



HAL
open science

Analyse et modélisation de la résonance plasmonique de surface d'une membrane modèle formée de liposomes supportés pour l'étude de l'interaction biomoléculaire

Meryem Belkilani

► To cite this version:

Meryem Belkilani. Analyse et modélisation de la résonance plasmonique de surface d'une membrane modèle formée de liposomes supportés pour l'étude de l'interaction biomoléculaire. Chimie. Université Claude Bernard Lyon 1; Université de Tunis (Tunisie), 2022. Français. ⟨NNT : 2022LYO1004⟩. ⟨tel-03888488⟩

HAL Id: tel-03888488

<https://cnrs.hal.science/tel-03888488v1>

Submitted on 7 Dec 2022

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.



Distributed under a Creative Commons CC BY 4.0 - Attribution - International License



N°d'ordre NNT : 2022LYO1004

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

réalisée au sein de

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

en co-tutelle avec

L'UNIVERSITE DE TUNIS

Ecole Nationale Supérieure d'Ingénieurs de Tunis

Ecole Doctorale : Chimie de Lyon N° 206

Ecole Doctorale : Sciences et Technologies

Spécialité de doctorat : Chimie - Sciences Physiques

Soutenue publiquement le 08/09/2022, par :

Meryem BELKILANI

Analyse et modélisation de la résonance plasmonique de surface d'une membrane modèle formée de liposomes supportés pour l'étude de l'interaction biomoléculaire

Devant le jury composé de :

DEJEU Jérôme	Maître de Conférences, Université Grenoble Alpes UMR 5250 - DCM	Rapporteur
VIDIC Jasmina MIELE Adriana	Ingénieure de Recherche, INRAE Jouy-en-Josas Professeure des Universités, Université Lyon 1 UMR 5280 - ISA	Rapporteuse Examinatrice
ALIMI Kamel CHAIX Carole	Professeur, Université de Monastir (Tunisie) Directrice de Recherche, CNRS Lyon UMR 5280 - ISA	Examineur Directrice de thèse
ABDELGHANI Adnane	Professeur, Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie (Tunisie)	Directeur de thèse



Ces travaux de thèse ont été réalisés par Meryem BELKILANI sous la direction du Dr. Carole CHAIX et Pr. Adnane ABDELGHANI, au sein de l'équipe Interfaces et Biocapteurs de l'Institut des Sciences Analytiques (ISA - UMR 5280) et l'équipe de Nano-biotechnologie et valorisation des plantes médicinales (UR17ES22) de l'Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie (INSAT-TUNISIE)



Financés par une bourse d'alternance du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique de TUNISIE et soutenus financièrement par l'Institut de Chimie de Lyon (ICL) et l'unité de recherche de Nano-biotechnologie et valorisation des plantes médicinales (UR17ES22)

Réalisés au sein de l'Ecole Doctorale : Chimie de Lyon N° 206 et l'Ecole Doctorale : Sciences et Technologies de l'ENSIT



RESUME

Ces travaux de thèse s'intéressent à l'étude des interactions membranaires avec des biomolécules afin d'améliorer notre compréhension de leurs mécanismes d'action. L'objectif est de développer une méthodologie innovante imitant au mieux les conditions biologiques des cellules et permettant des études d'interaction en temps réel, sans marquage spécifique. À cette fin, une approche de résonance plasmonique de surface multiparamétrique à double longueur d'onde (MP-SPR) a été développée avec succès pour étudier le comportement d'une membrane biomimétique supportée. Cette dernière est constituée de liposomes biotinylés greffés sur une surface d'or recouverte d'une couche de streptavidine avec une grande affinité. Cette stratégie d'ancrage s'est avérée efficace pour maintenir l'intégrité de la structure vésiculaire des phospholipides. Cette couche a été utilisée comme une membrane biomimétique pour étudier la liaison du mono-rhamnolipide, du peptide HA2 du virus de la grippe et du peptide bradykinine (BK). Plusieurs séries de sensorgrammes à différentes concentrations et dans diverses conditions expérimentales ont été générées. La modélisation théorique de la couche de Fresnel à double longueur d'onde a été appliquée pour calculer l'épaisseur (d) et l'indice de réfraction (n) de la couche de liposomes afin de suivre les changements de ses paramètres optiques lors de l'interaction avec les biomolécules. Une étude cinétique des interactions a été réalisée. Les résultats expérimentaux et les calculs théoriques ont montré différents mécanismes d'action induits par ces biomolécules sur la couche de liposomes. Le mono-rhamnolipide a provoqué la destruction de la couche de liposomes. Le peptide HA2 a montré une action pH-dépendante. Il a entraîné un gonflement des liposomes à pH acide, suite à une insertion dans la membrane, sans causer leur destruction. Le peptide BK a révélé un autre mécanisme d'interaction, à savoir une cinétique d'interaction plus lente que celle observée pour le peptide HA2, avec une affinité de liaison plus élevée.

ABSTRACT

The thesis focuses on the study of membrane interactions with biomolecules to improve our understanding of their mechanisms of action. The objective is to develop an innovative methodology that best mimics the biological conditions of cells and allows real-time interaction studies, without specific labeling. To this end, a dual-wavelength multiparametric surface plasmon resonance (MP-SPR) approach has been successfully developed to study the behavior of a supported biomimetic membrane. The latter consists of biotinylated liposomes grafted onto a gold surface covered with a layer of streptavidin with high affinity. This anchoring strategy has been shown to be effective in maintaining the integrity of the phospholipid vesicular structure. This layer was used as a biomimetic membrane to study the binding of monorhamnolipid, influenza virus HA2 peptide and bradykinin (BK) peptide. Several sets of sensorgrams at different concentrations and under various experimental conditions were generated. Theoretical modeling of the dual-wavelength Fresnel layer was applied to calculate the thickness (d) and refractive index (n) of the liposome layer in order to follow the changes of its optical parameters upon interaction with the biomolecules. A kinetic study of the interactions was performed. Experimental results and theoretical calculations showed different mechanisms of action induced by these biomolecules on the liposome layer. The monorhamnolipid caused the destruction of the liposome layer. The HA2 peptide showed a pH-dependent action. It induced a swelling of the liposomes at acidic pH, following insertion into the membrane, without causing their destruction. The BK peptide revealed another mechanism of interaction, namely slower interaction kinetics than that observed for the HA2 peptide, with a higher binding affinity.

*Une pensée à ma famille qui a toujours été là pour moi, que ça soit dans
les bons ou les mauvais moments. . . Sans elle, je ne serais rien.*

J'offre ce travail en témoignage de l'amour, de l'amitié et

de la reconnaissance que je porte à :

Mes parents : Abdessatar et Khamssa

Mes sœurs : Sarra et Siwar

et mon frère : Badr

A tous ceux qui me sont chers

Meryem,

REMERCIEMENTS

Avant de clôturer cette belle et inoubliable expérience que fut ma thèse et de partir vers de nouveaux horizons, je tiens à remercier tous ceux qui ont de près ou de loin contribué à sa réussite et même à ceux qui ont eu la gentillesse de faire de ces trois ans et demi un moment très agréable et profitable.

Je remercie tout d'abord les membres du jury, Madame VIDIC Jasmina et Monsieur DEJEU Jérôme d'avoir accepté de prendre le temps de lire et de rapporter cette thèse, ainsi que Madame MIELE Adriana et Monsieur ALIMI Kamel de m'avoir fait l'honneur d'examiner mon travail.

Ce travail a été réalisé à l'Institut des Sciences Analytiques (ISA - UMR 5280 - Lyon) dirigé par Monsieur Christophe Morell. Je le remercie de m'avoir accueilli durant ces trois ans et demi de thèse.

Je remercie tout particulièrement ma directrice de thèse, Dr. Carole CHAIX, pour m'avoir accueilli dans son équipe Interfaces et biocapteurs à l'ISA et pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse. Merci Carole, pour toute ton implication dans ma thèse, pour tes conseils, ton soutien dans les moments les plus difficiles de la thèse, notamment la rédaction des articles mais aussi la rédaction de la thèse dont les précieux conseils m'ont permis d'améliorer ce manuscrit. J'ai été très heureuse de travailler à tes côtés, malgré toutes les difficultés qu'on a rencontrées ! Tu as une manière toute particulière d'insuffler du dynamisme et de la gaieté, tout en sérieux et en professionnalisme. Tu as été la voix du calme et de la raison pendant ma thèse, toujours là pour me rassurer. Je ne sais pas si j'aurais pu terminer sans, merci encore !

Je tiens également à adresser mes remerciements à mon directeur de thèse, Pr. Adnane ABDELGHANI, pour m'avoir accueilli dans son équipe Nano-biotechnologie et valorisation des plantes médicinales de l'INSAT depuis mon master. Merci Mr. Adnane pour ton aide, tes encouragements, ton investissement, et tes conseils autant sur les aspects techniques que sur l'interprétation des résultats et la rédaction. Je suis très fier de ce que l'on a pu faire ensemble !

J'exprime toute ma reconnaissance à Madame Nicole JAFFREZIC-RENAULT, Directrice de recherche émérite au CNRS, de m'avoir proposé comme candidate pour le sujet de ma thèse. Je tiens à la remercier très sincèrement pour son aide constante durant ces années de travail ainsi que sa disponibilité, sa patience, sa bonne humeur et pour les nombreuses discussions scientifiques que nous avons eues. Merci Madame Nicole !

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à Carole Farre, Ingénieur chimiste à l'ISA. Merci Carole pour ton accompagnement, du début du stage à la fin de la thèse. Tu as toujours été à l'écoute, au moindre problème. Merci pour toute la confiance que tu m'as accordée, au niveau des manip et de l'encadrement. J'ai pris beaucoup de plaisir pendant ces trois ans et demis avec toi !

Je voudrais, par la même occasion, exprimer mon profond respect pour Monsieur Yves CHEVALIER, Directeur de Recherches CNRS, qui m'a accueilli au sein de son laboratoire LAGEPP pour l'élaboration de liposomes. Je tiens à vous remercier également pour votre disponibilité, votre soutien et vos conseils tout au long de ce travail de thèse. Je vous remercie pour tout...

Et pour finir, je remercie toutes les personnes que j'aurais pu oublier de citer ...

« Le rôle de l'infiniment petit est infiniment grand. »

Louis Pasteur

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	3
ABSTRACT	4
REMERCIEMENTS	6
INTRODUCTION GENERALE.....	15
Chapitre I : Revue bibliographique	21
I. Introduction	22
II. Des membranes biologiques aux membranes biomimétiques supportées	22
II.1. Les membranes biologiques	23
II.2. Les membranes biomimétiques modèles.....	27
II.3. Les différents modèles membranaires biomimétiques	28
II.4. Les membranes biomimétiques supportées.....	38
III. Applications des membranes biomimétiques supportées	47
III.1. Microscopie à force atomique (AFM)	48
III.2. Les techniques de fluorescence.....	51
III.3. Microbalance à quartz (QCM)	52
III.4. La Résonance Plasmonique de Surface (SPR).....	54
IV. Conclusion	60
Chapitre II : La théorie de la Résonance Plasmonique de Surface (SPR).....	75
I. Introduction	76
II. Résonance plasmonique de surface et approche plasmonique.....	76
II.1. Historique de la découverte du plasmon de surface	76
II.2. Définition du ‘plasmon de surface’	77
II.3. Caractéristiques du plasmon de surface	78
II.4. Formalisme de Fresnel pour la caractérisation des couches.....	88
II.5. Formalisme de Jung	89
II.6. Formule de Feijter	89
III. Résonance plasmonique de surface multiparamétrique (MP-SPR).....	90
III.1. Description et intérêt de l’approche	90
III.2. MP-SPR à double longueur d’onde : Principe de l’approche	92
IV. Approches mathématiques de l’interaction moléculaire	97

V.	Conclusion.....	99
Chapitre III : Suivi par résonance plasmonique de surface de l'interaction des mono-		
rhamnolipides avec une couche de liposomes supportés 103		
I.	Introduction	104
II.	Préparation et caractérisation des liposomes biotinylés	107
II.1.	Lipides utilisés.....	107
II.2.	Caractérisation des liposomes	107
III.	Suivi par MP-SPR de l'immobilisation des liposomes sur des surfaces modifiées	109
IV.	Formation et modélisation des différentes couches de la puce d'or SPR	113
V.	Etude MP-SPR de l'interaction entre les mono-RLs et la couche de liposomes supportés.....	116
VI.	Publication	120
VII.	Conclusion.....	121
Chapitre IV : Mécanismes d'interaction du peptide HA2 du virus de la grippe et du peptide		
bradykinine avec des liposomes par MP-SPR..... 124		
I.	Introduction	125
II.	Etude de l'interaction du peptide HA2 avec une membrane modèle.....	129
II.1.	Caractérisation physico-chimique des liposomes.....	129
II.2.	Formation de la couche de liposomes supportés	130
II.3.	Etude de l'interaction du peptide HA2 avec la membrane supportée	135
III.	Publication	149
IV.	Etude de l'interaction du peptide BK avec une membrane modèle.....	196
IV.1.	Analyse de l'interaction peptide BK/liposome par MP-SPR	196
IV.2.	Protocole expérimental	198
V.	Conclusion.....	199
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES		204
Annexe 1 : Equations de Maxwell et équation de propagation.....		208
Annexe 2 : Existence du plasmon de surface		210

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

θ_{SPR} : Angle de résonance

n : Indice de réfraction

θ_c : Angle d'incidence critique

k_a : Constante de vitesse d'association

k_d : Constante de vitesse de dissociation

K_D : Constante de dissociation à l'équilibre

T_m : « Melting Temperature » ou Température de transition de phase

TIR : Réflexion Interne Totale

ATR : Réflexion Totale Atténuée

SP : Plasmon de Surface

TE : Transverse Electrique

TM : Transverse Magnétique

MLV : « MultiLamellar Vesicle » ou vésicule multilamellaire

SUV : « Small Unilamellar Vesicle » ou petite vésicule unilamellaire

LUV : « Large Unilamellar Vesicle » ou grande vésicule unilamellaire

GUV : « Giant Unilamellar Vesicle » ou Vésicule unilamellaire géante

DLS : « Dynamic Light Scattering » ou Diffusion dynamique de la lumière

PDI : Indice de polydispersité

NTA : « Nanoparticle-Tracking Analysis » ou analyse du suivi individuel de particules

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

TEM : Microscopie Electronique à Transmission

Cryo-TEM : Microscopie Electronique à Transmission cryogénique ou Cryo-Microscopie Electronique à Transmission

SERS : « Surface Enhanced Raman Spectroscopy » ou spectroscopie Raman exaltée de surface

RMN : « Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy » ou spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire

DPI : « Dual Polarization Interferometry » ou Interférométrie par Double Polarisation

SLB : « Supported Lipid Bilayer » ou bicouche lipidique supportée

SVL : « Supported Vesicle Layer » ou couche vésiculaire supportée

SAM : « Self-Assembled Monolayer » ou monocouche auto-assemblée

MUA : Acide mercaptoundécanoïque

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide RiboNucléique

HA : Hémagglutinine

BSA : Albumine de sérum bovin

PEG : Polyéthylène glycol

PEI : Poly(Ethylène) Imine

LPS : Lipopolysaccharide

BBSA : Biotinylated BSA

CM : « Carboxymethylated dextran » ou carboxyméthyl dextrane

SM : Sphingomyéline

Chol : Cholestérol

CL : Cardiolipine

PC : phosphatidylcholine

PS : phosphatidylsérine

PI : phosphatidylinositol

PE : phosphatidyléthanolamine

DMPC : 1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine

PDDA : Polychlorure de DiallylDiméthylAmmonium

DOGS-NTA : (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[(N-(5-amino-1-carboxypentyl) iminodiacetic acid)succinyl] nickel salt)

DPPC : 1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine

DOPC : 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine

DOPE : 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine

DSPC : 1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphocholine

DPPE : 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine

DPPE : 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine

DPPE : 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine

DPPTE : 1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro- 3-phosphothioéthanol

DSPE : 1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine

POPG : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol

POPE : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanol-amine

DOPS : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (sodium salt)

POPC : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine

PLPC : 1-palmitoyl-2-linoléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine

HSPC : phosphatidylcholine de soja hydrogénée

SOPC : 1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DSPE-PEG (2000) Biotin : 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[biotinyl(polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt).

DNP-PE : N-Dinitrophényl-phosphatidyléthanolamine

DOetPC : 1,2-dioléyl-sn-glycéro-3-phosphocholine

egg-PC : egg phosphatidylcholine.

egg-PG : egg-phosphatidylglycérol

Lyso PC : 1-stéaroyl-2-hydroxy-sn-glycéro-3-phosphocholine

SA : Acide Stéarique

μCP : « Microcontact printing » ou impression par microcontact

SPR : « Surface Plasmon Resonance » ou Résonance plasmonique de surface

SPRi : Imagerie par résonance plasmonique de surface

BALM : « Backside Absorbing Layer Microscopy »

AFM : Microscopie à Force Atomique

QCM : Microbalance à quartz

QCM-D : Microbalance à Quartz et à Dissipation

FRAP : « Fluorescence Recovery After Photobleaching » ou Redistribution de fluorescence après photoblanchiment

FCS : « Fluorescence Correlation Spectroscopy » ou Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence

FRET : « Fluorescence Resonance Energy Transfert » ou Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes

FLIM : « Fluorescence-lifetime imaging microscopy »

EIS : Spectroscopie d'Impédance Electrochimique

MP-SPR : Résonance plasmonique de surface multiparamétrique

SPFS : Spectroscopie de fluorescence des plasmons de surface

IS : « Impedance Spectroscopy » ou Spectroscopie d'impédance

FTIR : « Fourier-Transformed Infrared spectroscopy » ou spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

RL : rhamnolipide

mono-RL : mono-rhamnolipide

di-RL : di-rhamnolipide

CMC : Concentration Micellaire Critique

EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

NHS : N-hydroxysuccinimide

PBS : « Phosphate Buffered Saline » ou tampon phosphate salin

BK : Bradykinine

TRIS : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane

DMAP : 3-diméthylaminopropylamine

INTRODUCTION GENERALE

Depuis des siècles, l'homme cherche à comprendre l'origine des maladies afin de trouver des traitements thérapeutiques. Ceci a amené la communauté scientifique à appréhender les mécanismes biologiques de l'échelle humaine à l'échelle nanométrique par de multiples recherches qui se sont succédées depuis la découverte de la cellule au cours du XVII^e siècle.

La cellule constitue une unité fondamentale des organismes vivants. Elle est délimitée par une membrane biologique, barrière naturelle qui délimite le milieu intracellulaire du milieu extracellulaire. Les membranes remplissent de nombreux rôles, tant structurels que fonctionnels. Elles sont principalement constituées d'une bicouche lipidique qui forme leur architecture de base et dans laquelle sont intégrées des protéines fonctionnelles. Cet ensemble est impliqué dans de nombreux processus cellulaires tel que le transport moléculaire, la reconnaissance moléculaire, la fusion, l'adhésion cellulaire.... En effet, un grand nombre de pathologies peut être associé à des perturbations de la composition, de l'organisation et des propriétés de la membrane biologique. Ces altérations, qui perturbent l'homéostasie des membranes, touchent de nombreux processus cellulaires et contribuent à la progression de la pathologie.

Dans la recherche et le développement de molécules à des fins thérapeutiques ou pour comprendre l'activité biologique de certaines molécules avec les membranes, travailler directement sur des cellules vivantes peut être long et fastidieux, étant donné que les cellules sont difficiles à maintenir dans leur intégrité et que leur culture est relativement longue (au-delà d'une vingtaine de jours), coûteuse, nécessitant des précautions et un environnement contrôlé. De plus, l'étude d'une fonction distincte ou d'un composant particulier est rendue difficile en raison de la complexité des membranes naturelles. De ce fait, il est primordial de disposer des bons outils, avec des modèles membranaires fiables et représentatifs.

Des systèmes modèles de membranes biomimétiques ont été développés dans le but de réduire ce degré de complexité et de faciliter les études ciblant les mécanismes se déroulant à la surface des membranes ou en leur sein. Parmi les modèles de membrane les plus populaires figurent les membranes dites « supportées ». Les structures membranaires lipidiques supportées sont d'excellents systèmes biomimétiques en raison de leur grande ressemblance avec les membranes cellulaires et autres barrières biologiques constituées principalement de

phospholipides. Elles sont importantes pour la recherche grâce à une combinaison de facteurs tels que la facilité de leur formation, le contrôle de leur complexité, leur stabilité et leur applicabilité à une vaste gamme de techniques analytiques différentes. Les structures membranaires lipidiques supportées ont été soigneusement étudiées à l'aide de nombreuses techniques de caractérisation de surface, notamment la spectroscopie de la résonance plasmonique de surface (SPR), la microbalance à quartz (QCM), les techniques de fluorescence, la microscopie à force atomique (AFM), la spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS) [1] et l'interférométrie par double polarisation (DPI) [2]. Les mécanismes de formation des couches lipidiques sur un support ont été appréhendés grâce aux nombreuses études réalisées par ces techniques. Aujourd'hui, les processus d'élaboration de ces structures lipidiques, en solution ou sur un support solide, sont bien maîtrisés. Les surfaces biomimétiques permettent désormais des études pertinentes d'interaction avec les milieux liquides, notamment dans le domaine de la biologie et de la médecine.

En solution, les vésicules lipidiques sont souvent utilisées comme modèle de membrane. Les interactions biomoléculaires ont été étudiées par une grande variété de techniques biophysiques adaptées aux analyses en solution telles que la diffusion dynamique de la lumière (DLS), la spectroscopie RMN et la spectroscopie de fluorescence.

Sur une surface solide, l'assemblage de membranes biomimétiques offre des possibilités attrayantes pour surveiller et caractériser les interactions avec les (bio)-molécules par diverses techniques biophysiques sensibles de détection qui sont également des techniques de caractérisation de surface. Les études exploitent principalement la résonance plasmonique de surface (SPR), la microbalance à quartz (QCM), la microscopie de fluorescence et la microscopie à force atomique (AFM). Ces dernières décennies, de nombreuses recherches ont été menées pour comprendre les mécanismes d'interaction des membranes avec les (bio)-molécules à travers des surfaces biomimétiques. Elles concernent un grand nombre d'analytes, allant de petites molécules telles que des médicaments, des toxines, des peptides, des sucres, à de plus grandes structures telles que des acides nucléiques, des protéines, des enzymes, des anticorps, voire des cellules et des microorganismes entiers tels que des pathogènes (virus, bactéries, etc.).

Les premières études ont porté sur les monocouches et les bicouches de phospholipides comme surfaces biomimétiques [3-6]. En revanche, l'étude de certains mécanismes et processus

cellulaires intéressants avec ce type de membrane demeure limitée et parfois impossible. Plus récemment, des travaux ont été réalisés sur des supports fonctionnalisés par des vésicules lipidiques intactes de type liposome [7-10]. Les liposomes se présentent comme des vésicules constituées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques. Ils sont devenus de véritables outils de recherche dans différents domaines depuis leur découverte par Bangham et *al.* en 1964 [11]. Nous nous sommes intéressés aux systèmes liposomaux, répandus du fait de leur facilité de préparation, leur caractère amphiphile, leur forme vésiculaire mimant une cellule et permettant d'étudier divers processus cellulaires, ou encore leur innocuité en termes de biocompatibilité et biodégradabilité. Les liposomes utilisés dans cette thèse sont préparés à base de phosphatidylcholine (PC) afin d'imiter davantage l'environnement naturel de la membrane cellulaire.

Les travaux de cette thèse se sont intéressés aux interactions biomolécule-membrane, et plus particulièrement aux interactions entre des biomolécules d'intérêt avec des liposomes intacts supportés sur une surface. Pour ce faire, nous nous sommes investies dans deux axes de développement, à savoir :

- L'établissement d'une méthode efficace pour une immobilisation stable de liposomes intacts sur une surface d'or.
- Le développement de méthodes biophysiques et notamment la résonance plasmonique de surface multiparamétrique (MP-SPR) pour le suivi et l'étude de l'interaction biomolécule-membrane.

Dans ce cadre, nous nous sommes particulièrement intéressés aux interactions de trois types de biomolécules ayant une activité biologique différente avec les membranes. Une toxine bactérienne, le rhamnolipide, qui constitue le principal facteur de virulence de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* et deux peptides tels que le peptide HA2 du virus de la grippe et le peptide bradykinine (BK) ont été mis en interaction avec une membrane biomimétique supportée à base de liposomes. Malgré l'étendue des connaissances acquises et les nombreux travaux antérieurs sur les effets de ces biomolécules, leurs mécanismes d'action restent encore compliqués et nécessitent davantage de compréhension. Ainsi notre objectif a été de mieux comprendre leurs mécanismes d'interaction avec la membrane cellulaire qui contribuent notoirement à des maladies sévères chez l'homme.

Nous avons cherché à caractériser et à suivre en temps réel et sans marquage spécifique les interactions de ces biomolécules avec la membrane modèle en utilisant la résonance plasmonique de surface multiparamétrique MP-SPR à double longueur d'onde. A notre connaissance, cette technique n'a pas été utilisée jusqu'à présent pour étudier l'interaction des trois biomolécules présentées dans ce travail avec des membranes modèles. La MP-SPR, avec son mode de balayage SPR large et sa configuration optique multi-longueurs d'onde, peut fournir des informations structurelles, thermodynamiques et cinétiques très importantes sur les membranes et leurs interactions avec des (bio)-molécules. En outre, une détermination théorique unique des propriétés optiques (épaisseur et indice de réfraction) des films ultraminces à l'échelle nanométrique peut être obtenue.

Ce manuscrit s'articule en quatre chapitres :

Tout d'abord, une étude bibliographique aborde la littérature existante en mettant l'accent sur les sujets et les questions cruciales qui ont motivé les recherches présentées dans cette thèse. Ainsi, nous introduisons les différentes notions de base concernant les membranes biologiques naturelles et les membranes biomimétiques modèles, en particulier les liposomes. Ensuite, nous décrivons les principales méthodes d'élaboration des membranes biomimétiques supportées citées dans les travaux antérieurs, et notamment, la bicouche lipidique supportée (SLB) et la couche vésiculaire supportée (SVL). A la fin de ce chapitre, nous illustrons l'application de ces membranes dans l'étude des mécanismes d'interaction de diverses biomolécules et leur caractérisation par les principales techniques de caractérisation de surface.

Le second chapitre, quant à lui, est une présentation de la théorie du phénomène de résonance plasmonique de surface. Nous essayons d'expliquer, d'une manière plutôt brève, les grandes lignes du principe de résonance. Ensuite, nous présentons les avantages de l'utilisation de la technique MP-SPR par rapport à la SPR traditionnelle afin de souligner son intérêt. Nous finissons le chapitre en présentant l'approche à double longueur d'onde de la technique MP-SPR utilisée dans l'analyse optique et théorique de nos résultats.

Les deux derniers chapitres, présentent, interprètent et discutent sur la base des connaissances actuelles les résultats expérimentaux obtenus dans le cadre de cette thèse. Le troisième chapitre a fait l'objet d'une publication parue dans le journal *Langmuir* (2021, 37(26), 7975-7985) et le quatrième chapitre a fait l'objet d'une publication récemment acceptée dans le journal *ACS Applied Materials & Interfaces* et une autre en cours de rédaction.

Le troisième chapitre est consacré à l'analyse de l'interaction entre les mono-rhamnolipides et une couche de liposomes supportés en utilisant la technique MP-SPR à deux longueur d'onde. Nous présentons la caractérisation des liposomes utilisés, ainsi que la méthode efficace pour les immobiliser sur une surface solide. Ensuite, nous présentons l'approche théorique du système multicouches adaptée à l'étude de l'interaction mono-RLs/liposome. Ainsi l'étude de la spécificité et du mécanisme de cette interaction est suivie par MP-SPR et analysée théoriquement pour distinguer les différents changements morphologiques de la couche initiale de liposomes.

Le quatrième chapitre présente l'application de la MP-SPR à deux longueur d'onde pour analyser les interactions d'un analogue du peptide HA2 du virus de la grippe et du peptide bradykinine avec une couche de liposomes supportés. En premier, les liposomes sont caractérisés par DLS, dans des tampons de pH différents. Puis, nous présentons les caractérisations par AFM de la couverture de surface par les liposomes. Enfin, nous rapportons l'analyse en temps réel de l'interaction des deux peptides avec la membrane, dans des tampons de pH différents. L'étude du peptide HA2 est plus développée dans ce chapitre. Les signaux SPR résultant de l'interaction peptide HA2/liposome sont modélisés pour mieux comprendre son mécanisme d'action à différents pH et à différentes concentrations.

Références

- [1] Bruzas, I., Brinson, B. E., Gorunmez, Z., Lum, W., Ringe, E., & Sagle, L. (2019). Surface-enhanced Raman spectroscopy of fluid-supported lipid bilayers. *ACS applied materials & interfaces*, 11(36), 33442-33451.
- [2] Granqvist, N., Yliperttula, M., Valimaki, S., Pulkkinen, P., Tenhu, H., & Viitala, T. (2014). Control of the morphology of lipid layers by substrate surface chemistry. *Langmuir*, 30(10), 2799-2809.
- [3] Rossi, C., Homand, J., Bauche, C., Hamdi, H., Ladant, D., & Chopineau, J. (2003). Differential mechanisms for calcium-dependent protein/membrane association as evidenced from SPR-binding studies on supported biomimetic membranes. *Biochemistry*, 42(51), 15273-15283.
- [4] Papo, N., & Shai, Y. (2003). Exploring peptide membrane interaction using surface plasmon resonance: differentiation between pore formation versus membrane disruption by lytic peptides. *Biochemistry*, 42(2), 458-466.
- [5] Andersson, J., & Köper, I. (2016). Tethered and polymer supported bilayer lipid membranes: Structure and function. *Membranes*, 6(2), 30.
- [6] Andersson, J., Köper, I., & Knoll, W. (2018). Tethered membrane architectures—design and applications. *Frontiers in Materials*, 55.
- [7] Bompard, J., Maniti, O., Aboukhachfe, R., Ausserre, D., & Girard-Egrot, A. (2021). BALM: Watching the Formation of Tethered Bilayer Lipid Membranes with submicron lateral resolution. *Langmuir*, 37(31), 9457-9471.
- [8] Kari, O. K., Rojalín, T., Salmaso, S., Barattin, M., Jarva, H., Meri, S., ... & Urtti, A. (2017). Multi-parametric surface plasmon resonance platform for studying liposome-serum interactions and protein corona formation. *Drug delivery and translational research*, 7(2), 228-240.
- [9] Baird, C. L., Courtenay, E. S., & Myszka, D. G. (2002). Surface plasmon resonance characterization of drug/liposome interactions. *Analytical biochemistry*, 310(1), 93-99.
- [10] Skyttner, C., Enander, K., Aronsson, C., & Aili, D. (2018). Tuning liposome membrane permeability by competitive coiled coil heterodimerization and heterodimer exchange. *Langmuir*, 34(22), 6529-6537.
- [11] Bangham, A. D., & Horne, R. W. (1964). Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of molecular biology*, 8(5), 660-IN10.

Chapitre I : Revue bibliographique

I. Introduction

La complexité des membranes naturelles rend difficile l'étude d'une fonction distincte ou d'un constituant en particulier. Leur importance croissante en biotechnologie médicale a donc conduit au développement de modèles de membranes biomimétiques pour les mimer. Différentes stratégies ont été adoptées dans la littérature pour mettre au point des membranes artificielles en vue d'obtenir un modèle simple et pertinent. Dans ce contexte, ce chapitre est une synthèse bibliographique des nombreuses informations sur les membranes biomimétiques, leurs caractérisations et leurs applications. Il a pour but de présenter le contexte et les enjeux des membranes biomimétiques supportées afin de positionner le travail qui a été réalisé au cours de cette thèse.

Ce chapitre est devisé en deux parties. Dans une première partie, nous présentons la notion générale d'une membrane biologique ainsi que ses principaux constituants. Nous décrivons également les différents modèles de membranes biomimétiques développés à ce jour et plus particulièrement les liposomes. Ainsi, nous présentons les structures, les propriétés, les méthodes d'élaboration et les outils de caractérisation des liposomes. Puis, nous documentons l'état de l'art retraçant notamment les méthodes d'élaboration des membranes biomimétiques supportées et les façons de les former sur un support solide, en particulier la bicouche lipidique supportée et la couche vésiculaire supportée, en nous focalisant notamment sur la méthode que nous avons utilisée.

Dans une seconde partie, nous évoquons l'application des membranes biomimétiques supportées dans l'étude des mécanismes d'interactions biomoléculaires notamment vis-à-vis des protéines membranaires. Nous présentons ainsi les méthodes de caractérisation les plus utilisées, en soulignant le grand intérêt de la technique de résonance plasmonique de surface (SPR) qui est la méthode utilisée dans cette thèse.

II. Des membranes biologiques aux membranes biomimétiques supportées

Cette partie vise à définir les caractéristiques d'une membrane biologique en termes de structure, composition et propriétés en vue de proposer un modèle expérimental pertinent.

II.1. Les membranes biologiques

La cellule est une unité structurale et fonctionnelle de la plupart des organismes vivants, entourée d'une membrane biologique. Les membranes biologiques sont essentielles à la vie en assurant le maintien de l'intégrité cellulaire. Elles jouent un rôle indispensable de barrière imperméable et sélective entre le milieu intérieur et extérieur de la cellule. Les membranes biologiques sont très complexes, tant au niveau de leur organisation que de leur composition. Quelle que soit sa provenance, une membrane est essentiellement formée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont insérées des protéines (Figure 1). La partie lipidique des membranes est composée principalement de phospholipides, de cholestérol et de glycolipides.

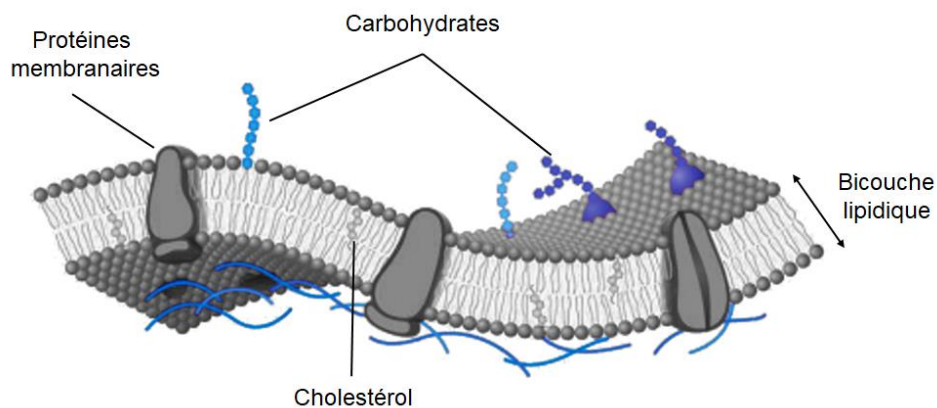


Figure 1. Représentation simplifiée d'une membrane biologique et de ses composants

II.1.1. Les phospholipides

Les phospholipides sont les lipides les plus abondants des membranes biologiques. Ce sont des molécules amphiphiles dotées d'une tête polaire hydrophile et de deux chaînes hydrocarbonées hydrophobes. La plupart des phospholipides sont des phosphoglycérides dont la structure se compose d'un squelette de glycérol auquel sont greffés deux acides gras à chaîne longue, estérifiés chacun en position sn1 et sn2. Les acides gras possèdent généralement 16 ou 18 atomes de carbone et peuvent comporter une ou plusieurs insaturations, généralement non conjuguées. Ceci forme la zone hydrophobe (apolaire) de la molécule de phospholipide. À la troisième fonction alcool du glycérol (position sn3) est lié un groupe polaire, qui constitue la tête polaire hydrophile du phospholipide. Il s'agit d'un groupement phosphate chargé négativement, lui-même estérifié par différents groupements souvent azotés tel qu'un alcool aminé (choline, éthanolamine ou sérine), ou non azotés comme un polyol (inositol). Suivant les

groupements, la tête polaire est chargée positivement, négativement ou globalement neutre (zwitterionique). La nature et la charge globale des phospholipides seront dépendantes du groupement fixé au groupement phosphate. Les plus fréquemment rencontrés sont : la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (PI) qui sont chargés négativement, la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE) qui ont une charge globale neutre dans une solution à pH physiologique (pH 7,4) [1].

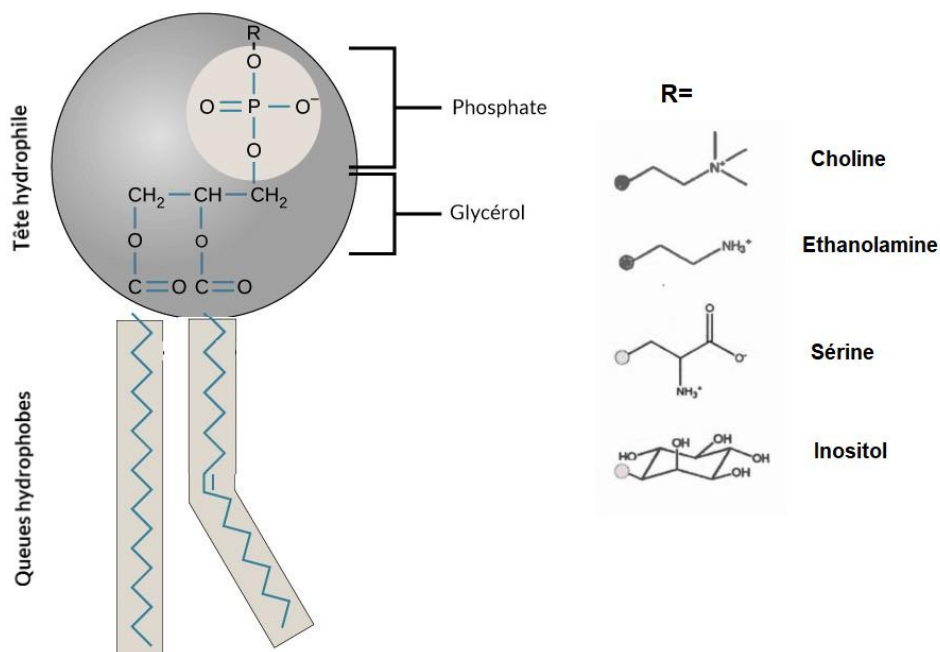


Figure 2. Structure chimique des phospholipides : suivant la nature du groupe R attaché au groupement phosphate, on différenciera la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (PI)

Les phospholipides sont donc constitués de deux parties (polaire et apolaire) qui possèdent des affinités pour deux milieux incompatibles, d'où l'appellation des phospholipides comme molécules amphiphiles ou tensioactifs ou surfactants.

II.1.2. Organisation des phospholipides en solution aqueuse

La présence d'eau a pour effet de conduire les phospholipides à s'auto-organiser en une forme susceptible de diminuer les interactions énergétiquement défavorables entre les groupements hydrophobes des phospholipides et le milieu aqueux. La conséquence est qu'ils présentent leur tête vers le milieu aqueux. Compte tenu de la nature moléculaire des constituants, cet auto-assemblage pourra donner lieu à des micelles (Figure 3.a) (têtes polaires hydrophiles en contact avec le milieu aqueux et queues hydrophobes à l'abri du milieu aqueux) ou bien des bicouches

lipidiques (Figure 3.b) (deux monocouches de lipides associées qui contiennent les queues hydrophobes des lipides sachant que les têtes polaires sont en contact avec la phase aqueuse). Généralement les phospholipides s'associent dans une solution aqueuse sous forme de liposomes (Figure 3.c) (connue sous l'appellation « vésicule lipidique »). En solution, les molécules de phospholipides s'organisent entre elles de sorte que les groupements polaires soient en contact et les groupements apolaires également.

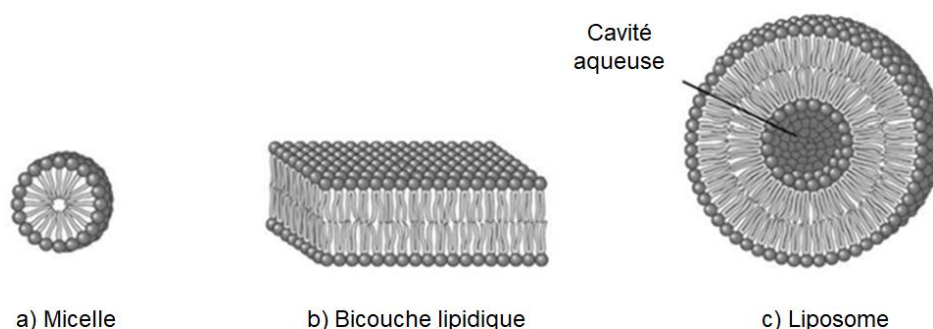


Figure 3. Différents auto-assemblages lipidiques en solution aqueuse. a) une micelle, b) une bicouche lipidique, c) une vésicule lipidique ou liposome

II.1.3. Température de transition de phase d'un phospholipide

Une donnée caractéristique des phospholipides est leur température de transition de phase (T_m : *melting temperature*) qui correspond au passage réversible d'un état ordonné (L_β ou configuration *trans*) vers un état désordonné (L_α ou configuration *gauche*) par le biais d'un état intermédiaire P_β [2, 3] (Figure 4). Il faut savoir qu'à une température inférieure à T_m , les chaînes hydrocarbonées sont étirées au maximum et sont parallèles les unes aux autres et peu mobiles, la bicouche est alors à l'état gel ou phase L_β . Dans le cas d'une température supérieure à T_m , la mobilité moléculaire augmente et les phospholipides passent à l'état fluide ou phase L_α , où les chaînes hydrocarbonées ne sont plus étirées mais désordonnées.

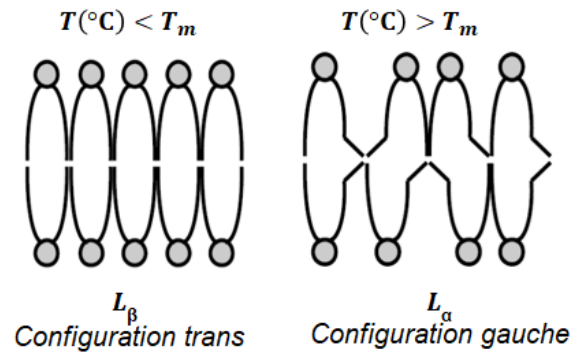


Figure 4. Configuration trans et gauche des phospholipides au sein de la membrane phospholipidique [4]

La température de transition de phase est déterminée par la longueur des chaînes lipidiques et leur degré de saturation. En effet, une chaîne hydrocarbonée longue et saturée entraîne une T_m élevée. En revanche, la T_m diminue quand la chaîne est plus courte et le nombre d'insaturation augmente [4]. Il est à souligner que la température de transition de phase est un facteur déterminant et doit être pris en considération lors de la préparation des liposomes. Les liposomes se forment en cas de température supérieure à la température de transition de phase du phospholipide utilisé. Si des phospholipides de différente nature sont utilisés, il est nécessaire que la température soit supérieure à la T_m du phospholipide la plus élevée [4].

II.1.4. Le cholestérol

Les stérols et plus précisément le cholestérol se définissent comme étant des lipides qui comportent un noyau stéroïde plan se composant de 4 cycles fusionnés, 3 intégrant 6 atomes de carbone et 1 constitué de 5 atomes de carbone. Dans sa partie hydrophile nous pouvons relever un groupement hydroxyle (-OH), quant à sa partie hydrophobe, elle comporte quatre cycles aromatiques ainsi qu'une chaîne hydrocarbonée (Figure 5.a). Il est à noter que dans la bicouche phospholipidique, le cholestérol est inséré parallèlement aux chaînes des acides gras des phospholipides, incluant son groupement hydroxyle polaire orienté vers les têtes polaires des phospholipides [5, 6] (Figure 5.b). Le cholestérol se distingue notamment par le rôle essentiel qu'il possède concernant la perméabilité et la fluidité des membranes. Par ailleurs, il est utilisé dans la formulation des liposomes vu sa susceptibilité de diminuer les effets de la température sur la bicouche phospholipidique. Il faut savoir que le cholestérol s'incruste dans la bicouche phospholipidique. Si la température est inférieure à la température de transition de phase, le cholestérol a pour effet de réduire la rigidité de la membrane. En revanche, si la température est

supérieure à la température de transition de phase, le cholestérol entraîne une diminution du mouvement des phospholipides dans la bicouche. L'on en déduit donc que la fonction du cholestérol est de parer aux situations extrêmes de rigidité ou de fluidité pouvant caractériser la bicouche phospholipidique.

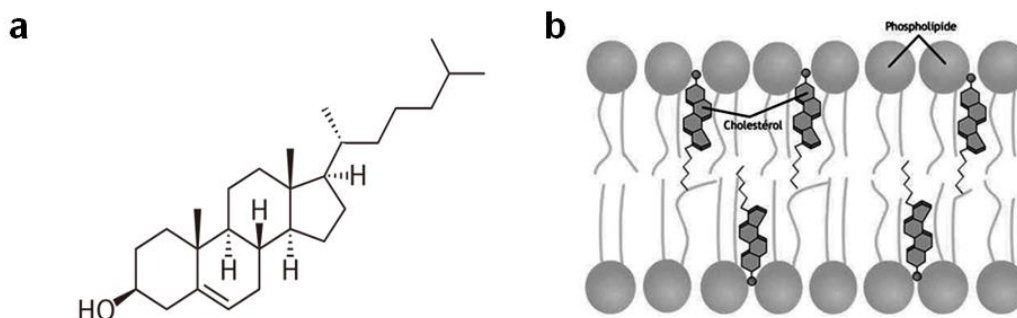


Figure 5. (a) Structure chimique du cholestérol et (b) son orientation dans la bicouche lipidique

II.2. Les membranes biomimétiques modèles

Vu la complexité des membranes biologiques qui réside notamment dans leur hétérogénéité moléculaire (variété des lipides, flexibilité organisationnelle) et leur fluidité, il n'est guère facile d'étudier leur structure et leur fonction. Par ailleurs, la dynamique cellulaire rend difficile l'évaluation de la contribution de la membrane biologique à un phénomène par rapport à la contribution du reste de la cellule [7]. Dans ce contexte, des membranes artificielles qui reproduisent les propriétés et la structure des membranes biologiques représentent des solutions de choix permettant d'atténuer ladite complexité et d'appréhender de façon plus précise des études relatives aux mécanismes ayant lieu à la surface des membranes ou au sein même de celles-ci. Ces membranes, appelées membranes biomimétiques, sont généralement constituées de lipides qui fournissent un environnement optimal aux membranes biologiques. Dans ce contexte, nous pouvons distinguer deux types de modèle, notamment les modèles de membranes libres en solution et les modèles de membranes supportées, confinées sur un support.

Pour reconstituer artificiellement les membranes biologiques et mimer ainsi leur comportement, il suffit de mettre en solution aqueuse le mélange de lipides souhaité. Les lipides s'auto-assemblent alors naturellement pour former différentes sortes de micelles, liposomes, monocouches lipidiques ou de bicouches phospholipidiques planes. La morphologie des phases

formées dépend de plusieurs paramètres d'élaboration dont la concentration, la température, mais aussi la forme géométrique des molécules utilisées.

II.3. Les différents modèles membranaires biomimétiques

Parmi les différentes classes de membranes biomimétiques, on retrouve les monocouches lipidiques, les vésicules lipidiques (liposomes) et les bicouches phospholipidiques planes.

II.3.1. La monocouche de Langmuir

Les monocouches lipidiques, appelées aussi films de Langmuir sont historiquement les premiers modèles développés pour mimer les membranes [8-10]. Elles sont formées par l'étalement de lipides sur une interface air-eau. Le caractère amphiphile des lipides va conduire à l'orientation de leurs têtes polaires vers la phase aqueuse et de leurs queues hydrophobes vers la phase gazeuse [8].

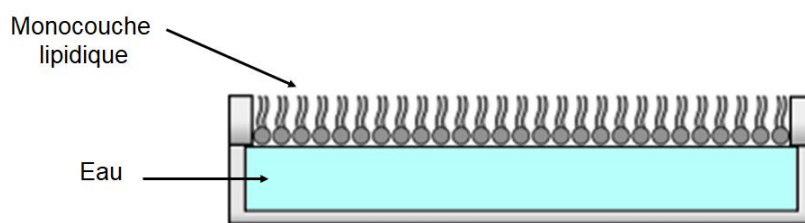


Figure 6. Schéma représentatif d'une monocouche de Langmuir

II.3.2. Les vésicules lipidiques : Les liposomes

Les systèmes vésiculaires lipidiques de type liposomes, constituent un modèle simple de membrane cellulaire, en sus de leur importance dans la délivrance de médicaments. Etant constitués de lipides, leur étude permet de mieux comprendre les propriétés physico-chimiques et l'implication fonctionnelle de la fraction lipidique des membranes biologiques [11-13]. Leur utilisation permet d'étudier leur interaction avec des différentes biomolécules.

II.3.2.1. Structure et propriétés des liposomes

La découverte des liposomes est accordée à Alec D. Bangham suite à son étude publiée en 1964 [14] mais la dénomination "liposomes" n'est apparue que quelques années plus tard avec G. Weissman et G. Sessa [15]. Le terme « liposome » dérive de deux mots d'origine grecque, « lipos » qui signifie gras et « soma » qui signifie corps.

Les liposomes constituent le modèle le plus simple de structure biomimétique cellulaire. Ils ont la forme de vésicules lipidiques fermées, composées d'une ou plusieurs bicouches phospholipidiques qui emprisonnent une partie du solvant dans lequel elles se trouvent [16]. Etant insolubles dans l'eau, le caractère amphiphile des phospholipides détermine leur comportement en solution aqueuse. Ainsi, ces molécules tendent à s'auto-assembler afin de protéger leurs chaînes hydrophobes de l'eau. En particulier, les phospholipides possédant une forme moléculaire cylindrique, comme la phosphatidylcholine, s'auto-assemblent en bicouches lipidiques. Par conséquent, au contact d'une solution aqueuse, ces phospholipides tendent à s'aligner étroitement en bicouches afin de minimiser les interactions défavorables entre leurs chaînes hydrocarbonées et le milieu aqueux. En outre, ces bicouches se referment sur elles-mêmes pour former des vésicules closes et scellées ce qui élimine complètement les interactions défavorables avec le milieu aqueux tout en enfermant un certain volume aqueux.

Le diamètre de ces vésicules varie d'une vingtaine de nanomètres à quelques micromètres. L'épaisseur d'une bicouche phospholipidique est en moyenne de 4 à 6 nm (en fonction de la nature des phospholipides).

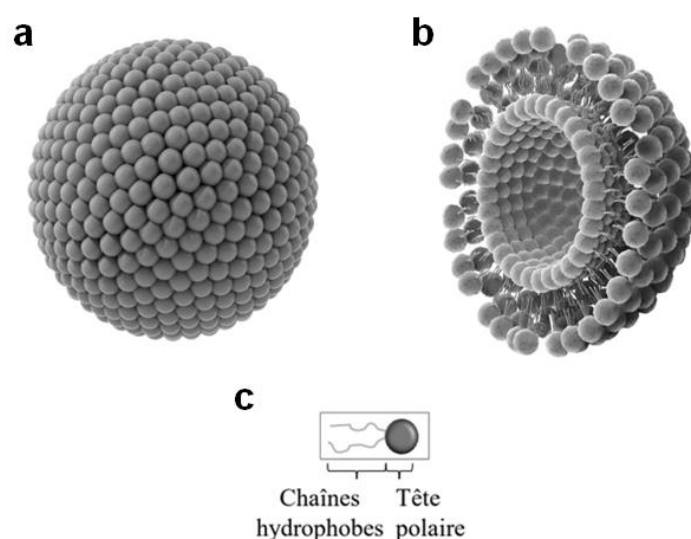


Figure 7. Structure d'un liposome : (a) un liposome fermé, (b) un demi-liposome, (c) un phospholipide

Les liposomes peuvent être classés en fonction de leur nombre de bicouches ou de leur taille. Les liposomes multilamellaires ou MLV (MultiLamellar Vesicles) sont formées de plusieurs bicouches lipidiques, qui délimitent entre elles des compartiments aqueux. Au contraire, les liposomes unilamellaires sont uniquement constituées d'une bicouche et d'un compartiment

aqueux. Ces derniers sont répartis selon leur taille en trois grandes catégories ; les petites vésicules (Small Unilamellar Vesicles : SUV) mesurant de 20 à 100 nm, les grandes vésicules (Large Unilamellar Vesicles : LUV) mesurant de 100 nm à 1000 nm et les vésicules géantes (Giant Unilamellar Vesicles : GUV) de taille supérieure à 1000 nm [17].

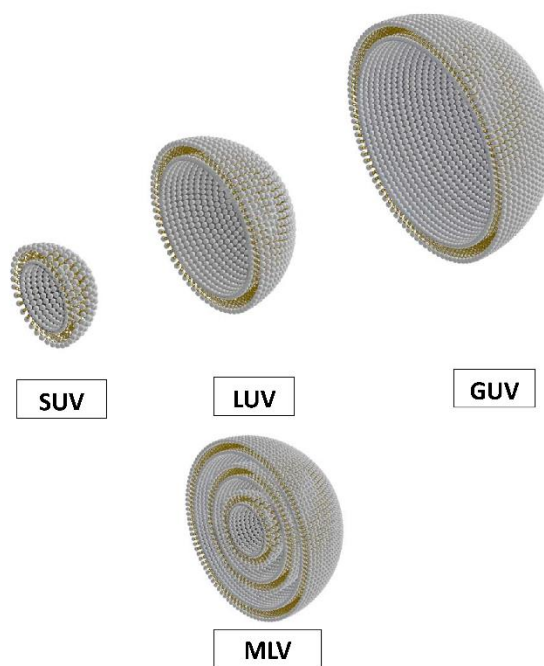


Figure 8. Différentes structures de vésicules : SUV (petites vésicules unilamellaires), LUV (grandes vésicules unilamellaires), GUV (vésicules unilamellaires géantes) et MLV (grandes vésicules multilamellaires). Les vésicules sont présentées comme des demi vésicules pour montrer l'intérieur

La structure des vésicules dépend du protocole de préparation de liposomes [18]. Les méthodes de préparation de base consistent généralement à sécher les lipides afin d'obtenir un film lipidique, puis à le gonfler et à le peler sous agitation énergétique et/ou sonication pour former et disperser des vésicules lipidiques. La préparation des GUV nécessite des protocoles spécifiques différents de ceux de la préparation des SUV et LUV.

Une variété de phospholipides naturels et synthétiques est disponible pour la préparation de liposomes. Un équilibre précis entre les forces électrostatiques, les défauts d'empilement des lipides et la courbure est essentiel pour contrôler la taille, l'homogénéité et la stabilité des liposomes [19]. La composition lipidique modifie la charge globale des liposomes, ainsi que leur taille et leur rigidité. De ce fait, il est possible d'élaborer des liposomes anioniques, neutres ou cationiques, en utilisant des formulations lipidiques très précises. Par ailleurs, les

biomembranes classiques formées de phosphatidylcholine, un lipide zwitterionique, sont faiblement négatives. Les propriétés électrostatiques des membranes dépendent de la fraction de lipides chargés négativement, comme la phosphatidylserine (PS) et les phosphoinositides. D'autre part, les défauts d'agencement et la courbure sont favorisés par les lipides ayant des chaînes acyles insaturées et/ou des petits groupes de tête [19]. Par conséquent, pour former un liposome, il est préférable que l'aire de la tête hydrophile des lipides soit légèrement supérieure à la section de la chaîne aliphatique. Les molécules qui remplissent ces conditions s'auto-assemblent spontanément en vésicules. Tavakoli et *al.* ont récemment décrit la production de différents types de liposomes pour des études d'interaction avec des protéines corona dans des milieux biologiques [20]. En ce qui concerne la formulation, les tailles peuvent aller de 30 à 300 nm et le potentiel zêta peut varier de -60 à +45mV. Un pourcentage de cholestérol peut être utilisé dans la formulation pour rigidifier la structure. La libération d'une molécule encapsulée est diminuée quand le pourcentage molaire du cholestérol augmente et avec des phospholipides de chaînes hydrocarbonées plus longues [21, 22].

Par ailleurs, les liposomes constituent de bons modèles pour étudier ce qui se déroule au niveau membranaire lors de différents processus tels que l'exocytose [23], l'endocytose [24], la fusion des membranes [25] et l'interaction des protéines avec la membrane qui est cruciale pour la régulation des fonctions biologiques [26]. Certains auteurs ont relié l'activité biologique exercée par certaines molécules à leur interaction avec la membrane biologique et ceci dans le but de fournir une base moléculaire qui peut expliquer les mécanismes d'action de ces molécules. Ainsi l'interaction de diverses molécules bioactives avec la membrane biologique a été étudiée en utilisant les liposomes comme modèles mimétiques de la membrane [27-29].

II.3.2.2. Elaboration des liposomes

La littérature a montré qu'il existait une panoplie de méthodes de préparation des liposomes qui ont été développées et détaillées [30, 31]. Aussi, le choix de la méthode est déterminé essentiellement par la taille du liposome attendu et l'application biotechnologique à laquelle des liposomes sont nécessaires. Les GUV sont des vésicules se caractérisant par leur fragilité. Leur formation requiert des méthodes douces et lentes. Concernant la formation de MLV, elle est plutôt établie en recourant à des méthodes qui impliquent des contraintes mécaniques importantes. Il faut souligner que la méthode la plus utilisée est celle de l'hydratation d'un film lipidique sous agitation. Le résultat de cette méthode est la formation de vésicules de type MLV de taille et de lamellarité hétérogènes. La formation de LUV et de SUV est généralement

déterminée par la réduction de la taille et de la lamellarité de MLV précédemment formées sachant que des méthodes de préparation directes existent. Le passage des MLV aux LUV ou aux SUV se fait par le recours à des méthodes qui fournissent de l'énergie mécanique qui aura pour impact de casser les lamelles, parmi lesquelles on retrouve l'extrusion [32], la sonication [33] ou l'hydratation/déshydratation [34]. Autant de techniques permettent d'ouvrir les MLV, ce qui aura pour conséquence la formation des vésicules unilamellaires dont la taille sera essentiellement déterminée par la méthode utilisée et les conditions expérimentales.

Notre travail se penchera précisément sur la formation de liposomes de type SUV par la méthode d'hydratation du film lipidique décrite par Bangham en 1965 [35, 36] et suivi d'un traitement mécanique par sonication.

Force est d'admettre que la méthode d'hydratation du film lipidique est la méthode la plus utilisée en ce qui concerne la préparation des MLV. Dans ce protocole, les phospholipides sont préalablement dissous dans un solvant organique ou dans un mélange de solvants organiques. Le solvant est ensuite évaporé, ce qui entraîne la formation d'un film lipidique mince sur la paroi du ballon. Le film lipidique est hydraté en ajoutant une phase aqueuse sous agitation. L'étape d'hydratation se fait en maintenant une température supérieure à la température de transition de phase (T_m) du phospholipide ou à la T_m la plus élevée si un mélange de phospholipides est utilisé. La conséquence est un gonflement du film phospholipidique au contact de la solution aqueuse, pour ensuite se détacher des parois du ballon et se refermer sur lui-même en emprisonnant cette solution aqueuse. Ce procédé donne ainsi naissance à des vésicules de type MLV. La particularité de cette méthode est qu'elle génère des vésicules avec un important diamètre, de l'ordre de quelques micromètres et la distribution de la taille est très hétérogène. Les composés qui doivent être encapsulés sont ajoutés selon leur solubilité, soit dans la phase aqueuse soit dans le solvant organique contenant les lipides.

En ce qui concerne la réduction de la taille des MLV, elle se fait en les soumettant à une sonication en recourant à un bain à ultrasons ou par le biais d'une sonde à ultrasons [37, 38].

Si l'on opte pour une sonication par sonde à ultrasons, on procède en plongeant directement la sonde d'un sonicateur dans la dispersion de liposomes. En effet, dans la dispersion des liposomes, l'apport d'énergie est très élevé, ce qui entraîne un réchauffement du milieu. C'est pour cela qu'il est impératif de plonger le ballon qui contient la préparation de liposomes dans un bain de glace [39, 40].

Concernant la sonication par l'utilisation d'un bain à ultrasons : le ballon contenant la dispersion liposomiale est directement plongé dans un bain à ultrasons dont la température est supérieure à la T_m du phospholipide [39, 40].

La particularité des ultrasons est qu'ils fournissent de l'énergie acoustique de sorte qu'elle exerce une pression qui fractionne les MLV en petites vésicules unilamellaires de type SUV [41]. Notons que les vésicules traitées sont influencées par la durée et la force de sonication [41]. Ceci dit, une augmentation de la durée et de la force de sonication conduit à une réduction de la taille des liposomes [42].

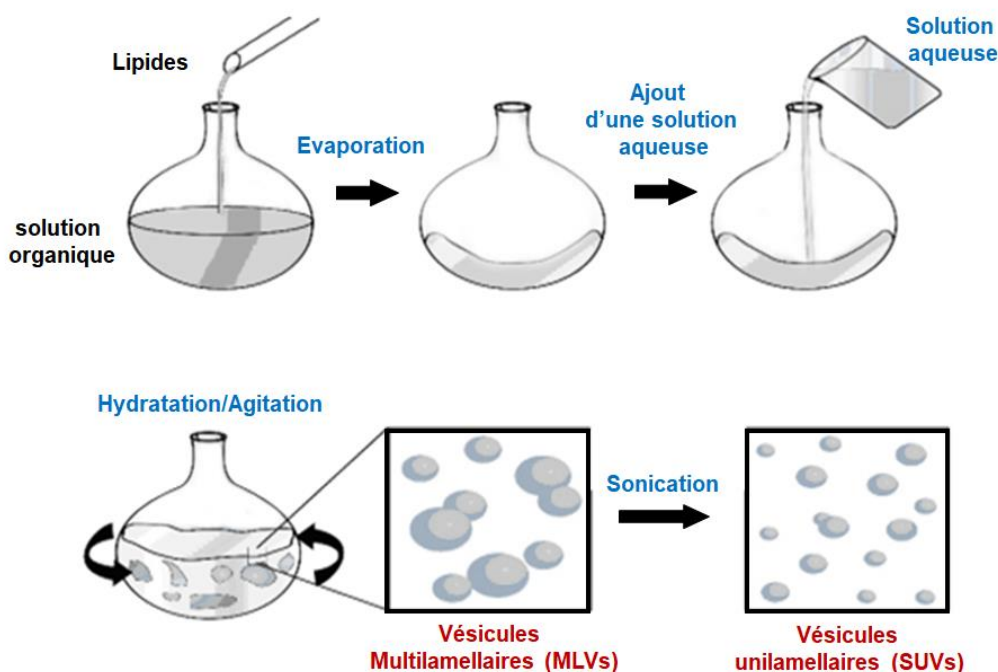


Figure 9. Préparation des liposomes par la méthode de Bangham : Hydratation d'un film lipidique

II.3.2.3. Caractérisation des liposomes

Les liposomes sont caractérisés par leur taille, leur charge, leur morphologie (forme, nombre de couches) et leur stabilité. Cette section est dédiée plus en détails à la méthodologie des différentes techniques de caractérisation des liposomes utilisées dans les travaux de cette thèse.

a. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La diffusion dynamique de la lumière (DLS), connue aussi sous l'appellation "spectroscopie par corrélation de photons", est une technique mise en pratique depuis le début des années 80 pour caractériser des molécules, des particules ou des colloïdes en suspension [43]. Le principe

de fonctionnement de cette technique repose sur la mesure de la lumière diffusée par des particules de quelques nanomètres à quelques micromètres. Etant en état de suspension dans un liquide, ces particules sont animées d'un mouvement aléatoire, appelé mouvement brownien résultant du choc entre la particule et les petites molécules du solvant. Lorsque la suspension de particules est traversée par un faisceau de lumière (laser), celle-ci est alors diffusée dans toutes les directions par les particules. La lumière diffusée est enregistrée au niveau d'un détecteur placé à un angle donné vis-à-vis du faisceau incident. En mesurant la diffusion du faisceau par les particules, il sera possible de déterminer ainsi la taille des particules.

- **Diamètre hydrodynamique**

La DLS sert à déterminer le diamètre hydrodynamique de particules en suspension, pour des tailles comprises entre 1 nm à 1 μm .

L'intensité de la lumière diffusée par les particules est tributaire de leur taille. En effet, une petite taille de particule entraînera un mouvement brownien plus rapide. Le mouvement brownien donne lieu à une fluctuation de l'intensité de la lumière diffusée détectée. De ce fait, l'intensité diffusée par une petite particule varie plus rapidement que celle diffusée par une particule de plus grande taille (Figure 10).

