ADN était observée à $[La^{3+}]$ = 100 µM (Figure 34C). A $[La^{3+}]$ = 10 µM, en-dessous de la concentration

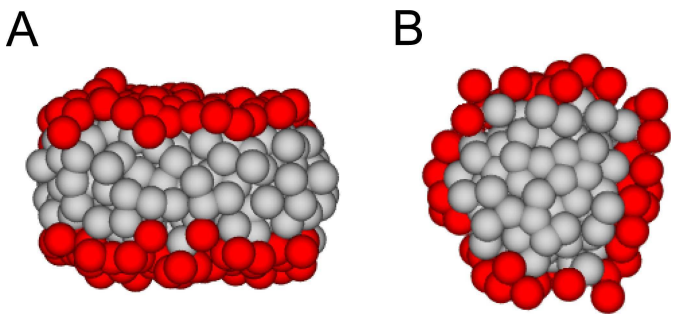

FIG. 35: Simulations Monte Carlo d'assemblages lipidiques. (A) Bicouche plane obtenue avec des fortes énergies d'interaction entre les lipides. (B) Assemblage micellaire résultant de faibles énergies d'interactions, à savoir 100 fois moindres qu'en (A). Les sphères grises représentent les chaînes hydrocarbonées, et les sphères rouges sont les têtes polaires des lipides. Figure extraite de [214].

d'inversion de charge des lipides, aucun motif n'était détecté et aucun précipité n'était même formé. Deux autres caractéristiques peuvent être relevées sur les spectres de diffraction aux rayons X :

1. Même si deux phases H_{II} et H_{II}^{C} étaient observées avec 200 mM de La^{3+}, seule la phase complexée H_{II}^{C} demeurait à 1 mM et 100 µM.
2. Le paramètre de maille de H_{II}^{C} augmentait légèrement de 68 Å pour 200 mM à 71 Å pour 100 µM, probablement à cause des interactions effectives plus faibles entre les lipides et l'ADN.

Nous avons également essayé d'utiliser des ions monovalents K^{+} pour former des complexes DOPE-ADN. Cependant, aucune structure ordonnée ne fut détectée par diffraction des rayons X. Ceci est dû au fait que les cations monovalents ne reconnaissent pas suffisamment de sites d'adsorption pour contrebalancer et surpasser la densité surfacique de charge intrinsèque soit des phospholipides, soit de l'ADN.

Structure des Complexes Phospholipide-ADN par Simulations Monte Carlo

Afin d'avoir une vision détaillée de la structure moléculaire des complexes et de leur stabilité, nous avons réalisé des simulations Monte Carlo à l'aide d'un modèle de lipides à gros grains avec solvant aqueux implicite. Cette procédure nous a permis de calculer l'état d'équilibre de tels assemblages supramoléculaires à un coût de calcul raisonnable.

La Figure 35 illustre des assemblages obtenus avec deux modèles de lipides. En imposant de fortes énergies d'interaction entre les sphères constitutives des lipides, les simulations produisaient une bicouche lipidique plane en accord avec un module de courbure de $\sim 54 k_B T$ comme estimé par Farago [264]. La réduction des énergies d'interaction conduisit à un plus faible module de courbure, et un assemblage micellaire était formé avec les têtes hydrophiles pointant vers le solvant aqueux tandis que les parties hydrophobes étaient

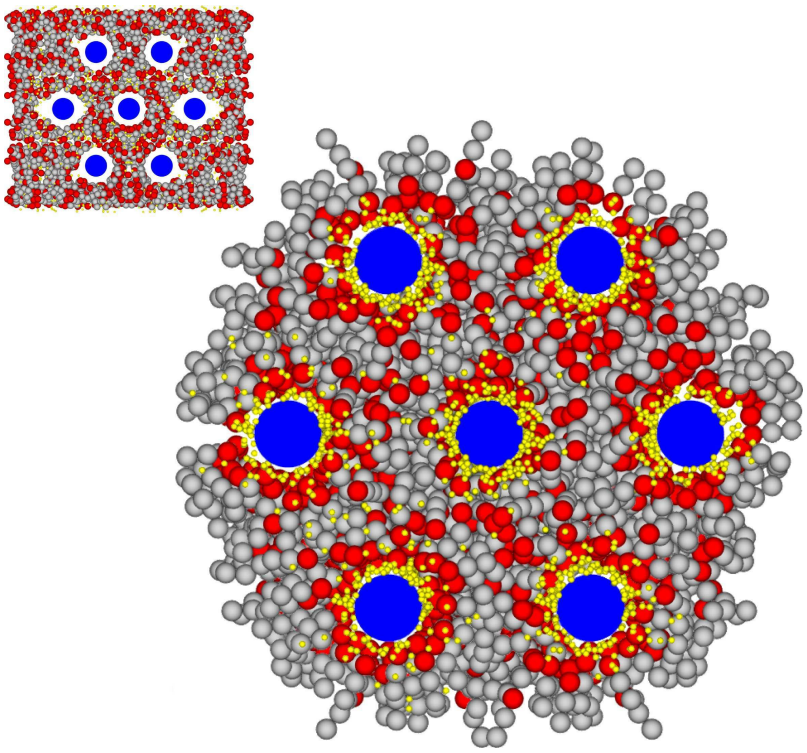

FIG. 36: Auto-assemblage d'un complexe hexagonal lipide-ADN par simulation Monte Carlo. Les barreaux d'ADN, représentés en bleu, sont fixées sur un réseau hexagonal durant la simulation. Les lipides zwittérioniques et les cations divalents (sphères jaunes) sont distribués aléatoirement en début de simulation (encart). Figure extraite de [214].

protégées du solvant ici implicite. Ce modèle était cohérent avec des membranes de DOPE qui ont un module de courbure typique de l'ordre de $10 k_B T$.

Nous nous sommes ensuite efforcés de reproduire la structure cristal liquide hexagonale révélée par diffraction aux rayons X. Pour cela, nous avons fixé des barreaux d'ADN de longueur infinie sur un réseau hexagonal, et nous avons distribué aléatoirement des molécules de lipides zwittérioniques ainsi que des cations divalents à travers la boîte de simulation. Puis, nous avons laissé les lipides et les cations évoluer jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint. La Figure 36 montre les états initial et à l'équilibre de la simulation. Les lipides formaient des micelles inverses autour des barreaux d'ADN avec les cations faisant un pont électrostatique. Les barreaux d'ADN étaient initialement positionnés à une distance minimale l'un de l'autre, juste suffisante pour abriter deux molécules de lipide ; cependant, nous pouvons voir que les espaces inter-ADN étaient uniformément remplis bien que cela implique que quelques têtes lipidiques chargées soient dissociées de l'ADN.

3.2.3 *Transfert de Gènes et Toxicité*

Nous avons évalué les capacités de transfection des complexes phospholipide-ADN sur deux lignées cellulaires humaines différentes, l'une provenant de glioblastome (U87) et l'autre d'hépatome (HepG2). Pour des soucis de clarté et pour écarter un possible biais introduit par l'état physiologique des cellules, les efficacités de transfection, quantifiées par luminescence, furent normalisées aux valeurs obtenues sous les mêmes conditions expérimentales avec un mélange binaire de 1,2-dioléoyl-3-triméthylammonium-propane (DOTAP) et de DOPE dans un rapport molaire de 60/40%. Ce mélange est un agent de transfection lipidique couramment utilisé et présente de bonnes performances [123]. Les Figures 37A et 37B montrent les efficacités de transfection relatives pour des complexes DOPE-ADN. Le rapport de masse lipide/ADN (L/D) et le temps de croissance des complexes

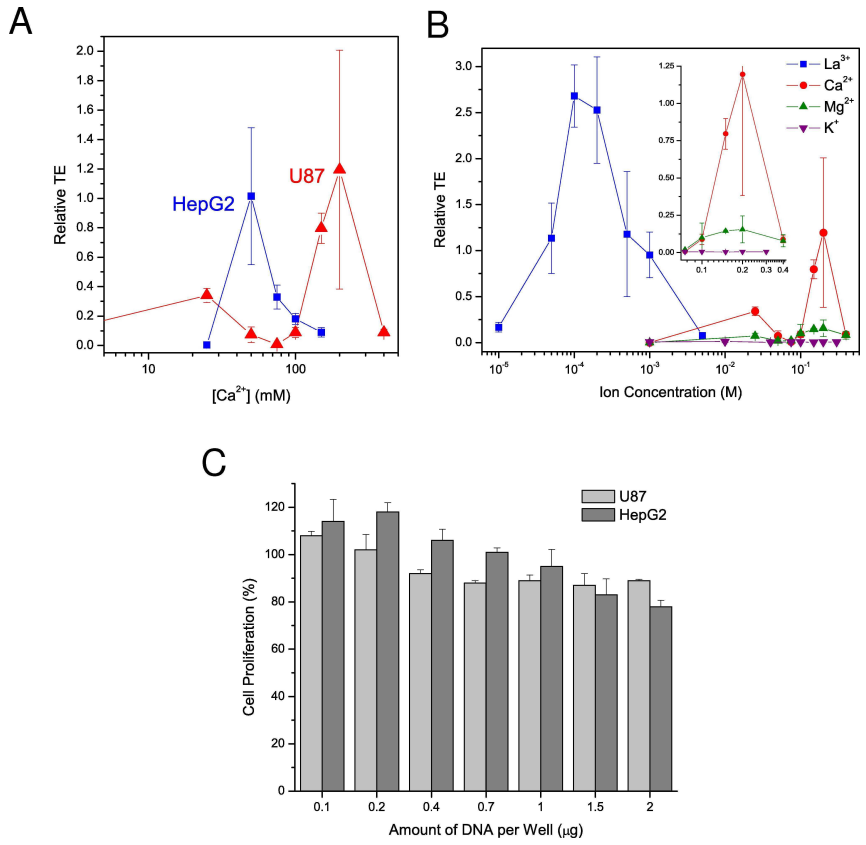

FIG. 37: Efficacités relatives de transfection de la DOPE (A) avec des ions Ca^{2+} sur des lignées U87 (ligne rouge) et HepG2 (ligne bleue), et (B) sur des cellules U87 avec différents cations : La^{3+} (■), Ca^{2+} (•), Mg^{2+} (▲), et K^{+} (▼). L'encart est un agrandissement sur les concentrations ioniques comprises entre 100 et 400 mM. Dans toutes les expériences, L/D = 7 et τ_g = 2 h. (C) Analyse de prolifération cellulaire pour différentes quantités d'ADN à transfecter. Les complexes sont faits de DOPE avec 100 µM de La^{3+}. Les cellules testées étaient des U87 et des HepG2, le temps d'incubation de 48 h, et le rapport de masse L/D fixé à 7. Figure extraite de [213].

avant transfection (τ_g) étaient maintenus à 7 et à 2 h respectivement. En utilisant des ions Ca^{2+}, nous sommes parvenus à transfecter les lignées cellulaires U87 et HepG2, et le niveau d'activité de la luciférase était comparable à celui obtenu avec un mélange cationique DOTAP/-DOPE, et ce pour des concentrations ioniques de 200 mM et 50 mM respectivement (Figure 37A). En l'absence de lipides, l'efficacité de transfection (TE) relative n'excédait jamais ~0,03 pour U87 et ~0,08 pour HepG2. La Figure 37B montre les performances obtenues sur U87 avec des complexes DOPE-ADN formés grâce à des cations de différentes valences. Comme attendu, les lipides mélangés avec K^+ ne donnèrent aucun résultat car l'ADN n'était même pas complexé. Avec des cations multivalents, les efficacités augmentaient dans l'ordre suivant : $Mg^{2+} < Ca^{2+} < La^{3+}$, $[La^{3+}]$ = 100 µM donnant le meilleur résultat avec une efficacité ~2,6 fois plus élevée que le mélange DOTAP/DOPE. Il faut noter ici que la courbe d'efficacité pour La^{3+} est décalée vers les basses concentrations ioniques de trois ordres de grandeur par rapport à celle des Ca^{2+}, ce qui est attribué à la valeur très élevée de la constante d'adsorption des cations trivalents. La présence d'un pic dans la courbe d'efficacité de transfection résulte des interactions entre la membrane lipidique et l'ADN : à faibles concentrations en cations, seules quelques molécules d'ADN sont complexées, et le nombre total d'ADN transféré est faible. A fortes concentrations en cations, les molécules d'ADN sont fortement liées aux lipides et ne peuvent pas être relarguées efficacement hors de l'endosome vers la machinerie cellulaire. La concentration optimale dépend du modèle cellulaire considéré (Figure 37A), et ce fait peut se révéler être un avantage pour le ciblage cellulaire *in vivo*, en assurant ainsi qu'une seule lignée cellulaire est transfectée efficacement sans affecter les autres.

Nous avons suivi la toxicité induite par les complexes en effectuant des analyses de prolifération sur les cellules transfectées. Afin de garder les niveaux de transfection optimaux, nous avons varié la quantité d'ADN à transférer tout en maintenant le rapport L/D constant. Nous avons sélectionné la combinaison de DOPE avec 100 µM de La^{3+}, et les données de prolifération correspondantes sur des cellules U87 et HepG2 transfectées sont montrées sur la Figure 37C. Avec 0,2 µg d'ADN considéré comme une valeur nominale, le graphe montre qu'avec même 10 fois plus d'ADN à transférer, 89% et 79% des cellules U87 et HepG2 respectivement, étaient encore viables après 48 h de culture. D'autres analyses impliquant 200 mM de Ca^{2+} pour la préparation des complexes, résultèrent en des viabilités plus faibles, soulignant l'importance de la concentration ionique pour la toxicité. Dans un contexte pharmaceutique, l'utilisation de cations ayant une forte affinité avec les lipides et l'ADN tels que les ions La^{3+} est bénéfique pour une toxicité réduite parce que cela permet la préparation de complexes phospholipide-ADN avec de petites quantités de cations (plusieurs ordres de grandeurs entre Ca^{2+} et La^{3+}). Ainsi, l'environnement ionique intracellulaire est moins affecté et la viabilité cellulaire préservée.

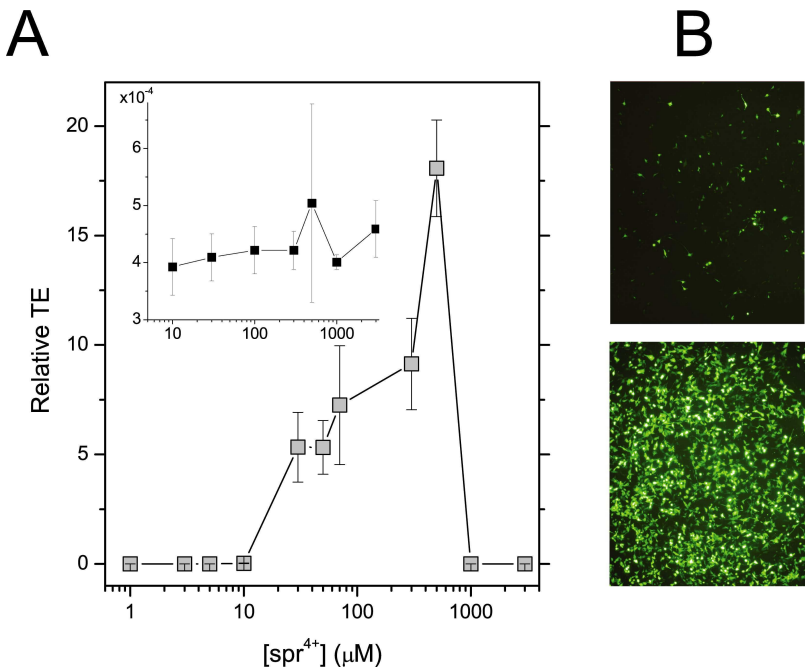

Fig. 38: Transfection de cellules U87 avec du DOPA et de la spermine (spr^{4+}). (A) Efficacité de transfection relative en fonction de la concentration en spermine. L'encart est l'efficacité obtenue en l'absence de lipides. L/D = 20 et τ_g = 4 h. (B) Image en fluorescence de cellules U87 transfectées avec de l'ADN plasmidique encodant de la GFP, par un mélange DOTAP/DOPE (haut), et du DOPA avec 300 μM de spr^{4+}, L/D = 20, τ_g = 4 h (bas). Les images ont été prises dans les deux cas 3 jours après la transfection. Figure extraite de [213].

La complexation entre les phospholipides et l'ADN ne se limite pas aux ions inorganiques. La spermine (spr^{4+}), un polycation tétravalent, est présente dans une grande variété d'organismes et de tissus. Elle est en particulier exploitée par le bactériophage T4 et le virus de l'herpès comme agent de condensation pour compacter l'ADN dans le volume réduit de la capside [265, 266]. *In vitro*, la spermine est aussi connue pour précipiter l'ADN pur ou dans des particules cœur de nucléosome [267, 268, 257]. Nous avons ainsi assemblé des complexes phospholipide-ADN qui sont inspirés des virus naturels mentionnés ci-dessus, en substituant de la spermine aux cations inorganiques. Nous avons trouvé qualitativement par des mesures de mobilité électrophorétique que les propriétés d'adsorption de la spermine n'étaient pas satisfaisantes sur de la DOPE, mais étaient suffisamment bonnes pour inverser la densité de charge de membranes en phospholipides anioniques tels que le 1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphate (DOPA). La Figure 38A montre la haute efficacité résultant de la combinaison DOPE-spr^{4+} sur des cellules U87 : une expression de la luciférase approximativement 18 fois plus élevée que celle obtenue avec le mélange DOTAP/DOPE, pour seulement 500 μM de spermine. Ce résultat a été confirmé par microscopie de fluorescence en exprimant de la GFP au lieu de la luciférase dans les cellules (Figure 38B). Même en présence de sérum et en transfectant directement dans du milieu de culture,

les analyses par luminescence donnèrent de meilleurs valeurs parce que les complexes étaient en contact avec les cellules pour des durées plus longues. En l'absence de DOPA ou de cations, le niveau de transfection était négligeable. Il faut noter que les conditions optimales de transfection, à savoir le rapport de masse lipide/ADN et le temps de croissance avant transfection, différaient du cas avec la DOPE.

3.2.4 *Facteurs Affectant la Transfection*

Les facteurs conditionnant l'efficacité de transfection ont été étudiés sur des phospholipides naturels extraits de jaunes d'œuf, avec des lignées cellulaires U87 : il s'agissait de phophatidyléthanolamine ("egg PE"), de phosphatidylcholine ("egg PC") et d'acide phosphatidique ("egg PA"). l'"egg PE" produisit une bonne TE relative de ~2,2 avec $[Ca^{2+}]$ = 40 mM comme on peut le voir sur la Figure 39A. En revanche, "egg PC", pourtant également un mélange de lipides zwittérioniques, n'excédait pas 0,09, ce qui est à peine mieux qu'en l'absence totale de lipides. A un niveau intermédiaire, l'anionique "egg PA" obtint une TE relative approchant 0,25. Ces résultats suggèrent que les propriétés biophysiques des lipides, en particulier le module de courbure des membranes qui est beaucoup plus élevé pour PC (~$50k_BT$) que pour PE (~$10k_BT$), et la densité de charge intrinsèque, jouent un rôle critique dans le processus de transfert. Des conclusions similaires ont été tirées d'expériences avec des lipides cationiques [216, 123].

Tout comme les systèmes avec des lipides cationiques [269], la taille des complexes avant transfection s'est avérée déterminante comme illustré sur la Figure 39B. La taille et l'efficacité de transfection étaient fortement corrélées à travers le temps de croissance avant transfection τ_g. Les particules d'"egg PE" nues avaient une distribution de taille centrée sur ~96 nm. Durant les premières secondes après la formation des complexes, la taille augmentait brutalement jusqu'à 300 nm pour atteindre ~425 nm après 15 min. L'efficacité de transfection était maximale lorsque les complexes étaient administrés aux cellules à cet instant précis. Il faut noter ici que le temps de croissance optimal pouvait varier fortement d'une combinaison lipide-ion à une autre, débutant à 15 min pour l'"egg PE"-Ca^{2+} jusqu'à 4 h dans le cas DOPA-spr^{4+}. A mesure que les complexes "egg PE"-ADN continuaient à grossir, leur taille augmentait jusqu'à ~650 nm après 4 h. En terme de transfection, ces derniers complexes étaient 10 fois moins efficaces que leurs homologues de 425 nm. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que les petits complexes transportent peu d'ADN à transfecter tandis que les gros complexes ne peuvent pas être assimilés dans les cellules par endocytose et/ou fusion cellule-complexe.

La Figure 39C illustre l'influence du rapport de masse L/D et de la concentration ionique pour "egg PE"-Ca^{2+}. L'efficacité de transfection était maximale à L/D = 10 et $[Ca^{2+}]$ = 40 mM, et en-dehors de cette plage, l'efficacité chutait brutalement produisant de faibles efficacités. Ces deux paramètres fixent la charge globale des complexes phospholipide-ADN : si celle-ci est trop faible, l'incorporation dans

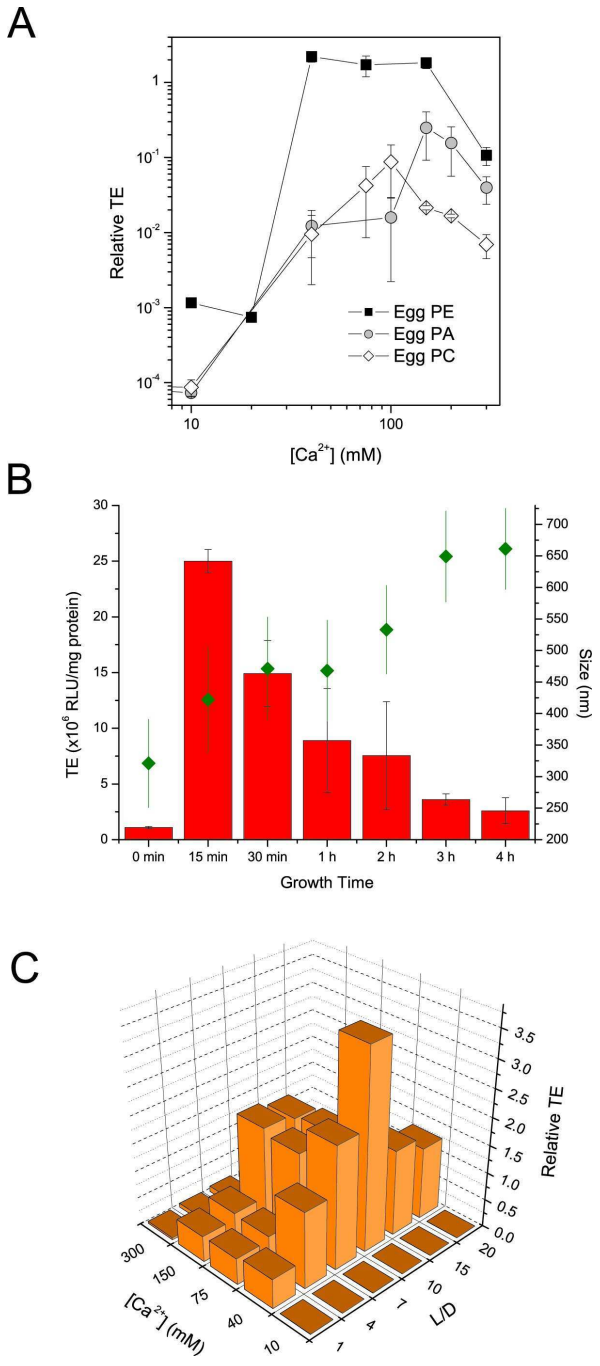

FIG. 39: Transfert de gènes avec des phospholipides naturels et des ions Ca^{2+}. (A) Efficacité de transfection relative pour des concentrations variables de Ca^{2+} sur des cellules U87 : "egg PE" (■ noir), "egg PA" (• gris), et "egg PC" (◊). L/D = 7 et τ_g = 15 min. (B) Efficacité de transfection de l'"egg PE" en unité de luminescence relative par mg de protéines en fonction du temps de croissance des lipoplexes avant transfection τ_g (barres, axe de gauche), et leur taille correspondante (⧫, axe de droite). L/D = 7 et $[Ca^{2+}]$ = 75 mM. (C) Efficacité de transfection relative de l'"egg PE" en fonction de L/D et $[Ca^{2+}]$ à τ_g = 15 min fixé. Figure extraite de [213].

les cellules est inefficace ; si elle est trop élevée, les complexes sont piégés dans l'endosome et l'ADN ne peut pas migrer vers le noyau. En principe, L/D, la concentration ionique, et τ_g devraient tous être ajustés simultanément pour obtenir un transfert optimal sur une lignée cellulaire donnée. Ceci peut s'avérer problématique lorsqu'on veut transfecter une grande variété de cellules. Cependant, la thérapie génique nécessite de cibler des cellules bien spécifiques et la transfection des tissus périphériques peut s'avérer fatale pour le patient. La marge d'opération étroite peut donc assurer davantage de sûreté pour les applications cliniques.

3.2.5 *Remarques de Conclusion*

En dépit des interactions électrostatiques défavorables, les phospholipides et l'ADN peuvent être assemblés en structure cristal-liquide ordonnée par la médiation de cations multivalents. Le processus tire parti de l'attraction générée par les corrélations électrostatiques des cations multivalents au voisinage de deux surfaces de charges intrinsèques identiques [260]. La physique sous-jacente est encore loin d'être comprise, et les phospholipoplexes pourraient constituer une plateforme d'étude fondamentale pour l'auto-assemblage biologique.

L'efficacité dans le transfert de gènes dépend d'un certain nombre de facteurs critiques :

- Le temps de croissance avant transfection τ_g fixe la taille des complexes lorsqu'ils sont administrés aux cellules et conditionne l'incorporation par les cellules.
- La concentration ionique et le rapport de masse L/D fixe la charge globale des complexes qui est connectée à l'incorporation des complexes et au relargage de l'ADN depuis l'endosome.
- La concentration et la valence des ions contrôle l'attraction électrostatique et par conséquent la complexation de l'ADN.
- Les lipides eux-mêmes prennent part à l'incorporation des complexes et à la toxicité induite.

Il existe déjà une abondante littérature sur les lipides contrairement à d'autres composés chimiques tels que les dendrimères et les dérivés de porphyrines pour lesquels de nombreuses études restent à effectuer avant qu'ils puissent être utilisés cliniquement. Des stratégies élaborées développées à l'origine pour le transfert de gènes et de médicaments par des vecteurs lipidiques sont directement applicables aux phospholipoplexes : le ciblage spécifique des cellules par conjugaison d'anticorps [270, 53] ou la stabilisation colloïdale par greffage de polymères [271] sont parmi les nombreuses techniques dédiées aux lipides pour leur conférer des fonctions réservées jusque-là aux virus.