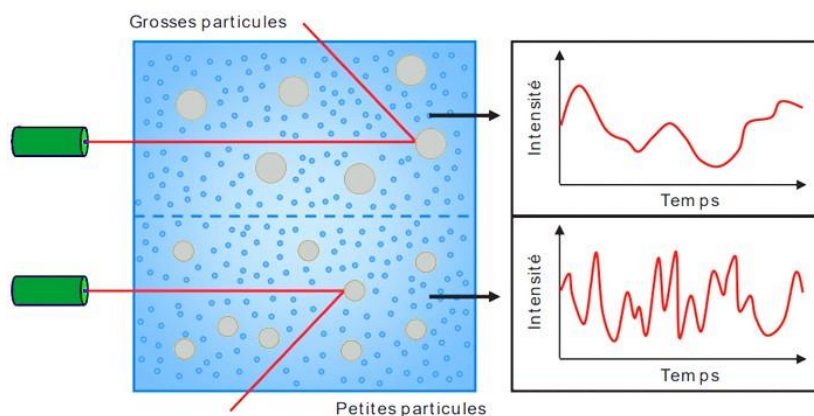


Figure 10. Principe de la diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Un corrélateur enregistre les fluctuations en calculant le temps de décalage entre la détection de chaque particule. Le mouvement brownien est influencé par la température et la viscosité du milieu de dispersion des particules. Le diamètre hydrodynamique est calculé en considérant le

coefficient de diffusion dans l'équation de Stokes-Einstein [44-46], pour des particules sphériques :

$$d = \frac{k \times T}{3 \times \pi \times \eta \times D}$$

Avec ;

d : le diamètre hydrodynamique des particules ou molécules

k : constante de Boltzmann ($k = 1,3806488 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2} \text{ K}^{-1}$)

T : la température

η : la viscosité du milieu

D : le coefficient de diffusion

Il faut savoir que le diamètre hydrodynamique est également dépendant de la force ionique du milieu de dispersion des particules. À la surface des particules, les ions créent une double couche électrique dont l'épaisseur correspond à la longueur de Debye (K^{-1}). La concentration en ions impacte nettement la vitesse de diffusion des particules puisqu'elle modifie la longueur de Debye. En effet, quand la concentration en ions est faible, la double couche s'étend autour de la particule, ce qui réduit la vitesse de diffusion et augmente le diamètre hydrodynamique apparent. Dans le cas contraire, c'est à dire lorsque la force ionique est élevée, la longueur de Debye est faible et le diamètre hydrodynamique diminue.

- **Potentiel zêta**

Le potentiel zêta permet de caractériser la charge de surface d'une particule. Lorsqu'une particule chargée est mise en suspension en présence d'ions, une double couche électrique se forme entre la surface chargée et les ions du milieu. Le potentiel zêta correspond au potentiel électrocinétique d'une particule colloïdale, soit le potentiel situé au niveau du plan de cisaillement, entre la couche d'ions en forte interaction avec les colloïdes (couche de Stern) et la couche dite diffuse de la double couche électrique formée en surface du colloïde. Le potentiel zêta est déterminé par électrophorèse à laser Doppler. Une tension est appliquée entre deux électrodes, ce qui permet d'attirer les particules chargées par l'électrode de charge opposée. Une forte charge de la particule entraîne un déplacement plus rapide. Par ailleurs, la vitesse est

mesurée en fonction de la mobilité des particules. Au moyen de l'équation d'Henry, on détermine le potentiel zêta comme suit [47] :

$$Ug = \frac{2 \times \varepsilon \times \zeta \times f(ka)}{3\eta}$$

Où :

Ug =mobilité électrophorétique

ε = constante diélectrique

ζ = potentiel zêta

$f(ka)$ = fonction de Henry, avec ka est une mesure du rapport entre le rayon de la particule à la longueur de Debye.

η = viscosité du milieu

b. Etude de la morphologie des liposomes

Les liposomes peuvent avoir une ou plusieurs bicouches lipidiques, et être sphériques ou ellipsoïdaux. Ces propriétés influencent la stabilité des liposomes, d'où la nécessité de leur caractérisation morphologique.

Les techniques microscopiques couramment utilisées pour l'imagerie des liposomes en solution sont la microscopie électronique à balayage (MEB) et la microscopie électronique à transmission (TEM). La microscopie électronique à balayage utilise les électrons rétrodiffusés et les électrons secondaires émis par l'échantillon, tandis que la microscopie électronique à transmission utilise les électrons transmis pour former une image [48].

La particularité de la microscopie électronique à balayage est qu'elle donne des informations relatives à la morphologie des liposomes et leur degré d'agrégation au sein d'un échantillon [49-51]. Néanmoins, cette technique a certaines limites en ce qui concerne la caractérisation des liposomes du fait que, par exemple, elle ne permet pas d'observer la structure interne des liposomes. Des difficultés sont également rencontrées lorsqu'il s'agit de différencier clairement les liposomes du milieu environnant. Ce problème s'accroît davantage dans le cas où les liposomes étudiés ont tendance à adhérer les uns aux autres en formant des agrégats [48].

En revanche, le recours à la microscopie électronique à transmission apporte des informations sur la taille des particules, la forme et le nombre de lamelles qui apparaissent comme des couches de surface [48]. Contrairement à la microscopie électronique à balayage, l'observation de la morphologie des liposomes et l'identification de leur structure uni ou multilamellaire par TEM est bien connue dans la littérature [52-54].

Le principe de fonctionnement de la TEM repose sur le passage d'un faisceau d'électrons à travers un échantillon très mince. Celui-ci est ensuite guidé par un système de lentilles magnétiques et forme au final une image. Une partie des électrons est alors absorbée par la matière selon la densité de celle-ci. Le contact du faisceau d'électrons avec la matière engendre l'apparition de différents types de rayonnements qui permettent de caractériser l'échantillon en termes de forme, taille, porosité, cristallinité et composition élémentaire. Le faisceau transmis a donc pour effet de former une image qui correspond à la projection en deux dimensions de l'objet d'étude. Les rayons X sont exploités pour déterminer la composition chimique du matériau. Quant au faisceau diffracté, il est analysé pour déterminer l'organisation tridimensionnelle des atomes et caractériser la structure cristalline des matériaux.

La TEM est une technique très efficace mais elle nécessite une préparation complexe des échantillons de suspension liposomiale. Deux méthodes de préparation des échantillons sont proposées dans la littérature : le TEM cryogénique (Cryo-TEM) [55] et la coloration négative [56].

Le principe de la méthode Cryo-TEM consiste à effectuer une analyse TEM tout en maintenant l'échantillon à des températures cryogéniques. Dans un premier temps, les échantillons de suspension de liposomes sont soumis à une cryogénéisation dans du propane liquide (Température < 230 K). Puis l'échantillon solide est fractionné à 123 K et une reproduction de la surface est effectuée par sublimation d'une fine couche de carbone sous vide à la surface de l'échantillon. Une ombre de la réplique est produite à l'aide d'une vapeur de platine. On nettoie ensuite la réplique avec de l'eau et de l'acétone, on la place sur une grille de cuivre et on l'observe au TEM.

Dans le cas de la coloration négative, on fait absorber les échantillons de suspension liposomiale sur une grille métallique recouverte d'un mince film de carbone. On élimine l'excès d'eau à l'aide de papier buvard. La grille est ensuite recouverte d'une solution contenant un agent de contraste, comme le tétraoxyde d'osmium ou l'acétate d'uranyle, pendant quelques secondes, puis

la solution est absorbée. L'agent de contraste se fixe de manière préférentielle sur le bord des particules absorbées. En raison de sa masse atomique élevée, l'agent de contraste dévie les électrons dans le diaphragme de l'objectif. Par conséquent, l'échantillon biologique apparaît plus clair que son environnement, d'où le nom de coloration négative. Dans les images obtenues au TEM, l'échantillon apparaît blanc sur un fond sombre.

Gao et *al.* [57] ont caractérisé par TEM à coloration négative des liposomes formés de phosphatidylcholine de soja, du cholestérol et PEG-ylés à la surface. Ces liposomes ont encapsulé un triterpène, l'acide oléanolique. Les images obtenues ont révélé la formation de vésicules sphériques de diamètre moyen de 100 nm (Figure 11). Autour de ces vésicules, une structure en bicouche a été clairement visualisée. Les clichés ont également permis de montrer que les liposomes contenant le tensioactif (Tween-80) présentaient moins de particules adhérentes les unes aux autres en comparaison de ceux ne contenant pas le Tween-80.

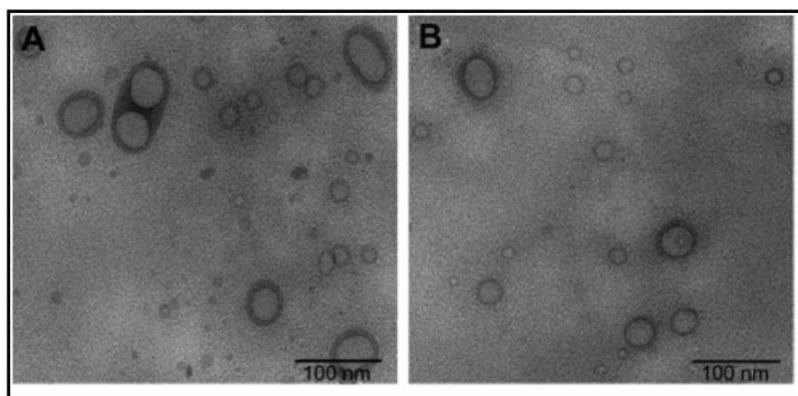


Figure 11. Images obtenues par microscopie électronique à transmission pour des liposomes PEG-ylés encapsulant l'acide oléanolique. (A) : formulation sans le Tween-80 et (B) : formulation avec le Tween-80 [57]

La Cryo-TEM est la méthode utilisée pour étudier la morphologie des liposomes dans cette thèse.

II.4. Les membranes biomimétiques supportées

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés plus en détail aux modèles membranaires biomimétiques supportés sur des surfaces solides, en particulier les membranes biomimétiques vésiculaires. Outre leur utilité pour la modélisation de membranes, les

liposomes présentent un grand intérêt puisqu'ils peuvent intervenir dans le processus de formation des deux principales surfaces biomimétiques membranaires, à savoir la bicouche lipidique supportée (SLB) et la couche vésiculaire supportée (SVL) [58, 59]. Ces membranes modèles formées sur une surface solide présentent le sérieux avantage de les rendre physiquement stabilisées et localisées, très pratique pour leur étude par des techniques de caractérisation de surface.

Les modèles les plus appropriés de bicouches phospholipidiques biomimétiques doivent répondre aux exigences suivantes :

- Il doit s'agir de structures fluides comportant deux couches de phospholipides authentiques.
- Les phospholipides doivent délimiter deux compartiments aqueux distincts ("cis" et "trans") des deux côtés de la bicouche.
- La bicouche doit être exempte de défauts pour éviter les canaux préférentiels pour les électrons, les ions et/ou les petites molécules.
- Leur préparation doit être facile, reproductible, robuste et stable pendant de longues périodes.
- Cette structure semblable à une membrane doit pouvoir être assemblée sur différents types de surfaces pour permettre divers types de détection ou d'analyse [60].

Les deux prochaines parties traiteront les deux principales catégories de membranes biomimétiques supportées, décrivant leurs méthodes d'élaboration et de caractérisation.

II.4.1. La bicouche lipidique supportée (SLB)

Les bicouches lipidiques supportées (SLBs) représentent le modèle le plus simple, où une bicouche lipidique repose sur un support solide. Les SLBs ont été découvertes dans les années 80 par l'équipe Tamm et Mc Connell [61, 62] puis sont devenues très répandues en raison de leur facilité de préparation, leur robustesse et le fait qu'elles peuvent être étudiées par de nombreuses techniques de caractérisation de surface. Traditionnellement, leur formation repose sur la fusion ou l'éclatement de liposomes sur une surface hydrophile (mica, verre, oxydes métalliques...) puis du réarrangement des lipides et de leur auto-assemblage pour éviter les interactions hydrophobes-hydrophiles. [63, 64]. Dans la méthode conventionnelle de fusion de vésicules, lorsque de petites vésicules (<100 nm) sont ajoutées à une surface solide, elles s'adsorbent à la surface et, si l'énergie d'adhésion entre la membrane et le support est

suffisamment élevée, elles se rompent et fusionnent ensuite pour former une bicouche lipidique continue sur des supports hydrophiles [65]. Toutefois, si l'énergie est insuffisante, les vésicules fixées à la surface restent intactes [66]. Les propriétés chimiques de surface du substrat solide peuvent donc faciliter la formation des SLBs [67, 68], ainsi que les conditions expérimentales telles que la composition des lipides, la force ionique [69], le pH de la solution [70] et la pression osmotique [71]. Anderson et *al.* [72] ont étudié la formation de bicouches phospholipidiques du lipide neutre (zwitterionique) dimyristoyl-phosphatidylcholine (DMPC) sur diverses surfaces de verre à partir de vésicules dans diverses solutions aqueuses. Ils ont montré que les vésicules non chargées forment facilement des bicouches sur la silice chargée négativement dans des conditions de forte salinité mais n'adhèrent que faiblement dans des conditions de faible salinité.

Les SLBs se forment sur un support hydrophile avec une épaisseur qui varie généralement entre 4 et 7 nm suivant les lipides qui la constituent et sont séparées du support par une fine couche aqueuse d'environ 1 à 3 nm d'épaisseur (Figure 12). C'est cette fine couche qui permet à la bicouche de conserver une certaine fluidité et qui permet à la bicouche de ne pas être totalement fixée au support [73, 74].

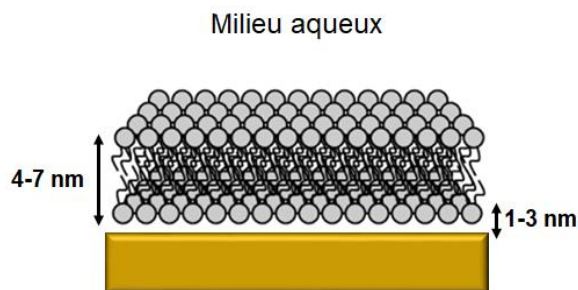


Figure 12. Schéma d'une bicouche lipidique supportée sur une surface hydrophile

Il existe une autre approche récente pour développer les SLBs : notamment la formation de bicouches attachées à un support. Le principe de cette formation est l'utilisation d'espaces entre le support et la membrane. L'attachement des espaces au support est réalisable par un traitement préalable du support par une chimie de surface qui permet ensuite la fixation de l'espaceur [75]. Pour le support solide, il s'agit généralement du verre, du mica ou encore de l'or. Ce sont en effet des matériaux pour lesquels il existe une chimie de surface développée, et pour lesquels de nombreuses techniques de caractérisation sont adaptées [75].

Sur une surface d'or, les SLBs peuvent être générées sur une monocouche auto-assemblée (SAM) d'alcanethiol. Dans la littérature, la stratégie principale pour stabiliser la bicouche membranaire déposée consiste à utiliser des thiolipides attachés à la surface d'or sous la forme d'une SAM mixte avec d'autres composés thiolés (Figure 13.a) [76-78]. Les thiolipides, en s'insérant dans la bicouche phospholipidique, permettent d'ancrer de manière stable le modèle de membrane sur la surface.

D'autres systèmes espaceurs existent, comme un système avidine-biotine utilisant la très forte affinité entre ces deux molécules en accrochant une membrane comportant des lipides biotinylés à un support greffé de streptavidine, ou encore l'ancrage par des brins d'acides nucléiques complémentaires les uns aux autres [79, 80]. Dans notre groupe, nous avons observé qu'une bicouche de phospholipides pouvait être formée en ancrant un lipide biotinylé sur une couche de streptavidine déposée sur une surface d'or [81].

Une autre approche a utilisé des thiopeptides pour attacher la membrane. Ceux-ci sont construits sur la base d'un espaceur flexible comprenant un peptide court qui possède à une extrémité un groupe de thiol et à l'autre extrémité un lipide [82] (Figure 13.a). Une bicouche lipidique a également été élaborée sur des couches de polymères fonctionnalisés par des lipides, en utilisant des polymères tels que le poly(éthylène) imine (PEI) [82], le polyéthylène glycol (PEG) [83], le polychlorure de diallyldiméthylammonium (PDDA) [84], ou bien un polymère amphiphile [85]. (Figure 13.b)

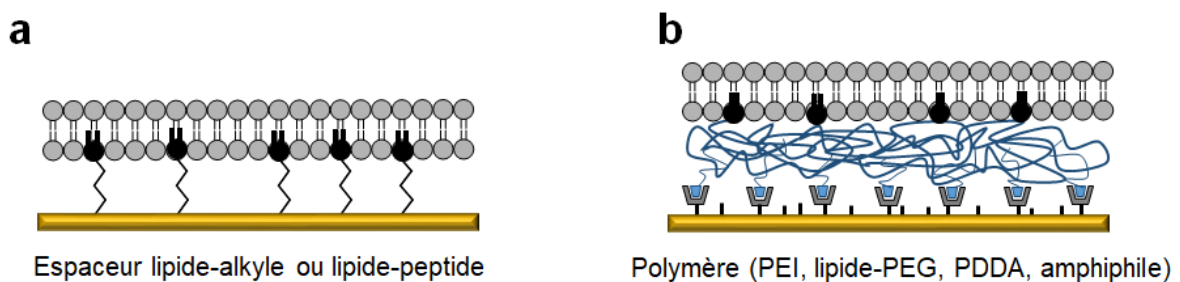


Figure 13. Schéma d'une bicouche lipidique attachée à un support solide par des espaceurs. (a) Espaceur de type lipide-alkyle ou lipide-peptide, (b) une couche d'un polymère

Ces stratégies permettent d'obtenir une membrane modèle bien définie dans laquelle les couches lipidiques supérieure et inférieure sont fluides et avec une couche aqueuse supplémentaire entre la puce et la membrane. L'un des avantages de cette bicouche lipidique par rapport à la monocouche est qu'elle imite la membrane cellulaire. Il est possible d'inclure des protéines

transmembranaires sous une forme active dans la bicouche pour étudier leurs propriétés et leur activité de transfert.

II.4.2. La couche vésiculaire supportée (SVL)

Ce type de membranes biomimétiques fera l'objet d'une étude privilégiée dans nos travaux. Les SVLs ont suscité une recherche intensive au cours de la dernière décennie et ont montré un grand potentiel dans les applications biologiques et biomédicales. Ces développements ont été inspirés par le fait que les liposomes ressemblent aux cellules biologiques et conservent structurellement les propriétés inhérentes aux membranes lipidiques naturelles. Les liposomes immobilisés sur une surface ont généralement été étudiés en tant que système modèle simple pour des applications biocapteur [86]. A des fins thérapeutiques, les liposomes immobilisés sur un dispositif biomédical ont été considérés comme un système potentiel de délivrance locale de médicaments qui libère immédiatement les médicaments et réduit les effets toxiques sur d'autres organismes, ce qui renforce l'effet thérapeutique du médicament [87].

Par rapport aux SLBs, les SVLs présentent plusieurs avantages en termes d'applications, parmi les plus fréquentes on peut citer :

- L'étude des interactions biomoléculaires de manière efficace grâce au rayon de courbure de la vésicule qui est un paramètre important.
- L'étude de différents mécanismes tels que l'étalement, la fusion, la rupture ou la destruction de la bicouche lipidique des vésicules.
- L'étude de la perméabilité de la bicouche lipidique, par exemple, en changeant la solution aqueuse externe, on peut mesurer la vitesse à laquelle la solution contenue dans les liposomes diffuse à travers la bicouche lipidique.
- L'étude de la fonctionnalité des protéines en insérant des protéines membranaires purifiées dans les liposomes pour former des protéoliposomes. Cela permet par exemple de mimer l'incorporation des protéines dans les membranes cellulaires.
- L'encapsulation dans leur compartiment interne des composés hydrophiles (ions, marqueurs, analytes, médicaments, gènes ...), ce qui est un plus pour des études mécanistiques par rapport aux bicouches. On peut étudier des mécanismes de fuites, de relargage, de diffusion...

De plus, les SVLs offrent une meilleure sensibilité que les SLBs et sont physiologiquement plus pertinentes. Néanmoins, l'obtention de couches stables de liposomes intacts n'est pas évidente car, en général, les liposomes se rompent au contact des surfaces solides en formant des bicouches.

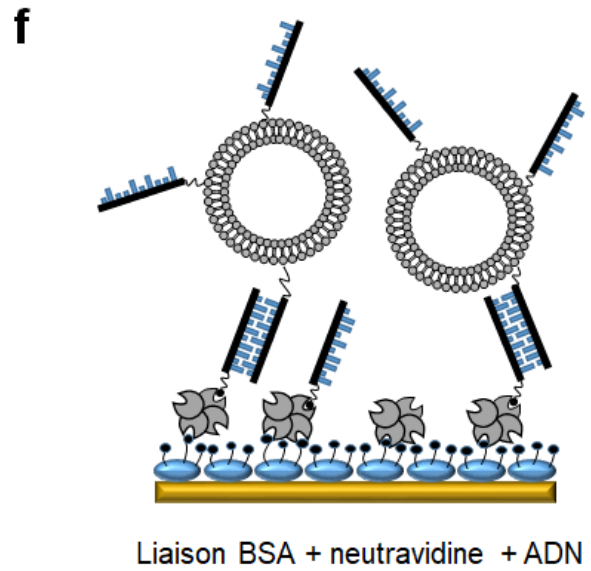
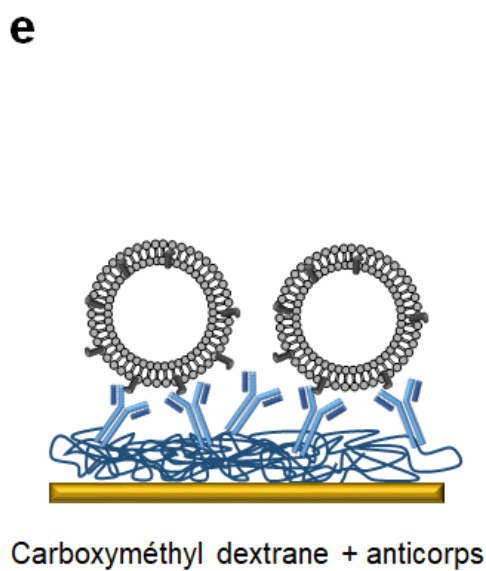
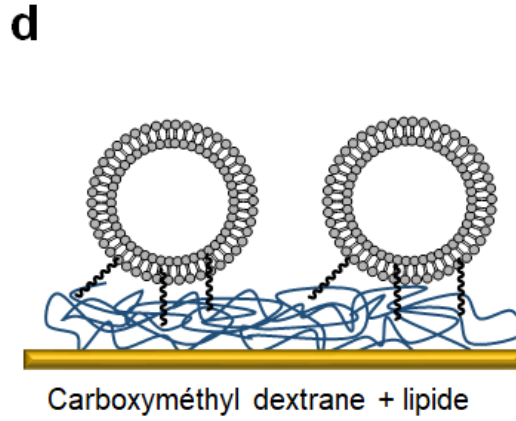
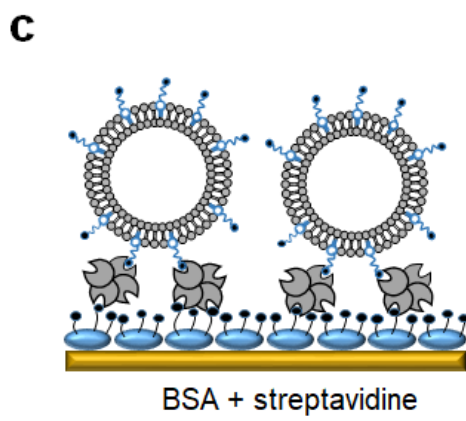
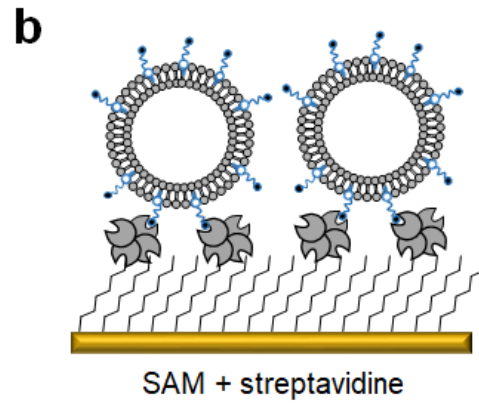
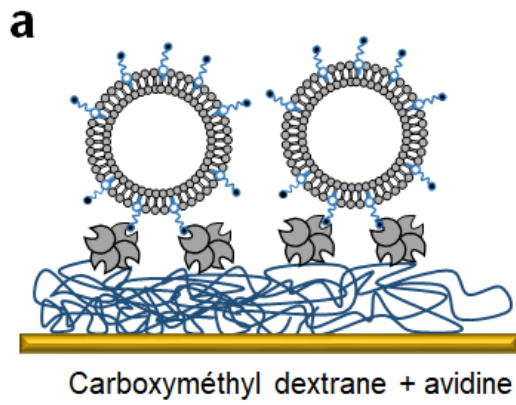
Généralement, les SVLs se forment sur les supports solides soit par la formation de liaisons non covalentes, ou par la formation de liaisons covalentes en synthétisant des liposomes modifiés par des groupes d'ancrage [88].

Le comportement des liposomes sur une surface diffère considérablement selon le type de surface et les conditions expérimentales. Reimhult et *al.* [89-91] et Dimitrievski et Kasemo [92] ont examiné en détail les facteurs qui déterminent la stabilité des liposomes adsorbés. Ils ont abouti à la conclusion que les facteurs les plus importants qui conditionnent le destin des liposomes intacts lors de l'adsorption sont la composition lipidique et la charge de surface, bien que la taille et la concentration des liposomes, la température et la pression osmotique peuvent également jouer un rôle. Par conséquent, les vésicules neutres peuvent former des SVLs sur des surfaces de densité de charge modérée, à basse température et à faible gradient osmotique.

Les méthodes permettant d'immobiliser des liposomes en maintenant leur structure initiale sur des substrats solides ont suscité une attention considérable dans le monde de la recherche. Diverses méthodes simples et reproductibles d'immobilisation de liposomes intacts en recourant à des interactions moléculaires, telles que les interactions avidine-biotine [93], l'hybridation de l'ADN [94], ou des réactions chimiques [95] ont été rapportées.

Les premières méthodes ont exploité l'interaction avidine ou streptavidine-biotine. Des liposomes contenant une faible proportion de lipides biotinylés ont été retenus de manière stable sur une puce fonctionnalisée par une couche d'avidine greffée de manière covalente sur une matrice de carboxyméthyl dextrane [96-98] (Figure 14.a). Certains auteurs ont élaboré une monocouche plane de streptavidine directement sur une SAM mixte de poly (oxyde d'éthylène) à terminaisons biotine et hydroxyle sur une surface d'or, ce qui a permis le développement d'une couche intacte de liposomes biotinylés [99, 100]. Un film dense et homogène de liposomes biotinylés a aussi été formé sur une couche de streptavidine greffée de manière covalente sur une SAM d'acide mercaptoundécanoïque (MUA) [81] (Figure 14.b). Stamou et *al.* ont également réussi à adresser des liposomes biotinylés en monocouche sur un microréseau en modelant des régions de BSA biotinylées par μ CP (impression par microcontact) et en formant

ensuite une couche de streptavidine pour ancrer les liposomes [101] (Figure 14.c). Biacore a commercialisé en 2000 une puce élaborée avec des groupes lipophiles fixés à la surface d'une matrice de carboxyméthyl dextrane (puce de détection L1). Des liposomes intacts ont été retenus de manière stable sur cette surface après injection [102, 103] (Figure 14.d). Stahelin et *al.* ont comparé la nature des couches lipidiques formées après injection de liposomes sur deux types de surface, à savoir une surface hydrophobe formée par des groupes alcanethiol et une surface recouverte par le carboxyméthyl dextrane (puce de détection Biacore Carboxymethylated dextran (CM)). Ils ont confirmé qu'une monocouche phospholipidique supportée était obtenue sur la surface d'or fonctionnalisée par des groupes alcanethiol tandis qu'une monocouche de liposomes intacts était formée sur le carboxyméthyl dextrane [59]. MacKenzie et *al.* ont exploité l'interaction stable entre un lipopolysaccharide (LPS) et l'anticorps spécifique du LPS pour immobiliser les liposomes sur une puce de détection CM [104, 105] (Figure 14.e). Une stratégie originale de structuration *via* la liaison d'ADN double brin a aussi été rapportée, qui pourrait être utilisée pour assembler un réseau de liposomes 3D pour les études SPR [106, 107] (Figure 14.f). Ma et *al.* [95] ont exploité la réaction de Staudinger afin d'immobiliser des liposomes fonctionnalisés par des groupes triphénylphosphine sur une lame de verre modifiée par des fonctions azide (Figure 14.g). Enfin récemment, Bompard et *al.* ont immobilisé des liposomes contenant un ratio molaire de 2 % d'un lipide chélateur appelé DOGS-NTA sur un substrat d'or SPR fonctionnalisé par des peptides *via* la formation d'un complexe histidine-NTA-nickel [108] (Figure 14.h).



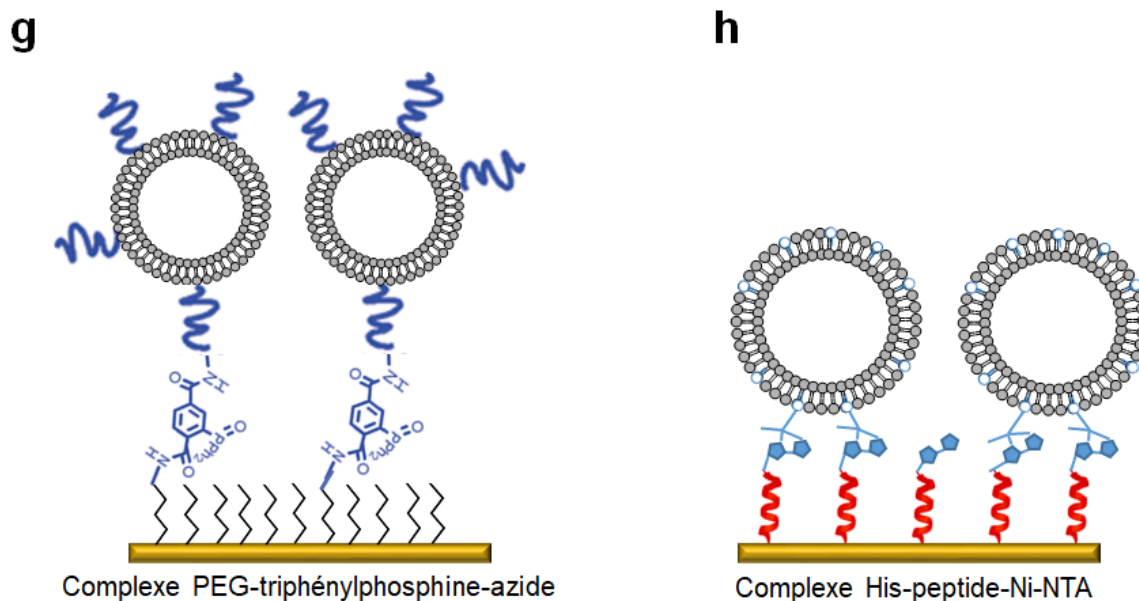


Figure 14. Différentes méthodes d'immobilisation des liposomes intacts sur des substrats solides

II.4.3. Intercalation des protéines dans la membrane biomimétique supportée

Les protéines membranaires accomplissent un grand nombre de tâches biologiques essentielles. Cependant, elles ne peuvent pas être étudiées en dehors de leur environnement naturel, car leur structure et leur fonction naturelles sont compromises lorsque la protéine ne réside pas dans la membrane cellulaire. La recherche menée au cours des dernières décennies s'est orientée vers la mise en œuvre de fonctionnalités dans la membrane biomimétique pour fournir un environnement contrôlé, semblable à celui d'une membrane, dans lequel ces protéines peuvent être étudiées dans leur forme et leur fonction natives sans interférence avec d'autres composants membranaires.

Pour introduire des fonctions biologiques dans des systèmes de membranes lipidiques, il faut tenir compte de deux facteurs importants : a) la conformation et la fonction natives de la protéine doivent être conservées, et b) la flexibilité/fluidité du système doit être adéquate pour les changements de conformation ou les interactions physiologiques.

Il existe deux techniques principales d'intercalation des protéines dans une bicouche lipidique. La première technique consiste à reconstituer la membrane à partir de protéines pré-purifiées et mélangées à des lipides [109]. La seconde utilise des protéoliposomes qui sont isolés directement de la source cellulaire et contiennent toutes les protéines associées à la membrane

exprimées par une lignée cellulaire particulière [100]. La première approche permet d'étudier spécifiquement l'activité d'une protéine particulière tandis que la seconde minimise le risque de dénaturation des protéines membranaires qui sont généralement sensibles aux étapes de purification. Des protéines associées à des liposomes (Figure 15.a) ou à des bicouches lipidiques supportées (Figure 15.b) peuvent être élaborées à partir de liposomes natifs ou synthétiques.

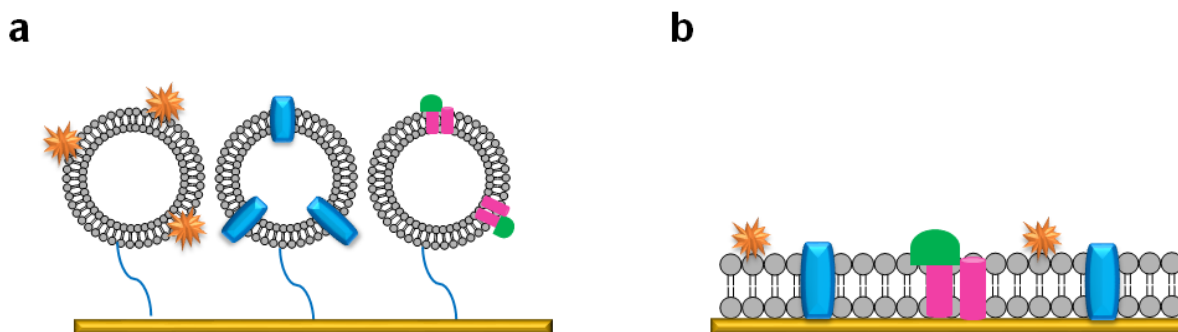


Figure 15. Approches basées sur des réseaux membranaires pour l'analyse des protéines membranaires : (a) réseau de liposomes, (b) réseau de bicouches lipidiques supportées avec des protéines membranaires incorporées

Granéli et *al.* ont étudié l'insertion de deux protéines, à savoir le translocateur de proton nicotinamide nucléotide transhydrogénase (TH) de *Escherichia coli* et la gramicidine A (GrA) de *Bacillus brevis* dans des SLBs et SVLs [107, 109]. En 2005, Elie-Caille et *al.* [100] ont formé des membranes artificielles sur un support solide contenant des protéines transmembranaires en se servant de protéoliposomes provenant de la membrane interne de mitochondries de cellules hépatiques cancérigènes humaines. En effet, les protéoliposomes ont été attachés et fusionnés sur une surface *via* une liaison streptavidine. Chadli et *al.* [110] ont réussi à insérer une protéine G (CXCR4) dans une bicouche lipidique SLB greffée sur des peptides (pep-tBLM) à travers la fusion par un peptide α -hélicoïdal (AH) de protéoliposomes attachés. Ils ont montré que la bicouche lipidique insérant la protéine CXCR4 restait fluide, homogène et continue.

III. Applications des membranes biomimétiques supportées

Le développement des modèles membranaires ouvre de nombreuses perspectives. En reproduisant les propriétés et la structure des membranes cellulaires, ils apparaissent comme des solutions privilégiées pour un grand nombre d'applications. Parmi ces applications, on peut

citer l'étude des mécanismes d'interaction des biomolécules d'intérêt avec les membranes ou avec les protéines membranaires. D'autres applications concernent le développement de (bio)capteurs ou bien d'approches thérapeutiques innovantes.

Nous abordons ainsi l'application des SVLs et des SLBs pour la détection de l'interaction biomoléculaire. Les principales techniques de caractérisation les plus couramment utilisées pour l'identification de ces interactions sont présentées ci-après.

La sélection de la technique à utiliser dépend du type de membrane biomimétique utilisée et de l'objet d'études. L'intérêt principal est généralement une bonne résolution sur l'axe z. Une membrane biomimétique est susceptible de couvrir une large surface mais n'a que quelques nanomètres d'épaisseur.

Parmi les techniques de caractérisation sensibles à la surface, on trouve les méthodes d'imagerie tel que la microscopie à force atomique (AFM) et les techniques de fluorescence. Il est également rapporté des méthodes permettant de suivre en temps réel l'adsorption de molécules sur un support comme la microbalance à quartz (QCM) et la résonance plasmonique de surface (SPR). Ces méthodes permettent d'imager et de caractériser de manière très sensible un échantillon contenu dans une très fine tranche [111-113]. Dans le cas des membranes biomimétiques planes, de nombreux travaux ont permis de mieux appréhender leur formation, leurs propriétés et leurs mécanismes d'interaction avec diverses biomolécules d'intérêt.

III.1. Microscopie à force atomique (AFM)

La technique de microscopie à force atomique (AFM) a été développée depuis la découverte du microscope à effet tunnel en 1981 par Gerd Binnig et Heinrich Rohrer [114]. Celle-ci était au début utilisée dans l'air et permettait essentiellement d'obtenir une résolution atomique. Par la suite, sa mise au point en milieu liquide a largement facilité l'étude structurale de membranes plasmiques ainsi que la caractérisation de molécules uniques. Elle a également la particularité de permettre l'évaluation des forces d'interaction intra ou inter moléculaire.

III.1.1. Principe

L'AFM est une technique où une pointe montée sur un cantilever flexible permet de balayer ligne par ligne la surface d'un échantillon adsorbé sur un support. L'appareil enregistre alors les forces d'interaction qui ont lieu entre ces deux derniers. Le mica (surface hydrophile) constitue l'un des supports les plus employés grâce à ses grandes zones planes à l'échelle atomique. Le

mouvement de la pointe dans les trois dimensions (x,y,z) est réglé par un scanner piézoélectrique.

Son fonctionnement se fait par le biais d'un faisceau laser qui se focalise sur le dessus de l'extrémité de la pointe. Grâce à sa réflexion vers un système optique de photodiode à quadrants, il est possible de détecter les mouvements de déflexion de la pointe lors de sa rencontre avec un élément de topographie. Par ailleurs, ce sont les mouvements de déflexion verticale (variation en z) qui feront que l'image en hauteur sera construite ligne par ligne. Cela permettra une reconstitution en trois dimensions de la surface de l'échantillon. Le petit changement qui apparaîtra dans l'angle de flexion du cantilever sera converti en une large déviation susceptible d'être mesurée.

Notons que les forces d'interaction manifestées entre la pointe et la surface dépendent de la distance séparant la pointe de l'échantillon ainsi que de la nature physicochimique de la pointe et de celle de la surface [115].

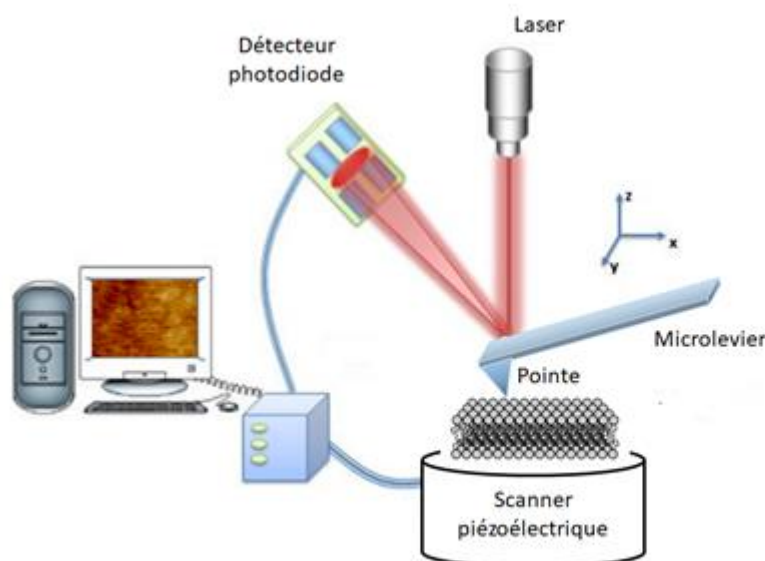


Figure 16. Schéma illustrant les composantes principales d'un microscope à force atomique (AFM)

Deux principaux modes d'imagerie sont habituellement utilisés, qui se distinguent par la façon dont la pointe se déplace et interagit avec l'échantillon. : le mode contact et le mode contact intermittent (« tapping mode »).

-Le mode contact : il s'agit du mode dans lequel la pointe reste en contact avec la surface au cours du processus de balayage de l'échantillon. La force entre la pointe et l'échantillon reste constante. Il est important que ces forces soient aussi faibles que possible afin de parer aux dommages qui pourraient affecter l'échantillon.

-Le mode contact intermittent (« tapping mode ») : il s'agit d'un mode dans lequel la pointe oscille à haute fréquence, ce qui réduit le contact entre la pointe et l'échantillon. La pointe n'interagit que périodiquement avec l'échantillon, une boucle d'asservissement maintenant l'amplitude de l'oscillation constante et ajustant la hauteur lorsque la pointe touche un élément topographique. Ce mode est le plus répandu étant donné qu'il est le moins dommageable pour l'échantillon.

Par ailleurs, l'AFM permet de déterminer la taille et la hauteur des liposomes. Cependant, il est probable que le comportement élastique de l'échantillon puisse diminuer la précision des mesures. Cela peut s'expliquer par les caractéristiques de la pointe et l'aplatissement des liposomes qui ont tendance à s'élargir quand ils sont adsorbés à la surface.

Dans le cadre de cette thèse, les images d'AFM ont été principalement acquises en mode "tapping" et en milieu liquide pour les surfaces recouvertes de phospholipides.

III.1.2. Applications

De nombreuses études ont illustré l'utilité et l'efficacité de l'AFM pour l'étude des propriétés structurales des membranes biomimétiques supportées et pour caractériser l'effet de leur interaction avec des biomolécules sur l'organisation membranaire. C'est une technique d'imagerie utilisée pour visualiser et caractériser morphologiquement des liposomes fixés sur une surface. A titre d'exemple, Takechi-Haraya et *al.* [116] ont caractérisé des liposomes immobilisés sur un substrat de verre recouvert de streptavidine-biotinyl-BSA (BBSA) par AFM en milieu liquide. Ils ont montré que la forme des liposomes fixés diffère selon les procédures d'immobilisation des liposomes sur un substrat solide. Ils ont constaté que l'immobilisation des liposomes sur la streptavidine augmente l'adhésion des liposomes sans modifier la forme des liposomes attachés. Bakowsky et *al.* [117] ont étudié par AFM la morphologie de vésicules lipidiques PEGylées qui semblent sphériques sur une surface légèrement rugueuse par rapport aux vésicules non-PEGylées. Ils ont constaté que les vésicules PEGylées conservent leur forme arrondie et qu'aucun étalement ou fusion n'est observé à la surface, alors que pour les vésicules non-PEGylées, une coalescence est observée. Anabousi et *al.* [118] ont étudié par AFM, l'effet

de la protéine transferrine sur la taille des liposomes. La protéine a été ajoutée par couplage covalent à la surface des liposomes. Les auteurs ont montré que la taille des liposomes augmente de 5 à 15% en présence de transferrine. Berquand *et al.* [119] ont étudié l'effet d'un antibiotique macrolide (l'azithromycine) sur des vésicules lipidiques de différentes compositions lipidiques (DPPC:DOPC, DPPE:DOPC, SM:DOPC et SM:Chol:DOPC). Ils ont montré que cette interaction est fortement dépendante de la nature des lipides. Les images AFM ont révélé que l'azithromycine entraîne la dégradation et la disparition des domaines de gel DPPC et DPPE, alors qu'aucun effet n'a été noté sur les domaines SM et SM:cholestérol. Domenech *et al.* [120] ont caractérisé les interactions de l'oritavancine, un antibiotique de type glycopeptide qui est doté d'une puissante activité antimicrobienne, avec les bicouches phospholipidiques, en utilisant des liposomes (LUV) et des bicouches supportées faites de cardiolipine (CL) ou de palmitoyloléoyl phosphatidylglycérol (POPG) et de palmitoyloléoyl phosphatidyléthanolamine (POPE). Ils ont montré par AFM que l'oritavancine à une concentration de 84 nM a provoqué un repositionnement des domaines lipidiques de la bicouche supportée formée par CL: POPE. Chadli *et al.* [110] ont étudié étape par étape l'effet de l'interaction d'un peptide α -hélicoïdal (AH) dérivé de l'extrémité N-terminale de la protéine NS5A du virus de l'hépatite C sur une couche supportée de liposomes intacts composés de DOPC/DOPS + 2% de DOGS-NTA-Ni et immobilisés sur un substrat en or fonctionnalisé par un peptide. Ils ont montré par AFM que l'addition du peptide AH à 200 $\mu\text{g/mL}$ conduit à la déstabilisation de la couche de liposome et à la formation d'une bicouche lipidique attachée sur le substrat.

III.2. Les techniques de fluorescence

III.2.1. Principe

La fluorescence présente une large gamme d'outils pour marquer spécifiquement un élément, un organite ou une protéine. Elle offre aussi un fort contraste du fait que l'objet est éclairé sur un fond noir, ce qui rend plus facile la détection des structures d'intérêt. Les techniques recourant à la fluorescence se sont considérablement diversifiées depuis le début du 20^{ème} siècle. A notre connaissance, la grande majorité de ces méthodes nécessitent un marquage préalable par des molécules dites fluorochromes ou fluorophores.

Suite à une excitation lumineuse, une molécule fluorescente absorbe un photon: elle passe alors d'un état électronique fondamental à un état excité de plus haute énergie. Elle peut perdre son

excitation spontanément et revenir dans son état fondamental en réémettant de façon rapide un autre photon d'énergie plus faible.

Les techniques de fluorescence restent les plus utilisées dans les études de systèmes membranaires modèles et de membranes de cellules vivantes [121]. Elles permettent d'étudier la dynamique des molécules d'intérêt (FRAP, FCS...) ainsi que leurs interactions (FRET, FLIM...) avec des cellules ou des membranes modèles. Leurs applications sont nombreuses et ne sont que brièvement abordées ici.

III.2.2. Applications

Christiaens *et al.* [122] ont étudié par la fluorescence naturelle du tryptophane, l'insertion des peptides et des protéines dans les membranes, associée à des changements de conformation. Les méthodes de spectroscopie de fluorescence ont aussi été exploitées par Matos *et al.* [123] pour surveiller les interactions entre peptides et membrane lipidique. Levental *et al.* [124] ont montré que le marquage fluorescent des protéines et des lipides dans les *GUV* permet de déterminer la répartition des protéines dans les *Lo*-domains (liquid-ordered (*Lo*) domains dans la bicouche). Homan *et al.* [125] ont démontré que les stérols fluorescents peuvent permettre de suivre la cinétique d'estérification des stérols. Kiessling *et al.* [113] ont utilisé des membranes planes supportées et la microscopie à fluorescence pour répondre à certaines des questions ouvertes concernant les mécanismes moléculaires de la fusion membranaire médiée par les protéines *SNARE* (sigle pour l'anglais : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor).

III.3. Microbalance à quartz (QCM)

III.3.1. Principe

La microbalance à quartz (QCM) est une méthode utilisée pour mesurer la masse d'un film mince déposé sur une surface. Cette technique est essentiellement basée sur la variation de la fréquence de résonance d'une lame de quartz, celle-ci étant due à une augmentation de la masse déposée sur la surface. La QCM a été initialement développée pour des mesures dans l'air ou dans le vide. Il était ainsi possible de mesurer la masse d'un dépôt rigide comme un film métallique. Cette technique a ensuite été développée notamment dans les années 90 par Rodahl *et al.* [126, 127] après la mise au point de la microbalance à quartz et à dissipation (QCM-D). Ils ont ainsi été en mesure d'établir des caractérisations en milieu liquide, ce qui a ouvert un champ considérable de nouvelles applications.

Contrairement aux autres techniques, cette technique a l'avantage de ne pas nécessiter l'utilisation d'un marquage spécifique.

La QCM exploite les propriétés piézoélectriques du quartz, qui associent une déformation mécanique à une polarisation électrique. De ce fait, lorsqu'un champ électrique alternatif est appliqué à un cristal de quartz, celui-ci oscille et entre en résonance. Un apport de matière va alors provoquer une perturbation de la résonance du cristal et donc une modification de la fréquence d'oscillation : plus la masse adsorbée est importante, plus la fréquence est réduite (Figures 17.a et 17.b). La mesure du facteur de dissipation permet de quantifier l'amortissement des oscillations du cristal par le matériau adsorbé, qui dépend directement des propriétés viscoélastiques de ce dernier, les matériaux « mous » dissipant plus efficacement que les matériaux « durs » (Figures 17.c et 17.d).

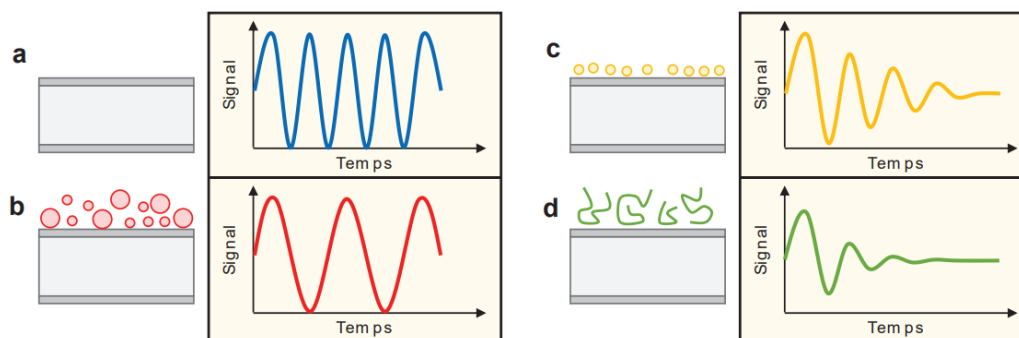


Figure 17. Principe de la QCM. (a) Fréquence d'oscillation d'un cristal nu, (b) Fréquence d'oscillation d'un cristal après ajout de la masse, (c) Dissipation de l'oscillation d'un cristal revêtu d'un matériau dur, (d) Dissipation de l'oscillation d'un cristal revêtu d'un matériau mou

III.3.2. Applications

En 2010, Briand et *al.* [128] ont utilisé la QCM-D et la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) pour étudier (i) la formation de SLBs sur un substrat SiO₂ et (ii) l'influence de l'insertion d'un peptide formant des pores (la gramicidine D) sur les propriétés mécaniques et électriques de la membrane supportée. Ils ont pu vérifier la formation d'une bicouche lipidique par l'adsorption et la rupture de vésicules de POPC sur le substrat SiO₂. Les propriétés membranaires de la SLB ont été modifiées en fonction de la concentration en peptides. De faibles concentrations de peptides n'ont pas provoqué de modifications structurales détectables par QCM-D. En revanche, à des concentrations élevées, des changements structurels de la SLB ont été induits (également confirmés par AFM). De même,

Lu et al. [129] ont étudié le dépôt et la déformation de vésicules sur différentes surfaces, ainsi que leur interaction avec le peptide mélittine, par la technique QCM-D combinée à des simulations informatiques. Ils ont révélé la formation d'une SLB sur la surface nue de SiO₂, et la formation d'une couche de vésicules intactes sur un substrat recouvert d'or ou de polyélectrolyte. Ils ont constaté que la morphologie de la membrane influençait les interactions de celle-ci avec la mélittine, allant jusqu'à altérer l'efficacité d'insertion du peptide dans la membrane.

Zobel et al. [130] ont incorporé des protéines d'adhésion trans-synaptiques recombinantes Fc-chimera (EphrinA5 et N-Cadherin) dans une bicouche lipidique fluide (POPC) pour constituer une plateforme biomimétique capable de favoriser l'adhésion des cellules neurales. L'intercalation efficace de ces deux protéines membranaires a été prouvée par QCM, imagerie calcique et immunofluorescence. La plateforme biomimétique résultante s'est également avérée agir pour la maturation des neurones immobilisés. Ainsi, les études ont montré que les protéines insérées dans la membrane restent actives car elles sont capables de jouer un rôle d'adhésion et de propagation de signaux dans les neurones.

III.4. La Résonance Plasmonique de Surface (SPR)

La spectroscopie de résonance plasmonique de surface (SPR) est une technique optique, couramment utilisée pour étudier en temps réel les interactions moléculaires qui se produisent à l'interface d'un métal (l'or, l'argent ...) et d'un milieu diélectrique (eau, air, solvant). Il s'agit d'une technique sensible aux phénomènes de surface. D'une manière générale, le ligand est immobilisé sur la surface du métal, l'analyte en solution est injecté *via* un système microfluidique et l'interaction peut être facilement détectée et analysée. Comme pour la QCM, cette technique présente l'avantage de ne nécessiter aucun marquage spécifique de la molécule à étudier. Elle est souvent utilisée pour caractériser des couches minces, suivre des processus biologiques spécifiques (association/dissociation) et étudier des changements physico-chimiques telles que l'adsorption/désorption de molécules.

III.4.1. Principe

La SPR est basée sur l'utilisation d'ondes électromagnétiques évanescentes se propageant à l'interface métal/milieu diélectrique. Ces ondes évanescentes sont sensibles à tout changement de l'indice de réfraction sur une distance très courte par rapport à la surface métallique, siège des interactions moléculaires étudiées. Le principe de la SPR repose donc sur la quantification

des changements des propriétés optiques de la surface, qui sont liés à la variation de densité de masse à la surface suite à la formation et à la dissociation des complexes moléculaires.

La Figure 18 est une représentation schématique du principe de fonctionnement de la SPR. Celui-ci repose sur la mise en commun d'un prisme, d'une source de lumière monochromatique polarisée p , d'un canal d'écoulement et d'une surface formée d'une couche métallique (généralement en or) pour la génération de la résonance plasmonique de surface. Les principes physiques de la SPR seront expliqués plus en détails au niveau du second chapitre de cette thèse.

La lumière émise par la source lumineuse est réfléchiée sur la surface du prisme recouvert d'or et est ensuite détectée par un photodétecteur. Ainsi, la lumière interagit avec les électrons libres du métal ce qui provoque l'excitation du plasmon de surface. Sous un angle d'incidence précis, une partie de la lumière est absorbée par le métal et entraîne une oscillation ondulatoire des électrons, connue sous le nom de résonance plasmonique de surface. Cet angle d'incidence spécifique est appelé angle de résonance et est noté θ_{SPR} dans ce manuscrit. L'absorption de l'énergie photonique à l'angle de résonance résulte alors en une perte d'une partie de la lumière réfléchiée et une forte baisse de l'intensité de la lumière réfléchiée.

L'angle de résonance correspondant à l'angle d'incidence au minimum d'intensité. Il dépend d'un certain nombre de facteurs tels que l'épaisseur de la couche métallique, la longueur d'onde de la lumière excitatrice et surtout de la masse (l'indice de réfraction) adsorbée sur la surface métallique.

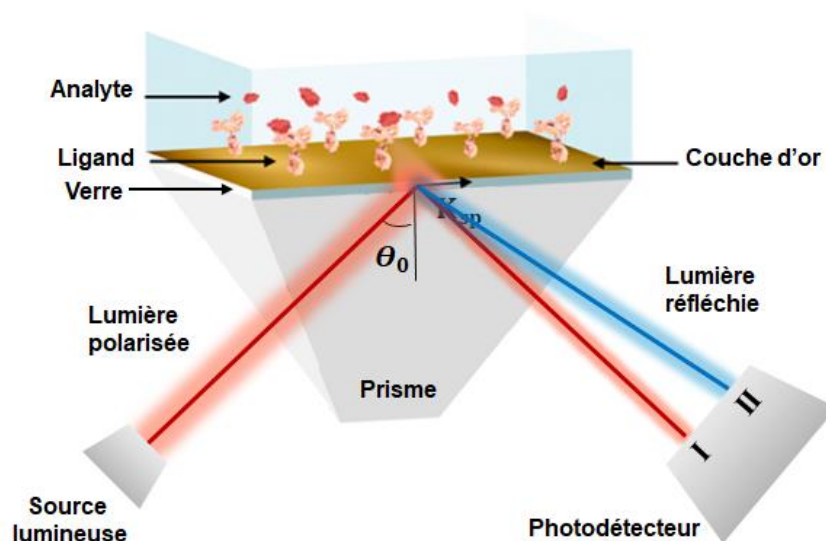


Figure 18. Représentation schématique du principe de fonctionnement de la technique SPR

Suite à l'excitation du plasmon de surface, il apparaît un pic de résonance au niveau de la courbe SPR (également appelé courbe de plasmon ou courbe de réflectivité) (I) (Figure 19.a) qui montre la variation de l'intensité de la lumière réfléchiée en fonction de l'angle de résonance θ_{SPR} . En effet, les variations de ce pic vont permettre de quantifier les perturbations se produisant au voisinage de l'interface métal/milieu diélectrique en raison des variations de l'indice de réfraction et de l'épaisseur de la couche formée. Pour un état (I), le minimum du pic de la courbe SPR se situe à un angle de résonance ($\theta_{SPR,1}$). La plus faible variation à la surface entraîne un changement d'indice de réfraction du milieu. Ce changement implique la modification de l'énergie nécessaire à l'excitation du plasmon de surface et entraîne donc un déplacement de l'angle de résonance $\theta_{SPR,1}$ en $\theta_{SPR,2}$ (état II) pour remplir les nouvelles conditions de résonance. C'est ce décalage qui est mesuré comme réponse. Le suivi de la variation de l'angle de résonance θ_{SPR} en fonction du temps donne ce qu'on appelle le sensorgramme (Figure 19.b). Ce dernier permet de donner des informations sur la cinétique des interactions, l'épaisseur et la masse de la couche déposée sur la surface et donc sur le nombre de molécules fixées.

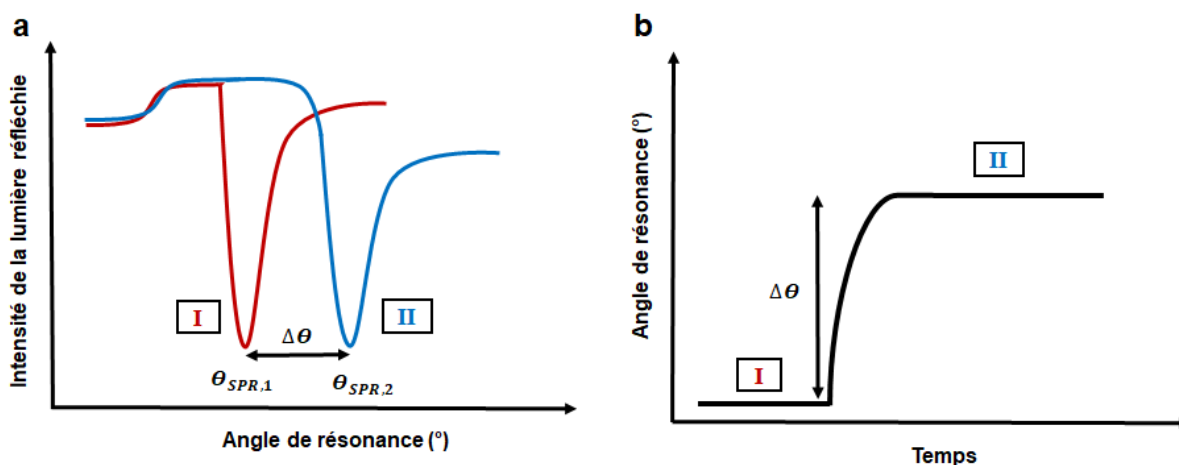


Figure 19. (a) pic de résonance avant et après formation du complexe moléculaire et (b) le sensorgramme

La technique SPR a apporté une véritable avancée pour la détection biochimique, du fait qu'une fine couche de biomolécules atténue fortement les conditions d'excitation du plasmon de surface, ce qui peut être mesuré comme expliqué par le changement de l'angle de résonance (θ_{SPR}). La méthode la plus utilisée dans les instruments SPR est la configuration de

Kretschmann où l'excitation du plasmon de surface est obtenue par réflexion interne totale (TIR), dont le principe sera défini dans le chapitre suivant.

III.4.2. Applications

Le domaine d'applications de la SPR est large et très diversifié. Il s'étend de la détermination des propriétés optiques des couches minces (indices de réfraction, épaisseurs...) [131-133] à son utilisation comme principe de base pour des capteurs chimiques et des capteurs biologiques pouvant détecter des interactions de type antigène-anticorps, ADN-ADN, ADN-protéine, protéine-protéine et récepteur-ligand [134 -136]. Récemment, la technique SPR a également été mise en œuvre pour étudier des interactions avec des membranes biomimétiques impliquant des monocouches, des bicouches ou des vésicules lipidiques supportées. Un certain nombre d'études ont porté sur le dépôt de ces membranes sur des substrats d'or par SPR [67,91,137-142] et ont ensuite été appliquées pour étudier les interactions avec différentes molécules telles que le catéchol [143], des médicaments [144], des peptides [145, 146], des protéines [58,147,148], ou des toxines [149]. Ces applications démontrent l'énorme potentiel de la SPR pour améliorer notre compréhension moléculaire des événements médiés par les membranes. La résonance plasmonique de surface permet de sonder les surfaces et les films de façon non destructive et de mesurer en temps réel les biomolécules se liant à des surfaces biomimétiques sans l'application d'un marqueur spécifique puisque la méthode SPR dépend de la variation de la masse adsorbée à la surface.

Pour certaines applications, la SPR présente quelques faiblesses, notamment dans l'incapacité à résoudre le mode et l'emplacement de la liaison d'une molécule avec la surface et l'insensibilité aux événements anisotropes tels que les changements d'orientation de l'espèce liée à la membrane [150]. Il existe d'autres techniques comme l'ellipsométrie [151] et l'interférométrie à double polarisation [152, 153] qui peuvent dévoiler ces propriétés. L'orientation des molécules dans les membranes lipidiques peut également être étudiée à l'aide de la spectroscopie infrarouge ou par le dichroïsme linéaire [154]. La QCM aussi peut fournir des informations complémentaires sur les modèles de membranes lipidiques, comme les changements de viscoélasticité et d'hydratation de la membrane [155]. Ainsi, la SPR peut être combinée à d'autres techniques simultanément dans le but d'augmenter la sensibilité de la détection et d'améliorer par conséquent ses fonctionnalités. Par exemple, la QCM-D et la SPR peuvent toutes les deux fournir des informations sur les événements de liaison avec les surfaces

et les propriétés des films lipidiques qui en résultent en temps réel en utilisant respectivement la variation de la dissipation de fréquence et le changement d'indice de réfraction.

Au cours des dernières années, de nombreux chercheurs ont exploité principalement la technique SPR, associée parfois à d'autres techniques complémentaires, pour suivre les étapes de formation des membranes biomimétiques supportées, puis étudier leur interaction avec des molécules biologiques spécifiques afin de comprendre certains mécanismes complexes. En regard des travaux rapportés dans la littérature, le Tableau 1 présente une variété des études d'interaction utilisant des systèmes membranaires modèles de type SLB ou SVL. La composition lipidique de la membrane varie entre les différentes études et parfois au sein d'une même étude afin de comprendre le rôle de différents composants membranaires dans les événements médiés par la membrane. Ces membranes ont été immobilisées sur des substrats solides *via* différentes méthodes d'élaboration pour former soit une couche de liposomes intacts ou une bicouche lipidique supportée. La formation et la stabilité des membranes biomimétiques formées ont été caractérisées par la technique SPR. Ces études prouvent qu'il est également possible d'obtenir facilement des informations sur la cinétique de liaison des biomolécules à la membrane, de fournir en temps réel les taux d'association et de dissociation, de comprendre l'effet induit par ces interactions sur la membrane grâce aux signaux SPR obtenus et à la modélisation théorique des résultats. En outre, ces chercheurs ont montré que la SPR combinée à d'autres techniques peut fournir la base d'une compréhension plus fine des mécanismes moléculaires de ces interactions membranaires. Ils ont notamment pu identifier et confirmer certains mécanismes tels que l'adsorption et/ou l'insertion, la création de pores dans les membranes, la libération de biomolécules ou d'espèces encapsulées (médicaments), ou encore la déstabilisation des membranes et la fusion membranaire, ...

Tableau 1. Différents travaux rapportés sur l'interaction de biomolécules avec des membranes biomimétiques détectée par la technique SPR en combinaison avec d'autres méthodes de mesure.