3.3 Architecture tridimensionnelle des assemblages de polyélectrolytes enrobés de lipides

3.3.1 *Introduction*

Même si la structure supramoléculaire est désormais largement reconnue comme critique pour effectuer un interfaçage efficace avec les cellules [123, 272, 218], très peu de choses sont connues sur la morphologie tridimensionnelle des assemblages lipide-polyélectrolyte, et en particulier sur celle des complexes lipide-acide nucléique en phase H_{II}^{C}. En effet, l'arrangement hexagonal qui résulte de l'empilement des acides nucléiques enrobés de lipides est généralement déduit de mesures par diffraction des rayons X sur des échantillons à forte fraction volumique afin d'avoir un rapport signal sur bruit suffisant. Pourtant, pour des applications pratiques de transfert de gènes, les complexes doivent être suffisamment petits pour diffuser à travers les tissus ou pour quitter le systèmes circulatoire sanguin [273]. En outre, l'information structurale fournie par la diffraction des rayons X est moyennée sur toutes les orientations de tous les assemblages, ce qui empêche de tirer des conclusions à l'échelle d'un complexe unique. Des simulations Monte Carlo et dynamique moléculaire ont permis d'obtenir une vision plus fine de la structure moléculaire et ont mis en évidence un certain degré de désordre dans les complexes [214, 274, 275]. Néanmoins l'accès aux morphologies tridimensionnelles complètes demeure freiné par des temps de calcul prohibitifs.

Nous allons montré que les complexes lipide-acide nucléique en phase H_{II}^{C} appartiennent en réalité à une classe générale d'assemblages supramoléculaires faits de polyélectrolytes enrobés de lipides. Nous avons conduit une étude expérimentale avec différents polyélectrolytes ayant une vaste gamme de longueurs et de rigidités, incluant entre autres un polymère synthétique, un polysaccharide, et de l'actine F. La cryomicroscopie électronique à haute résolution révèle la structure interne des assemblages à un niveau de détails moléculaires. Les morphologies tridimensionnelles ont pu être prédites par un modèle original de tubes semi-flexibles. Cette approche nous a permis de quantifier le degré d'ordre structural et de comprendre le rôle de l'électrostatique dans la stabilisation de la taille des assemblages.

3.3.2 *Etude par Cryomicroscopie Electronique à Haute Résolution de la Structure des Assemblages*

La Figure 40 montre une série d'images à haute résolution obtenues par cryomicroscopie électronique sur des assemblages contenant de l'ADN double brins. Dans toute l'étude qui suit, les lipides consistaient en un mélange de DOTAP et de DOPE dans un rapport molaire de 25/75% connu pour former des phases colonnaires hexagonales H_{II}^{C} par association avec l'ADN [204]. Les assemblages étaient obtenus en mélangeant les lipides sous forme de petites vésicules unilamellaires

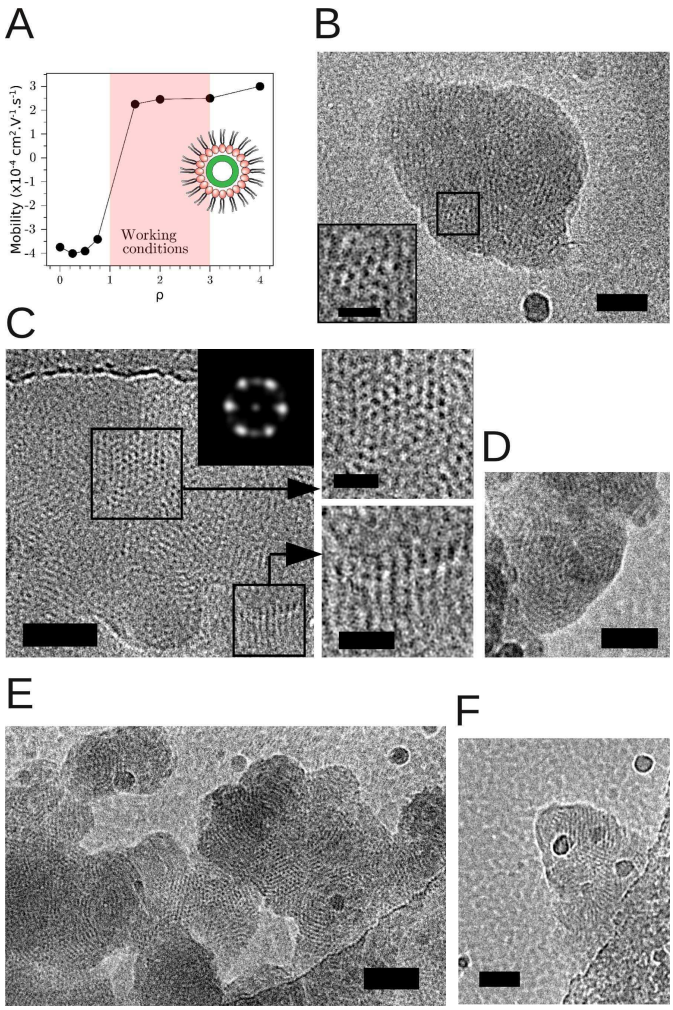

FIG. 40: Assemblages supramoléculaires d'ADN double brin enrobé de lipides. (A) Mobilité électrophorétique d'assemblages faits d'ADN λ à différents rapports de charge lipide/ADN ρ. Le schéma représente une coupe d'une molécule d'ADN (vert) entourée d'une monocouche inverse de lipides (tête hydrophile en rouge et chaîne hydrocarbonée hydrophobe en gris). (B) Assemblage lipide-ADN λ à ρ = 2. (C) Vue détaillée d'un assemblage d'ADN de 146 paires de bases (ADN 146 pb) avec des lipides à ρ = 1. L'encart montre la transformée de Fourier de la région délimitée par le carré du haut. Les panneaux sur la droite sont des vues agrandies des régions délimitées par les deux carrés. (D) Vue détaillée d'un autre assemblage lipide-ADN 146 pb à ρ = 2. (E) Agrégat lipide-ADN λ à ρ = 1. La barre d'échelle vaut 80 nm. (F) Petit assemblage lipide-ADN 146 pb à ρ = 3. Sauf mention explicite, les barres d'échelles sont de 60 nm pour les images principales et de 30 nm pour les agrandissements. Le défocus du microscope est de -6 μm pour toutes les images. Figure extraite de [276].

avec l'ADN dans des rapports de charge ρ. La Figure 40A donne la mobilité électrophorétique d'assemblages contenant de l'ADN λ en fonction de ρ. Pour $\rho < 1$ (excès d'ADN), les assemblages avaient une mobilité électrophorétique négative, alors que pour $\rho > 1$, la mobilité devenait brutalement positive. Autour de ρ = 1, la solution

était turbide, ce qui indiquait la présence de gros agrégats empêchant toute mesure fiable. Nous avons choisi de travailler préférentiellement à $1 \leqslant \rho \leqslant 3$ de sorte qu'aucun polyélectrolyte ne reste libre dans la solution. La Figure 40B fournit un exemple typique d'assemblage supramoléculaire lipide-ADN λ avec une taille de 200-250 nm. Les points sombres correspondent aux groupes phosphate localisés sur l'ADN et sur la tête polaire des lipides, et qui sont plus denses aux électrons que les chaînes hydrocarbonées des lipides. A l'évidence, les chaînes d'ADN enrobées de lipides étaient plutôt ordonnées et formaient localement des structures hexagonales (voir vue agrandie). Le degré d'ordre est d'ailleurs plus élevé sur l'image C qui était obtenue avec de l'ADN de 146 paires de bases (ADN 146 pb). Il faut noter ici que l'ADN λ comporte 48.502 paires de bases et est de ce fait long d'environ 16 μm, tandis que l'ADN 146 pb a une longueur de 52 nm. Comme sur la Figure 40B, de vastes zones avec des structures hexagonales sont présentes (voir panneau du haut) et correspondent à des vues en coupe d'ADN enrobé de lipides. La transformée de Fourier 2D (voir encart) confirme l'arrangement hexagonal et donne un paramètre de maille de ≈64 Å ce qui est cohérent avec le diamètre d'une molécule d'ADN (≈20 Å) plus l'épaisseur d'une bicouche lipidique (≈ 45 Å). En d'autres endroits, des striations sont visibles (voir panneau en bas à droite). Il s'agit du même réseau hexagonal mais vu sur la tranche de sorte que l'espacement correspond à la distance entre les plans formés par les molécules d'ADN enrobées, à savoir, $\sqrt{3}/2a$, où a est le paramètre de maille du réseau hexagonal. Les striations ont bien un espacement de ≈ 59 Å. Il faut mentionner qu'aucune différence structurale n'était observée entre les assemblages formés avec de l'ADN λ et de l'ADN-146 pb en dépit de leur grande différence de longueur. La Figure 40D illustre le fait que l'ADN enrobé était souvent courbé sur des distances plus courtes que la longueur de persistance de l'ADN double brin nu (≈ 50 nm). Les assemblages ne sont pas des faisceaux droits avec une coupe hexagonale comme parfois représentés dans la littérature. Au lieu de cela, ils ont une flexibilité interne et présentent par conséquent de multiples orientations qui donnent lieu à de nombreux défauts structuraux par rapport à une parfaite organisation hexagonale. L'image E montre un agrégat qui s'étend sur des centaines de nanomètres. Il a été obtenu au point isoélectrique, c'est à dire à $\rho = 1$. En augmentant le rapport de charge lipide/ADN, les assemblages avaient tendance à être plus petits tout en conservant leur ordre interne comme montré sur l'image F avec un assemblage formé pour $\rho = 3$.

La haute résolution et la finesse des détails obtenues sur ces images résultent d'une forte défocalisation et d'une correction numérique de la fonction de transfert du contraste (CTF) du microscope. Un défocus de -6 μm était souvent employé car il permettait de mettre en valeur les longueurs d'onde spatiales dans la gamme nanométrique et tout particulièrement celles au-dessus de 30-50 Å correspondant aux espacements des réseaux. La correction de la CTF a permis d'améliorer le contraste sur les structures ordonnées et de réduire le bruit de fond [277].

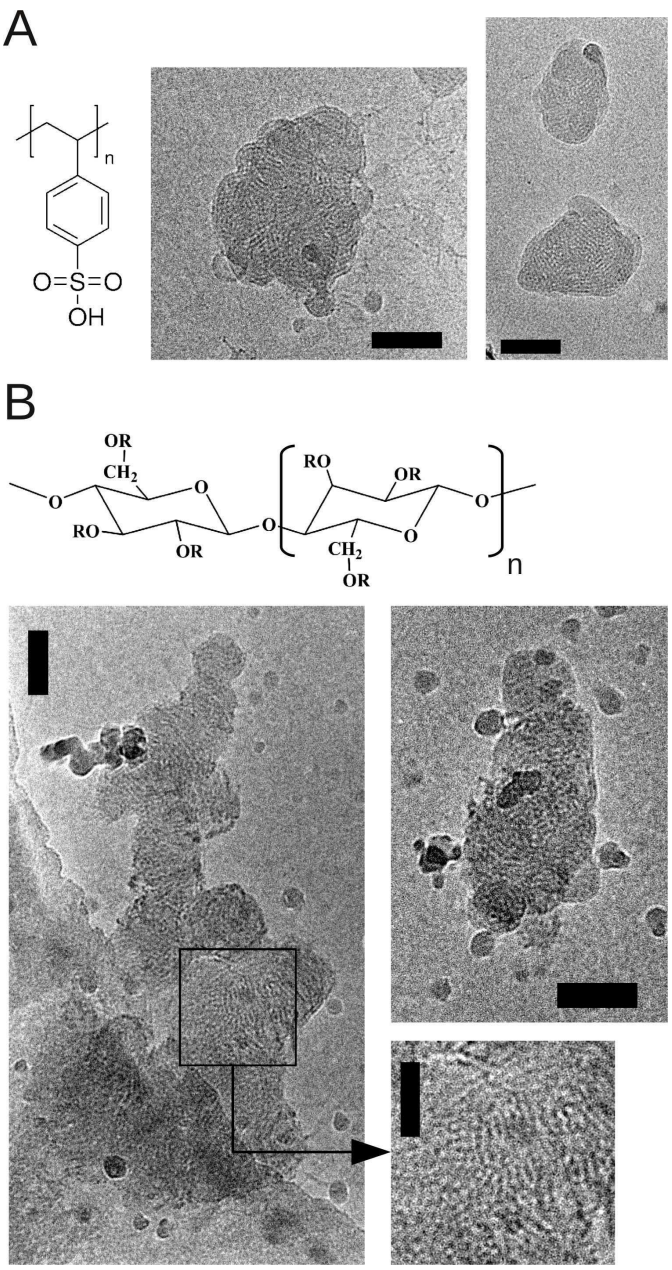

FIG. 41: Assemblages supramoléculaires de lipides et de polyélectrolytes flexibles. (A) Assemblages faits avec du poly(styrène acide sulfonique) de 3 MDa. La formule chimique d'un monomère est donnée à gauche et les assemblages montrés sur les images en cryomicroscopie électronique ont été obtenus à $\rho = 2$. (B) Assemblages faits de carboxyméthylcellulose de 171 kDa. La formule chimique de deux monomères liés est donnée sur la partie haute. R = -H ou bien R = $-CH_2COONa$ selon le degré de substitution. Les assemblages sont obtenus à $\rho = 2$. La photo en bas à droite est un agrandissement de la zone délimitée sur la photo de gauche. Sa barre d'échelle est de 30 nm. Sauf mention explicite, les barres d'échelle valent 80 nm. Le défocus du microscope est de -4 µm. Figure extraite de [276].

Nous nous sommes ensuite focalisés sur le cas d'assemblages obtenus avec des polyélectrolytes flexibles, c'est à dire dont la longueur de persistance était plus courte que celle des acides nucléiques double

brin. La Figure 41A montre des assemblages formés avec du PSS de 3 MDa, qui a une longueur de persistance inférieure à 1 nm alors que sa longueur de contour est de ≈4 µm. Des structures organisées sont encore présentes même si le degré d'ordre est légèrement plus faible qu'avec des acides nucléiques. Les courbures sont plus fortes mais nous pouvons distinguer des espacements réguliers (≈50 Å) qui coïncident bien avec une vue de profil de PSS enrobé et compacté, le PSS ayant un diamètre de 12 Å. L'effet de la flexibilité du polyélectrolyte est plus frappant avec le CMC - un polysaccharide communément utilisé dans l'industrie agroalimentaire - comme on peut le voir sur le panneau B. Bien que le CMC ait une longueur de persistance de 12 nm, soit davantage que le PSS, les structures internes sont de loin plus désordonnées. La séparation typique entre les striations (≈60 Å) est en accord avec des chaînes de CMC enrobées et compactées, mais comme on peut le voir sur la vue agrandie, l'ordre est de courte portée. De plus, nous n'observons pas d'arrangements hexagonaux probablement parce que la longueur de corrélation d'orientation entre les monomères était trop courte pour produire un ordre significatif par projection. Il peut sembler surprenant que les assemblages contenant du PSS paraissent plus ordonnés, alors que la rigidité du PSS est bien plus faible. Cependant, il faut noter que le facteur clé est la rigidité du polyélectrolyte enrobé de sa monocouche lipidique inverse. Les interactions électrostatiques entre les têtes des lipides et les charges portées par le polyélectrolyte peuvent augmenter l'énergie élastique nette. En considérant le PSS et le CMC comme des tubes de section circulaire, leurs densités de charge surfacique sont de 0,88 et de 0,34 $e^{-}.nm^{-2}$ respectivement. On peut alors s'attendre à des interactions plus fortes entre les lipides et le PSS, ce qui en retour mène à une rigidité plus élevée des ensembles lipide-PSS que des ensembles lipide-CMC.

PSS = Poly(Styrène acide Sulfonique)

CMC = CarboxyMéthylCellulose sodique

Dans l'étude qui suit, nous nous sommes concentrés sur un long polyélectrolyte ayant une longueur de persistance beaucoup plus grande que sa longueur de contour, de sorte qu'il puisse être considéré comme une tige rigide. Nous avons sélectionné l'actine filamenteuse (actine F) qui constitue une partie du cytosquelette de toutes les cellules et qui est un composant des fibres musculaires essentielles à la contraction [278]. L'actine F peut être nanostructurée en rubans tubulaires lipidiques [220] ou en réseaux bidimensionnels par des cations multivalents [279]. Nous démontrons ici qu'elle peut aussi former des faisceaux par complexation avec des lipides. Le schéma A de la Figure 42 montre la structure hélicoïdale de l'actine F résultant de la polymérisation de l'actine globulaire (actine G). Le diamètre de l'actine F est entre 5 nm et 9 nm, et sa longueur de persistance est d'environ 18 µm. Dans nos expériences, l'actine F avait une longueur de contour moyenne estimée à ≈400 nm. La Figure 42B montre un faisceau lipide-actine F d'environ 200 nm de large et ayant une longueur excédant la longueur d'un unique filament d'actine. Dans beaucoup d'images, nous pouvions voir de l'actine F encore libre en solution ; ceci est dû au fait que le rapport de charge lipide/actine F n'était que de 1, et puisque la densité surfacique de charge de l'actine F est faible (≈0,18 $e^{-}.nm^{-2}$), il n'y avait pas assez de lipides disponibles pour recouvrir

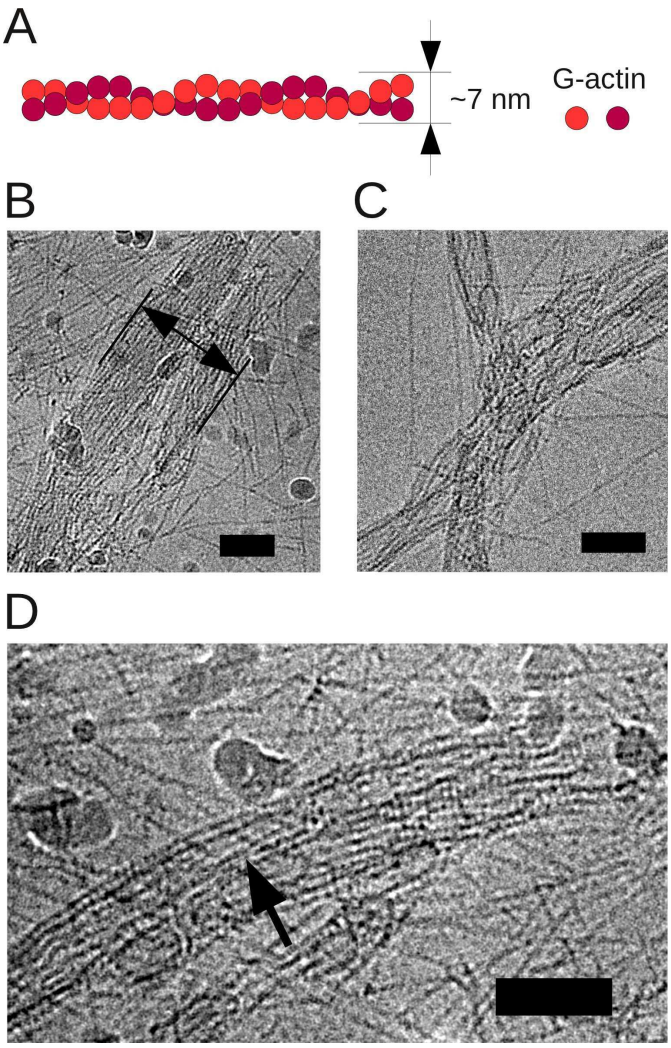

FIG. 42: Assemblages supramoléculaires lipide-actine F. (A) Schéma d'un filament d'actine (actine F) constitué de monomères d'actine globulaire (actine G). (B,C,D) Assemblages obtenus à $\rho = 1$. Les barres d'échelles valent 80 nm. Le défocus du microscope est de -6 µm. Figure extraite de [276].

la surface de la totalité des filaments présents en solution. L'image C montre que les faisceaux ne sont pas alignés et qu'ils peuvent former des réseaux enchevêtrés. En regardant plus attentivement un faisceau, on s'aperçoit que les filaments d'actine enrobés ne sont pas parfaitement compactés et que de nombreux défauts existent (voir la flèche sur l'image D). Bien que modérément longs, les filaments enrobés manque d'entropie orientationelle qui pourrait leur permettre de s'aligner en une structure hexagonale cristal-liquide. Le système est ainsi piégé dans un état métastable, sans être toutefois très éloigné de l'équilibre thermodynamique.

3.3.3 *Simulations Monte Carlo sur un Modèle de Tubes Semi-Flexibles*

Nous avons effectué des simulations Monte Carlo afin d'obtenir une vision plus fine de la morphologie tridimensionnelle et des mécanismes physiques sous-jacents de ces assemblages. Parce que les systèmes sont très étendus et mettent en œuvre un très grands nombres d'interactions, les simulations numériques au niveau des molécules individuelles sont hors d'atteinte des ordinateurs actuels. Ou bien la géométrie du système doit être simplifiée en limitant les degrés de liberté des polyélectrolytes [274, 275, 214], ou alors le nombre d'entités en interaction doit être réduit en regroupant les molécules en sous-unités. Nous avons choisi cette dernière option, et nous avons modélisé les polyélectrolytes enrobés de lipides par des tubes semi-flexibles de section circulaire (voir Figure 43) interagissant entre eux via les forces hydrophobes et les répulsions stériques. Dans un premier temps, les tubes étaient supposés électriquement neutres, les lipides cationiques et les contre-ions contrebalançant exactement les charges portées par le polyélectrolyte. Nous discuterons plus tard le cas de tubes portant une charge nette résiduelle.

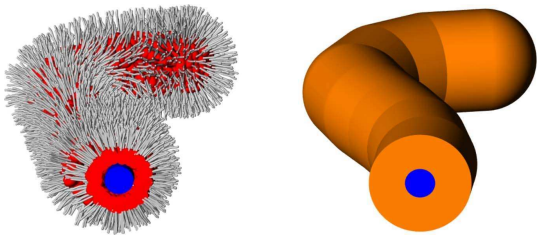

FIG. 43: Modèle d'un polyélectrolyte enrobé de lipides. A gauche, un polyélectrolyte (en bleu) est recouvert d'une monocouche inverse de lipides (tête polaire en rouge et chaîne hydrocarbonée en gris). A droite, le modèle de tube où la partie orange représente les composants lipidiques et la partie bleue représente le polyélectrolyte. Cette distinction est faite par souci de clarté uniquement, l'intérieur bleu ne joue aucun rôle en pratique. Figure extraite de [276].

Les simulations Monte Carlo furent effectuées à travers le traditionnel algorithme de Metropolis avec les ensembles de mouvements standards de translation, de pivot et de vilebrequin [280]. Les tubes étaient ajoutés à un agrégat depuis une position et une orientation aléatoire, l'un après l'autre en observant 10^5 pas Monte Carlo d'équilibrage afin d'être sûr que le système demeure proche de l'équilibre. Chaque tube consistait en N nœuds séparés par une distance δ, et référencé par un vecteur $\mathbf{r}_i$ avec $1 \leqslant i \leqslant MN$ où M est le nombre total de tubes. L'énergie totale était calculée comme la somme de l'énergie élastique $E_{élastique}$, l'énergie de volume exclu $E_{exclusion}$, et l'énergie d'interaction hydrophobe à courte portée $E_{hydrophobe}$. L'énergie élastique est donnée par :

$$E_{élastique} = \frac{1}{2} k_B T \sum_{i=1}^{M} \int_{\text{tube } i} \kappa^2(s) ds \tag{3.4}$$

où k_B est la constante de Boltzmann, T la température, l_p la longueur de persistance d'un tube, $\kappa(s)$ la courbure locale, et s l'abscisse curviligne des tubes. L'exclusion stérique n'était pas modélisée par des chaînes de billes sphériques ne pouvant pas s'interpénétrer comme c'est souvent le cas dans les simulations de polymères. Nous avons plutôt adopté une représentation plus précise qui s'est révélée efficace pour retrouver les motifs structuraux des protéines tels que les hélices α et les feuillets β [281], et qui a aussi été utilisée pour explorer les propriétés fondamentales des hélices telles que rencontrées dans les biomolécules et les polymères [282, 283]. Nous avons par conséquent introduit le potentiel de Gonzalez-Maddocks $U_{GM}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3)$ entre trois nœuds à des positions vectorielles $\mathbf{r}_1$, $\mathbf{r}_2$, et $\mathbf{r}_3$ [284]

$$U_{GM}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3) = \begin{cases} 0 & \text{si } r_g > d/2 \\ +\infty & \text{si } r_g \leqslant d/2 \end{cases} \tag{3.5}$$

où d est le diamètre du tube et r_g le rayon de courbure global défini comme le rayon du cercle connectant trois nœuds

$$r_g = \frac{|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2||\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_3||\mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_3|}{4A(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3)} \tag{3.6}$$

avec $A(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3)$ l'aire du triangle de sommets $\mathbf{r}_1$, $\mathbf{r}_2$, et $\mathbf{r}_3$, et $|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2|$ la distance euclidienne entre les nœuds $\mathbf{r}_1$ et $\mathbf{r}_2$. En conséquence, l'énergie totale de volume exclu qui empêche les tubes de s'interpénétrer est donnée par la somme des potentiels de Gonzalez-Maddocks sur tous les nœuds de chaque tubes,

$$E_{exclusion} = \sum_{i \neq j \neq k}^{MN} U_{GM}(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j, \mathbf{r}_k) \tag{3.7}$$

Un dernier terme d'énergie a été utilisé pour tenir compte de l'interaction hydrophobe attractive intervenant entre les chaînes hydrocarbonées des lipides pointant vers l'extérieur des polyélectrolytes enrobés. Il n'existe pas de théorie exhaustive sur l'effet hydrophobe, et la majorité des modèles microscopiques appliqués à l'effondrement d'une chaîne hydrophobe requiert d'énormes temps de calcul [285]. Nous avons par conséquent adopté une approche heuristique dans laquelle les nœuds non liés intéragissent via un potentiel en créneau de profondeur $-\epsilon$ et de largeur D_c. De ce fait, l'énergie hydrophobe s'écrit

$$E_{hydrophobe} = -\epsilon \sum_{i=1}^{MN-2} \sum_{j=i+2}^{MN} \Theta(D_c - |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|) \tag{3.8}$$

où la fonction d'Heaviside $\Theta(x)$ est égale à 1 si $x > 0$ et 0 sinon. Toutes les grandeurs spatiales étaient normalisées au diamètre du tube d. Toutes les simulations ont été effectuées avec $\delta/d = 0,59$,

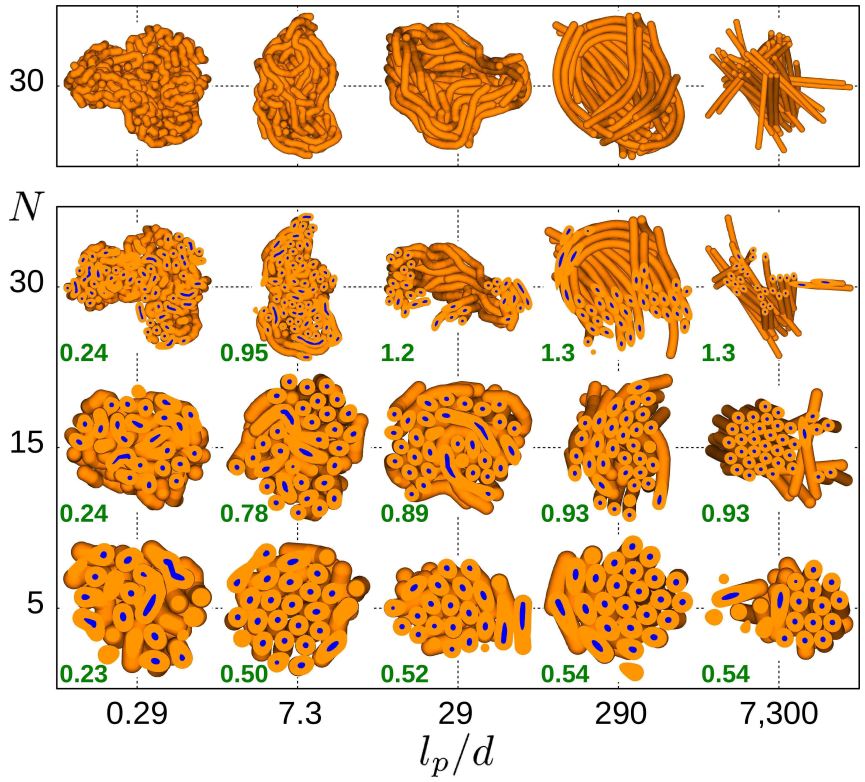

FIG. 44: Morphologies des tubes semi-flexibles auto-assemblés. Les simulations Monte Carlo sont faites avec $M = 40$ tubes comprenant un nombre variable de nœuds N et différentes longueurs de persistance l_p/d. Le panneau du bas montre une vue en coupe des agrégats, tandis que le panneau du haut montre les agrégats entiers calculés pour un nombre de nœuds $N = 30$. Les nombres en vert près des agrégats sont les longueurs de corrélation réduites déduites de la RPA ζ^*_{RPA} (voir le texte). Figure extraite de [276].