Analyte cible	Modèle membranaire	Lipides	Méthode analytique	Réf
Peptide amphiphile de la cinnamycine	Bicouche lipidique	DOPC/DOPE/DPPE	SPR	[156]

Peptides de mélittine et de magainine	Bicouche lipidique	egg-PC/CHOL PE/egg-PG	SPR	[157]
Protéine neurocalcine et toxine de l'adénylate cyclase	Bicouche lipidique	Egg-PC/ DSPE-PEG3400-NHS	SPR	[60]
Médicaments	Liposome	POPC/CHOL	SPR	[144]
Peptides cationiques actifs sur la membrane	Liposome	POPC/MPB-PE	SPR/Fluorescence	[146]
Peptide HA de la protéine HCV NS5A	Liposome	POPC/DOGS-NTA(Ni) POPC/SM/DOPE/CHOL/DOGS-NTA(Ni)	SPR/BALM	[108]
Protéine de Corona	Liposome	HSPC/ cholestérol /DSPE-PEG2000 ou DSPE	MP-SPR	[131]
Protéine de Corona	Liposome	DPPC/DSPC/LysoPC/DSPE ou DSPE-PEG2000	MP-SPR nLC-MS/MS	[147]
Phospholipase A2	Liposome	DOetPC/Biot-DOPC	SPR	[99]
Créatinine kinase mitochondriale	Liposome (LUV)	Biotin-X-DHPE/CL/PC	SPR	[98]
Protéotoxines	Liposome	N-Biotin PE/DNP-PE	SPR	[96]
Protéine G transducine	Rhodopsine insérée dans une bicouche lipidique	egg-PC	Time-resolved SPR	[158]
Colicine N	OmpF porine insérée dans la bicouche lipidique	dioléoyl lécithine	SPR/ IS	[77]

Antagoniste α-bungarotoxine	Récepteur d'acétylcholine inséré dans la bicouche lipidique	Soybean lipids	SPRS/SPFS	[159]
Chemokine pour CXCR4, dérivé des cellules stromales facteur 1a (SDF-1a)	GPCR inséré dans la bicouche lipidique	POPC	SPR	[160]
Toxine du choléra	Ganglioside GM1 inséré dans la membrane du liposome	Egg-PC	SPR	[103]
Antibiotiques du groupe de la vancomycine	Mucopeptide de la paroi cellulaire bactérienne, analogue inséré dans la membrane du liposome	Egg-PC	SPR	[103]

DOPC : Dioléoylphosphatidylcholine ; DOPE : 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine ; DPPE : 1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine ; HSPC : phosphatidylcholine de soja hydrogénée ; DSPE : 1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine ; DSPE-PEG2000 : N-(carbonyl-méthoxypolyéthylène glycol 2000)-1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine sodium salt ; DNP-PE : N-Dinitrophénylphosphatidyléthanolamine ; N-Biotin PE : N-biotin-phosphatidyléthanolamine ; DOetPC : 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine ; egg-PC, egg phosphatidylcholine, egg-phosphatidylglycérol (egg-PG) ; IS : spectroscopie d'impédance ; SPRS : spectroscopie de résonance plasmonique de surface ; SPFS : Spectroscopie de fluorescence des plasmons de surface ; DPPC : 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine ; DSPC : 1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphocholine ; Lyso PC : 1-stéaroyl-2-hydroxy-sn-glycéro-3-phosphocholine ; POPC : 1-Palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine ; DOGS-NTA(Ni) : 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-[(N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacétique acid)succinyl] nickel salt ; SM : sphingomyéline (brain porcine) ; DSPE-PEG3400-NHS : 1,2-Distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolaminepoly-(éthylèneglycol)-N-hydroxysuccinimide ; MPB-PE : 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N-(4-(p-maléimidophényl)butyramide) ; GPCR : Récepteur couplé à la protéine G ; CL : Cardiolipine ; MS-SPR : Résonance plasmonique de surface multiparamétrique ; nLC-MS/MS : nano-chromatographie liquide-spectrométrie de masse.

IV. Conclusion

Cette étude bibliographique montre le très grand nombre de recherches menées sur le développement de membranes biomimétiques pour appréhender des phénomènes

membranaires complexes. Après avoir défini les constituants d'une membrane biologique tels que les phospholipides et le cholestérol nécessaires à la compréhension des travaux réalisés dans cette thèse, la bicouche lipidique supportée (SLB) et la couche vésiculaire supportée (SVL) ont été décrites comme des modèles membranaires pertinents du fait de leur grande similitude avec les membranes cellulaires. Nous avons abordé les nouvelles approches citées dans la littérature qui mènent à la formation de ces deux modèles, en particulier l'approche basée sur le complexe biotine/streptavidine avec laquelle nous avons choisi de travailler pour développer une couche de liposomes intacts. De nombreuses techniques de caractérisation ont été exploitées par les chercheurs afin de caractériser la formation de ces couches modèles et de détecter des phénomènes biologiques induits par leur interaction avec des biomolécules. Notamment, les techniques de microscopie à force atomique (AFM), fluorescence et microbalance à quartz (QCM) ont été privilégiées pour ces études. Des méthodes électrochimiques ont également été développées. Par ailleurs, les dernières avancées biotechnologiques montrent l'efficacité de la technique de résonance plasmonique de surface (SPR) pour suivre ces interactions membranaires en temps réel et sans marquage spécifique. Dans le chapitre suivant, nous allons présenter la théorie de la technique de résonance plasmonique de surface utilisée au long de ce travail.

Références

- [1] Shechter, E. (1997). Fluidité membranaire. *Biochimie et biophysique des membranes. Aspects structuraux et fonctionnels*, 97-121.
- [2] Lipowsky, R., & Sackmann, E. (1995). *Structure and Dynamics of Membranes—from Cells to Vesicles (Handbook of Biological Physics vol 1)*.
- [3] Weinstein J. and Leserman L. (1984). Liposomes as drug carriers in cancer chemotherapy. *Pharmacology and Therapeutics* 24, 207-233.
- [4] Lorin A, Flore C, Thomas A, Brasseur R, 2004. Les liposomes: description, fabrication et applications. *Biotechnology Agronomy Society and Environment* 8, 163-176.
- [5] Maxfield, F. R., & Tabas, I. (2005). Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature*, 438(7068), 612-621.
- [6] Matsingou, C., & Demetzos, C. (2007). The perturbing effect of cholesterol on the interaction between labdanes and DPPC bilayers. *Thermochimica acta*, 452(2), 116-123.
- [7] Sarkis, J., & Vié, V. (2020). Biomimetic models to investigate membrane biophysics affecting lipid–protein interaction. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 270.
- [8] Zasadzinski, J. A., Viswanathan, R., Madsen, L., Garnaes, J., & Schwartz, D. K. (1994). Langmuir-blodgett films. *Science*, 263(5154), 1726-1733.
- [9] Pinto, O. A., & Disalvo, E. A. (2019). A new model for lipid monolayer and bilayers based on thermodynamics of irreversible processes. *Plos one*, 14(4), e0212269.
- [10] Shokurov, A. V., Novak, D. N., Ostroverkhov, P. V., Grin, M. A., Zaytseva, A. V., Raitman, O. A., ... & Selektor, S. L. (2020). Lipid monolayer as a simple model membrane for comparative assessment of the photodynamic therapy photosensitizer efficiency via macroscopic measurements. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 210, 111958.
- [11] Chatterjee, S. N., & Agarwal, S. (1988). Liposomes as membrane model for study of lipid peroxidation. *Free radical biology and medicine*, 4(1), 51-72.
- [12] Siontorou, C. G., Nikoleli, G. P., Nikolelis, D. P., & Karapetis, S. K. (2017). Artificial lipid membranes: Past, present, and future. *Membranes*, 7(3), 38.
- [13] Bozzuto, G., & Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *International journal of nanomedicine*, 10, 975.
- [14] Bangham, A. D., & Horne, R. W. (1964). Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of molecular biology*, 8(5), 660-IN10.

-
- [15] Sessa, G., & Weissmann, G. (1968). Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *Journal of lipid research*, 9(3), 310-318.
- [16] Podlipec, R., & Strancar, J. (2010). Interaction of liposomes on endothelial cells. University of Ljubljana, Slovenia.
- [17] Lebègue, E., Farre, C., Jose, C., Saulnier, J., Lagarde, F., Chevalier, Y., ... & Jaffrezic-Renault, N. (2018). Responsive polydiacetylene vesicles for biosensing microorganisms. *Sensors*, 18(2), 599.
- [18] Book : New, R.C.C. *Liposomes: A Practical Approach*; Oxford University Press: Oxford, UK, 1990, ISBN 13-978-0199630776
- [19] Bigay, J., & Antonny, B. (2012). Curvature, lipid packing, and electrostatics of membrane organelles: defining cellular territories in determining specificity. *Developmental cell*, 23(5), 886-895.
- [20] Tavakoli, S., Kari, O. K., Turunen, T., Lajunen, T., Schmitt, M., Lehtinen, J., ... & Subrizi, A. (2020). Diffusion and Protein Corona Formation of Lipid-Based Nanoparticles in the Vitreous Humor: Profiling and Pharmacokinetic Considerations. *Molecular pharmaceutics*, 18(2), 699-713.
- [21] Anderson, M., & Omri, A. (2004). The effect of different lipid components on the in vitro stability and release kinetics of liposome formulations. *Drug delivery*, 11(1), 33-39.
- [22] Lu, T., Wang, Z., Ma, Y., Zhang, Y., & Chen, T. (2012). Influence of polymer size, liposomal composition, surface charge, and temperature on the permeability of pH-sensitive liposomes containing lipid-anchored poly (2-ethylacrylic acid). *International Journal of Nanomedicine*, 7, 4917.
- [23] Cans, A. S., Wittenberg, N., Karlsson, R., Sombers, L., Karlsson, M., Orwar, O., & Ewing, A. (2003). Artificial cells: unique insights into exocytosis using liposomes and lipid nanotubes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(2), 400-404.
- [24] Düzgüneş, N., & Nir, S. (1999). Mechanisms and kinetics of liposome–cell interactions. *Advanced drug delivery reviews*, 40(1-2), 3-18.
- [25] Martin, I., & Ruyschaert, J. M. (2000). Common properties of fusion peptides from diverse systems. *Bioscience reports*, 20(6), 483-500.
- [26] Höfer, C. T., Herrmann, A., & Müller, P. (2010). Use of liposomes for studying interactions of soluble proteins with cellular membranes. In *Liposomes* (pp. 69-82). Humana Press.
- [27] Hou, G., Niu, J., Song, F., Liu, Z., & Liu, S. (2013). Studies on the interactions between ginsenosides and liposome by equilibrium dialysis combined with ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 923, 1-7.

- [28] Matos, C., Moutinho, C., & Lobão, P. (2012). Liposomes as a model for the biological membrane: studies on daunorubicin bilayer interaction. *The Journal of membrane biology*, 245(2), 69-75.
- [29] Potamitis C, Chatzigeorgiou P, Siapi E, Viras K, Mavromoustakos T, Hodzic A, Pabst G, Cacho-Nerin F, Laggner P, Rappolt M, 2011. Interactions of the AT1 antagonist valsartan with dipalmitoyl-phosphatidylcholine bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808, 1753-1763.
- [30] Rickwood, D. and Hames, D. (1989). *Liposomes a practical approach*. New York, Oxford University Press.
- [31] Delattre, J., Couvreur, P., Puisieux, F., Philippot, J. R. and Schuber, F. (1993). *Les liposomes aspects technologiques biologiques et pharmacologiques*. Paris.
- [32] Berger, N., Sachse, A., Bender, J., Schubert, R., & Brandl, M. (2001). Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. *International journal of pharmaceutics*, 223(1-2), 55-68.
- [33] Woodbury, D. J., Richardson, E. S., Grigg, A. W., Welling, R. D., & Knudson, B. H. (2006). Reducing liposome size with ultrasound: bimodal size distributions. *Journal of liposome research*, 16(1), 57-80.
- [34] Karlsson, M., Nolkrantz, K., Davidson, M. J., Strömberg, A., Ryttsén, F., Åkerman, B., & Orwar, O. (2000). Electroinjection of colloid particles and biopolymers into single unilamellar liposomes and cells for bioanalytical applications. *Analytical chemistry*, 72(23), 5857-5862.
- [35] Bangham, A. D., Standish, M. M., & Watkins, J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of molecular biology*, 13(1), 238-IN27.
- [36] Bangham, A. D., Standish, M. M., & Weissmann, G. (1965). The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations. *Journal of molecular biology*, 13(1), 253-IN28.
- [37] Mishima, K., Suezaki, Y., & Hashimoto, M. (1992). Formation and mechanical stability of phospholipid vesicles. *Membrane*, 17(4), 257-262.
- [38] Pereira-Lachataignerais, J., Pons, R., Panizza, P., Courbin, L., Rouch, J., & Lopez, O. (2006). Study and formation of vesicle systems with low polydispersity index by ultrasound method. *Chemistry and physics of lipids*, 140(1-2), 88-97.
- [39] Akbarzadeh A, Sadabady RR, Daaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki K, 2013. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* 8, 102-110.
- [40] Dua, J. S., Rana, A. C., & Bhandari, A. K. (2012). Liposome: methods of preparation and applications. *Int J Pharm Stud Res*, 3(2), 14-20.

- [41] Cho, N. J., Hwang, L. Y., Solandt, J. J., & Frank, C. W. (2013). Comparison of extruded and sonicated vesicles for planar bilayer self-assembly. *Materials*, 6(8), 3294-3308.
- [42] Silva, R., Ferreira, H., Little, C., & Cavaco-Paulo, A. (2010). Effect of ultrasound parameters for unilamellar liposome preparation. *Ultrasonics sonochemistry*, 17(3), 628-632.
- [43] Johnson CS, Gabriel DA. (1981). *Laser light scattering*. Publications D, editor. New York: Inc. 96 p.
- [44] Chu, B. (1974). *Laser Light Scattering* Academic Press. New York.
- [45] Dahneke, B. E. (1983). *Measurement of Suspended Particles by Quasi-Elastic Light Scattering*, John Wiley & Sons. Inc., New York.
- [46] Pecora, R. (Ed.). (1985). *Dynamic light scattering: applications of photon correlation spectroscopy*. Springer Science & Business Media.
- [47] Clogston, J. D., & Patri, A. K. (2011). Zeta potential measurement. In *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery* (pp. 63-70). Humana Press.
- [48] Herrera J, and Sakulchaicharoen N, (2009). Microscopic and spectroscopic characterization of nanoparticles. Chapter 14 in *Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization*, First Edition, Informa Healthcare, pp. 237-240.
- [49] De Rosa, G., De Stefano, M., Ungaro, F., & La Rotonda, M. I. (2008). Cold field emission gun-scanning electron microscopy: A new tool for morphological and ultrastructural analysis of liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 362(1-2), 189-192.
- [50] Janga, K. Y., Jukanti, R., Velpula, A., Sunkavalli, S., Bandari, S., Kandadi, P., & Veerareddy, P. R. (2012). Bioavailability enhancement of zaleplon via proliposomes: Role of surface charge. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 80(2), 347-357.
- [51] Mukherjee, P. K., Long, L., Kim, H. G., & Ghannoum, M. A. (2009). Amphotericin B lipid complex is efficacious in the treatment of *Candida albicans* biofilms using a model of catheter-associated *Candida* biofilms. *International journal of antimicrobial agents*, 33(2), 149-153.
- [52] Chetanachan, P., Akarachalanon, P., Worawirunwong, D., Dararutana, P., Bangtrakulnonth, A., Bunjop, M., & Kongmuang, S. (2008). Ultrastructural characterization of liposomes using transmission electron microscope. In *Advanced Materials Research* (Vol. 55, pp. 709-711). Trans Tech Publications Ltd.
- [53] Jain, R. and Shastri, J P. (2012). Study of ocular drug delivery system using drug loaded liposomes. *International Journal of Pharmaceutical Investigation* 1, 35-41.
- [54] Zasadzinski, J. A. (1986). Transmission electron microscopy observations of sonication-induced changes in liposome structure. *Biophysical journal*, 49(6), 1119-1130.

- [55] Kuntsche, J., Horst, J. C., & Bunjes, H. (2011). Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. *International journal of pharmaceutics*, 417(1-2), 120-137.
- [56] Frederiksen, L., Anton, K., Hoogevest, P. V., Keller, H. R., & Leuenberger, H. (1997). Preparation of liposomes encapsulating water-soluble compounds using supercritical carbon dioxide. *Journal of pharmaceutical sciences*, 86(8), 921-928.
- [57] Gao, D., Tang, S., & Tong, Q. (2012). Oleanolic acid liposomes with polyethylene glycol modification: promising antitumor drug delivery. *International journal of nanomedicine*, 7, 3517.
- [58] Beseničar, M., Maček, P., Lakey, J. H., & Anderluh, G. (2006). Surface plasmon resonance in protein–membrane interactions. *Chemistry and physics of lipids*, 141(1-2), 169-178.
- [59] Stahelin, R. V. (2013). Surface plasmon resonance: a useful technique for cell biologists to characterize biomolecular interactions. *Molecular biology of the cell*, 24(7), 883-886.
- [60] Rossi, C., Homand, J., Bauche, C., Hamdi, H., Ladant, D., & Chopineau, J. (2003). Differential mechanisms for calcium-dependent protein/membrane association as evidenced from SPR-binding studies on supported biomimetic membranes. *Biochemistry*, 42(51), 15273-15283.
- [61] Brian, A. A., & McConnell, H. M. (1984). Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(19), 6159-6163.
- [62] Tamm, L. K., & McConnell, H. M. (1985). Supported phospholipid bilayers. *Biophysical journal*, 47(1), 105-113.
- [63] Weirich, K. L., Israelachvili, J. N., & Fygenson, D. K. (2010). Bilayer edges catalyze supported lipid bilayer formation. *Biophysical journal*, 98(1), 85-92.
- [64] Andrecka, J., Spillane, K. M., Ortega-Arroyo, J., & Kukura, P. (2013). Direct observation and control of supported lipid bilayer formation with interferometric scattering microscopy. *ACS nano*, 7(12), 10662-10670.
- [65] Keller, C. A., & Kasemo, B. (1998). Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophysical journal*, 75(3), 1397-1402.
- [66] Mager, M. D., Almquist, B., & Melosh, N. A. (2008). Formation and characterization of fluid lipid bilayers on alumina. *Langmuir*, 24(22), 12734-12737.
- [67] Granqvist, N., Yliperttula, M., Valimäki, S., Pulkkinen, P., Tenhu, H., & Viitala, T. (2014). Control of the morphology of lipid layers by substrate surface chemistry. *Langmuir*, 30(10), 2799-2809.

-
- [68] Reimhult, E., Merz, C., Ye, Q., & Textor, M. Novel surface architectures for biomimetic lipid membranes.
- [69] Boudard, S., Seantier, B., Breffa, C., Decher, G., & Felix, O. (2006). Controlling the pathway of formation of supported lipid bilayers of DMPC by varying the sodium chloride concentration. *Thin Solid Films*, 495(1-2), 246-251.
- [70] Cho, N. J., Jackman, J. A., Liu, M., & Frank, C. W. (2011). pH-Driven assembly of various supported lipid platforms: A comparative study on silicon oxide and titanium oxide. *Langmuir*, 27(7), 3739-3748.
- [71] Jackman, J. A., Choi, J. H., Zhdanov, V. P., & Cho, N. J. (2013). Influence of osmotic pressure on adhesion of lipid vesicles to solid supports. *Langmuir*, 29(36), 11375-11384.
- [72] Anderson, T. H., Min, Y., Weirich, K. L., Zeng, H., Fygenson, D., & Israelachvili, J. N. (2009). Formation of supported bilayers on silica substrates. *Langmuir*, 25(12), 6997-7005.
- [73] Hardy, G. J., Nayak, R., & Zauscher, S. (2013). Model cell membranes: Techniques to form complex biomimetic supported lipid bilayers via vesicle fusion. *Current opinion in colloid & interface science*, 18(5), 448-458.
- [74] Lv, Z., Banerjee, S., Zagorski, K., & Lyubchenko, Y. L. (2018). Supported lipid bilayers for atomic force microscopy studies. In *Nanoscale Imaging* (pp. 129-143). Humana Press, New York, NY.
- [75] Shenoy, S., Moldovan, R., Fitzpatrick, J., Vanderah, D. J., Deserno, M., & Lösche, M. (2010). In-plane homogeneity and lipid dynamics in tethered bilayer lipid membranes (tBLMs). *Soft matter*, 6(6), 1263-1274.
- [76] Lang, H., Duschl, C., & Vogel, H. (1994). A new class of thiolipids for the attachment of lipid bilayers on gold surfaces. *Langmuir*, 10(1), 197-210.
- [77] Stora, T., Lakey, J. H., & Vogel, H. (1999). Ion-channel gating in transmembrane receptor proteins: functional activity in tethered lipid membranes. *Angewandte Chemie International Edition*, 38(3), 389-392.
- [78] Terrettaz, S., Ulrich, W. P., Vogel, H., Hong, Q., Dover, L. G., & Lakey, J. H. (2002). Stable self-assembly of a protein engineering scaffold on gold surfaces. *Protein Science*, 11(8), 1917-1925.
- [79] Andersson, J., & Köper, I. (2016). Tethered and polymer supported bilayer lipid membranes: Structure and function. *Membranes*, 6(2), 30.
- [80] Andersson, J., Köper, I., & Knoll, W. (2018). Tethered membrane architectures—design and applications. *Frontiers in Materials*, 55.

-
- [81] Belkilani, M., Shokouhi, M., Farre, C., Chevalier, Y., Minot, S., Bessueille, F., ... & Chaix, C. (2021). Surface Plasmon Resonance Monitoring of Mono-Rhamnolipid Interaction with Phospholipid-Based Liposomes. *Langmuir*, 37(26), 7975-7985.
- [82] Knoll, W., Frank, C. W., Heibel, C., Naumann, R., Offenhäusser, A., Rühle, J., ... & Sinner, A. (2000). Functional tethered lipid bilayers. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 74(3), 137-158.
- [83] Wagner, M. L., & Tamm, L. K. (2000). Tethered polymer-supported planar lipid bilayers for reconstitution of integral membrane proteins: silane-polyethyleneglycol-lipid as a cushion and covalent linker. *Biophysical journal*, 79(3), 1400-1414.
- [84] Zhang, L., Longo, M. L., & Stroeve, P. (2000). Mobile phospholipid bilayers supported on a polyion/alkylthiol layer pair. *Langmuir*, 16(11), 5093-5099.
- [85] Théato, P., & Zentel, R. (2000). Formation of lipid bilayers on a new amphiphilic polymer support. *Langmuir*, 16(4), 1801-1805.
- [86] Ngo, A. T., Karam, P., Fuller, E., Burger, M., & Cosa, G. (2008). Liposome encapsulation of conjugated polyelectrolytes: Toward a liposome beacon. *Journal of the American Chemical Society*, 130(2), 457-459.
- [87] Brochu, H., Polidori, A., Pucci, B., & Vermette, P. (2004). Drug delivery systems using immobilized intact liposomes: a comparative and critical review. *Current Drug Delivery*, 1(3), 299-312.
- [88] Ye, Q., Konradi, R., Textor, M., & Reimhult, E. (2009). Liposomes tethered to omega-functional PEG brushes and induced formation of PEG brush supported planar lipid bilayers. *Langmuir*, 25(23), 13534-13539.
- [89] Reimhult, E., Höök, F., & Kasemo, B. (2002). Vesicle adsorption on SiO₂ and TiO₂: dependence on vesicle size. *The Journal of chemical physics*, 117(16), 7401-7404.
- [90] Reimhult, E., Höök, F., & Kasemo, B. (2003). Intact vesicle adsorption and supported biomembrane formation from vesicles in solution: influence of surface chemistry, vesicle size, temperature, and osmotic pressure. *Langmuir*, 19(5), 1681-1691.
- [91] Reimhult, E., Zäch, M., Höök, F., & Kasemo, B. (2006). A multitechnique study of liposome adsorption on Au and lipid bilayer formation on SiO₂. *Langmuir*, 22(7), 3313-3319.
- [92] Dimitrievski, K., & Kasemo, B. (2009). Influence of lipid vesicle composition and surface charge density on vesicle adsorption events: a kinetic phase diagram. *Langmuir*, 25(16), 8865-8869.
- [93] Boukobza, E., Sonnenfeld, A., & Haran, G. (2001). Immobilization in surface-tethered lipid vesicles as a new tool for single biomolecule spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(48), 12165-12170.

- [94] Benkoski, J. J., & Höök, F. (2005). Lateral mobility of tethered vesicle– DNA assemblies. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(19), 9773-9779.
- [95] Ma, Y., Zhang, H., Gruzdys, V., & Sun, X. L. (2011). Azide-reactive liposome for chemoselective and biocompatible liposomal surface functionalization and glyco-liposomal microarray fabrication. *Langmuir*, 27(21), 13097-13103.
- [96] Masson, L., Mazza, A., & Brousseau, R. (1994). Stable immobilization of lipid vesicles for kinetic studies using surface plasmon resonance. *Analytical biochemistry*, 218(2), 405-412.
- [97] Stachowiak, O., Dolder, M., & Wallimann, T. (1996). Membrane-binding and lipid vesicle cross-linking kinetics of the mitochondrial creatine kinase octamer. *Biochemistry*, 35(48), 15522-15528.
- [98] Schlattner, U., & Wallimann, T. (2000). A quantitative approach to membrane binding of human ubiquitous mitochondrial creatine kinase using surface plasmon resonance. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 32(1), 123-131.
- [99] Jung, L. S., Shumaker-Parry, J. S., Campbell, C. T., Yee, S. S., & Gelb, M. H. (2000). Quantification of tight binding to surface-immobilized phospholipid vesicles using surface plasmon resonance: binding constant of phospholipase A2. *Journal of the American Chemical Society*, 122(17), 4177-4184.
- [100] Elie-Caille, C., Fliniaux, O., Pantigny, J., Maziere, J. C., & Bourdillon, C. (2005). Self-Assembly of solid-supported membranes using a triggered fusion of phospholipid-enriched proteoliposomes prepared from the inner mitochondrial membrane1. *Langmuir*, 21(10), 4661-4668.
- [101] Stamou, D., Duschl, C., Delamar, E., & Vogel, H. (2003). Self-assembled microarrays of attoliter molecular vessels. *Angewandte Chemie*, 115(45), 5738-5741.
- [102] Anderluh, G., Beseničar, M., Kladnik, A., Lakey, J. H., & Maček, P. (2005). Properties of nonfused liposomes immobilized on an L1 Biacore chip and their permeabilization by a eukaryotic pore-forming toxin. *Analytical biochemistry*, 344(1), 43-52.
- [103] Cooper, M. A., Hansson, A., Löfås, S., & Williams, D. H. (2000). A vesicle capture sensor chip for kinetic analysis of interactions with membrane-bound receptors. *Analytical biochemistry*, 277(2), 196-205.
- [104] MacKenzie, C. R., Hirama, T., Lee, K. K., Altman, E., & Young, N. M. (1997). Quantitative analysis of bacterial toxin affinity and specificity for glycolipid receptors by surface plasmon resonance. *Journal of Biological Chemistry*, 272(9), 5533-5538.
- [105] MacKenzie, C. R., & Hirama, T. (2000). Quantitative analyses of binding affinity and specificity for glycolipid receptors by surface plasmon resonance. *Methods in Enzymology*, 312, 205-216.

- [106] Svedhem, S., Pfeiffer, I., Larsson, C., Wingren, C., Borrebaeck, C., & Höök, F. (2003). Patterns of DNA-Labeled and scFv-Antibody-Carrying Lipid Vesicles Directed by Material-Specific Immobilization of DNA and Supported Lipid Bilayer Formation on an Au/SiO₂ Template. *ChemBioChem*, 4(4), 339-343.
- [107] Granéli, A., Rydström, J., Kasemo, B., & Höök, F. (2004). Utilizing adsorbed proteoliposomes trapped in a non-ruptured state on SiO₂ for amplified detection of membrane proteins. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(3), 498-504.
- [108] Bompard, J., Maniti, O., Aboukhachfe, R., Ausserre, D., & Girard-Egrot, A. (2021). BALM: Watching the Formation of Tethered Bilayer Lipid Membranes with submicron lateral resolution. *Langmuir*, 37(31), 9457-9471.
- [109] Granéli, A., Rydström, J., Kasemo, B., & Höök, F. (2003). Formation of supported lipid bilayer membranes on SiO₂ from proteoliposomes containing transmembrane proteins. *Langmuir*, 19(3), 842-850.
- [110] Chadli, M., Rebaud, S., Maniti, O., Tillier, B., Cortès, S., & Girard-Egrot, A. (2017). New tethered phospholipid bilayers integrating functional G-protein-coupled receptor membrane proteins. *Langmuir*, 33(39), 10385-10401.
- [111] Rao, N. M., Plant, A. L., Silin, V., Wight, S., & Hui, S. W. (1997). Characterization of biomimetic surfaces formed from cell membranes. *Biophysical journal*, 73(6), 3066-3077.
- [112] Eid, M., Rippa, S., Castano, S., Desbat, B., Chopineau, J., Rossi, C., & Béven, L. (2010). Exploring the membrane mechanism of the bioactive peptaibol ampullosporin a using lipid monolayers and supported biomimetic membranes. *Journal of Biophysics*, 2010.
- [113] Kiessling, V., Liang, B., Kreutzberger, A. J., & Tamm, L. K. (2017). Planar supported membranes with mobile SNARE proteins and quantitative fluorescence microscopy assays to study synaptic vesicle fusion. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 72.
- [114] Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C. & Weibel, E. Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. *Phys. Rev. Lett.* 49, 57–61 (1982).
- [115] Haugstad, G. (2012). Atomic force microscopy: understanding basic modes and advanced applications. John Wiley & Sons.
- [116] Takechi-Haraya, Y., Goda, Y., & Sakai-Kato, K. (2018). Imaging and size measurement of nanoparticles in aqueous medium by use of atomic force microscopy. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 410(5), 1525-1531.
- [117] Bakowsky, H., Richter, T., Kneuer, C., Hoekstra, D., Rothe, U., Bendas, G., ... & Bakowsky, U. (2008). Adhesion characteristics and stability assessment of lectin-modified liposomes for site-specific drug delivery. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1778(1), 242-249.

- [118] Anabousi, S., Laue, M., Lehr, C. M., Bakowsky, U., & Ehrhardt, C. (2005). Assessing transferrin modification of liposomes by atomic force microscopy and transmission electron microscopy. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 60(2), 295-303.
- [119] Berquand, A., Fa, N., Dufrene, Y. F., & Mingeot-Leclercq, M. P. (2005). Interaction of the macrolide antibiotic azithromycin with lipid bilayers: effect on membrane organization, fluidity, and permeability. *Pharmaceutical research*, 22(3), 465-475.
- [120] Domenech, O., Francius, G., Tulkens, P. M., Van Bambeke, F., Dufrene, Y., & Mingeot-Leclercq, M. P. (2009). Interactions of oritavancin, a new lipoglycopeptide derived from vancomycin, with phospholipid bilayers: effect on membrane permeability and nanoscale lipid membrane organization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(9), 1832-1840.
- [121] Yguerabide, J., Schmidt, J. A., & Yguerabide, E. E. (1982). Lateral mobility in membranes as detected by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophysical journal*, 40(1), 69-75.
- [122] Christiaens, B., Symoens, S., Vanderheyden, S., Engelborghs, Y., Joliot, A., Prochiantz, A., ... & Vanloo, B. (2002). Tryptophan fluorescence study of the interaction of penetratin peptides with model membranes. *European Journal of Biochemistry*, 269(12), 2918-2926.
- [123] Matos, P. M., Franquelim, H. G., Castanho, M. A., & Santos, N. C. (2010). Quantitative assessment of peptide-lipid interactions.: Ubiquitous fluorescence methodologies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1798(11), 1999-2012.
- [124] Levental, K. R., & Levental, I. (2015). Giant plasma membrane vesicles: models for understanding membrane organization. *Current topics in membranes*, 75, 25-57.
- [125] Homan, R., Esmail, N., Mendelsohn, L., & Kato, G. J. (2013). A fluorescence method to detect and quantitate sterol esterification by lecithin: cholesterol acyltransferase. *Analytical biochemistry*, 441(1), 80-86.
- [126] Richter, R. P. (2004). The Formation of Solid-Supported Lipid Membranes and Two-Dimensional Assembly of Proteins. A Study Combining Atomic Force Microscopy and Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring.
- [127] Dixon, M. C. (2008). Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring: enabling real-time characterization of biological materials and their interactions. *Journal of biomolecular techniques: JBT*, 19(3), 151.
- [128] Briand, E., Zäch, M., Svedhem, S., Kasemo, B., & Petronis, S. (2010). Combined QCM-D and EIS study of supported lipid bilayer formation and interaction with pore-forming peptides. *Analyst*, 135(2), 343-350.

- [129] Lu, N. Y., Yang, K., Li, J. L., Yuan, B., & Ma, Y. Q. (2013). Vesicle deposition and subsequent membrane–melittin interactions on different substrates: A QCM-D experiment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(8), 1918-1925.
- [130] Zobel, K., Choi, S. E., Minakova, R., Gocyla, M., & Offenhäusser, A. (2017). N-Cadherin modified lipid bilayers promote neural network formation and circuitry. *Soft matter*, 13(44), 8096-8107.
- [131] Kari, O. K., Rojalin, T., Salmaso, S., Barattin, M., Jarva, H., Meri, S., ... & Urtti, A. (2017). Multi-parametric surface plasmon resonance platform for studying liposome-serum interactions and protein corona formation. *Drug delivery and translational research*, 7(2), 228-240.
- [132] Damos, F. S., Luz, R. C., & Kubota, L. T. (2005). Determination of thickness, dielectric constant of thiol films, and kinetics of adsorption using surface plasmon resonance. *Langmuir*, 21(2), 602-609.
- [133] Granqvist, N., Liang, H., Laurila, T., Sadowski, J., Yliperttula, M., & Viitala, T. (2013). Characterizing ultrathin and thick organic layers by surface plasmon resonance three-wavelength and waveguide mode analysis. *Langmuir*, 29(27), 8561-8571.
- [134] Hock, B., Seifert, M., & Kramer, K. (2002). Engineering receptors and antibodies for biosensors. *Biosensors and bioelectronics*, 17(3), 239-249.
- [135] Hao, D., Ohme-Takagi, M., & Yamasaki, K. (2003). A modified sensor chip for surface plasmon resonance enables a rapid determination of sequence specificity of DNA-binding proteins. *FEBS letters*, 536(1-3), 151-156.
- [136] Fivash, M., Towler, E. M., & Fisher, R. J. (1998). BIAcore for macromolecular interaction. *Current opinion in biotechnology*, 9(1), 97-101.
- [137] Plant, A. L., Brighamburke, M., Petrella, E. C., & Oshannessy, D. J. (1995). Phospholipid/alkanethiol bilayers for cell-surface receptor studies by surface plasmon resonance. *Analytical Biochemistry*, 226(2), 342-348.
- [138] Keller, C. A., Glasmästar, K., Zhdanov, V. P., & Kasemo, B. (2000). Formation of supported membranes from vesicles. *Physical Review Letters*, 84(23), 5443.
- [139] Fenzl, C., Hirsch, T., & Baeumner, A. J. (2015). Liposomes with high refractive index encapsulants as tunable signal amplification tools in surface plasmon resonance spectroscopy. *Analytical chemistry*, 87(21), 11157-11163.
- [140] Fenzl, C., Genslein, C., Domonkos, C., Edwards, K. A., Hirsch, T., & Baeumner, A. J. (2016). Investigating non-specific binding to chemically engineered sensor surfaces using liposomes as models. *Analyst*, 141(18), 5265-5273.

- [141] Sacconi, A., Tadini-Buoninsegni, F., Tiribilli, B., & Margheri, G. (2018). A Comparative Study of Phosphatidylcholine versus Phosphatidylserine-Based Solid Supported Membranes for the Preparation of Liposome-Rich Interfaces. *Langmuir*, 34(40), 12183-12190.
- [142] Xiang, Y., Kiseleva, R., Reukov, V., Mulligan, J., Atkinson, C., Schlosser, R., & Vertegel, A. (2015). Relationship between targeting efficacy of liposomes and the dosage of targeting antibody using surface plasmon resonance. *Langmuir*, 31(44), 12177-12186.
- [143] Parkkila, P., & Viitala, T. (2020). Partitioning of catechol derivatives in lipid membranes: Implications for substrate specificity to catechol-o-methyltransferase. *ACS chemical neuroscience*, 11(6), 969-978.
- [144] Baird, C. L., Courtenay, E. S., & Myszka, D. G. (2002). Surface plasmon resonance characterization of drug/liposome interactions. *Analytical biochemistry*, 310(1), 93-99.
- [145] Mozsolits, H., & Aguilar, M. I. (2002). Surface plasmon resonance spectroscopy: an emerging tool for the study of peptide-membrane interactions. *Peptide Science: Original Research on Biomolecules*, 66(1), 3-18.
- [146] Skyttner, C., Enander, K., Aronsson, C., & Aili, D. (2018). Tuning liposome membrane permeability by competitive coiled coil heterodimerization and heterodimer exchange. *Langmuir*, 34(22), 6529-6537.
- [147] Kari, O. K., Ndika, J., Parkkila, P., Louna, A., Lajunen, T., Puustinen, A., ... & Urtti, A. (2020). In situ analysis of liposome hard and soft protein corona structure and composition in a single label-free workflow. *Nanoscale*, 12(3), 1728-1741.
- [148] Coutable, A., Thibault, C., Chalmeau, J., François, J. M., Vieu, C., Noireaux, V., & Trévisiol, E. (2014). Preparation of tethered-lipid bilayers on gold surfaces for the incorporation of integral membrane proteins synthesized by cell-free expression. *Langmuir*, 30(11), 3132-3141.
- [149] Palacios-Ortega, J., García-Linares, S., Åstrand, M., Al Sazzad, M. A., Gavilanes, J. G., Martínez-del-Pozo, A., & Slotte, J. P. (2016). Regulation of sticholysin II-induced pore formation by lipid bilayer composition, phase state, and interfacial properties. *Langmuir*, 32(14), 3476-3484.
- [150] Lee, T. H., Hirst, D. J., & Aguilar, M. I. (2015). New insights into the molecular mechanisms of biomembrane structural changes and interactions by optical biosensor technology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1848(9), 1868-1885.
- [151] Howland, M. C., Szmodis, A. W., Sanii, B., & Parikh, A. N. (2007). Characterization of physical properties of supported phospholipid membranes using imaging ellipsometry at optical wavelengths. *Biophysical journal*, 92(4), 1306-1317.

-
- [152] Mashaghi, A., Swann, M., Popplewell, J., Textor, M., & Reimhult, E. (2008). Optical anisotropy of supported lipid structures probed by waveguide spectroscopy and its application to study of supported lipid bilayer formation kinetics. *Analytical chemistry*, 80(10), 3666-3676.
- [153] Swann, M. J., Peel, L. L., Carrington, S., & Freeman, N. J. (2004). Dual-polarization interferometry: an analytical technique to measure changes in protein structure in real time, to determine the stoichiometry of binding events, and to differentiate between specific and nonspecific interactions. *Analytical biochemistry*, 329(2), 190-198.
- [154] Lopes, S. C., & Castanho, M. A. (2005). Overview of common spectroscopic methods to determine the orientation/alignment of membrane probes and drugs in lipidic bilayers. *Current Organic Chemistry*, 9(9), 889-898.
- [155] Cho, N. J., Frank, C. W., Kasemo, B., & Höök, F. (2010). Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring of supported lipid bilayers on various substrates. *Nature protocols*, 5(6), 1096-1106.
- [156] Lee, G. S., & Park, J. W. (2020). Interactions of Cinnamycin-Immobilized Gold Nanorods with Biomimetic Membranes. *The Journal of membrane biology*, 253(1), 37-42.
- [157] Papo, N., & Shai, Y. (2003). Exploring peptide membrane interaction using surface plasmon resonance: differentiation between pore formation versus membrane disruption by lytic peptides. *Biochemistry*, 42(2), 458-466.
- [158] Heyse, S., Ernst, O. P., Dienes, Z., Hofmann, K. P., & Vogel, H. (1998). Incorporation of rhodopsin in laterally structured supported membranes: observation of transducin activation with spatially and time-resolved surface plasmon resonance. *Biochemistry*, 37(2), 507-522.
- [159] Schmidt, E. K., Liebermann, T., Kreiter, M., Jonczyk, A., Naumann, R., Offenhäusser, A., ... & Knoll, W. (1998). Incorporation of the acetylcholine receptor dimer from *Torpedo californica* in a peptide supported lipid membrane investigated by surface plasmon and fluorescence spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics*, 13(6), 585-591.
- [160] Stenlund, P., Babcock, G. J., Sodroski, J., & Myszka, D. G. (2003). Capture and reconstitution of G protein-coupled receptors on a biosensor surface. *Analytical biochemistry*, 316(2), 243-250.

***Chapitre II : La théorie de la Résonance
Plasmonique de Surface (SPR)***

I. Introduction

Ce second chapitre est dédié à la présentation de la théorie de la résonance plasmonique de surface (SPR). Nous nous intéressons, en premier lieu, à une approche théorique quant aux plasmons de surface. Leurs conditions d'existence, leurs propriétés spatiales ainsi que leurs méthodes d'excitation sont abordées. La notion de la résonance du plasmon de surface est ensuite déduite. Nous procédons ensuite à mettre en évidence l'intérêt de la résonance plasmonique de surface multiparamétrique MP-SPR par rapport à la SPR traditionnelle. Nous nous intéressons particulièrement au principe physique de la technique MP-SPR à double longueur d'onde qui est l'approche adoptée dans l'analyse optique de nos résultats.

II. Résonance plasmonique de surface et approche plasmonique

II.1. Historique de la découverte du plasmon de surface

L'étude du plasmon de surface n'est pas récente. Elle remonte à 1902 lorsque R.Wood, en étudiant le spectre de diffraction d'une source continue de lumière blanche à l'aide d'un réseau de diffraction recouvert de métal, avait remarqué une diffraction inhabituelle et la présence de bandes noires qu'il décrivait comme des anomalies [1]. L'interprétation théorique de ce phénomène et l'idée d'ondes de surface ont été rapportées pour la première fois en 1941 par U. Fano [2]. Cependant, la théorie n'a été pleinement développée qu'à la fin des années 50 par Ritchie [3], Stern et Ferrell [4] et Kanazawa [5] pour expliquer la perte d'énergie subie par les faisceaux d'électrons passant à travers des feuilles métalliques minces en contact avec un milieu diélectrique. Les auteurs ont constaté que les électrons à l'intérieur de la feuille pouvaient collectivement osciller à l'interface à une fréquence inférieure à la fréquence du plasma. En 1968, Otto avait montré que ces ondes de surface pouvaient être excitées en utilisant la réflexion totale atténuée (ATR) [6]. Au cours de la même année, Kretshmann et Raether [7] avaient montré la possibilité d'exciter le plasmon de surface en adoptant une autre configuration que celle d'Otto, mais toujours par ATR.

À la suite de ces travaux, l'intérêt pour la résonance du plasmon de surface a considérablement augmenté et a fait l'objet de nombreuses recherches et publications, en particulier pour caractériser les films minces et pour l'étude de processus d'interactions se déroulant sur des interfaces métalliques. Les nombreuses possibilités ouvertes dans ce domaine et le besoin de plus en plus important d'appareils robustes et fiables permettant la compréhension des

phénomènes biomoléculaires ont donné naissance à des entreprises spécialisées dans la vente d'appareils SPR. Le premier instrument commercial basé sur le principe de la SPR fut vendu par Biacore en 1990. L'émergence de cette technique a fait en sorte que le nombre de compagnies fabriquant des appareils à base de résonance du plasmon de surface a également augmenté énormément. On retrouve notamment des appareils produits par BioNavis, Horiba, Bio-Rad, BiOptix, Affinité Instruments, Texas Instruments, Biosensing Instruments et Sensia. Certains de ces appareils permettent de faire de l'imagerie, de l'électrochimie ou d'autres mesures optiques en plus des mesures SPR conventionnelles.

II.2. Définition du 'plasmon de surface'

Lorsque nous sommes en présence d'un métal contenant de nombreux électrons libres et pour une certaine fréquence de plasma (ω_p), le métal est le siège d'une oscillation collective d'un gaz d'électrons libres donnant naissance à une onde longitudinale dite de plasmon. Un plasmon est une quasi-particule résultant de la quantification des oscillations du plasma, de la même manière que les photons et les phonons sont des vibrations électromagnétiques et mécaniques quantifiées.

Un plasmon de surface (SP) est une oscillation collective et cohérente d'électrons qui se propage tout au long de l'interface entre un métal et un diélectrique (comme l'air, l'eau...). Au plasmon de surface est associé un champ électrique qui décroît exponentiellement et perpendiculairement, non seulement dans le métal mais aussi dans le diélectrique comme le montre la Figure 1 [8-10]. Cette décroissance confère au plasmon de surface un caractère évanescents caractérisé par une profondeur de pénétration dans le métal et dans le diélectrique.

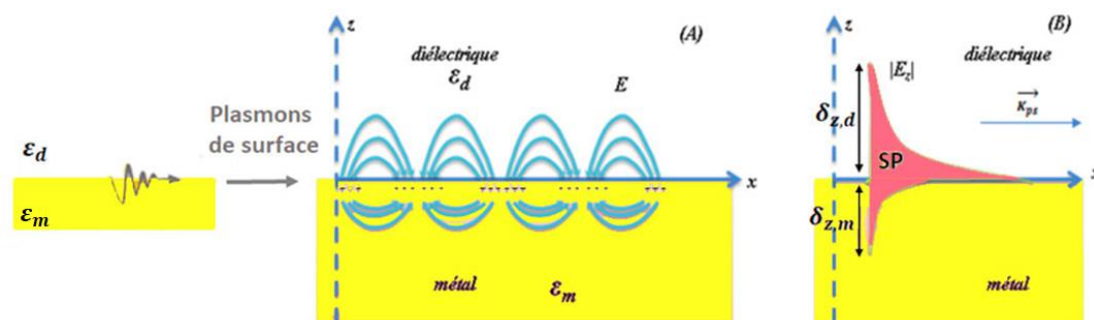


Figure 1. Représentation des ondes évanescentes du plasmon de surface à l'interface entre un métal et un diélectrique: (A) Champ électrique du plasmon de surface, (B) Amplitude du champ électrique du plasmon de surface. ϵ_m et ϵ_d sont respectivement les permittivités diélectriques du milieu métallique et du milieu diélectrique, E est le champ électrique, SP est le plasmon du surface, K_{sp} est le vecteur

d'onde, $\delta_{z,m}$ et $\delta_{z,d}$ sont respectivement les profondeurs de pénétration dans le métal et dans le diélectrique

L'excitation optique des SP par le biais d'un faisceau lumineux et sous certaines conditions est visible via un phénomène physique appelé la résonance du plasmon de surface [11]. Selon la loi de Snell [12], lorsqu'un rayon lumineux incident frappe une surface séparant deux milieux isotropes et non absorbants ayant des indices de réfraction différents, par exemple, l'air et le verre (tel que $n_{verre} > n_{air}$, où le verre est le milieu incident), avec un angle d'incidence θ_1 supérieur à l'angle d'incidence critique θ_c , toute la lumière sera réfléchi dans le verre ; c'est la réflexion totale interne (TIR). Pour un angle d'incidence θ_1 de TIR particulier et une longueur d'onde définie λ , l'énergie apportée par le rayon incident va créer une onde évanescente capable de résonner avec l'onde électromagnétique du SP. Le terme résonance traduit ainsi le fait que les électrons libres du métal oscillent à la même fréquence que celle de l'onde excitatrice incidente. En conséquence, l'absorption de cette énergie photonique va induire une diminution de l'intensité du rayon lumineux réfléchi à un angle caractéristique ; cet angle est communément appelé l'angle de résonance plasmonique θ_{SPR} . Ainsi, expérimentalement, cet effet SPR correspond à un pic d'absorption. Les conditions de résonance sont très sensibles à l'indice de réfraction du milieu diélectrique. L'onde résultante de ce phénomène est une onde évanescente, dont l'amplitude diminue exponentiellement dans la direction perpendiculaire de part et d'autre de l'interface. Lorsqu'une espèce biologique vient réagir à l'interface métal/milieu diélectrique, l'énergie nécessaire pour exciter les SP va alors changer. De plus amples détails sur la théorie associée à la résonance du plasmon de surface sont présentés au paragraphe II.3.4.

Dans cette première partie, nous avons introduit la notion générale d'un plasmon de surface, un bref historique montrant l'intérêt qu'ont toujours suscité ces derniers ainsi que le phénomène de résonance du plasmon de surface. Dans ce qui suit, nous nous penchons sur une étude « classique » du plasmon de surface à travers la théorie de Maxwell. Puis, nous déterminons quelques caractéristiques associées à cette onde. Et pour finir, nous présentons la génération des SP.

II.3. Caractéristiques du plasmon de surface

II.3.1. Les conditions d'existence du plasmon de surface

Les SP sont des ondes électromagnétiques de surface. Le phénomène peut être prédit par la théorie de Maxwell et conformément aux équations de Maxwell. Le champ électromagnétique associé aux SP, à l'interface entre un métal et un diélectrique, est obtenu en résolvant les

équations de Maxwell dans chaque milieu tout en utilisant les conditions de continuité à l'interface entre le milieu métallique et diélectrique. Ces dernières font intervenir les continuités des composantes tangentielles du champ électrique E et magnétique H à la traversée de l'interface [13]. La propagation d'une onde électromagnétique est décrite à travers l'équation de propagation (Equation 1), régie par les équations de Maxwell données en annexe 1.

$$\nabla^2 E + k_0^2 \varepsilon E = 0 \quad \text{(Equation 1)}$$

où ε est la permittivité diélectrique, $k_0 = \frac{w}{c}$ représente l'amplitude du vecteur d'onde de l'onde se propageant dans le vide avec c la célérité de la lumière dans le vide et w la fréquence angulaire de l'onde incidente.

L'équation 1, connue également sous le nom de l'équation d'Helmholtz, est aussi valable pour le champ magnétique H .

Passons à présent à la géométrie supportant les SP. Pour cette étude, une structure planaire est utilisée et le plan d'incidence de l'onde sera (xOz) . Les solutions recherchées des équations de Maxwell sont des modes guidés : évanescents selon la direction z , invariants selon y , se propageant selon la direction x et de constante de propagation k_{SP} . L'interface considérée sépare un milieu métallique (plan $z < 0$, Figure 1) d'un milieu diélectrique (plan $z > 0$, Figure 1), tous deux considérés comme linéaires, homogènes, isotropes, non-magnétiques de perméabilité magnétique $\mu = \mu_0$ (perméabilité magnétique du vide) et de permittivité diélectrique ε_m et ε_d et s'écrivant sous la forme présentée par les équations 2.a et 2.b [13]:

$$\text{Pour le milieu diélectrique : } \varepsilon_d = \varepsilon'_d + i \varepsilon''_d \quad \text{(Equation 2.a)}$$

$$\text{Pour le milieu métallique : } \varepsilon_m = \varepsilon'_m + i \varepsilon''_m \quad \text{(Equation 2.b)}$$

D'autre part, d'après la Figure 2, suivant la polarisation du champ électrique vis-à-vis du plan (xOz) , il est possible de distinguer entre deux catégories de solutions concernant le champ électromagnétique : une catégorie faisant intervenir une polarisation transverse électrique (TE) et une seconde faisant intervenir une polarisation transverse magnétique (TM) [14].

- Si le champ électrique est perpendiculaire au plan (xOz) , la polarisation s ou transverse électrique (TE) est mise en jeu. Dans ce cas, le champ électrique E est parallèle à y . Le mode (TE) lie $\{E_y, H_x, H_z\}$ (voir Figure 2.a)

- Si le champ électrique est parallèle au plan (xOz) , la polarisation p est prise en compte. Nous parlons alors de modes transverses magnétiques (TM). Dans ce cas, le champ magnétique H est orienté suivant x . Dans ce cas, le mode lie $\{H_y, E_x, E_z\}$ (voir Figure 2.b)

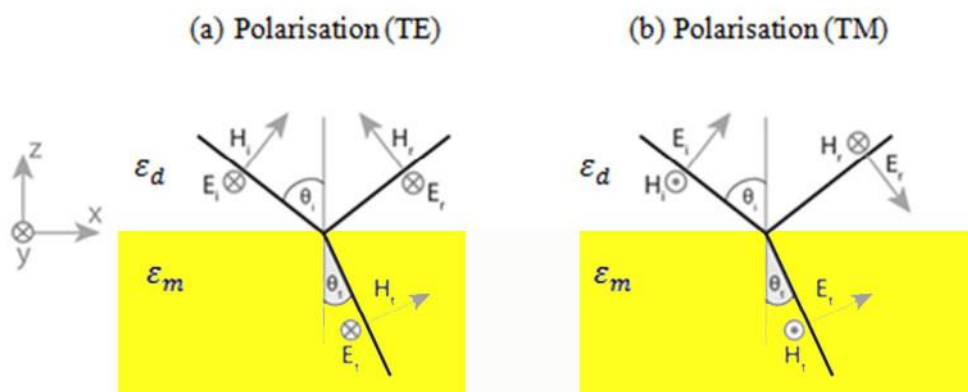


Figure 2. Différents types de polarisation. En (a) Polarisation (TE) et en (b) Polarisation (TM)

Dans ces conditions, il est possible de définir une composante transverse du champ, notée Ψ_j , qui peut-être, soit $E_{y,j}$ (polarisation TE), soit $H_{y,j}$ (polarisation TM) [15], solution de l'équation 1 qui s'écrit suivant l'équation 3 :

$$\nabla^2 \Psi_j + k_0^2 \varepsilon_j \Psi_j = 0 \quad \text{(Equation 3)}$$

où ε_j est définie comme étant la fonction diélectrique associée au milieu j (métal (m) ou diélectrique (d)).

Ainsi, les solutions cherchées doivent présenter le caractère évanescent suivant l'axe (z) des SP. Dans l'annexe 2, nous présentons les solutions obtenues pour les deux modes (TE) et (TM) et la justification du fait qu'un SP n'intervient qu'en mode TM et non pas en mode (TE). Un SP n'existe donc qu'en polarisation (TM) où le champ électrique E se trouve dans le plan (xOz) comme le montre la Figure 1.

De plus, une autre condition révélée nécessaire à l'existence du SP est que les parties réelles de la permittivité diélectrique des deux milieux ε_j doivent être de signe opposé. Cette condition plasmonique peut être remplie avec une interface métal/milieu diélectrique dont la partie réelle de la permittivité diélectrique est de signe opposé. Cependant, les applications à base de SPR utilisent généralement comme milieu diélectrique une solution aqueuse saline où se déroulent

les événements biologiques et dont la partie imaginaire de la permittivité diélectrique est nulle, soit : $n^2 = \varepsilon_d = \varepsilon'_d$ [16]. Ceci mène à choisir un métal avec $\varepsilon'_m < 0$. Plusieurs métaux satisfont à cette condition, mais en SPR, principalement quatre d'entre eux sont fréquemment utilisés : l'or (Au), l'argent (Ag), l'aluminium (Al) et le cuivre (Cu).

II.3.2. La relation de dispersion

Le vecteur d'onde k_{SP} du plasmon de surface dans la direction de propagation x est donné par l'équation 4 [8]:

$$k_{SP} = k_0 \times \sqrt{\frac{\varepsilon_d \times \varepsilon_m}{\varepsilon_d + \varepsilon_m}} = k'_{SP} + ik''_{SP} \quad \text{(Equation 4)}$$

où k_0 est le vecteur d'onde de la lumière dans l'air : $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda} = \frac{2\pi\nu}{c} = \frac{\omega}{c}$, avec λ est la longueur d'onde de la lumière, ω est la fréquence angulaire de l'onde incidente et c est la célérité de la lumière. k'_{SP} et k''_{SP} sont respectivement la partie réelle et imaginaire du vecteur d'onde k_{SP} .

À partir de ce vecteur d'onde k_{SP} , on en déduit la relation de dispersion $\omega = f(k_x)$.

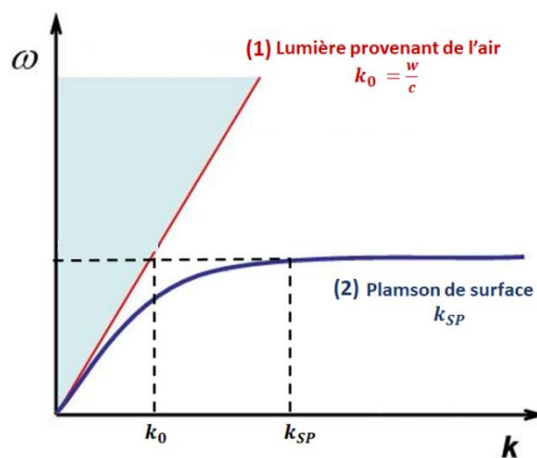


Figure 3. Relation de dispersion du plasmon de surface

La Figure 3 montre que la courbe de dispersion des plasmons de surface (courbe (2)) se situe toujours à droite de la courbe (1) dite ligne de lumière à laquelle correspond la relation de propagation de la lumière dans le vide $k_0 = \frac{\omega}{c}$.

II.3.3. Extension spatiale du plasmon de surface

Le champ électrique $E_{SP,j}$ associé à l'onde électromagnétique polarisée p des SP dans chaque milieu j (métal ou milieu diélectrique) s'écrit sous la forme présentée par les équations 5.a, 5.b et 5.c [9]:

$$\vec{E}_{SP}(x, z, t) = (E_{x,j}, 0, E_{z,j})e^{-|z|k_{z,j}}e^{i(k_{SP}x - wt)} \quad \text{(Equation 5.a)}$$

$$\vec{E}_{SP}(x, z, t) = (E_{x,j}, 0, E_{z,j})e^{-|z|k_{z,j}}e^{-k''_{SP}x}e^{i(k'_{SP}x - wt)} \quad \text{(Equation 5.b)}$$

$$\vec{E}_{SP}(x, z, t) = (E_{x,j}, 0, E_{z,j})e^{-\frac{|z|}{2\delta_{z,j}}}e^{-\frac{x}{2L_{SP}}}e^{i(k'_{SP}x - wt)} \quad \text{(Equation 5.c)}$$

Cette même expression peut être également obtenue pour le champ magnétique $H_{SP,j}(y, t)$.

L'expression du champ électrique obtenue montre que l'onde associée aux SP est purement évanescence selon la direction z avec une longueur caractéristique nommée profondeur de pénétration $\delta_{z,j}$. Suivant la direction x , l'onde se propage mais décroît exponentiellement, avec une longueur caractéristique appelée longueur de propagation et notée L_{SP} .

II.3.3.1. La profondeur de pénétration

La profondeur de pénétration appelée aussi épaisseur de peau $\delta_{z,j}$ correspond à la pénétration maximale de l'onde évanescence à l'intérieur du milieu j (métal ou diélectrique) et suivant la direction z . Elle est donnée par l'équation suivante dans les deux milieux [8]:

$$\delta_{z,j} = \frac{\lambda}{2\pi} \times \sqrt{\left| \frac{\varepsilon'_m + \varepsilon_d}{\varepsilon_j^2} \right|} \quad \text{(Equation 6)}$$

où ε'_m est la partie réelle de la permittivité diélectrique du milieu métallique, ε_d est la permittivité diélectrique du milieu diélectrique et ε_j fait référence à ε'_m ou ε_d .

Il est à noter que dans les applications capteurs, la profondeur de pénétration nous renseigne sur la distance à laquelle la molécule cible peut-être détectée.

II.3.3.2. La longueur de propagation

La longueur de propagation notée L_{SP} du SP, suivant l'axe x , est donnée par l'équation 7 :

$$L_{SP} = \frac{1}{2k''_{SP}} = \frac{\lambda (\varepsilon'_m)^2}{2\pi \varepsilon''_m} \sqrt{\left(\frac{\varepsilon'_m + \varepsilon_d}{\varepsilon'_m \varepsilon_d} \right)^3} \quad \text{(Equation 7)}$$

Elle est définie comme étant la distance au bout de laquelle l'intensité du champ décroît avec une distance caractéristique de $\frac{1}{2k''_{SP}}$.

Maintenant que nous avons introduit les principales caractéristiques des SP à savoir leurs conditions d'existence ainsi que leur extension spatiale, nous procédons dans le paragraphe suivant à la détermination de la méthode de génération de la résonance du plasmon de surface qui est le phénomène physique traduisant l'excitation des SP.

II.3.4. Excitation du plasmon de surface

Les SP peuvent être excités par une source d'énergie externe : soit par un faisceau d'électrons comme cela a été fait dans les premiers temps afin de comprendre les SP, soit par un couplage optique. Pour l'instant, nous nous concentrons uniquement sur les SP excités par la lumière. Lorsque les SP se couplent avec un photon incident, une autre quasi-particule appelée polariton est créée. D'après la Figure 3, nous remarquons que la relation de dispersion des SP (k_{SP}) reste toujours strictement en-dessous de la ligne de lumière k_0 . Cette absence d'intersection entre la ligne de lumière (courbe 1, Figure 3) et la courbe de dispersion des SP (courbe 2, Figure 3) résulte du fait que l'onde du SP est une onde évanescente des deux côtés de l'interface et que la lumière incidente est progressive. Par conséquent, ceci interdit tout couplage ou résonance entre une onde électromagnétique du domaine visible en particulier, et un mode de propagation des SP. En d'autres termes, il est impossible d'exciter les SP en éclairant directement le métal avec une source de lumière, car l'accord de phase ne peut pas être réalisé sans un système particulier de couplage. C'est pour cette raison, qu'un arrangement préalable de la composante longitudinale du vecteur d'onde de la lumière incidente $k_{0x} = \frac{\omega}{c} \times \sin(\theta)$ (avec θ est l'angle d'incidence) est indispensable pour le couplage entre le mode photonique et plasmonique. Ce couplage est possible si on réalise l'égalité $k_{0x} = k_{SP}$ tout en augmentant la valeur de k_{0x} car quel que soit l'angle d'incidence θ , nous aurons toujours $k_{SP} > k_{0x}$ [17]. Ce but peut être atteint en faisant passer la lumière incidente à travers un milieu d'indice de réfraction supérieur à celui du milieu diélectrique siège des ondes du SP.

En se basant sur ce principe, des configurations optiques existent pour mettre en évidence l'excitation du plasmon. L'une des techniques les plus utilisées pour l'excitation des SP est celle se basant sur la Réflexion Totale Atténuée (ATR) à une interface. Cette technique a été employée pour la première fois par Otto (Figure 4) puis par Kretschmann-Raether (Figure 5),

qui proposent d'exciter le plasmon en éclairant l'interface métal/diélectrique à travers un prisme. Cependant, quelques différences sont notées entre les deux configurations.

Au niveau de la configuration d'Otto [6], le prisme est disposé de façon à ce que sa base et la surface métallique soient séparées par un milieu diélectrique (l'air par exemple) appelé « gap ». Pour assurer le couplage par effet Tunnel de l'onde incidente avec la surface métallique, il faut s'assurer que l'épaisseur du diélectrique soit inférieure à la longueur d'onde d'excitation. C'est pour cette raison que la distance entre le prisme et le métal (soit l'épaisseur du diélectrique) doit être contrôlée parce qu'elle influence directement l'excitation des modes surfaciques. Ce contrôle minutieux fait que l'utilisation de cette méthode de couplage est la moins utilisée.

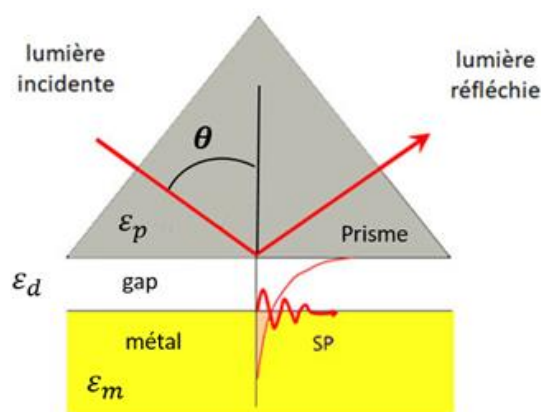


Figure 4. Configuration d'Otto [6]

Au niveau de la configuration de Kretschmann-Raether [7], le prisme est disposé de façon que sa base soit en contact direct avec l'une des surfaces du métal, l'autre est mise en contact avec le milieu diélectrique. Cette configuration est la plus utilisée car elle est plus facile à manier. D'autant plus, que la disposition de la surface métallique permet d'obtenir un couplage plasmonique important.

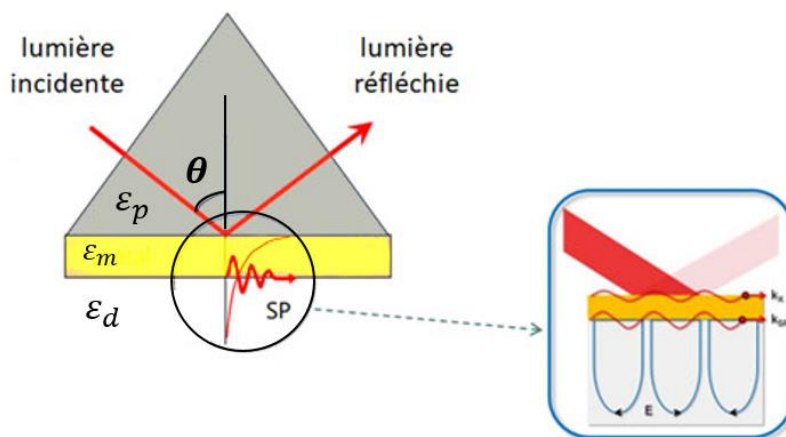


Figure 5. Configuration de Kretschmann-Raether [7]

Nous nous intéressons à la configuration de Kretschmann dont le principe est le suivant : une onde lumineuse excitatrice incidente, polarisée p , traverse un prisme (milieu incident) généralement en verre d'indice de réfraction $n_p = \sqrt{\varepsilon_p}$ supérieur à celui du milieu diélectrique n_d , subit une réflexion totale engendrant une onde évanescente se propageant à l'interface métal/milieu diélectrique.