$D_c/d = 0,47$, et $\epsilon = 2k_BT$. Le choix de D_c résultait d'une estimation tirée de la théorie macroscopique de démouillage d'une surface plane [286].

La Figure 44 résume les morphologies d'agrégats auto-assemblés formés par les tubes avec un nombre de nœuds N variant de 5 à 30 et avec des longueurs de persistance normalisées l_p/d variant de 0,29 à 7.300. Il est remarquable que les tubes semi-flexibles cristallisent localement et forment un arrangement hexagonal ressemblant à la structure interne observée expérimentalement, particulièrement aux valeurs intermédiaires de l_p/d entre 7,3 et 290, et pour $N = 5$ et 15. La tendance générale est que, pour un N donné, les agrégats évoluent depuis un état désordonné vers des faisceaux droits en passant par des faisceaux partiellement enroulés à mesure que l_p/d augmente. Aux faibles rigidités ($l_p/d = 0,29$), la morphologie des agrégats ne change pas avec N, les agrégats sont juste plus gros. En revanche, aux rigidités élevées ($l_p/d = 7.300$), la morphologie des agrégats varie d'une forme globulaire compacte pour $N = 5$ à des faisceaux enchevêtrés pour $N = 30$. Il semble aussi que les tubes courts ($N = 5$) commencent à cristalliser localement pour des valeurs plus faibles de

l_p/d (≈7,3) que les tubes longs ($N = 30$). Ces résultats sont en accord qualitatif avec les observations faites en cryomicroscopie électronique : les structures hexagonales formées avec de l'ADN-146 pb (Figure 40) peuvent être comparées à celles de l'agrégat $(N; l_p/d) = (15; 7, 3)$, le désordre des assemblages contenant du CMC (Figure 41) ressemble à celui de l'agrégat $(N; l_p/d) = (30; 0, 29)$, et les faisceaux enchevêtrés obtenus avec l'actine F (Figure 42) ont des similarités avec l'agrégat $(N; l_p/d) = (30; 7.300)$. Le degré d'ordre au sein des agrégats est lié aux corrélations de fluctuations de densité entre les monomères. Une expression approchée de la longueur de corrélation entre monomères ζ_{RPA} d'une solution de polymères semi-dilués est donnée par l'approximation de la phase aléatoire (RPA) [287]

RPA = Random Phase Approximation

$$\zeta_{RPA} \equiv \frac{R_G}{\sqrt{2(1+\rho N \nu)}} \tag{3.9}$$

avec

$$R_G^2 = \frac{1}{3} l_p^2 \left[\exp\left(-\frac{L}{l_p}\right) - 1 + \frac{L}{l_p} \right] \tag{3.10}$$

où R_G désigne le rayon de giration, ρ la concentration des monomères, ν le paramètre de volume exclu proportionnel au second coefficient du viriel, et $L \equiv N\delta$ la longueur de contour. Pour une interaction monomère-monomère donnée, et donc un paramètre de volume exclu, la longueur de corrélation dans le régime dense peut être réduit en $\zeta_{RPA}/d \propto \zeta^*_{RPA} \equiv (R_G/(d\sqrt{N}))$. Aux faibles longueurs de persistance ($L \gg l_p$), la longueur de corrélation réduite est indépendante de N, $\zeta^*_{RPA} \sim [(l_p/d)(\delta/d)/3]^{1/2}$, tandis que pour les tubes rigides ($L \ll l_p$), elle ne varie plus avec la longueur de persistance, $\zeta^*_{RPA} \sim (N/6)^{1/2}(\delta/d)$. Les valeurs de ζ^*_{RPA} sont reportées sur la Figure 44 et illustre la relation avec la morphologie des agrégats : plus la portée des corrélations entre monomères est grande, plus l'agrégat est ordonné et étendu.

La Figure 45A donne les distributions de paires pour l'agrégat $(N; l_p/d) = (5; 290)$. Si $\mathbf{u}$ est un vecteur tangentiel à un tube en un nœud $\mathbf{r}_i$, et $\mathbf{r}_j$ un autre nœud, alors on définit les distances longitudinale et transverse comme étant $r_\parallel \equiv |\mathbf{u}(\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j)|$ et $r_\perp \equiv |\mathbf{u} \times (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j)|$. Les distances longitudinale et transverse étaient dénombrées pour chaque paire de nœuds appartenant à des tubes distincts, et une distribution de paires $P(r_\parallel, r_\perp)$ était déduite de l'histogramme résultant. La distribution de paires était alors moyennée sur 1000 pas Monte Carlo décorrélés après équilibration de l'agrégat. Le graphe A révèle plusieurs pics caractéristiques d'un ordre interne présent à la fois dans les directions longitudinale et transverse. Il faut remarquer que pour $(r_\parallel/d)^2 + (r_\perp/d)^2 < 1$, $P(r_\parallel, r_\perp) = 0$ dû aux effets stériques. La Figure 45B montre la distribution de paires moyennée sur les distances transverses, ce qui produit la composante longitudinale de la distribution de paires $< P_\parallel >$. On peut y voir plusieurs maxima régulièrement espacés par une distance δ/d, le premier étant localisé

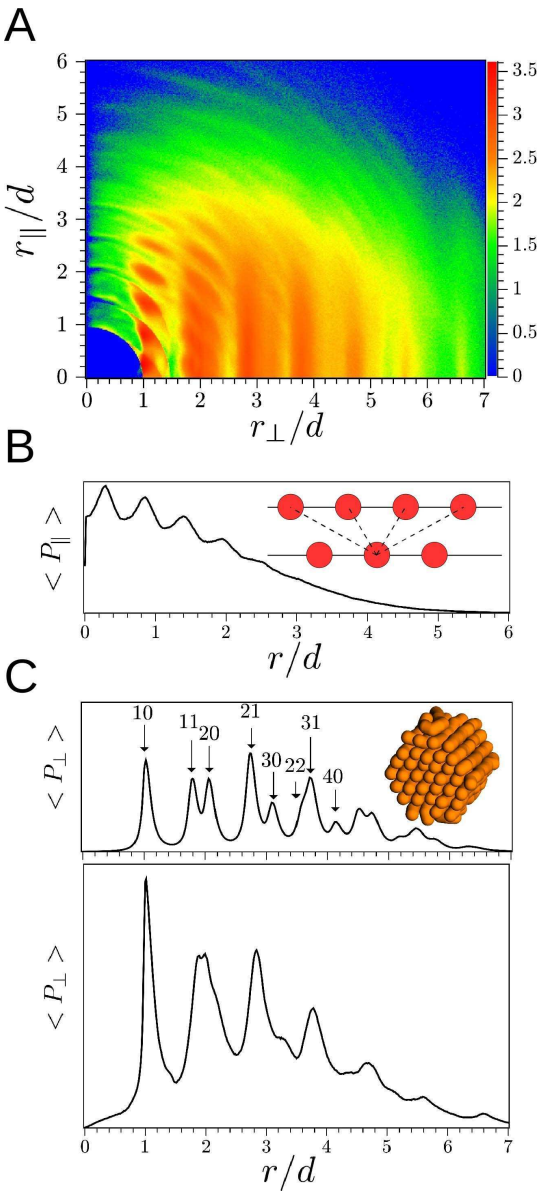

FIG. 45: Distributions de paires pour l'agrégat $(N; l_p/d) = (5; 290)$. (A) Distribution de paires en fonction des distances longitudinale et transverse en échelle logarithmique. (B) Composante longitudinale de la distribution de paires. Le schéma représente deux tubes adjacents avec des nœuds en interaction en rouge. (C) Composante transverse de la distribution de paires dans le panneau du bas. Le panneau du haut donne la même information pour un faisceau hexagonal de référence. Les chiffres sont les indices de Miller pour un réseau hexagonal. Figure extraite de [276].

à $r = 1/2(\delta/d)$. Comme schématisé dans l'encart, cet espacement est spécifique au modèle du tube : chaque nœud tend à maximiser le nombre de voisins dans sa sphère d'attraction D_c, et un maximum de quatre nœuds voisins peut être obtenu en décalant longitudinalement les tubes adjacents par $1/2(\delta/d)$. La Figure 45C donne quant à elle des informations sur l'organisation transverse de l'agrégat à travers la composante transverse de la distribution de paires $< P_\perp >$. Le pan-

neau du haut donne $< P_\perp >$ pour un faisceau fait de tubes flexibles $(N; l_p/d) = (10; 0,29)$ initialement arrangés sur un réseau hexagonal et évoluant librement sur 10^5 pas Monte Carlo. Les pics peuvent être indexés sur une structure cristalline hexagonale. A mesure que la distance augmente, les pics commencent à être légèrement décalés vers l'extérieur car le potentiel attractif que nous avons choisi était en créneau et les tubes étaient ainsi libres de se déplacer dans les limites de la distance d'interaction D_c. En particulier, près des bords de l'agrégat, les tubes sont beaucoup moins forcés d'être compactés qu'au centre du fait de la plus faible pression exercée par l'ensemble des autres tubes. Le graphe en bas du panneau C donne $< P_\perp >$ pour le même agrégat. Nous pouvons voir que même si les pics sont moins marqués que ceux du faisceau hexagonal de référence, ils sont néanmoins alignés avec eux, ce qui atteste clairement d'un arrangement transverse hexagonal.

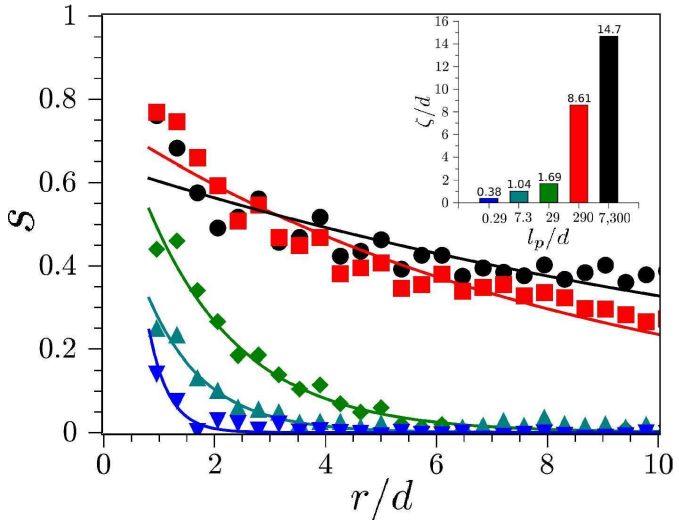

FIG. 46: Paramètre d'orde s en fonction de la distance pour les agrégats à $N = 30$ avec différentes longueurs de persistance l_p/d : 0,29 (triangles inversés bleus), 7,3 (triangles bleus clairs), 29 (losanges verts), 290 (carrés rouges), et 7.300 (disques noirs). Les lignes continues sont des fonctions exponentielles décroissantes de distance caractéristique ζ. L'encart résume les distances caractéristiques estimées en fonction des longueurs de persistance des tubes. Figure extraite de [276].

Nous avons ensuite étudié la portée de l'ordre en fonction de la longueur de persistance des tubes. Pour ce faire, nous avons calculé le paramètre d'ordre $s(r)$

$$s(r) \equiv \frac{1}{2} < 3(\mathbf{n}_i.\mathbf{n}_j)^2 - 1 > \tag{3.11}$$

entre chaque nœud i et j appartenant à des tubes distincts et séparés par une distance $r = |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|$, avec n_i et n_j étant les vecteurs unités tangentiels à leur tube respectif. Le paramètre d'ordre était moyenné sur 1000 pas Monte Carlo décorrélés. Une valeur de 1 indique un système complètement orienté, tandis qu'une valeur nulle correspond

à un système isotrope. $s(r)$ pour l'ensemble des agrégats à $N = 30$ est tracé sur la Figure 46. Le graphe montre que $s(r)$ suit une décroissance exponentielle, ce qui signifie que au-delà d'une certaine distance caractéristique ζ, les orientations des tubes deviennent décorrélées. ζ quantifie de ce fait la portée de l'ordre au sein d'un agrégat. Sans grande surprise, ζ augmente avec la longueur de persistance et confirme la tendance générale qui veut que les agrégats soient d'autant plus ordonnés que la rigidité des tubes est élevée.

Finalement, le rôle de l'électrostatique sur la formation des agrégats a été examiné. L'électrostatique a un effet stabilisant au sens où il empêche l'ajout de tubes au-delà d'une taille critique. Les mécanismes sont identiques à ceux impliqués dans les colloïdes chargés qui présentent des potentiels de paires avec un terme attractif à courte portée et un terme répulsif à longue portée [288]. Par ailleurs, lors de leur association avec des polyélectrolytes, les lipides de charge opposée ainsi que les contre-ions qui n'ont pas été relargués vont avoir tendance à neutraliser les charges portées par les monomères. Il en résulte que la charge nette portée par les polyélectrolytes enrobés de lipides est suffisamment faible pour ne pas surpasser la partie attractive du potentiel de paire à courte portée. Le potentiel attractif à courte portée conduit à l'agrégation des tubes jusqu'à ce que la charge nette portée par l'agrégat devienne trop élevée pour permettre à davantage de tubes de s'associer. Cela résulte en un agrégat de taille finie comprenant un nombre M_{min} de tubes. En l'absence de charge nette sur les tubes, les agrégats grossissent indéfiniment ($M_{min} \to \infty$) et donne lieu au final à une séparation de phase avec le solvant.

Le processus est illustré sur le panneau de gauche de la Figure 47 qui montre l'énergie interne par tube E/M en fonction des pas Monte Carlo. Chaque nœud des tubes portait une charge q, et un terme d'interaction coulombienne était ajouté à l'énergie du système

$$E_{Coulomb} = \frac{q^2}{4\pi\epsilon_r\epsilon_0} \sum_{i=1}^{MN-1} \sum_{j=i+1}^{MN} \frac{1}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|} \tag{3.12}$$

où $\epsilon_r = 80$ et ϵ_0 sont la constante diélectrique et la permittivité du vide respectivement. Les tubes étaient ajoutés un par un tous les 10^5 pas de telle sorte que le graphe montre indirectement E/M en fonction de M. L'énergie par tube tout d'abord diminuait jusqu'à un nombre critique de tubes M_{min} - excepté pour les tubes neutres -, qui correspond à la taille maximale d'un agrégat pour une charge donnée par tube. Au-delà de M_{min}, les tubes additionnels n'étaient pas incorporés à l'agrégat existant produisant une montée de E/M qui finalement relaxait vers l'énergie moyenne d'un tube unique isolé pour $M \to \infty$. M_{min} diminuait rapidement à mesure que la charge par tube augmentait ; les agrégats sont par conséquent plus petits quand les tubes sont fortement chargés. Les agrégats conservaient une structure hexagonale comme on peut le voir sur le panneau de droite de la Figure 47 à travers la position des pics de $< P_\perp >$ qui sont proches de ceux montrés sur la Figure 45C. La seule différence

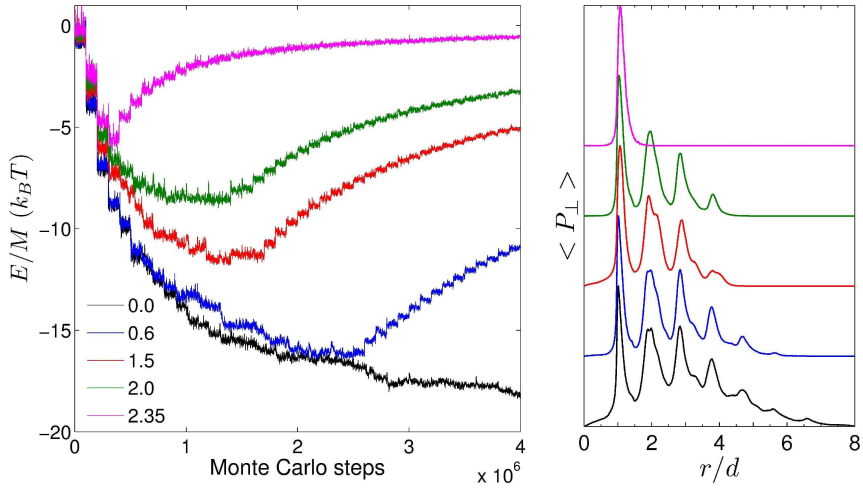

FIG. 47: Effets électrostatiques sur des agrégats chargés avec $(N; l_p/d) = (5; 290)$. Les tubes portent une charge nette par nœud indiquée dans la légende du panneau de gauche : aucune charge (noir), 0,6 e^- (bleu), 1,5 e^- (rouge), 2,0 e^- (vert), et 2,35 e^- (mauve). (A gauche) Energie par tube E/M en fonction des pas Monte Carlo à mesure que les tubes sont ajoutés à l'agrégat. Les tubes sont introduits tous les 10^5 pas. (A droite) Composante transverse de la distribution de paires en fonction de la distance pour les agrégats du panneau de gauche avec un nombre de tubes M_{min} qui minimise E/M pour chaque agrégat. $M_{min} = 40$ (noir), 24 (bleu), 17 (rouge), 14 (vert) et 3 (mauve). Les distributions sont obtenues en moyennant sur 10^6 pas Monte Carlo après équilibration. Figure extraite de [276].

significative provenait de l'étendue spatiale des distributions qui était directement corrélée à la réduction en taille des agrégats à mesure que la charge par tube était élevée.

Le fait que le minimum en E/M coïncide avec la taille d'équilibre d'un agrégat n'est pas fortuit. Un résultat classique dans la théorie de l'auto-assemblage des molécules énonce que, pourvu que la partie entropique de l'énergie libre des agrégats soit négligeable par rapport à leur énergie (interne), minimiser l'énergie libre devient équivalent à minimiser E/M [288, 17]. Afin d'interpréter plus finement les variations de E/M dans les simulations Monte Carlo précédentes, nous avons effectué une analyse dimensionnelle sur les différentes contributions entrant dans l'expression de l'énergie. L'énergie E d'un agrégat constitué de M tubes est $E = E_{élastique} + E_{hydrophobe} + E_{Coulomb}$. $E_{élastique}$ varie comme le nombre de tubes $+M$ et est généralement petite comparée aux autres termes. $E_{hydrophobe}$ comprend une composant attractive entre les paires de nœuds et proportionnelle à $-M$, et une énergie interfaciale provenant des tubes localisés au bord de l'agrégat et ainsi en contact avec le solvant. En supposant un agrégat de forme sphérique, cette dernière énergie varie comme R^2, où R est le rayon de l'agrégat, et par conséquent aussi comme $+M^{2/3}$. L'énergie coulombienne peut être déduite de l'énergie propre d'une sphère uniformément chargée, qui varie donc comme Q^2/R, avec Q la charge

totale portée par la sphère, et s'écrit ainsi $E_{Coulomb} \propto +M^{5/3}$. En conséquence, l'énergie par tube d'un agrégat donne

$$E/M = -\alpha + \beta M^{-1/3} + \gamma M^{2/3} \tag{3.13}$$

avec α, β, et γ des paramètres positifs indépendant de M. La Figure 48 illustre les variations de E/M données par l'Equation 3.13 à travers les branches **a** et **a'**. La courbe présente un minimum ($d(E/M)/dM = 0$) pour un nombre de tubes donné par $M_{min} = \beta/2\gamma$ correspondant à la taille d'équilibre de l'agrégat. En d'autres termes, M_{min} résulte d'une compétition entre l'énergie interfaciale (à travers β) et l'énergie électrostatique (à travers γ). Au-delà de M_{min}, l'Equation 3.13 n'est plus valide, et la branche **a'** est en fait instable. A la place, l'énergie interne est donnée par l'énergie d'équilibre de l'agrégat E_{min} plus l'énergie des tubes isolés en excès, c'est à dire

$$E/M = (E_{min}/M_{min} - E_{tube})\frac{M_{min}}{M} + E_{tube} \tag{3.14}$$

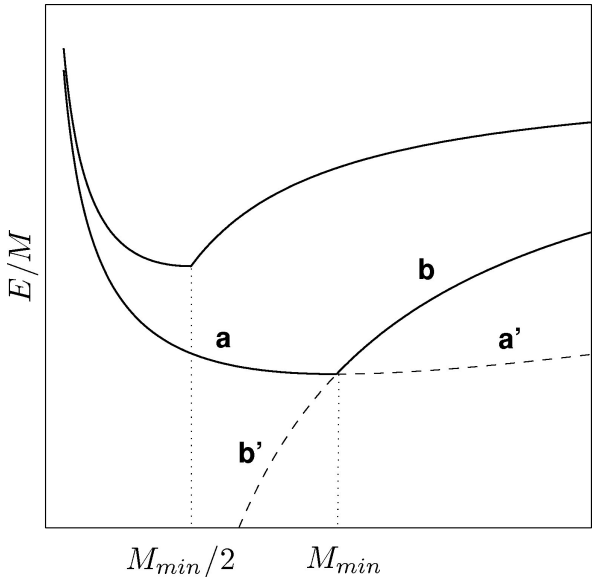

FIG. 48: Energie par tube E/M en fonction du nombre de tubes M. Les branches **a** et **a'** sont calculées à partir de l'Equation3.13, tandis que les branches **b** et **b'** sont données par l'Equation 3.14. La courbe du haut est obtenue avec un paramètre électrostatique γ deux fois plus élevé que celui de la courbe du bas. Figure extraite de [276].

avec $E_{tube} = -\alpha + \beta + \gamma$ étant l'énergie d'un tube isolé. Les branches **b'** et **b** sur la Figure 48 donnent une représentation de l'Equation 3.14. Seule la branche **b** est stable. Ainsi, la combinaison des branches **a** et **b** décrit complètement les variations de l'énergie par tube. Si la charge par tube est augmentée à travers $\gamma \propto q^2$, la taille d'équilibre des agrégats $M_{min} \propto 1/\gamma \propto 1/q^2$ est décalée vers les faibles valeurs (voir la courbe du haut de la Figure 48) d'autant plus rapidement que la charge devient élevée. Ces comportements sont en très bon

accord avec les résultats présentés sur la Figure 47, ce qui nous donne confiance dans la validité du modèle incarné par les Equations 3.13 et 3.14.

3.3.4 *Conclusions*

Nous avons démontré l'existence d'une classe générale d'assemblages supramoléculaires faits de polyélectrolytes enrobés dans les lipides. Ces assemblages présentent un riche polymorphisme paramétré par la rigidité et la longueur des polyélectrolytes enrobés. Nous avons révélé le degré d'ordre variable au sein des assemblages à la fois expérimentalement par cryomicroscopie électronique à haute résolution et numériquement en développant un modèle remarquablement efficace de tubes semi-flexibles. Le modèle a bien reproduit les structures localement hexagonales et a révélé une extension spatiale de l'ordre avec la rigidité des polyélectrolytes enrobés. L'ajout de charges dans les tubes conduisait à des assemblages constitués d'un nombre fini de tubes inversement proportionnel au carré des charges portées par chaque tube.

Il faut bien noter ici que les lipides sont en phase liquide, et qu'en conséquence, ils ne sont pas strictement confinés au voisinage des polyélectrolytes. Ils remplissent tout l'espace au sein des assemblages, et ils peuvent être capables de "sauter" d'un polyélectrolyte à l'autre. Par conséquent, le modèle de tube doit être regardé comme un potentiel effectif ressenti par les polyélectrolytes. De plus, les assemblages de taille finie calculés par nos simulations numériques doivent être imaginés enveloppés d'une monocouche lipidique qui vient protéger les chaînes hydrocarbonées extérieures pointant vers l'environnement aqueux.