Dans ce cas, il y aura une augmentation de la projection du vecteur d'onde de la lumière incidente sur l'axe de propagation x qui vaut $k_{0x} = \frac{\omega}{c} n_p \sin(\theta)$ où n_p est l'indice de réfraction du prisme et θ est l'angle d'incidence. Pour un certain angle d'incidence spécifique (angle supérieur à l'angle d'incidence critique θ_c), il y aura un couplage résonant (excitation maximale) entre la lumière incidente k_{0x} , plus précisément l'onde évanescente résultante, et l'onde du plasmon de surface k_{SP} . Ceci se traduit par une intersection au niveau de la courbe de dispersion des SP et celle de la lumière incidente provenant du prisme (courbe 3, Figure 6). Cette intersection est donnée par la relation de couplage ou de résonance traduite par l'équation 8 [8] :

$$k_{0x} = k_{SP}$$

$$\frac{\omega}{c} n_p \sin(\theta) = \frac{\omega}{c} \times \sqrt{\frac{\varepsilon_d \times \varepsilon_m}{\varepsilon_d + \varepsilon_m}} \quad \text{(Equation 8)}$$

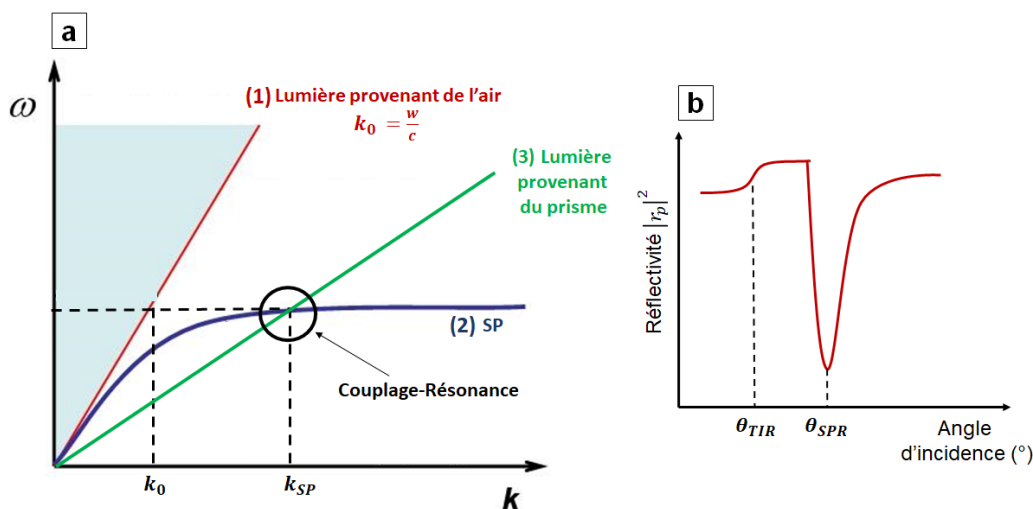


Figure 6. Mise en évidence de la résonance du plasmon de surface. En (a) couplage entre le mode photonique et plasmonique, en (b) le pic de résonance associé à la SPR

La conséquence de l'excitation des SP réside dans une diminution de la réflectivité (intensité de la lumière réfléchi) observée à l'angle d'incidence correspondant à la condition de couplage des SP (θ_{SPR}) puisque l'énergie lumineuse incidente est absorbée par le métal et transférée à ses électrons [7, 18]. Ce phénomène est appelé le phénomène de la résonance du plasmon de surface (SPR) qui se manifeste par l'apparition d'un pic de résonance au niveau du spectre de réflectivité visible au niveau de la Figure 6.b. L'évolution de la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence présente un pic d'absorption à l'angle de résonance θ_{SPR} . Cet angle où l'intensité de la réflexion totale est minimale présente une caractéristique spécifique de l'état de surface et il est sensible à la variation de masse, l'épaisseur et l'indice de réfraction à l'interface. Lorsque le milieu est optiquement plus dense et que dans ce cas, le prisme (n_p), le film métallique (n_m) et la longueur d'onde de la lumière incidente (λ) sont des valeurs constantes, θ_{SPR} ne dépend que de l'indice de réfraction du milieu diélectrique (n_d). Ainsi, les changements de l'indice de réfraction du milieu en contact avec la couche métallique peuvent être détectés comme des variations de θ_{SPR} .

La Figure 7 résume le phénomène du plasmon de surface lorsque la condition de couplage par résonance est remplie.

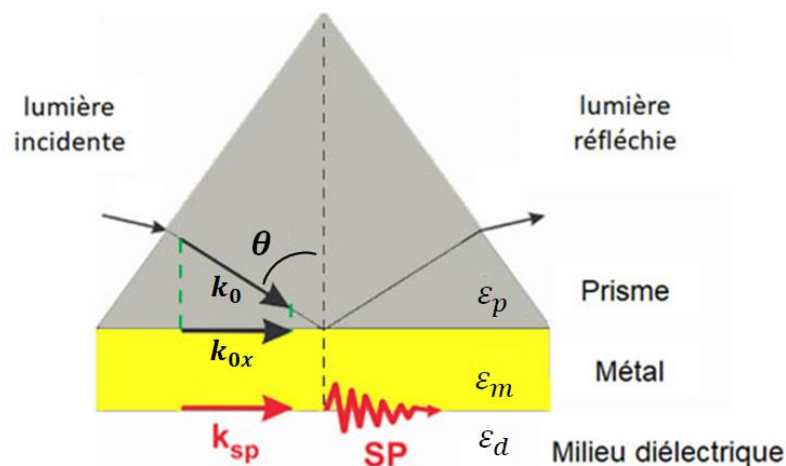


Figure 7. Illustration schématique de la SPR avec la configuration de Kretschmann lorsque la condition de couplage par résonance est remplie

La plupart des instruments SPR commerciaux utilisent la configuration de réflexion totale atténuée (ATR) de Kretschmann pour exciter les SP [19, 20]. Ils peuvent généralement fonctionner en mode balayage angulaire, à angle fixe ou par la variation de la longueur d'onde. En mode balayage angulaire, les changements de réflectivité détectés comme intensité du signal SPR en unités arbitraires sont surveillés en fonction de l'angle d'incidence du ou des laser(s) utilisés sur une plage angulaire pour produire la courbe SPR. Tandis que, en mode angle fixe, les changements de réflectivité sont surveillés à un angle incident fixe. Ces trois modes sont illustrés dans la Figure 8.

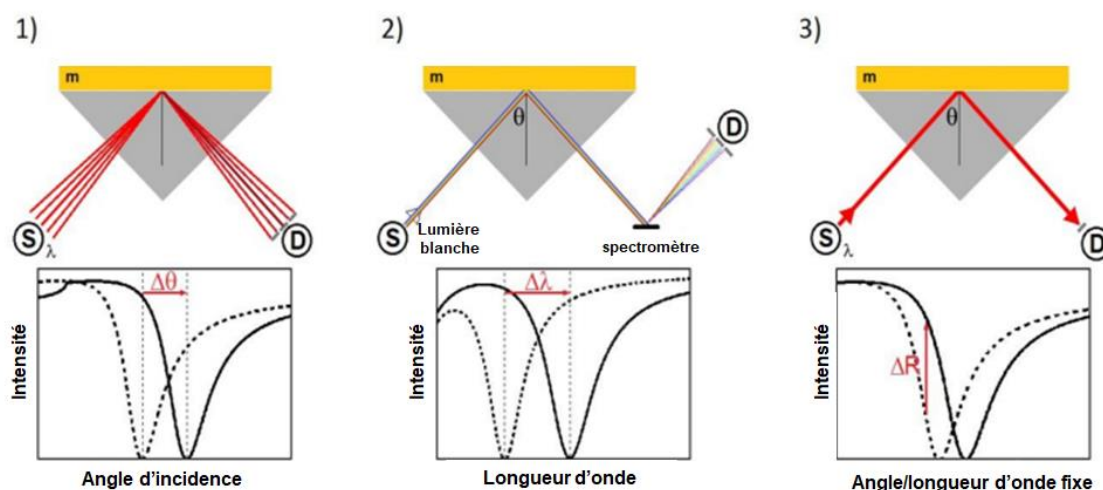


Figure 8. Illustration schématique de la SPR basés sur (de gauche à droite) la modulation angulaire (1), la longueur d'onde (2) et la modulation d'intensité (3)

II.4. Formalisme de Fresnel pour la caractérisation des couches

Les courbes SPR sont utilisées pour les calculs théoriques de l'épaisseur d et de l'indice de réfraction n d'une couche moléculaire. Ainsi, le spectre SPR peut être décrit avec les équations de Fresnel comme la réflectivité d'un système multicouche pour la lumière polarisée p [21, 22]. Le formalisme de la matrice de couche de Fresnel est la base de la description théorique de la réflectance de la lumière provenant du système optique SPR dans une configuration de Kretschmann. Les différentes couches du système sont supposées linéaires, homogènes et isotropes. Chaque couche est caractérisée par un indice de réfraction complexe $\tilde{n} = n + ik$ où n est l'indice de réfraction et k est le coefficient d'extinction, et une épaisseur d . Le milieu incident 0 (le prisme) et émergent N+1 (milieu d'analyse qui peut être gazeux ou liquide) ont une épaisseur infinie et sont non absorbants. Quant à la couche métallique, elle sera assimilée à un milieu absorbant ($k \neq 0$ et $\tilde{n} = n + ik$) et d'épaisseur finie. Les autres couches organiques intermédiaires seront assimilées à des couches non absorbantes ($k = 0$ et $\tilde{n} = n$) d'épaisseur finie.

Les perturbations de l'indice de réfraction à l'interface induisent des décalages de l'angle minimum du pic SPR en raison d'un changement de la condition de résonance. L'ajout de molécules est modélisé par une couche supplémentaire homogène entre le métal et le milieu d'analyse. Le calcul des paramètres optiques de cette couche est basé sur une matrice de diffusion 2×2 . Cette matrice représente les propriétés optiques résumées du système et considère les coefficients de réflexion comme des matrices, à l'interface entre deux milieux. La propagation de la lumière dans l'un des milieux est vue comme une autre matrice. Ces matrices dépendent de l'angle d'incidence de la lumière (θ), la longueur d'onde de la lumière (λ), l'épaisseur optique de la couche (d), les indices de réfraction de la couche (n) et du prisme (n_p)

La réflectivité d'un système multicouche est donnée par l'équation 9:

$$R = |r|^2 \quad \text{(Equation 9)}$$

Le coefficient de réflexion r de Fresnel associé à une structure multicouche pour la lumière polarisée p s'écrit comme présenté dans l'équation 10 [23, 24] :

$$r_p(\theta) = \frac{(M_{(1,1)}+M_{(1,2)}Q_N)Q_1-(M_{(2,1)}+M_{(2,2)}Q_N)}{(M_{(1,1)}+M_{(1,2)}Q_N)Q_1+(M_{(2,1)}+M_{(2,2)}Q_N)} \quad \text{(Equation 10)}$$

$$\text{Avec, } Q_k = \frac{1}{n_k^2} \times \cos\theta_k \quad \text{et } M_{ij} = \left(\prod_{k=2}^{N-1} M_k\right) \text{ avec } i, j = 1, 2$$

k étant le numéro de la couche, i représente l'indice de la ligne et j celle de la colonne.

En pratique, la modélisation et la résolution du formalisme matriciel de Fresnel sont effectuées par des outils d'ajustement mathématique ou des logiciels dédiés.

II.5. Formalisme de Jung

Le formalisme développé par Jung *et al.* en 1998 [25] relie le décalage d'angles θ_{SPR} aux propriétés optiques dépendantes de la longueur d'onde λ du film adsorbé sur une surface (épaisseur d , indice de réfraction n) et à deux paramètres liés au système SPR de mesure qui sont le coefficient de sensibilité (S , en deg) et la longueur de pénétration δ du champ électrique évanescent :

$$\Delta\theta_{SPR} = R = S(n - n_b) \left[1 - e^{\left(-\frac{d}{\delta}\right)} \right] \approx S(n - n_b) \frac{d}{\delta} \quad \text{(Equation 11)}$$

où $\Delta\theta_{SPR}$ (ou R) est la réponse SPR dans le cas où $d < \delta$, n_b est l'indice de réfraction du milieu d'analyse.

II.6. Formule de Feijter

La formule de Feijter présentée dans l'équation 12 est utilisée pour calculer la densité de masse surfacique Γ d'une couche biomoléculaire d'épaisseur d et d'indice de réfraction n . Cette formule a été dérivée de la dépendance de n par rapport à l'incrément de concentration des molécules adsorbantes [26, 27].

$$\Gamma = c \times d = \frac{d \times (n - n_b)}{\frac{dn}{dc}} \quad \text{(Equation 12)}$$

avec $c = \frac{(n - n_b)}{\frac{dn}{dc}}$, la concentration de la couche biomoléculaire, n_b est l'indice de réfraction du milieu d'analyse et $\frac{dn}{dc}$ est l'incrément d'indice de réfraction.

Dans le paragraphe suivant, nous présentons la nouvelle approche multiparamétrique de la résonance plasmonique de surface et tout particulièrement le principe de la méthode à deux longueurs d'onde utilisée dans la réalisation des travaux de cette thèse.

III. Résonance plasmonique de surface multiparamétrique (MP-SPR)

III.1. Description et intérêt de l'approche

Au cours des 20 dernières années, la SPR est apparue comme une technique optique relativement simple qui a été utilisée de manière routinière pour surveiller in situ les processus chimiques et physiques aux interfaces métalliques. Cette technique a connu un fort essor pour l'analyse des interactions biomoléculaires et pour la découverte de médicaments. Elle est extrêmement sensible aux petits changements de l'indice de réfraction à proximité d'une surface métallique et elle est utilisée pour caractériser un certain nombre de films différents, y compris les films métalliques, d'oxyde métallique et bio-organiques. Malgré son potentiel, la SPR dans sa forme traditionnelle a trouvé une utilisation limitée dans les domaines de recherche qui nécessitent d'appréhender un ensemble complet de paramètres afin de comprendre pleinement les mécanismes et le comportement des systèmes. Bien adaptée pour les études d'affinité entre molécules et surfaces, elle a rarement été utilisée sans approximation pour la caractérisation des films qui se forment sur les surfaces. Comme les mesures ellipsométriques, les mesures SPR donnent des épaisseurs et des indices de réfraction de films mais une seule mesure ne peut pas donner des valeurs uniques pour un film mince. Généralement, il n'est pas possible de déterminer n et d via une seule mesure SPR à une seule longueur d'onde [28]. De plus, lorsque l'un des paramètres doit être connu, la plupart des techniques SPR exploitent les indices de réfraction de la littérature. Ceux-ci peuvent cependant varier pour le même matériau. En conséquence, les études menées sur des nouveaux matériaux ne peuvent être qu'approximées car leur IR n'est pas encore connu. Ces hypothèses peuvent entraîner une grande incertitude dans le résultat.

Aujourd'hui, la résonance plasmonique de surface multiparamétrique (MP-SPR) redéfinit les capacités associées à la SPR traditionnelle, élargissant ainsi le champ d'application de cette technologie aux études biophysiques et aux études de biomatériaux [29]. Elle offre de nouvelles possibilités pour étudier les événements physiques impliqués à la fois dans la formation et les propriétés des couches dures et molles de matériaux et le comportement interfacial de ces couches entre elles dans des environnements solides, liquides et aussi gazeux. Cette technologie

a été spécifiquement adaptée, via son mode de balayage SPR et sa configuration optique à plusieurs longueurs d'onde pour offrir un nouveau niveau de compréhension dans les études biophysiques grâce à sa capacité dans l'analyse des événements de surface. En effet, elle permet de mesurer les épaisseurs et les indices de réfraction moyens de films ultra-minces (0.5-100 nm) jusqu'à relativement épais (300 nm - microns). Les couches mesurées peuvent être organiques, inorganiques, métalliques, et il est également possible de suivre les cinétiques d'interaction des composants avec tous ces matériaux.

Les instruments MP-SPR fabriqués par la société BioNavis Ltd exploitent le phénomène de résonance plasmonique de surface qui est obtenu en utilisant la configuration de Kretschmann, avec une source lumineuse rotative (voir Figure 9). Une lame de verre recouverte d'or est utilisée comme puce de détection. Le côté or fait face à la cellule d'écoulement et le côté verre est couplé au prisme à l'aide d'un gel optiquement adapté pour offrir un indice de réfraction n_p constant [30]. Cette configuration fournit une gamme d'indice de réfraction de 1,0 à 1,4 avec une sensibilité de 1 μ RIU (unité d'indice de réfraction micrométrique). Les mesures SPR traditionnelles surveillent les angles d'incidence sur une plage angulaire étroite de $\sim 10^\circ$ autour de θ_{SPR} . Cependant, la MP-SPR enregistre une courbe SPR complète en fonction du temps en balayant une plage angulaire plus large (38° - 78°) avec deux lasers ou plus. Dans un mode à une seule longueur d'onde, les courbes complètes SPR résultantes peuvent être ajustées et modélisées en utilisant un indice de réfraction connu du matériau mesuré et le formalisme de Fresnel. Cependant, en mode à longueurs d'onde multiples, lorsque le matériau est balayé avec au moins deux longueurs d'onde différentes, une solution unique peut être trouvée sans indice de réfraction ou épaisseur connus [28].

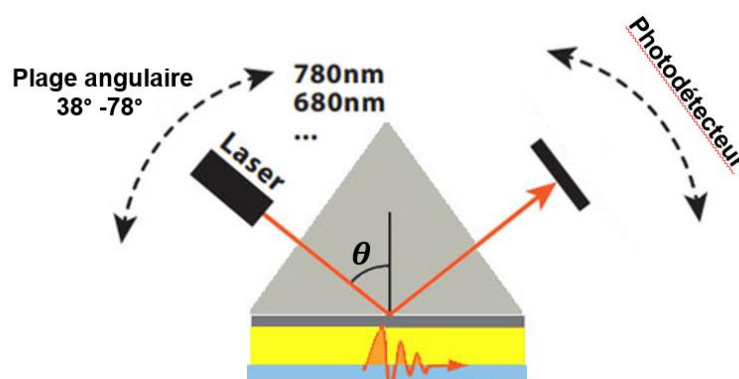


Figure 9. Illustration schématique de la MP-SPR (BioNavis, Ltd)

En utilisant la MP-SPR, plusieurs paramètres peuvent être acquis simultanément et suivis en temps réel tels que les positions angulaires TIR et θ_{SPR} , la demi-largeur du pic ou le changement d'intensité SPR en fonction de l'angle d'incidence. En conséquence, les indices de réfraction (n), les épaisseurs (d) et les densités de masse de surface (Γ) des couches biomoléculaires peuvent être déterminées avec la MP-SPR dans un mode de balayage angulaire large. Il convient de souligner que l'approche multi-longueurs d'onde pour la caractérisation des surfaces a été mise en œuvre avec succès dans des études précédentes [21,31-34]

III.2. MP-SPR à double longueur d'onde : Principe de l'approche

Les expériences SPR de cette thèse ont été réalisées à l'aide d'un instrument SPR multiparamétriques MP-SPR à double longueurs d'onde (670 et 785 nm) provenant de BioNavis, Tampere, Finlande (MP-SPR Navi™ 200). Cette approche à deux longueurs d'onde, combinée à un balayage angulaire sur une large gamme d'angles de lumière incidente est utilisée afin de caractériser des membranes biomimétiques supportées sur des surfaces en or. La caractérisation théorique de ces couches a été réalisée en utilisant le formalisme de Fresnel intégré dans le logiciel LayerSolver (BioNavis, Tampere, Finlande) tout en utilisant les spectres de réflectivité SPR complets en fonction de l'angle d'incidence. Le seuil de sensibilité en degré de cette technique est 10^{-3} .

Le plasmon de surface contient des informations sur les valeurs n et d d'une couche biomoléculaire. En effet, lorsqu'une couche vient se déposer sur un substrat, le champ évanescent va pénétrer le film et sonder les variations de surface, ce qui entraîne un déplacement du vecteur d'onde résonant du plasmon de surface k_{sp} d'une valeur de Δk_{sp} . La valeur de Δk_{sp} dépend de l'épaisseur d et de l'indice de réfraction n de la couche biomoléculaire ajoutée [28]. Le nouveau vecteur d'onde k_{sp} est considéré comme contenant toutes les informations et les constantes qui affectent les spectres SPR mesurés et conduisent à des différences entre les spectres SPR mesurés à plusieurs longueurs d'onde. Par conséquent, k_{sp} peut-être décrit par la relation mathématique suivante :

$$k_{SP} \propto n \times d \quad \text{(Equation 13)}$$

avec d et n sont l'épaisseur et l'indice de réfraction de la couche biomoléculaire.

Cependant, la résolution de l'équation 13 ne décrit qu'une seule solution de calcul pour d et n de la couche. Tandis que la solution unique pour d et n de la couche construite dans les

conditions expérimentales données ne peut être trouvée qu'à partir de l'intersection de deux solutions de calcul. Par conséquent, une mesure dans deux milieux différents ou avec plusieurs longueurs d'onde incidentes est nécessaire [21, 34].

Pour la première approche qui consiste à une mesure dans deux milieux différents (l'air et l'eau par exemple), si les propriétés optiques de la couche ne changent pas entre les différents milieux, les valeurs d'épaisseur peuvent être résolues dans deux milieux en fonction de n , où n est l'indice de réfraction de la couche. Cette approche donne lieu à deux ensembles de courbes de réflectance. Le tracé des différentes solutions pour chaque milieu est ensuite dessiné sur un graphique commun, avec l'intersection des solutions obtenues pour chaque milieu indiquant l'épaisseur et l'indice de réfraction exacts de la couche [21, 28, 34]. Liang *et al.* [34] ont essayé de trouver une solution unique pour d et n de monocouches de SA (Acide Stéarique) en utilisant l'approche de deux milieux différents tels que l'air et l'eau. L'intersection des deux courbes dans la Figure 10.a et 10.b donne des valeurs de n et d uniques. L'indice de réfraction et l'épaisseur pour 635 et 670 nm (intersection en (a) et (b)) sont de 1,58 - 2,66 nm et 1,4138 - 2,585 nm, respectivement.

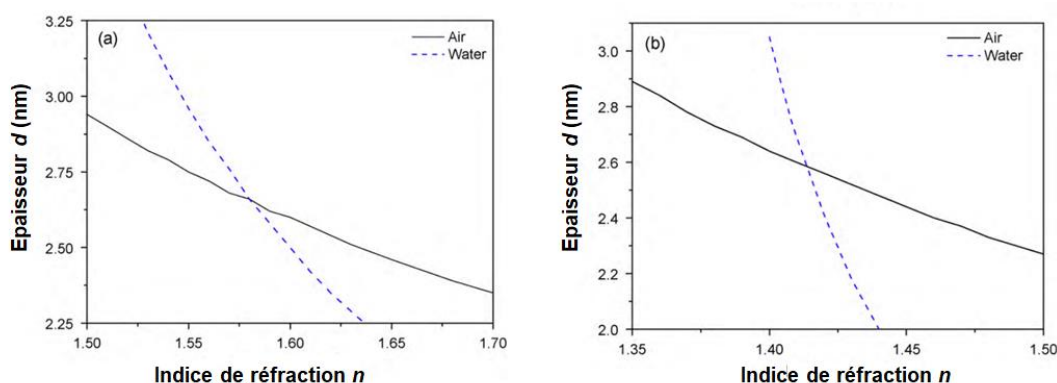


Figure 10. Calculs de d et n de monocouches de SA (Acide Stéarique) déterminés par des mesures dans deux milieux (air et eau) pour des longueurs d'onde de 635 nm (a) et 670 nm (b) [34]

La deuxième approche consiste à utiliser plusieurs longueurs d'ondes de la lumière excitatrice incidente. En effet, l'approche à double longueur d'onde est la méthode employée dans l'analyse des résultats obtenus dans cette thèse. C'est une méthode introduite depuis 1996 par Peterlinz et Georgiadis. Elle est basée sur l'hypothèse d'un coefficient de dispersion linéaire par rapport au changement de la longueur d'onde [28, 35] qui représente la dérivée de l'indice de réfraction en fonction de la longueur d'onde selon l'équation 14 :

$$\frac{dn}{d\lambda} \approx \frac{\Delta n}{\Delta \lambda} = \frac{n_2 - n_1}{\lambda_2 - \lambda_1} \text{ (Equation 14)}$$

où n_1 et n_2 représente les indices de réfraction d'une couche respectivement pour les deux longueurs d'onde λ_1 et λ_2 . Dans notre cas, $\lambda_1 = 670$ nm et $\lambda_2 = 785$ nm.

Par conséquent, en utilisant deux longueurs d'onde laser incidentes, deux valeurs de n peuvent théoriquement être obtenues pour la même couche et il est donc possible de déterminer des valeurs uniques pour n et d en une seule expérience [21, 22, 28, 36].

La solution unique pour l'épaisseur de couche d et l'indice de réfraction n peut être trouvée en résolvant les équations suivantes :

$$k_{SP1} \propto n_{\lambda_1} \times d \text{ (Equation 15.a)}$$

$$k_{SP2} \propto n_{\lambda_2} \times d \text{ (Equation 15.b)}$$

où k_{SP1} et n_{λ_1} désignent respectivement le vecteur d'onde du plasmon de surface et l'indice de réfraction pour la longueur d'onde λ_1 , k_{SP2} et n_{λ_2} représentent respectivement le vecteur d'onde du plasmon de surface et l'indice de réfraction pour la longueur d'onde λ_2 . L'indice de réfraction pour la longueur d'onde λ_2 peut s'écrire en fonction de l'indice de réfraction de λ_1 et le coefficient de dispersion $\frac{dn}{d\lambda}$ comme suit :

$$n_{\lambda_2} = n_{\lambda_1} + \frac{dn}{d\lambda} \times (\lambda_2 - \lambda_1) \text{ (Equation 16)}$$

En remplaçant l'expression de n_{λ_2} dans l'équation 15.b, on obtient une autre expression de k_{SP2} en fonction de n_{λ_1} comme suit :

$$k_{SP2} = n_{\lambda_2} \times d = \left(n_{\lambda_1} + \frac{dn}{d\lambda} \times (\lambda_2 - \lambda_1) \right) \times d \text{ (Equation 17)}$$

Les déclarations ci-dessus sont vraies pour les couches d'échantillons qui n'absorbent pas la lumière aux longueurs d'onde utilisées dans la mesure SPR. En pratique, cela signifie que la composante imaginaire k de l'indice de réfraction complexe est nulle, ce qui est le cas pour la majorité des couches d'échantillons organiques. Cependant, si la couche absorbe de la lumière, alors $k \neq 0$, et il existe une solution unique pour la couche d'échantillon :

$$k_{SP} = (n + ik) \times d \text{ (Equation 18)}$$

Dans l'étape de modélisation des courbes SPR résultantes, les épaisseurs des couches modélisées peuvent être liées comme communes pour les deux longueurs d'onde, c'est-à-dire que l'épaisseur de la couche est supposée être la même pour les deux longueurs d'onde puisque les courbes SPR sont mesurées à partir du même point. Selon la nature de la couche, l'indice de réfraction complexe peut être considéré comme une variable indépendante pour la modélisation des couches métalliques (par exemple couche d'or (Au) et de chrome (Cr)), ou comme une variable dépendante linéairement des deux longueurs d'onde utilisées.

La méthode à deux longueurs d'onde s'est avérée particulièrement efficace pour la caractérisation de fines couches biomoléculaires jusqu'à quelques nanomètres [28, 35,37,38]. Comme mentionné ci-dessus, cette approche a été initialement utilisée par Peterlinz et Georgiadis pour déterminer une valeur moyenne de l'épaisseur d'une monocouche organique mince d'alkanethiol dans un milieu liquide [28]. Cette méthode pourrait éventuellement être appliquée à la caractérisation optique des membranes biomimétiques à base de phospholipides puisque l'indice de réfraction n et l'épaisseurs d des couches lipidiques sont considérées comme des propriétés biologiquement pertinentes pour comprendre les changements résultant de l'interaction de ces membranes avec des biomolécules.

Dans cette thèse, l'utilisation de la MP-SPR à deux longueurs d'onde pour caractériser de manière appropriée la formation d'une couche lipidique à base de liposomes sur un substrat d'or et les changements structuraux qu'elle peut subir à la suite de son interaction avec des biomolécules d'intérêt nécessite que :

- a) les liposomes soient immobilisés sur la surface d'or.
- b) les mesures SPR des couches soient théoriquement dans la profondeur de détection du MP-SPR puisque la profondeur de pénétration est limitée par la décroissance exponentielle du champ évanescent. En effet, la profondeur de pénétration l déduite de l'équation 6 est donnée par l'équation 19 :

$$l = \frac{\lambda}{2\pi \times \sqrt{(n \times \sin\theta)^2 - 1}} \quad (\text{Equation 19}), \text{ où } \theta > \theta_c \text{ (} \theta_c \text{ est l'angle d'incidence critique)}$$

- c) la modélisation des couches donne des valeurs uniques pour l'épaisseur et l'indice de réfraction de chaque couche dans le milieu d'analyse utilisé.

Les approches multi-longueurs d'onde ont également été employées avec succès dans plusieurs études pour la caractérisation de couches minces comme les membranes biomimétiques modèles [31-34]. Des couches organiques tel que des membranes modèles à base de phospholipides ou des cellules vivantes, dont l'épaisseur peut atteindre quelques micromètres ont également été caractérisées en utilisant la MP-SPR assistée par guide d'ondes [19, 21, 32]. En théorie, résoudre à la fois d et n donnerait d'une manière pertinente des informations très utiles sur les changements structuraux de la membrane biomimétique sur un substrat, c'est-à-dire les changements nets à la fois de l'épaisseur de la membrane, sa densité de masse et sa concentration. Dans le tableau 1, nous présentons plus particulièrement des études théoriques basées sur des mesures MP-SPR pour la caractérisation de l'épaisseur d et de l'indice de réfraction n des systèmes membranaires modèles de type SLB ou SVL dont la composition des phospholipides est variée.

Tableau 1. Caractérisation théorique des propriétés optiques (d et n) de différents types de membranes biomimétiques supportées sur des surfaces solides par MP-SPR

Modèle membranaire	Lipides	Epaisseur (d)/ nm	Indice de réfraction (n)	Réf
SLB	DOPC	4.90	1.4776	[38]
	DOPC-DOPS	4.89	1.4827	
	POPC	4.96	1.4776	
		6.04	1.4889	
SVL	DOPC-Sm-cholestérol	76.13	1.3614	
	DPPC			
SVL	HSPC/ cholestérol /DSPE	55.5	1.34996	[37]
	HSPC/ cholestérol /DSPE-PEG2000			

		60.9	1.35263	
SVL	DPPC/DSPC/LysoP C/DSPE	86.63	-	[39]
	DPPC/DSPC/LysoP C/ DSPE-PEG2000	89.13	-	
SLB	HSPC	8.86	1.506	[21]
SLB	EggPC	4.7	1.4421	[31]
	EggPC+PS	4.63	1.4431	
	EggPC+ cholestérol	5.61	1.4236	

IV. Approches mathématiques de l'interaction moléculaire

Dans les mesures de l'interaction biomoléculaire, un ligand est immobilisé sur une surface et l'interaction d'un analyte avec le ligand est mesurée en temps réel par SPR grâce aux changements d'indice de réfraction à proximité de la surface. Cela permet d'évaluer les constantes de vitesse d'association et de dissociation et l'affinité à l'équilibre de la réaction.

Pour une réaction biomoléculaire ; $A + B \rightleftharpoons AB$ (**Equation 20**), la détermination des paramètres cinétiques donne des informations sur la vitesse à laquelle les réactions se produisent. Selon la loi de l'action de masse :

- La vitesse cinétique de la réaction d'association (v_a) dépend de la concentration de A, de B et de la constante de vitesse d'association (k_a) :

$$v_a = \frac{d[AB]}{dt} = k_a[A][B] \text{ (Equation 21.a)}$$

- La vitesse cinétique de la réaction de dissociation (v_d) dépend de la concentration du complexe AB et de la constante de vitesse de dissociation (k_d) :

$$v_d = -\frac{d[AB]}{dt} = k_d[AB] \text{ (Equation 21.b)}$$

Avec :

$[A]$: concentration de l'analyte libre

$[B]$: concentration du ligand libre

$[AB]$: concentration du complexe formé

k_a : constante cinétique d'association ($M^{-1}s^{-1}$)

k_d : constante cinétique de dissociation (s^{-1})

D'après l'équation 21.a et 21.b, il résulte la vitesse nette de l'interaction :

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a[A][B] - k_d[AB] \quad \text{(Equation 22)}$$

En SPR, la réponse ΔR enregistrée est la variation de l'angle de résonance θ_{SPR} . Celle-ci est proportionnelle à la quantité de complexe AB formée sur la surface d'or. On peut alors assimiler par analogie la concentration du complexe formé $[AB]$ à la réponse ΔR ($\Delta R = [AB]$). De ce fait la concentration du ligand libre $[B]$ correspond à la différence entre la réponse maximale obtenue à saturation du récepteur R_{max} et la réponse ΔR correspondant à la réponse du complexe formé ($[B] = R_{max} - \Delta R$). Par ailleurs, la concentration de l'analyte libre $[A]$ peut être considérée égale à la concentration de l'analyte initialement introduit dans le système noté C ($[A] = C$). L'équation (22) devient alors :

$$\frac{d\Delta R}{dt} = k_a [C](R_{max} - \Delta R) - k_d \Delta R \quad \text{(Equation 23)}$$

Lorsque la réaction $A + B \rightleftharpoons AB$ atteint un état d'équilibre, c'est-à-dire lorsque la vitesse d'association est égale à la vitesse de dissociation :

$$v_a = v_d \Rightarrow \frac{[AB]}{[A][B]} = \frac{k_a}{k_d} \quad \text{(Equation 24)}$$

On définit la constante d'équilibre liée à l'association K_A exprimée en (M^{-1}) et la constante d'équilibre liée à la dissociation K_D exprimée en (M).

La constante thermodynamique d'association K_A qui caractérise la formation de complexe et donc l'affinité de l'analyte pour le ligand peut être calculée selon :

$$K_A = \frac{[AB]}{[A][B]} = \frac{k_a}{k_d} \quad \text{(Equation 25.a)}$$

Toutefois, on utilise plus fréquemment la constante de dissociation K_D afin de caractériser l'affinité. Elle est définie par la relation :

$$K_D = \frac{1}{K_A} = \frac{k_d}{k_a} \text{ (Equation 25.b)}$$

L'affinité de liaison est habituellement mesurée et signalée par la constante de dissociation à l'équilibre (K_D). L'affinité désigne la force de l'interaction de liaison entre l'analyte (A) et le ligand (B). C'est donc une information très pertinente à connaître si on étudie l'interaction entre deux molécules. Plus la valeur de K_D est faible, plus l'affinité de A pour B est élevée et, par conséquent, plus l'interaction est forte.

Afin de déterminer les constantes d'affinité à partir de mesures SPR, il existe des isothermes d'adsorption, qui sont des modèles mathématiques permettant de décrire des processus d'adsorption d'une molécule sur un substrat. Il existe plusieurs isothermes, dont celles de Langmuir et de Freundlich. Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé le logiciel Trace DrawerTM pour SPR NaviTM, afin d'étudier des interactions biomoléculaires. L'objectif des algorithmes d'ajustement cinétique de ce logiciel est de déterminer les constantes de vitesse d'association et de dissociation (k_a et k_d) en ajustant le niveau de liaison de l'espèce AB en fonction du temps à une série de concentrations de l'analyte A.

V. Conclusion

Ce second chapitre a été consacré à définir théoriquement le phénomène de la résonance du plasmon de surface. Nous avons montré que la SPR est un phénomène physique soulignant l'excitation résonante du plasmon de surface et qu'elle se manifeste par un pic au niveau de la courbe de réflectivité SPR. Nous avons ensuite évoqué le grand intérêt de l'utilisation de la MP-SPR dans la caractérisation des films minces. En effet, l'approche à double longueur d'onde avec une source lumineuse rotative associée à la configuration de Kretschmann du système offre la possibilité de réaliser des mesures SPR sur une large plage angulaire et permet de déterminer à la fois l'indice de réfraction et l'épaisseur d'une couche mince dans une seule mesure. Ces paramètres fournissent une base pour l'étude de la formation de membranes biomimétiques supportées et permettent une meilleure compréhension des mécanismes d'interaction de ces membranes avec les biomolécules.

Références

- [1] Wood, R. W. (1902). XLII. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 4(21), 396-402.
- [2] Fano, U. (1941). The theory of anomalous diffraction gratings and of quasi-stationary waves on metallic surfaces (Sommerfeld's waves). *JOSA*, 31(3), 213-222.
- [3] Ritchie, R. H. (1957). Plasma losses by fast electrons in thin films. *Physical review*, 106(5), 874.
- [4] Stern, E. A., & Ferrell, R. A. (1960). Surface plasma oscillations of a degenerate electron gas. *Physical Review*, 120(1), 130.
- [5] Kanazawa, H. (1961). On the plasma oscillations in metal foils. *Progress of Theoretical Physics*, 26(6), 851-860.
- [6] Otto, A. (1968). Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and nuclei*, 216(4), 398-410.
- [7] Kretschmann, E., & Raether, H. (1968). Radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light. *Zeitschrift für Naturforschung A*, 23(12), 2135-2136.
- [8] Abbas, A., Linman, M. J., & Cheng, Q. (2011). New trends in instrumental design for surface plasmon resonance-based biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5), 1815-1824.
- [9] Laplatine, L. (2014). Résolution spatiale en microscopie par résonance de plasmon de surface à couplage par prisme (Doctoral dissertation, Grenoble).
- [10] Zhang, J., Zhang, L., & Xu, W. (2012). Surface plasmon polaritons: physics and applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 45(11), 113001.
- [11] Roh, S., Chung, T., & Lee, B. (2011). Overview of the characteristics of micro-and nano-structured surface plasmon resonance sensors. *Sensors*, 11(2), 1565-1588.
- [12] Saleh, B. E. A., & Teich, M. C. (1991). *Fundamentals of photonics*, 2Wiley. New York, 113.
- [13] Zayats, A. V., Smolyaninov, I. I., & Maradudin, A. A. (2005). Nano-optics of surface plasmon polaritons. *Physics reports*, 408(3-4), 131-314.
- [14] Bonnard, C. (2006). Couplage fort entre plasmons de surface et excitons de semiconducteur organique (Doctoral dissertation, Université Claude Bernard-Lyon I).

-
- [15] Ritchie, R. H., Arakawa, E. T., Cowan, J. J., & Hamm, R. N. (1968). Surface-plasmon resonance effect in grating diffraction. *Physical review letters*, 21(22), 1530.
- [16] Moreira, C. S., Lima, A. M. N., Neff, H., & Thirstrup, C. (2008). Temperature-dependent sensitivity of surface plasmon resonance sensors at the gold–water interface. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 134(2), 854-862.
- [17] Lethiec, C. (2014). Emission polarisée de nanoémetteurs: excitation de plasmons sur une surface métallique (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI).
- [18] Sadowski, J. W., Korhonen, I. K., & Peltonen, J. P. (1995). Characterization of thin films and their structures in surface plasmon resonance measurements. *Optical engineering*, 34(9), 2581-2586.
- [19] Knoll, W. (1998). Interfaces and thin films as seen by bound electromagnetic waves. *Annual review of physical chemistry*, 49(1), 569-638.
- [20] Robelek, R. (2009). Surface plasmon resonance sensors in cell biology: basics and application. *Bioanalytical reviews*, 1(1), 57-72.
- [21] Granqvist, N., Liang, H., Laurila, T., Sadowski, J., Yliperttula, M., & Viitala, T. (2013). Characterizing ultrathin and thick organic layers by surface plasmon resonance three-wavelength and waveguide mode analysis. *Langmuir*, 29(27), 8561-8571.
- [22] Albers, W. M., & Vikholm-Lundin, I. (2011). Surface plasmon resonance on nanoscale organic films. In *Nano-Bio-Sensing* (pp. 83-125). Springer, New York, NY.
- [23] Johnston, K. S., Karlsen, S. R., Jung, C. C., & Yee, S. S. (1995). New analytical technique for characterization of thin films using surface plasmon resonance. *Materials chemistry and physics*, 42(4), 242-246.
- [24] Kooyman, R. P., Yager, P., Chinowsky, T., Fu, E., Nelson, K., McWhirter, A., ... & Hall, D. R. (2008). *Handbook of surface plasmon resonance*. Royal Society of Chemistry.
- [25] Jung, L. S., Campbell, C. T., Chinowsky, T. M., Mar, M. N., & Yee, S. S. (1998). Quantitative interpretation of the response of surface plasmon resonance sensors to adsorbed films. *Langmuir*, 14(19), 5636-5648.
- [26] Zhao, H., Brown, P. H., & Schuck, P. (2011). On the distribution of protein refractive index increments. *Biophysical journal*, 100(9), 2309-2317.
- [27] Ball, V., & Ramsden, J. J. (1998). Buffer dependence of refractive index increments of protein solutions. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 46(7), 489-492.
- [28] Peterlinz, K. A., & Georgiadis, R. (1996). Two-color approach for determination of thickness and dielectric constant of thin films using surface plasmon resonance spectroscopy. *Optics Communications*, 130(4-6), 260-266.

- [29] Liu, X., Wu, D., Turgman-Cohen, S., Genzer, J., Theyson, T. W., & Rojas, O. J. (2010). Adsorption of a nonionic symmetric triblock copolymer on surfaces with different hydrophobicity. *Langmuir*, 26(12), 9565-9574.
- [30] Bionavis Ltd, MP-SPR Navi Instruments, (2018). <http://www.bionavis.com/en/materialscience/products/additional-options-and-consumables/accessories/> (accessed April 4, 2018).
- [31] Granqvist, N., Yliperttula, M., Valimaki, S., Pulkkinen, P., Tenhu, H., & Viitala, T. (2014). Control of the morphology of lipid layers by substrate surface chemistry. *Langmuir*, 30(10), 2799-2809.
- [32] Viitala, T., Granqvist, N., Hallila, S., Ravina, M., & Yliperttula, M. (2013). Elucidating the Signal Responses of Multi-Parametric Surface Plasmon Resonance Living.
- [33] Granqvist, N., Hanning, A., Eng, L., Tuppurainen, J., & Viitala, T. (2013). Label-enhanced surface plasmon resonance: a new concept for improved performance in optical biosensor analysis. *Sensors*, 13(11), 15348-15363.
- [34] Liang, H., Miranto, H., Granqvist, N., Sadowski, J. W., Viitala, T., Wang, B., & Yliperttula, M. (2010). Surface plasmon resonance instrument as a refractometer for liquids and ultrathin films. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 149(1), 212-220.
- [35] Zhou, M., Otomo, A., Yokoyama, S., & Mashiko, S. (2001). Estimation of organic molecular film structures using surface-plasmon resonance spectroscopy. *Thin Solid Films*, 393(1-2), 114-118.
- [36] Peterlinz, K. A., Georgiadis, R. M., Herne, T. M., & Tarlov, M. J. (1997). Observation of hybridization and dehybridization of thiol-tethered DNA using two-color surface plasmon resonance spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 119(14), 3401-3402.
- [37] Kari, O. K., Rojalín, T., Salmaso, S., Barattin, M., Jarva, H., Meri, S., ... & Urtti, A. (2017). Multi-parametric surface plasmon resonance platform for studying liposome-serum interactions and protein corona formation. *Drug delivery and translational research*, 7(2), 228-240.
- [38] Parkkila, P., Elderdfi, M., Bunker, A., & Viitala, T. (2018). Biophysical characterization of supported lipid bilayers using parallel dual-wavelength surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance measurements. *Langmuir*, 34(27), 8081-8091.
- [39] Kari, O. K., Ndika, J., Parkkila, P., Louna, A., Lajunen, T., Puustinen, A., ... & Urtti, A. (2020). In situ analysis of liposome hard and soft protein corona structure and composition in a single label-free workflow. *Nanoscale*, 12(3), 1728-1741.

***Chapitre III : Suivi par résonance
plasmonique de surface de l'interaction des
mono-rhamnolipides avec une couche de
liposomes supportés***

I. Introduction

Les rhamnolipides sont des métabolites secondaires produits naturellement par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Ils participent à diverses fonctions cellulaires essentielles. Ces composés appartiennent au groupe des glycolipides (ou lipopolysaccharides) tensioactifs et sont constitués d'une partie glycone composée d'une ou de deux fragments de rhamnose reliés par une liaison α -1,2-glycosidique et d'une partie aglycone constituée de deux chaînes alkyle, ce qui leur donne des propriétés de biosurfactant. Ils sont produits sous la forme d'un mélange composé principalement de α -L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate et de 2-O- α -L-rhamnopyranosyl- α -L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate appelés respectivement mono-rhamnolipide (mono-RL) et di-rhamnolipide (di-RL) (Figure 1). Les biosurfactants de rhamnolipides sont toujours un mélange de différents rhamnolipides.

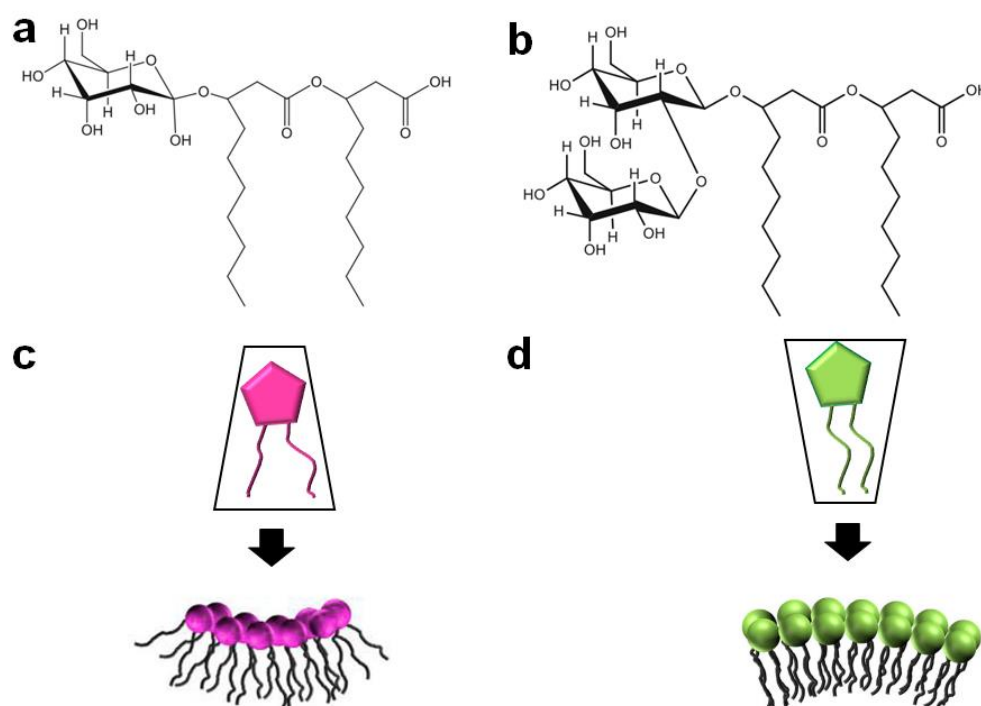


Figure 1. Les structures chimiques du (a) mono-rhamnolipide et du (b) di-rhamnolipide et une illustration schématique des différentes formes proposées pour le (c) mono-rhamnolipide et le (d) di-rhamnolipide et de l'effet résultant sur la courbure de la membrane

Ces deux composés sont les composants dominants du mélange produit naturellement. Ils constituent le principal facteur de virulence de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Les

rhamnolipides sont considérés comme le seul facteur de virulence lié à la détérioration de l'état des patients atteints de pneumonie sous ventilation assistée [1]. Ils engendrent des infections respiratoires chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose et les personnes immunodéprimés. Il a été démontré, sur un épithélium respiratoire humain reconstitué *in vitro* que l'incorporation de rhamnolipides dans une membrane de la cellule hôte diminue la résistance transépithéliale pour des concentrations supérieures à $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ [2]. Le rôle des rhamnolipides dans les infections pulmonaires est également confirmé par plusieurs autres rapports [3, 4]. La contribution des rhamnolipides à la virulence de *Pseudomonas aeruginosa* a aussi été relevée dans les infections de la cornée [5, 6]. En addition, les rhamnolipides peuvent tuer les leucocytes polymorphonucléaires (PMN), les macrophages et freiner la phagocytose. En somme, il est clairement démontré que les rhamnolipides constituent une source de virulence puissante chez l'homme.

Malgré les nombreuses connaissances acquises sur les effets des rhamnolipides et en raison de la complexité due à leurs nombreuses activités biologiques, une compréhension plus approfondie au niveau moléculaire de leur interaction avec les membranes cellulaires mérite encore des études détaillées. Les membranes biomimétiques modèles facilitent la compréhension des comportements biologiques complexes des membranes naturelles. Celles composées de lécithines, les principaux phospholipides de nombreuses cellules vivantes, sont structurées en bicouches qui peuvent être dispersées dans l'eau sous forme de liposomes ou vésicules. Des études calorimétriques ont montré que les di-RLs se lient aux vésicules de phospholipides mono-insaturés 1-palmitoyl-2-oléoyl-glycéro-3-phosphocholine (POPC), rompent les bicouches et provoquent une fuite du milieu aqueux interne lorsque le rapport RL/lipide est supérieur à 1. Cet effet est réduit en présence de cholestérol [7]. Une étude par FTIR a montré une interaction directe entre les groupes phosphate de la 1-palmitoyl-2-linoléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (PLPC) et les têtes polaires de rhamnolipides, ce qui a ensuite modifié l'organisation des groupes de tête polaire des phospholipides. Ces interactions ont été confirmées par des simulations de dynamique moléculaire de ces modèles de membrane en présence de rhamnolipides [8].

Il a été démontré que la structure des Rhamnolipides a une influence importante sur leur concentration micellaire critique (CMC), sur leur capacité à s'insérer dans les membranes et sur leur activité biologique [9-11]. Grâce à ses deux unités de rhamnose dans son groupe de tête polaire, le di-RL est un tensioactif plus hydrophile que le mono-RL [12]. Par ailleurs, plus le

nombre d'unités de rhamnose présentes est élevé, plus la molécule devient volumineuse, ce qui entraîne la formation de petites micelles sphériques à faible concentration et de micelles plus grandes à forte concentration. Ainsi, les di-RLs s'auto-assemblent sous forme de petites micelles, qui grandissent lorsque la concentration augmente. En revanche, les mono-RLs, qui sont moins hydrophiles, forment de grandes micelles à faible concentration [12]. Contrairement au di-RL, le mono-RL a un effet plus déstabilisant sur les membranes lipidiques en raison de sa forme conique qui permet de former des micelles inversées (voir Figure 1.c). Alors que la molécule de di-RL a une forme de cône inversé qui donne lieu à des micelles normales. (Voir Figure 1.d).

Dans le cadre de ce travail, nous avons voulu mettre en évidence l'effet déstabilisant du mono-RL vis-à-vis de vésicules lipidiques de type liposomes. En nous concentrant sur les interactions entre les mono-RLs et les membranes cellulaires modèles, nous avons recouru à la résonance plasmonique de surface MP-SPR multiparamétrique à double longueur d'onde pour suivre, détecter et analyser ces interactions en temps réel et sans marquage spécifique. A notre connaissance, la technique SPR n'a pas été utilisée jusqu'à présent pour étudier les interactions des RLs avec des couches de phospholipides ou des liposomes.

Dans ce chapitre, nous présentons les résultats expérimentaux et théoriques de l'étude de l'interaction entre le mono-RL et une couche de liposomes intacts formée sur un substrat d'or par MP-SPR. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication parue dans le journal *Langmuir* (2021, 37(26), 7975-7985). Dans un premier temps, l'objectif de ce travail était de développer une stratégie fiable et reproductible pour immobiliser les liposomes d'une manière stable sur un substrat d'or. Ensuite, l'épaisseur et l'indice de réfraction des différentes couches formant notre système multicouche ont été déduits en modélisant les courbes SPR obtenues à deux longueurs d'onde. Dans un second lieu, des solutions de mono-RL de différentes concentrations ont été injectées sur la couche de liposomes formée et les signaux SPR (sensorgrammes) ont été enregistrés. Une solution riche en mono-RL a été préférée pour cette étude car le mono-RL est supposé se lier plus fortement aux bicouches phospholipidiques que le di-RL [12, 13]. Un mélange RL riche en mono-RL peut déstructurer les liposomes phospholipidiques avec une meilleure efficacité. Suite à cette interaction, les changements morphologiques de la couche de liposomes ainsi que la variation de la densité de masse adsorbée sur la surface d'or ont été décrits, sur la base de la variation du signal SPR et de la modélisation théorique des courbes SPR résultantes.

II. Préparation et caractérisation des liposomes biotinylés

II.1. Lipides utilisés

Les lipides constituent l'élément principal pour déterminer les propriétés physico-chimiques d'un liposome. Deux principaux types de lipides ont été utilisés, un lipide à base de phosphatidylcholine (PC) et un lipide biotinylé. Les lipides utilisés dans le cadre de ces travaux sont des lipides commerciaux. Ces derniers sont présentés ci-dessous.

HSPC : Ce phospholipide correspond à la phosphatidylcholine de soja hydrogénée (Phospholipon 90 H) qui contient 90% de PC. Les chaînes carbonées sont majoritairement constituées d'acides gras saturés, environ 85 % d'acide stéarique et 15% d'acide palmitique. l'HSPC est peu coûteux par rapport aux phospholipides synthétiques et contient en majorité de la phosphatidylcholine (PC) qui est un constituant majeur de la membrane biologique.

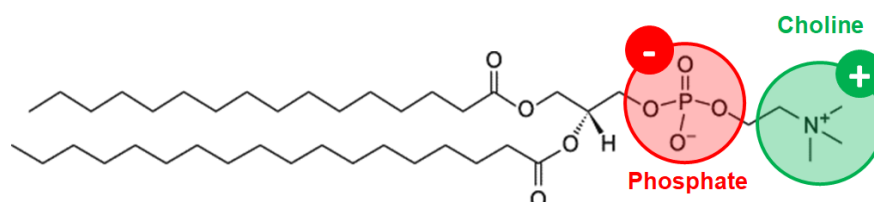


Figure 2. Formule du HSPC

DSPE-PEG (2000) Biotin : Ce phospholipide est le 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[biotinyl(polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt).

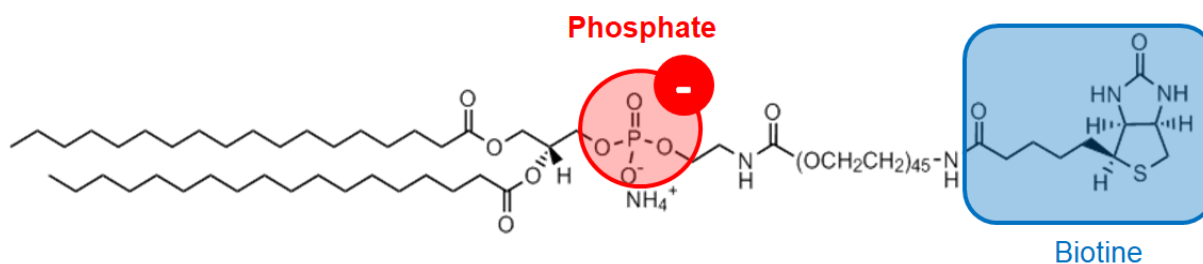


Figure 3. Formule du DSPE-PEG (2000) Biotin

II.2. Caractérisation des liposomes

II.2.1. Mesure de la taille et de la charge surfacique des liposomes

Les liposomes ont été préparés selon la méthode de Bangham et ont subi une sonication avec une sonde à ultrasons. Le phospholipide biotinylé est présent dans la membrane liposomale en

très faible quantité. Le protocole expérimental est décrit dans la publication 1. Par la suite, ils ont été caractérisés en fonction de leur taille et de leur charge de surface. La caractérisation de la taille et de l'indice de polydispersité (PDI pour « PolyDispersity Index ») des liposomes préparés a été réalisée par DLS. Le diamètre hydrodynamique des liposomes a été mesuré à environ $76 \text{ nm} \pm 7,5$, avec un indice de polydispersité (PdI) de 0,16.

La charge de surface des liposomes a été déterminée en mesurant le potentiel zêta sur la base de leur mobilité électrophorétique. Ce potentiel correspond à la charge électrique des liposomes en solution lorsqu'ils entrent en interaction avec des ions. Bien que les liposomes soient constitués de lipides zwitterioniques (charge globale neutre), une séparation des charges a lieu au sein du liposome. Il est probable que les charges négatives des groupements phosphate soient enfouies vers l'intérieur des liposomes tandis que les charges positives des ions ammonium des cholines sont plus exposées à la surface. Le potentiel zêta représente donc la charge de la couche superficielle des liposomes. Ainsi, le potentiel zêta mesuré inclut les charges des lipides à la surface du liposome, la première couche de contre-ions négatifs au contact de la tête choline et la seconde couche de contre-ions plus équilibrés en termes de charge.

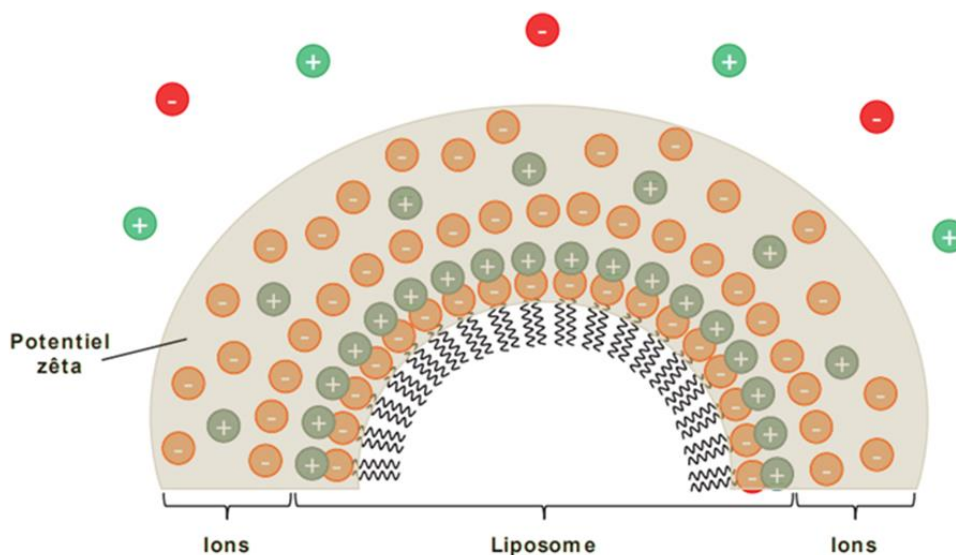


Figure 4. Potentiel zêta à la surface d'un liposome en solution

La surface négative des liposomes induit une répulsion électrostatique entre eux empêchant leur agrégation et leur confère une stabilité colloïdale.

II.2.2. Etude de la morphologie des liposomes

L'observation par Cryo-TEM a confirmé la taille des liposomes synthétisés. Comme le montre la Figure 5.a, les liposomes sont apparus comme des nanovésicules parfaitement sphériques et unilamellaires. La Figure 5.b présente la distribution de taille des liposomes. Le diamètre moyen des liposomes était de 69 nm avec un écart-type de 10 nm.

Nous avons remarqué un accord satisfaisant entre les deux distributions de taille dérivées de l'analyse d'image TEM et des mesures DLS.

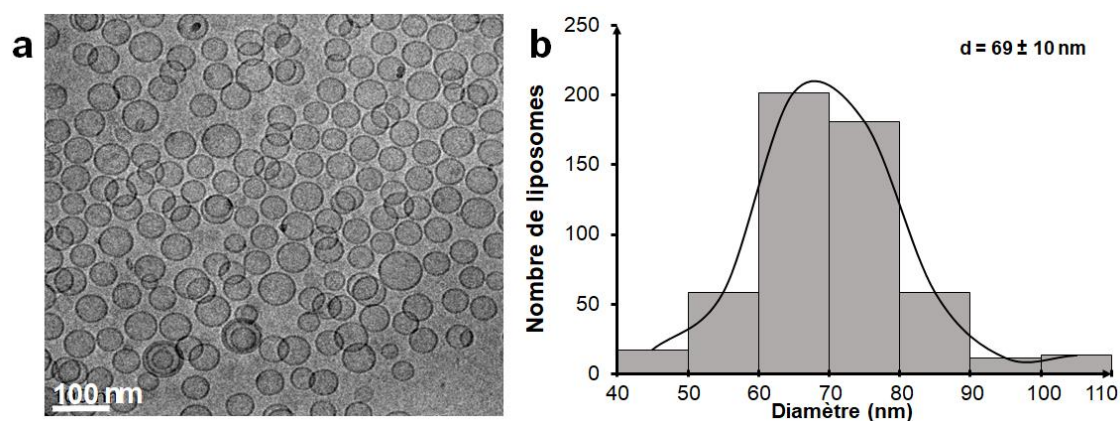


Figure 5. (a) Image TEM et (b) histogramme du diamètre d'une dispersion diluée de liposomes biotinylés

III. Suivi par MP-SPR de l'immobilisation des liposomes sur des surfaces modifiées

Après la préparation de liposomes biotinylés de type SUV (< 100nm), nous avons essayé d'élaborer une membrane biomimétique stable formée de liposomes intacts supportés sur la surface d'or. Pour ce faire, une étude comparative de l'interaction des liposomes biotinylés (anioniques) avec plusieurs puces SPR en or fonctionnalisées par une monocouche auto-assemblée (SAM) a été réalisée. Des SAMs d'alcanethiols à longue chaîne avec différents groupes terminaux (-COOH, -NH₂, et -CH₃) ont été formées sur les puces d'or. Une quatrième puce d'or a été fonctionnalisée par une couche de streptavidine (voir Figure 6). Avant l'injection des liposomes sur ces quatre surfaces, nous avons validé par MP-SPR chaque étape de la fonctionnalisation. Le dépôt de streptavidine sur la couche MUA (acide mercaptoundécanoïque) a entraîné une variation de +0,4° du θ_{SPR} , alors que le dépôt des différentes SAM sur l'or a entraîné une variation du signal d'environ +0,2°.

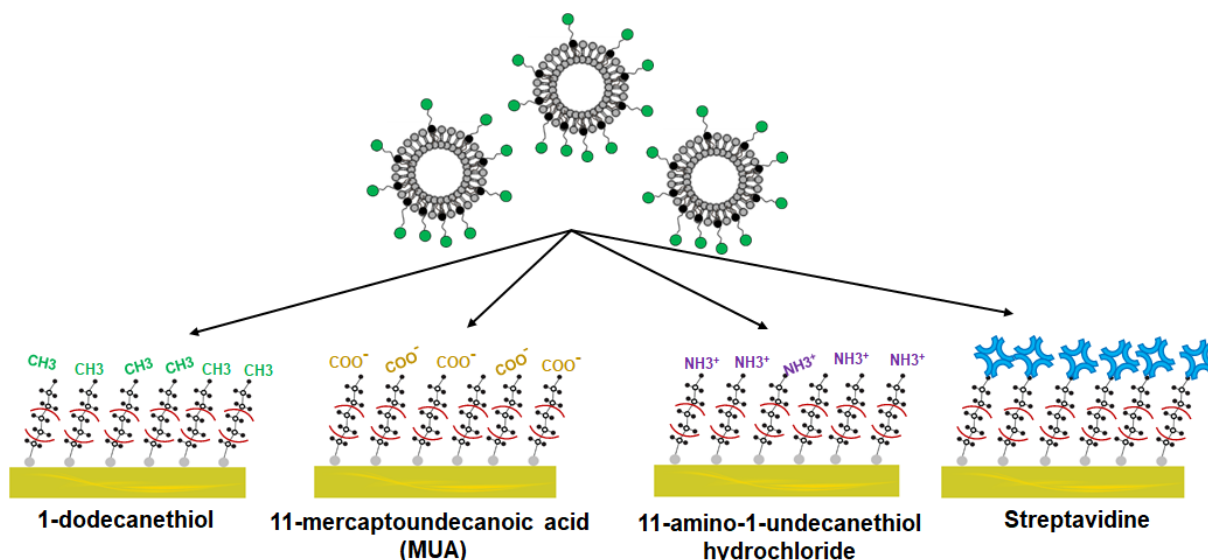


Figure 6. Schéma de principe de l'étude des interactions entre des liposomes biotinylés et des puces SPR en or fonctionnalisées par différents groupements alkyles et la streptavidine

Ensuite, nous avons injecté sur les quatre puces fonctionnalisées des dispersions de liposomes biotinylés à des concentrations comprises entre 1×10^{11} et 5×10^{12} lipo mL⁻¹ (correspondant à une teneur en phospholipides HSPC+DSPE-PEG de $1,5 \times 10^{-5}$ à 6×10^{-4} M) et à un débit d'écoulement de 50 μL min⁻¹ pendant 4 minutes. Chaque injection a été suivie d'une étape de lavage de 4 minutes dans une solution de NaCl 0,15 M.

En suivant la variation de la position de l'angle θ_{SPR} (variation de l'indice de réfraction) en fonction de différentes concentrations de liposomes (C_l) pour les quatre surfaces (Figure 7), nous avons constaté que les liposomes se lient fortement à la surface fonctionnalisée par la streptavidine, ce qui a entraîné une augmentation du θ_{SPR} de $+1.7^\circ$ sous l'injection de 5×10^{12} lipo mL⁻¹.