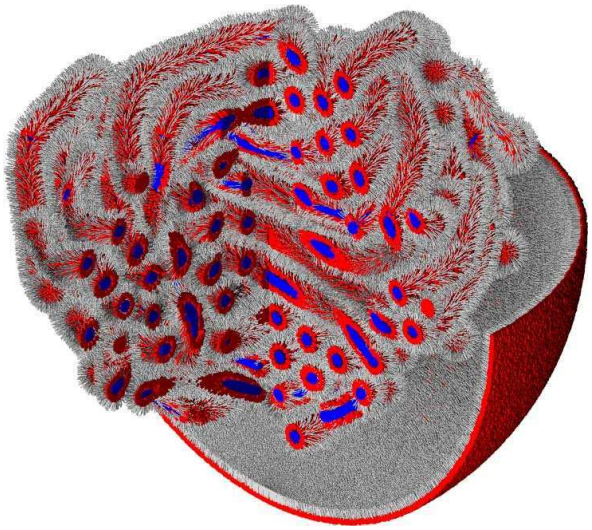

FIG. 49: Structure proposée d'un assemblage de polyélectrolytes enrobés de lipides. Les couleurs sont définies sur la Figure 43. Figure extraite de [276].

Nous espérons que ces résultats aideront à mieux contrôler l'entrée et le relarguage d'une vaste gamme de polyélectrolytes à l'intérieur des cellules, en particulier, pour les applications de transfert de gènes. Nous envisageons deux directions futures : la première concerne le contrôle précis de la taille des assemblages en élucidant la façon dont les polyélectrolytes s'associent avec les vésicules lipidiques et en exploitant davantage la charge résiduelle des tubes dans la stabilisation des assemblages. La seconde direction aura pour objet d'investiguer numériquement le processus de fusion entre un assemblage et une bicouche lipidique, ainsi que les mécanismes de relarguage des polyélectrolytes.

4

MÉCANISMES D'AUTO-ASSEMBLAGE DE PARTICULES PSEUDO-VIRALES ISSUES D'UN NOROVIRUS

4.1 PROPRIÉTÉS INUSUELLES D'AUTO-ASSEMBLAGE DE PARTICULES PSEUDO-VIRALES DU NOROVIRUS NEWBURY2

4.1.1 *Introduction*

La famille des *Caliciviridae* qui comprend des petits virus à ARN non enveloppés, est subdivisée en cinq genres : Norovirus, Sapovirus, Lagovirus, Vésivirus et Nébovirus. Les *Caliciviridae* infectent les humains et d'autres animaux, et suscitent de ce fait de sérieuses inquiétudes sur le plan économique et vétérinaire à travers le monde. Ils ont été ainsi étudiés intensément au cours des 30 dernières années révélant des douzaines de souches différentes [289]. Beaucoup de souches décrites n'appartiennent à aucun des cinq genres reconnus, et par conséquent plusieurs nouveaux genres ont été proposés tels que les Récovirus et les Valovirus. Les Norovirus et les Sapovirus sont les causes majeures de gastro-entérites chez les humains et les animaux. En particulier, les Norovirus sont la première cause de gastro-entérite d'origine non bactérienne chez les humains (génogroupes I et II) et le bétail (génogroupe III). Ils sont à l'origine d'épidémies de maladies transmises par les aliments et pourraient devenir la principale cause de gastro-entérite infantile. Le Norovirus le plus étudié est le prototype du génotype I/1, le virus de Norwalk (NV). Malgré des efforts considérables, il n'existe pas de système de culture pour le NV ni pour aucun autre Norovirus à l'exception d'un unique Norovirus infectant les rongeurs. Toutefois, des particules pseudo-virales (VLPs) recombinantes de symétrie icosaédrique $T = 3$ peuvent être produites en système baculovirus [290]. Ces VLPs sont morphologiquement et antigéniquement indistinguibles de virions infectieux isolés à partir de prélèvements sur des patients. La structure cristalline de NV-VLPs a constitué une avancée majeure dans l'étude moléculaire des Norovirus [291]. Elle demeure à ce jour l'unique structure cristalline de Norovirus, même si les structures de deux Vésivirus (qui peuvent être produits en culture cellulaire) ont été reportées depuis lors [292, 293]. La VLP est faite de 180 copies d'une unique protéine appelée VP1. NV-VP1 peut être divisée en deux domaines (Figure 50A). Les 180 domaines S forment une coque d'environ 30 nm de diamètre, depuis laquelle pointent 90 spicules de 5 nm faites de dimères du domaine P. Ce dernier abrite ainsi les déterminants du tropisme cellulaire et antigénique. Au contraire, les déterminants de l'assemblage sont abrités principalement par le domaine S. Comme dans la plupart des petit virus icosaédrique $T = 3$, un bras N terminal situé sous le corps de la coque participe au léger changement de conformation de la même

VLP=Virus-Like Particle

chaîne polypeptidique, désignée par les molécules A, B et C [294]. En outre, il a été montré que la NV-VLP peut être désassemblée et réassemblée *in vitro*, les paramètres uniques qui importent le plus étant le pH et la force ionique [295, 296]. Finalement, de plus petites particules (probablement des icosaèdres T = 1) qui sont parfois assemblées dans le système baculovirus ont pu être désassemblées dans les mêmes conditions que les NV-VLPs, et se sont réassemblées en partie en T = 3 NV-VLPs [297].

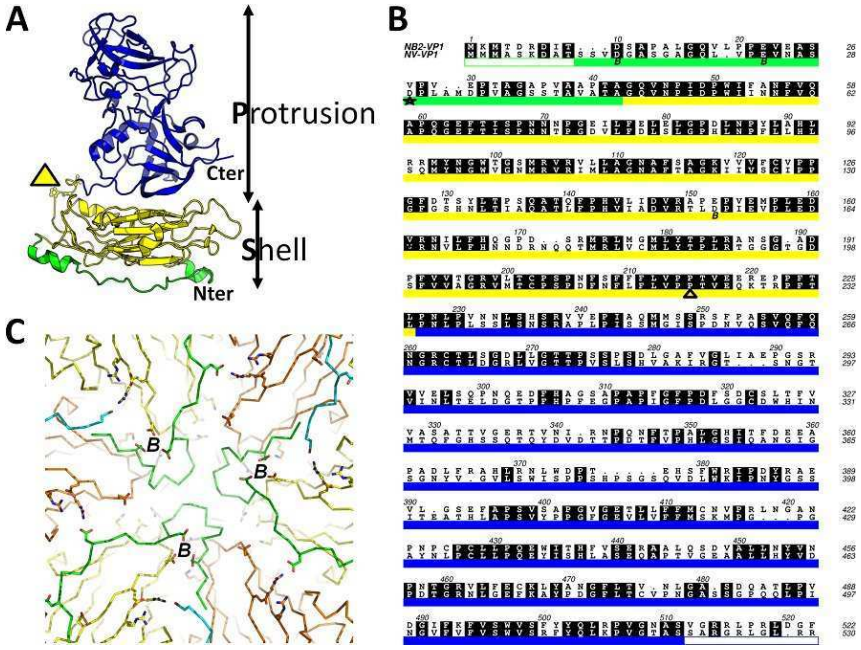

FIG. 50: Organisation de la protéine VP1 de capsides de Norovirus. VP1 est colorée par domaines : le domaine S en vert (bras N terminal) et jaune (coque), et le domaine P (spicule) en bleu. Le segment PPT où le domaine S de NB2 connecte le domaine P de NB1 dans la chimère NB2_1 est marqué avec un triangle en **A** et **B**. **A** Schéma de la molécule B de NV-VP1 d'après la structure cristalline d'une NV-VLP (code PDB 1IHM). **B** Alignement de séquence des protéines de la capside de NB2 (haut) avec NV (bas). Les parties de VP1 qui sont désordonnées au sein des trois molécules A, B et C de NV-VLP sont laissées vides. Le début de la partie ordonnée des molécules A et C est marqué par une étoile. Les trois résidus acides rassemblés dans la molécule B autour de l'axe de symétrie d'ordre 6 sont marqués avec un ***B***. **C** Vue de l'axe icosaédrique d'ordre 3 depuis l'intérieur d'une NV-VLP. Les traces de la chaîne principale des domaines S des 6 sous-unités (3 B et 3 C) sont visibles. Les 3 sous-unités C sont colorées en bleu clair (bras N terminal) et orange. Les résidus acides (Asp et Glu) et basiques (Lys et Arg) sont représentés sous forme de bâtonnets. Tous ces résidus sont neutralisés dans des ponts salins, à l'exception des trois groupements marqués d'un ***B***.

Nous étudions ici un proche parent du Norwalk, la souche bovine de Norovirus Bo/Newbury2/1976/UK (NB2) [298]. NB2-VP1 (57 kDa) partage 50% d'identité de séquence avec NV-VP1 (Figure 50B). Les protéines NB2-VP1 recombinantes s'auto-assemblent également en VLP lorsqu'elles sont produites en système baculovirus et se sont

révélées très adaptées à des études antigéniques et de reconnaissance de récepteur [299, 300]. Nous rapportons ici une caractérisation biophysique des propriétés d'auto-assemblage et de désassemblage de NB2-VP1 *in vitro* en utilisant la microscopie électronique, la diffusion de la lumière, ainsi que la diffusion centrale des rayons X et des neutrons. Nos résultats révèlent un système auto-assemblé très robuste et versatile.

4.1.2 *Les NB2-VLPs Peuvent Etre Désassemblées et Réassemblées en Assemblages Plus Grands et Homogènes*

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) indiquait que les préparations de NB2-VLP étaient des solutions monodisperses (polydispersité inférieure à 25% et couramment en-dessous de 20%), avec des objets d'environ 44 nm en diamètre hydrodynamique. Le diamètre hydrodynamique calculé à partir de la structure cristalline de NV-VLP est de 39 nm, ce qui montre que les mesures étaient cohérentes avec des NB2-VLPs $T = 3$. Les observations en microscopie électronique (ME) ont confirmé que les préparations contenaient des objets sphériques de la taille attendue (Figure 51, en haut). Ces VLPs restent stables pendant des mois dans un tampon légèrement acide (pH 6,0) avec 100 mM de sel monovalent. Toutefois, les préparations conservées dans 20 mM MES pH 6,0 avec environ 2,4 M CsCl restant du gradient de chlorure de césium présentaient un comportement différent et après un stockage de longue durée, la DLS indiquait une solution apparemment monodisperse avec un diamètre hydrodynamique de 64 nm. Les VLPs $T = 3$ (44 nm) dialysées pendant 24 h dans une solution à pH 8,0 et force ionique I de 20 mM se désassemblaient en un mélange hétérogène comprenant des petits objets sphériques (Figure 51, au milieu). L'estimation de la taille par DLS s'est révélée difficile à cause de l'hétérogénéité de l'échantillon. Cependant, le diamètre observé par microscopie électronique était d'environ 22 nm. Ce comportement dissociatif est qualitativement similaire à celui des NV-VLPs $T = 3$ [295, 296] et indique qu'un pH élevé et une force ionique faible sont des paramètres dissociant pour les NB2-VLPs aussi. Toutefois, contrairement aux protéines NV-VP1, les NB2-VP1 ont pu être réassemblées en objets fermés bien plus grands que les VLPs initiales de 44 nm (Figure 51, en bas à droite). Ces objets étaient clairement monocouches et apparaissaient souvent allongés plutôt que sphériques, bien que ce pouvait être une distortion due aux conditions sèches d'observation. L'échantillon réassemblé apparaissait monodisperse par DLS avec un diamètre hydrodynamique de 76 nm. Quelques objets plus petits pouvaient être vus par microscopie électronique, mais restaient indétectable par DLS.

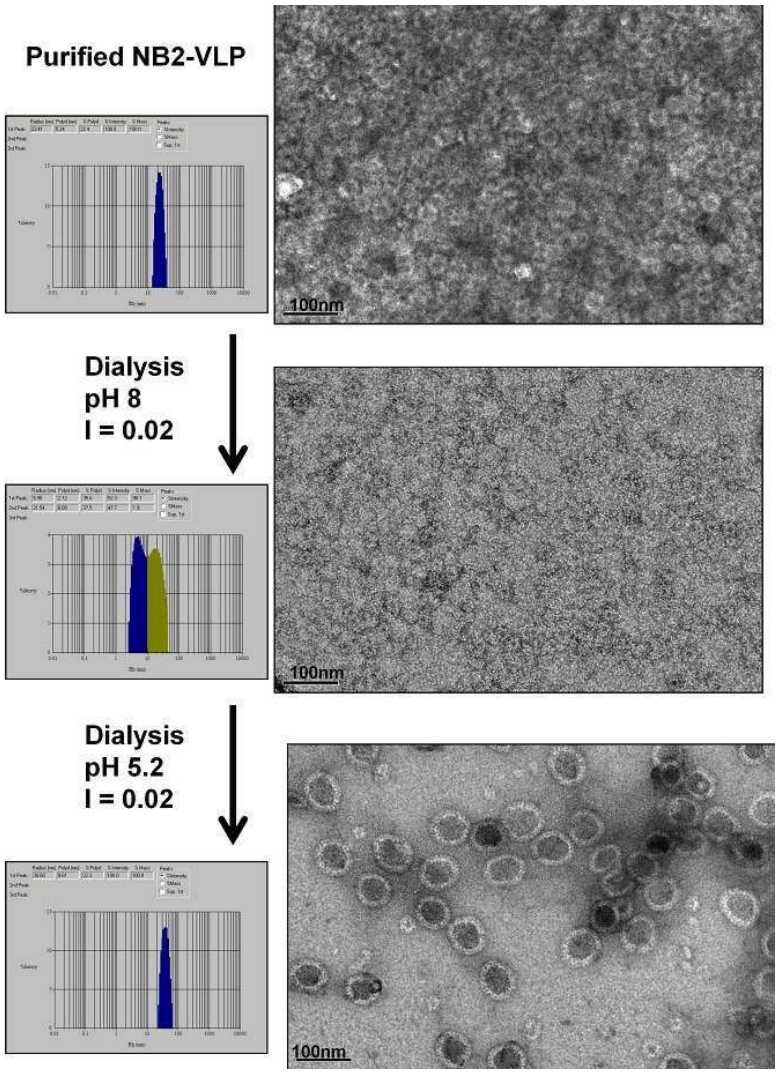

FIG. 51: Les NB2-VLPs produites en système baculovirus peuvent être désassemblées et réassemblées en objets plus grands. En haut, des NB2-VLPs purifiées présentent la taille attendue pour un icosaèdre $T = 3$ comme le prouvent la diffusion dynamique de la lumière (à gauche) et la microscopie électronique en transmission (à droite). Au milieu, par dialyse contre 20 mM HEPES pH 8,0, les NB2-VLPs sont partiellement dissociées en objets plus petits. En bas, une autre dialyse contre 20 mM d'un tampon citrate-phosphate pH 5,2 produit une population homogène d'objets plus grands.

4.1.3 *Le Pseudo Diagramme de Phase d'Auto-Assemblage en Fonction du pH et de la Force Ionique Confirme la Tendance des NB2-VP1 à se Réassembler en Particules plus Grandes que 44 nm*

A la vue de ces observations, nous avons entrepris une étude systématique des effets du pH et de la force ionique sur la morphologie des assemblages de NB2-VP1 en partant de solutions avec un pH de 8,0 et une faible force ionique. Nous avons qualifié le diagramme résultant de pseudo diagramme de phase car nous avons observé que certains états finaux pouvaient différer si l'on partait d'une solution à un pH

ou à une force ionique différente. Ce fait pouvait signifier que les objets formés étaient piégés cinétiquement et qu'ils ne sont donc pas à l'équilibre thermodynamique.

Partant de pH 8,0 et I = 10 mM, il y avait une différence très marquée lorsque le pH était amené à 9,0 où aucune particule sphérique n'était présente, et lorsque le pH devenait acide (Figure 52A) : à pH 8,0, 7,0 et 6,0, des particules de 44 nm étaient encore présentes et leur nombre augmentait à mesure que le pH diminuait, indiquant le réassemblage de plus petites espèces en VLPs T = 3. Ce phénomène était aussi observé et même plus prononcé avec une force ionique finale de 0,1 M (Figure 52B). De manière similaire, en augmentant la force ionique à un pH fixé à 8,0, le réassemblage en particules sphériques était aussi favorisé (Figure 52C). A I =0,5 M, l'état final de réassemblage était un mélange de particules sphériques d'au moins quatres tailles différentes avec des diamètres de 76 nm, 64 nm, 44 nm, et 22 nm, soit très similaires aux particules détectées dans différentes conditions. Cette coexistence de particules plus grandes et plus petites demeurait après un abaissement de I à 0,1 M et un pH fixé à 7,0 ou 5,5 (Figure 53).

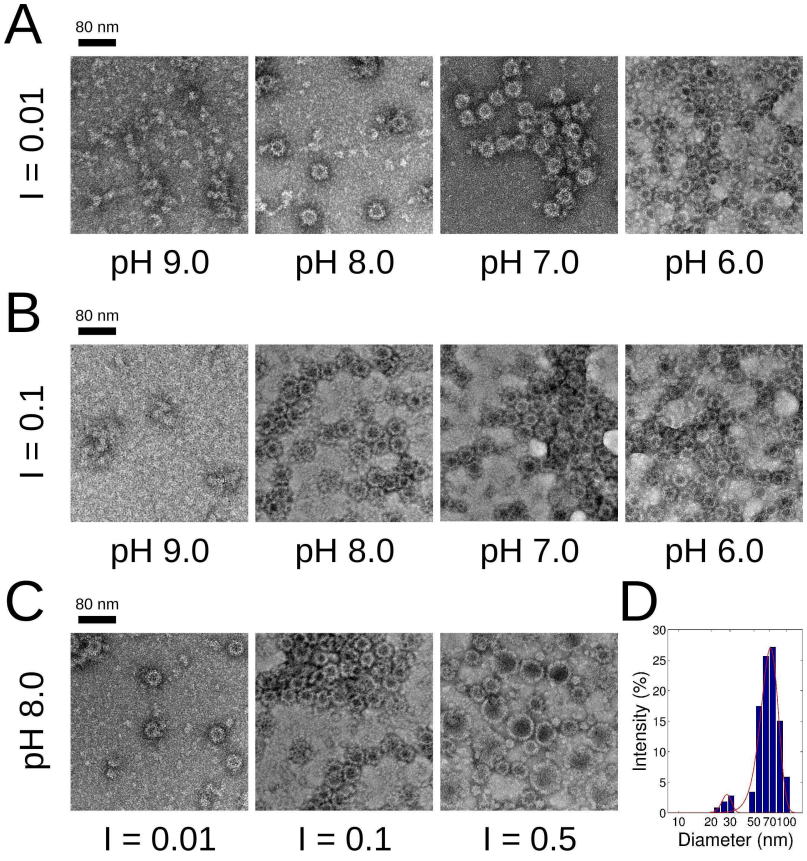

Fig. 52: Pseudo diagramme de phase des assemblages de NB2-VP1 en partant de pH 8,0 et I =10 mM. Images en microscopie électronique par coloration négative après 24 h de dialyse. (A) Influence du pH pour une force ionique fixée de 10 mM. (B) Influence du pH en amenant simultanément la force ionique à 0,1 M. (C) Influence de la force ionique à un pH fixé de 8,0.

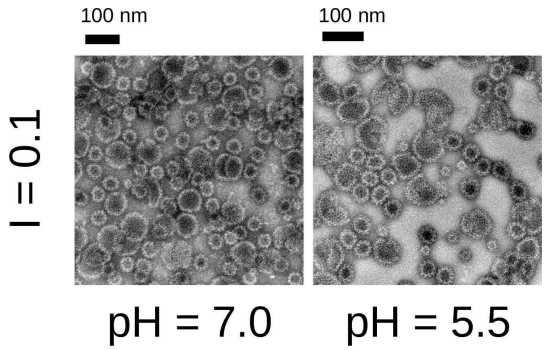

FIG. 53: Stabilité de la distribution multimodale des réassemblages de NB2-VP1 formés à I =0,5 M. Les protéines étaient initialement désassemblées à pH 8,0 et I =10 mM, puis réassemblées à pH 8,0 et I =0,5 M (voir Figure 52C, à droite). Les images ont été prises par microscopie électronique avec coloration négative après incubation à I =0,1 M et pH 7,0 (gauche) ou pH 5,5 (droite).

4.1.4 *La NB2-VLP T = 3 Est Capable d'Encapsuler des Nanoparticules Chargées Négativement*

Nous nous sommes ensuite focalisés sur les propriétés des VLPs T = 3 de 44 nm de diamètre. Notre analyse indiquait qu'une complète dissociation se produisait à pH 9,0 et I =10 mM (Figure 52A). La diffusion des rayons X aux petits angles (DXPA) par une telle solution de concentration 3,2 mg/mL (Figure 54A) montrait que dans ces conditions, les capsides se dissociaient en dimères, avec une masse moléculaire de 113,9 kDa et un rayon de giration R_g de 4,2 nm estimé d'après l'approximation de Guinier. Nous avons utilisé ces conditions comme point de départ dans toutes les expériences qui suivent. Nous avons choisi l'état final comme étant à pH 6,0 et I =0,1 M, c'est-à-dire dans des conditions favorables au réassemblage de VLPs T = 3 à l'exclusion de toute autre taille de particule (Figure 52B). De manière similaire, nous avons analysé les VLPs dans H_2O par DXPA et dans D_2O par DNPA (Figure 54B) pour déterminer des grandeurs quantitatives. Les analyses par microscopie électronique sur des particules dans D_2O (Figure 54B) montraient le même comportement que dans H_2O (Figure 52B, panneau de droite). Les données de diffusion étaient cohérentes avec un modèle de vésicule de diamètre extérieur égal à 39 nm et de diamètre intérieur égal à 23 nm, mais il a fallu utiliser un modèle polydisperse (Figure 54B). Cette polydispersité pouvait être due à une réelle hétérogénéité des VLPs ou bien à des assemblages incomplets trop petits pour être observables par microscopie électronique. Nous avons ensuite essayé d'encapsuler des particules de polystyrène fonctionalisées avec des groupements carboxylate par dissociation des VLPs suivie d'une réassociation. Cette tentative a été partiellement couronnée de succès avec la présence de quelques VLPs formées autour de nanoparticules visibles par microscopie électronique (Figure 55).

DNPA = Diffusion des Neutrons aux Petits Angles

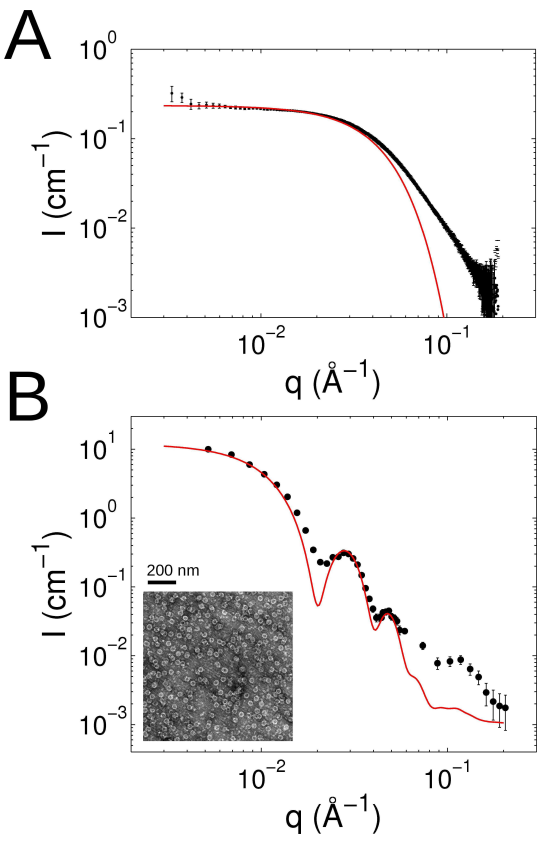

FIG. 54: Spectres en diffusion aux petits angles de solutions de NB2-VP1 après désassemblage à pH 9,0 et I =10 mM (A) et réassemblage à pH 6,0 et I =0,1 M. (A) Spectre DXPA des protéines dissociées (points) et approximation de Guinier (ligne rouge) aux très petits angles ($qR_g < 1$, ce qui donne ici q <2,4×10^{-2} Å^{-1}). L'approximation fournit R_g =42 Å, I_0 =0,234 cm^{-1}. (B) Spectre DNPA des protéines réassemblées. Les données expérimentales (points) sont affinées avec un modèle de vésicule polydisperse (ligne rouge) donnant un rayon interne de 115 ± 10 Å et une épaisseur de 79 ± 11 Å.

4.1.5 *Mobilité Electrophorétique des Assemblages de NB2-VP1 en Fonction du pH*

La dépendance marquée du pH sur les propriétés d'assemblage et de désassemblage des NB2-VLPs indique que des groupes protonables avec des pKa dans la gamme 5,5 - 9,0 étaient impliqués. En outre, la structure cristalline des NV-VLPs montre des amas de résidus acides, conservés dans NB2-VP1 (Figure 50B), et qui sont impliqués dans des interactions clés de l'architecture en VLP T = 3 (Figure 50C). Ces résidus doivent subir un décalage de leur pKa lors de la dissociation de la VLP et/ou lors de la relocalisation du bras N terminal. Nous avons par conséquent analysé la mobilité électrophorétique de NB2-VP1 après désassemblage puis dialyse dans des tampons de pH allant de 4,0 à 9,0 et de force ionique I = 0,1 M ou I = 10 mM (Figure 56). Etant donné que les particules en solution étaient détectées par décalage Doppler de la lumière diffusée, les objets les plus gros pouvaient masquer les espèces les plus petites vu que ces dernières contribuent

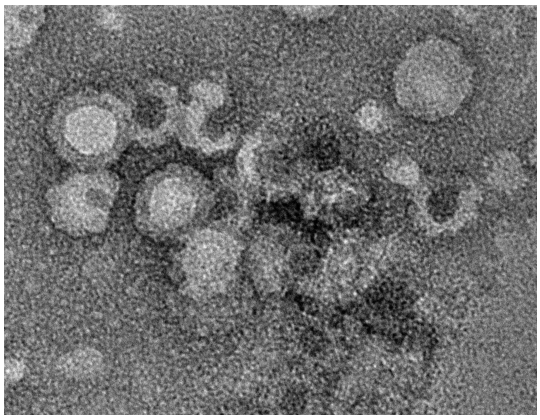

FIG. 55: Encapsulation de nanoparticule par NB2-VP1. Image en microscopie électronique de nanoparticules de polystyrène fonctionalisées par des groupements carboxylate (objets clairs) encapsulées dans des capsides de NB2-VP1 (couronne sombre). Des capsides vides sont également visibles. Les conditions finales étaient pH 5,5 et I =0,1 M.

moins au signal. Le point isoélectrique était légèrement au-dessus de pH 4,0 aux deux forces ioniques considérées. La mobilité devenait négative à mesure que le pH augmentait, jusqu'à -1.1×10^{-}4 cm^2/V/s à pH 6,0 pour I = 0,1 M et -2×10^{-}4 cm^2/V/s au même pH pour I = 10 mM. Ce comportement était attendu car une salinité plus élevée induit un écrantage du potentiel électrostatique plus fort et donc une réduction de la mobilité.