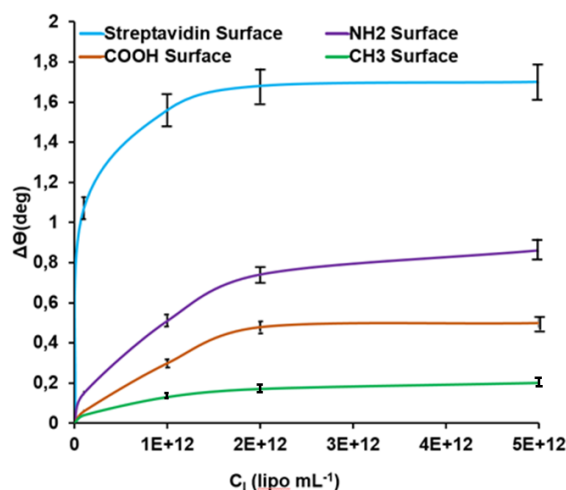


Figure 7. Déplacements angulaires du pic de résonance ($\Delta\theta_{SPR}$) ($\lambda=670$ nm) en fonction de l'injection d'une solution de liposomes à différentes concentrations (C_l). Les interactions des solutions de liposomes biotinylés ont été étudiées sur des surfaces SPR en or fonctionnalisées par des groupes $-COOH$ (acide 11-mercaptopundécanoïque), $-NH_2$ (11-amino-1-undécane-thiol), $-CH_3$ (1-dodécane-thiol) et modifiées par la streptavidine

Pour la surface fonctionnalisée par une couche de thiol amine ($-NH_2$), le décalage angulaire était significatif ($+0,86^\circ$) mais faible par rapport à celui obtenu avec la couche de streptavidine puisque l'interaction était principalement induite par une interaction électrostatique. Dans le cas de la couche MUA, un faible décalage angulaire de $+0,48^\circ$ a été obtenu, ce qui reflète un effet de blocage clair dû à la répulsion électrostatique. Cependant, cette liaison était encore plus forte que pour la SAM hydrophobe (1-dodécane-thiol), qui a empêché les liposomes hydrophiles de se lier, ce qui a entraîné une faible variation de l'angle ($+0,2^\circ$).

La surface des liposomes était faiblement anionique et comportait des fragments de PEG qui peuvent jouer un rôle dans les interactions. Nous supposons que l'interaction attractive entre les liposomes anioniques et la surface cationique ($-NH_2$) n'était pas suffisamment efficace pour obtenir une couche homogène de liposomes stables par rapport au substrat d'or fonctionnalisé par la streptavidine. La surface d'or SPR modifiée par la streptavidine a été choisie pour l'immobilisation des liposomes, en raison de sa forte affinité permettant un dépôt efficace et une bonne stabilité de la couche. La Figure 8 montre les étapes réactionnelles lors de cette phase de fonctionnalisation ; les carboxylates ($-COOH$) des MUA sont mis en réaction avec un carbodiimide tel que l'EDC (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide), puis avec le

NHS (N-hydroxysuccinimide) pour former un ester semi-stable de NHS qui peut réagir ensuite avec les amines primaires (-NH₂) de la streptavidine.

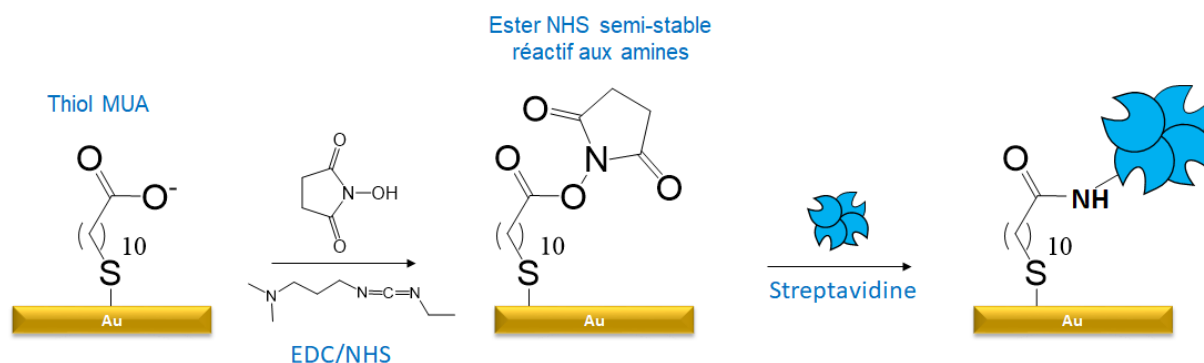


Figure 8. Schéma des différentes réactions impliquant l'EDC et NHS pour l'activation de la surface SAM d'acide mercaptoundecanoïque (MUA), avant le dépôt de la streptavidine

Comme les liposomes biotinylés interagissent avec la streptavidine par de fortes interactions, la régénération de la surface de streptavidine n'était pas possible sans enlever la couche de streptavidine. Ainsi, dans ce cas, le dispositif expérimental a consisté en des injections cumulées de liposomes sur le substrat SPR fonctionnalisé à la streptavidine, suivies de 4 minutes de lavage dans une solution de NaCl 0,15 M (Figure 9). Ainsi, la saturation du signal SPR lors de l'injection de liposomes sur la surface de streptavidine est atteinte par l'injection cumulée de concentrations de liposomes allant de 1×10^{11} à 5×10^{12} lipo mL⁻¹ (voir courbe rouge sur la Figure 9). Afin d'atteindre directement la saturation du signal, nous avons injecté à la surface de la streptavidine une forte concentration de liposomes de 1×10^{14} lipo mL⁻¹ (voir courbe verte sur la Figure 9). Cette concentration entraîne un changement d'angle d'environ +1,7°, ce qui correspond au même changement d'angle global obtenu après l'injection cumulée de liposomes. Nous avons donc utilisé cette concentration élevée pour la suite de l'étude.

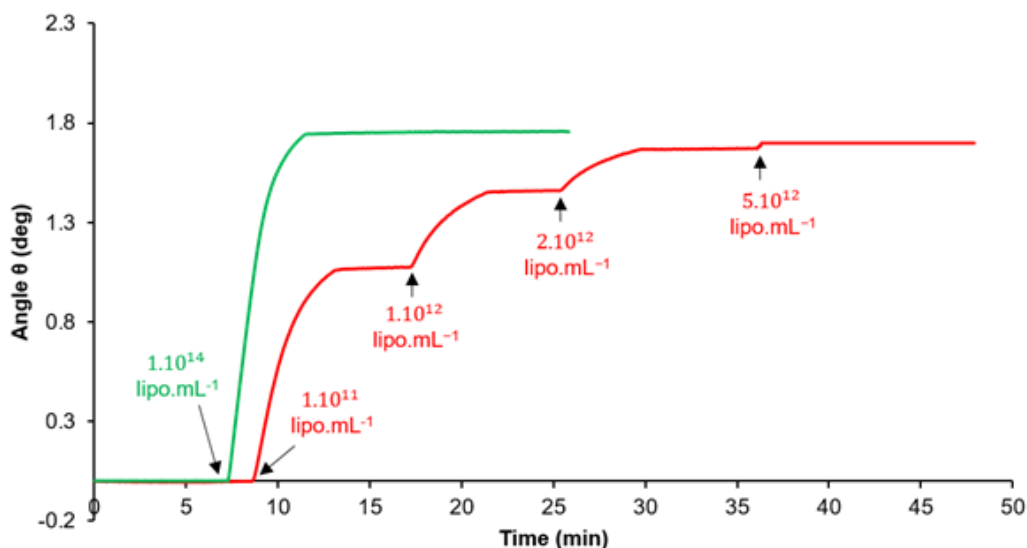


Figure 9. Sensorgrammes MP-SPR pour l'immobilisation de liposomes biotinylés et leur interaction avec la streptavidine ; mesure à la longueur d'onde de 670 nm

IV. Formation et modélisation des différentes couches de la puce d'or SPR

Le système multicouche considéré pour étudier l'interaction du mono-RL est présenté dans la Figure 10. Les couches 0 à 4 de la puce d'or SPR sont respectivement le substrat en verre, la couche de chrome-or, la couche MUA, la couche de streptavidine et la couche de liposomes.

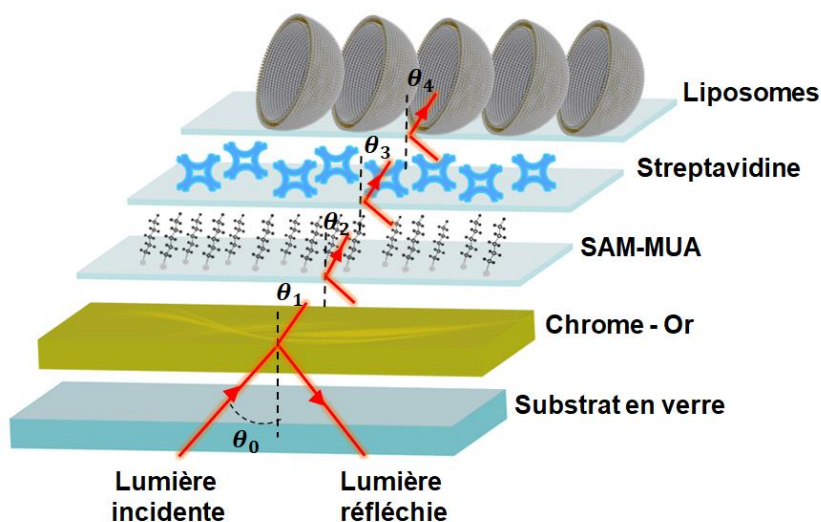


Figure 10. Représentation schématique du système multicouche de la puce d'or SPR

Après avoir sélectionnée la surface fonctionnalisée par la streptavidine pour déposer les liposomes, nous avons injecté une concentration de 1×10^{14} lipo mL^{-1} pour effectuer l'ancrage (Figure 11.a).

Nous avons suivi par MP-SPR le décalage de l'angle SPR pour les deux longueurs d'onde (670 nm et 785 nm) après chaque étape de fonctionnalisation. Le décalage angulaire a confirmé le succès des fonctionnalisations successives de la surface de l'or (Figure 11.b).

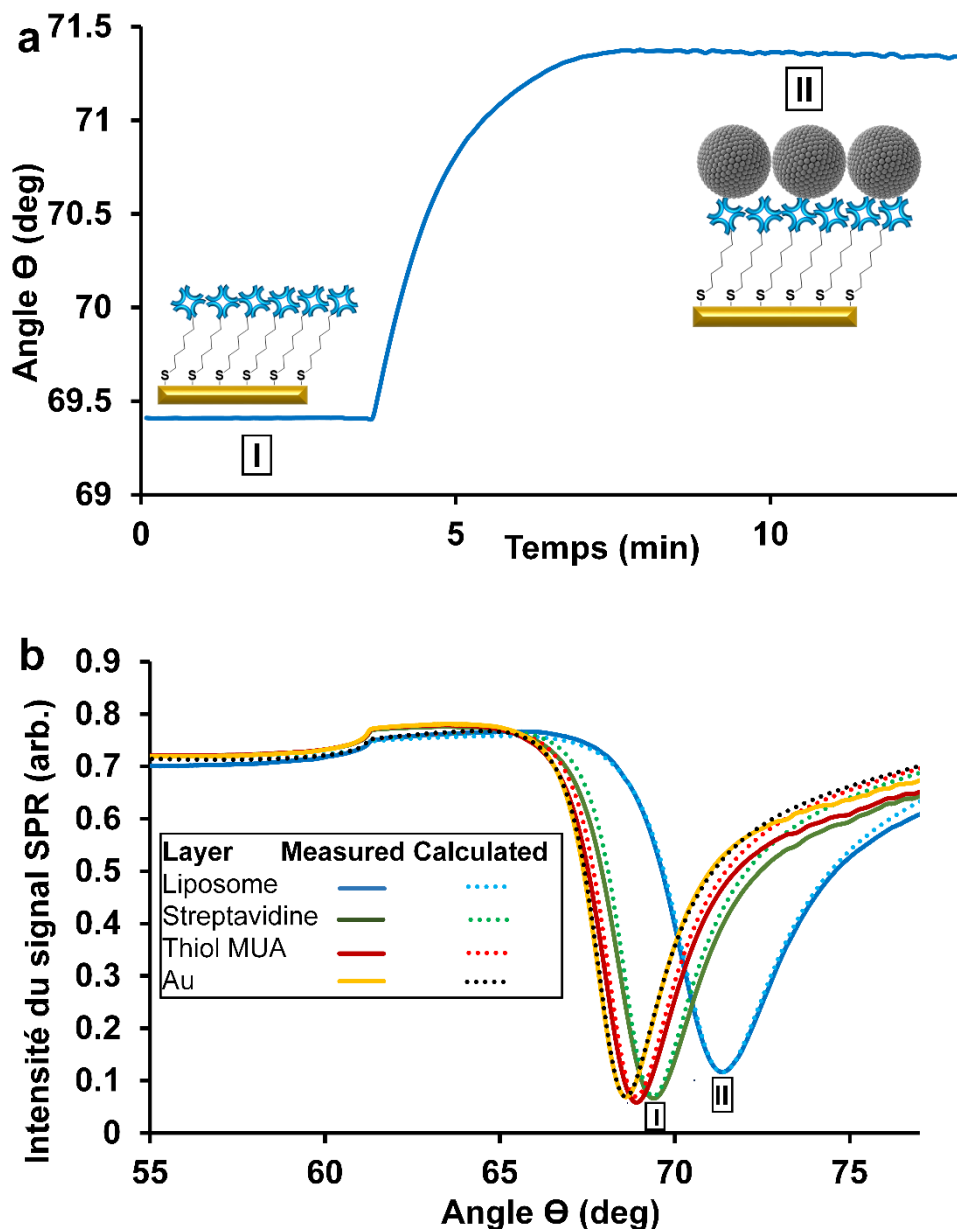


Figure 11. (a) Sensorgramme SPR de l'immobilisation de 1×10^{14} lipo mL^{-1} sur une puce SPR fonctionnalisée par la streptavidine, mesuré à 670 nm. (b) Spectres angulaires du signal SPR à 670 nm des différentes étapes de la fonctionnalisation : couche d'or (ligne jaune), MUA (ligne rouge),

couche de streptavidine (ligne verte) et couche de liposomes (ligne bleue), avec les fits correspondants (lignes pointillées) provenant de la modélisation LayerSolver de chaque couche de façon individualisée. Les chiffres romains (I et II) indiquent la correspondance des événements dans (a) et (b)

Afin de mieux caractériser les couches formées et de quantifier l'adsorption, nous avons effectué une analyse à double longueur d'onde pour la détermination de l'épaisseur (d) et de l'indice de réfraction (\tilde{n}) des différentes couches de notre système avec le logiciel LayerSolver.

Les paramètres (d et n), avec (n) est la partie réelle de l'indice de réfraction complexe (\tilde{n}), provenant de la modélisation de la couche de liposomes ainsi que des autres couches sont rapportés dans le Tableau 1.

Tableau 1. Epaisseur (d) et indice de réfraction (n) des différentes couches de la puce SPR, obtenus par la simulation théorique de LayerSolver. Les valeurs calculées représentent la moyenne (\pm variation standard) de trois mesures répétées indépendamment.

Layer	d (nm)	n_{670}	n_{785}
Glass	Infinite (starting layer)	$n = 1.52020$	$n = 1.51620$
Chromium	1.6 ± 0.06	$n = 3.51127 \pm 0.02050$	$n = 4.04615 \pm 0.17135$
Gold	54.98 ± 0.02	$n = 0.19612 \pm 0.00016$	$n = 0.19548 \pm 0.00477$
Thiol MUA	1.50 ± 0.08	$n = 1.43897 \pm 0.01385$	$n = 1.42702 \pm 0.01378$
Streptavidin	2.71 ± 0.31	$n = 1.41646 \pm 0.01102$	$n = 1.41416 \pm 0.01102$
Liposome	79.61 ± 6.74	$n = 1.35270 \pm 0.00122$	$n = 1.35102 \pm 0.00126$
NaCl solution	Infinite (ending layer)	$n = 1.33216$	$n = 1.32966$

Nous avons obtenu des résultats cohérents avec ceux rapportés dans la littérature [14-16] pour l'épaisseur et l'indice de réfraction de la couche de MUA et la couche de streptavidine (Tableau 1). La modélisation de la courbe SPR obtenue après la formation de la couche de liposomes (II, Figure 11.b) et prise après stabilisation du signal, a montré que les liposomes constituent une couche d'environ 80 nm d'épaisseur en moyenne. En regard de l'équation 19 du chapitre 2, nous

pouvons ainsi affirmer que l'onde évanescente peut pénétrer la totalité de la couche de liposomes adsorbés à la surface de la puce SPR, car l'épaisseur moyenne est inférieure à la demi-valeur de chaque longueur d'onde (670 et 785 nm) du dispositif MP-SPR. Nous avons remarqué que l'épaisseur de la couche de liposomes correspond au diamètre des liposomes mesurés par DLS et TEM. Cela suggère fortement que les liposomes s'adsorbent sous forme d'une monocouche.

V. Etude MP-SPR de l'interaction entre les mono-RLs et la couche de liposomes supportés

Nous avons suivi en temps réel et sans marquage les interactions entre les mono-RLs et les liposomes immobilisés, par la technique MP-SPR. Le protocole expérimental est décrit dans la publication 1. Les solutions de mono-RL aux concentrations de 2 à 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ont été injectées en 15 min, avec un débit de 12,5 $\mu\text{l min}^{-1}$ et les solutions de 50 à 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ont été injectées à un débit de 50 $\mu\text{l min}^{-1}$. Chaque injection était alternée par une étape de lavage de 4 min dans une solution de 0,15M NaCl, à un débit de 50 $\mu\text{l min}^{-1}$. Le sensorgramme complet dans la Figure 12 montre que l'injection successive de différentes concentrations de mono-RL a provoqué des variations nettes du signal SPR et donc une déstabilisation progressive de la couche de liposomes formée à l'état III. La variation du signal a été reproductible d'une expérience à l'autre et a révélé trois domaines (état III, IV et V) pour lesquels les interactions du mono-RL avec la couche de liposome semblent suivre des mécanismes différents.

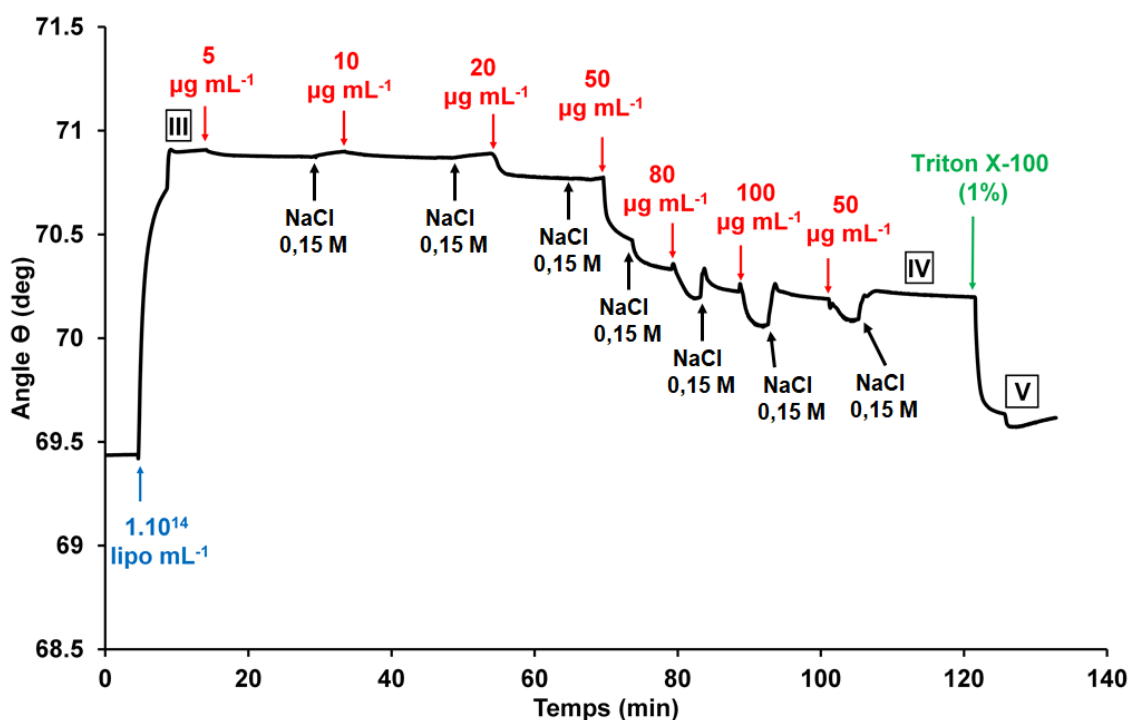


Figure 12. Sensorgramme de l'angle SPR en fonction du temps, mesuré à une longueur d'onde de 670 nm, pendant l'interaction des mono-RLs avec les liposomes

Pour les faibles concentrations (5 et 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de mono-RL), nous pensons que le mono-RL s'intercale dans la couche phospholipidique sans déstructurer significativement la couche de liposomes. Cette interaction suit probablement un équilibre entre les mono-RLs libres en solution et les molécules intégrées dans la bicouche lipidique. Ceci conduit à une baisse réversible du signal SPR. Pour la concentration de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ qui est une concentration proche de la concentration micellaire critique (CMC) du mono-RL, sachant que la valeur rapportée dans la littérature est de 56,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($\sim 110 \mu\text{M}$) [17-19], nous avons noté un changement structurel de la couche de liposomes étant donné la chute significative du signal SPR. À cette concentration, le mono-RL s'intercale dans la double couche lipidique des liposomes en déstabilisant leur structure de bicouche fermée. Il est observé que l'ouverture des liposomes entraîne une perte de masse et un changement d'état de la couche. Ce mécanisme d'interaction induit probablement une réorganisation de la couche lipidique pour former au final une bicouche adsorbée à la surface de la puce (état IV). L'excès de phospholipides est probablement éliminé par solubilisation à l'intérieur des micelles de mono-RLs. Ce phénomène est apparu irréversible.

Pour les concentrations les plus élevées (80 et 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), nous avons constaté un autre mécanisme d'interaction entre les RLs et la bicouche lipidique formée. Nous avons observé une baisse du signal SPR, suivie d'une ré-augmentation jusqu'à la valeur d'origine lors du passage de la solution NaCl. Une adsorption réversible de mono-RLs a eu lieu sur la bicouche phospholipidique, même après l'injection de la dernière concentration à 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Ce phénomène pourrait être expliqué par la propriété des RLs d'induire une séparation de phase dans la bicouche phospholipidique comme décrit par Herzog et *al.* [13] Nous avons noté dans notre cas que l'organisation des phospholipides en tant qu'une bicouche semble se reformer sur la surface de la puce SPR lorsque le solvant d'éluion passe de la solution de mono-RL à la solution de NaCl. Ainsi, l'étape de lavage a provoqué le relargage d'une grande quantité de mono-RL en solution ce qui a permis à la double couche de phospholipides de se reformer de façon homogène.

En regard de cette étude, nous avons conclu que les mono-RLs induisent une forte déstructuration des liposomes, qui nécessite la rupture de la membrane de la vésicule pour former une bicouche lipidique connectée latéralement à la surface de la puce d'or.

Après l'injection de Triton X-100 (1%), nous avons observé une chute remarquable du signal SPR qui a donné lieu à un autre état V.

Ces variations du signal SPR se produisent lorsque la masse et/ou l'épaisseur de la couche change. Nous avons modélisé par le logiciel LayerSolver les courbes SPR qui correspondent aux trois états (III, IV et V) et nous avons calculé les épaisseurs moyennes (d) et les indices de réfraction (n) des différentes couches pour les deux longueurs d'onde. Nous avons obtenu les résultats ci-dessous dans le Tableau 2.

Tableau 2. Epaisseur (d) et indice de réfraction (n_{670}) obtenus à partir de l'analyse SPR dans du NaCl 0,15 M pour la couche de liposomes déposée sur la streptavidine et pour les couches lipidiques résultantes après injection de mono-RL et de Triton X-100 (1%).

Couche	d (nm)	n_{670}
Liposomes (III)	79.61 ± 6.74	1.35270 ± 0.00122
Bicouche lipidique (IV)	5.60 ± 0.01	1.44941 ± 0.00042

Monocouche lipidique (V)	2.30 ± 0.43	1.41931 ± 0.00033
--------------------------	-----------------	-----------------------

A partir des valeurs théoriques obtenues, nous avons confirmé que la couche obtenue à l'état IV après interaction avec le mono-RL est une bicouche lipidique contenant à la fois des lipides HSPC et DSPC-PEG biotinylés et que l'injection de Triton X-100 (1 %) sur la couche IV a laissé une monocouche lipidique sur la streptavidine qui correspond aux lipides biotinylés (DSPE-PEG) (état V). La Figure 13 illustre les différents états de la couche de phospholipides sous l'action de solutions de mono-RL à différentes concentrations et de Triton X-100 (1 %).

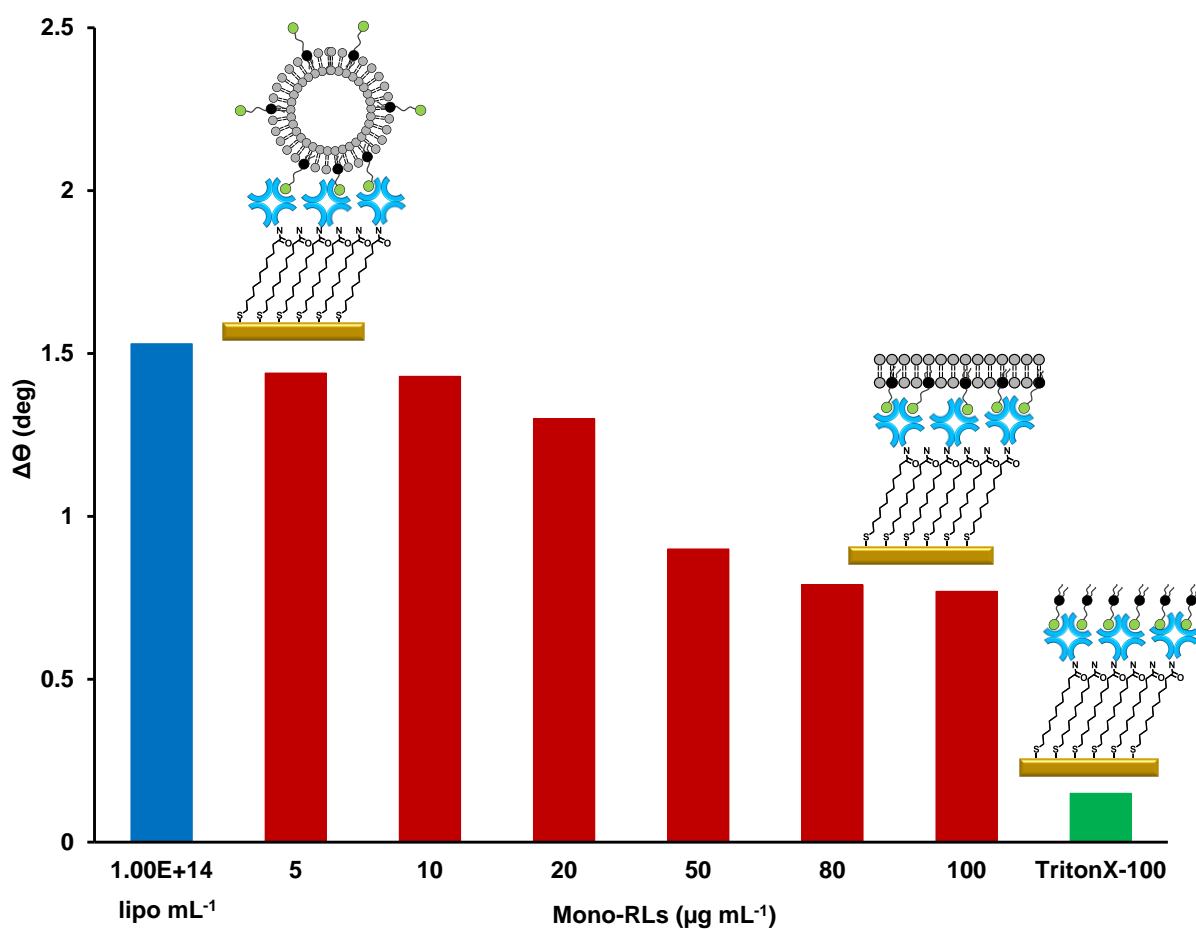


Figure 13. Schéma des changements morphologiques de la couche de liposome associés aux décalages angulaires du pic SPR après des injections de mono-RL et de Triton X-100 (1%) sur la couche de liposomes

Par la suite, en utilisant les résultats théoriques du Tableau 2 et la formule de Feijter dans l'équation 1 (qui est l'équation 12 dans le chapitre 2), nous avons pu estimer les densités de

masse surfacique de lipides greffés sur la puce d'or après interaction des liposomes avec le mono-RL et le Triton X-100 (1%).

$$\Gamma = \frac{d_L \times (n_L - n_b)}{dn/dc} \quad (\text{Equation 1})$$

Dans l'équation 1, d_L , n_L sont respectivement l'épaisseur et l'indice de réfraction de la couche correspondante L, n_b est l'indice de réfraction de la solution de NaCl à chaque longueur d'onde, et dn/dc est l'incrément d'indice de réfraction de la dispersion des liposomes. Une valeur de dn/dc de $\sim 0,134 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ a été déterminée expérimentalement à partir de la pente de la variation linéaire de l'indice de réfraction en fonction de la concentration en liposomes (C_1).

Les densités de masse de lipides à la surface ont ainsi été calculées. Les valeurs obtenues ont été $\Gamma(\text{III}) \sim 1226 \text{ ng cm}^{-2}$ pour la couche de liposomes immobilisés, puis $\Gamma(\text{IV}) \sim 490 \text{ ng cm}^{-2}$ pour la bicouche lipidique et enfin $\Gamma(\text{V}) \sim 150 \text{ ng cm}^{-2}$ pour la quantité de lipides restant sur la couche de streptavidine. La densité de masse surfacique des lipides calculée pour l'état III correspond à une monocouche de liposomes telle que décrite dans la littérature (densité de masse surfacique $\Gamma = 1557,64 \text{ ng cm}^{-2}$ pour des liposomes de 86,63 nm de diamètre) [20]. Ces résultats nous ont permis de confirmer que nous avons initialement développé une couche dense de liposomes à la surface de la streptavidine et que l'interaction avec le mono-RL entraîne une perte de masse. La densité de lipides observée à l'état IV doit correspondre à une bicouche lipidique unique, car la masse calculée est comparable aux valeurs précédemment obtenues dans la littérature [21, 22].

VI. Publication

Surface Plasmon Resonance Monitoring of Mono-Rhamnolipid Interaction with Phospholipid-Based Liposomes

Meryem Belkilani, Maryam Shokouhi, Carole Farre, Yves Chevalier, Sylvain Minot, François Bessueille, Adnane Abdelghani, Nicole Jaffrezic-Renault, and Carole Chaix*



Cite This: *Langmuir* 2021, 37, 7975–7985



Read Online

ACCESS |



Metrics & More

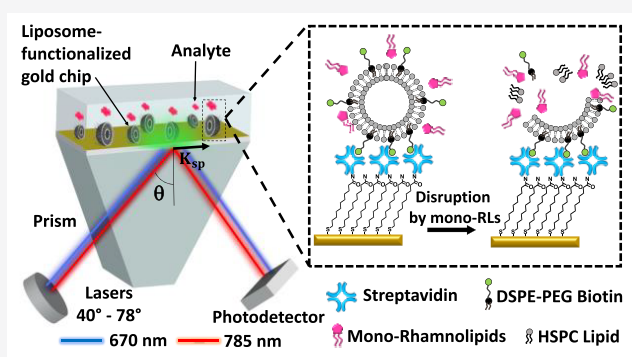


Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: The interactions of mono-rhamnolipids (mono-RLs) with model membranes were investigated through a biomimetic approach using phospholipid-based liposomes immobilized on a gold substrate and also by the multiparametric surface plasmon resonance (MP-SPR) technique. Biotinylated liposomes were bound onto an SPR gold chip surface coated with a streptavidin layer. The resulting MP-SPR signal proved the efficient binding of the liposomes. The thickness of the liposome layer calculated by modeling the MP-SPR signal was about 80 nm, which matched the average diameter of the liposomes. The mono-RL binding to the film of the phospholipid liposomes was monitored by SPR and the morphological changes of the liposome layer were assessed by modeling the SPR signal. We demonstrated the capacity of the MP-SPR technique to characterize the different steps of the liposome architecture evolution, i.e., from a monolayer of phospholipid liposomes to a single phospholipid bilayer induced by the interaction with mono-RLs. Further washing treatment with Triton X-100 detergent left a monolayer of phospholipid on the surface. As a possible practical application, our method based on a biomimetic membrane coupled to an SPR measurement proved to be a robust and sensitive analytical tool for the detection of mono-RLs with a limit of detection of $2 \mu\text{g mL}^{-1}$.



INTRODUCTION

Rhamnolipids are secondary metabolites naturally produced by the bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, with biosurfactant properties. They belong to the group of surface-active glycolipids and consist of a glycone part composed of one or two rhamnose moieties connected via an α -1,2-glycosidic linkage and a glycone part consisting of two alkyl chains. They are produced as a mixture of mainly α -L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoil- β -hydroxydecanoate and 2-O- α -L-rhamnopyranosyl- α -L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoil- β -hydroxydecanoate called mono- and di-rhamnolipid, respectively. These two compounds are the dominant components in the naturally produced mixture. They constitute the virulence factor of *P. aeruginosa* and they cause chronic respiratory infections in cystic fibrosis patients and immunocompromised individuals. It has been shown on in vitro-reconstituted human respiratory epithelium that incorporating rhamnolipids in a host cell membrane decreases transepithelial resistance for concentrations higher than $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.¹ Rhamnolipids are incorporated within the apical membranes of epithelial cells and later within their basolateral membranes. The permeability of epithelia to bacteria is then increased. As biosurfactants, rhamnolipids are used in detergents, food, and cosmetic

products, as these compounds have low toxicity and a weak ecological impact.²

Because of complexity due to the numerous biological activities of rhamnolipids, interactions of rhamnolipids with cell membranes still deserve detailed investigations. Biomimetic membrane models facilitate the understanding of complex biological membrane behaviors. Those composed of lecithins, the main phospholipids of many living cells, are structured as bilayers that may be dispersed in water as liposomes or vesicles. These types of vesicles, encapsulating redox or fluorescent probes, have been used for the detection of various microorganisms through their metabolites.^{3,4} Calorimetric studies have shown that di-RLs bind to mono-unsaturated phospholipid 1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine (POPC) vesicles, rupture the bilayers, and cause leakage from the inner aqueous medium at RL/lipid ratios higher than one, this effect is reduced in the presence of

Received: March 26, 2021

Revised: June 16, 2021

Published: June 25, 2021



cholesterol.⁵ An FTIR study showed a direct interaction between the phosphate groups of 1-palmitoyl-2-linoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PLPC) and the polar heads of rhamnolipids, which then altered the organization of polar headgroups of the phospholipids. These interactions were confirmed by molecular dynamics simulations of these membrane models in the presence of rhamnolipids.⁶ Owing to their two rhamnose units in their polar headgroup, di-RLs are more hydrophilic surfactants than mono-RLs.⁷ Thus, di-RLs self-assemble as small micelles, which grow as the concentration increases. Conversely, the less hydrophilic mono-RLs form large micelles and vesicles in aqueous solution. On this basis, mono-RLs are more prone to mix with phospholipids and be incorporated into liposome bilayers.

Surface plasmon resonance (SPR) is a suitable label-free technique for the study of interactions between species bound to the SPR chip surface and their partners in solution. The Kretschmann configuration enables measurements avoiding interference from the surrounding liquid medium because incident light does not pass through this medium. Moreover, SPR measurements performed with two different wavelengths of incident light allow a unique pair of values of the thickness and refractive index of the films deposited on the gold surface to be determined.^{8,9}

In the past few years, a number of studies have investigated the deposition of either planar mono- or bilipidic layers or liposomes on gold substrates by SPR.^{10–17} These membrane biomimicking systems have been applied to the study of the interactions with different molecules such as catechol,¹⁸ drugs,¹⁹ peptides,^{20,21} proteins,^{22–24} or toxins.²⁵ To our knowledge, the SPR technique has not been used so far for studying the interactions of RLs with phospholipid layers or liposomes. The objective of this work was to assess the mechanism of interaction of RLs with a biomimetic membrane formed by a monolayer of liposomes. First, the immobilization of phosphatidylcholine-based liposomes on functionalized gold SPR chips was monitored. The thickness and refractive index of the different layers were deduced by modeling the SPR signals at two wavelengths. Then, RL solutions of different concentrations were flowed on the liposome layer and SPR signals (sensorgrams) were recorded. A solution rich in mono-RLs was preferred for this study because mono-RLs are presumed to bind more strongly to phospholipid bilayers than di-RLs.^{7,26} A RL mixture rich in mono-RLs may destructure phospholipid liposomes with better efficacy. The change of the morphology of the liposome layer was then described, based on modeling of the SPR signal.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Hydrogenated soybean phosphatidylcholine (HSPC) was purchased from Lipoid company, 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[biotinyl(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG), cholesterol (99%), 11-mercaptoundecanoic acid (MUA), 11-amino-1-undecanethiol hydrochloride, 1-dodecanethiol, streptavidin, 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide (EDC), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), ethanolamine, mono-rhamnolipid (mono-RL) R95Md (95% pure rhamnolipids, mono-rhamnolipid dominant) produced by AGAE Technologies LLC (USA), Triton X-100, and NaCl were provided by Sigma-Aldrich. Chloroform (99.8%) was bought from Fisher Chemical. Diethyl ether was purchased from Carlo Erba. Methanol was ordered from VWR company. 2-(*N*-Morpholino) ethanesulfonic acid (MES) was purchased from Dominique Dutcher company. Ultrapure water was obtained using a Milli-Q system (resistivity 18.2 M Ω cm).

Preparation of Biotinylated Liposomes. Biotinylated liposomes were prepared for immediate use according to the “thin layer rehydration” technique and a slightly modified protocol from that developed by Zhao et al.²⁷ HSPC, DSPE-PEG, and cholesterol (610.8, 9.8, and 200 mg, respectively) were dissolved in 75 mL of a mixed organic solvent: chloroform, diethyl ether, and methanol (5.75:5.75:1 V/V). Biotinylated phospholipids represent 1.5% (W/W) of the total phospholipids used in this protocol. Organic solvents were then evaporated under a vacuum of -0.05 MPa in a water bath at 50 °C for 3 h using a rotary evaporator (Buchi Rotavapor R-114 with Heating Waterbath B-480 and Glassware-Acomercial). The thin transparent layer in the round-bottom flask was hydrated with water at 60 °C by rotating the container for 1 h, until the thin layer was completely dispersed in water and a milky suspension solution was obtained. In order to obtain a homogeneous mixture and to reduce the average size of the liposomes, the solution was sonicated for 20 min with a UP400S – Powerful Sonication of Larger Samples (Hielscher Ultrasound Technology company) at 60 kHz in an ice bath. The liposome solution was stored at room temperature until further use.

Physicochemical Characterization of Liposomes. Hydrodynamic diameter measurements were performed at 25 °C by Dynamic Light Scattering (DLS) with a Zetasizer NanoZS instrument (Malvern Panalytical, Palaiseau, France) operating in a backscatter mode at an angle of 173°. A disposable polystyrene cuvette was filled with 3 mL of a diluted liposome suspension (1:10) in a 0.15 M NaCl solution and measurements in triplicate were started after an equilibration time of 60 s. Results are based on intensity distribution calculation; they are given as an average hydrodynamic diameter \pm standard deviation (SD) with a polydispersity index (Pdl).

The surface charge of the liposomes was determined by ζ -potential measurements using a NanoZS Zetasizer instrument (Malvern Panalytical). The measurements were carried out in folded capillary cells DTS 1070 (Malvern Instruments), which were filled with 800 μ L of a diluted liposome suspension (1:10) in 0.15 M NaCl solution and equilibrated at 25 °C for 60 s.

The refractive index of the prepared liposome suspensions was determined using an PAL-1 ATAGO refractometer.

Cryo-TEM observations were performed on diluted dispersions of purified liposomes. A drop of dispersion was cast onto a 300 mesh holey carbon film (Quantifoil R2/1) and quench-frozen in liquid ethane using a cryoplunge workstation (LPS, University of Paris-Saclay, France). The specimens were then mounted on a precooled Gatan 626 sample holder, transferred into a microscope (Phillips CM120) and observed at an accelerating voltage of 120 kV.

Functionalization Procedure of the SPR Gold Chips. SPR gold chips were obtained from BioNavis (BioNavis Ltd., Ylöjärvi, Finland). They were typically 20 mm long, 12 mm wide, and 0.55 mm thick, consisting of a (\sim 50 nm) Au layer on a (\sim 3 nm) Cr adhesive layer on a glass slide that has a refractive index of 1.52020 and 1.51620 at 670 and 785 nm, respectively. The gold surface roughness was 1.53 nm. It was measured by atomic force Microscopy (AFM) operating in a tapping mode (Agilent M5500 Picoplus, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) and corresponds to the root mean square roughness (RMS) for an image of $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}$ in size.

The SPR gold chips were used as substrates after the following procedures:

- Any potential contaminants were removed by microwave-induced plasma generated by a microwave plasma reactor (UHP-MW-PC, Diener electronic company, Stuttgart, Germany). The operating pressure was generated by a dry-vacuum pump. We used two successive steps for plasma treatment. The first step was cleaning using dioxygen at a pressure of 0.7 mbar for 3 min with a power of 180 W dm³. To ensure the grafting of the thiols onto the metallic surface by avoiding the potential risk of oxidation, the second step was a reducing plasma treatment. We achieved this second step using dihydrogen at a pressure of 1 mbar for 5 min with a power of 126 W dm³.

Then, the slides were sonicated for 5 min in acetone and next in ultrapure water.

- To form a dense self-assembled monolayer (SAM) on the gold surface, the Au substrates were dried under a nitrogen flow and immediately immersed in a 1 mM ethanolic solution of MUA (acidic SAM) or of 11-amino-1-undecanethiol hydrochloride (amino SAM) or of 1-dodecanethiol (alkyl SAM) for a minimum duration of 20 h at 4 °C. The chips were then rinsed with ethanol and dried under a gentle nitrogen flow. SPR gold chips functionalized with different SAMs were preserved in an ultrapure water bath and used directly for liposome immobilization.
- To develop the streptavidine SPR chip, the gold surface was cleaned by plasma treatment as described above and immersed in an ethanolic solution of MUA (1 mM) for 20 h at 4 °C.²⁸ Then, the chip was rinsed with ethanol and dried under a gentle flow of nitrogen. The MUA SPR gold chip was incubated in 100 μL of a mixture of 0.2 M EDC and 0.05 M NHS in MES buffer (5 mM MES, pH 5) for 2 h at room temperature. The activated surfaces were washed in 1 mL of MES buffer and then incubated in 100 μL of streptavidin solution (1 mg mL⁻¹) in PBS buffer (0.1 M NaH₂PO₄, 0.1 M Na₂HPO₄, 0.15 M NaCl, pH 7) for 12 h at room temperature. Afterward, SPR chip surfaces were rinsed with 1 mL of MES buffer, incubated in 2 mL of 10 mM ethanolamine aqueous solution for 10 min to block the residual activated acid functions and remove all the physisorbed streptavidin, and rinsed again in 1 mL of MES buffer. All functionalization steps were monitored by SPR under a 0.15 M NaCl solution flow.

Multiparametric Surface Plasmon Resonance (MP-SPR).

Dual wavelength SPR measurements were performed with a MP-SPR Navi 200 OTSO (BioNavis Ltd., Ylöjärvi, Finland) instrument at ambient temperature. The setup was equipped with two laser source excitation providing 670 and 785 nm incident wavelengths and two independent flow channels, inlet tubing and an outlet for waste tubing. The measurements in both flow channels were carried out in parallel with the incident lights of 670 and 785 nm. The intensity of the reflected light was measured at a resonant angle between 40 and 78°.

During the SPR measurements on the gold chips functionalized with amino SAM, alkyl SAM, acidic SAM, and streptavidin, a continuous flow (50 $\mu\text{L min}^{-1}$) of a 0.15 M NaCl solution was first injected for approximately 10 min until the SPR sensorgram signal was stabilized. After stabilization of the signal intensity, different concentrations of liposomes (1 $\times 10^{11}$ –5 $\times 10^{12}$ liposomes mL⁻¹) in a 0.15 M NaCl solution were injected onto the SPR gold chips in both flow channels for 4 min at a flow rate of 50 $\mu\text{L min}^{-1}$, in order to evaluate which type of functionalization ensures a dense layer of liposomes.

Liposome–Rhamnolipid Interaction Analysis. An MP-SPR measuring instrument was used for monitoring interactions between mono-RLs and liposomes. The mono-RL solutions were prepared in 0.15 M NaCl, in a range of concentrations from 2 to 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and then injected onto the liposome layer; 2, 5, 10, and 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mono-RL solutions were injected at a flow rate of 12 $\mu\text{L min}^{-1}$ for 15 min, while the concentrations of 50, 80, and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were injected at a flow rate of 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ for 4 min. Each injection was followed by a 4 min washing step with 0.15 M NaCl solution at 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ until the signal was stabilized. This protocol provided an optimal variation of the SPR signal during the sensorgram. Finally, 1 mL of Triton X-100 (1%) in a 0.15 M NaCl solution was injected into both channels for 4 min. Each experimental procedure was reproduced twice.

MP-SPR Biophysical Analysis. The theoretical simulation of the multilayer system and the determination of the optical parameters of the different layers were performed by SPR Navi LayerSolver v. 1.2.1 (BioNavis Ltd., Ylöjärvi, Finland) software, which is supplied as associated software with the MP-SPR instrument. LayerSolver software uses the well-known Fresnel equation formalism for

calculations.^{29,30} The multilayer calculation method is based on a numerical layer-by-layer iteration and allows for multiple SPR spectra processing and a stepwise approach for calculations. A theoretical description for the resonance condition can be obtained by solving Maxwell's equations for a multilayer optical system.²⁹ Software was used to simultaneously determine the thickness and refractive index giving the best fit of the theoretical calculation to the full SPR angular spectra measured at both laser wavelengths at the same time and at the same point.^{8,29} The two-wavelength method combined with angular scanning over a wide range of incidence angles has proven to be particularly efficient to retrieve the layer thickness and refractive index values of the thin biomolecular layers.^{9,31,32}

The schematic representation of the multilayer system is presented in Figure 1. Layers 0 to 4 of the SPR gold chip are the glass substrate,

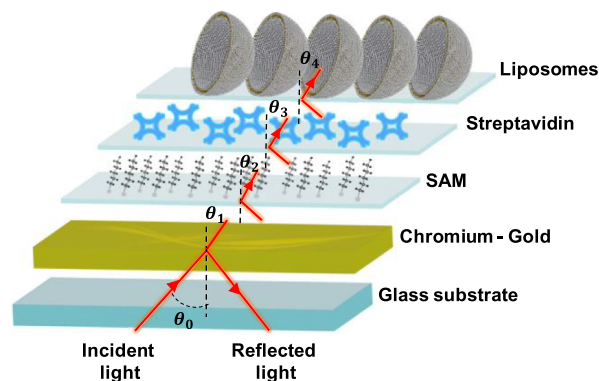


Figure 1. Schematic representation of the multilayer system of the SPR gold chip.

the chromium-gold layer, the SAM, the streptavidin layer, and the liposome layer, respectively. It is worth noting that the MP-SPR Fresnel's reflection coefficient is based on an independent layer model structure. Each layer is characterized by its thickness (d) and its complex refractive index (\tilde{n})³³ calculated with eq 1:

$$\tilde{n} = n + ik \quad (1)$$

where n is the real part of the complex refractive index that corresponds to the refraction of light and k is the imaginary part corresponding to the extinction or absorption of light by the material.

Since the SPR full angle spectra at both wavelengths are measured at the same location, the layer thickness should be the same for both wavelengths. The thickness values were therefore defined as global variables for both wavelengths. The complex refractive index was considered as an independent variable for the metal layer modeling ($k \neq 0$) and as a linearly dependent variable between the two used wavelengths for the other organic layers that do not absorb light ($k = 0$). The refractive index of the layer for the second wavelength, $n_{\lambda 2}$, can be calculated using eq 2.³⁰

$$n_{\lambda 2} = n_{\lambda 1} + \frac{dn}{d\lambda} \times (\lambda 2 - \lambda 1) \quad (2)$$

where $n_{\lambda 1}$ is the refractive index for wavelength 1 and $\frac{dn}{d\lambda}$ is the linear dispersion coefficient relative to wavelength change.

The optical input parameters of chromium and gold layers are taken from the MP-SPR Navi LayerSolver User Manual as follows: for the chromium adhesion layer $\tilde{n}_{670} = 3.52950 + i4.26830$ and $\tilde{n}_{785} = 3.97290 + i4.18950$; for the gold layer, $\tilde{n}_{670} = 0.17410 + i3.61230$ and $\tilde{n}_{785} = 0.18360 + i4.58710$. The other parameters were determined by fitting to the experimental data.

The changes of the thickness and refractive index at the surface of the SPR gold chips induce a shift of the SPR angular peak minimum (θ_{SPR}). Thus, based on Feijter's formula,³⁴ the surface mass density (Γ) of an adsorbed liposome layer can be calculated using eq 3, considering the SPR measured parameters of the layer.

$$\Gamma = \frac{d_L \times (n_L - n_b)}{dn/dc} \quad (3)$$

where d_L and n_L are the thickness and refractive index, respectively, of the corresponding layer L , n_b is the refractive index of the NaCl solution at each wavelength, and dn/dc is the refractive index increment of the dispersion of liposomes. An accurate determination of dn/dc is necessary to precisely quantify the surface mass densities (Γ) of liposomes. dn/dc was determined experimentally from the slope of the linear variation of the refractive index as a function of liposome concentrations (C_l). The obtained value, $dn/dc \approx 0.134 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, is comparable to the values reported in the literature ($dn/dc_{\text{lipid}} \approx 0.135 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$).^{35,36}

RESULTS AND DISCUSSION

Biotinylated Liposome Characterization. The liposomes were characterized with respect to their size and surface charge. The hydrodynamic diameter of liposomes determined by DLS (Table 1) was around 76 nm, with a

Table 1. Properties of the Biotinylated Liposomes; the Hydrodynamic Diameter and Zeta Potential Are Given as Mean Values \pm SD of Three Independent Measurements

diameter (nm)	PdI ^a	zeta potential (mV)	C_p^b (mmol L ⁻¹)	C_l^c (lipo mL ⁻¹)	RI ^d
76 \pm 7.5	0.16	-10.8 \pm 0.6	30	2.5 \times 10 ¹⁴	1.34

^aPolydispersity index. ^bConcentration of phospholipids. ^cConcentration of liposomes. ^dRefractive index.

polydispersity index (PdI) of 0.16. It can be noted that the liposome size was less than half of both wavelengths of the MP-SPR device so that the evanescent wave could penetrate the full liposome layer. In addition, the surface potential of the liposomes was measured on the basis of their electrophoretic mobility. The zeta potential value was approximately -10.8 mV. The negative surface of the liposomes, due to the phosphate groups of the phospholipids, induces an electrostatic repulsion between them, preventing their aggregation and providing high colloidal stability. Several measurements of these parameters over time confirmed the stability of the liposome suspensions over a period of 6 months. Furthermore, the liposome suspension was carefully controlled before each SPR experiment.

The liposome concentration C_l is obtained by dividing the total number of liposomes N_{lipo} (calculated according to eq S1 in the Supporting Information) by the volume of the suspension ($V = 25 \text{ mL}$), resulting in $2.5 \times 10^{14} \text{ lipo mL}^{-1}$.

Cryo-TEM observation confirmed the size of the synthesized liposomes. As shown in Figure 2a, the liposomes appeared as perfectly spherical and unilamellar nanovesicles. Figure 2b presents the size distribution of liposomes, estimated with ImageJ software. The mean diameter of the liposomes was 69 nm with a SD of 10 nm.

A satisfactory agreement is noticed between the two size distributions derived from TEM image analysis and DLS measurements. The measurement of the hydrodynamic diameter of liposomes by DLS in solution takes into account a layer of hydration around the liposomes, which leads to a difference of around 10% with the diameter measured by Cryo-TEM.

SPR Monitoring of Liposome Immobilization on Modified Surfaces. A comparative study of the interaction of biotinylated liposomes with several SAM-functionalized gold

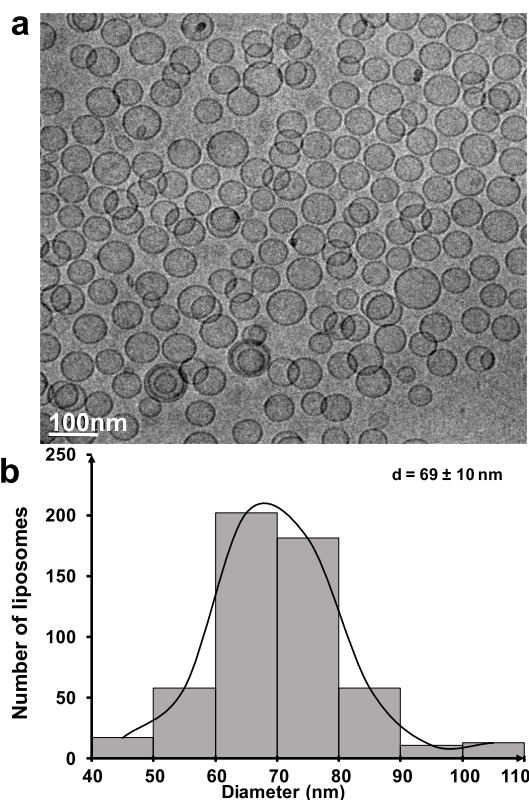


Figure 2. (a) TEM image and (b) diameter histogram of a diluted dispersion of biotinylated liposomes.

SPR chips was performed so as to select a SAM binding a dense layer of immobilized liposomes. For this purpose, the gold surface underwent different functionalizations. After thorough cleaning of the gold SPR chip, SAMs of long-chain alkanethiols with varying terminal groups ($-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, and $-\text{CH}_3$) were formed on gold chips after 20 h reaction. A fourth gold chip was functionalized by a streptavidin layer by a two-step protocol: A closely packed MUA layer was first elaborated on the gold surface. Then, the acidic function was activated using EDC/NHS chemistry in order to covalently graft the streptavidin to the SPR chip surface.

During the measurement and to ensure the accuracy of the changes in the measured optical parameters, a calibration step of the SPR device with 0.15 M NaCl solution was made. Next, biotinylated liposome dispersions at concentrations between 1×10^{11} and $5 \times 10^{12} \text{ lipo mL}^{-1}$ were injected and flowed at $50 \mu\text{L min}^{-1}$ for an interaction time of 4 min with the functionalized chips. This was followed by a 4 min washing step in 0.15 M NaCl to remove unbound liposomes. The variation in the θ_{SPR} position ensuing from the variation of the refractive index as a function of different liposome concentrations (C_l) was compared for the four different functionalized surfaces (Figure 3).

After calibration of the device, the SPR measurement of the functionalized gold surface was performed before the injection of the liposomes. Streptavidin deposition on the MUA layer resulted in a 0.4° variation of the θ_{SPR} , whereas the deposition of the different SAMs on gold led to a signal variation of approximately 0.2° . As shown in Figure 3, liposomes bound strongly to the streptavidin-functionalized surface, resulting in a θ_{SPR} increase of 1.7° under injection of $5 \times 10^{12} \text{ lipo mL}^{-1}$. By modifying the gold surface with an amino-terminated layer,

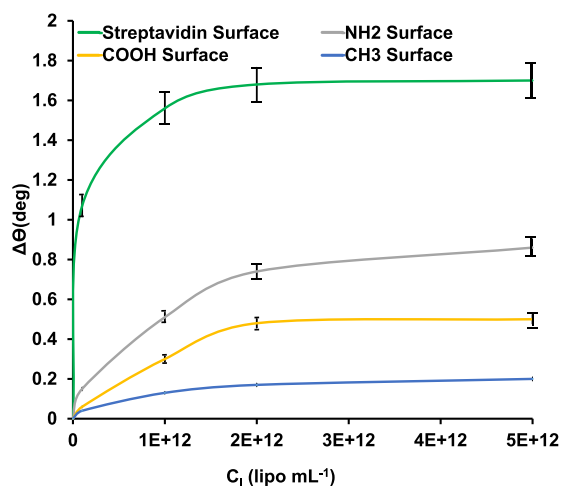


Figure 3. Angular shifts of the resonance peak ($\Delta\theta_{\text{SPR}}$) in SPR measurements at 670 nm versus liposome solution injection at different concentrations (C_l). The interactions of biotinylated liposome solutions were studied on $-\text{COOH}$ (11-mercaptoundecanoic acid), $-\text{NH}_2$ (11-amino-1-undecanethiol), $-\text{CH}_3$ (1-dodecanethiol), and streptavidin-modified SPR gold surfaces.

the angular shift was substantial (0.86°) but remained weak compared to the one obtained during the liposome binding on the streptavidin chip. The binding interaction on the amino-terminated layer was mainly driven by electrostatic interaction. In the case of the MUA layer, a low angular shift of 0.48° was obtained, which reflected a clear blocking effect due to electrostatic repulsion. However, this binding was even stronger than for the hydrophobic SAM (1-dodecanethiol), which prevented hydrophilic liposomes from binding, resulting in a small angle variation (0.2°). Thus, the order of the angle variation $\Delta\theta$ following the liposome immobilization on SAM surfaces was as follows: $\Delta\theta_{\text{NH}_2 \text{ surface}} > \Delta\theta_{\text{COOH surface}} > \Delta\theta_{\text{CH}_3 \text{ surface}}$. These results are in good agreement with experimental results reported by Fenzl et al.¹⁵ for the interaction of negatively charged liposomes (DPPC/DPPG/cholesterol liposomes with a zeta potential of -34 mV and DPPC/DPPG/N-glutaryl DPPE/cholesterol with a zeta potential of -47 mV) with varying charge and hydrophilicity surfaces. They noted the same order of variation for refractive index values, i.e., $\Delta n_{\text{NH}_2 \text{ surface}} > \Delta n_{\text{COOH surface}} > \Delta n_{\text{CH}_3 \text{ surface}}$ when injecting a 453 pM ($\sim 2.5 \times 10^{12}$ lipo mL^{-1}) concentration of liposomes on gold surfaces modified by 11-mercaptoundecyl amine hydrochloride, MUA, and 1-mercaptoundecane SAMs. In our case, the liposome surface was less anionic and had PEG moieties that can play a role in the interactions. We assume that the attractive interaction between the anionic liposomes and the cationic amino surface was not sufficiently effective to obtain a homogeneous layer of liposomes compared with the streptavidin-functionalized gold substrate.

The efficiency of washing with Triton X-100 detergent was assessed at this stage. After immobilization of liposomes and signal stabilization in NaCl solution, Triton X-100 (1%) was injected on the surface of each SPR chip leading to phospholipid release. Thus, the success of liposome binding to the streptavidin-functionalized surface was indirectly demonstrated by the Triton treatment. As expected, a significant drop in the SPR signal down to the baseline was observed for the liposomes immobilized on SAM-function-

alized surfaces after the injection of Triton X-100, whatever the quantity of immobilized liposomes (see Figure S1 in the Supporting Information). Further details on the calculation of residual liposome masses after Triton treatment will be discussed later in the text. The streptavidin-modified SPR gold surface was preferred for liposome coating, on the basis of its strong affinity³⁷ leading to efficient loading and good layer stability.

SPR Gold Chip Layers: Formation and Modeling.

Figure 4a shows the time-resolved sensorgram obtained after

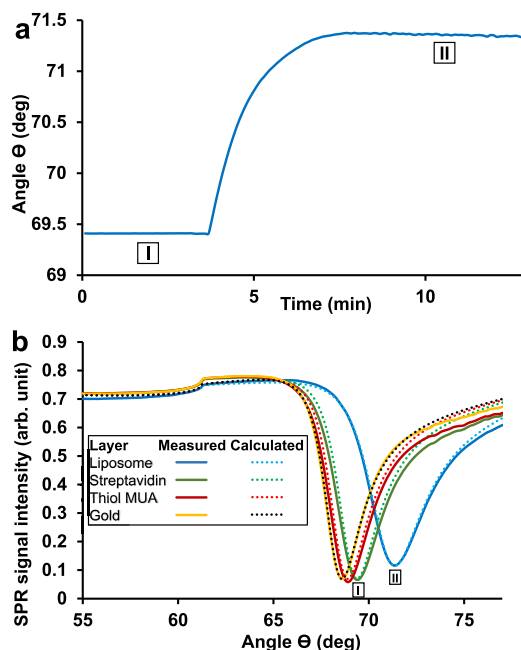


Figure 4. (a) SPR sensorgram of the immobilization of 1×10^{14} lipo mL^{-1} liposomes on a streptavidin-functionalized SPR chip, with the light source at 670 nm. (b) SPR full angle scans of the SPR gold chip at the different steps of functionalization: gold layer (yellow line), MUA layer (red line), streptavidin layer (green line), and liposome layer (blue line), with corresponding fits (dashed lines) from LayerSolver modeling of individual SPR chip layers using the full SPR angular spectra measured at a 670 nm wavelength. Roman numerals (I and II) show the correspondence of events in the sensorgram (a) and the SPR angle scans (b).

saturation by 1×10^{14} lipo mL^{-1} of biotinylated liposomes on the streptavidin layer. The variation of θ_{SPR} reached about 1.7° and this value remained constant during the washing step with 0.15 M NaCl solution. This value obtained in a single injection is the same as that following cumulative injections of increasing concentrations of liposomes up to 5×10^{12} lipo mL^{-1} as presented in Figure 3. Both experiments show the saturation of the SPR gold surface at this coverage.

Figure 4b (light source at 670 nm) and Figure S2 (light source at 785 nm, see Supporting Information) present the SPR full angle scans recorded from 55 to 77° and 60 to 72° , respectively. The angular shift of the SPR confirmed the success of the successive functionalizations of the gold surface. Indeed, the θ_{SPR} recorded for the metal (yellow trace, $\theta_1 = 68.63^\circ$) shifted to the right when the MUA layer was deposited on the surface (red trace, $\theta_2 = 68.89^\circ$), and the SPR peak subsequently moved farther to the right when streptavidin was adsorbed (green trace, $\theta_3 = 69.41^\circ$). Interestingly, the SPR peak recorded after liposome immobilization on streptavidin

was the largest of all (blue trace, $\theta_4 = 71.4^\circ$). In addition, we noted the absence of any peak in the vicinity of the total internal reflection (TIR) angle where a second peak is likely to appear when the thickness of the liposome layer exceeds the penetration depth of the evanescent SPR field. Indeed, it was reported in the literature that this exotic optical behavior of the full SPR angular spectrum was due to the formation of a waveguide on the SPR gold chip.³⁸

To confirm the formation of the layers and quantify the adsorption, a dual wavelength analysis for the determination of thicknesses (d) and refractive indexes (\tilde{n}) was performed with the layer resolution software LayerSolver. These parameters were independently calculated after several measurements and obtained when the upper and lower limits of the layer thicknesses and refractive indexes were fixed. The d and \tilde{n} values were calculated using a consistent set of initial values throughout the modeling in order to evaluate the dynamic behavior of the modeled systems and the sensitivity of the differential equations to the initial conditions provided as inputs to LayerSolver. The parameters (d and n) coming from the liposome layer modeling as well as the other layers are reported in Table 2. The results for each individual measurement are shown in Table S1 (Supporting Information).

Table 2. Thickness (d) and Refractive Index (n) of the Different Layers of the SPR Chip, Obtained by SPR LayerSolver Simulation^a

layer	d (nm)	n_{670}	n_{785}
glass	infinite (starting layer)	$n = 1.52020$	$n = 1.51620$
chromium	1.6 ± 0.06	$n = 3.51127 \pm 0.02050$	$n = 4.04615 \pm 0.17135$
gold	54.98 ± 0.02	$n = 0.19612 \pm 0.00016$	$n = 0.19548 \pm 0.00477$
thiol MUA	1.50 ± 0.08	$n = 1.43897 \pm 0.01385$	$n = 1.42702 \pm 0.01378$
streptavidin	2.71 ± 0.31	$n = 1.41646 \pm 0.01102$	$n = 1.41416 \pm 0.01102$
liposome	79.61 ± 6.74	$n = 1.35270 \pm 0.00122$	$n = 1.35102 \pm 0.00126$
NaCl solution	infinite (ending layer)	$n = 1.33216$	$n = 1.32966$

^aThe calculated values represent the average (\pm SD) of three independently repeated measurements.

All simulations were performed with an electrolyte solution of 0.15 M NaCl and under the excitation of incident light at 670 and 785 nm. The simulation started with the determination of the optimized optical properties for the chromium adhesion layer “Cr” and the gold layer “Au” by modeling a full SPR angle spectrum of a cleaned SPR gold chip. Then, the optical properties of the SPR chip were maintained as fixed and used as the starting point to determine the optical properties of the different deposited layers.

For the determination of the MUA layer parameters, the Fresnel equations for a system of five layers (prism (glass)/Cr/Au/MUA films/NaCl) were used. MUA forms, on average, a thin layer on the surface of the SPR gold chip, with a thickness of 1.5 nm and a refractive index of 1.44 at 670 nm. These results are in good agreement with the numerical analysis results of Damos et al. who calculated a film thickness of about 1.55 nm with a dielectric constant of $\epsilon = n^2 = 2.1$ at 670 nm for the adsorption of MUA on the gold surface.³⁹ Adding the

parameters found for the MUA layer to the calculating system, a thickness of 2.7 nm was determined for the streptavidin layer (spectrum I) with a refractive index of 1.42 at 670 nm. Our theoretical simulation reproduced well the modeling results reported by Schmidt et al.⁴⁰ and Dolci et al.⁴¹ for a streptavidin layer. They measured 2.8 and 3 nm thicknesses together with 1.45 and 1.5 refractive indexes, respectively.