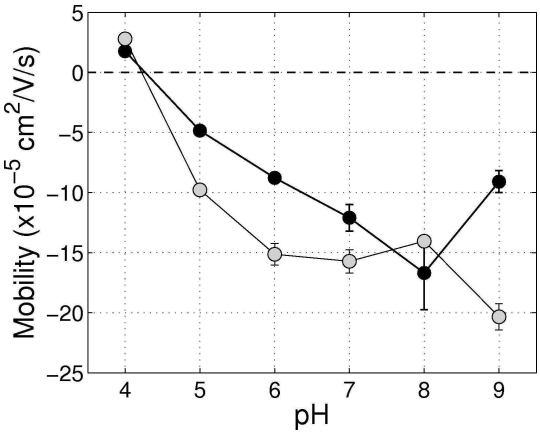

FIG. 56: Mobilité électrophorétique d'une solution de NB2-VP1 en fonction du pH pour I = 0.1 M (points noirs) et I = 10 mM (points gris). Les protéines étaient initialement dissociées puis dialysées dans les conditions de tampon spécifiées. Les données représentent les moyennes de trois expériences avec les barres d'erreurs associées.

4.1.6 *Analyse cinétique du réassemblage des VLPs* T = 3

Puisque le réassemblage part de dimères pour former des oligomères de 180 molécules, le processus peut être facilement suivi via

l'augmentation de l'intensité de lumière diffusée après mélange d'une solution de NB2-VP1 à pH 9,0 et I = 10 mM avec une seconde solution tampon amenant le pH à 6,0 et la force ionique à 0,1 M. Lorsque de telles expériences furent réalisées avec une concentration finale en NB2-VP1 de 1 mg/mL, il y avait une augmentation du signal d'un facteur 5 à 6 durant la première minute. Les cinétiques qui suivirent depuis 1 min jusqu'à 200 min étaient biphasiques que ce soit à 10 °C ou bien à 20 °C (Figure 57). La première phase détectée atteignait un plateau après environ 50 min. Une seconde phase prenait alors le relai pour saturer au bout d'environ 150 min pour l'expérience à 10 °C. Cependant, à 20 °C un signal plus élevé et une absence de plateau suggéraient que la totalité des protéines ne s'était pas auto-assemblée. Par ailleurs, l'intensité diffusée doublait sur une période s'étalant entre 1 min et 200 min (Figure 57), produisant un facteur multiplicatif global de 10 ou 12, soit bien moins que 90 ainsi qu'on l'attendrait d'une association complète de dimères en capsides T = 3. Néanmoins, les analyses en DLS des points initiaux et finaux à 10 °C étaient cohérentes avec un assemblage depuis des capsides complètement dissociées en VLP T = 3. Dans ce dernier cas, la large distribution et les petits diamètres confirmaient la présence d'espèces intermédiaires non assemblées.

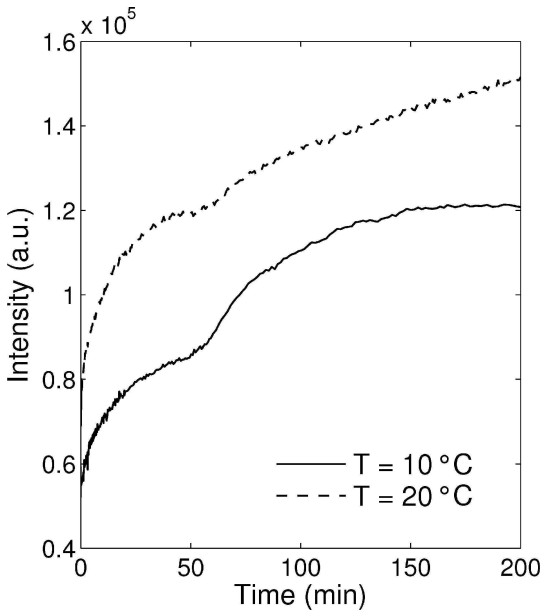

Fig. 57: Cinétique d'auto-assemblage de capsides. Intensité de la lumière diffusée pour des expériences à 10 °C (ligne continue) et à 20 °C (tirets). Les protéines étaient initialement à pH 9,0 et I = 10 mM. L'intensité diffusée par cette solution initiale après soustraction du tampon et dilution par un facteur 2, était de 0,11 en unité arbitraire. Un tampon était rapidement mélangé aux protéines dissociées de telle sorte que le pH chute à 6,0 et I monte à 0,1 M afin d'initier l'auto-assemblage.

4.1.7 *Chimère de NB2-VLP avec une Spicule d'un Calicivirus Apparenté*

Afin de confirmer que la VLP de 44 nm était bien un icosaèdre T = 3 et pour évaluer si nous pouvions identifier des facteurs moléculaires expliquant la faculté inhabituelle de NB2-VP1 à s'auto-assembler en objets plus gros, nous avons essayé de cristalliser les VLPs. Nous ne sommes hélas pas parvenus à obtenir des cristaux des VLPs natives. Nous avons alors construit une chimère en remplaçant le domaine P de NB2-VP1 par celui de NB1-VP1. Bien qu'étant aussi un calicivirus, NB1 n'est pas un Norovirus mais un Nébovirus, et NB1-VP1 a seulement 21% d'identité de séquence avec NB2-VP1 (32% dans le domaine S, 11% dans le domaine P) [289]. Néanmoins, nous avons pu produire et purifier une construction chimérique NB2_1-(S_P)-VP1 de la même façon que la protéine native NB2-VP1, et la DLS a confirmé que les objets purifiés étaient monodisperses (polydispersité de 15%) avec un unique pic au diamètre hydrodynamique de 44 nm. La cristallisation de cette VLP chimérique fut couronnée de succès mais nous ne sommes pas parvenus à une résolution en diffraction des rayons X meilleure que 15 Å. Néanmoins, les données étaient de qualité suffisante pour déterminer les paramètres de maille ainsi que le groupe d'espace, et pour calculer la fonction d'auto-rotation. Tout ceci nous a permis d'établir que NB2_1-VP1, et par extension NB2-VP1, s'auto-assemblait en authentique VLP icosaédrique T = 3.

4.1.8 *Discussion*

La famille des *Caliciviridae* comprend d'importants pathogènes à la fois chez l'homme et chez l'animal, et est l'une des quelques familles de virus de mammifères à ARN positif avec une capside icosaédrique T = 3 faite à partir d'une unique protéine structurale. Cette architecture est très fréquente parmi les virus de plantes à ARN positif. En effet, la première structure cristallographique à haute résolution d'un virus fut celle du virus du rabougrissement buissonneux de la tomate (TBSV) [294]. Trois caractéristiques marquantes de la capside du TBSV ont été largement retrouvées par la suite dans les virus non enveloppés à ARN positif :

TBSV = Tomato Bushy Stunt Virus

1. Les 180 copies de la protéine capsidique suivent les principes de quasi-équivalence brillamment établis par Caspar et Klug [301], de telle sorte qu'il existe trois différents mais pourtant très similaires (quasi-équivalents) environnements associés avec trois conformations très similaires (sous-unités A, B et C).
2. Les protéines présentent une architecture modulaire, avec un domaine qui constitue la coque protéique autour du génome viral et un domaine optionnel représentant les spicules à la surface du virion.
3. La présence d'un bras N terminal (et quelque fois C terminal) qui tapisse la surface interne de la capside et qui est impliqué dans les ajustements effectués à partir d'une symétrie stricte et qui donnent lieu à la quasi-équivalence.

Ces caractéristiques ont été trouvées depuis dans les structures cristallographiques des capsides de tous les virus T = 3 non enveloppés à ARN positif résolus à ce jour (voir base de données VIPER [302]). Cela inclut tous les virus de plantes des familles *Tombusviridae* (avec les structures de capsides de 5 espèces virales comprenant le TBSV), *Bromoviridae* (4 espèces comprenant de nombreuses formes du très étudié virus de la marbrure chlorotique de la cornille (CCMV)), *Sobemoviridae* (4 espèces), *Tymoviridae* (3 espèces), tous les virus d'insectes de la famille *Nodaviridae* (3 espèces) et tous les virus de mammifères de la famille *Caliciviridae* (3 espèces incluant la VLP du Norwalk).

CCMV = Cowpea Chlorotic Mottle Virus

La structure cristalline de NV-VLP présente de très nombreuses interfaces dimériques entre les domaines P et a conduit à penser que NV (et par extension tous les Norovirus) s'auto-assemblent par des intermédiaires faits d'oligomères de dimères [291]. En effet, toutes les études ont rapporté que la NV-VLP peut être dissociée en dimères stables de VP1 et que dans les conditions adéquates, NV-VP1 se réassocie en icosaèdres T = 3 [295, 296, 303]. Nous montrons ici que NB2-VLP peut aussi être désassemblée en dimères. De façon surprenante, NB2-VP1 peut être réassociée non seulement en icosaèdres T = 3 comme NV-VP1, mais aussi en objets beaucoup plus grands, apparemment fermés et de taille définie. Le rapport des diamètres entre l'objet le plus large et la VLP T = 3 (pour lesquels nous avons obtenu des mesures précises par la même technique) est de 1,73. Si on suppose que le nombre de sous-unités est proportionnel au carré du diamètre, supposition raisonnable au moins dans le cas des capsides de CCMV [304], ce résultat indique que les objets les plus grands pourraient être constitués de 3 fois plus de sous-unités que les VLPs T = 3. Comme T = 9 est un nombre de triangulation permis par le principe de symétrie quasi-équivalente [301], ceci indique la capacité de NB2-VP1 à sauter à de tels assemblages icosaédriques, même si les particules ne semblent pas des icosaèdres réguliers, du moins par coloration négative.

L'auto-assemblage d'une capside vide est supposé procéder par l'agrégation de sous-unités en un intermédiaire stable, suivi par l'adsorption séquentielle et l'assemblage de sous-unités individuelles [305]. L'état final de tels assemblages dépend de la stabilité du ou des intermédiaires à partir duquel ou desquels la capside peut nucléer. Cette vision s'est forgée grâce entre autres à des études expérimentales de formation de capsides vides de CCMV et de CCMV avec des mutations sur le bras N terminal [305, 306]. Dans le cas de NB2-VP1, nos données cinétiques indiquent que l'auto-assemblage spontané des particules T = 3 à partir de dimères dissociés implique plusieurs phases, dont au moins une se produit durant la première minute. Nous montrons aussi qu'un désassemblage incomplet ainsi qu'un réassemblage en mélange d'objets sphériques de différentes tailles sont observés dans certaines conditions, menant à une distribution discrète d'espèces dont quelques unes au moins sont cinétiquement piégées. Ce fait montre une remarquable versatilité dans les propriétés d'auto-assemblage de NB2-VP1.

De plus grands assemblages que T = 3 n'ont jamais été observés pour le type sauvage de NV-VP1 malgré un caractérisation complète des états finaux d'auto-assemblage [295, 296, 303]. Cependant, des mutants de NV-VP1 avec de plus grands diamètres ont été observés par microscopie électronique en coloration négative quand des régions du domaine P impliquées dans l'interfaçage dimérique étaient supprimées [307]. Ceci suggère que bien que les déterminants de l'assemblage sont principalement contenus dans le domaine S, le domaine P peut aussi moduler la taille de la capside et/ou peut être requis pour la stabilité de la capside. Néanmoins, nous montrons ici que la modularité de NB2-VP1 permet d'accomoder le domaine P d'un Calicivirus de parenté distante sans compromettre le fort taux de production d'icosaèdres régulier T = 3 cristallisables. Ce fait suggère une faible dépendance du domaine P dans l'auto-assemblage de NB2-VP1.

Finalement, une propriété désormais bien connue de quelques capsides icosaédriques issues de virus de plantes est de s'auto-assembler *in vitro* autour d'un objet chargé [308]. La première démonstration fut donnée par Bancroft et Hiebert [309] qui reconstituèrent *in vitro* un CCMV infectieux à partir de son acide nucléique et des protéines de la capside. Le CCMV ainsi que d'autres *Bromoviridae* T = 3 ont été largement étudiés pour leur capacité à encapsuler des acides nucléiques ou bien des matériaux abiotiques *in vitro* [310, 304]. Jusqu'à présent, aucun Calicivirus ou VLP de Calicivirus n'a révélé une telle capacité. Nous avons montré que NB2-VP1 était capable d'encapsuler des nanoparticules portant des charges négatives. Ainsi, la modularité de NB2-VP1 apparaît très prononcée, et elle peut être décrite comme consistant en un domaine d'auto-assemblage N terminal versatile et un domaine d'interaction cellulaire C terminal échangeable. Tout ceci, en plus des excellentes propriétés circulatoires dans le conduit gastro-intestinal et la forte infectivité des Norovirus, font de la protéine NB2-VP1 un vecteur prometteur pour le transfert de médicament et pour des applications d'imagerie médicale.

4.2 Cinétique d'auto-assemblage de protéines capsidiques de norovirus : modélisation globale et reconstruction des espèces

4.2.1 *Introduction*

L'auto-assemblage de VLPs demeure un processus mal connu et la nature des espèces intermédiaires est encore largement débattue. Pourtant, l'auto-assemblage de VLPs modifiées suscite un intérêt croissant pour la production de nanoparticules virales biofonctionnalisées [311, 312, 313] et sa compréhension permettrait d'élucider la réplication *in vivo* des virus. Les NV-VLPs, ainsi que de nombreuses autres VLPs obtenues à partir de virus tels que le CCMV, sont supposées s'auto-assembler à partir de dimères en capsides T = 3 via des pentamères de dimères [291, 314, 305] qui, avec des hexamères de dimères, constituent les faces d'un icosaèdre. Néanmoins, les VLPs de l'hépa-

tite B par exemple semblent plutôt procéder à travers des trimères de dimères pour produire soit des capsides T = 3 ou 4 [315]. Une étude inspirée de la théorie des graphes et appliquée à l'assemblage d'un icosaèdre modèle fait de 30 sous-unités dimériques, suggérait un nombre limité d'intermédiaires stables alors que le nombre total d'intermédiaires possibles croît combinatoirement avec le nombre de sous-unités [316].

Le chemin cinétique d'auto-assemblage de VLPs consiste souvent en une étape de nucléation dans laquelle les intermédiaires s'accumulent dans la solution, suivie d'une étape d'élongation conduisant à la polymérisation des capsides par additions successives de sous-unités [317, 318, 319]. Les cinétiques sont le plus souvent suivies à travers l'augmentation de la masse moléculaire des objets, soit par diffusion statique de la lumière à angle fixe, soit par des mesures de turbidité résolues en temps [314, 315, 320, 321]. Ces techniques fournissent uniquement des traces temporelles à partir desquelles les temps caractéristiques sont déduits, mais aucune information structurale n'est disponible. Au contraire, la diffusion des rayons X et des neutrons aux petits angles (DXPA et DNPA), grâce aux progrès considérables réalisés sur les détecteurs, l'électronique et les dispositifs de mélange, permet désormais de déterminer la forme et l'organisation de particules sur des échelles spatiales s'étendant de quelques angströms à quelques centaines de nanomètres, et avec des résolutions temporelles inférieures à 100 ms [322]. De récentes études ont été réalisées par diffusion aux petits angles résolue en temps sur le repliement des protéines [323] et de l'ARN [324], la formation d'amyloïdes [325], l'assemblage de procapsides de bactériophage P22 [326], la croissance de nanoparticules d'or [327], la formation de micelles polymères [328], ou encore les transitions de phase de microémulsions [329] pour ne citer que quelques exemples. L'analyse des données est rendue difficile par la coexistence d'espèces multiples au cours de la cinétique. Une méthode de démultiplexage populaire en spectroscopie est la décomposition en valeurs singulières (SVD) qui factorise un ensemble de données spatio-temporelles en spectres de base et en vecteurs d'amplitude triés par ordre décroissant des valeurs singulières [330, 331]. Si la SVD permet une réduction des données efficace, les spectres de base n'ont aucune signification physique et un traitement suplémentaire est requis pour comprendre les mécanismes sous-jacents.

SVD = Singular Value Decomposition

Nous présentons ci-après une étude cinétique sur l'auto-assemblage de protéines NB2-VP1 en capsides T = 3 par diffusion des rayons X aux petits angles résolue en temps (DXPA-RT). Afin d'identifier convenablement les espèces intermédiaires, nous avons procédé à une modélisation globale en plus de l'analyse par SVD. Plusieurs chemins cinétiques ont été évalués à travers leur écart global aux données expérimentale. Une telle modélisation globale sur des données DXPA-RT n'avait pas encore été effectuée avec des VLPs en cours d'assemblage, et nous pensons que cette approche constitue un puissant outil pour explorer les mécanismes de réplication virale et l'auto-assemblage de nanoparticules pseudo-virales.

4.2.2 *NB2-VP1 se Présente Initialement sous Forme de Dimères*

La Figure 58 montre le spectre DXPA des sous-unités avant leur assemblage. Ces sous-unités avaient un rayon de giration R_g de 42 Å et une dimension maximale D_{max} de 150 Å d'après la distribution de paires calculée par le programme GNOM [332]. La masse molaire des sous-unités calculée à partir de $I(q = 0)$ sur la reconstruction GNOM était de 113,9 kDa, ce qui correspond à des dimères étant donné que NB2-VP1 a une masse molaire de 57 kDa. Dans toute la suite, les sous-unités seront désignées comme dimères. Une structure moléculaire à basse résolution obtenue par le programme GASBOR [333] est proposée sur la Figure 58. Cette structure montre le domaine dimérisé formant les spicules de la capside et pointant ici vers le haut.

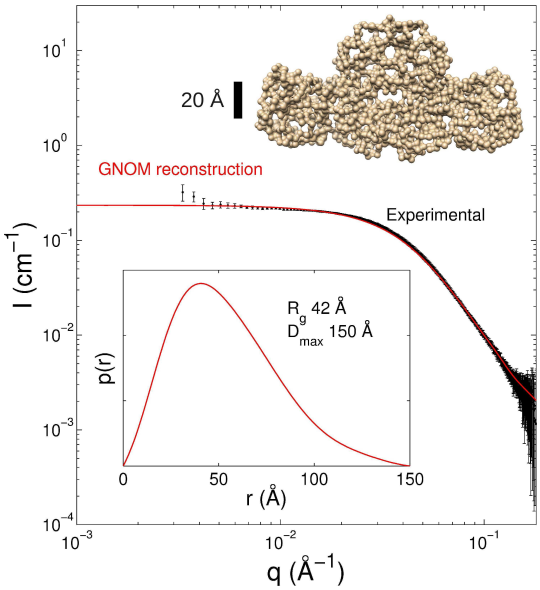

FIG. 58: Spectre DXPA de dimères de NB2-VP1 dans un tampon de dissociation. Une reconstruction effectuée avec le programme GNOM (courbe rouge) est comparée aux données expérimentale (symboles noirs). La concentration des dimères était de 28 µM. L'encart montre la distribution de paires $p(r)$ calculée par GNOM avec le rayon de giration R_g et la dimension maximale D_{max} résultants. La structure moléculaire basse résolution résulte d'une reconstruction avec le programme GASBOR contrainte par les données obtenues avec GNOM.

4.2.3 *Le Processus Comporte un Nombre Réduit d'Espèces en Solution*

Partant d'un état dissocié, les dimères de NB2-VP1 s'assemblaient en VLPs par acidification du pH et augmentation de la force ionique. En utilisant un dispositif "stopped-flow", nous avons mélangé rapidement les dimères dans le tampon de dissociation avec un tampon d'assemblage amenant le pH final à ~6 et la force ionique à 55 mM. Nous avons ensuite suivi le processus d'auto-assemblage par DXPA-RT depuis ~4 ms correspondant au temps de mélange plus le délai d'injection dans

le capillaire de mesure, jusqu'à plus de 3 heures, lorsque les spectres ne montraient plus qu'une évolution marginale. La Figure 59A révèle un facteur 35 dans l'augmentation de l'intensité transmise mettant en évidence la formation de gros objets. Les données étaient collectées en deux expériences séparées sur deux échelles de temps différentes afin d'éviter la dégradation des échantillons due à des expositions répétées. Les temps courts s'échelonnaient de quelques millisecondes à plusieurs dizaines de secondes (en noir sur la Figure 59A) et les temps longs couvraient la minute jusqu'à plusieurs heures (en rouge). La totalité de la cinétique a été répétée deux fois et les spectres étaient bien reproduits. De façon remarquable, les spectres superposés en début et en fin de cinétique présentaient des points isobestiques (voir flèches sur les Figures 59B et 59C respectivement) : la présence de ces points suggèrent que sur chacune des échelles de temps, seules deux espèces échangeaient de la matière. Par conséquent, parmi les nombreuses espèces intermédiaires possibles, seul un très petit nombre avait un temps de vie suffisamment long pour contribuer significativement aux intensités diffusées. Ce résultat est en bon accord avec ceux obtenus par la théorie des graphes [316].

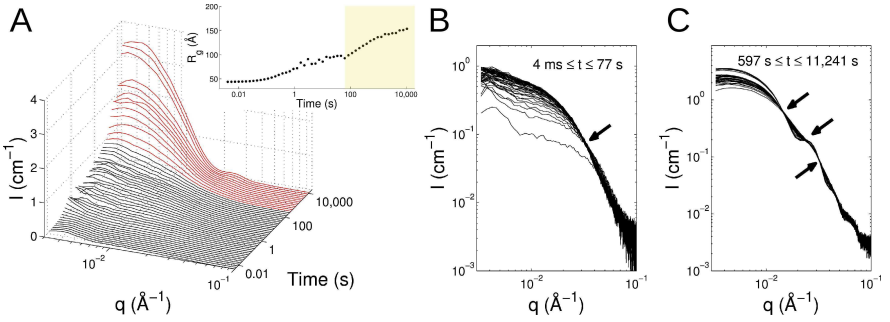

Fig. 59: Spectres DXPA-RT de dimères NB2-VP1 en cours d'auto-assemblage. (A) Les spectres en noir ont été obtenus sur une échelle de temps courte, alors que ceux en rouge provenaient d'une échelle de temps longue. Les spectres ont été réechantillonnés par interpolation linéaire sur une échelle logarithmique. L'encart présente l'évolution du rayon de giration en fonction du temps d'après l'approximation de Guinier. (B) et (C) sont les spectres collectés sur les échelles de temps courte et longue respectivement. Il faut noter que les intensités sont tracées en échelle logarithmique pour une meilleure clarté aux valeurs de q élevées. Les flèches désignent les points isobestiques. La concentration des dimères était de 12 µM.

En supposant que les espèces ne présentaient pas d'interactions à longue portée et parce qu'elles étaient faites des mêmes dimères, l'intensité diffusée peut s'exprimer comme

$$I(t,q) = K(\bar{\nu}, \Delta b) \sum_i M_i^2 P_i(q) c_i(t) \tag{4.1}$$

où $K(\bar{\nu}, \Delta b)$ est une constante dépendant des propriétés du dimère, c'est à dire son volume spécifique $\bar{\nu}$ et sa densité de longueur de diffusion Δb, et M_i, $P_i(q)$ et $c_i(t)$ sont la masse moléculaire, le facteur

de forme et la concentration molaire de l'espèce i. t et q désignent le temps et le nombre d'onde respectivement, et prennent des valeurs discrètes en pratique. Sous forme matricielle, l'Equation 4.1 devient $\mathbf{I} = K\mathbf{P}'\mathbf{c}$ où les M_i ont été intégrés dans les $\mathbf{P}'$. L'objectif était alors de déterminer $\mathbf{P}'$ contenant les facteurs de forme des espèces, en imposant un modèle cinétique gouvernant $\mathbf{c}$ afin d'affiner autant que possible les données expérimentales $\mathbf{I}$. La modélisation globale est une technique utilisée pour analyser les données spectroscopiques et s'est révélée très efficace aussi bien pour extraire les spectres d'espèces intermédiaires que pour estimer les taux de réaction régissant les réactions biochimiques [330]. Cependant, cette technique a été insuffisamment employée avec des données DXPA-RT jusqu'à présent. Pour estimer le nombre d'espèces contribuant au signal et pour réduire le niveau de bruit, nous avons effectué une SVD sur l'ensemble des données de la cinétique. Comme le suggérait la présence de points isobestiques, nous avons établi que la matrice des intensités $\mathbf{I}$ pouvait être approximée par une matrice de rang 3, c'est à dire $\mathbf{I} \approx \tilde{\mathbf{I}} = \tilde{\mathbf{U}}\tilde{\Sigma}\tilde{\mathbf{V}}^{\mathbf{T}}$ où $\tilde{\mathbf{U}}$ et $\tilde{\mathbf{V}}$ sont les matrices tronquées des vecteurs propres de la SVD, et $\tilde{\Sigma}$ une matrice diagonale 3×3 contenant les valeurs singulières. En d'autres termes, trois espèces seulement contribuaient à l'intensité diffusée au cours de la cinétique.

4.2.4 *Modélisation Globale de la Cinétique*

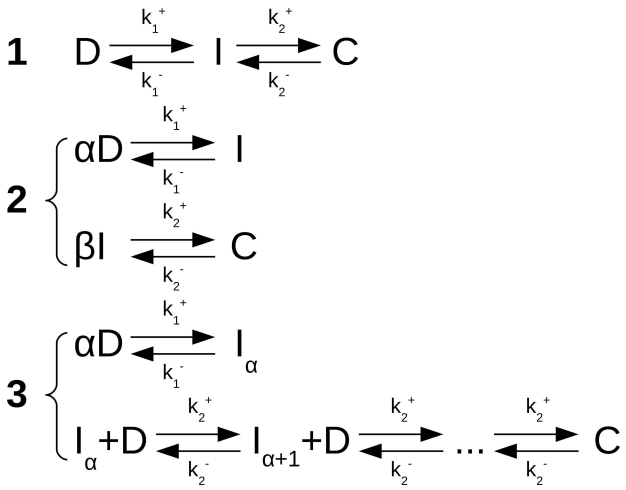

Fig. 60: Modèles cinétiques testés lors de la modélisation globale. D, I, et C représentent les dimères, les intermédiaires, et les capsides respectivement, tandis que k^+ et k^- sont les taux de réactions. I_α est un intermédiaire fait de α dimères. α et β sont les nombres stœchiométriques.