The SPR spectrum (II, Figure 4b) taken after signal stabilization corresponds to the liposome layer. Liposomes immobilized on the streptavidin-functionalized chip form a layer of about 80 nm average thickness. The calculated refractive indexes at both wavelengths were $n_{670} = 1.35270$ and $n_{785} = 1.35102$. The layer thickness corresponded to the liposome diameter measured by DLS and TEM and further adsorption did not occur when the liposome concentration in the solution was increased again. This strongly suggests that liposomes adsorb as a monolayer. The difference of the theoretical thickness value compared to the hydrodynamic diameter measured in bulk can be attributed to morphological changes in the liposome shape due to the interactions with the functionalized gold chip surface and to the shear stress due to the buffer flow.

The liposome addition induced a shift of the SPR curve toward higher incidence angles which became wider due to the increased thickness of the adsorbed layer on the surface.

In most biomolecular interaction studies, layer thicknesses are lower than the penetration depth of the evanescent field. This is so in the present case; the evanescent wave of the SPR can penetrate the whole liposome layer adsorbed on the SPR chip surface because the liposome average diameter is less than half that of the wavelengths (670 and 785 nm) of the MP-SPR device.^{14,33} The adsorption as a dense monolayer of liposomes is clearly demonstrated since the full angular SPR spectrum was predicted by modeling and the conditions for the validity of the optical model were satisfied.

In general, the SPR curve produced by MP-SPR provides averaged information from the entire SPR chip surface. There are factors that can influence the thicknesses and refractive indexes of the layers such as gaps in the layers, inhomogeneous coverage, or multilayer formation.⁴² In our case, the small difference of theoretical thickness and refractive index of the different layers in comparison with the calculated values can be related to the gold surface roughness or defect area of grafted biomolecules.

Mono-Rhamnolipid Interactions with Immobilized Biotinylated Liposomes. The MP-SPR technique allows direct measurement of interactions in real time and without labeling. Figure 5 shows the full sensorgram for successive injections of mono-RLs at different concentrations. First, the injection of 1×10^{14} lipo mL^{-1} of liposomes on the streptavidin layer yielded a $+1.58^\circ$ variation of the θ_{SPR} . After stabilization of the signal in 0.15 M NaCl, state III of the sensorgram corresponded to the liposome-functionalized SPR chip. Then, the injection of different concentrations of mono-RLs caused definite variations of the SPR signal, showing that RLs interacted with the liposome layer, as described in the literature.^{26,43,44} A progressive destabilization of the liposome layer was observed upon successive injections of mono-RLs. The θ_{SPR} decreased and then stabilized when the lipid layer reached a second state (state IV). At the end of the experiment, a final state of the surface was reached upon the injection of Triton X-100 (1%) followed by stabilization under the electrolyte flow (state V). The signal variation as a function

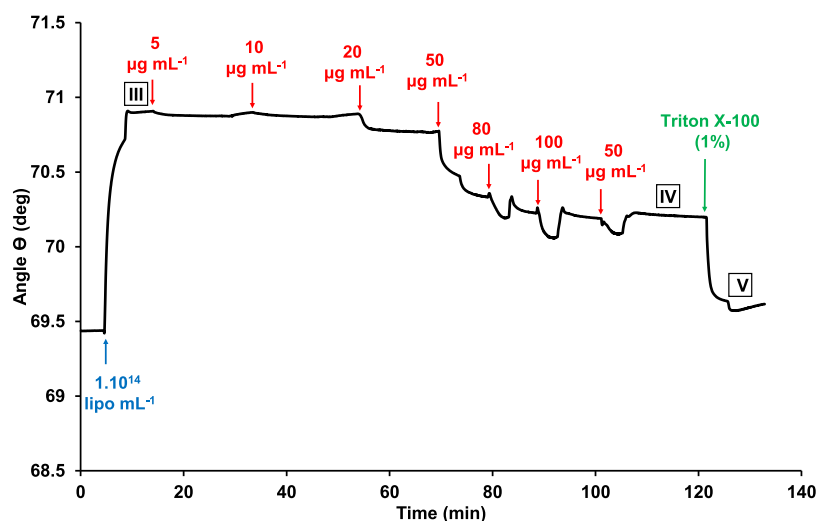


Figure 5. Sensorgram of the SPR angle versus time, measured at a wavelength of 670 nm, during the interaction of mono-RLs with liposomes.

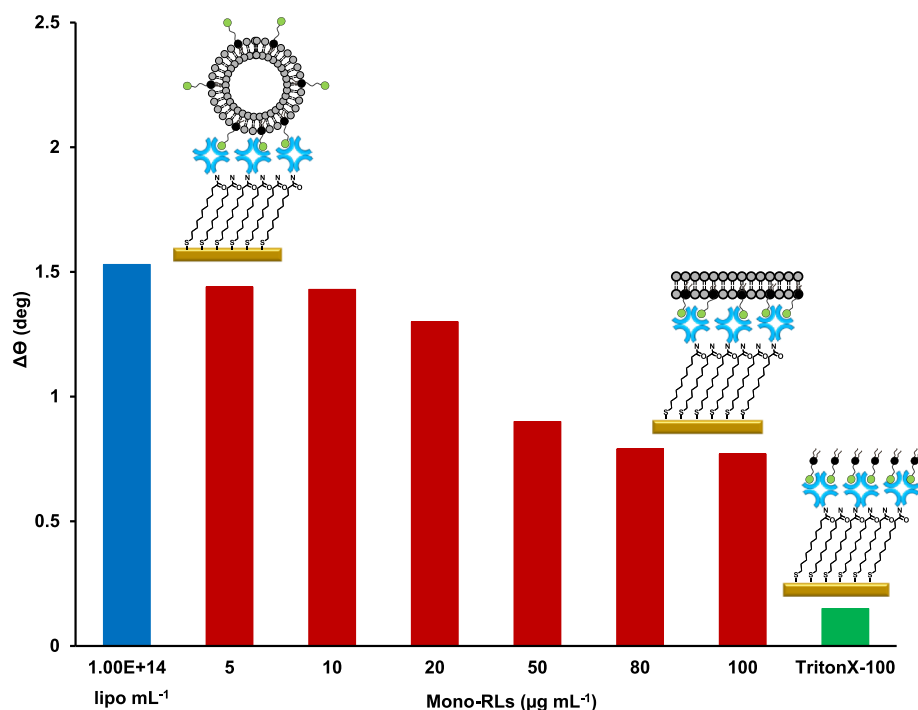


Figure 6. Sketches of the morphology changes of the liposome layer associated with the angular shifts of the SPR resonance peak following injections of mono-RLs and Triton X-100 (1%) onto the liposome layer.

of the RL concentration was reproducible from one experiment to another as is shown in the two sensorgrams presented in Figure 5 and Figure S3 (see Supporting Information). Figure S4 (see Supporting Information) exhibits the corresponding full angle SPR scans and calculated fits from LayerSolver modeling associated with the III, IV, and V states, respectively.

Considering the sensorgram presented in Figure 5, it is worth noting that the mono-RLs were immediately captured by the lipid layer of the liposomes and the signal variation resulted from the change in thickness and/or refractive index of the layer after adsorption. The variations of the SPR signal revealed different phenomena on the liposome layer depending on the concentration of mono-RLs. We can differentiate three domains for which the interactions of mono-RLs with the model membrane seem to follow different mechanisms. From

2 to 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mono-RLs, the sensorgram showed a progressive decrease in the SPR signal upon injection. We believe that RLs intercalate in the phospholipid layer without destructuring the liposomes. This interaction probably follows an equilibrium between free RLs in solution and molecules integrated into the lipid bilayer. This leads to a drop in the SPR signal related to the concentration of RLs. Then, the SPR signal significantly dropped upon 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mono-RL injection. A structural change in the liposome layer was hypothesized at this concentration. The 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentration is close to the critical micellar concentration (CMC) for mono-RLs, as the value reported in the literature is 56.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($\sim 110 \mu\text{M}$).^{45–47} At 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentration, the mono-RLs plunged into the double lipid layer of liposomes, thereby destabilizing their structure as closed

bilayers. Opening the liposomes obviously should cause the formation of an adsorbed bilayer at the surface of the chip. The excess of phospholipids was presumably washed off by the mono-RL solution by means of solubilization inside the micelles. This phenomenon was irreversible. Then, the injections of higher concentrations of mono-RLs (80 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) produced another different behavior. A drop in the angular shift of the SPR peak was observed followed by a rise of the signal back to the original value when switching to NaCl solution. A reversible adsorption of mono-RLs onto the phospholipid bilayer was taking place, even after injection of the last concentration (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). This phenomenon could be explained by the property of RLs to induce a phase dissociation and partitioning of the phospholipid bilayer, as described by Herzog et al.²⁶ These authors showed by AFM and confocal fluorescence microscopy that rhamnolipids were able to cause a phase separation of the phospholipid bilayer into liquid-ordered (lo) and liquid-disordered (ld) phases. The AFM measurement showed a thinner bilayer thickness of the ld phase compared to the lo phase. This mechanism was reversible, depending on the concentration of each constituent in the medium. Thus, in our case, the phospholipid organization as a bilayer seems to reform on the SPR chip surface when the eluting solvent changed from the mono-RL solution back to the NaCl solution, which caused the release of a large amount of mono-RLs in solution. This mechanism could explain the drop, and then the rise back up, of the signal observed during the study.

Figure 6 shows the SPR angular shifts ($\Delta\theta$) with respect to the streptavidin layer following the successive injection of mono-RLs and then Triton X-100 (1%) on the SPR gold chip. It is interesting to note that when the mono-RLs bound to lipid vesicles, the SPR angular shifts ($\Delta\theta$) decreased (red bars) and then dropped down further after the injection of Triton X-100 (1%) (green bar). This behavior is also shown in Figure S4 (Supporting Information) since the θ_{SPR} corresponding to the liposome layer (state III) shifted to the left upon mono-RL action on the biomimetic surface. This phenomenon takes place when the mass or thickness of the layer changes. In our case, the shift toward the minimum SPR angles up to state IV and then state V is equivalent to a mass decrease of the molecules coating the SPR gold chip due to a high degree of lipid vesicle lysis.

Mono-RLs induce a strong destructure of the liposomes, which requires the rupture of the vesicle membrane to form a lipid bilayer laterally connected to the surface of the gold chip. After each injection of RLs, a 4 min washing step of the SPR chip with 0.15 M NaCl is performed for signal stabilization. The average thicknesses (d) and refractive indexes (n) of layers at the three stages (III, IV, and V) indicated in Figure 5 are calculated after signal stabilization in 0.15 M NaCl (Table 3).

According to the results shown in Table 3, layer IV has a thickness around 5.6 nm, which is very thin compared to the initial liposome layer (III). This thickness calculated by modeling the SPR curve corresponds to the layer that remains attached to the SPR gold chip after the interaction with mono-RLs. This value is comparable to the theoretical thickness of a lipid bilayer containing both HSPC and DSPC-PEG lipids (~ 6 nm). Our results can also be compared to the data from the literature on the thickness and refractive index values calculated for lipid bilayers with various types of lipids; POPC ($d = 4.976$ nm, $n = 1.4788$), DOPC ($d = 3.992$ nm, $n =$

Table 3. Thickness (d) and Refractive Index (n_{670}) Obtained from the SPR Analysis in 0.15 M NaCl for the Liposome Layer Deposited on Streptavidin and for the Resulting Lipid Layers after Injection of Mono-RLs and Triton X-100 (1%)^a

layer	d (nm)	n_{670}
liposomes (III)	79.61 ± 6.74	1.35270 ± 0.00122
lipid bilayer (IV)	5.60 ± 0.01	1.44941 ± 0.00042
lipid monolayer (V)	2.30 ± 0.43	1.41931 ± 0.00033

^aThe calculated values represent the average (\pm SD) of three independent measurements.

1.456) and DMPC ($d = 4.980$ nm, $n = 1.4810$),³⁵ and HSPC ($d \sim 6$ nm, $n = 1.404$).⁸

The injection of Triton X-100 (1%) on layer IV left a thin layer V on streptavidin whose calculated thickness was 2.3 nm. According to the literature studies,^{8,13,40} this value is comparable to the thickness of a lipid monolayer. This layer corresponds to biotinylated lipids (DSPE-PEG) that remained attached to streptavidin due to the high strength of the biotin-streptavidin interaction.

Thanks to the theoretical modeling and calculation of the optical parameters of the layers, we were able to estimate the quantity of lipids grafted on the SPR gold chip after the interaction of the liposomes with mono-RLs and Triton X-100 (1%). This study was achieved in order to better understand the effect of the lytic mode of action of the mono-RLs against the lipids contained in the liposome layer immobilized on streptavidin. The surface mass densities of lipids bound to the surface of the SPR gold chip were calculated for the three layers (III, IV, and V) using eq 3 and the theoretical values obtained in Table 3. Hence, the surface mass densities of lipids were $\Gamma(\text{III}) \sim 1226$ ng cm^{-2} for the immobilized liposome layer, then $\Gamma(\text{IV}) \sim 490$ ng cm^{-2} for the lipid bilayer, and finally $\Gamma(\text{V}) \sim 150$ ng cm^{-2} for the amount of lipids remaining on the streptavidin layer.

The surface mass density of lipids calculated for state III corresponds to a monolayer of liposomes as described in the literature (surface mass density $\Gamma = 1557.64$ ng cm^{-2} for liposomes with a diameter of 86.63 nm).²³ In our case, this mass corresponds to 1.32×10^{10} liposomes per cm^{-2} . This value can be compared to the theoretical maximum number of spheres of 80 nm diameter deposited on a surface as the geometric prediction of a densely packed monolayer of spheres (1.8×10^{10} nanosphere cm^{-2}) and calculated with eq S2. The lipid mass calculated in our case confirms that we have developed a dense layer of liposomes on the sensor surface. The slightly lower coverage rate compared to the theoretical value can be explained by the fact that deposition in the aqueous phase is strongly impacted by the hydrodynamic diameter and surface nature (negative charge and presence of biotin arms) of the lipidic vesicles.

The lipid mass observed after the interaction with mono-RLs (state IV) is expected to be a single lipid bilayer, as the calculated mass is comparable to values from previously published measurements.^{36,48}

The present SPR device can be used as a sensitive biosensor for mono-RL detection because the interaction with a layer of immobilized liposomes was highly dependent on the concentration. Increasing the mono-RL concentration up to 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ led to a decrease in the θ_{SPR} . Starting from the minimum angular value of the liposome layer, a $\Delta\theta_c$ increase from 0.015 to 0.47° (absolute values) was observed after

injection of mono-RLs from 2 to 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The $\Delta\theta_c$ shift indicates that the liposome-coated SPR chip detects mono-RLs even at low concentrations. Based on these results, we experimentally determined the mono-RL detection limit at 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($\sim 3 \mu\text{M}$). The detection threshold was established as three times the SD of the SPR angle measurement recorded from three independent injections of NaCl 0.15 M solution ($\Delta\theta_c$ threshold: 0.005°). The sensitivity range of the method corresponds well to the concentrations of rhamnolipids that have been detected in the sputum of patients with acute *P. aeruginosa* infection (~ 1 to $10 \mu\text{g mL}^{-1}$).⁴⁹ The sensorgram also shows that the SPR chip was able to respond immediately and continuously, indicating the ability of liposomes to monitor the presence of mono-RLs in real time (Figure 7).

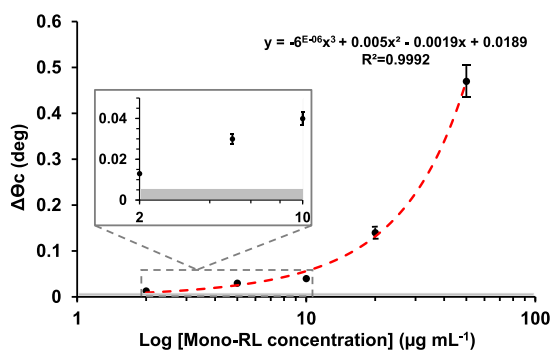


Figure 7. Cumulated $\Delta\theta_c$ (absolute values) versus different concentrations of mono-RLs onto the liposome-coated SPR chip (average values of two experiments).

Our SPR chip showed good analytical performance in terms of sensitivity compared to previous studies describing other methods for RL detection. Indeed, the liposome-based fluorescence assay developed by Jenkins' group was able to detect certain toxins such as RLs with a limit of detection (LoD) of $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.⁴⁴ The fluorescence signal of the assay showed a nonlinear response versus RL concentration from 10 to $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ in solution. Jenkins' group also proved that RLs were detected in real samples of *P. aeruginosa* strains isolated from either chronic or acute infections.⁵⁰ This liposome-based fluorescence assay was recently validated for the detection of toxins associated with several bacteria including *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida auris*, and *Enterococcus faecalis* species in wound samples. A good correlation was demonstrated between the fluorescent sensor switch-on and early-stage wound infection.⁵¹ A high performance liquid chromatography coupled to a charged-aerosol detection (HPLC-CAD) method was also developed by Behrens et al. with a LoD for RLs of $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.⁵² One can note that the LoD reached by this highly sensitive technique is close to that of the proposed MP-SPR technique in this work. Thus, our strategy based on the use of a biomimetic membrane coupled to a measurement by SPR appears to be a robust and sensitive analytical approach for the easy detection of biosurfactants such as RLs.

CONCLUSIONS

A biomimetic surface formed of liposomes grafted onto a gold substrate was developed for the study of interactions with biosurfactants by the MP-SPR method. First, we optimized the liposome anchoring on the SPR gold chip surface via a biotin/

streptavidin binding strategy in order to investigate their interactions with RLs. The SPR signal variation clearly illustrated the binding affinity and the formation of a very stable liposome layer on the streptavidin-functionalized surface, with high coverage. Monitoring the angular shifts proved to be reproducible from one experiment to another. We demonstrated the capacity of the MP-SPR technique to characterize the different states of the liposome architecture, i.e., from a monolayer of lipid vesicles to a single lipid bilayer induced by the interaction with mono-RLs and then a lipid monolayer resulting from Triton X-100 (1%) treatment. This assumption was proven theoretically by calculating the thickness (d) and refractive index (\bar{n}) of our multilayer system via SPR Navi LayerSolver software. The modeling of the experimental data was successful and the small difference observed was mainly attributed to gold surface roughness. In addition, we were able to calculate the surface mass density (Γ) of the lipid layers on the SPR chip surface after the interaction of liposomes with mono-RLs and Triton X-100 (1%) successively. The MP-SPR characterization method is generic and can be adapted to any multilayer system undergoing morphological and quantitative transformations during the adsorption of biomolecules on their surfaces. This analytical tool proved its high sensitivity for the detection of RLs, with a detection limit of $2 \mu\text{g mL}^{-1}$. Further studies are still needed to validate our method in real samples. On this point, it is important to note that although the test is probably not specific for the detection of rhamnolipids from *P. aeruginosa*, it may be of interest for the sensitive detection of bacterial toxins at the early stage of an infection. In summary, the use of MP-SPR and layer-by-layer modeling is a powerful combination to identify and quantify biomolecular layers deposited on a solid surface. This could open interesting perspectives to understand and study other mechanisms of interaction and transitions in membranes induced by biologically relevant processes such as membrane-interacting peptides or membrane-active drugs.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.langmuir.1c00846>.

Liposome concentration calculation (eq S1), theoretical maximum number of nanospheres deposited on a surface (eq S2), effect of Triton X-100 (1%) detergent on the SPR response (Figure S1), SPR full angle scans at the different steps of the SPR gold chip functionalization (Figure S2), compiled modeling results (Table S1), sensorgram of the mono-RL/liposome interaction (Figure S3), and measured and modeled SPR full angle scans of the liposome layer at 670 nm (Figure S4) (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Carole Chaix – CNRS, Claude Bernard Lyon 1 University, Institute of Analytical Sciences, University of Lyon, F-69100 Villeurbanne, France; orcid.org/0000-0003-4882-2364; Email: carole.chaix-bauvais@univ-lyon1.fr

Authors

Meryem Belkilani – CNRS, Claude Bernard Lyon 1 University, Institute of Analytical Sciences, University of Lyon, F-69100 Villeurbanne, France; ENSIT, University of Tunis, 1008 Tunis, Tunisia; INSAT, Research Unit of Nanobiotechnology and Valorisation of Medicinal Plants, University of Carthage, 1080 Charguia Cedex, Tunisia

Maryam Shokouhi – Department of chemistry, University of Isfahan, Isfahan 81746-73441, Iran

Carole Farre – CNRS, Claude Bernard Lyon 1 University, Institute of Analytical Sciences, University of Lyon, F-69100 Villeurbanne, France

Yves Chevalier – CNRS, Claude Bernard Lyon 1 University, University of Lyon, F-69622 Villeurbanne, France; orcid.org/0000-0002-7526-5658

Sylvain Minot – CNRS, Claude Bernard Lyon 1 University, Institute of Analytical Sciences, University of Lyon, F-69100 Villeurbanne, France

François Bessueille – CNRS, Claude Bernard Lyon 1 University, Institute of Analytical Sciences, University of Lyon, F-69100 Villeurbanne, France

Adnane Abdelghani – INSAT, Research Unit of Nanobiotechnology and Valorisation of Medicinal Plants, University of Carthage, 1080 Charguia Cedex, Tunisia

Nicole Jaffrezic-Renault – CNRS, Claude Bernard Lyon 1 University, Institute of Analytical Sciences, University of Lyon, F-69100 Villeurbanne, France; orcid.org/0000-0003-1354-9273

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acs.langmuir.1c00846>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the Tunisian government for financial support of M. B.s PhD thesis and the Institut de Chimie de Lyon (ICL) for funding support. The authors also acknowledge Pierre-Yves Dugas, C2P2 Laboratory, UMR CNRS 5128, Lyon 1 University, for the Cryo-TEM characterization of liposomes.

ABBREVIATIONS

Mono-RLtabmono-rhamnolipid
MP-SPRtabmultiparametric surface plasmon resonance
MUAtab11-mercaptoundecanoic acid
DLStabdynamical light scattering
PdItabpolydispersity index
Cryo-TEMtabcryo transmission electron microscopy
SAMtabself-assembled monolayers
SDtabstandard deviation
 θ_{SPR} tabSPR angular peak minimum

REFERENCES

- (1) Zulianello, L.; Canard, C.; Köhler, T.; Caille, D.; Lacroix, J.-S.; Meda, P. Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 3134–3147.
- (2) Santos, D.; Rufino, R.; Luna, J.; Santos, V.; Sarubbo, L. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 401.
- (3) Lebègue, E.; Farre, C.; Jose, C.; Saulnier, J.; Lagarde, F.; Chevalier, Y.; Chaix, C.; Jaffrezic-Renault, N. Responsive poly-

diacetylene vesicles for biosensing microorganisms. *Sensors* **2018**, *18*, 599.

(4) Lebègue, E.; Farre, C.; Jose, C.; Saulnier, J.; Lagarde, F.; Chevalier, Y.; Chaix, C.; Jaffrezic-Renault, N. Biomimetic vesicles for electrochemical sensing. *Curr. Opin. Electrochem.* **2018**, *12*, 101–106.

(5) Aranda, F. J.; Espuny, M. J.; Marqués, A.; Teruel, J. A.; Manresa, A.; Ortiz, A. Thermodynamics of the interaction of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* with phospholipid membranes. *Langmuir* **2007**, *23*, 2700–2705.

(6) Monnier, N.; Furlan, A.; Buchoux, S.; Deleu, M.; Dauchez, M.; Rippa, S.; Sarazin, C. Exploring the dual interaction of natural rhamnolipids with plant and fungal biomimetic plasma membranes through biophysical studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1009.

(7) Chen, M. L.; Penfold, J.; Thomas, R. K.; Smyth, T. J. P.; Perfumo, A.; Marchant, R.; Banat, I. M.; Stevenson, P.; Parry, A.; Tucker, L.; Grillo, I. Solution self-assembly and adsorption at the air–water interface of the monorhamnolipid and dirhamnolipid rhamnolipids and their mixtures. *Langmuir* **2010**, *26*, 18281–18292.

(8) Granqvist, N.; Liang, H.; Laurila, T.; Sadowski, J.; Yliperttula, M.; Viitala, T. Characterizing ultrathin and thick organic layers by surface plasmon resonance three-wavelength and waveguide mode analysis. *Langmuir* **2013**, *29*, 8561–8571.

(9) Kari, O. K.; Rojalín, T.; Salmaso, S.; Barattin, M.; Jarva, H.; Meri, S.; Yliperttula, M.; Viitala, T.; Urtti, A. Multi-parametric surface plasmon resonance platform for studying liposome-serum interactions and protein corona formation. *Drug Deliv. Trans. Res.* **2017**, *7*, 228–240.

(10) Plant, A. L.; Brighamburke, M.; Petrella, E. C.; Oshannessy, D. J. Phospholipid/alkanethiol bilayers for cell-surface receptor studies by surface plasmon resonance. *Anal. Biochem.* **1995**, *226*, 342–348.

(11) Keller, C. A.; Glasmästar, K.; Zhdanov, V. P.; Kasemo, B. Formation of supported membranes from vesicles. *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *84*, 5443.

(12) Reimhult, E.; Zäch, M.; Hök, F.; Kasemo, B. A multitechnique study of liposome adsorption on Au and lipid bilayer formation on SiO₂. *Langmuir* **2006**, *22*, 3313–3319.

(13) Granqvist, N.; Yliperttula, M.; Välimäki, S.; Pulkkinen, P.; Tenhu, H.; Viitala, T. Control of the morphology of lipid layers by substrate surface chemistry. *Langmuir* **2014**, *30*, 2799–2809.

(14) Fenzl, C.; Hirsch, T.; Baeumner, A. J. Liposomes with high refractive index encapsulants as tunable signal amplification tools in surface plasmon resonance spectroscopy. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 11157–11163.

(15) Fenzl, C.; Genslein, C.; Domonkos, C.; Edwards, K. A.; Hirsch, T.; Baeumner, A. J. Investigating non-specific binding to chemically engineered sensor surfaces using liposomes as models. *Analyst* **2016**, *141*, 5265–5273.

(16) Sacconi, A.; Tadani-Buoninsegni, F.; Tiribilli, B.; Margheri, G. A Comparative Study of Phosphatidylcholine versus Phosphatidylserine-Based Solid Supported Membranes for the Preparation of Liposome-Rich Interfaces. *Langmuir* **2018**, *34*, 12183–12190.

(17) Xiang, Y.; Kiseleva, R.; Reukov, V.; Mulligan, J.; Atkinson, C.; Schlosser, R.; Vertegel, A. Relationship between targeting efficacy of liposomes and the dosage of targeting antibody using surface plasmon resonance. *Langmuir* **2015**, *31*, 12177–12186.

(18) Parkkila, P.; Viitala, T. Partitioning of Catechol Derivatives in Lipid Membranes: Implications for Substrate Specificity to Catechol-O-methyltransferase. *ACS Chem. Neurosci.* **2020**, *11*, 969–978.

(19) Baird, C. L.; Courtenay, E. S.; Myszk, D. G. Surface plasmon resonance characterization of drug/liposome interactions. *Anal. Biochem.* **2002**, *310*, 93–99.

(20) Mozzolits, H.; Aguilar, M. I. Surface plasmon resonance spectroscopy: an emerging tool for the study of peptide–membrane interactions. *Pept. Sci.: Origin. Res. Biomol.* **2002**, *66*, 3–18.

(21) Skyttner, C.; Enander, K.; Aronsson, C.; Aili, D. Tuning Liposome Membrane Permeability by Competitive Coiled Coil Heterodimerization and Heterodimer Exchange. *Langmuir* **2018**, *34*, 6529–6537.

- (22) Beseničar, M.; Maček, P.; Lakey, J. H.; Anderluh, G. Surface plasmon resonance in protein–membrane interactions. *Chem. Phys. Lipids* **2006**, *141*, 169–178.
- (23) Kari, O. K.; Ndika, J.; Parkkila, P.; Louna, A.; Lajunen, T.; Puustinen, A.; Viitala, T.; Alenius, H.; Urtti, A. In situ analysis of liposome hard and soft protein corona structure and composition in a single label-free workflow. *Nanoscale* **2020**, *12*, 1728–1741.
- (24) Coutable, A.; Thibault, C.; Chalmeau, J.; François, J. M.; Vieu, C.; Noireaux, V.; Trévisiol, E. Preparation of tethered-lipid bilayers on gold surfaces for the incorporation of integral membrane proteins synthesized by cell-free expression. *Langmuir* **2014**, *30*, 3132–3141.
- (25) Palacios-Ortega, J.; García-Linares, S.; Åstrand, M.; al Sazzad, M. A.; Gavilanes, J. G.; Martínez-del-Pozo, A.; Slotte, J. P. Regulation of Sticholysin II-Induced Pore Formation by Lipid Bilayer Composition, Phase State, and Interfacial Properties. *Langmuir* **2016**, *32*, 3476–3484.
- (26) Herzog, M.; Tiso, T.; Blank, L. M.; Winter, R. Interaction of rhamnolipids with model biomembranes of varying complexity. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2020**, 1862, No. 183431.
- (27) Zhao, Y.; Du, D.; Lin, Y. Glucose encapsulating liposome for signal amplification for quantitative detection of biomarkers with glucometer readout. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *72*, 348–354.
- (28) Baccar, H.; Mejri, M. B.; Hafaiedh, I.; Ktari, T.; Aouni, M.; Abdelghani, A. Surface plasmon resonance immunosensor for bacteria detection. *Talanta* **2010**, *82*, 810–814.
- (29) Albers, W. M.; Vikholm-Lundin, I. Surface plasmon resonance on nanoscale organic films. In *Nano-Bio-Sensing*; Springer, 2011, pp. 83–125, DOI: 10.1007/978-1-4419-6169-3_4.
- (30) Parkkila, P.; Elderdfi, M.; Bunker, A.; Viitala, T. Biophysical characterization of supported lipid bilayers using parallel dual-wavelength surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance measurements. *Langmuir* **2018**, *34*, 8081–8091.
- (31) Peterlinz, K. A.; Georgiadis, R. Two-color approach for determination of thickness and dielectric constant of thin films using surface plasmon resonance spectroscopy. *Opt. Commun.* **1996**, *130*, 260–266.
- (32) Zhou, M.; Otomo, A.; Yokoyama, S.; Mashiko, S. Estimation of organic molecular film structures using surface–plasmon resonance spectroscopy. *Thin Solid Films* **2001**, *393*, 114–118.
- (33) Viitala, T.; Granqvist, N.; Hallila, S.; Raviña, M.; Yliperttula, M. Elucidating the signal responses of multi-parametric surface plasmon resonance living cell sensing: a comparison between optical modeling and drug–MDCKII cell interaction measurements. *PLoS One* **2013**, *8*, No. e72192.
- (34) Chattoraj, D. K.; Birdi, K. S. *Adsorption and the Gibbs surface excess*, 1st ed.; Springer: Boston, 1984, DOI: 10.1007/978-1-4615-8333-2.
- (35) Mashaghi, A.; Swann, M.; Popplewell, J.; Textor, M.; Reimhult, E. Optical anisotropy of supported lipid structures probed by waveguide spectroscopy and its application to study of supported lipid bilayer formation kinetics. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 3666–3676.
- (36) Ye, Q.; Konradi, R.; Textor, M.; Reimhult, E. Liposomes tethered to omega-functional PEG brushes and induced formation of PEG brush supported planar lipid bilayers. *Langmuir* **2009**, *25*, 13534–13539.
- (37) Haes, A. J.; Van Duyne, R. P. A nanoscale optical biosensor: sensitivity and selectivity of an approach based on the localized surface plasmon resonance spectroscopy of triangular silver nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10596–10604.
- (38) Baba, A.; Taranekar, P.; Ponnappati, R. R.; Knoll, W.; Advincula, R. C. Electrochemical surface plasmon resonance and waveguide-enhanced glucose biosensing with N-alkylaminated polypyrrole/glucose oxidase multilayers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2010**, *2*, 2347–2354.
- (39) Damos, F. S.; Luz, R. C. S.; Kubota, L. T. Determination of thickness, dielectric constant of thiol films, and kinetics of adsorption using surface plasmon resonance. *Langmuir* **2005**, *21*, 602–609.
- (40) Schmidt, A.; Spinke, J.; Bayerl, T.; Sackmann, E.; Knoll, W. Streptavidin binding to biotinylated lipid layers on solid supports. A neutron reflection and surface plasmon optical study. *Biophys. J.* **1992**, *63*, 1385–1392.
- (41) Dolci, M.; Bryche, J.-F.; Leuvrey, C.; Zafeiratos, S.; Gree, S.; Begin-Colin, S.; Barbillon, G.; Pichon, B. P. Robust clicked assembly based on iron oxide nanoparticles for a new type of SPR biosensor. *J. Mater. Chem. C* **2018**, *6*, 9102–9110.
- (42) Hall, D. Chapter 4. Kinetic models describing biomolecular interactions at surfaces. In *Handbook of Surface Plasmon Resonance*; Royal Society of Chemistry Cambridge, 2008, pp. 81–122.
- (43) Moussa, Z.; Chebl, M.; Patra, D. Interaction of curcumin with 1, 2-dioctadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine liposomes: Intercalation of rhamnolipids enhances membrane fluidity, permeability and stability of drug molecule. *Colloids Surf., B* **2017**, *149*, 30–37.
- (44) Thet, N. T.; Jamieson, W. D.; Laabei, M.; Mercer-Chalmers, J. D.; Jenkins, A. T. A. Photopolymerization of polydiacetylene in hybrid liposomes: effect of polymerization on stability and response to pathogenic bacterial toxins. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 5418–5427.
- (45) Guo, Y.-P.; Hu, Y.-Y. Solubilization of moderately hydrophobic 17 α -ethinylestradiol by mono- and di-rhamnolipid solutions. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2014**, *445*, 12–20.
- (46) Guo, Y.-P.; Hu, Y.-Y.; Gu, R. R.; Lin, H. Characterization and micellization of rhamnolipidic fractions and crude extracts produced by *Pseudomonas aeruginosa* mutant MIG-N146. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *331*, 356–363.
- (47) Eismín, R. J.; Munusamy, E.; Kegel, L. L.; Hogan, D. E.; Maier, R. M.; Schwartz, S. D.; Pemberton, J. E. Evolution of aggregate structure in solutions of anionic monorhamnolipids: Experimental and computational Results. *Langmuir* **2017**, *33*, 7412–7424.
- (48) Reimhult, E.; Larsson, C.; Kasemo, B.; Hök, F. Simultaneous surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance with dissipation monitoring measurements of biomolecular adsorption events involving structural transformations and variations in coupled water. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 7211–7220.
- (49) Kownatzki, R.; Tümmeler, B.; Döring, G. Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. *Lancet* **1987**, *1*, 1026–1027.
- (50) Laabei, M.; Jamieson, W. D.; Lewis, S. E.; Diggle, S. P.; Jenkins, A. T. A. A new assay for rhamnolipid detection—important virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 7199–7209.
- (51) Thet, N. T.; Mercer-Chalmers, J.; Greenwood, R. J.; Young, A. E. R.; Coy, K.; Booth, S.; Sack, A.; Jenkins, A. T. SPaCE Swab: Point-of-Care Sensor for Simple and Rapid Detection of Acute Wound Infection. *ACS Sensors* **2020**, *5*, 2652–2657.
- (52) Behrens, B.; Baune, M.; Jungkeit, J.; Tiso, T.; Blank, L. M.; Hayen, H. High performance liquid chromatography-charged aerosol detection applying an inverse gradient for quantification of rhamnolipid biosurfactants. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1455*, 125–132.

Supporting Information

SPR monitoring of mono-Rhamnolipid interaction with phospholipid-based liposomes

*Meryem Belkilani, Maryam Shokouhi, Carole Farre, Yves Chevalier, Sylvain Minot, François Bessueille, Adnane Abdelghani, Nicole Jaffrezic-Renault, Carole Chaix**

Liposome concentration

As the hydrodynamic diameter of the vesicles was known, the total number of liposome vesicles present in the suspension was calculated using the following relationship:

$$N_{lipo} = \frac{m \times a_0 \times N}{2 \times 4\pi r^2 \times M} \quad (S1)$$

where m is the phospholipid mass, r is the hydrodynamic radius ($r = \frac{d}{2}$ with d being the hydrodynamic diameter of the liposomes), $4\pi r^2$ represents the surface area of a liposome vesicle, a_0 is the surface area of a phospholipid which is equal to $5.7 \times 10^{-19} \text{ m}^2$, M is the molar mass of phospholipids ($790.161 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) and N is Avogadro's number. The concentration of liposomes C_l was then obtained by dividing the total number of liposomes (N_{lipo}) by the volume of suspension V which has a value of 25 mL, giving $2.5 \times 10^{14} \text{ lipo mL}^{-1}$.

Theoretical maximum number of nanospheres deposited on a surface of 1 cm^2

$$N_{\text{nanosphere}} = \frac{\frac{\pi}{2 \times \sqrt{3}}}{\pi \times r^2} = \frac{1}{2 \times \sqrt{3} \times r^2} \quad (S2)$$

Where r is the radius of a nanosphere

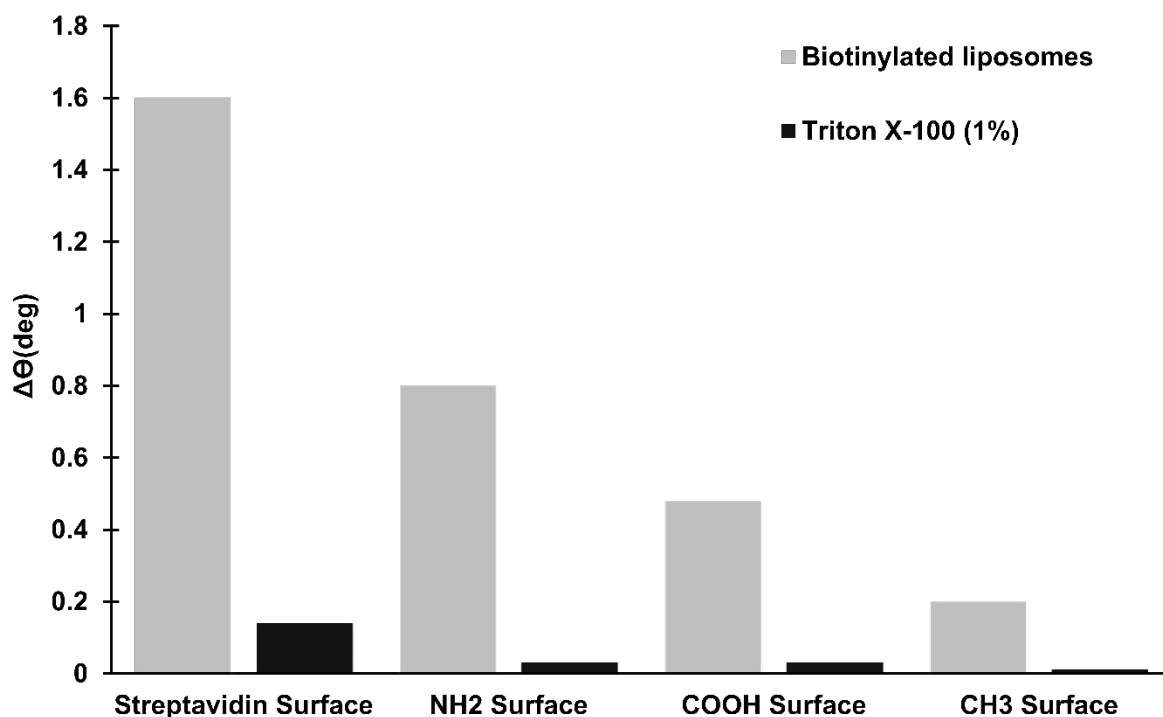


Figure S1. Grey bars: The angular shifts of the resonance in SPR measurements at 670 nm induced by the interaction of biotinylated liposome with $-\text{CH}_3$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$ SAM and with streptavidin modified gold surfaces at 5×10^{12} lipo mL^{-1} liposome concentration. Black bars: Effect of Triton X-100 (1 %) detergent on the SPR response on the four functionalized surfaces.

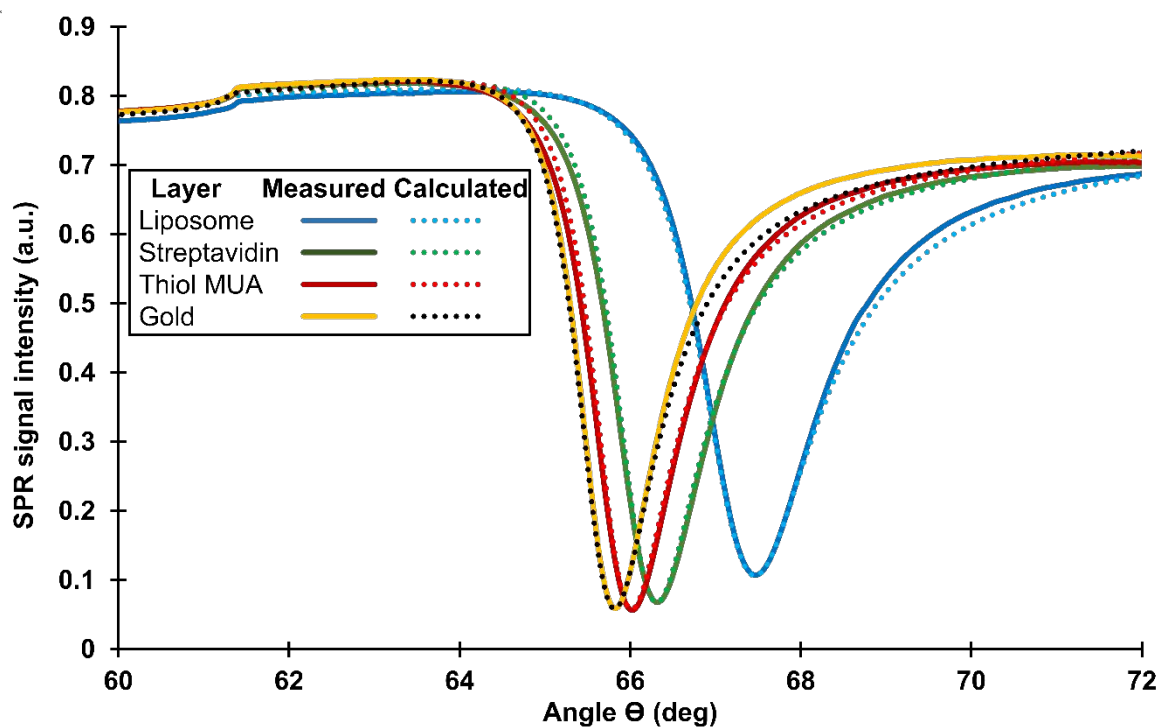


Figure S2. SPR full angle scans at the different steps of the SPR gold chip functionalization: gold layer (yellow line), 11-mercaptoundecanoic acid layer (red line), streptavidin layer (green line) and 1×10^{14} lipo mL^{-1} liposome layer (blue line), with corresponding fits (dashed lines) from LayerSolver modeling of individual SPR chip layers using the full SPR angular spectra measured at 785 nm wavelength.

Table S1. The compiled modeling results of separate experiments for the different layers of three similarly functionalized SPR gold chips. The calculated values are low and high limits for layer thickness (d) with the corresponding complex refractive index values (\tilde{n}) from three independent measurements and their average value (\pm standard deviation).

		d (nm)	n_{670}	k_{670}	n_{785}	k_{785}
Chromium adhesion layer	1	1.64	3.48907	4.20862	4.24196	3.67297
	2	1.52	3.52950	4.28711	3.97290	4.66136
	3	1.62	3.51524	4.01517	3.92360	4.41747
	Average Value \pm SD	1.6 \pm 0.06	3.51127 \pm 0.02050	4.17030 \pm 0.13996	4.04615 \pm 0.17135	4.25060 \pm 0.51489
Gold layer	1	55.00	0.19597	3.86388	0.20098	4.77923
	2	54.96	0.19610	3.86296	0.19261	4.77855
	3	54.98	0.19629	3.86374	0.19284	4.77985
	Average Value \pm SD	54.98 \pm 0.02	0.19612 \pm 0.00016	3.86352 \pm 0.00049	0.19548 \pm 0.00477	4.77921 \pm 0.00065
Thiol MUA layer	1	1.40	1.44180	0.00000	1.43971	0.00000
	2	1.56	1.45120	0.00000	1.42900	0.00000
	3	1.55	1.42393	0.00000	1.41235	0.00000
	Average Value \pm SD	1.50 \pm 0.08	1.43897 \pm 0.01385	0.00000	1.42702 \pm 0.01378	0.00000
Streptavidin layer	1	2.37	1.42826	0.00000	1.42596	0.00000
	2	2.77	1.40641	0.00000	1.40411	0.00000
	3	3.00	1.41471	0.00000	1.41241	0.00000
	Average \pm SD	2.71 \pm 0.31	1.41646 \pm 0.01102	0.00000	1.41416 \pm 0.01102	0.00000
Liposome layer	1	76.49	1.35321	0.00000	1.35148	0.00000
	2	87.36	1.35131	0.00000	1.34958	0.00000
	3	75.00	1.35360	0.00000	1.35199	0.00000
	Average \pm SD	79.61 \pm 6.74	1.35270 \pm 0.00122	0.00000	1.35102 \pm 0.00126	0.00000

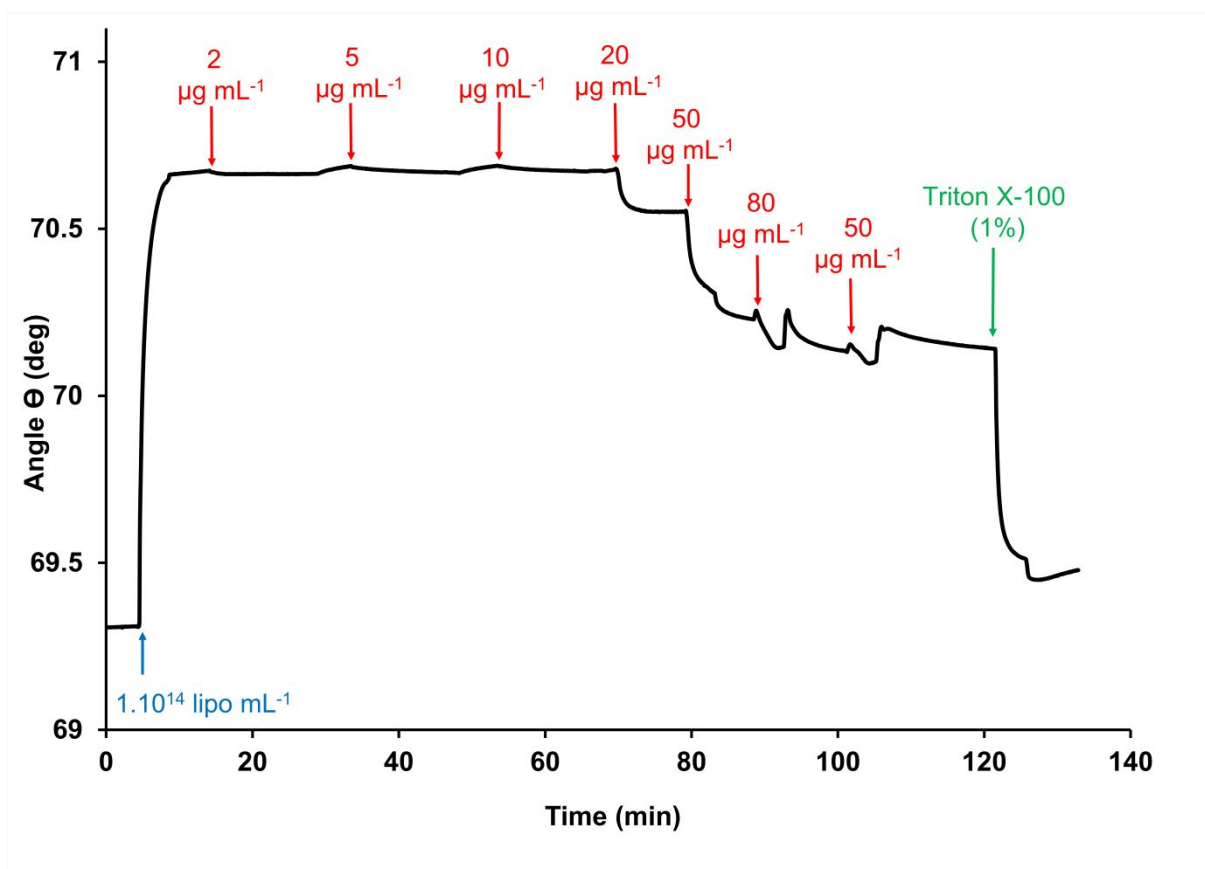


Figure S3. Sensorgram of the SPR angle versus time, measured at the wavelength of 670 nm, during the interaction of mono-RLs with liposomes.

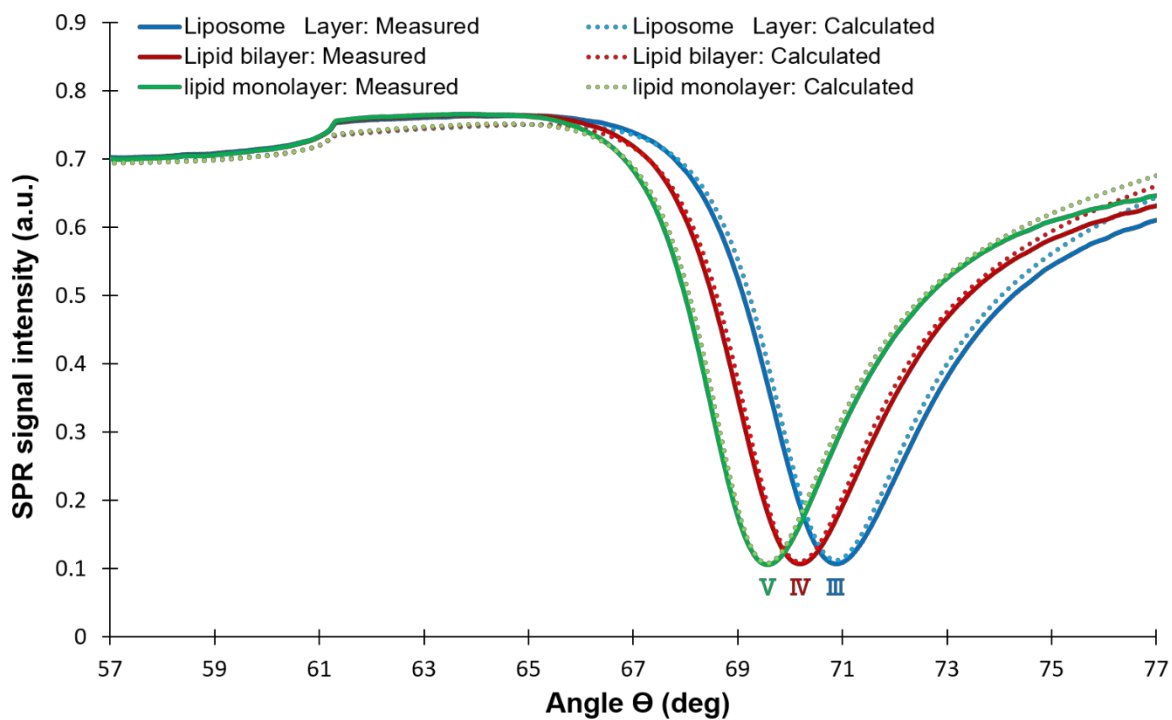


Figure S4. Measured and modeled SPR full angle scans of the liposome layer before and after interaction with mono-RLs and Triton X-100 (1 %), using the measured full SPR angular spectra at the wavelength of 670 nm. The SPR peak minimum shifts from the **III state which corresponds to the liposome immobilization to the **IV** state (lipid bilayer) and then the **V** state (biotinylated lipid monolayer).**

VII. Conclusion

Dans ce travail, nous avons considéré une surface biomimétique formée de liposomes greffés sur un substrat d'or pour l'étude des interactions avec un biosurfactant par la méthode MP-SPR. Le mono-rhamnolipide produit par *Pseudomonas aeruginosa* a été choisi comme biosurfactant pour cette étude. Dans un premier temps, nous avons optimisé l'ancrage des liposomes sur la surface de la puce d'or via une stratégie de liaison biotine/streptavidine afin d'étudier les interactions avec le mono-RL. La variation du signal SPR a clairement illustré l'affinité de liaison et la formation d'une couche dense et très stable de liposomes sur la surface fonctionnalisée par la streptavidine. Le suivi des décalages angulaires s'est avéré reproductible d'une expérience à l'autre. Nous avons démontré la capacité de la technique MP-SPR à caractériser les différents états de l'architecture des liposomes, c'est-à-dire d'une monocouche de vésicules lipidiques à une bicouche lipidique unique, induits par l'interaction avec le mono-RL et ensuite une monocouche lipidique résultant d'un traitement au Triton X-100 (1%). Ces hypothèses de structure ont été validées théoriquement en calculant l'épaisseur (d) et l'indice de réfraction (n) de notre système multicouche. La modélisation des données expérimentales a été effectuée avec succès. En outre, nous avons été en mesure de calculer la densité de masse surfacique (Γ) des couches lipidiques sur la surface de la puce SPR après interaction des liposomes avec le mono-RL puis le Triton X-100 (1%). Durant cette étude, nous avons pu mettre en évidence l'intérêt de caractériser les surfaces par la méthode MP-SPR. Cette technique est générique et peut être adaptée à tout système multicouche subissant des transformations morphologiques quantitatives pendant l'adsorption de biomolécules à leur surface. Cet outil analytique a prouvé sa haute sensibilité pour la détection des mono-RLs, avec une limite de détection de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$. D'autres études sont encore nécessaires pour valider notre méthode dans des échantillons réels. Sur ce point, il est important de noter que, bien que le test ne soit probablement pas spécifique pour la détection des rhamnolipides de *P.aeruginosa*, il peut être intéressant pour la détection sensible de toxines bactériennes au stade précoce d'une infection. En résumé, l'utilisation de la méthode MP-SPR et de la modélisation couche par couche est une combinaison puissante pour identifier et quantifier les couches biomoléculaires déposées sur une surface solide. Cela pourrait ouvrir des perspectives intéressantes pour comprendre et étudier d'autres mécanismes d'interaction et de transition dans les membranes induites par des processus biologiquement pertinents tels que des peptides interagissant avec les membranes ou des médicaments actifs sur les membranes.

Références

- [1] Köhler, T., Guanella, R., Carlet, J., & Van Delden, C. (2010). Quorum sensing-dependent virulence during *Pseudomonas aeruginosa* colonisation and pneumonia in mechanically ventilated patients. *Thorax*, 65(8), 703-710.
- [2] Zulianello, L., Canard, C., Köhler, T., Caille, D., Lacroix, J. S., & Meda, P. (2006). Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity*, 74(6), 3134-3147.
- [3] Gerstel, U., Czapp, M., Bartels, J., & Schröder, J. M. (2009). Rhamnolipid-induced shedding of flagellin from *Pseudomonas aeruginosa* provokes hBD-2 and IL-8 response in human keratinocytes. *Cellular microbiology*, 11(5), 842-853.
- [4] Read, R. C., Roberts, P. H. I. L. I. P. P. A., Munro, N. E. I. L., Rutman, A. N. D. R. E. W., Hastie, A., Shryock, T., ... & Taylor, G. R. A. H. A. M. (1992). Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. *Journal of Applied Physiology*, 72(6), 2271-2277.
- [5] Alarcon, I., Kwan, L., Yu, C., Evans, D. J., & Fleiszig, S. M. (2009). Role of the corneal epithelial basement membrane in ocular defense against *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity*, 77(8), 3264-3271.
- [6] Zhu, H., Bandara, R., Conibear, T. C., Thuruthyil, S. J., Rice, S. A., Kjelleberg, S., ... & Willcox, M. D. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* with lasI quorum-sensing deficiency during corneal infection. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(6), 1897-1903.
- [7] Aranda, F. J., Espuny, M. J., Marqués, A., Teruel, J. A., Manresa, Á., & Ortiz, A. (2007). Thermodynamics of the interaction of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* with phospholipid membranes. *Langmuir*, 23(5), 2700-2705.
- [8] Monnier, N., Furlan, A. L., Buchoux, S., Deleu, M., Dauchez, M., Rippa, S., & Sarazin, C. (2019). Exploring the dual interaction of natural rhamnolipids with plant and fungal biomimetic plasma membranes through biophysical studies. *International journal of molecular sciences*, 20(5), 1009.
- [9] Howe, J., Bauer, J., Andrä, J., Schromm, A. B., Ernst, M., Rössle, M., ... & Brandenburg, K. (2006). Biophysical characterization of synthetic rhamnolipids. *The FEBS journal*, 273(22), 5101-5112.
- [10] Nitschke, M., Costa, S. G., & Contiero, J. (2005). Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnology Progress*, 21(6), 1593-1600.
- [11] Andrä, J., Rademann, J., Howe, J., Koch, M. H., Heine, H., Zähringer, U., & Brandenburg, K. (2006). Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia (Pseudomonas) plantarii*: immune cell stimulation and biophysical characterization.

- [12] Chen, M. L., Penfold, J., Thomas, R. K., Smyth, T. J. P., Perfumo, A., Marchant, R., ... & Grillo, I. (2010). Solution self-assembly and adsorption at the air– water interface of the monorhamnose and dirhamnose rhamnolipids and their mixtures. *Langmuir*, 26(23), 18281-18292.
- [13] Herzog, M., Tiso, T., Blank, L. M., & Winter, R. (2020). Interaction of rhamnolipids with model biomembranes of varying complexity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1862(11), 183431.
- [14] Damos, F. S., Luz, R. C., & Kubota, L. T. (2005). Determination of thickness, dielectric constant of thiol films, and kinetics of adsorption using surface plasmon resonance. *Langmuir*, 21(2), 602-609.
- [15] Schmidt, A., Spinke, J., Bayerl, T., Sackmann, E., & Knoll, W. (1992). Streptavidin binding to biotinylated lipid layers on solid supports. A neutron reflection and surface plasmon optical study. *Biophysical journal*, 63(5), 1385-1392.
- [16] Dolci, M., Bryche, J. F., Leuvre, C., Zafeiratos, S., Gree, S., Begin-Colin, S., ... & Pichon, B. P. (2018). Robust clicked assembly based on iron oxide nanoparticles for a new type of SPR biosensor. *Journal of Materials Chemistry C*, 6(34), 9102-9110.
- [17] Guo, Y. P., & Hu, Y. Y. (2014). Solubilization of moderately hydrophobic 17 α -ethinylestradiol by mono- and di-rhamnolipid solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 445, 12-20.
- [18] Guo, Y. P., Hu, Y. Y., Gu, R. R., & Lin, H. (2009). Characterization and micellization of rhamnolipidic fractions and crude extracts produced by *Pseudomonas aeruginosa* mutant MIG-N146. *Journal of Colloid and Interface Science*, 331(2), 356-363.
- [19] Eismin, R. J., Munusamy, E., Kegel, L. L., Hogan, D. E., Maier, R. M., Schwartz, S. D., & Pemberton, J. E. (2017). Evolution of aggregate structure in solutions of anionic monorhamnolipids: Experimental and computational results. *Langmuir*, 33(30), 7412-7424.
- [20] Kari, O. K., Ndika, J., Parkkila, P., Louna, A., Lajunen, T., Puustinen, A., ... & Urtti, A. (2020). In situ analysis of liposome hard and soft protein corona structure and composition in a single label-free workflow. *Nanoscale*, 12(3), 1728-1741.
- [21] Ye, Q., Konradi, R., Textor, M., & Reimhult, E. (2009). Liposomes tethered to omega-functional PEG brushes and induced formation of PEG brush supported planar lipid bilayers. *Langmuir*, 25(23), 13534-13539.
- [22] Reimhult, E., Larsson, C., Kasemo, B., & Höök, F. (2004). Simultaneous surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance with dissipation monitoring measurements of biomolecular adsorption events involving structural transformations and variations in coupled water. *Analytical chemistry*, 76(24), 7211-7220.

*Chapitre IV : Mécanismes d'interaction du
peptide HA2 du virus de la grippe et du
peptide bradykinine avec des liposomes par
MP-SPR*

I. Introduction

Les interactions peptide-membrane jouent un rôle critique dans de nombreux processus biologiques qui se produisent au niveau cellulaire, parmi lesquels on peut citer les mécanismes d'infections virales, l'action des toxines bactériennes de nature peptidique, des peptides antimicrobiens, cytotoxiques ou encore peptides de pénétration cellulaire, et également l'interaction des hormones peptidiques avec les récepteurs membranaires [1, 2]. La caractéristique structurelle commune des peptides est l'adoption d'une structure secondaire stable lors de la liaison à la surface de la membrane. Dans ce chapitre, nous avons choisi d'étudier l'interaction de deux peptides qui présentent une structure secondaire différente lors de leur association avec une membrane biomimétique. À cet égard, les surfaces recouvertes de liposomes sont d'excellents systèmes biomimétiques en raison de leur structure similaire à celle des membranes cellulaires et d'autres barrières biologiques constituées principalement de phospholipides. Nous avons ainsi utilisé ces surfaces pour étudier leur interaction avec le peptide HA2 issu de la protéine hémagglutinine du virus de la grippe et le peptide bradykinine (BK) qui est une hormone peptidique.

Chaque hiver, les épidémies de grippe touchent des millions de personnes. Le virus Influenza est la cause de cette infection dont les symptômes ont déjà été ressentis par la grande majorité de la population mondiale [3]. Ce virus attaque particulièrement les cellules du système respiratoire. Un taux de mortalité particulièrement élevé a été enregistré lors de certaines pandémies du siècle dernier [4]. Le génome viral est constitué de 8 segments d'ARN enfermés sous la membrane virale. Chaque segment code pour une protéine bien déterminée. Parmi celles-ci, la protéine hémagglutinine (HA) est une glycoprotéine d'enveloppe localisée à la surface du virus de la grippe. Elle joue un rôle essentiel dans le mécanisme d'entrée du virus dans la cellule hôte. Cette protéine HA est constituée de deux sous-unités, HA1 et HA2 qui sont reliées par un pont disulfure. La sous unité HA1 contient le site de liaison de HA aux récepteurs de surface des cellules hôtes. La sous unité HA2 est protégée par HA1. La sous unité HA2 est responsable de la fusion membranaire et permet l'ancrage de HA à la membrane virale. Elle comporte une courte séquence riche en résidus hydrophobes appelée peptide de fusion HA2 qui représente le peptide d'intérêt de cette étude (voir Figure 1). Ce peptide HA2 est une séquence de 20 acides aminés dérivée de l'extrémité N terminale de la sous unité HA2 [5].

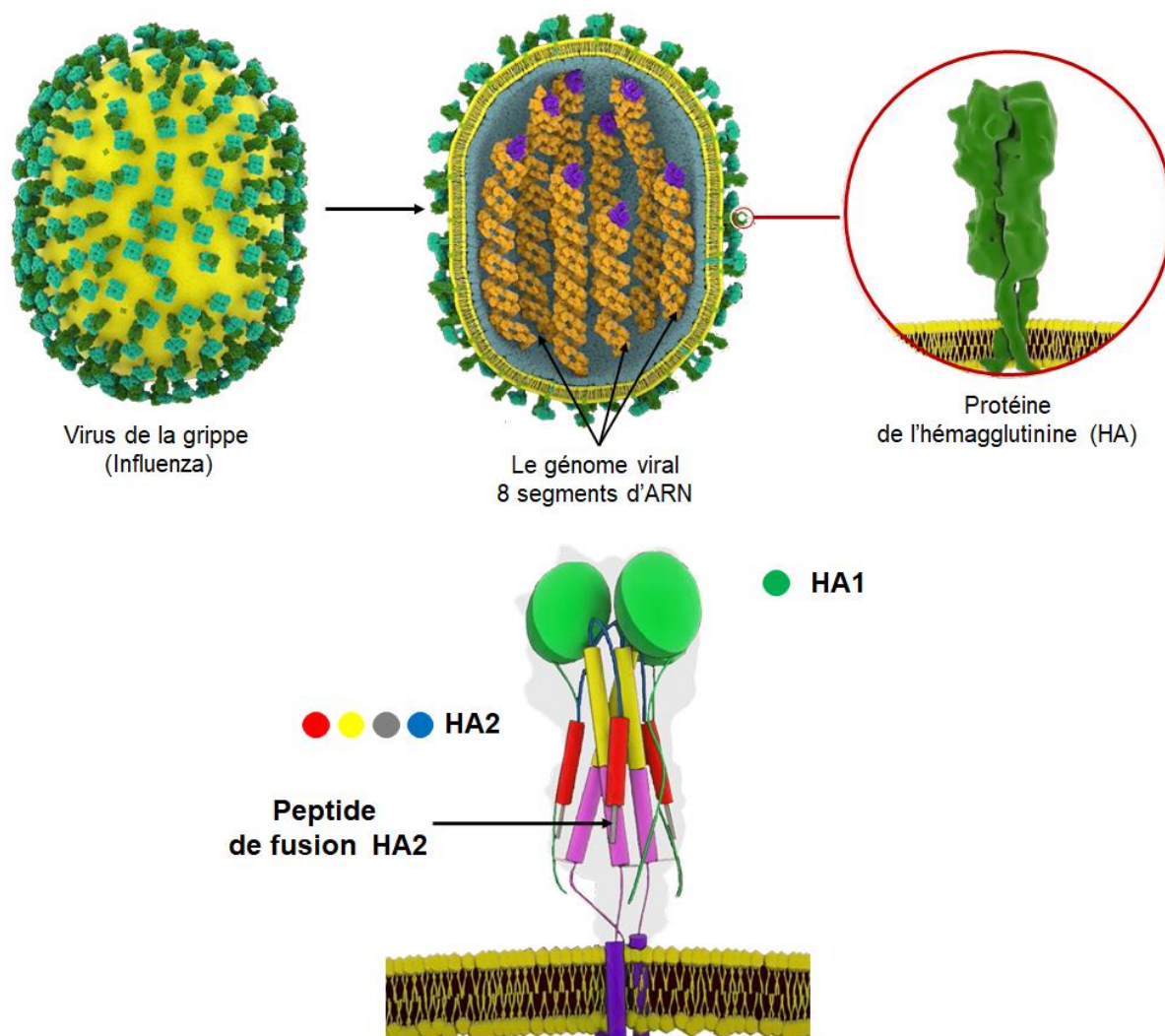


Figure 1. Constituants de la protéine hémagglutinine (HA) du virus de la grippe

Dans ce travail, nous avons étudié en premier lieu le peptide HA2 avec une glycine substituée par de l'acide glutamique en position 4 de la séquence de type sauvage. Une efficacité de fusion plus importante a été prouvée avec ce variant [6]. L'extrémité COOH a également été modifiée par l'ajout des acides aminés GGYC, comme décrit dans des travaux antérieurs [6]. Ce variant a été décrit par Wagner et *al.* comme un peptide interagissant fortement avec la membrane, à pH acide [7]. La séquence du peptide étudié est schématisée dans la Figure 2. Elle a été intitulée E4-GGYC tout au long de ce chapitre.

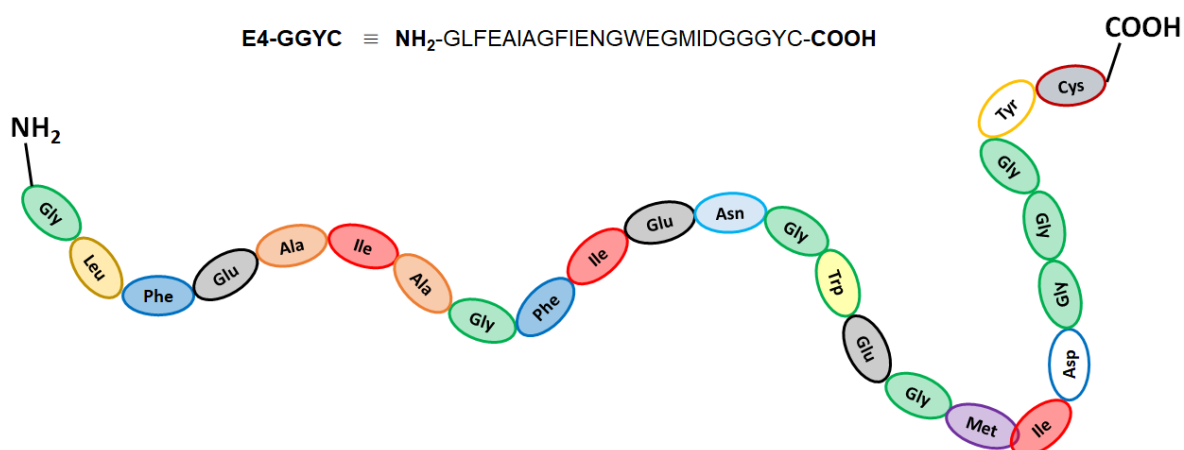


Figure 2. Séquence du peptide E4-GGYC dérivée de l'extrémité N de la deuxième sous-unité de l'hémagglutinine (HA2) du virus de la grippe

Au cours de l'infection, l'hémagglutinine du virus Influenza opère des réarrangements structuraux par acidification ($\text{pH} \leq 6$), qui permettent à sa séquence fusogène N-terminale de s'insérer dans la membrane endosomale cible [8]. Les études structurales réalisées sur le peptide HA2 ont montré qu'il adopte une conformation α -hélicoïdale pour déclencher la fusion [9]. Les trois acides glutamiques et l'acide aspartique du variant E4 sont protonés à faible pH, ce qui induit un changement de conformation en une conformation en hélice α rigide [6, 10]. Luneberg et *al.* ont étudié le mécanisme d'interaction du peptide HA2 avec des liposomes de phosphatidylcholine comme membrane modèle [11]. Les propriétés fusogènes du peptide HA2 résultent principalement de la structure amphipathique de l'hélice α , toutes les glycines de la séquence étant situées d'un côté de l'hélice, tandis que les résidus hydrophobes volumineux se trouvent du côté opposé de l'hélice [11]. Ils ont trouvé une insertion oblique du peptide dans la bicouche lipidique avec un angle d'environ 45° entre l'axe de l'hélice et le plan de la membrane en utilisant la spectroscopie FTIR. Cet angle était de 30° d'après les calculs théoriques d'une autre référence [12]. L'interaction de l'analogue AcE4K du peptide HA2 avec les liposomes SOPC a également été étudiée par Zhelev et *al.* Ils ont montré la répartition dans la membrane en fonction du pH et la réversibilité de la liaison par des expériences de dichroïsme circulaire et de fluorescence. Ils ont également émis l'hypothèse de la formation de pores au sein de la membrane à faible pH ($\text{pH} 4,0-4,5$), ce qui pourrait provoquer la fuite des solutés internalisés [10]. Les propriétés de perturbation membranaire du peptide HA2 ont été étudiées par un test de fuite des liposomes basé sur la libération de la calcéïne encapsulée dans les vésicules [6]. Le peptide a provoqué une telle fuite uniquement à un pH acide, entre 4,0 et 6,5.

Le deuxième peptide est le peptide bradykinine (BK) qui est une hormone peptidique produite par le clivage enzymatique de son précurseur protéique, le kininogène, lors d'une blessure ou d'un traumatisme tissulaire. La BK est décrite comme un puissant vasodilatateur et augmente la perméabilité vasculaire. Elle est impliquée dans de nombreux processus physiologiques tels que la contraction des muscles lisses des voies respiratoires et gastro-intestinales et de l'utérus, les stimuli de la douleur dans le système nerveux central, la réponse inflammatoire et les symptômes associés au rhume [13]. Elle est impliquée dans les complications vasculaires et respiratoires de la COVID-19 [14]. En solution aqueuse, la BK existe dans des états conformationnels de type random-coil. Le peptide subit des modifications conformationnelles lors de l'interaction avec son récepteur membranaire [15, 16]. Il est également rapporté que la BK interagit fortement avec les surfaces membranaires, modifiant potentiellement la structure de la membrane lipidique en augmentant l'emballage de la bicouche [13, 17]. Sa séquence est présentée dans la Figure 3.



Figure 3. Séquence du peptide de bradykinine (BK)

Afin de comprendre en détail les interactions peptide-membrane, plusieurs recherches ont été consacrées à l'étude de ces mécanismes d'interaction soit avec des bicouches lipidiques [18-21], ou avec des couches de liposomes intacts supportés par des substrats solides [22-24]. Ces études ont été réalisées par une grande variété de techniques biophysiques comme la résonance plasmonique de surface (SPR).

Ce chapitre est divisé en deux parties. La première partie la plus développée concerne l'étude de l'interaction du peptide HA2 avec une couche de liposomes supportés. La seconde partie présente en comparaison une étude de l'interaction d'un autre peptide, la BK, avec une couche de liposomes supportés. Nous rapportons le suivi en temps réel des interactions des peptides E4-GGYC et BK avec le substrat lipidique supporté en utilisant la résonance plasmonique de surface multiparamétrique à double longueur d'onde (MP-SPR). La surface biomimétique élaborée avec des liposomes dont le diamètre moyen < 100 nm, est bien adaptée pour étudier les interactions spécifiques avec les biomolécules comme dans le cas du chapitre précédent. Au cours de cette étude, plusieurs séries de sensorgrammes SPR ont été recueillies avec différentes concentrations de peptide E4-GGYC et BK interagissant avec des surfaces recouvertes de liposomes dans des milieux de pH différentes. L'étude de peptide E4-GGYC était plus

développée dans ce travail et les sensorgrammes ont été exploités afin d'étudier les interactions dynamiques exprimées en termes de constante de vitesse d'association (k_a), de constante de vitesse de dissociation (k_d) et de constante de dissociation à l'équilibre (K_D). Les spectres angulaires complets SPR correspondant à la couche de liposomes avant et après son exposition au peptide E4-GGYC ont été ajustés en utilisant la modélisation de la couche de Fresnel à double longueur d'onde avec le logiciel Layer SolverTM. Cette simulation théorique nous a permis d'estimer la variation de l'épaisseur moyenne (d), la variation de l'indice de réfraction (n), ainsi que la concentration de phospholipides (C_p) de la couche de liposomes.

Des informations complémentaires concernant les interactions entre les liposomes et E4-GGYC en solution ont été obtenues par diffusion dynamique de la lumière (DLS) et NanoSight (Nanoparticle-Tracking Analysis, NTA).

II. Etude de l'interaction du peptide HA2 avec une membrane modèle

II.1. Caractérisation physico-chimique des liposomes

Pour cette étude, nous avons préparé par la même méthode de Bangham et le même protocole expérimental, des liposomes biotinylés formés par les mêmes lipides mentionnés dans la section II.1 du chapitre 3. Nous avons utilisé la diffusion dynamique de la lumière (DLS) pour mesurer leur diamètre hydrodynamique moyen et l'indice de polydispersité (PdI) dans une solution de NaCl 0,15 M et dans du PBS à pH 4,5 et pH 8. Le potentiel zêta des liposomes a été mesuré sur la base de leur mobilité électrophorétique. Le Tableau 1 présente les caractérisations physico-chimiques de l'échantillon.

Tableau 1. Caractérisation des liposomes. Les diamètres hydrodynamiques moyens et les potentiels zêta sont donnés comme des valeurs moyennes \pm l'erreur standard de la moyenne de trois mesures indépendantes.

Echantillon	Diamètre (nm)	PdI ^a	Potentiel zêta (mV)	C_p ^b (mM)	C_l ^c (lipo/mL)	IR ^d
Liposomes/ solution de 0.15 M NaCl	94 ± 3.7	0.14	-6.6 ± 0.8	31	1.94×10^{14}	1.338

Liposomes/ PBS pH 4.5^e	98 ± 1.1	0.15	-2.1 ± 0.5	31	1.80×10 ¹⁴	1.334
Liposomes/ PBS pH 8^f	99.6 ± 1.2	0.14	-4.0 ± 0.6	31	1.73×10 ¹⁴	1.336

^a Indice de polydispersité, ^b Concentration de phospholipides, ^c Concentration des liposomes, ^d Indice de réfraction, ^e PBS pH 4.5 : 0.1 M NaH₂PO₄ + 0.05 M NaCl, ^f PBS pH 8 : 0.1 M Na₂HPO₄ + 0.05 M NaCl

Ainsi, nous avons soigneusement contrôlé la taille et le potentiel zêta de chaque suspension de liposomes avant chaque expérience MP-SPR.

II.2. Formation de la couche de liposomes supportés

II.2.1. Mesure de la constante de dissociation à l'équilibre K_D de l'interaction des liposomes avec des surfaces fonctionnalisées

Après avoir préparé les liposomes, nous avons suivi par MP-SPR leur immobilisation sur quatre surfaces d'or différemment fonctionnalisées, selon le protocole expérimental décrit dans la publication 2 et comme mentionné dans la section III du chapitre 3. Les surfaces d'or ont été modifiées avec différentes monocouches auto-assemblées (SAMs) d'alcanethiols à longue chaîne (C11-C12) avec différents groupements terminaux (-COOH, -NH₂, et -CH₃) ou avec une couche de streptavidine. Dans cette section du présent chapitre, nous avons étudié l'étape de l'immobilisation des liposomes sur ces quatre surfaces d'or en calculant l'affinité de la liaison. Pour cela, les sensorgrammes résultants ont été extraits avec le visualiseur de données MP-SPR Navi et analysés par le logiciel Trace Drawer™. Ils sont présentés dans les Figures S2, S3 et S4 de la publication 2. Les constantes de dissociation à l'équilibre K_D de l'interaction entre les liposomes biotinylés et les quatre surfaces d'or fonctionnalisées ont été calculées. Elles sont présentées dans le Tableau 2.

Tableau 2. Affinité de liaison des liposomes avec différentes surfaces d'or fonctionnalisées. Les constantes de dissociation (K_D), exprimées en concentrations molaires de phospholipides, ont été obtenues à partir de l'ajustement des sensorgrammes extraits avec le visualiseur de données MP-SPR Navi. Les données ont été calculées en utilisant le modèle "Affinity" pour les surfaces (-CH₃, -COOH, -NH₂) et le modèle "OneToOne" pour la surface streptavidine. Ces deux modèles d'ajustement sont des modèles propriétaires du logiciel Trace Drawer™.

Surface	K_D (M)
$-CH_3$	$7.20 \times 10^{-4} \pm 1.01 \times 10^{-4}$
$-COOH$	$1.09 \times 10^{-4} \pm 0.74 \times 10^{-4}$
$-NH_2$	$2.06 \times 10^{-5} \pm 1.20 \times 10^{-5}$
<i>Streptavidine</i>	$9.44 \times 10^{-12} \pm 1.02 \times 10^{-12}$

Les résultats ont montré que l'affinité des liposomes pour la surface augmente en suivant l'ordre $CH_3 < COOH < NH_2 < streptavidine$. Ainsi l'ancrage des liposomes sur la couche de streptavidine a montré une très forte affinité résultant de la présence de biotine à la surface des liposomes. Par conséquent, cette surface a été choisie pour élaborer une surface fonctionnalisée par des liposomes très stable afin d'étudier l'interaction du peptide E4-GGYC par MP-SPR.

Avant de procéder à l'immobilisation des liposomes sur la surface de streptavidine, nous avons évalué l'éventuelle adsorption non spécifique du peptide E4-GGYC sur la couche de streptavidine. Cette adsorption non spécifique engendre un signal ne pouvant être discerné du signal provenant de la liaison de l'analyte (peptide) sur le ligand (liposome). De ce fait, comme expérience préliminaire, nous avons suivi par MP-SPR l'adsorption et la désorption du peptide E4-GGYC à la concentration de 10 μ M dans un tampon PBS (pH 4,5) sur une surface fonctionnalisée par la streptavidine, puis passivée soit par une solution aqueuse à 10 mM de tris(hydroxyméthyl)aminométhane (TRIS), de 3-diméthylaminopropylamine (DMAP) ou de lysine (voir Figure 4). Le protocole expérimental est décrit dans la publication 2.

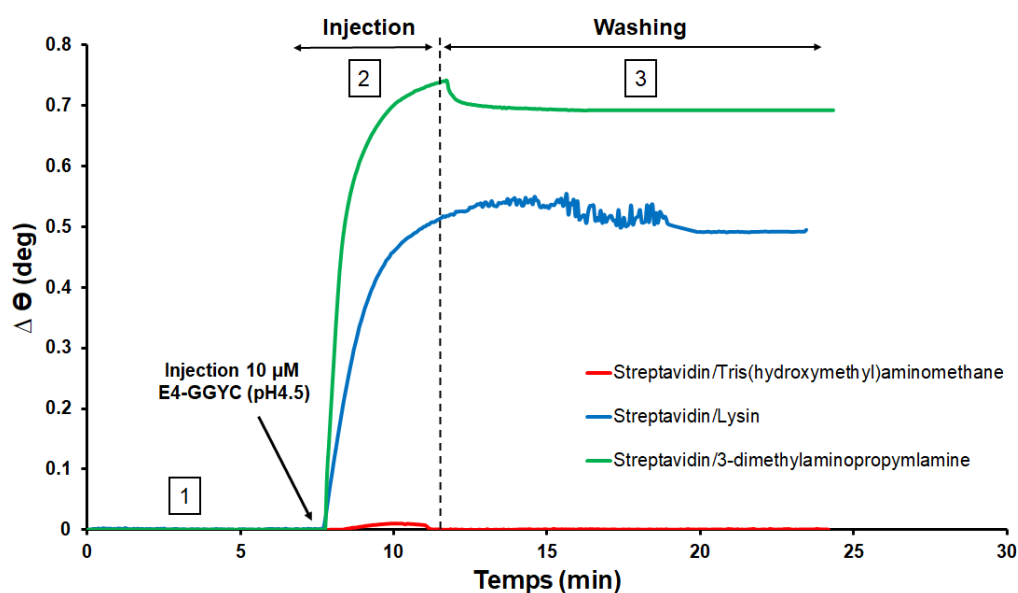


Figure 4. Contrôles négatifs sans liposome pour étudier l'interaction non spécifique du peptide E4-GGYC avec la couche de streptavidine, après passivation avec trois molécules différentes. (1) signaux superposés après passivation avec soit la lysine, le TRIS ou la DMAP, (2) Injection de 10 μM de E4-GGYC dans du PBS pH4,5 sur chaque surface pendant 4 min à un débit de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ et (3) étape de lavage dans un tampon PBS pH4,5

Nous avons obtenu un signal SPR négligeable suite à l'injection de 10 mM de peptide sur la surface de streptavidine passivée par le TRIS, indiquant un très faible degré de liaison non spécifique. Les deux autres méthodes de passivation par la lysine et la DMAP se sont avérées moins efficaces car montrant par SPR une adsorption significative du peptide sur la surface. Suite à cette étude, nous avons choisi le protocole de passivation par le TRIS pour passiver la surface de streptavidine avant d'immobiliser les liposomes.

Ensuite, nous avons déposé une concentration de 1×10^{14} lipo mL^{-1} de liposomes biotinylés dans les deux tampons PBS à pH 4,5 et pH 8 sur la couche de streptavidine. Cette injection a généré un déplacement significatif de l'angle θ_{SPR} d'environ 1,80 ° et 1,75 ° à pH 4,5 et pH 8 respectivement, par rapport à la couche de streptavidine, indiquant ainsi le succès du dépôt. Puis nous avons calculé l'épaisseur de la couche de liposomes formée dans les deux pHs à partir de l'ajustement des courbes SPR correspondantes avec le logiciel LayerSolverTM (voir Figure S6 de la publication 2). Une épaisseur moyenne de 83 nm et 93 nm de la couche de liposomes a été obtenue à pH 4,5 et pH 8 respectivement.

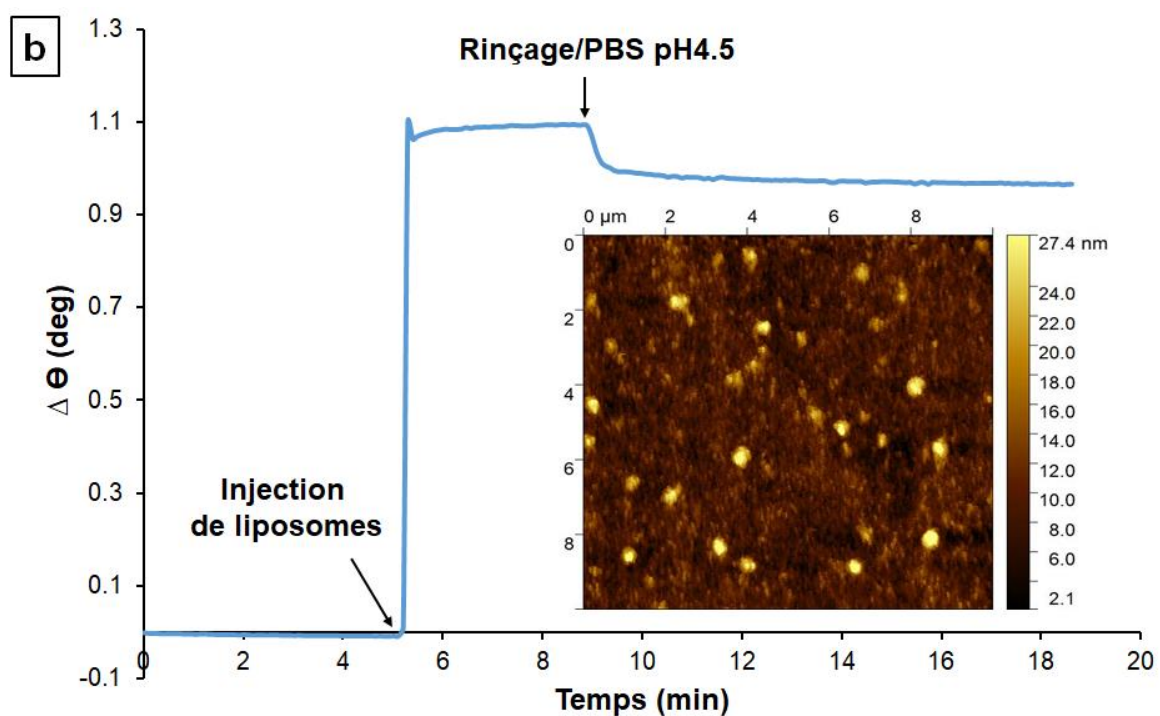
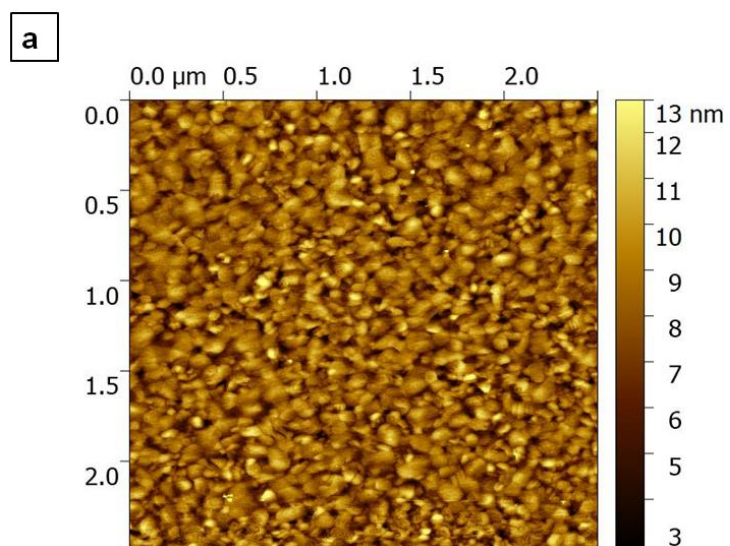
II.2.2. Caractérisation morphologique par AFM

Nous nous sommes ensuite penchés sur l'utilisation de l'AFM pour imager la morphologie de la surface de l'or et de streptavidine recouverte de liposomes afin de mettre en évidence la qualité du dépôt des liposomes. Les liposomes sont des objets difficiles à imager par AFM en raison de leur tendance à se déformer pendant les observations à cause des interactions avec la pointe.

Une concentration de liposomes de 1×10^{14} lipo mL^{-1} dans un tampon PBS (pH 4,5) a été directement adsorbée sur la puce d'or SPR nettoyée et sur la puce d'or SPR fonctionnalisée à la streptavidine pendant 4 min à un débit de $50 \mu\text{L}/\text{min}$ et l'excès de liposomes a ensuite été lavé. La puce a été retirée de l'instrument MP-SPR, et environ 1 mL de tampon PBS (pH 4,5) a été soigneusement déposé sur la surface pour éviter le séchage pendant l'analyse AFM.

La comparaison des images AFM de la surface de l'or avant (Figure 5.a) et après l'ajout de liposomes (Figure 5.b) a montré une topographie granulaire dans les deux cas. Cependant, la hauteur et la morphologie de la surface des éléments arrondis étaient différentes. Des objets sphériques ont été observés sur la Figure 5.b avec une hauteur moyenne approximative d'environ 30 nm. Cette valeur était bien plus petite que le diamètre hydrodynamique moyen des liposomes obtenu par DLS (voir Tableau 1). De plus, une sous-couche moléculaire de quelques nanomètres a également été observée qui pourrait correspondre à une monocouche homogène de phospholipides résultant de la destruction de liposomes en contact avec la surface d'or.

D'autre part, l'image AFM des liposomes déposés sur la surface d'or fonctionnalisée par la streptavidine montre un fort recouvrement de la surface par des objets globulaires (Figure 5.c). Nous avons observé une surface granulée, recouverte de liposomes intacts dont la hauteur moyenne est supérieure à 70 nm, proche du diamètre moyen des liposomes en suspension aqueuse. Nous avons pu montrer par ces résultats que l'interaction biotine-streptavidine favorise l'adhésion d'une couche dense de liposomes sans modifier leur forme.



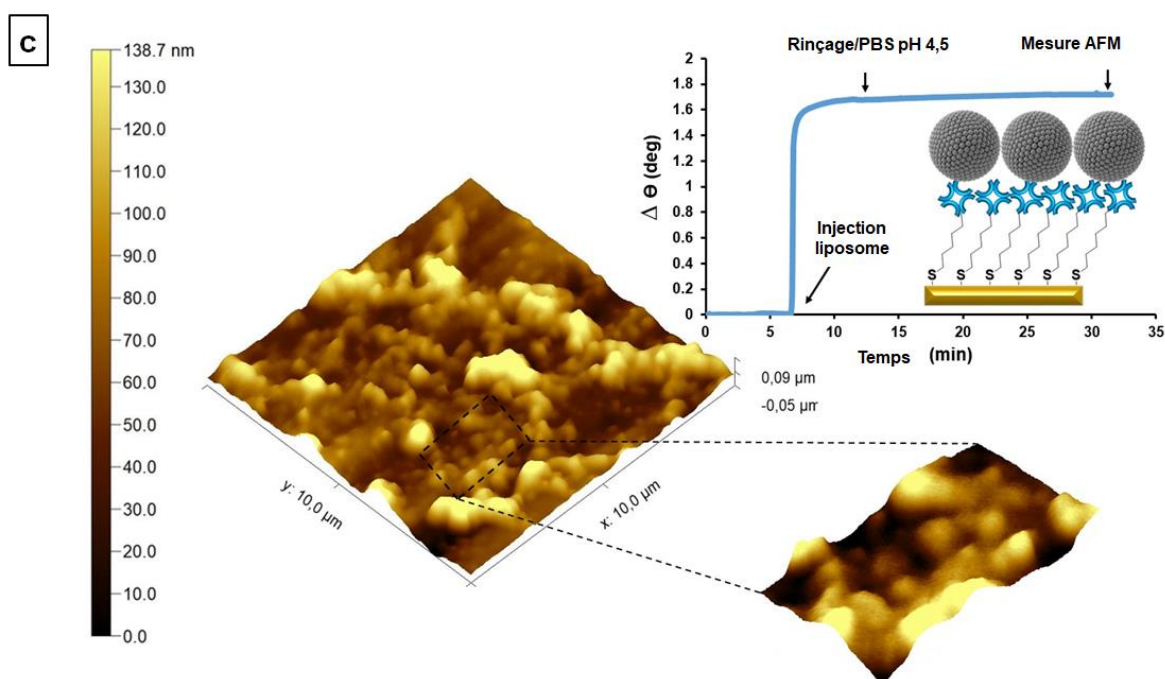


Figure 5. Images topographiques AFM en mode tapping de liposomes adsorbés sur un substrat d'or nu et d'or fonctionnalisé par la streptavidine. L'adsorption des liposomes sur les deux surfaces a été suivie par MP-SPR, puis par une caractérisation AFM à la fin de chaque dépôt. Images topographiques AFM du substrat d'or avant (a) et après dépôt de liposomes (b) et après dépôt de liposomes sur une surface fonctionnalisée par la streptavidine (c)

II.3. Etude de l'interaction du peptide HA2 avec la membrane supportée

II.3.1. Analyse MP-SPR de la liaison peptide HA2/liposome

Après avoir préparé une couche de liposomes stable sur la surface de streptavidine, nous avons étudié l'interaction de E4-GGYC en enregistrant des spectres angulaires SPR complets en fonction du temps. Pour ce faire, nous avons injecté des solutions de peptide de concentrations croissantes (5, 10 et 25 μM) dans du PBS à pH4,5 à un débit constant de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. D'après la Figure 6, nous avons noté que l'interaction du peptide avec la couche de liposomes induit une augmentation du signal SPR dépendante de la concentration. En particulier, les sensorgrammes ont indiqué que le processus d'association peptide/liposome était rapide et atteignait au plateau un état stable jusqu'à la fin de l'injection du peptide. Ceci nous permet de suggérer que le peptide s'est adsorbé ou inséré dans la bicouche lipidique des liposomes pendant la période d'injection. Une réversibilité relative de l'interaction a été observée lorsque la solution d'injection a été remplacée par une solution PBS à pH 4,5.

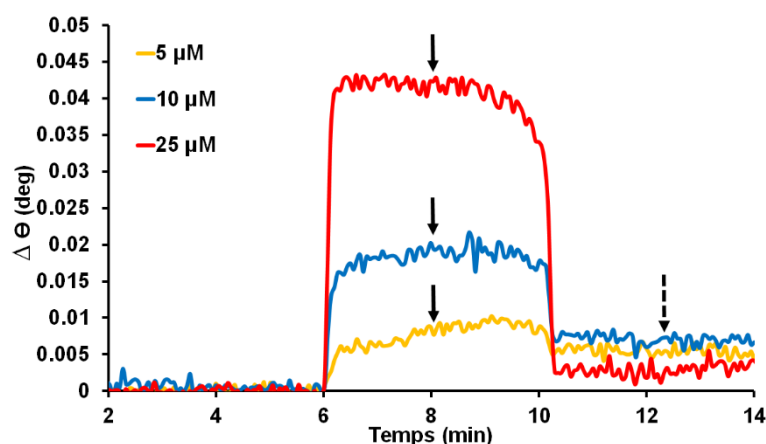


Figure 6. Sensorgrammes superposés (position angulaire du pic normalisé en fonction du temps) enregistrés pendant l'injection de 5-25 μM de peptide E4-GGYC à pH 4,5 sur la surface fonctionnalisée par des liposomes. Les flèches indiquent le positionnement pour les calculs d et n (Tableau 3) à 670 nm

Afin de mieux comprendre les phénomènes qui se produisent sur la couche de liposomes suite à l'injection du peptide, nous avons modélisé les courbes SPR correspondant aux expériences en temps réel après chaque injection de peptide sur la couche de liposomes à pH 4,5 (voir Figure 7). Les courbes ont été ajustées séparément avec le logiciel Layer SolverTM, en considérant chaque couche comme une seule couche optiquement homogène.

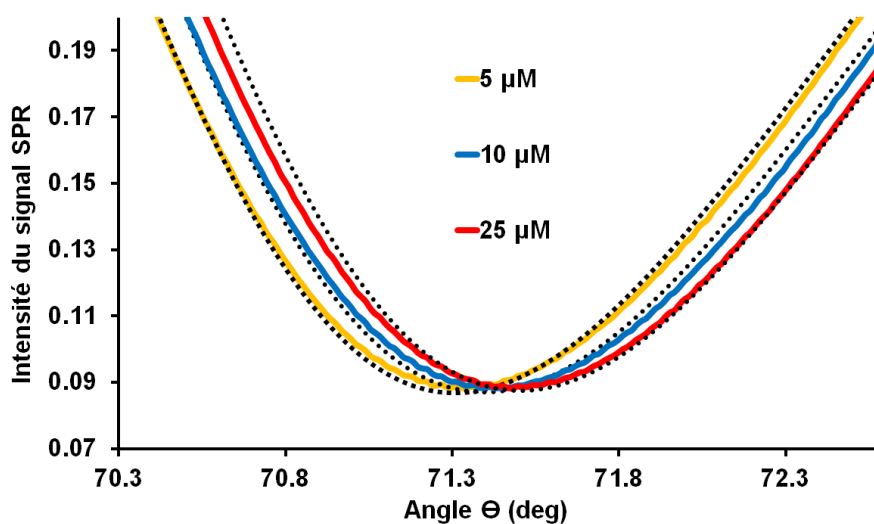


Figure 7. Balayages de l'angle complet aux pics SPR à 670 nm des surfaces supportées par les liposomes après injection de solutions de 5-25 μM d'E4-GGYC à pH 4,5 (courbes pleines), avec les ajustements correspondants de la modélisation LayerSolverTM (courbes en pointillés). La courbe SPR correspondant à chaque concentration a été prise à l'équilibre de l'interaction peptide/liposome pour la modélisation par le logiciel LayerSolverTM

Nous avons déterminé en premier lieu les propriétés optiques des couches constituant la puce d'or SPR fonctionnalisée telles que la couche d'adhérence de chrome 'Cr' et la couche d'or 'Au', ainsi que les deux couches organiques déposées de MUA et de streptavidine. Les paramètres obtenus ont été maintenus fixes et utilisés comme base pour calculer l'épaisseur optique (d) et l'indice de réfraction réel (n) de la couche de liposomes déposée avant et après injection des différentes concentrations de peptides. Les résultats des calculs théoriques sont présentés dans le Tableau 3.

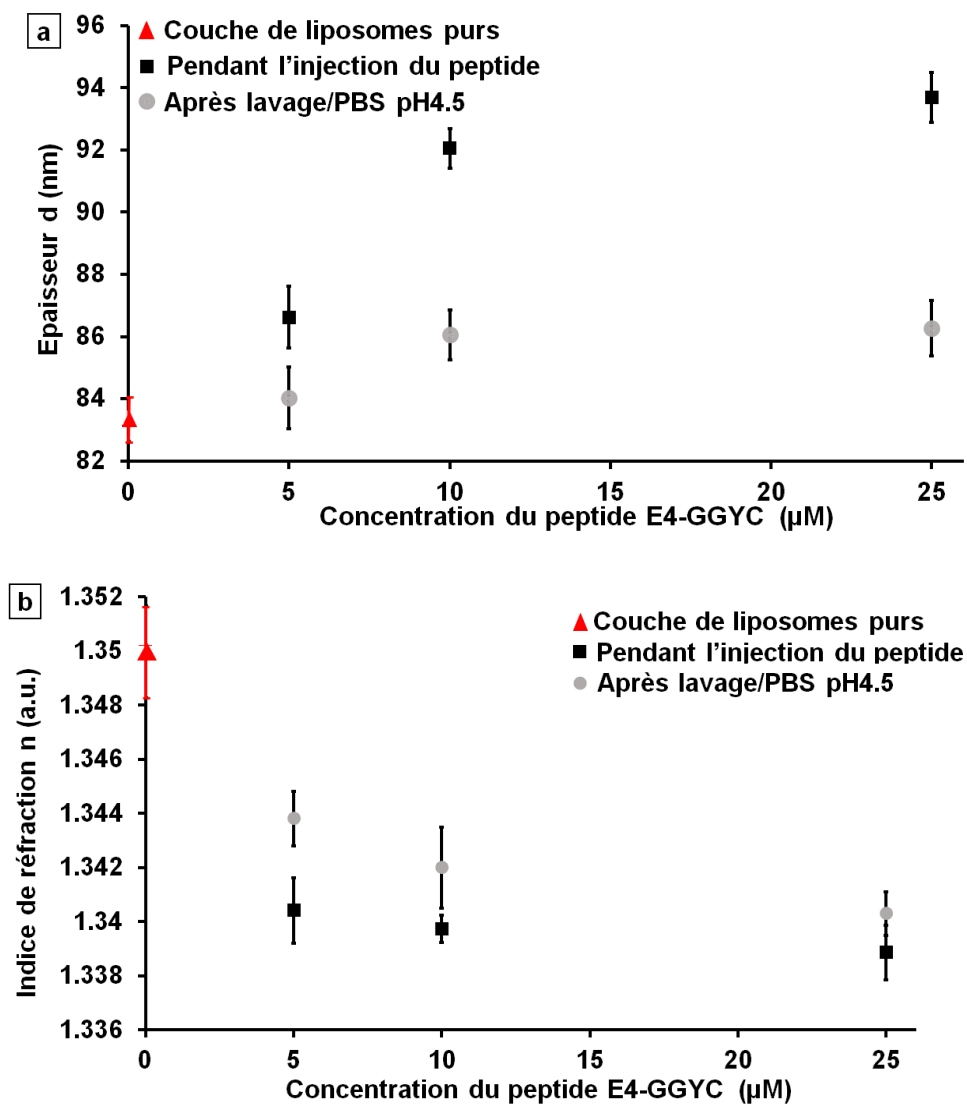
Bien que l'épaisseur de la couche de liposomes formée sur la surface de streptavidine était inférieure à la profondeur de pénétration du champ évanescent ($< 1/2 \lambda_1$ et $1/2 \lambda_2$), ce dernier est capable de détecter des changements optiques extrêmement faibles dans la couche de liposomes pendant l'interaction avec les peptides. Les Figures 8a-b illustrent la variation des paramètres optiques calculés (d et n) pour la couche de liposomes en fonction de la concentration de peptide injecté à pH 4,5.

Tableau 3. Epaisseur (d , nm), indice de réfraction (n , RIU) de la couche de liposomes ainsi que la concentration en phospholipides (C_p , g/cm³) après chaque injection de E4-GGYC (5-25 μ M) et après chaque lavage avec du PBS à pH4.5. Les valeurs représentent la moyenne (\pm écart-type) de trois calculs indépendants par la simulation SPR LayerSolver™.

Concentration du peptide (μ M)	Pendant l'injection du peptide	Après Lavage avec PBS pH4.5
5	$d = 86.62 \pm 1.00$	$d = 84.03 \pm 0.98$
	$n = 1.34041 \pm 0.00120$	$n = 1.34381 \pm 0.00100$
	$C_p = 0.08585 \pm 0.00265$	$C_p = 0.08849 \pm 0.00072$
10	$d = 92.05 \pm 0.70$	$D = 86.06 \pm 0.80$
	$n = 1.33974 \pm 0.00050$	$n = 1.34200 \pm 0.00150$
	$C_p = 0.08078 \pm 0.00045$	$C_p = 0.08641 \pm 0.00133$
25	$d = 93.70 \pm 0.90$	$d = 86.27 \pm 1.10$
	$n = 1.33886 \pm 0.00100$	$n = 1.34030 \pm 0.00080$

$$C_p = 0.07936 \pm 0.00152 \quad C_p = 0.08620 \pm 0.00121$$

Couche de liposomes purs ; $d = 83,30$ nm, $n = 1,34997$, $C_p = 0,08925$ g/cm³



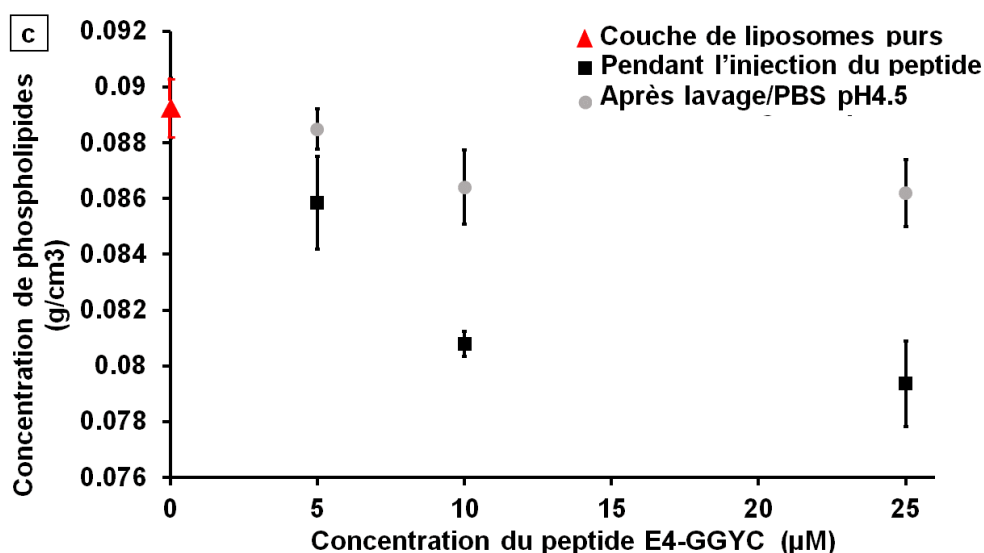


Figure 8. Effet de l'injection de 5-25 μM d'E4-GGYC sur (a) l'épaisseur d , (b) l'indice de réfraction n et (c) la concentration de phospholipides C_p de la couche de liposomes immobilisés à pH 4,5, avant et après l'étape de lavage dans du PBS, pH 4,5

D'après les Figures 8.a et 8.b, nous avons constaté que l'épaisseur de la couche de liposomes a augmenté lors de l'ajout du peptide à pH 4,5 (données reportées dans le Tableau 3). Cette augmentation progressive de l'épaisseur a été accompagnée d'une diminution de l'indice de réfraction (n) de la couche. En nous appuyant sur l'équation de Jung (équation 11 citée au chapitre 2) et sur les résultats de la modélisation, nous avons pu relever que le décalage angulaire du minimum du pic SPR vers les grandes valeurs d'angle est principalement induit par la variation de l'épaisseur de la couche (d).

Grâce au calcul théorique et aux équations appropriées cités dans la publication 2, nous avons pu estimer la concentration en phospholipides (C_p) dans la couche initiale de liposomes ainsi que sa variation due à l'injection de E4-GGYC (Figure 8.c). Ce calcul a été réalisé afin de mieux comprendre l'effet du peptide sur la couche de liposomes. Les valeurs de C_p calculées après l'injection de 5-25 μM de peptide sont présentées dans le Tableau 3. En effet, la C_p a été estimée à $0,08925 \text{ g/cm}^3$ pour la couche initiale de liposomes. La concentration a diminué en présence du peptide, jusqu'à $C_p \sim 0,07936 \text{ g/cm}^3$ suite à l'injection de 25 μM de peptide. Ainsi, nous avons pu émettre l'hypothèse que lors de l'injection de 5-25 μM de peptide à pH 4,5, celui-ci s'insère dans la membrane des liposomes, provoquant probablement la formation de pores dans la membrane comme décrit dans la littérature [10] suivie du gonflement des liposomes par le tampon. Ceci conduit d'une part à une augmentation de l'épaisseur d due au gonflement des

liposomes et d'autre part, à une diminution de l'indice de réfraction n de la couche induite par l'entrée du tampon à l'intérieur des liposomes, ce qui explique également la diminution de la concentration en phospholipides C_p . Lors de l'étape de lavage, les valeurs calculées de l'épaisseur, de l'indice de réfraction ainsi que de la concentration en phospholipides ont prouvé que le gonflement a été stoppé et que le peptide s'est désorbé. Les valeurs calculées ont suggéré un dégonflement partiel de la couche de liposomes sans revenir parfaitement aux valeurs initiales de la couche native (voir Tableau 3).

Dans notre cas, nous n'avons pas été en mesure de confirmer la réversibilité complète de l'insertion du peptide dans la membrane comme cela a été démontré précédemment par Longo *et al.* [25, 26] et Zhelev *et al.* [10]. Longo *et al.* ont montré que le peptide de fusion de la grippe (peptide HA2 wt-20) s'insère rapidement dans la membrane à faible pH et que l'insertion est principalement inversée par le rinçage de la membrane avec un tampon. Zhelev *et al.* ont étudié l'interaction de l'analogue du peptide HA2 (AcE4K) avec des liposomes de phosphatidylcholine et ont prouvé que la liaison du peptide augmente lorsque le pH diminue jusqu'à pH 4,5, et que l'insertion s'avère réversible. Ils ont également observé que l'insertion du peptide dans la membrane lipidique n'affecte pas la perméabilité de la membrane pour l'eau, ce qui montre que le peptide à une concentration $\leq 10 \mu\text{M}$ ne perturbe pas substantiellement l'emballage de la région hydrocarbonée. Cependant, la capacité de la membrane à retenir les solutés en présence du peptide s'est révélée compromise, ce qui suggère que le peptide inséré favorise la formation de pores de courte vie. Ce point a été confirmé par nos calculs théoriques lorsque l'indice de réfraction n de la couche de liposomes a diminué après l'injection de 5-25 μM de peptides à pH 4,5. Nous avons suggéré que les nanopores créés par les peptides lors de leur insertion dans la membrane lipidique facilitent l'entrée du tampon, ce qui diminue en globalité la concentration calculée des phospholipides C_p .

II.3.2. Cinétique de l'interaction peptides/liposomes à pH 4,5

Nous avons analysé les sensorgrammes résultant des interactions E4-GGYC/liposome à pH 4,5 par le logiciel Trace Drawer™ en utilisant le modèle d'ajustement simple de Langmuir 'one-to-one' pour réaliser une étude cinétique des interactions. La Figure 9.a représente la superposition entre les sensorgrammes expérimentaux et les courbes ajustées pour les 3 concentrations de peptide.

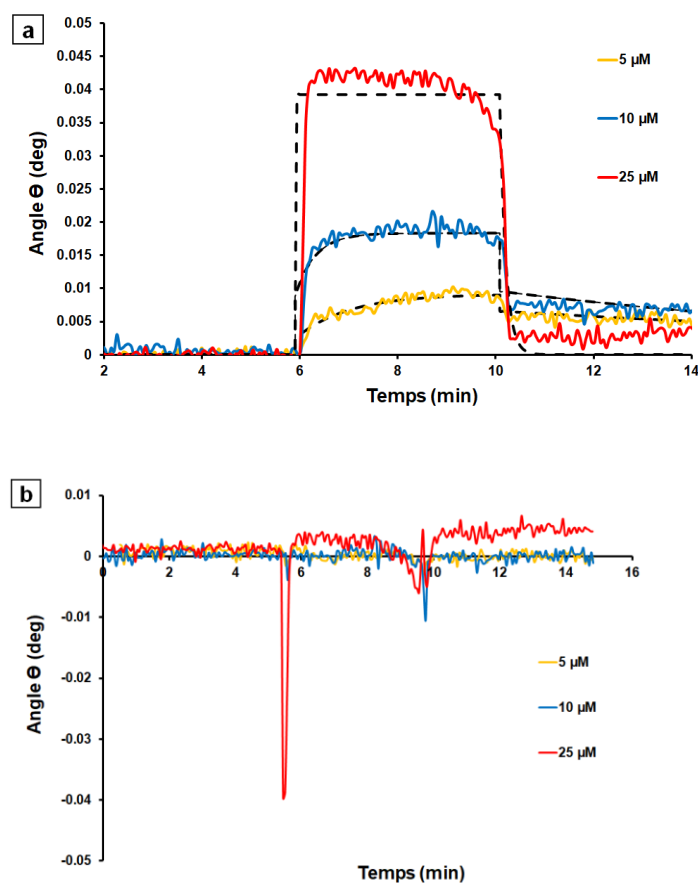


Figure 9. (a) Sensorgrammes MP-SPR (lignes en gras) et courbes ajustées (lignes en pointillés) du peptide E4-GGYC aux concentrations 5-25 μM interagissant avec des liposomes immobilisés à pH 4,5. (b) Courbes résiduelles provenant de la soustraction des courbes ajustées aux sensorgrammes expérimentaux

Les constantes de vitesse d'association (k_a), de dissociation (k_d) ainsi que la constante de dissociation à l'équilibre (K_D) obtenues à partir de l'ajustement sont indiquées dans le Tableau 4.

Tableau 4. Paramètres cinétiques obtenus à partir de l'ajustement des sensorgrammes MP-SPR de l'interaction E4-GGYC/liposome.

	$k_a \times 10^5 (1/M \times s)$	$k_d \times 10^{-1} (1/s)$	$K_D \times 10^{-7} (M)$
Peptide	2.820 ± 0.005	1.23000 ± 0.00006	4.50 ± 0.03

Le peptide s'est inséré dans la membrane du liposome avec une K_D de $4,5 \times 10^{-7}$ M. Ce résultat est en bon accord avec la K_D calculée par Rafalski et *al.* à partir de mesures de fluorescence de la liaison du peptide HA2 à des vésicules de liposome ($K_D \sim 8 \times 10^{-7}$ M) [5].

II.4. Effet du pH sur l'interaction peptide-membrane lipidique

Nous avons également étudié la réponse SPR induite par l'injection de solutions de peptides à pH basique. La Figure 10 montre les sensorgrammes superposés pour des injections de 5-25 μ M d'E4-GGYC à pH 4.5 et pH 8. Nous avons remarqué deux réponses SPR différentes, résultant probablement d'un mécanisme d'interaction différent aux deux pHs. Pour être sûr de l'action du peptide sur la couche de liposomes, une étude contrôle réalisée en injectant successivement du PBS à pH 4,5 et à pH 8 a confirmé que le signal SPR de la surface fonctionnalisée par les liposomes était stable lors de la variation du pH.

En superposant les sensorgrammes, nous avons observé des cinétiques de liaison différentes, tant au niveau des taux d'association que de dissociation à pH 4,5 par rapport à pH 8. Comme on le voit, les mêmes concentrations de peptides injectées à pH 8 ont conduit à une lente diminution des signaux quelle que soit la concentration utilisée. La cinétique d'interaction était beaucoup plus lente que celle observée à pH 4,5, et n'a pas atteint un signal stable pendant le temps d'injection de 4 minutes. Cependant, lorsque les liposomes ont été rincés avec du PBS à pH 8, l'angle SPR a recommencé à augmenter et il a fallu environ 4 minutes pour atteindre la ligne de base. Cela suggère que le peptide a été complètement éliminé de la bicouche lipidique ou qu'il n'a pas interagi avec le liposome. Les variations des signaux SPR étaient clairement dépendantes de la concentration pour le peptide à pH 4,5, mais pas à pH 8, pour lequel les variations des angles SPR étaient quasiment similaires pour toutes les concentrations testées.

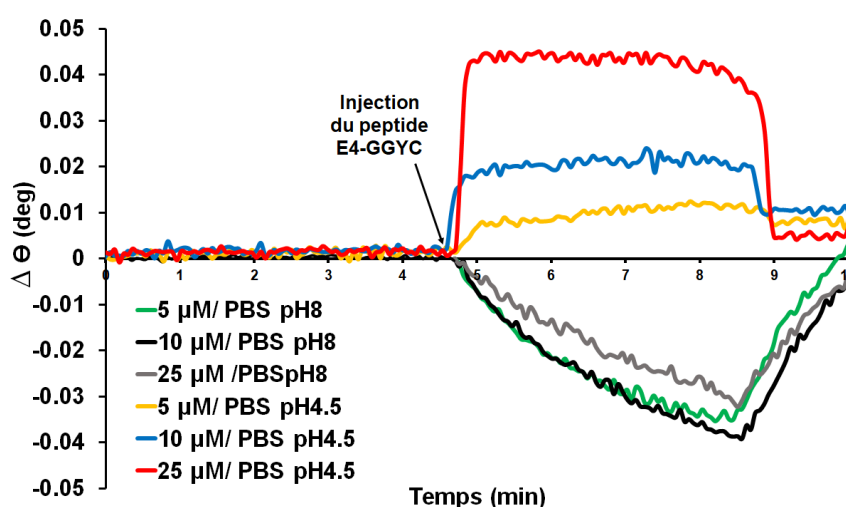


Figure 10. Sensorgrammes superposés d'injections de 5-25 μM d'E4-GGYC à pH 4,5 et pH 8 sur la surface recouverte de liposomes

Ces résultats indiquent que E4-GGYC a des modes d'interaction différents avec les liposomes lors du passage d'un pH acide à un pH basique. Nous avons émis l'hypothèse que le décalage négatif de l'angle SPR provient de changements morphologiques dans la couche de liposomes. Le peptide injecté à pH basique induit probablement une contraction des liposomes accompagnée d'un retour à leur forme initiale après rinçage. Cette contraction est indépendante de la concentration en peptide. Les études réalisées par MP-SPR à pH 8 ne nous permettent pas de conclure sur l'absence d'interaction entre E4-GGYC et le liposome dans ce tampon. Il a donc été envisagé de mettre en relation ces études avec les résultats obtenus par DLS et NTA pour conclure clairement sur la pH-dépendance de l'interaction E4-GGYC/liposome.

II.5. Effet du peptide sur la taille des liposomes en solution

La taille et l'indice de polydispersité (*PdI*) des liposomes peuvent fournir des informations sur leur stabilité et, à ce titre, peuvent permettre une évaluation qualitative de leur interaction avec E4-GGYC dans notre étude. Nous avons contrôlé ainsi ces paramètres par les techniques DLS et NanoSight-NTA (Nanoparticle-Tracking Analysis). Les résultats de ces deux techniques (voir Figure 11) ont clairement démontré que des concentrations croissantes de E4-GGYC dans du PBS à pH 4,5 induisaient une augmentation de la taille des liposomes, alors que le *PdI* mesuré par DLS restait relativement faible. Ceci suggère fortement que le peptide, à une concentration de 0,5 à 10 μM , n'a pas induit d'agrégation ou de destruction des liposomes. D'autre part, l'augmentation des concentrations de peptide de 0,5 à 10 μM dans du PBS à pH 8 n'a pas favorisé de changement significatif de la taille des liposomes, les diamètres hydrodynamiques et les valeurs de *PdI* étant restées presque stables. Par conséquent, nous avons pu confirmer les résultats obtenus par MP-SPR et avons montré le comportement différent de E4-GGYC vis-à-vis des liposomes à pH 4,5 et pH 8. Pour cette étude, nous n'avons pas été en mesure d'augmenter la concentration en peptide au-delà de 10 μM . Des agrégats entre les peptides et les liposomes ont été observés dans nos solutions, ce qui nous a empêché d'obtenir des données interprétables.

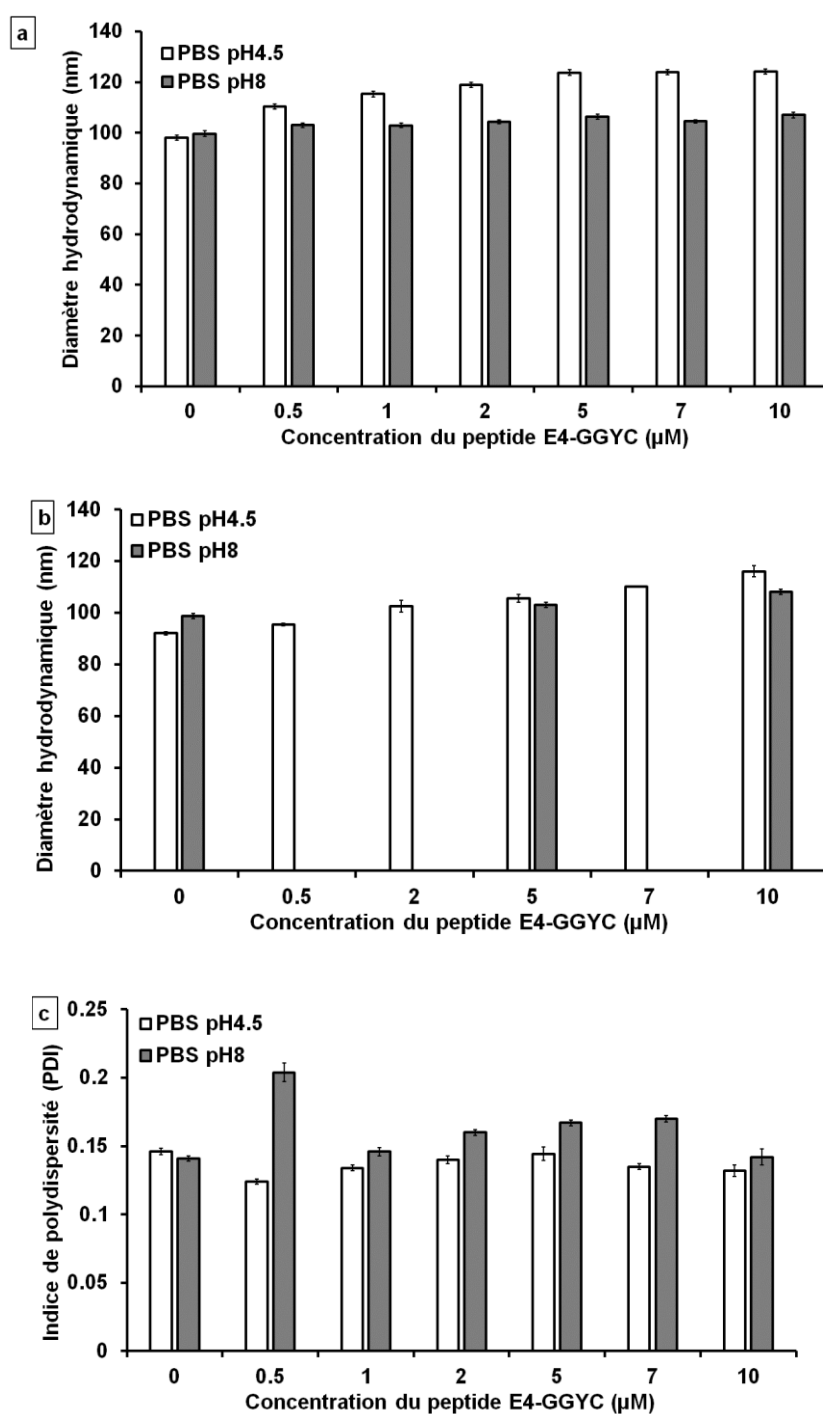


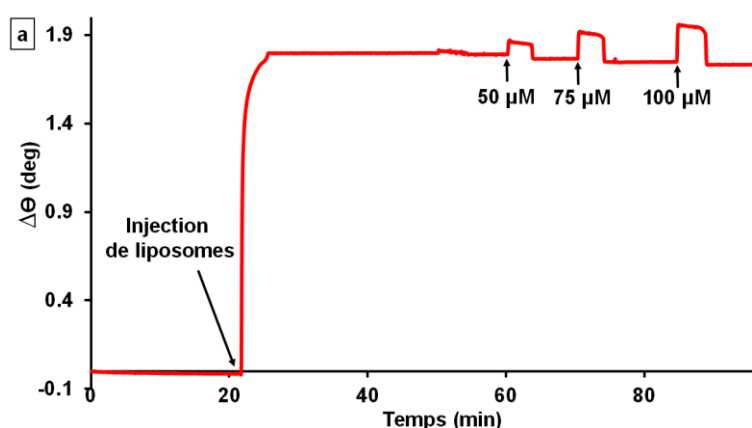
Figure 11. Effets de l'incubation des liposomes avec des concentrations croissantes de E4-GGYC dans du PBS à pH 4,5 et pH 8 sur le diamètre hydrodynamique mesuré par DLS (a), NTA (b) et l'indice de polydispersité (PDI) par DLS (c)

Grâce à ces résultats, nous avons confirmé le processus de gonflement des liposomes à pH 4,5 par DLS et NTA jusqu'à 10 μM de peptide en solution. Ensuite, les conjugués peptide-liposome en solution ont commencé à s'agréger et à précipiter, perturbant les mesures DLS et NTA, mais

pas la réponse MP-SPR suivie sur des substrats fonctionnalisés par des liposomes. Dans la littérature, le gonflement des liposomes dans une solution de 10 μM de peptide HA2 a été décrit par Zhelev et *al* [10]. De manière similaire à nos résultats de DLS, ils ont également confirmé que les conjugués peptide-liposome se dégradent avec le temps dans des solutions de peptide à une concentration $\geq 10 \mu\text{M}$. Les auteurs ont alors conclu que la membrane lipidique était rompue par un éventuel processus de fusion. Grâce à nos résultats obtenus par MP-SPR, nous avons pu suivre l'interaction peptide/liposome jusqu'à 25 μM de peptide, montrant une réversibilité partielle de la liaison sans rupture de la couche de liposome.

II.6. Essais de destruction de la couche de liposomes supportée

Pour tenter de détruire la couche de liposomes, nous avons réalisé l'expérience avec des concentrations croissantes de peptides jusqu'à 100 μM . La Figure 12.a montre les sensorgrammes complets en temps réel pour 50, 75 et 100 μM de peptide E4-GGYC à pH 4,5. Nous avons pu conclure à partir de ces résultats que l'interaction de E4-GGYC à pH 4,5 avec la couche lipidique jusqu'à 100 μM n'a pas induit de perturbation de la membrane conduisant à la rupture des liposomes. En effet, nous n'avons pas observé une chute du signal SPR qui pourrait correspondre à une dégradation. Nous avons aussi remarqué que E4-GGYC s'est lié de manière différente à la surface des liposomes à une concentration supérieure à 25 μM (voir Figure 12.b par rapport à la Figure 6). En effet, le mécanisme initial d'association peptide/liposome était également rapide. Mais ensuite, le signal a lentement diminué dans le temps jusqu'à la fin de l'injection du peptide sans atteindre un état stable. En changeant le milieu par du PBS à pH 4.5, une chute rapide du signal SPR jusqu'à la ligne de base a été enregistrée.



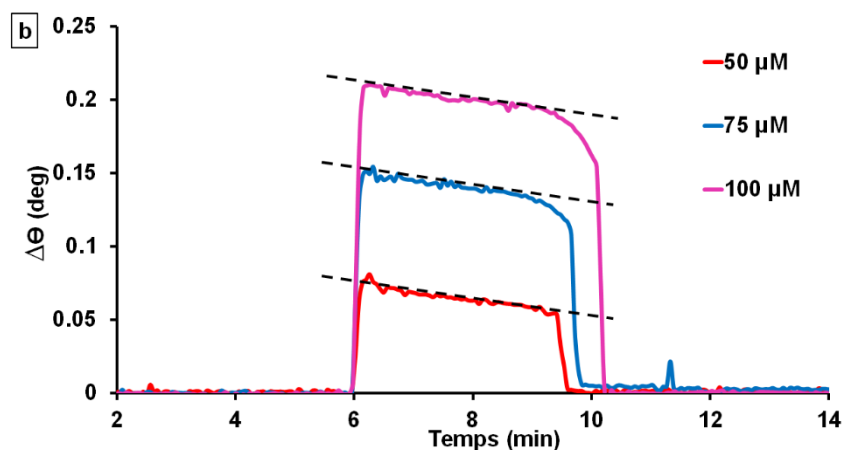


Figure 12. Le sensorgramme complet (a) et les sensorgrammes superposés (b) mesurés à une longueur d'onde de 670 nm, pendant l'interaction de E4-GGYC à une concentration de 50 à 100 μM , pH 4.5 sur des liposomes immobilisés

Entre les petites et les grandes concentrations, nous avons remarqué qu'il y avait une transition probable dans le mode d'action du peptide avec la couche de liposomes. Cette observation était cohérente avec la forme du sensorgramme, montrant un état stable au niveau du signal SPR pendant l'injection de 5-25 μM de peptide (Figure 6), alors que pendant l'injection de 50-100 μM de peptide, aucun état stable n'a été observé (Figure 12.b). Ceci nous permet d'émettre l'hypothèse que la concentration en peptide de 25 μM était une concentration critique pour saturer la membrane de la couche de liposomes. À 50-100 μM , le peptide s'est d'abord inséré dans les liposomes jusqu'à saturation, puis l'excès de peptide a continué à s'adsorber sur la surface de la couche lipidique, provoquant à nouveau une augmentation du signal SPR liée à la concentration de peptide. Cette hypothèse a été confirmée en calculant d et n de la couche de liposome après chaque injection de peptide E4-GGYC à pH 4,5 jusqu'à 100 μM comme illustré dans la Figure 13. Nous avons observé que la variation monotone de l'épaisseur (d) a d'abord été accompagnée d'une diminution de l'indice de réfraction (n) de la couche de liposomes de 1,34997 à 1,33886, suivie d'une nouvelle augmentation jusqu'à 1,34625. Il y a eu un minimum dans la courbe de l'indice de réfraction autour du point de 25 μM de peptide. Après insertion dans la membrane jusqu'à saturation, l'excès de peptide a continué à s'adsorber à la surface de la couche de liposomes, provoquant ainsi une augmentation continue de l'épaisseur avec une augmentation notable de l'indice de réfraction pour des injections de 50-100 μM . Il est à noter que l'indice de réfraction était toujours inférieur à celui de la couche de liposome pur (1,34997).

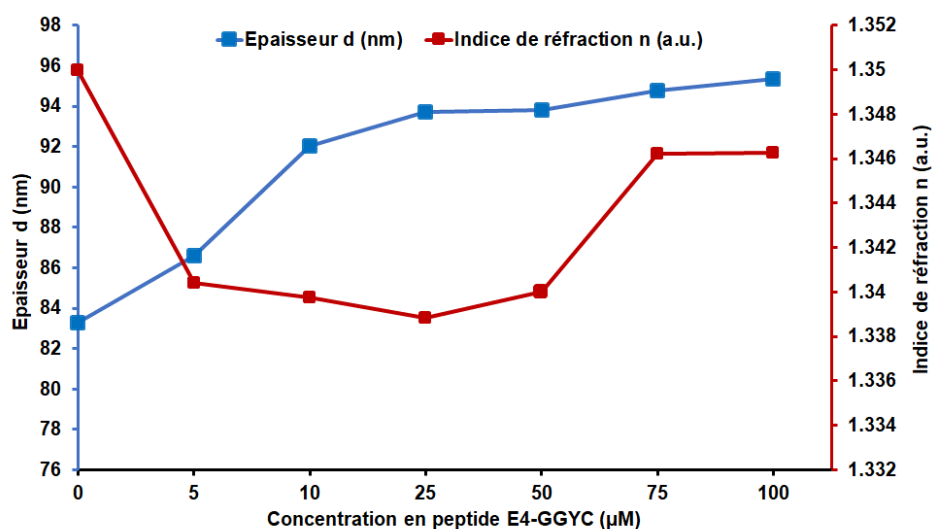


Figure 13. Effet de l'injection du peptide E4-GGYC à différentes concentrations à pH4,5 sur l'épaisseur (d) et l'indice de réfraction (n) de la couche de liposomes

Une fois qu'un nombre maximal de peptide a été inséré et a saturé la membrane du liposome, la structure vésiculaire du liposome n'a pas été détruite. Ces résultats suggèrent que l'insertion de E4-GGYC à pH 4,5 dans la bicouche lipidique pourrait augmenter la robustesse de la membrane du liposome. Ce point a été étudié expérimentalement dans l'expérience ci-après.