Nous avons retenu trois modèles cinétiques possibles pour traiter les données (voir Figure 60). Le modèles **1** est un modèle du premier ordre à trois états. Il s'agit du modèle le plus simple impliquant trois espèces, la masse totale étant conservée. Le modèle **2** est un modèle d'ordre élevé à trois états qui prend en compte la stœchiométrie

Tab. 2: Facteurs de mérite et rapports de masse et de volume pour quelques modèles cinétiques

Modèle	Espèces fixées	α	β	χ^2	R (%)	ρ_M	ρ_V
1	D	-	-	6,1	18	11	11,9
1	D, C	-	-	5,5	18	10,8	11,8
2	D, C	5	18	3,5	13	9,61	8,65
2	D, C	6	15	3,7	12	10	9,59
2	D, C	9	10	1,5	9	11,4	10,4
2	D	10	9	1,1	7,4	12,2	11,2
2	D, C	10	9	1,5	9	11,8	10,8
2	D, C	15	6	8,5	20	9,08	8,33
3	D, C	5	-	11	29	9870	41
3	D, C	10	-	6,2	22	22,3	28,5
3	D, C	15	-	5,9	21	25,7	30,8

des espèces (conservation molaire). Le dernier modèle est un modèle d'assemblage en ligne [318] avec une étape de nucléation d'ordre élevé. La modélisation globale était appliquée sur la matrice approximée $\tilde{\mathbf{I}}$, et nous avons défini deux facteurs de mérite comme suit [334] :

$$\chi^2 \equiv \frac{1}{MN-1} \sum_{m,n=1}^{M,N} \left(\frac{I_{mn} - I_{mn}^{fit}}{\sigma_{mn}} \right)^2 \quad \text{et} \quad R \equiv \frac{\sum_{m,n=1}^{M,N} \left| I_{mn} - I_{mn}^{fit} \right|}{\sum_{m,n=1}^{M,N} |I_{mn}|} \tag{4.2}$$

où M et N sont les nombres de lignes (valeurs de q) et de colonnes (valeurs de t) de $\mathbf{I}$, σ les incertitudes expérimentales, et $\mathbf{I}^{\mathbf{fit}}$ la matrice des intensités modélisées. Pour chaque modèle de la Figure 60, nous avons considéré trois espèces : les dimères D, les intermédiaires I et I_α - α étant inconnu -, et les capsides assemblées C. Parce que nous savions *a priori* que les capsides étaient faites de 90 dimères (VLPs $T = 3$), nous avons imposé $\alpha\beta = 90$ dans le modèle **2**, et l'étape d'élongation du modèle **3** contenait $90 - \alpha$ réactions.

Puisqu'à l'état initial $t = 0$, seuls des dimères étaient présents en solution, nous avons forcé le facteur de forme de D comme étant le premier spectre normalisé acquis ~4 ms après mélange. Dans plusieurs essais, le facteur de forme des capsides était fixé également : il a été extrait des données aux temps longs et le bruit a été filtré à travers une reconstruction par le programme GNOM.

La Table 2 liste quelques résultats obtenus avec les modèles cinétiques en considération. Seuls les taux de réactions et les facteurs de forme des espèces non fixées étaient variés par l'algorithme. Clairement, un modèle cinétique du premier ordre (modèle **1**) n'était pas suffisant pour reproduire les données ($\chi^2 > 5$). De même, le modèle

d'assemblage en ligne avec nucléation (modèle **3**) de donnait pas de résultats satisfaisant en dépit des différents nombres stœchiométriques α essayés. Les meilleurs facteurs de mérite ont été obtenus pour le modèle **2** avec α autour de 10. Afin de vérifier la fiabilité des modèles, nous avons calculé les rapports de masse ρ_M et de volume ρ_V entre intermédiaire et dimère. Un modèle cohérent doit vérifier $\alpha \sim \rho_M \sim \rho_V$, excepté pour le modèle **1** où $\rho_M \sim \rho_V$ suffit. Le rapport de masse était directement calculé comme $\sqrt{P'_I/P'_D}$ - ou bien P'_I/P'_D pour le modèle **1** qui conserve la masse - à $q \to 0$, et le rapport de volume était déduit à partir de l'invariant de Porod :

$$\rho_V \equiv \frac{\int_0^\infty q^2 P_D(q) dq}{\int_0^\infty q^2 P_I(q) dq} \tag{4.3}$$

En accord avec les facteurs de mérite χ^2 et R donnés dans la Table 2, les résultats les plus cohérents ($\alpha \sim \rho_M \sim \rho_V$) étaient de nouveau obtenus avec le modèle **2** pour α autour de 10. Il peut sembler surprenant que les intermédiaires soient faits de 9 ou 10 dimères étant donné que la structure cristalline de NV-VLPs suggère plutôt un mécanisme d'assemblage qui met en œuvre un noyau de pentamères de dimères [291]. Des analyses complémentaires sur les temps courts durant lesquels des intermédiaires s'accumulaient dans la solution ont écarté les possibilités d'avoir des pentamères ou des hexamères de dimères comme espèce intermédiaire. De récentes analyses effectuées par spectroscopie de masse native sur des NV-VLPs à l'équilibre ont révélé une collection d'oligomères selon le pH [296, 335]. En particulier, des 18-mères ont été trouvés pour des conditions expérimentales dans lesquelles des VLPs étaient formées [335]. Ce fait accompagné de nos analyses soutiennent le rôle clé joué par des 18- ou des 20-mères dans l'auto-assemblage de VLPs de Norovirus.

La Figure 61A fournit le facteur de forme des intermédiaires obtenus par la modélisation globale. Etant donné un rayon de giration de 104 Å et une dimension maximale de 350 Å calculés par GNOM, l'espèce intermédiaire était un objet quelque peu massif et allongé. Sur la Figure 61B, nous pouvons voir une comparaison entre les données expérimentales et les spectres reconstruits à partir du meilleur modèle cinétique : l'accord était excellent sur 6 décades temporelles.

4.2.5 *Reconstruction ab initio de l'Espèce Intermédiaire*

Nous avons effectué une reconstruction *ab initio* avec un modèle compact de billes [336] qui affinait autant que possible le spectre de diffusion des intermédiaires. La Figure 62 montre l'enveloppe à basse résolution issue de la reconstruction comparée au modèle cristallographique d'une NV-VLP. Ce modèle comprenait 11 dimères et était fait de deux pentamères de dimères connectés par un dimère interstitiel. Nous pouvons voir que ce modèle s'inscrivait raisonnablement bien dans l'enveloppe calculée. Il faut mentionner ici que NV-VP1 a un

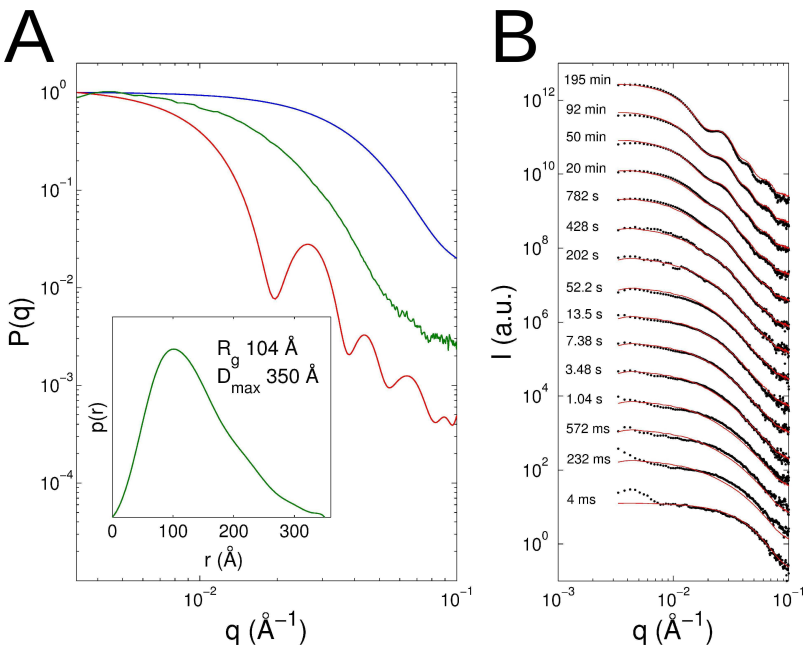

FIG. 61: Modélisation globale avec le modèle cinétique **2**, $\alpha = 10$, $\beta = 9$, les espèces D et C étant fixées. (A) Facteurs de forme des trois espèces : les dimères D en bleu, les intermédiaires I en vert, et les capsides C en rouge. L'encart montre la distribution des paires $p(r)$ des intermédiaires calculée avec GNOM ainsi que les R_g et D_{max} associés. (B) Comparaison entre les intensités expérimentales diffusées (points noirs) et les intensités reconstruites à partir de la modélisation globale (ligne rouge) à différents temps.

volume plus petit que celui de NB2-VP1 de sorte que le modèle cristallographique basé sur NV a aussi un volume plus petit que l'enveloppe fondée sur NB2. De plus, le modèle cristallographique était extrait d'une coque sphérique et était de ce fait courbée, tandis que que les intermédiaires libres en solution n'avaient pas de raison de présenter une si forte courbure et étaient donc relativement plats.

4.2.6 *Evaluation Prédictive du Modèle Cinétique*

Finalement, nous avons vérifié que le modèle cinétique était suffisamment robuste pour prédire une cinétique effectuée avec une concentration différente de dimères. Alors que le modèle était établi sur des données collectées à une concentration en dimère de 12 µM, nous avons comparé la prédiction du même modèle avec des données collectées à une concentration en dimère de 19,2 µM (Figure 63). Comme attendu, la cinétique était bien plus rapide et la présence de VLPs était claire dès 122 s. Ensuite, le système évoluait à peine jusqu'à ce que l'équilibre fusse atteint quelques heures plus tard. Notre modèle cinétique prédisait correctement l'apparition précoce des VLPs et suivait la lente évolution des intensités. Cependant, il tendait à surestimer la quantité de capsides à l'équilibre, comme le révèlaient les oscillations prononcées sur les derniers spectres reconstruits.

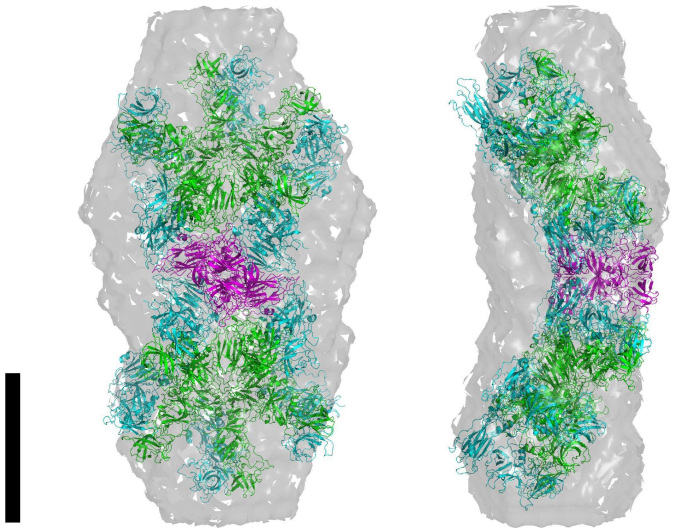

FIG. 62: Enveloppe tridimensionnelle reconstruite de l'espèce intermédiaire (gris). Le modèle cristallographique superposé était une portion de la structure cristalline d'une NV-VLP (référence PDB 1IHM). Le modèle consistait en deux pentamères de dimères A-B (vert et cyan) connectés par un dimère C-C (magenta). La barre d'échelle vaut 100 Å.

4.2.7 *Conclusion*

La modélisation globale et les reconstruction *ab initio* nous ont permis d'élaborer un modèle cinétique fiable pour l'auto-assemblage des protéines de la capside d'un Norovirus : les intermédiaires étaient formés rapidement avec 10 ou plus probablement 11 dimères arrangés en deux pentamères de dimères connectés par un unique dimère interstitiel. Après accumulation, les intermédiaires s'auto-assemblaient lentement pour produire des VLPs $T = 3$, c'est à dire, des coques sphériques comprenant 90 dimères. La prochaine étape sera d'obtenir la structure cristallographique de NB2-VP1 par diffraction des rayons X. Nous serons alors capables de résoudre la structure des intermédiaires à des résolutions subnanométriques. Ce genre d'étude peut être aisément transposé à d'autres systèmes viraux et pourra éventuellement élucider les mécanismes d'auto-assemblage de divers matériaux nanostructurés.

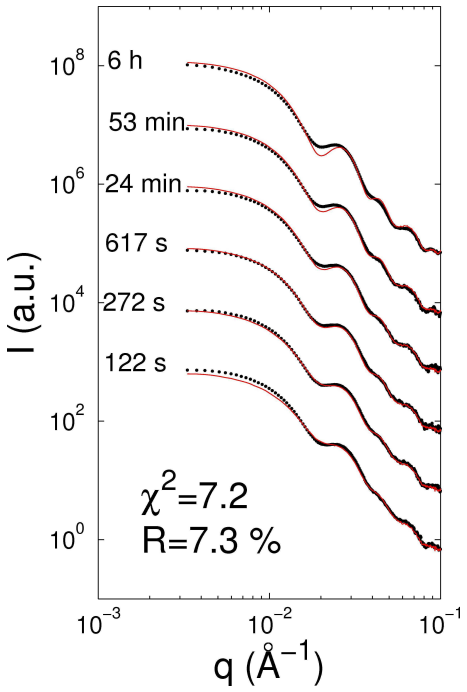

FIG. 63: Comparaison entre les intensités diffusées expérimentales (points noirs) et les spectres reconstruits à partir du modèle cinétique **2**, $\alpha = 10$, $\beta = 9$ (ligne rouge). Aucune procédure de modélisation n'était appliquée dans ce cas, les taux de réactions et les facteurs de forme étaient ceux déterminés par la modélisation globale pour une concentration en dimère de 12 µM. Les données expérimentales étaient collectées sur les temps longs à 20 °C pour une concentration en dimère de 19,2 µM.

PERSPECTIVES : VERS L'AUTO-ASSEMBLAGE CONTRÔLÉ DE SYSTÈMES VIRO-INSPIRÉS

Si beaucoup de problématiques parmi les aspects structurels de la matière complexe à l'équilibre - ou proche de l'équilibre - ont pu être élucidées grâce aux récents développements expérimentaux et conceptuels, les questions liées à la dynamique et à l'état hors équilibre demeurent encore largement non résolues. L'auto-assemblage de systèmes complexes se présente généralement comme un processus irréversible, l'état final dépend du trajet suivi et donc des états intermédiaires du système. Des études théoriques sur l'auto-assemblage de capsides virales et sur la cristallisation bidimensionnelle de disques adhésifs [337] montrent l'existence d'un régime optimal dans lequel le degré d'organisation du système est maximisé. A forte énergie d'interaction entre les composants, de nombreux états désordonnés et métastables coexistent ; le système peut alors être cinétiquement piégé dans un état faiblement ordonné. Dans le régime des faibles énergies d'interaction, l'auto-assemblage est simplement inefficace.

Il est remarquable de constater que les virus s'assemblent *in vivo* dans un milieu intracellulaire parfois encombré (jusqu'à 30% en fraction volumique dans le cytoplasme) avec un taux d'erreurs faible en dépit des nombreuses interactions non spécifiques possibles avec les constituants cellulaires. Certains virus comme le virus de la marbrure chlorotique de la cornille (CCMV) qui infecte une variété de haricot, partagent leur génome entre plusieurs populations de particules distinctes : pour le CCMV, deux populations possèdent un ARN de 3200 et 2800 nucléotides respectivement tandis que la troisième population contient deux ARNs de 2100 et 900 nucléotides [338]. Le virus grippal Influenza A quant à lui encapsulent 8 segments distincts d'ARN comprenant entre 890 et 2341 nucléotides au sein de la même particule [339]. Les mécanismes par lesquels les protéines virales capturent sélectivement les segments d'acides nucléiques génomiques demeurent encore inconnus à ce jour. Processus gouverné par l'énergie potentielle [340], ou bien assisté par des enzymes spécifiques et des cascades de reconnaissances moléculaires, la question reste ouverte et la réponse dépend du modèle viral considéré. Pourtant, la connaissance de ces mécanismes serait aussi bien profitable à la médecine en vue d'enrayer la réplication des virus, qu'aux nanobiotechnologies en utilisant les capsides virales comme vecteurs pour le transfert de gènes et de médicaments.

CCMV = Cowpea Chlorotic Mottle Virus

Les futures recherches porteront sur l'auto-assemblage de systèmes viro-inspirés. Trois thématiques sont à ce jour envisagées :

1. Cinétique à haute résolution spatio-temporelle.
2. Encapsulation à l'échelle du nano-objet individuel.
3. Auto-assemblage dirigé par microfluidique.

La première thématique est en continuité avec le projet évoqué au Chapitre 4. Il s'agira d'étudier l'encapsulation de polyélectrolytes ou de nanoparticules dans des capsides de CCMV ou de NB2 par diffusion des rayons X aux petits angles. Le CCMV est un petit virus à ARN non enveloppé d'approximativement 28 nm de diamètre. Sous l'effet d'un pH acide, les protéines de la capside spontanément forment des coques sur des échelles de temps variant de quelques minutes jusqu'à plusieurs heures selon la concentration en protéine et la température. En présence d'un polyélectrolyte négativement chargé, un changement de pH n'est plus nécessaire, et les capsides contenant les polyélectrolytes s'assemblent sur une échelle de temps plus courte. La Figure 64 montre une série de spectres en DXPA-RT obtenue en mélangeant des protéines de CCMV avec du PSS. De façon remarquable, les protéines semblent se lier au PSS au cours des premières minutes ; durant les 30 minutes suivantes, les agrégats relaxent lentement en objets sphériques comme l'atteste la présence d'oscillations sur le spectre final.

PSS = Poly(Styrène acide Sulfonique)

Il est étonnant que les protéines puissent être capables d'encapsuler un polyélectrolyte synthétique alors que la Nature ne les a pas pourvu pour une telle tâche. On peut alors se demander si l'ARN génomique est internalisé plus efficacement et s'il suit le même chemin cinétique. Etant donné que l'ARN présente une topologie compacte du fait de l'appariement des bases, on s'attend à ce que la relaxation des complexes protéine-ARN en objets sphériques soit plus rapide. Une autre question concerne l'influence de l'encombrement du milieu environnant. En ajoutant du PEG, on sera en mesure varier la pression osmotique, la viscosité apparente, et les forces de déplétion. Il y a fort à parier que dans ce cas, la formation des complexes intermédiaires

PEG = Poly(Ethylène Glycol)

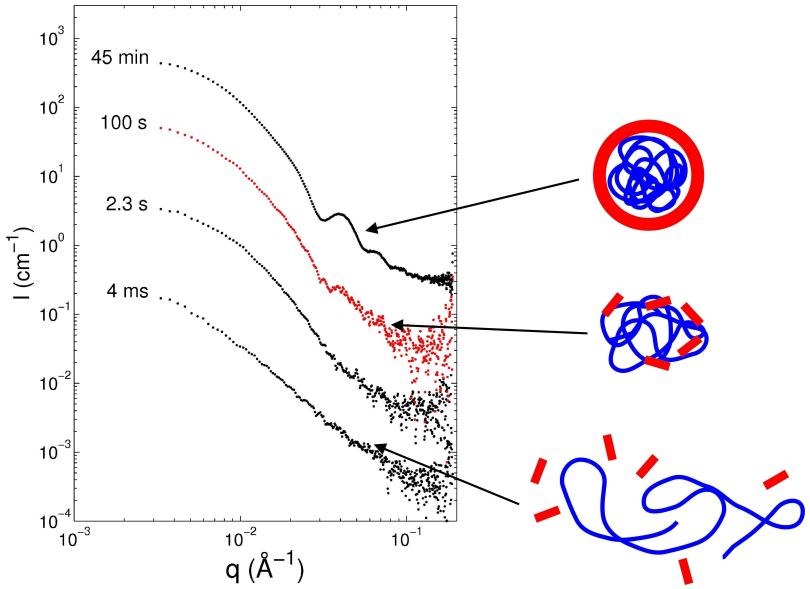

Fig. 64: Spectres DXPA-RT d'encapsulation de PSS de 1,6 MDa à l'intérieur de capsides de CCMV. Le schéma sur la droite illustre le processus avec le polyélectrolyte symbolisé par une chaîne en bleue et les protéines en rouge.

protéine-ARN soit bien plus lente du fait de la diffusion ralentie des molécules. En revanche, la relaxation en objets sphériques devrait être facilitée par la pression osmotique.

Une pléthore d'expériences de cinétique est envisageable et de nombreuses possibilités sont offertes grâce à l'extraordinaire diversité et sophistication des virus. On peut imaginer d'étudier l'encapsulation de polyélectrolytes ramifiés, et de nanoparticules sphériques ou allongées, l'auto-assemblage de virus tubulaires ou multi-coques, ou bien même... le désassemblage de tous ces systèmes.

La seconde thématique est complémentaire de la précédente, car si cette dernière traite d'une très large population statistique d'objets, la présente se veut orientée vers l'échelle de la particule unique. Il s'agira de s'inspirer des études en molécule unique effectuées sur la compaction de l'ADN par un agent d'encombrement [341]. Les particules à isoler seront confinées dans un canal nanofluidique d'environ 300 nm de large sur 300 nm de haut moulé dans du PDMS. Le moule sera réalisé dans de la résine photosensible structurée par un faisceau d'ions focalisés. Du fait de ce confinement extrême, il sera possible d'isoler des chaînes d'acides nucléiques aussi efficacement que par la méthode des microchambres femtolitriques décrites au Chapitre 2. Les chaînes d'ARN seront marquées en complémentant des bribes de la séquence génomique avec des sondes fluorescentes. Une chaîne d'ARN sera ensuite étirée dans le canal par un champ électrique alternatif (Figure 65). Il a été démontré que le CCMV pouvait encapsuler en une seule particule de l'ARN comprenant 6400 nucléotides, soit une longueur de contour d'environ 2,2 µm [342]. Cela devient délicat à observer surtout pour suivre les variations de longueur avec une bonne précision, mais on reste encore largement au-dessus de la limite

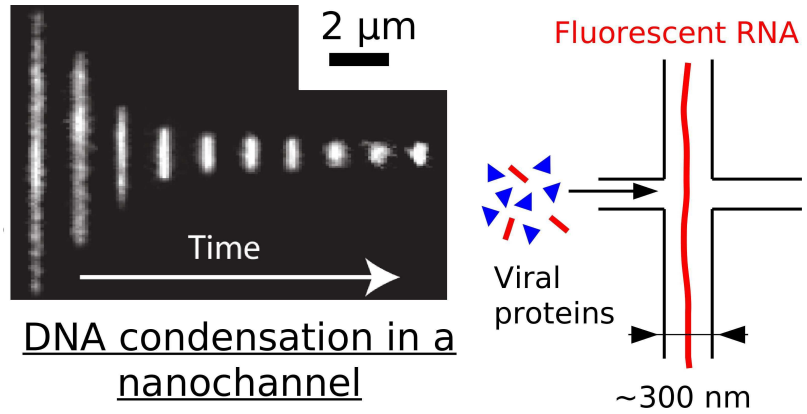

Fig. 65: Principe décrivant le suivi de la compaction d'une chaîne d'acides nucléiques par des protéines virales à l'échelle de la particule unique. A gauche, compaction d'ADN fluorescent dans un canal nanofluidique en présence d'un agent d'encombrement. L'image est tirée de [341]. A droite, schéma de principe pour les futures expérimentations : l'ARN ou ADN simple brin marqué par fluorescence sera confiné dans un canal nanofluidique d'environ 300 nm de large. Perpendiculairement, des protéines virales seront injectées et la compaction de la chaîne sera suivie en temps réel.

de diffraction. Les protéines virales seront injectées dans des canaux nanofluidiques perpendiculaires, et la compaction de l'ARN au fur et à mesure de son encapsulation sera observée avec une résolution temporelle de quelques millisecondes. Un avantage de cette méthode, outre le fait qu'elle s'applique à l'échelle de la particule unique, est qu'elle permet de découpler la compaction de l'ARN de la formation de la capside. Les spectres en DXPA contiennent les contributions des deux entités, qu'il est ensuite nécessaire de séparer à travers une modélisation *ad hoc*. Ici, seule l'information émanant de l'ARN sera obtenue ce qui permettra de corroborer ou d'affiner les modèles de compaction.

FRET = Förster Resonance Energy Transfer

Un autre type d'expérimentation s'ouvre également à travers cette méthodologie en particule unique via le FRET. Il s'agit d'une technique de fluorescence qui permet de quantifier l'association de molécules ou d'entités. La première entité est marquée avec une sonde fluorescente dont la longueur d'onde d'émission coïncide avec la longueur d'onde d'excitation d'une autre sonde greffée sur la seconde entitée. En excitant la première sonde, l'emission produite par la seconde atteste quantitativement de l'association entre les deux entités. Les protéines virales pourront être marquées après ingénierie génétique. Une séquence peptidiques comprenant quatre cystéines sera incorporée dans le bras N terminal de la protéine. Une sonde fluorescente capable de reconnaître très spécifiquement cette séquence se greffera alors à l'endroit de la séquence, en contact étroit avec une entité à encapsuler dans la capside et préalablement marquée. Cette entité pourra être de l'ARN comme précédemment, mais aussi un polyélectrolyte synthétique ou une nanoparticule. L'inconvénient majeur est que la présence de la sonde sera susceptible d'altérer les propriétés d'auto-assemblage voire de les inhiber. L'insertion de la séquence peptidique résultera donc d'un compromis entre le contact avec l'entité à encapsuler et l'éloignement des sous-unités en charge de l'assemblage sphérique.

La troisième et dernière thématique a pour but de développer le concept d'auto-assemblage dirigé par microfluidique. Dans l'auto-assemblage usuel, les sous-unités, ou encore les réactifs, sont amenés en contact par mélange macroscopique, avec des hétérogénéités de concentrations considérables. Les particules finales résultent d'un chemin cinétique tortueux qui aboutit à une faible reproductibilité. A titre d'exemple, les molécules amphiphiles telles que les copolymères blocs et les lipides peuvent s'auto-assembler en nanoparticules lorsqu'elles subissent un changement dans la qualité du solvant. Une façon souple et commune d'accomplir un changement dans la qualité du solvant est en mélangeant le solvant avec de l'anti-solvant, le temps de mélange influençant directement la taille finale et la distribution des nanoparticules formées [343]. Si le temps de mélange τ_{mix} est plus long que le temps caractéristique requis par les chaînes pour nucléer et croître ($\tau_{agg} \sim$ 10-100 ms selon la masse moléculaire de la chaîne), les nanoparticules commencent à s'assembler sous des degrés variés de qualité du solvant. Cet environnement hétérogène empêche la stabilisation efficace des nanoparticules par la portion hydrophile de la molécule amphiphile et facilite l'agrégation, condui-

sant à la formation de nanoparticules polydisperses. Cependant, si $\tau_{mix} < \tau_{agg}$, l'auto-assemblage se produit quand le changement de solvant est achevé. Cet environnement homogène pour l'assemblage des nanoparticules permet à la portion hydrophile de la molécule de stabiliser les nanoparticules plus efficacement, et donne naissance à des nanoparticules plus petites et de taille uniforme. Si les mélanges conventionnels s'effectuent en quelques secondes, avec des systèmes microfluidiques le temps de mélange est contrôlable jusqu'à l'échelle de la microseconde [344].

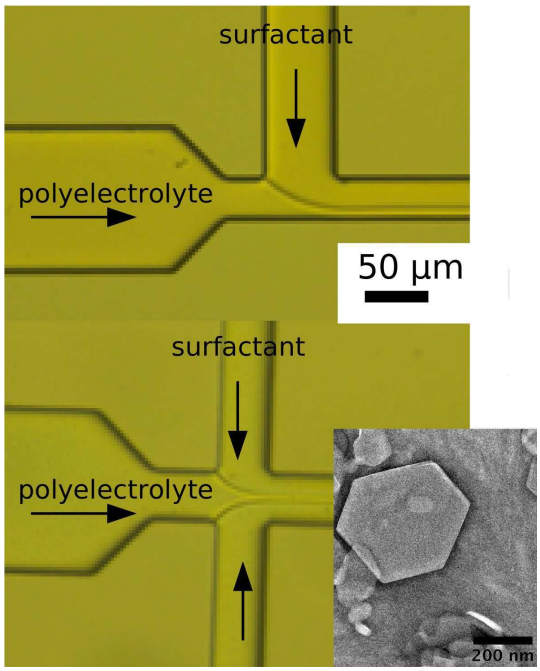

FIG. 66: Dispositifs microfluidiques pour l'auto-assemblage dirigé de nanoparticules tensioactif-polyélectrolyte. En haut, illustration d'une configuration en focalisation latérale. En bas, configuration en focalisation centrale. L'encart montre une image en microscopie électronique d'une nanoparticule formée par une configuration en focalisation centrale.

La complexation entre des entités portant des charges opposées est fortement contrôlée par la cinétique de mélange du fait d'un τ_{agg} proche de la milliseconde. Dans le cas des complexes polycation-ADN pour le transfert de gènes, les particules qui résultent d'un mélange macroscopique ont une distribution de taille qui s'échelonne de 50 nm à 500 nm, et les efficacités de transfection qui en découlent sont faibles ou au mieux ne sont pas reproductibles. L'usage de petites particules monodisperses est de plus en plus souhaitable pour optimiser leur diffusion à travers les tissus de l'organisme et pour garantir ainsi des efficacités élevées [273].

L'objectif sera ici d'assembler des nanoparticules contenant de l'ADN en leur conférant une taille minimale. L'idéal étant que chaque nanoparticule ne contienne qu'une seule et unique chaîne d'ADN. L'agent de condensation pourra être des lipides comme décrit au Chapitre 3, des tensioactifs ou bien encore des polycations. Ces nano-

particules pourront ensuite être encapsulées dans des capsides virales pour tirer profit des excellentes propriétés circulatoires des virus sans dangers de prolifération et de mutation intempestive.

La stratégie d'assemblage reposera sur l'utilisation de dispositifs microfluidiques pour contrôler finement le temps de mélange. La Figure 66 donne deux illustrations de systèmes de mélange par focalisation hydrodynamique. Le principe est de pincer un écoulement par un autre afin de moduler le temps nécessaire à la diffusion des entités. Dans une configuration en focalisation latérale, (Figure 66, haut), un fluide contenant l'entité cationique vient focaliser le fluide contenant l'entité anionique (ADN par exemple) contre la paroi du canal microfluidique. On démontre que le temps de mélange τ_{mix} varie comme R^{-1}, où R est le rapport des débits entre le fluide focalisant et le fluide focalisé. Dans le cas d'une configuration en focalisation centrale, (Figure 66, bas), le fluide focalisé est pincé entre deux fluides focalisant de même nature. Dans ce cas, on a $\tau_{mix} \propto R^{-2}$, ce qui permet d'atteindre des temps de mélange de l'ordre de la milliseconde.

Nous avons appliqué ce principe à l'assemblage de nanoparticules faites d'un tensioactif cationique et d'un polysaccharide anionique semi-flexible. La taille des nanoparticules s'est avérée finement contrôlée par le rapport des débits et a montré une remarquable reproductibilité. Jusque-là, il n'a pas été possible d'obtenir des particules plus petites que 50 nm. Toutefois, en plaçant les tensioactifs et les polyanions ensemble dans un solvant organique polaire, puis en mélangeant de l'eau par focalisation hydrodynamique, les nanoparticules devraient atteindre des tailles minimales : en effet, τ_{mix} est contrôlé par la diffusion des molécules, et l'eau diffuse bien plus rapidement que les entités à complexer. Ainsi, le temps de mélange peut descendre en-dessous de la milliseconde, soit proche voire inférieur au temps de complexation.

Le vaste de champ de la microfluidique s'offre ensuite pour séparer ou trier les nanoparticules en fonction de leur taille. L'injection en aval de protéines virales permettra de former des systèmes viro-inspirés en continu avec des applications possibles dans le domaine biomédical, en particulier pour la transfection de gènes.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Luecke, H. ; Richter, H. T. ; Lanyi, J. K. *Science* **1998**, *280*, 1934–1937.

[2] Alber, F. ; Dokudovskaya, S. ; Veenhoff, L. M. ; Zhang, W. ; Kipper, J. ; Devos, D. ; Suprapto, A. ; Karni-Schmidt, O. ; Williams, R. ; Chait, B. T. ; Rout, M. P. ; Sali, A. *Nature* **2007**, *450*, 683–94.

[3] Alber, F. ; Dokudovskaya, S. ; Veenhoff, L. M. ; Zhang, W. ; Kipper, J. ; Devos, D. ; Suprapto, A. ; Karni-Schmidt, O. ; Williams, R. ; Chait, B. T. ; Sali, A. ; Rout, M. P. *Nature* **2007**, *450*, 695–701.

[4] Boyer, P. D. *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 717–49.

[5] Rondelez, Y. ; Tresset, G. ; Nakashima, T. ; Kato-Yamada, Y. ; Fujita, H. ; Takeuchi, S. ; Noji, H. *Nature* **2005**, *433*, 773–7.

[6] Mahfoud, R. ; Garmy, N. ; Maresca, M. ; Yahi, N. ; Puigserver, A. ; Fantini, J. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 11292–6.

[7] Sandvig, K. ; Spilsberg, B. ; Lauvrak, S. U. ; Torgersen, M. L. ; Iversen, T.-G. ; van Deurs, B. *Int. J. Med. Microbiol.* **2004**, *293*, 483–90.

[8] Tresset, G. *PMC Biophys.* **2009**, *2*, 3.

[9] Hunter, R. J. *Foundations of colloid science*, second edition ed. ; Oxford University Press, New York, 2001.

[10] Gelbart, W. M. ; Ben-Shaul, A. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 13169–13189.

[11] Israelachvili, J. *Intermolecular and surface forces*, second edition ed. ; Academic Press, 1991.

[12] Tanford, C. *The hydrophobic effect. Formation of micelles and biological membranes.*, second edition ed. ; Wiley, New York, 1980.

[13] Willard, A. P. ; Chandler, D. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 6187–6192.

[14] Chandler, D. *Nature* **2005**, *437*, 640–7.

[15] Despa, F. ; Berry, R. S. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 373–378.

[16] Meyer, E. E. ; Rosenberg, K. J. ; Israelachvili, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 15739–46.

[17] Maibaum, L. ; Dinner, A. R. ; Chandler, D. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 6778–6781.

[18] Israelachvili, J. N. ; Mitchell, D. J. ; Ninham, B. W. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **1976**, *72*, 1525–1568.

[19] Zemb, T.; Dubois, M.; Deme, B.; Gulik-Krzywicki, T. *Science* **1999**, *283*, 816–9.

[20] Dubois, M.; Demé, B.; Gulik-Krzywicki, T.; Dedieu, J. C.; Vautrin, C.; Désert, S.; Perez, E.; Zemb, T. *Nature* **2001**, *411*, 672–5.

[21] Dubois, M.; Lizunov, V.; Meister, A.; Gulik-Krzywicki, T.; Verbavatz, J. M.; Perez, E.; Zimmerberg, J.; Zemb, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 15082–7.

[22] Gonzalez-Pérez, A.; Schmutz, M.; Waton, G.; Romero, M. J.; Krafft, M. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 756–7.

[23] Ulrich, A. S. *Biosci. Rep.* **2002**, *22*, 129–50.

[24] Lasic, D. D. *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 307–21.

[25] Karlsson, M.; Davidson, M.; Karlsson, R.; Karlsson, A.; Bergenholtz, J.; Konkoli, Z.; Jesorka, A.; Lobovkina, T.; Hurtig, J.; Voinova, M.; Orwar, O. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2004**, *55*, 613–649.

[26] Jesorka, A.; Orwar, O. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, *1*, 801–832.

[27] Liang, H.; Angelini, T. E.; Ho, J.; Braun, P. V.; Wong, G. C. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11786–11787.

[28] Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular biology of the cell*; Garland Science, New York, 2002.

[29] Menger, F. M.; Chlebowski, M. E.; Galloway, A. L.; Lu, H.; Seredyuk, V. A.; Sorrells, J. L.; Zhang, H. *Langmuir* **2005**, *21*, 10336–41.

[30] Olmsted, P. D. In *Soft condensed matter physics in molecular and cell biology*; Poon, D., Wilson C K; Andelman, Ed.; Taylor & Francis, Boca Raton, 2006; pp 63–77.

[31] Helfrich, W. *Z. Naturforsch.* **1973**, *28*, 693–703.

[32] Kucerka, N.; Pencer, J.; Sachs, J. N.; Nagle, J. F.; Katsaras, J. *Langmuir* **2007**, *23*, 1292–9.

[33] Pan, J.; Mills, T. T.; Tristram-Nagle, S.; Nagle, J. F. *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 198103.

[34] Pan, J.; Tristram-Nagle, S.; Kucerka, N.; Nagle, J. F. *Biophys. J.* **2008**, *94*, 117–24.

[35] Daillant, J.; Bellet-Amalric, E.; Braslau, A.; Charitat, T.; Fragneto, G.; Graner, F.; Mora, S.; Rieutord, F.; Stidder, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 11639–44.

[36] Koynova, R.; Caffrey, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1376*, 91–145.

[37] Sun, W. J.; Tristram-Nagle, S.; Suter, R. M.; Nagle, J. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 7008–12.

[38] Pisani, M.; Bruni, P.; Caracciolo, G.; Caminiti, R.; Francescangeli, O. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 13203–11.

[39] Tsong, T. Y. *Biophys. J.* **1991**, *60*, 297–306.

[40] Tresset, G.; Iliescu, C. *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *90*, 173901.

[41] Olofsson, J.; Nolkrantz, K.; Ryttsén, F.; Lambie, B. A.; Weber, S. G.; Orwar, O. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 29–34.

[42] Bangham, A. D.; Horne, R. W. *J. Mol. Biol.* **1964**, *8*, 660–8.

[43] Lasic, D. D. In *Giant vesicles*; Luisi, P., Pier Luigi; Walde, Ed.; John Wiley & Sons, Chichester, 2000; Chapter 2, pp 11–24.

[44] Segota, S.; Tezak, D. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2006**, *121*, 51–75.

[45] Torchilin, V. P.; Weissig, V. *Liposomes : A Practical Approach*; Oxford University Press, Oxford, 2003.

[46] Voinea, M.; Simionescu, M. *J. Cell. Mol. Med.* **2002**, *6*, 465–474.

[47] Vasir, J. K.; Reddy, M. K.; Labhasetwar, V. D. *Curr. Nanosci.* **2005**, *1*, 47–64.

[48] Lian, T.; Ho, R. J. Y. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 667–680.

[49] Karanth, H.; Murthy, R. S. R. *J. Pharm. Pharmacol.* **2007**, *59*, 469–483.

[50] Park, Y. S. *Biosci. Rep.* **2002**, *22*, 267–81.

[51] Allen, C.; Dos Santos, N.; Gallagher, R.; Chiu, G. N. C.; Shu, Y.; Li, W. M.; Johnstone, S. A.; Janoff, A. S.; Mayer, L. D.; Webb, M. S.; Bally, M. B. *Biosci. Rep.* **2002**, *22*, 225–50.

[52] Mason, J. T.; Xu, L.; Sheng, Z.-m.; He, J.; O'Leary, T. J. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2003–11.

[53] Mason, J. T.; Xu, L.; Sheng, Z.-m.; O'Leary, T. J. *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 555–7.

[54] Steinert, S.; Lee, E.; Tresset, G.; Zhang, D.; Hortsch, R.; Wetzel, R.; Hebbar, S.; Sundram, J. R.; Kesavapany, S.; Boschke, E.; Kraut, R. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2933.

[55] Kremer, J. J.; Murphy, R. M. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2003**, *57*, 159–69.

[56] Chan, Y.-H. M.; Boxer, S. G. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 581–587.

[57] Stoicheva, N. G.; Hui, S. W. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1195*, 31–8.

[58] Tresset, G.; Takeuchi, S. *Biomed. Microdevices.* **2004**, *6*, 213–8.

[59] Tresset, G.; Takeuchi, S. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2795–801.

[60] Dimova, R.; Riske, K. A.; Aranda, S.; Bezlyepkina, N.; Knorr, R. L.; Lipowsky, R. *Soft Matter* **2007**, *3*, 817–827.

[61] Riquelme, G.; Lopez, E.; Garcia-Segura, L. M.; Ferragut, J. A.; Gonzalez-Ros, J. M. *Biochemistry* **1990**, *29*, 11215–22.

[62] Karlsson, A.; Sott, K.; Markström, M.; Davidson, M.; Konkoli, Z.; Orwar, O. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 1609–17.

[63] Sott, K.; Lobovkina, T.; Lizana, L.; Tokarz, M.; Bauer, B.; Konkoli, Z.; Orwar, O. *Nano Lett* **2006**, *6*, 209–14.

[64] Nomura, S.-i. M.; Tsumoto, K.; Hamada, T.; Akiyoshi, K.; Nakatani, Y.; Yoshikawa, K. *Chembiochem* **2003**, *4*, 1172–5.

[65] Noireaux, V.; Libchaber, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 17669–74.

[66] Ishikawa, K.; Sato, K.; Shima, Y.; Urabe, I.; Yomo, T. *FEBS Lett.* **2004**, *576*, 387–90.

[67] Hotani, H. *J. Mol. Biol.* **1984**, *178*, 113–20.

[68] Käs, J.; Sackmann, E. *Biophys. J.* **1991**, *60*, 825–44.

[69] Miao, L.; Seifert, U.; Wortis, M.; Döbereiner, H. *Phys. Rev. E* **1994**, *49*, 5389–5407.

[70] Seifert, U. *Adv. Phys.* **1997**, *46*, 13–137.

[71] Ziherl, P.; Svetina, S. *Europhys. Lett.* **2005**, *70*, 690–696.

[72] Michalet, X. *Phys. Rev. E* **2007**, *76*, 021914.

[73] Yanagisawa, M.; Imai, M.; Taniguchi, T. *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 148102.

[74] Jülicher, F.; Lipowsky, R. *Phys. Rev. E* **1996**, *53*, 2670–2683.

[75] Baumgart, T.; Das, S.; Webb, W. W.; Jenkins, J. T. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 1067–80.

[76] Harden, J. L.; Mackintosh, F. C.; Olmsted, P. D. *Phys. Rev. E* **2005**, *72*, 011903.

[77] Sens, P.; Turner, M. S. *Phys. Rev. E* **2006**, *73*, 031918.

[78] Korlach, J.; Schwille, P.; Webb, W. W.; Feigenson, G. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 8461–6.

[79] Baumgart, T.; Hess, S. T.; Webb, W. W. *Nature* **2003**, *425*, 821–4.

[80] Bagatolli, L. A.; Gratton, E. *Biophys. J.* **2000**, *78*, 290–305.

[81] Veatch, S. L.; Keller, S. L. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 3074–83.

[82] Ariola, F. S.; Mudaliar, D. J.; Walvick, R. P.; Heikal, A. A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 4517–29.

[83] Yanagisawa, M.; Imai, M.; Masui, T.; Komura, S.; Ohta, T. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 115–25.

[84] Sesso, A.; de Faria, F. P.; Iwamura, E. S.; Corrêa, H. *J. Cell Sci.* **1994**, *107 (Pt 3)*, 517–28.

[85] Sciaky, N.; Presley, J.; Smith, C.; Zaal, K. J.; Cole, N.; Moreira, J. E.; Terasaki, M.; Siggia, E.; Lippincott-Schwartz, J. *J. Cell Biol.* **1997**, *139*, 1137–55.

[86] Iglic, A.; Hagerstrand, H.; Bobrowska-Hagerstrand, M.; Arrigler, V.; Kraij-Iglic, V. *Phys. Lett. A* **2003**, *310*, 493–497.

[87] Shimizu, T.; Masuda, M.; Minamikawa, H. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1401–43.

[88] Shimizu, T. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **2008**, *46*, 2601–2611.

[89] Brazhnik, K. P.; Vreeland, W. N.; Hutchison, J. B.; Kishore, R.; Wells, J.; Helmerson, K.; Locascio, L. E. *Langmuir* **2005**, *21*, 10814–7.

[90] Cuvelier, D.; Chiaruttini, N.; Bassereau, P.; Nassoy, P. *Europhys. Lett.* **2005**, *71*, 1015–1021.

[91] Tokarz, M.; Akerman, B.; Olofsson, J.; Joanny, J.-F.; Dommersnes, P.; Orwar, O. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 9127–32.

[92] Mahajan, N.; Fang, J. *Langmuir* **2005**, *21*, 3153–7.

[93] Liu, H.; Bachand, G. D.; Kim, H.; Hayden, C. C.; Abate, E. A.; Sasaki, D. Y. *Langmuir* **2008**, *24*, 3686–9.

[94] Schnur, J. M. *Science* **1993**, *262*, 1669–1676.

[95] Thomas, B. N.; Safinya, C. R.; Plano, R. J.; Clark, N. A. *Science* **1995**, *267*, 1635–1638.

[96] Zarif, L. *J. Control. Release* **2002**, *81*, 7–23.

[97] John, G.; Masuda, M.; Okada, Y.; Yase, K.; Shimizu, T. *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 715–718.

[98] Frusawa, H.; Fukagawa, A.; Ikeda, Y.; Araki, J.; Ito, K.; John, G.; Shimizu, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 72–74.

[99] Yui, H.; Guo, Y.; Koyama, K.; Sawada, T.; John, G.; Yang, B.; Masuda, M.; Shimizu, T. *Langmuir* **2005**, *21*, 721–7.

[100] Whitesides, G. M. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1161–1165.

[101] Yamamoto, T.; Kurosawa, O.; Kabata, H.; Shimamoto, N.; Washizu, M. *IEEE Trans. Ind. Appl.* **2001**, *37*, 1625–1633.

[102] Hashiguchi, G.; Goda, T.; Hosogi, M.; Hirano, K.; Kaji, N.; Baba, Y.; Kakushima, K.; Fujita, H. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4347–4350.

[103] Hohmura, K. I.; Itokazu, Y.; Yoshimura, S. H.; Mizuguchi, G.; Masamura, Y. S.; Takeyasu, K.; Shiomi, Y.; Tsurimoto, T.; Nishijima, H.; Akita, S.; Nakayama, Y. *J. Electron Microsc.* **2000**, *49*, 415–421.

[104] Reyes, D. R.; Iossifidis, D.; Auroux, P.-A.; Manz, A. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2623–2636.

[105] Auroux, P.-A.; Iossifidis, D.; Reyes, D. R.; Manz, A. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2637–2652.

[106] Vilkner, T.; Janasek, D.; Manz, A. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3373–3385.

[107] Hughes, M. P.; Morgan, H. *J. Phys. D : Appl. Phys.* **1998**, *31*, 2205–2210.

[108] Nomura, S. M.; Yoshikawa, Y.; Yoshikawa, K.; Dannenmuller, O.; Chasserot-Golaz, S.; Ourisson, G.; Nakatani, Y. *Chembiochem* **2001**, *2*, 457–459.

[109] Masuda, S.; Washizu, M.; Kawabata, I. *IEEE Trans. Ind. Appl.* **1988**, *24*, 217–222.

[110] Ajdari, *Phys. Rev. E* **2000**, *61*, R45–R48.

[111] Brown, A. B.; Smith, C. G.; Rennie, A. R. *Phys. Rev. E* **2001**, *63*, 016305.

[112] Studer, V.; Pepin, A.; Chen, Y.; Ajdari, A. *Analyst* **2004**, *129*, 944–949.

[113] Strömberg, A.; Karlsson, A.; Ryttsén, F.; Davidson, M.; Chiu, D. T.; Orwar, O. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 126–130.

[114] Iliescu, C.; Yu, M. L.; Xu, G. L.; Tay, F. E. H. *J. Microelectromech. Syst.* **2006**, *15*, 1506.

[115] Iliescu, C.; Tay, F. E. H.; Miao, J. *Sens. Actuators A* **2007**, *133*, 395.

[116] Vreeland, W. N.; Locascio, L. E. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6906–6911.

[117] Chiu, D. T.; Wilson, C. F.; Ryttsén, F.; Strömberg, A.; Farre, C.; Karlsson, A.; Nordholm, S.; Gaggar, A.; Modi, B. P.; Moscho, A.; Garza-López, R. A.; Orwar, O.; Zare, R. N. *Science* **1999**, *283*, 1892–1895.

[118] Lundqvist, J. A.; Sahlin, F.; Aberg, M. A.; Strömberg, A.; Eriksson, P. S.; Orwar, O. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 10356–10360.

[119] Strömberg, A.; Ryttsén, F.; Chiu, D. T.; Davidson, M.; Eriksson, P. S.; Wilson, C. F.; Orwar, O.; Zare, R. N. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 7–11.

[120] Chiu, D. T. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 609–612.

[121] Kulin, S.; Kishore, R.; Helmerson, K.; Locascio, L. E. *Langmuir* **2003**, *19*, 8206–8210.

[122] Masuda, S.; Washizu, M.; Nanba, T. *IEEE Trans. Ind. Appl.* **1989**, *25*, 732–737.

[123] Lin, A. J.; Slack, N. L.; Ahmad, A.; George, C. X.; Samuel, C. E.; Safinya, C. R. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 3307–16.

[124] Jensen, K. *Nature* **1998**, *393*, 735.

[125] Wölcke, J.; Ullmann, D. *Drug Discov. Today* **2001**, *6*, 637–646.

[126] Thorsen, T.; Maerkl, S. J.; Quake, S. R. *Science* **2002**, *298*, 580–584.

[127] Lu, H. P.; Xun, L.; Xie, X. S. *Science* **1998**, *282*, 1877–1882.

[128] Xue, Q.; Yeung, E. S. *Nature* **1995**, *373*, 681–683.

[129] Funatsu, T.; Harada, Y.; Tokunaga, M.; Saito, K.; Yanagida, T. *Nature* **1995**, *374*, 555–559.

[130] Levene, M. J.; Korlach, J.; Turner, S. W.; Foquet, M.; Craighead, H. G.; Webb, W. W. *Science* **2003**, *299*, 682–686.

[131] Stamou, D.; Duschl, C.; Delamarche, E.; Vogel, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 5580–5583.

[132] Gratzl, M.; Lu, H.; Matsumoto, T.; Yi, C.; Bright, G. R. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2751–2756.

[133] Nakano, M.; Komatsu, J.; Matsuura, S.-i.; Takashima, K.; Katsura, S.; Mizuno, A. *J. Biotechnol.* **2003**, *102*, 117–124.

[134] Foquet, M.; Korlach, J.; Zipfel, W. R.; Webb, W. W.; Craighead, H. G. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1618–1626.

[135] Nagai, H.; Murakami, Y.; Yokoyama, K.; Tamiya, E. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 1015–1019.

[136] Gosalia, D. N.; Diamond, S. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 8721–8726.

[137] Loscertales, I. G.; Barrero, A.; Guerrero, I.; Cortijo, R.; Marquez, M.; Gañán-Calvo, A. M. *Science* **2002**, *295*, 1695–1698.

[138] Renault, J. P.; Bernard, A.; Juncker, D.; Michel, B.; Bosshard, H. R.; Delamarche, E. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2320–2323.

[139] McDonald, J. C.; Whitesides, G. M. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 491–499.

[140] Rondelez, Y.; Tresset, G.; Tabata, K. V.; Arata, H.; Fujita, H.; Takeuchi, S.; Noji, H. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 361–365.

[141] Du Plessis, J.; Pugh, W. J.; Judefeind, A.; Hadgraft, J. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2002**, *15*, 63–69.

[142] Wheeler, A. R.; Throndset, W. R.; Whelan, R. J.; Leach, A. M.; Zare, R. N.; Liao, Y. H.; Farrell, K.; Manger, I. D.; Daridon, A. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3581–3586.

[143] Sapsford, K. E.; Ligler, F. S. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19*, 1045–1055.

[144] Huang, Z. J. *Biochemistry* **1991**, *30*, 8535–8540.

[145] Noji, H.; Yasuda, R.; Yoshida, M.; Kinosita, K., Jr *Nature* **1997**, *386*, 299–302.

[146] Ishijima, A.; Yanagida, T. *Trends Biochem Sci* **2001**, *26*, 438–444.

[147] Itoh, H.; Takahashi, A.; Adachi, K.; Noji, H.; Yasuda, R.; Yoshida, M.; Kinosita, K. *Nature* **2004**, *427*, 465–468.

[148] Senior, A. E.; Nadanaciva, S.; Weber, J. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1553*, 188–211.

[149] Yoshida, M.; Muneyuki, E.; Hisabori, T. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2001**, *2*, 669–677.

[150] Kinosita, K., Jr; Yasuda, R.; Noji, H. *Essays Biochem.* **2000**, *35*, 3–18.

[151] Kato-Yamada, Y.; Noji, H.; Yasuda, R.; Kinosita, K., Jr; Yoshida, M. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 19375–19377.

[152] Yasuda, R.; Noji, H.; Kinosita, K., Jr; Yoshida, M. *Cell* **1998**, *93*, 1117–1124.

[153] Yasuda, R.; Noji, H.; Yoshida, M.; Kinosita, K., Jr; Itoh, H. *Nature* **2001**, *410*, 898–904.

[154] Abrahams, J. P.; Leslie, A. G.; Lutter, R.; Walker, J. E. *Nature* **1994**, *370*, 621–628.

[155] Zhou, Y.; Duncan, T. M.; Cross, R. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 10583–10587.

[156] Diez, M.; Zimmermann, B.; Börsch, M.; König, M.; Schweinberger, E.; Steigmiller, S.; Reuter, R.; Felekyan, S.; Kudryavtsev, V.; Seidel, C. A. M.; Gräber, P. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 135–141.

[157] Matsui, T.; Yoshida, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1231*, 139–146.

[158] Hirono-Hara, Y.; Noji, H.; Nishiura, M.; Muneyuki, E.; Hara, K. Y.; Yasuda, R.; Kinosita, K., Jr; Yoshida, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 13649–13654.

[159] Hirono-Hara, Y.; Ishizuka, K.; Kinosita, K., Jr; Yoshida, M.; Noji, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 4288–4293.

[160] Nishizaka, T.; Oiwa, K.; Noji, H.; Kimura, S.; Muneyuki, E.; Yoshida, M.; Kinosita, K., Jr *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 142–148.

[161] Laget, P. P.; Smith, J. B. *Arch. Biochem. Biophys.* **1979**, *197*, 83–89.

[162] Dunn, S. D.; Zadorozny, V. D.; Tozer, R. G.; Orr, L. E. *Biochemistry* **1987**, *26*, 4488–4493.

[163] Kato, Y.; Matsui, T.; Tanaka, N.; Muneyuki, E.; Hisabori, T.; Yoshida, M. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 24906–24912.

[164] Nowak, K. F.; Tabidze, V.; McCarty, R. E. *Biochemistry* **2002**, *41*, 15130–15134.

[165] Tsunoda, S. P.; Rodgers, A. J.; Aggeler, R.; Wilce, M. C.; Yoshida, M.; Capaldi, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 6560–6564.

[166] Suzuki, T.; Murakami, T.; Iino, R.; Suzuki, J.; Ono, S.; Shirakihara, Y.; Yoshida, M. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 46840–46846.

[167] Bulygin, V. V.; Duncan, T. M.; Cross, R. L. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 35616–35621.

[168] Gibbons, C.; Montgomery, M. G.; Leslie, A. G.; Walker, J. E. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 1055–1061.

[169] Kaasgaard, T.; Drummond, C. J. *Phys Chem Chem Phys* **2006**, *8*, 4957–75.

[170] Luzzati, V.; Gambacorta, A.; DeRosa, M.; Gulik, A. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1987**, *16*, 25–47.

[171] Luzzati, V.; Husson, F. *J Cell Biol* **1962**, *12*, 207–19.

[172] Luzzati, V.; Reiss-Husson, F.; Rivas, E.; Gulik-Krzywicki, T. *Ann. New York Acad. Sci.* **1966**, *137*, 409–413.

[173] Seddon, J. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1031*, 1–69.

[174] Koynova, R.; Caffrey, M. *Chem. Phys. Lipids* **1994**, *69*, 1–34.

[175] Turner, D. C.; Gruner, S. M. *Biochemistry* **1992**, *31*, 1340–55.

[176] Kozlov, M. M.; Leikin, S.; Rand, R. P. *Biophys. J.* **1994**, *67*, 1603–11.

[177] Gawrisch, K.; Parsegian, V. A.; Hajduk, D. A.; Tate, M. W.; Graner, S. M.; Fuller, N. L.; Rand, R. P. *Biochemistry* **1992**, *31*, 2856–64.

[178] Siegel, D. P. *Biophys. J.* **1999**, *76*, 291–313.

[179] Siegel, D. P.; Kozlov, M. M. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 366–74.

[180] Luzzati, V. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 661–8.

[181] Seddon, J. M.; Robins, J.; Gulik-Krzywicki, T.; Delacroix, H. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2*, 4485–4493.

[182] Charvolin, J.; Sadoc, J.-F. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* **1996**, *354*, 2173–2192.

[183] Barauskas, J.; Johnsson, M.; Tiberg, F. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1615–9.

[184] Johnsson, M.; Barauskas, J.; Tiberg, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1076–7.

[185] Barauskas, J.; Misiunas, A.; Gunnarsson, T.; Tiberg, F.; Johnsson, M. *Langmuir* **2006**, *22*, 6328–34.

[186] Seddon, J. M. *Biochemistry* **1990**, *29*, 7997–8002.

[187] Landh, T. *FEBS Lett.* **1995**, *369*, 13–7.

[188] Landau, E. M.; Rosenbusch, J. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 14532–5.

[189] Caffrey, M. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 486–97.

[190] Cherezov, V.; Rosenbaum, D. M.; Hanson, M. A.; Rasmussen, S. G. F.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Choi, H.-J.; Kuhn, P.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K.; Stevens, R. C. *Science* **2007**, *318*, 1258–65.

[191] Luo, D.; Saltzman, W. M. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 33–7.

[192] Allen, T. M.; Cullis, P. R. *Science* **2004**, *303*, 1818–22.

[193] Gardlík, R.; Pálffy, R.; Hodosy, J.; Lukács, J.; Turna, J.; Celec, P. *Med. Sci. Monit.* **2005**, *11*, RA110–21.

[194] Mastrobattista, E.; van der Aa, M. A. E. M.; Hennink, W. E.; Crommelin, D. J. A. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2006**, *5*, 115–21.

[195] Rao, N. M.; Gopal, V. *Biosci. Rep.* **2006**, *26*, 301–24.

[196] Desigaux, L.; Sainlos, M.; Lambert, O.; Chevre, R.; Letrou-Bonneval, E.; Vigneron, J.-P.; Lehn, P.; Lehn, J.-M.; Pitard, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 16534–9.

[197] Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 7413–7.

[198] Lasic, D. D.; Strey, H.; Stuart, M. C. A.; Podgornik, R.; Frederik, P. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 832–833.

[199] Rädler, J. O.; Koltover, I.; Salditt, T.; Safinya, C. R. *Science* **1997**, *275*, 810–4.

[200] Safinya, C. R. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 440–8.

[201] Farago, O.; Ewert, K.; Ahmad, A.; Evans, H. M.; Grønbech-Jensen, N.; Safinya, C. R. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 836–46.

[202] Koltover, I.; Wagner, K.; Safinya, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 14046–51.

[203] Caracciolo, G.; Pozzi, D.; Caminiti, R.; Mancini, G.; Luciani, P.; Amenitsch, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10092–3.

[204] Koltover, I.; Salditt, T.; Rädler, J. O.; Safinya, C. R. *Science* **1998**, *281*, 78–81.

[205] Ewert, K. K.; Evans, H. M.; Zidovska, A.; Bouxsein, N. F.; Ahmad, A.; Safinya, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3998–4006.

[206] Hikita, T.; Tadano-Aritomi, K.; Iida-Tanaka, N.; Levery, S. B.; Ishizuka, I.; Hakomori, S. *Neurochem. Res.* **2002**, *27*, 575–81.

[207] Dass, C. R. *J. Mol. Med.* **2004**, *82*, 579–91.

[208] Tatulian, S. A. In *Surface chemistry and electrochemistry of membranes*; Sørensen, T. S., Ed.; Marcel Dekker, New York, 1999; Chapter 22, pp 872–922.

[209] Francescangeli, O.; Stanic, V.; Gobbi, L.; Bruni, P.; Iacussi, M.; Tosi, G.; Bernstorff, S. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **2003**, *67*, 011904.

[210] McManus, J. J.; Rädler, J. O.; Dawson, K. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15966–7.

[211] Liang, H.; Harries, D.; Wong, G. C. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 11173–11178.

[212] Francescangeli, O.; Pisani, M.; Stanić, V.; Bruni, P.; Weiss, T. M. *Europhys. Lett.* **2004**, *67*, 669–675.

[213] Tresset, G.; Cheong, W. C. D.; Tan, Y. L. S.; Boulaire, J.; Lam, Y. M. *Biophys. J.* **2007**, *93*, 637–44.

[214] Tresset, G.; Cheong, W. C. D.; Lam, Y. M. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 14233–8.

[215] Zuhorn, I. S.; Engberts, J. B. F. N.; Hoekstra, D. *Eur. Biophys. J.* **2007**, *36*, 349–62.

[216] Ahmad, A.; Evans, H. M.; Ewert, K.; George, C. X.; Samuel, C. E.; Safinya, C. R. *J. Gene Med.* **2005**, *7*, 739–48.

[217] Koynova, R.; Wang, L.; Tarahovsky, Y.; MacDonald, R. C. *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16*, 1335–9.

[218] Koynova, R.; Wang, L.; MacDonald, R. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 14373–8.

[219] Yang, L.; Liang, H.; Angelini, T. E.; Butler, J.; Coridan, R.; Tang, J. X.; Wong, G. C. L. *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 615–9.

[220] Wong, G. C.; Tang, J. X.; Lin, A.; Li, Y.; Janmey, P. A.; Safinya, C. R. *Science* **2000**, *288*, 2035–9.

[221] Subramanian, G.; Hjelm, R. P.; Deming, T. J.; Smith, G. S.; Li, Y.; Safinya, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 26–34.

[222] Raviv, U.; Needleman, D. J.; Li, Y.; Miller, H. P.; Wilson, L.; Safinya, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 11167–72.

[223] Raviv, U.; Needleman, D. J.; Safinya, C. R. *J. Phys.-Condes. Matter* **2006**, *18*, 1271–1279.

[224] Raviv, U.; Nguyen, T.; Ghafouri, R.; Needleman, D. J.; Li, Y.; Miller, H. P.; Wilson, L.; Bruinsma, R. F.; Safinya, C. R. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 278–87.

[225] Sackmann, E. *Science* **1996**, *271*, 43–8.

[226] Sackmann, E.; Tanaka, M. *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 58–64.

[227] Goennenwein, S.; Tanaka, M.; Hu, B.; Moroder, L.; Sackmann, E. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 646–55.

[228] Munro, J. C.; Frank, C. W. *Langmuir* **2004**, *20*, 3339–49.

[229] Silin, V. I.; Wieder, H.; Woodward, J. T.; Valincius, G.; Offenhausser, A.; Plant, A. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14676–83.

[230] Purrucker, O.; Förtig, A.; Jordan, R.; Tanaka, M. *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 327–35.

[231] Phang, T.-L.; Franses, E. I. *Langmuir* **2006**, *22*, 1609–18.

[232] Orth, R. N.; Kameoka, J.; Zipfel, W. R.; Ilic, B.; Webb, W. W.; Clark, T. G.; Craighead, H. G. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 3066–73.

[233] Brian, A. A.; McConnell, H. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1984**, *81*, 6159–63.

[234] Richter, R.; Mukhopadhyay, A.; Brisson, A. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 3035–47.

[235] Richter, R. P.; Bérat, R.; Brisson, A. R. *Langmuir* **2006**, *22*, 3497–505.

[236] Tasis, D.; Tagmatarchis, N.; Bianco, A.; Prato, M. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1105–36.

[237] Richard, C.; Balavoine, F.; Schultz, P.; Ebbesen, T. W.; Mioskowski, C. *Science* **2003**, *300*, 775–8.

[238] Qiao, R.; Ke, P. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13656–7.

[239] Wu, Y.; Hudson, J. S.; Lu, Q.; Moore, J. M.; Mount, A. S.; Rao, A. M.; Alexov, E.; Ke, P. C. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 2475–8.

[240] Artyukhin, A. B.; Shestakov, A.; Harper, J.; Bakajin, O.; Stroeve, P.; Noy, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7538–42.

[241] Ye, J.-S.; Sheu, F.-S. *Curr. Nanosci.* **2006**, *2*, 319–327.

[242] Ke, P. C. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 439–47.

[243] Ferber, D. *Science* **2001**, *294*, 1638–1642.

[244] Kootstra, N. A.; Verma, I. M. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2003**, *43*, 413–439.

[245] Lundstrom, K. *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 117–122.

[246] Bergen, M.; Chen, R.; Gonzalez, R. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2003**, *3*, 377–384.

[247] Ewert, K. K.; Ahmad, A.; Evans, H. M.; Safinya, C. R. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2005**, *5*, 33–53.

[248] Stopeck, A. T.; Jones, A.; Hersh, E. M.; Thompson, J. A.; Finucane, D. M.; Gutheil, J. C.; Gonzalez, R. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 2285–2291.

[249] Gromelski, S.; Brezesinski, G. *Langmuir* **2006**, *22*, 6293–6301.

[250] Bruni, P.; Pisani, M.; Amici, A.; Marchini, C.; Montani, M.; Francescangeli, O. *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *88*, 073901.

[251] McLaughlin, A.; Grathwohl, C.; McLaughlin, S. *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *513*, 338–57.

[252] Lehrmann, R.; Seelig, J. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1189*, 89–95.

[253] Böckmann, R. A.; Grubmüller, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 1021–1024.

[254] Tatulian, S. A. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 4963–4965.

[255] Grahame, D. C. *Chem. Rev.* **1947**, *41*, 441–501.

[256] Freiberger, N.; Glatter, O. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 14719–14727.

[257] Bloomfield, V. A. *Biopolymers* **1997**, *44*, 269–82.

[258] Stevens, M. J. *Biophys. J.* **2001**, *80*, 130–139.

[259] Besteman, K.; van Eijk, K.; Lemay, S. G. *Nat. Phys.* **2007**, *3*, 641–644.

[260] Grosberg, A. Y.; Nguyen, T. T.; Shklovskii, B. I. *Rev. Mod. Phys.* **2002**, *74*, 329–345.

[261] Shklovskii, B. I. *Phys. Rev. E* **1999**, *60*, 5802–11.

[262] Levin, Y. *Rep. Prog. Phys.* **2002**, *65*, 1577–1632.

[263] Butler, J. C.; Angelini, T.; Tang, J. X.; Wong, G. C. L. *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *91*, 028301.

[264] Farago, O. *J. Chem. Phys.* **2003**, *119*, 596–605.

[265] Gibson, W.; Roizman, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1971**, *68*, 2818–2821.

[266] Tabor, C. W.; Tabor, H. *Annu. Rev. Biochem.* **1984**, *53*, 749–790.

[267] Raspaud, E.; Chaperon, I.; Leforestier, A.; Livolant, F. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 1547–1555.

[268] Raspaud, E.; Durand, D.; Livolant, F. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 392–403.

[269] Ross, P. C.; Hui, S. W. *Gene Ther.* **1999**, *6*, 651–659.

[270] Lee, H. Y.; Jung, H. S.; Fujikawa, K.; Park, J. W.; Kim, J. M.; Yukimasa, T.; Sugihara, H.; Kawai, T. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21*, 833–838.

[271] Allen, C.; Dos Santos, N.; Gallagher, R.; Chiu, G. N. C.; Shu, Y.; Li, W. M.; Johnstone, S. A.; Janoff, A. S.; Mayer, L. D.; Webb, M. S.; Bally, M. B. *Biosci. Rep.* **2002**, *22*, 225–250.

[272] Koynova, R. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *606*, 399–423.

[273] Blessing, T.; Remy, J. S.; Behr, J. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 1427–31.

[274] Farago, O.; Grønbech-Jensen, N. *Soft Matter* **2011**, *7*, 4302–4306.

[275] Farago, O.; Grønbech-Jensen, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2875–81.

[276] Tresset, G.; Lansac, Y.; Romet-Lemonne, G. *Langmuir* **2012**, *28*, 5743–5752.

[277] Frank, J. *Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies*; Oxford University Press, New York, 2006.

[278] Fujii, T.; Iwane, A. H.; Yanagida, T.; Namba, K. *Nature* **2010**, *467*, 724–8.

[279] Wong, G. C. L.; Lin, A.; Tang, J. X.; Li, Y.; Janmey, P. A.; Safinya, C. R. *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *91*, 018103.

[280] Ullner, M.; Staikos, G.; Theodorou, D. N. *Macromolecules* **1998**, *31*, 7921–7933.

[281] Banavar, J. R.; Hoang, T. X.; Maddocks, J. H.; Maritan, A.; Poletto, C.; Stasiak, A.; Trovato, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 17283–6.

[282] Snir, Y.; Kamien, R. D. *Phys. Rev. E* **2007**, *75*, 051114.

[283] Hansen-Goos, H.; Roth, R.; Mecke, K.; Dietrich, S. *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *99*, 128101.

[284] Gonzalez, O.; Maddocks, J. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 4769–73.

[285] Miller, T. F. r.; Vanden-Eijnden, E.; Chandler, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 14559–64.

[286] Huang, X.; Margulis, C. J.; Berne, B. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 11953–8.

[287] Barrat, J.-L.; Hansen, J.-P. *Basic concepts for simple and complex liquids*; Cambridge University Press, Cambridge (UK), 2003.

[288] Groenewold, J.; Kegel, W. K. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 11702–11709.

[289] Rohayem, J.; Bergmann, M.; Gebhardt, J.; Gould, E.; Tucker, P.; Mattevi, A.; Unge, T.; Hilgenfeld, R.; Neyts, J. *Antiviral Res.* **2010**, *87*, 162–178.

[290] Jiang, X.; Wang, M.; Graham, D. Y.; Estes, M. K. *J. Virol.* **1992**, *66*, 6527–6532.

[291] Prasad, B. V.; Hardy, M. E.; Dokland, T.; Bella, J.; Rossmann, M. G.; Estes, M. K. *Science* **1999**, *286*, 287–290.

[292] Chen, R.; Neill, J. D.; Estes, M. K.; Prasad, B. V. V. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 8048–8053.

[293] Ossiboff, R. J.; Zhou, Y.; Lightfoot, P. J.; Prasad, B. V. V.; Parker, J. S. L. *J. Virol.* **2010**, *84*, 5550–5564.

[294] Harrison, S. C.; Olson, A. J.; Schutt, C. E.; Winkler, F. K.; Bricogne, G. *Nature* **1978**, *276*, 368–373.

[295] Ausar, S. F.; Foubert, T. R.; Hudson, M. H.; Vedvick, T. S.; Middaugh, C. R. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 19478–19488.

[296] Shoemaker, G. K.; van Duijn, E.; Crawford, S. E.; Uetrecht, C.; Baclayon, M.; Roos, W. H.; Wuite, G. J. L.; Estes, M. K.; Prasad, B. V. V.; Heck, A. J. R. *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9*, 1742–1751.

[297] White, L. J.; Hardy, M. E.; Estes, M. K. *J. Virol.* **1997**, *71*, 8066–8072.

[298] Oliver, S. L.; Dastjerdi, A. M.; Wong, S.; El-Attar, L.; Gallimore, C.; Brown, D. W. G.; Green, J.; Bridger, J. C. *J. Virol.* **2003**, *77*, 2789–2798.

[299] Zakhour, M.; Ruvoën-Clouet, N.; Charpilienne, A.; Langpap, B.; Poncet, D.; Peters, T.; Bovin, N.; Le Pendu, J. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000504.

[300] Vildevall, M.; Grahn, A.; Oliver, S. L.; Bridger, J. C.; Charpilienne, A.; Poncet, D.; Larson, G.; Svensson, L. *J. Med. Virol.* **2010**, *82*, 1241–1246.

[301] Caspar, D. L.; Klug, A. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **1962**, *27*, 1–24.

[302] Carrillo-Tripp, M.; Shepherd, C. M.; Borelli, I. A.; Venkataraman, S.; Lander, G.; Natarajan, P.; Johnson, J. E.; Brooks, C. L., 3rd; Reddy, V. S. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D436–D442.

[303] Kissmann, J.; Ausar, S. F.; Foubert, T. R.; Brock, J.; Switzer, M. H.; Detzi, E. J.; Vedvick, T. S.; Middaugh, C. R. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 4208–4218.

[304] Hu, Y.; Zandi, R.; Anavitarte, A.; Knobler, C. M.; Gelbart, W. M. *Biophys. J.* **2008**, *94*, 1428–1436.

[305] Zlotnick, A.; Aldrich, R.; Johnson, J. M.; Ceres, P.; Young, M. J. *Virology* **2000**, *277*, 450–456.

[306] Tang, J.; Johnson, J. M.; Dryden, K. A.; Young, M. J.; Zlotnick, A.; Johnson, J. E. *J. Struct. Biol.* **2006**, *154*, 59–67.

[307] Bertolotti-Ciarlet, A.; White, L. J.; Chen, R.; Prasad, B. V. V.; Estes, M. K. *J. Virol.* **2002**, *76*, 4044–4055.

[308] Aniagyei, S. E.; Dufort, C.; Kao, C. C.; Dragnea, B. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 3763–3774.

[309] Bancroft, J. B.; Hiebert, E. *Virology* **1967**, *32*, 354–356.

[310] Daniel, M.-C.; Tsvetkova, I. B.; Quinkert, Z. T.; Murali, A.; De, M.; Rotello, V. M.; Kao, C. C.; Dragnea, B. *ACS Nano* **2010**, *4*, 3853–3860.

[311] Douglas, T.; Young, M. *Science* **2006**, *312*, 873–875.

[312] Manchester, M., Steinmetz, N. F., Eds. *Viruses and nanotechnology*; Springer, 2009.

[313] Aniagyei, S. E.; Kennedy, C. J.; Stein, B.; Willits, D. A.; Douglas, T.; Young, M. J.; De, M.; Rotello, V. M.; Srisathiyanarayanan, D.; Kao, C. C.; Dragnea, B. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 393–398.

[314] Johnson, J. M.; Tang, J.; Nyame, Y.; Willits, D.; Young, M. J.; Zlotnick, A. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 765–770.

[315] Zlotnick, A.; Johnson, J. M.; Wingfield, P. W.; Stahl, S. J.; Endres, D. *Biochemistry* **1999**, *38*, 14644–14652.

[316] Moisant, P.; Neeman, H.; Zlotnick, A. *Biophys. J.* **2010**, *99*, 1350–1357.

[317] Endres, D.; Zlotnick, A. *Biophys. J.* **2002**, *83*, 1217–1230.

[318] Zlotnick, A. *J. Mol. Recognit.* **2005**, *18*, 479–490.

[319] Hagan, M. F.; Elrad, O. M. *Biophys. J.* **2010**, *98*, 1065–1074.

[320] Casini, G. L.; Graham, D.; Heine, D.; Garcea, R. L.; Wu, D. T. *Virology* **2004**, *325*, 320–327.

[321] Chen, C.; Kao, C. C.; Dragnea, B. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 9405–9412.

[322] Grillo, I. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2009**, *14*, 402–408.

[323] Doniach, S. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 1763–1778.

[324] Russell, R.; Millett, I. S.; Tate, M. W.; Kwok, L. W.; Nakatani, B.; Gruner, S. M.; Mochrie, S. G. J.; Pande, V.; Doniach, S.; Herschlag, D.; Pollack, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 4266–4271.

[325] Ortore, M. G.; Spinozzi, F.; Vilasi, S.; Sirangelo, I.; Irace, G.; Shukla, A.; Narayanan, T.; Sinibaldi, R.; Mariani, P. *Phys. Rev. E* **2011**, *84*, 061904.

[326] Tuma, R.; Tsuruta, H.; French, K. H.; Prevelige, P. E. *J. Mol. Biol.* **2008**, *381*, 1395–1406.

[327] Abécassis, B.; Testard, F.; Spalla, O.; Barboux, P. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1723–1727.

[328] Lund, R.; Willner, L.; Monkenbusch, M.; Panine, P.; Narayanan, T.; Colmenero, J.; Richter, D. *Phys. Rev. Lett.* **2009**, *102*, 188301.

[329] Tabor, R. F.; Eastoe, J.; Grillo, I. *Soft Matter* **2009**, *5*, 2125–2129.

[330] Henry, E. R. *Biophys. J.* **1997**, *72*, 652–673.

[331] Schmidt, M.; Rajagopal, S.; Ren, Z.; Moffat, K. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 2112–2129.

[332] Svergun, D. I. *J. Appl. Crystallogr.* **1992**, *25*, 495–503.

[333] Svergun, D. I.; Petoukhov, M. V.; Koch, M. H. *Biophys. J.* **2001**, *80*, 2946–2953.

[334] Putnam, C. D.; Hammel, M.; Hura, G. L.; Tainer, J. A. *Q. Rev. Biophys.* **2007**, *40*, 191–285.

[335] Uetrecht, C.; Barbu, I. M.; Shoemaker, G. K.; van Duijn, E.; Heck, A. J. R. *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 126–132.

[336] Svergun, D. I. *Biophys. J.* **1999**, *76*, 2879–2886.

[337] Jack, R. L.; Hagan, M. F.; Chandler, D. *Phys. Rev. E* **2007**, *76*, 021119.

[338] Speir, J. A.; Munshi, S.; Wang, G.; Baker, T. S.; Johnson, J. E. *Structure* **1995**, *3*, 63–78.

[339] Chou, Y.-y. ; Vafabakhsh, R. ; Doğanay, S. ; Gao, Q. ; Ha, T. ; Palese, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 9101–9106.

[340] Venev, S. V. ; Zeldovich, K. B. *Phys. Rev. Lett.* **2013**, *110*, 098104.

[341] Zhang, C. ; Shao, P. G. ; van Kan, J. A. ; van der Maarel, J. R. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 16651–16656.

[342] Cadena-Nava, R. D. ; Comas-Garcia, M. ; Garmann, R. F. ; Rao, A. L. N. ; Knobler, C. M. ; Gelbart, W. M. *J. Virol.* **2012**, *86*, 3318–3326.

[343] Johnson, B. K. ; Prud'homme, R. K. *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *91*, 118302.

[344] Karnik, R. ; Gu, F. ; Basto, P. ; Cannizzaro, C. ; Dean, L. ; Kyei-Manu, W. ; Langer, R. ; Farokhzad, O. C. *Nano Lett.* **2008**, *8*, 2906–2912.