La stabilité de la membrane lipidique et sa robustesse ont été étudiées après l'injection de 25 μM de E4-GGYC sur une couche de liposomes. Pour cela, nous avons injecté une solution de mono-rhamnolipide (mono-RL) à une concentration de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (concentration qui correspond à la concentration micellaire critique, CMC) sur une couche de liposomes saturés par 25 μM de E4-GGYC à pH 4,5, et en parallèle sur une couche de liposomes sans injection préalable de peptide, prise comme couche de référence (Figure 14).

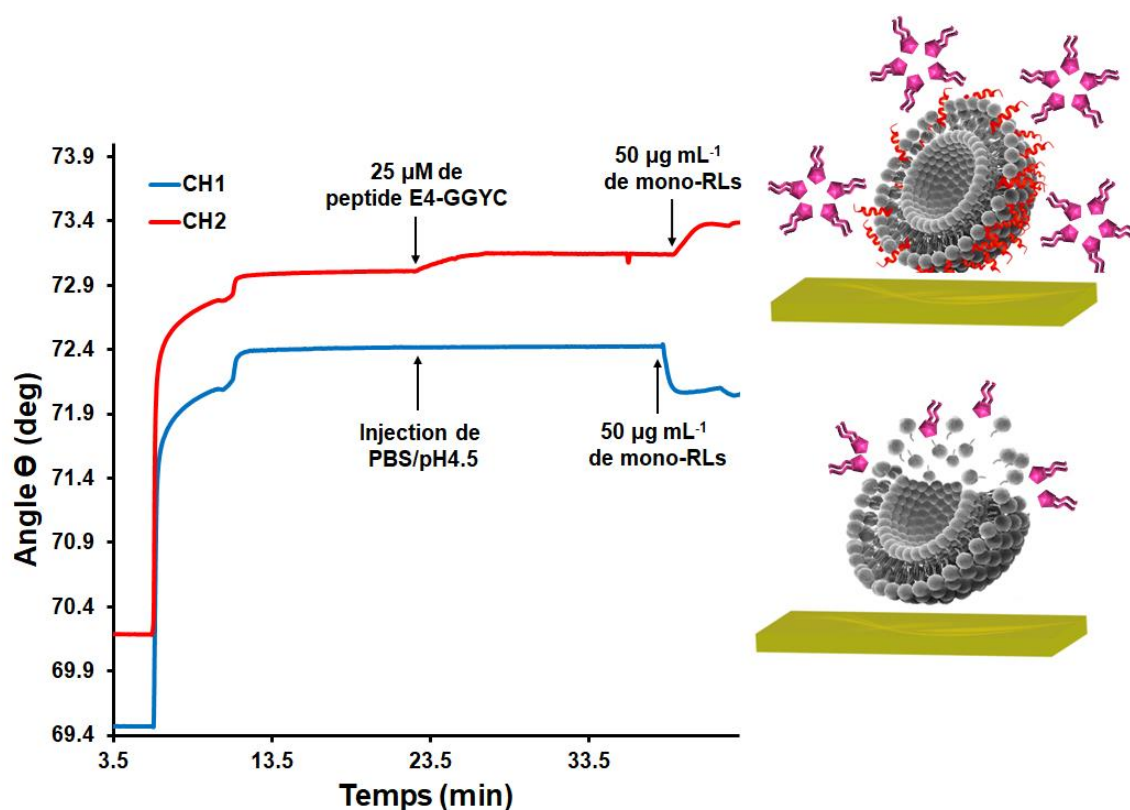


Figure 14. Sensorgrammes mesurés dans du PBS pH 4,5 et à la longueur d'onde de 670 nm lors d'une injection de mono-RL à une concentration de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sur une couche de liposomes purs (CH1) et sur une couche de liposomes saturés avec 25 μM de peptide E4-GGYC à pH 4,5 (CH2)

Nous avons observé une augmentation progressive de l'angle SPR, suivie d'une stabilisation du signal jusqu'à un plateau pendant l'injection de E4-GGYC (Figure 14, courbe rouge). Cette variation était caractéristique de l'insertion du peptide dans la membrane lipidique. L'étape suivante a été l'injection de mono-RL afin d'étudier son interaction avec la membrane lipidique et de déclencher la rupture du liposome. Cependant, l'ajout de mono-RL a conduit à une nouvelle augmentation de l'angle SPR (Figure 14, courbe rouge). Ainsi, l'augmentation de l'angle SPR était proportionnelle à la quantité de mono-RL déposée sur la surface. En comparaison, l'injection de mono-RL sur la couche de liposomes sans peptide a entraîné une baisse significative du signal SPR (Figure 14, courbe bleu), ce qui montre que le mono-RL a interagi avec les liposomes et a commencé à les détruire. Cela nous rappelle l'effet perturbateur de mono-RL sur les liposomes qui a été décrit dans le chapitre 3. Nous avons rapporté que la couche de liposomes immobilisés sur un support pouvait être perturbée et restructurée avec perte de matière phospholipidique par l'action du mono-RL. Une chute nette du signal SPR a été observée et les paramètres optiques (d et n) calculés par MP-SPR ont confirmé la formation

de la bicouche phospholipidique après dégradation complète. De même, Bombard et *al.* [23] ont décrit la perturbation d'une couche de liposomes supportés sur une surface par un peptide amphiphile en utilisant l'imagerie par résonance plasmonique de surface (SPRi) et la technique BALM. Ils ont enregistré une augmentation du signal SPRi juste après l'injection du peptide fusogène dans la couche de liposomes, indiquant le gonflement des liposomes, et ensuite une chute remarquable du signal, reflétant la perte de matière lipidique et la rupture des liposomes. Nos résultats ont confirmé que la présence de E4-GGYC inséré dans la double couche lipidique des liposomes inhibait la perturbation déclenchée par le mono-RL en améliorant la robustesse de la membrane. Dans la littérature, un certain nombre d'études ont montré que le peptide HA2 s'intercale dans le feuillet externe de la bicouche lipidique, augmentant l'ordonnement des groupes de tête de cette couche, augmentant de ce fait sa robustesse [27-29]. De plus, des études dans la littérature ont révélé que le peptide ne traverse pas la double couche phospholipidique et reste positionné dans la partie externe de la membrane [28]. Il a été décrit que le couplage entre le feuillet externe durci par l'insertion du peptide et le feuillet interne plus souple génère des contraintes de flexion dans la bicouche. Les auteurs ont suggéré que ces contraintes peuvent initier la fusion de la membrane. Dans notre cas, les résultats obtenus par SPR sur une couche de liposomes supportés ne nous ont pas permis d'observer le mécanisme de fusion jusqu'à 100 μ M de peptide en solution.

III. Publication

Mechanisms of Influenza virus HA2 peptide interaction with liposomes studied by dual-wavelength MP-SPR

*Meryem Belkilani,^{† ‡ §} Carole Farre,[†] Yves Chevalier,[#] Sylvain Minot,[†] François Bessueille,[†]
Adnane Abdelghani,[§] Nicole Jaffrezic-Renault,[†] Carole Chaix^{†*}*

[†]University of Lyon, CNRS, Claude Bernard Lyon 1 University, Institute of Analytical Sciences, 5 rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne, France.

[‡] University of Tunis, ENSIT, av. Taha Hussein, Montfleury, 1008 Tunis, Tunisia.

[§] University of Carthage, INSAT, Research Unit of Nanobiotechnology and Valorisation of Medicinal Plants, 1080 Charguia Cedex, Tunisia.

[#] University of Lyon, CNRS, Claude Bernard Lyon 1 University, LAGEPP, 43 bd 11 Novembre, F-69622 Villeurbanne, France.

* Corresponding authors: carole.chaix-bauvais@univ-lyon1.fr

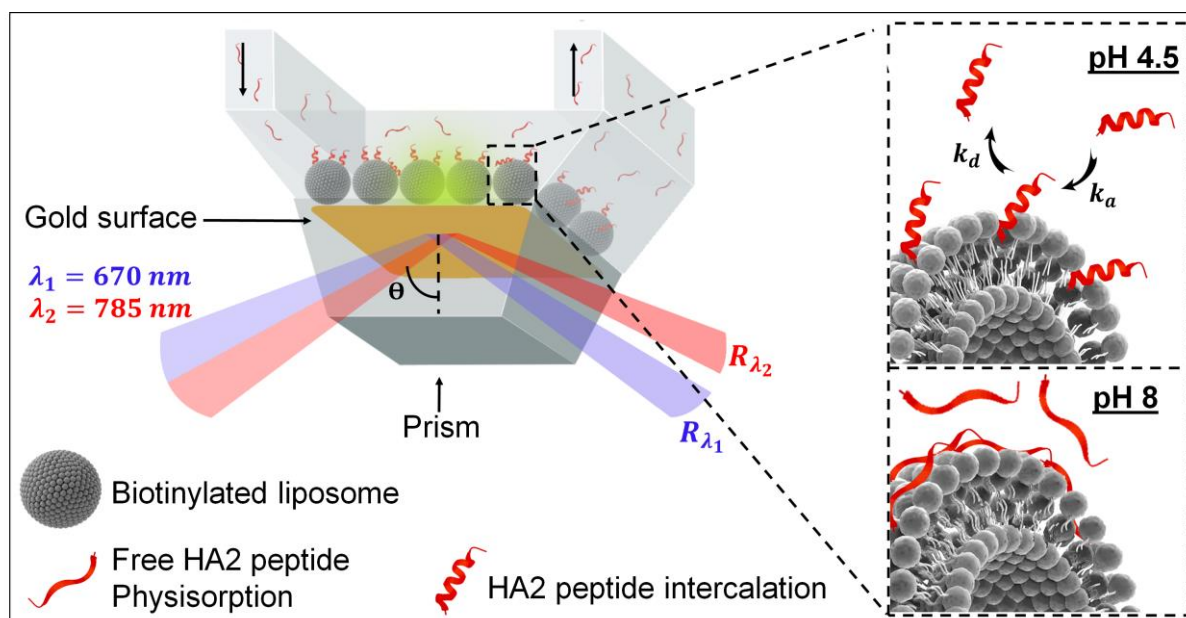
KEYWORDS. Multi-parametric surface plasmon resonance (MP-SPR), Liposome, Streptavidin, HA2 peptide, Phospholipid, Influenza virus.

ABSTRACT

A phospholipid-based liposome layer was used as an effective biomimetic membrane model to study the binding of the pH-dependent fusogenic peptide (E4-GGYC) from the Influenza virus hemagglutinin HA2 subunit. To this end, a multi-parameter surface plasmon resonance approach (MP-SPR) was used for monitoring peptide-liposome interactions at two pH values (4.5 and 8) by means of recording sensorgrams in real-time without the need for labeling. Biotinylated liposomes were firstly immobilized as a monolayer onto the surface of a SPR gold chip coated with a streptavidin layer. Multiple sets of sensorgrams with different HA2 peptide

concentrations were generated at both pHs. Dual-wavelength Fresnel layer modeling was applied to calculate the thickness (d) and the refractive index (n) of the liposome layer in order to monitor the change in its optical parameters upon interaction with the peptide. At acidic pH, the peptide, in its alpha helix form, entered the lipid bilayer of liposomes, inducing vesicle swelling and increasing membrane robustness. Conversely, a contraction of liposomes was observed at pH 8, associated with non-insertion of the peptide in the double layer of phospholipids. The equilibrium dissociation constant $K_D = 4.7 \times 10^{-7}$ M of the peptide/liposome interaction at pH 4.5 was determined by fitting the OneToOne model to the experimental sensorgrams using Trace Drawer™ software. Our experimental approach showed that the HA2 peptide at a concentration up to 100 μ M produced no disruption of liposomes at pH 4.5.

GRAPHICAL ABSTRACT



INTRODUCTION

Surfaces coated with liposomes are excellent biomimetic systems as their structure is similar to cell membranes and other biological barriers mostly consisting of phospholipids. We have used

herein these functional surfaces to study their interaction with HA2 peptide. The HA2 peptide is a 20 amino acid sequence derived from the N-extremity of the second hemagglutinin subunit (HA2) of the Influenza virus.¹ Here, we studied the HA2 peptide with a glutamic acid-substituted glycine at position 4 of the wild-type sequence. Higher fusion efficiency has been proven with this variant.² The COOH end was also modified by adding GGYC amino acids as described in a previous work.³ The HA2 peptide variant is referred to as E4-GGYC throughout this paper. During infection, the hemagglutinin of the Influenza virus operates structural rearrangements through acidification ($\text{pH} \leq 6$), which allow its N-terminal fusogenic sequence to enter the target endosomal membrane.⁴ Structural studies carried out on the HA2 peptide have shown that it adopts an α -helical conformation to trigger fusion.⁵ The three glutamic acids and one aspartic acid residues of the E4-variant are protonated at low pH, inducing a conformation change to a rigid α -helix conformation.^{2,6} Luneberg *et al.* studied the interaction mechanism of the HA2 peptide with phosphatidylcholine liposomes as model membrane.⁷ The fusogenic properties of the HA2 peptide mainly results from the amphipathic structure of the α -helix, all glycines of the sequence being located on one side of the helix, whereas the bulky hydrophobic residues are found at the opposite side of the helix.⁷ They found an oblique insertion of the peptide into the lipid bilayer with an angle of about 45° between the helix axis and the membrane plane using FTIR spectroscopy. This angle was 30° from theoretical calculations in another reference.⁸ The interaction of the AcE4K analog of HA2 peptide with 1-stearoyl-2-oleoyl phosphatidylcholine liposomes was also investigated by Zhelev *et al.* They showed the pH-dependent partitioning in the membrane and the reversibility of the binding, by circular dichroism and fluorescence experiments. They also hypothesized the formation of pores within the membrane at low pH (pH 4.0–4.5), which could cause the leakage of internalized solutes.⁶ The membrane-disrupting properties of HA2 peptide was studied by a liposome leakage assay based on the release of calcein encapsulated inside the vesicles.² The

peptide caused such leakage only at acidic pH, between 4.0 and 6.5. This active peptide with regard to the cell membrane was used to develop new therapeutic approaches. HA2 peptide-polylysine conjugate was developed as a gene-transfer vehicle.² The conjugate was shown to package nucleic acids as a vector that can be released from the endosome under the acidification process. This peptide was also bound on the surface of an oil-in-water nanoemulsion to facilitate transfection and endosome release.³

In recent years, several research papers have been devoted to the study of the mechanisms of interaction between various types of peptides and either lipid bilayers⁹⁻¹² or intact liposome layers¹³⁻¹⁵ supported on solid substrates. These studies were monitored by surface plasmon resonance (SPR), an optical technique based on evanescent waves. SPR is a labeling-free technique suitable for real-time monitoring of interactions between lipid layers bound to the SPR chip surface and their partners in solution (i.e. peptides), providing an estimation of binding affinity and kinetic constants. The thickness (d) and the mean refractive index (n) of the layers deposited on the substrate can also be extracted from the MP-SPR signal through the optical modeling of the full angular spectra.¹⁶⁻¹⁸ These parameters allow a clear description of the layers before and after the interaction with peptides.

Here, we report the monitoring of E4-GGYC interactions with a liposome-supported substrate using a dual-wavelength multi-parameter surface plasmon resonance (MP-SPR) approach based on the Kretschmann configuration. This biomimetic surface elaborated with preformed liposomes (average diameter < 100 nm) is well suited to study the specific interactions with biomolecules. In a previous work, the rupture of liposomes by interaction with monorhamnolipid, an amphiphilic biomolecule, was characterized by MP-SPR.¹⁹

In this study, several sets of SPR sensorgrams were collected with different concentrations of E4-GGYC interacting with liposome-coated surfaces at pH 4.5 and pH 8 so as to investigate their dynamic interactions expressed in terms of the association rate constant (k_a), dissociation

rate constant (k_d) and equilibrium dissociation constant (K_D). The SPR angular spectra calculated using the dual-wavelength Fresnel-layer modeling with Layer Solver™ software were fitted to the experimental sensorgrams to estimate the kinetic variation of the thickness (d) and in the refractive index (n) of the liposome layer.

Complementary information pertaining to interactions between liposomes and E4-GGYC in 3D solution was obtained from Dynamic Light Scattering (DLS) and NanoSight (Nanoparticle-Tracking Analysis, NTA).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Hydrogenated soybean phosphatidylcholine HSPC (Phospholipon 90 H) was a generous gift of Lipoid company, 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[biotinyl(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG), cholesterol (99 %), 11-mercaptopundecanoic acid (MUA), 11-amino-1-undecanethiol hydrochloride, 1-dodecanethiol, streptavidin, 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), ethanolamine, Triton X-100, NaCl, sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4), disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4), tris(hydroxymethyl)aminomethane and mono-rhamnolipid (mono-RL) R95Md (95 % pure rhamnolipids, mono-rhamnolipid dominant) produced by AGAE Technologies LLC (USA) were purchased from Sigma-Aldrich. Chloroform (99.8 %) was from Fisher Chemical, diethyl ether was from Carlo Erba, methanol was from VWR company, and 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) was from Dominique Dutcher company. Ultrapure water was obtained using a Milli-Q system (resistivity = 18.2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$).

The peptide sequence E4-GGYC was purchased from BioMérieux company. This variant was described by Wagner *et al.*² as a highly pH-sensitive membrane-interacting peptide. Its sequence derived from the N-end of the second hemagglutinin subunit (HA2) of the Influenza

virus was NH₂-GLFEAIAGFIENGWEGMIDGGGYC-COOH (molar mass = 2506.8 g/mol). The E4-GGYC purity was 75 % based on HPLC analysis (see Figure S1 in supporting information). The peptide concentration was determined using UV-Vis absorbance (Varian CARY100 Bio) at 280 nm in pH 7 PBS buffer, using the extinction coefficient $\epsilon = 6990$ (1/M.cm). All experiments were carried out using freshly prepared solutions.

Preparation of biotinylated liposomes. Biotinylated liposomes were prepared using the Bangham's "thin layer rehydration" technique²⁰ and a slightly modified protocol from that developed by Zhao *et al.*²¹ for the preparation of small (< 100 nm) liposomes. HSPC, DSPE-PEG and cholesterol (610.8 mg, 9.8 mg and 200 mg respectively) were dissolved in 75 mL of a mixed organic solvent: chloroform, diethyl ether and methanol (5.75:5.75:1 v/v). The amount of biotinylated phospholipids was 1.5 wt % of the total phospholipids. Organic solvents were then evaporated under a reduced pressure of 0.05 MPa in a water bath at 50 °C for 3 hrs using a rotary evaporator (Buchi Rotavapor R-114 with Heating Waterbath B-480 & Glassware-Acomercial). The thin transparent layer in the round bottom flask was hydrated with 25 mL of water at 60 °C by rotating the container for 1 h until the thin layer was completely dispersed in water and a milky suspension was obtained. In order to obtain a homogeneous mixture and reduce the average size of the liposomes, the solution was sonicated for 20 min with a UP400S ultrasound device (Hielscher – Ultrasound Technology Company) at 60 kHz in an ice bath.

Biotinylated liposome characterizations. Hydrodynamic diameters of the liposomes before and after their interaction with E4-GGYC in solution were measured at 25 °C using two methods:

- Dynamic Light Scattering (DLS) with a Zetasizer NanoZS instrument (Malvern Panalytical, Palaiseau, France) operating in backscattering mode at an angle of 173 °. A disposable polystyrene cuvette was filled with 3 mL of a diluted liposome suspension (1:10) in a 0.15 M NaCl solution and in PBS buffers (0.1 M NaH₂PO₄, 0.05 M NaCl, pH 4.5) and (0.1 M

Na_2HPO_4 , 0.05 M NaCl, pH 8). Diameters were calculated based on the intensity distribution of data; they were given as average hydrodynamic diameters \pm standard deviation (*SD*) from three independent measurements with a polydispersity index (*PdI*).

- NanoSight NS300 (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK), equipped with a NS300 flow-cell top plate and a laser diode operating at 405 nm. The data were analyzed using NanoSight Nanoparticle-Tracking Analysis NTA 3.4 Build 3.4.003 software. Liposomes were diluted 2.5×10^5 -fold in PBS due to the relatively low particle concentrations that are required for NTA measurements (10^8 – 10^9 liposomes/mL).²² 500 μL of the liposome solution was incubated with 500 μL of peptide at the final concentrations of 0, 0.5, 2, 5, 7, 10, 25, 50, 75 and 100 μM in PBS at pH 4.5 or pH 8, for 30 min at room temperature. Afterward, 1 mL of each sample was injected into the viewing chamber with a 1 mL syringe. The temperature was maintained at 25 °C. For each measurement, three 30 s videos were captured by a sCMOS camera level of 16 and analyzed by NanoSight NTA Software. The liposome sizes were expressed as the calculated means \pm standard deviation (*SD*) of size distribution.

The surface potential of the liposomes was determined by ζ -potential measurements using a NanoZS Zetasizer instrument (Malvern Panalytical). The measurements were carried out in folded capillary cells DTS 1070 (Malvern Instruments) filled with 800 μL of a diluted liposome suspension (1:10) in 0.15 M NaCl solution, PBS at pH 4.5 and pH 8, and equilibrated at 25 °C for 60 s.

SPR gold chip surface preparation. The SPR gold chips were obtained from BioNavis (BioNavis Ltd., Ylöjärvi, Finland). They are composed of a glass plate, 240 mm² in surface area coated with a 3 nm-thick Cr adhesive layer and a 50 nm-thick gold layer. To remove surface contamination, the SPR gold chips were cleaned before use by a microwave induced plasma (UHP-MW-PC, Diener electronic company, Stuttgart, Germany). Then, the slides were sonicated for 5 min in acetone and next in ultrapure water.

In order to form a dense self-assembled monolayer (SAM) on the gold surface, the Au substrates were dried under a nitrogen flow and immediately immersed in a 1 mM ethanolic solution of 11-mercaptopundecanoic acid (MUA) (acidic SAM), 11-amino-1-undecanethiol hydrochloride (amino SAM), or 1-dodecanethiol (alkyl SAM) for 20 hrs at 4 °C. The chips were then rinsed with ethanol and dried under a gentle nitrogen flow. SPR gold chips functionalized with the different SAMs were stored in an ultrapure water bath and used directly for liposome immobilization.

The streptavidin-coated SPR chip was prepared by derivation of the MUA chip. The latter was incubated in 100 µL of a mixture of 0.2 M EDC and 0.05 M NHS in MES buffer (5 mM MES, pH 5) for 2 hrs at room temperature to activate the carboxylic groups. The activated surfaces were washed in 1 mL of MES buffer and then incubated in 100 µL of a streptavidin solution (1 mg/mL) in PBS (0.1 M NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄, 0.15 M NaCl, pH 7) for 12 hrs at room temperature. Afterwards, the SPR chip surfaces were rinsed with 1 mL of MES buffer, incubated in 100 µL of 10 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (pH = 8.1) or 10 mM 3-dimethylaminopropylamine (pH = 10.0) or 10 mM lysine (pH = 10.5) aqueous solutions for 30 min in order to deactivate all the residual active sites possibly responsible for non-specific binding, and finally rinsed again in 1 mL of ultrapure water.

Multi-parametric-surface plasmon resonance (MP-SPR) measurements. MP-SPR measurements were simultaneously performed at room temperature in both flow channels, at the wavelengths of 670 and 785 nm, with a MP-SPR Navi™ 200 OTSO instrument (BioNavis Ltd., Ylöjärvi, Finland). The intensity of the reflected light was measured at a resonant angle between 40 ° and 78 ° and all dual-wavelength SPR experiments were processed using the BioNavis Data viewer software.

Atomic Force Microscopy (AFM). AFM was used to investigate the surface morphology of the deposited liposomes on a solid surface. Measurements were carried out using Atomic Force

Microscopy (AFM) operating in tapping mode (Nano-Observer AFM Microscope – CSInstrument.eu, Les Ulis, France). A liposome concentration of 1×10^{14} lipo/mL in PBS buffer (pH 4.5) was directly adsorbed on the cleaned SPR gold chip and on the streptavidin-functionalized SPR gold chip for 4 min at a flow rate of 50 μ L/min and the excess of liposomes was subsequently washed. The chip was removed from the MP-SPR instrument, and about 1 mL of PBS buffer (pH 4.5) was gently deposited on the surface to prevent drying during AFM analysis. Topographic images were taken using AppNano Fort A tips with a normal spring constant of 0.6 - 3.7 N/m and a frequency of 30 kHz in liquid medium. Topographic images were generated at different positions of each sample. AFM images were treated with the free software Gwyddion.

Analysis of E4-GGYC interaction with immobilized liposomes. The interaction between E4-GGYC and immobilized liposomes was assessed using the MP-SPR method. After inserting the SPR gold chips functionalized with streptavidin into the BioNavis system, a continuous flow (50 μ L/min) of PBS at pH 4.5 or pH 8 was firstly injected for approximately 20 min until a stable baseline was reached. After stabilization of the signal intensity, a liposome concentration of 1×10^{14} lipo/mL in PBS at pH 4.5 or pH 8 was injected on the streptavidin surface in both flow channels for 4 min at a flow rate of 50 μ L/min. The liposome layer thereby formed on the surface was then used as a model cell membrane surface to study the interaction with E4-GGYC. Peptide solutions were prepared immediately before injection by diluting the E4-GGYC mother solution in the desired volume of PBS buffer.

A peptide concentration range of 5-100 μ M was injected onto the liposome layer. Initial concentrations of 5, 10, and 25 μ M were injected for 4 min at a flow rate of 50 μ L/min onto a newly prepared liposome-functionalized chip. High concentrations of 50, 75 and 100 μ M were successively injected in a serial configuration onto the same liposome-functionalized chip for 4 min at a flow rate of 50 μ L/min.

Each injection was followed by a washing step with the PBS buffer at 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ until the signal was stabilized to obtain a new baseline before another injection could be done. As the liposomes were immobilized on two flow cells, one was used for sample injection and the other was used to inject PBS buffer as reference. The MP-SPR signals vs. time at different E4-GGYC concentrations were recorded. Measurements were triplicated for each E4-GGYC concentration.

Kinetic study of the binding. In order to evaluate the immobilization of liposomes and the binding of E4-GGYC to liposomes, Trace Drawer™ for SPR Navi™ software was used to calculate kinetic parameters and affinity constants. For the calculations, the resulting sensorgrams were extracted via the SPR Navi™ Data viewer software and the dissociation constants (K_D) were calculated.

Biophysical analysis by MP-SPR. The SPR software Navi LayerSolver™ v. 1.2.1 (BioNavis Ltd., Ylöjärvi, Finland), provided as software associated with the MP-SPR instrument, employs the Fresnel-layer matrix formalism²³ to determine the thickness (d) and refractive index (n) of thin layers for a variety of biological applications.^{17-18, 24-25} In the LayerSolver™ analysis software, the reflection spectra calculated from the Fresnel multilayer equations for p-polarized light at both laser wavelengths (670 and 785 nm) were fitted to the experimental SPR reflection spectra to simultaneously determine d and n of the layer at the same time and at the same point.^{17,23} Each layer was treated as an optically homogeneous and independent layer, and characterized by its thickness (d) and its complex refractive index (\tilde{n})²⁶ defined by equation 1:

$$\tilde{n} = n + ik \quad (1)$$

where n is the real part of the complex refractive index that corresponds to the refraction of light and k is the imaginary part corresponding to the absorption of light by the layer.

An algorithm-based dual-wavelength method was used in this work to calculate the optical parameters of the multilayer system. The thickness value (d) was defined as a global variable

for both wavelengths, whereas the complex refractive index was considered as an independent variable for the metal layer modeling ($k \neq 0$) and as a linearly dependent variable between the two wavelengths used for the other organic layers that do not absorb light ($k = 0$). The refractive index of the layer for the second wavelength, $n_{\lambda 2}$, was calculated using equation 2.

$$n_{\lambda 2} = n_{\lambda 1} + \frac{dn}{d\lambda} \times (\lambda 2 - \lambda 1) \quad (2)$$

Mono-rhamnolipid interaction with immobilized liposomes. The same protocol as previously described was used to prepare a liposome layer immobilized on a streptavidin-functionalized gold chip passivated with TRIS. The signal was stabilized for 4 min at a flow rate of 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ in PBS (pH 4.5). Then, a solution of 25 μM E4-GGYC in PBS pH 4.5 was injected at a flow rate of 12 $\mu\text{L}/\text{min}$ for 15 min in channel 1, and in parallel, PBS pH 4.5 was injected at a flow rate of 12 $\mu\text{L}/\text{min}$ for 15 min in channel 2. Then, a solution of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mono-RL in PBS pH 4.5 was injected at a flow rate of 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ for 4 min. The SPR signal was measured at 670 and 785 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical characterization of liposome samples. Biotinylated liposomes were prepared to develop the biomimetic model membrane. Dynamic light scattering (DLS) was used to measure their mean hydrodynamic diameter and the polydispersity index (PDI) in 0.15 M NaCl solution, and in PBS at pH 4.5 and pH 8. The zeta potential of the liposomes was measured on the basis of their electrophoretic mobility. The physicochemical characterizations are given in Table 1.

Table 1. Characterization of liposomes. The average hydrodynamic diameters and zeta potentials are given as mean values \pm standard error of the mean (sem) of three independent measurements. The sem was calculated with equation (S1) (see section 1 in supporting information).

Sample	Diameter (nm)	<i>PDI</i> ^a	Zeta potential (mV)	<i>C_p</i> ^b (mM)	<i>C_l</i> ^c (lipo/mL)	<i>RI</i> ^d
Liposomes/0.15 M NaCl solution	94 ± 3.7	0.14	-6.6 ± 0.8	31	1.94 × 10 ¹⁴	1.338
Liposomes/PBS pH 4.5	98 ± 1.1	0.15	-2.1 ± 0.5	31	1.80 × 10 ¹⁴	1.334
Liposomes/PBS pH 8	99.6 ± 1.2	0.14	-4.0 ± 0.6	31	1.73 × 10 ¹⁴	1.336

^a Polydispersity index, ^b Concentration of phospholipids, ^c Concentration of liposomes, ^d Refractive index

In the different solutions, the liposomes presented an average size smaller than half the value of both wavelengths used in the MP-SPR device, so the SPR evanescent field could penetrate the entire liposome layer. The liposomes maintained their hydrodynamic diameters as well as their negative zeta potential in solution over a period of 6 months ensuring an efficient electrostatic repulsion between them, which prevents their aggregation. Each liposome suspension was carefully controlled for liposome size and ζ -potential before each MP-SPR experiment.

Measurement of the equilibrium dissociation constant K_D of liposome interaction with the functionalized surfaces. The gold surfaces were modified with different self-assembled monolayers (SAMs) of functional α,ω -alkanethiols with varying terminal groups ($-\text{CH}_3$, $-\text{COOH}$, and $-\text{NH}_2$) or with a streptavidin layer, following protocols described in a previous work.¹⁹ Then, liposome immobilization on these surfaces was studied by recording the SPR signal upon injection of different concentrations of the liposome suspension. The binding affinity was assessed by the shift of the SPR angle position θ_{SPR} resulting from the change of refractive index induced by liposome binding. The equilibrium dissociation constants K_D of the interaction between biotinylated liposomes and the $-\text{CH}_3$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$ (see Figure S2 and S3 in supporting information) and streptavidin (Figure S4) functionalized surfaces were

calculated from the different sensorgrams, and displayed in Table 2 (See supporting information in section 3).

Table 2. Binding affinity of liposomes with different functionalized gold surfaces. The dissociation constants (K_D), expressed as molar concentrations of phospholipids, were obtained from the fitting of the sensorgrams extracted with MP-SPR Navi Data viewer. Data were calculated using the “Affinity” model for ($-CH_3$, $-COOH$, $-NH_2$) surfaces and the “OneToOne” model for the streptavidin surface.

Surface	K_D (M)
$-CH_3$	$7.20 \times 10^{-4} \pm 1.01 \times 10^{-4}$
$-COOH$	$1.09 \times 10^{-4} \pm 0.74 \times 10^{-4}$
$-NH_2$	$2.06 \times 10^{-5} \pm 1.20 \times 10^{-5}$
<i>Streptavidin</i>	$9.44 \times 10^{-12} \pm 1.02 \times 10^{-12}$

The results show decreasing dissociation constants K_D corresponding to the increasing affinity of liposomes to the functionalized surface. The affinity increases following the order $CH_3 < COOH < NH_2 < streptavidin$. The interaction with CH_3 , $COOH$ and NH_2 surfaces were driven by either hydrophobic or electrostatic interactions as described in the literature^{19,27} whereas liposome anchoring on the streptavidin layer showed a very strong affinity resulting from the presence of biotin on the liposome surface. The K_D for streptavidin is of the same order of magnitude as that of biotin-streptavidin affinity constant.²⁸⁻²⁹ The latter protocol was selected to elaborate a highly stable liposome-functionalized surface to study the E4-GGYC interaction via MP-SPR.

As a preliminary experiment, the possible unspecific adsorption of the peptide on the streptavidin layer was checked by injection of a 10 μ M peptide solution on the streptavidin-functionalized surface that has been passivated by either 10 mM of an aqueous solution of either

tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS), 3-dimethylaminopropylamine (DMAP), or lysine for 30 min. The peptide was injected in PBS buffer (pH 4.5) for 4 min, followed by a washing step in PBS at pH 4.5 (see Figure S5 in the supporting information). E4-GGYC adsorption on the streptavidin surface passivated with both DMAP and lysine generated a significant increase of the SPR signal, with $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ of ca. 0.73° and 0.53° respectively. Conversely, a negligibly small signal was obtained with the TRIS-passivated surface, indicating a very low degree of unspecific binding. The TRIS protocol was selected to passivate surfaces functionalized with liposomes.

Biotinylated liposomes were deposited on the streptavidin-covered SPR gold chip at a concentration of 1×10^{14} lipo/mL in PBS buffers at pH 4.5 and pH 8. Successful immobilization of the liposome was evidenced by first recording the full SPR angular spectrum. Injection of liposomes at both pHs resulted in fast deposition and generated a significant shift in the SPR angular peak minimum of ca. 1.80° and 1.75° at pH 4.5 and pH 8 respectively, compared to the streptavidin layer (see Figures 1 and S6). The thickness values of the deposited liposome layer at both pHs, before and after rinsing with PBS, and calculated from the fitting of the corresponding SPR curves with LayerSolverTM Software did not show any significant difference. An average thickness of 83 nm and 93 nm of the liposome layer was obtained at pH 4.5 and pH 8 respectively.

The morphology of the streptavidin surface coated with liposomes was characterized by AFM in order to highlight the quality of liposome deposition. Liposomes are challenging objects to image by AFM due to their tendency to collapse during observations because of interactions with the tip.³⁰⁻³³ As a reference, the gold surface roughness was measured through its root mean square roughness ($\text{RMS} \cong 1.53 \text{ nm}$ for images of $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}^2$ area) (see Figure S7 in the supporting information).

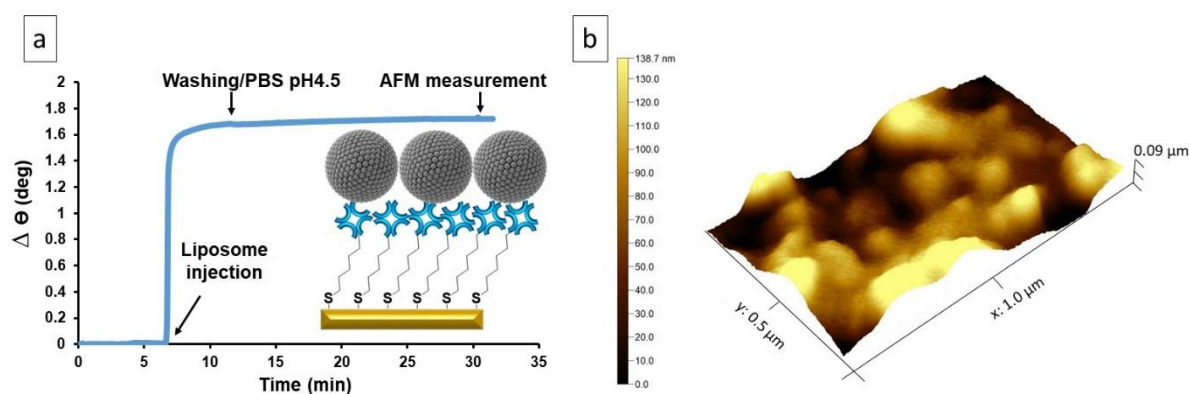


Figure 1. MP-SPR sensorgram of the liposome adsorption on a streptavidin functionalized surface before AFM measurement (a), and AFM topographic image by tapping-mode of the liposome-functionalized surface (b).

The AFM image of liposomes deposited on the streptavidin-functionalized gold surface shows a strong covering of the surface by globular objects (Figure 1). We observed a granulated surface, covered by intact liposomes with an average height slightly greater than 70 nm, close to the mean diameter of liposomes in aqueous suspension. The covering was formed by a monolayer of liposomes, lighter areas of the image may correspond to larger liposomes. These results showed that the biotin–streptavidin interaction promoted the adhesion of a dense layer of liposomes without changing their shape. This result is in agreement with the AFM characterization of biotinylated liposomes interacting with a streptavidin-functionalized glass surface reported by Takechi-Haraya *et al.*³³ showing that the shape of the liposomes was not impacted by their immobilization.

MP-SPR analysis of peptide interaction with the model membrane. The interaction of E4-GGYC with liposome-coated surface was investigated by recording full SPR angular spectra as a function of time. 5, 10 and 25 μM peptide solutions in PBS pH4.5 were injected at a constant flow rate of 50 $\mu\text{L}/\text{min}$.

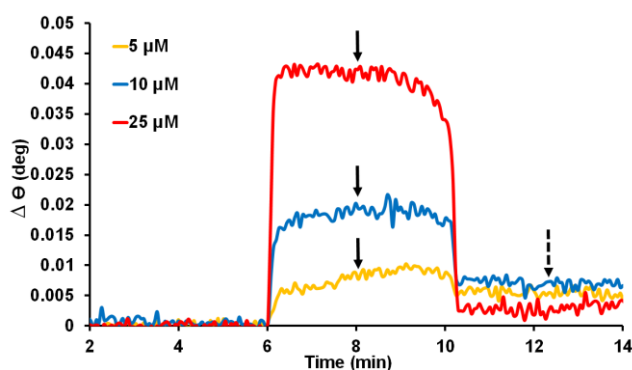


Figure 2. Superimposed sensorgrams (normalized peak angular position vs time) recorded during injection of 5–25 μM E4-GGYC peptide at pH 4.5 on the liposome-functionalized surface. The arrows indicate the positioning for d and n calculations (Table 3) at 670 nm.

Figure 2 shows that the interaction of the peptide with the liposome layer induced an increase in the SPR signal at pH 4.5. This increase was related to the concentration of peptide during the injection. It is worth noting that the injection of 10 μM of peptide at pH 4.5 resulted in an angle change of approximately $+0.02^\circ$, whereas no significant change in the SPR angle was measured when the same concentration was allowed to interact with only the streptavidin layer passivated with TRIS (see Figure S5 in the supporting information). This confirmed that the signal variation measured during peptide interaction with the liposome layer reflects the actual peptide-liposome interaction and not peptide-streptavidin interaction.

Most notably, the sensorgrams indicate that the peptide/liposome association process is rapid, and reaches a stable state during the peptide injection. This suggests that the peptide is adsorbed onto or inserted into the lipid bilayer of liposomes during the injection period. Relative reversibility of the interaction was observed when the injection solution was changed to PBS solution at pH 4.5.

Figure 3 shows the measured and fitted SPR curves from real-time experiments after each injection of peptide onto the liposome layer at pH 4.5. The main SPR peak angular position shifted to higher angles with the addition of increasing concentrations of peptide at pH 4.5. The

curves were fitted separately with LayerSolver™ software, by considering each layer as a single optically homogeneous layer. The fit of this model to the experimental data was very good.

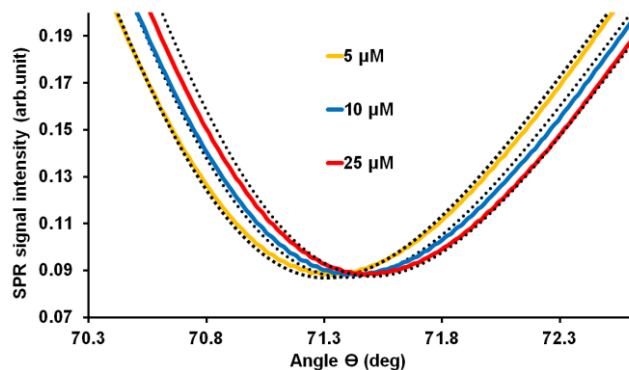


Figure 3. SPR peak full angle scans measured at 670 nm of the liposome-supported surfaces after injection of 5–25 μM E4-GGYC solutions at pH 4.5 (solid curves), with corresponding fits from LayerSolver™ modeling (dotted curves). The SPR curve corresponding to each concentration was taken at the equilibrium of peptide/liposome interaction for the modeling by LayerSolver™ software.

The modeling was started by determining the optical properties of the layers constituting the functionalized SPR gold chip, such as the chromium 'Cr' adhesion layer and the gold 'Au' layer of the cleaned SPR gold chip, as well as the two organic deposited layers of MUA and streptavidin. These calculations were based on the stepwise numerical iteration procedure in LayerSolver™, where the previous layer acted as a background to solve the optical parameters of the next layer.¹⁹ The obtained parameters were maintained fixed and used as a basis for calculating the optical thickness (d) and the real refractive index (n) of the deposited liposome layer before and after injection of the different peptide concentrations.

The experiments were performed maintaining the same buffer for i) liposome deposition, ii) E4-GGYC binding, and iii) washing step to minimize the variation in refractive index caused by the buffer and to facilitate the interpretation of the experimental data.

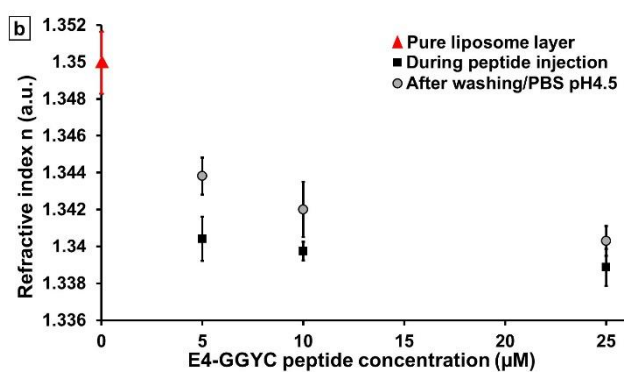
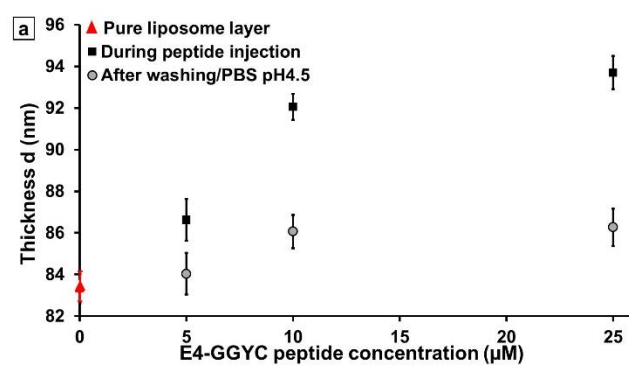
According to the calculation, the addition of liposomes in PBS to the streptavidin surface generated a layer with an average thickness of $d = 83$ nm and a refractive index of $n = 1.34997$ at pH 4.5. The refractive index values of the liposome layer give an indication of the lipid/buffer ratio in the liposomes. The refractive index of the phospholipid reported in the literature was around 1.435–1.450,³⁴ while that of PBS was of 1.3352 at pH 4.5 (experimental data).

The resulting SPR curve in Figure S6.a (blue curve) showed a full SPR angular spectra without the formation of a waveguide peak in the vicinity of the total internal reflection (TIR) angle.^{17,26} This was due to the fact that the liposome thickness formed on the surface was well below the penetration depth of the evanescent field ($< 1/2 \lambda_1$ and $1/2 \lambda_2$). In this case, the SPR evanescent field allowed the detection of extremely small optical changes in the liposome layer during interaction with peptides. The variation of thickness (d) and refractive index (n) of the liposome layer during interaction with E4-GGYC were calculated from SPR LayerSolver™ simulations. Data are presented in Table 3. Figure 4a-b illustrate, in graph form, the variation of the calculated optical parameters (d and n) for the liposome layer as a function of injected peptide concentration at pH 4.5. The modeling was performed before and after the washing step with PBS.

Table 3. Thickness (d , nm), refractive index (n , RIU) of the liposome layer as well as the phospholipid concentration (C_p , g/cm³) after each E4-GGYC injection (5-25 μ M) and after each washing with PBS at pH4.5. The values represent the average (\pm standard deviation) of three independent calculations by the SPR LayerSolver™ simulation.

Peptide concentration (μM)	During peptide injection	Washing with PBS pH4.5
5	$d = 86.62 \pm 1.00$ $n = 1.34041 \pm 0.00120$ $Cp = 0.08585 \pm 0.00265$	$d = 84.03 \pm 0.98$ $n = 1.34381 \pm 0.00100$ $Cp = 0.08849 \pm 0.00072$
10	$d = 92.05 \pm 0.70$ $n = 1.33974 \pm 0.00050$ $Cp = 0.08078 \pm 0.00045$	$d = 86.06 \pm 0.80$ $n = 1.34200 \pm 0.00150$ $Cp = 0.08641 \pm 0.00133$
25	$d = 93.70 \pm 0.90$ $n = 1.33886 \pm 0.00100$ $Cp = 0.07936 \pm 0.00152$	$d = 86.27 \pm 1.10$ $n = 1.34030 \pm 0.00080$ $Cp = 0.08620 \pm 0.00121$

Pure liposome layer; $d = 83.30$ nm, $n = 1.34997$, $Cp = 0.08925$ g/cm³



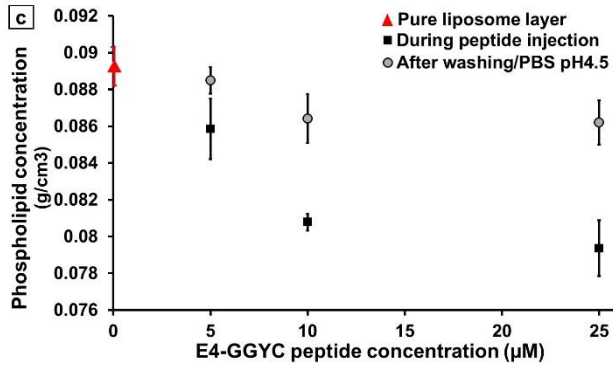


Figure 4. Effect of 5-25 μM E4-GGYC injection on the thickness d (a), refractive index n (b) and concentration of phospholipids C_p (c) of the immobilized liposome layer at pH 4.5, before and after the washing step in PBS, pH 4.5.

Figure 4.a shows that the liposome layer thickness increases from 83.3 nm to 93.7 nm upon addition of the peptide at pH 4.5 (data reported in Table 3). This progressive increase in thickness is accompanied by a decrease in the refractive index (n) from 1.34997 to 1.33886 (refractive index of the layer after 25 μM peptide injection) as shown in Figure 4b.

The angular shift in SPR peak minimum of an optically homogeneous layer according to the well-established Jung model³⁵ is proportional to d and n via equation 3.

$$\Delta\theta_{SPR} = S(n_L - n_b)[1 - e^{(-\frac{d}{\delta})}] \quad (3)$$

where S is the sensitivity factor per refractive index unit (deg), n_b and n_L are the bulk and layer refractive indices respectively, δ is the decay length of the intensity of the evanescent electric field and d is the thickness of the layer.

On the basis of this equation, it is clear from the simulated curves that the SPR response was mainly induced by the variation of the layer thickness (d). The multiple parameters extracted from simulated fits of the full SPR angular spectra measured in real-time during peptide-liposome interactions provide a means to explain the origin of the SPR response.

Thanks to the theoretical calculation, we were able to estimate the concentration of phospholipids (C_p) in the initial liposome layer as well as its variation due to E4-GGYC injection (Figure 4.c). This calculation was achieved in order to better understand the peptide effect on the liposome layer. The concentration of phospholipids in the initial liposome layer (before peptide injection) was calculated using equation (S5) provided by Feijter's formula. The resulting phospholipid concentration in the liposome layer after each peptide injection was calculated by considering that the increase in calculated thickness d was an increase in volume of the liposome layer, and thus a change in phospholipid concentration. The C_p values calculated after the injection of 5–25 μM peptide using equation (S6) are presented in Table 3. Hence, C_p was estimated at 0.08925 g/cm^3 for the initial liposome layer. The concentration decreased in the presence of peptide, down to $C_p \sim 0.07936 \text{ g/cm}^3$ at 25 μM peptide injection. Thus, we could hypothesize that during the injection of 5–25 μM peptide at pH 4.5, it penetrates the liposome membrane, probably causing the formation of pores in the membrane as described in the literature,⁶ followed by the swelling of the liposomes by buffer flux. This leads on the one hand to an increase in the thickness due to the swelling and on the other hand, to a decrease in the refractive index of the layer induced by a larger volume of buffer inside the liposomes, which also explains the decrease in phospholipid concentration. Upon switching the medium to buffer (washing step), the calculated values of thickness, refractive index as well as phospholipid concentration proved that the swelling stopped and the peptide desorbed. The calculated values suggested a partial deflation of the liposome layer without perfectly returning to the initial values of the native layer.

In our case, we were unable to confirm the complete reversibility of the peptide insertion into the membrane as was previously shown by Longo *et al.*³⁶⁻³⁷ and Zhelev *et al.*⁶ Longo *et al.* showed that the Influenza fusion peptide (wt-20 HA2 peptide) rapidly inserts in the membrane at low pH and that insertion was mainly reversed by rinsing the membrane with buffer. Zhelev

et al. studied the interaction of the HA2 peptide analog (AcE4K) with phosphatidylcholine liposomes and proved that the binding of the peptide increases as the pH decreases to pH 4.5, and the insertion proved to be reversible. They also observed that the peptide insertion in the lipidic membrane does not affect the membrane permeability for water, which shows that the peptide at concentrations $\leq 10 \mu\text{M}$ does not substantially perturb the packing of the hydrocarbon region. However, the ability of the membrane to retain solutes in the presence of peptide proved to be compromised, suggesting that the inserted peptide promotes the formation of short-lived pores. This point was confirmed by our theoretical calculations when the refractive index n of the liposome layer decreased following the injection of 5–25 μM peptides at pH 4.5. We suggested that nanopores created by peptides upon insertion into the lipidic membrane facilitate the flux of buffer, which decreases the calculated concentration of phospholipids.

Kinetics of peptide interaction with liposomes at pH 4.5. The sensorgrams resulting from the E4-GGYC/liposome interactions at pH 4.5 were analyzed through Trace Drawer™ software to perform a kinetic study of the interactions. The fitting model adopted was the simple Langmuir binding, “one-to-one” reaction model (equation S3). The sensorgrams obtained at 5–25 μM peptide concentrations were fitted simultaneously to calculate the equilibrium dissociation constant (K_D). The binding mechanism described by this model is that of the peptide (P), which represents the analyte in solution, inserted in the immobilized liposome (L) as a ligand. During the process, the association (k_a) and dissociation (k_d) rate constants control the formation of the complex (PL) at the surface, as shown in equation 4.



Figure S8.a represents the overlay between experimental sensorgrams and fitted curves, while in Figure S8.b, the fitting residual values after subtraction from the experimental sensorgrams are shown. Satisfactory fits were obtained using the one-to-one binding model. The kinetic parameters obtained from the fitting are reported in Table 4. The peptide was inserted in the

liposome membrane with a K_D of 4.5×10^{-7} M. This result was in good agreement with the K_D calculated by Rafalski *et al.* from fluorescence measurements of HA2 peptide binding to liposome vesicles ($K_D \sim 8 \times 10^{-7}$ M).¹

Table 4. Kinetic parameters obtained from the fitting of the MP-SPR sensorgrams of E4-GGYC/liposome interaction.

	$k_a (10^5)(1/M \times s)$	$k_d (10^{-1})(1/s)$	$K_D (10^{-7})(M)$
Peptide	2.820 ± 0.005	1.23000 ± 0.00006	4.50 ± 0.03

Effect of pH on peptide-lipid membrane interaction. We also studied the SPR response induced by the injection of peptide solutions at basic pH. Figure 5 shows the superimposed sensorgrams for 5-25 μ M E4-GGYC injections at pH 4.5 and pH 8.

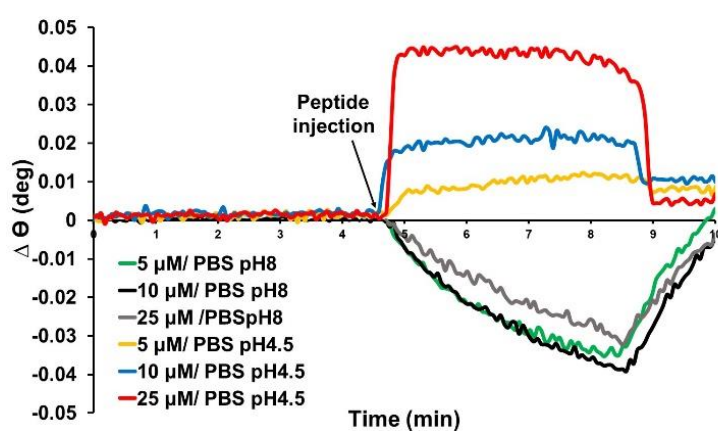


Figure 5. Superimposed sensorgrams of 5-25 μ M E4-GGYC injections at pH 4.5 and pH 8 on the liposome-coated surface.

Sensorgrams revealed two different SPR responses, probably resulting from a different mechanism of interaction at both pHs. As a control, a study carried out in PBS at pH 4.5 and

pH 8 confirmed that the SPR signal of the liposome-functionalized surface was stable upon pH variation.

Different binding kinetics in both association and dissociation rates were observed at pH 4.5 compared to pH 8. As shown, the same peptide concentrations injected at pH 8 led to a slow decrease in the signals regardless of the concentration used. The interaction kinetics were much slower than those observed at pH 4.5, and did not reach a stable signal within the injection time of 4 min. However, when the liposomes were rinsed with PBS (pH 8), the SPR angle started to increase again and about 4 min were required to reach the baseline.

Shifts in SPR signals were clearly concentration dependent for the peptide at pH 4.5, but not for pH 8, for which the variations in the SPR angles were similar for all concentrations tested. These results indicate that E4-GGYC has different modes of interaction with liposomes when moving from acidic to basic pH.

The negative shift in the SPR angle probably originates from morphological changes in the liposome monolayer. This suggests that injected peptide at basic pH probably induces a contraction of the liposomes accompanied by a return to their initial shape after rinsing. A similar behavior was shown by the studies of Viitala *et al.*²⁶ Cuerrier *et al.*³⁸ and Chabot *et al.*³⁹ Viitala *et al.* reported from MP-SPR studies that the simulation of MDCKII cells with the D-mannitol and propranolol drugs resulted in a negative shift in the angular position of the SPR peak minimum during cell stimulation and this was induced by the contraction of the cells. Cuerrier *et al.* and Chabot *et al.* showed that morphological changes in cells, i.e. contraction of cells, induced a negative SPR shift in the reflection intensity measured at a fixed angle. The studies carried out by MP-SPR at pH 8 do not allow us to conclude on the absence of interaction between E4-GGYC and liposome in this buffer. It will therefore be interesting to relate these studies to the results obtained by DLS and NTA to clearly conclude on the pH-dependence of the E4-GGYC/liposome interaction.

Peptide effect on liposome size in solution. The size and the polydispersity index (*Pdl*) of liposomes represent pertinent parameters for their characterization.⁴⁰ These parameters can provide information on their stability and, as such, can allow a qualitative assessment of their interaction with E4-GGYC in our study. Thus, synthesized liposomes were suspended in PBS at pH 4.5 and pH 8 and hydrodynamic diameters of 98 nm and 99.6 nm were recorded by DLS, respectively. These solutions were then incubated for 30 min at room temperature with increasing concentrations of E4-GGYC (from 0.5 to 10 μ M) in PBS at both pHs. The evolution of the hydrodynamic diameter and the polydispersity index (*Pdl*) of the liposomes was then controlled by DLS and Nanosight (NTA) techniques (Figure 6). The results clearly demonstrated that increasing concentrations of E4-GGYC in PBS at pH 4.5 induced a rise in liposome size, whereas the *Pdl* remained relatively low. This strongly suggested that 0.5–10 μ M peptide didn't induce any liposome aggregation, or destruction. On the other hand, increasing concentrations of peptide from 0.5 to 10 μ M in PBS at pH 8 did not promote any significant change in liposome size, as hydrodynamic diameters and *Pdl* values remained almost stable. Nanoparticle-Tracking Analysis (NTA) experiments by NanoSight revealed the same behavior. The size of the liposomes measured by NTA increased as a function of peptide concentrations, between 0.5 and 10 μ M at pH 4.5, without reaching a plateau as observed by DLS. The difference in size between the two pH values was smaller by NTA measurements. It is known that the DLS measurement of the average hydrodynamic diameter is more impacted by the presence of aggregates, in a very small amount, than the NTA measurement.⁴¹ Nevertheless, both techniques confirmed the results obtained by MP-SPR and showed the different behavior of E4-GGYC towards liposomes at pH 4.5 and pH 8.

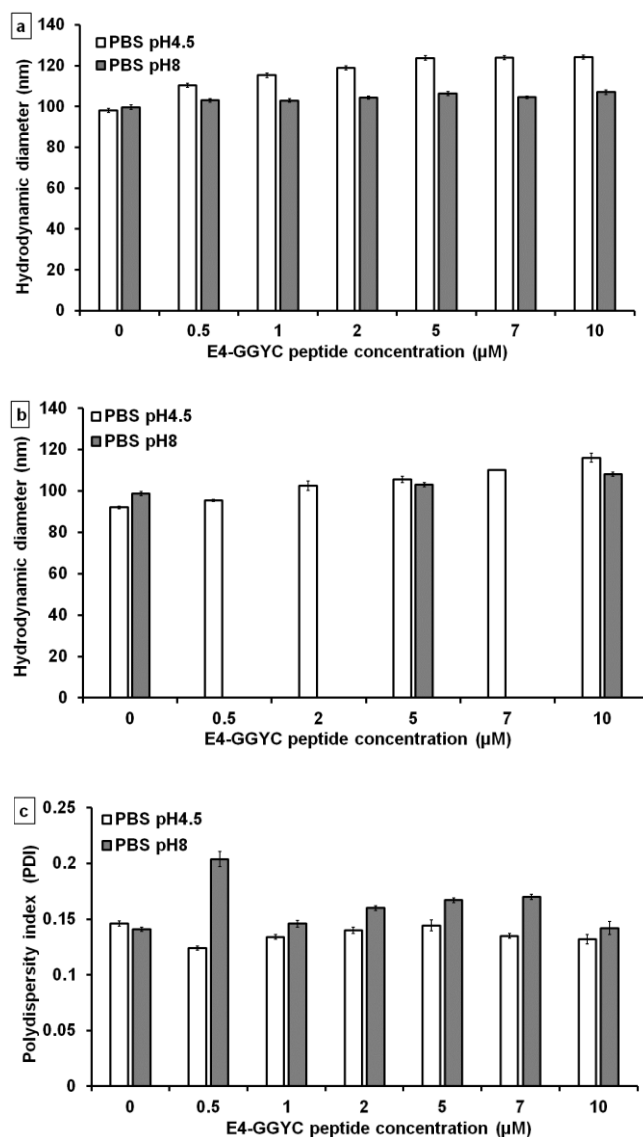


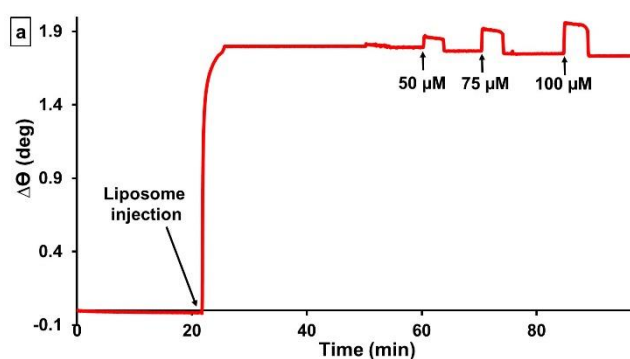
Figure 6. Effects of liposome incubation with increasing concentrations of E4-GGYC in PBS pH 4.5 and pH 8 on hydrodynamic diameter measured by DLS (a), NTA (b) and Polydispersity index (*PDI*) by DLS (c).

For the study, we were not able to increase the peptide concentration beyond 10 μM . Aggregates between peptides and liposomes were observed, which prevented us from obtaining interpretable data. This observation was in agreement with results reported by Zhelev *et al.*, who also described an aggregation of a similar peptide (AcE4K) at a concentration $\geq 10 \mu\text{M}$ and under $\text{pH} < 6$, in the presence of liposomes in solution. Whereas the aggregation of peptide

was not observed by light scattering at 10 μM of a pure peptide solution, it precipitated from the solution only in the presence of liposomes when the pH was below 6.⁶

By these results, we confirmed the swelling process of liposomes at pH 4.5 by DLS and NTA, up to 10 μM of peptide in solution. For higher concentrations of peptide, peptide-liposome conjugates started to aggregate and precipitated, disturbing the DLS and NTA measurements, but not the MP-SPR response monitored on liposome-functionalized substrates. In the literature, the liposome swelling in a solution of 10 μM HA2 peptide was described by Zhelev *et al.* Similarly to our DLS results, they also confirmed that the peptide-liposome conjugates deteriorated with time in peptide solutions at concentration $\geq 10 \mu\text{M}$. The authors then concluded that the lipid membrane was broken by a possible fusion process. Thanks to our results obtained by MP-SPR, we were able to monitor the peptide/liposome interaction up to 25 μM peptide, showing a partial reversibility of the binding without disruption of the liposome layer.

Disruption assays of the supported liposome layer. In an attempt to destroy the liposome layer, we carried out the experiment with increasing peptide concentrations up to 100 μM . Figure 7.a shows the full real-time sensorgrams of the main SPR peak angular position for 50, 75 and 100 μM E4-GGYC at pH 4.5. With regard to the MP-SPR results, we were able to conclude that the interaction of E4-GGYC at pH 4.5 with the lipid layer up to 100 μM did not induce any perturbation of the membrane leading to the disruption of the liposomes. Indeed, we did not observe a drop in the SPR signal that could correspond to this degradation.



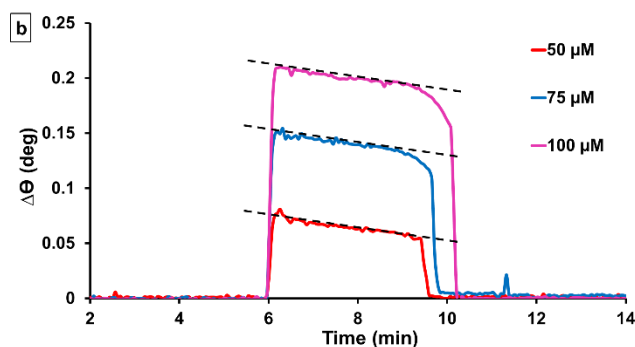


Figure 7. The full sensorgram (a) and the superimposed sensorgrams (b) measured at a wavelength of 670 nm, during the interaction 50-100 μ M E4-GGYC at pH 4.5 on immobilized liposomes.

Compared to Figure 2, the sensorgram in Figure 7.b revealed that E4-GGYC at acidic pH and at a concentration higher than 25 μ M bound differently to the liposome surface. Here, the initial peptide/liposome association mechanism was also rapid. But after that, the signal slowly decreased over time until the end of the peptide injection without reaching a steady state. Upon switching to PBS pH 4.5, a rapid drop in SPR signal to the baseline was recorded. Between small and high concentrations, we noticed that there was a probable transition in the mode of action of the peptide with the layer of liposomes. This observation was consistent with the shape of the sensorgram, showing a plateau of the signal during injection of 5-25 μ M peptide (Figure 2), whereas a steady state was not observed during injection of 50-100 μ M peptide (Figure 7.b). This allows us to hypothesize that the peptide concentration of 25 μ M was a critical concentration to saturate the membrane of the liposome layer. At 50-100 μ M, the peptide first inserted into liposomes until saturation, then the excess peptide continued to adsorb onto the surface of the lipid layer, again causing an increase in the SPR signal related to peptide concentration.

Once a maximum amount of peptide was inserted and saturated the liposome membrane, the vesicular structure of the liposome was not destroyed. These results suggested that the insertion

of E4-GGYC at pH 4.5 into the lipid bilayer increased the robustness of the liposome membrane. This point was experimentally investigated in the following experiment.

The stability of the lipidic membrane and its robustness were studied after the injection of 25 μM E4-GGYC on a liposome-functionalized chip. In a previous work, the rupture of liposomes by interaction with mono-rhamnolipid (mono-RL), a biosurfactant, was proven by MP-SPR.¹⁹ Here, a solution of mono-RL was injected onto the liposome layer after the injection of peptide at pH 4.5, and in parallel onto a peptide-free liposome layer as a reference (Figure 8). The protocol was applied as described in the experimental part, i.e.: step (1) preparation of a liposome-functionalized substrate in PBS at pH 4.5, step (2) injection of 25 μM E4-GGYC in PBS at pH 4.5 (red curve), and in parallel, injection of PBS at pH 4.5 (blue curve), step (3) injection of mono-RL at a concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the same phosphate buffer.

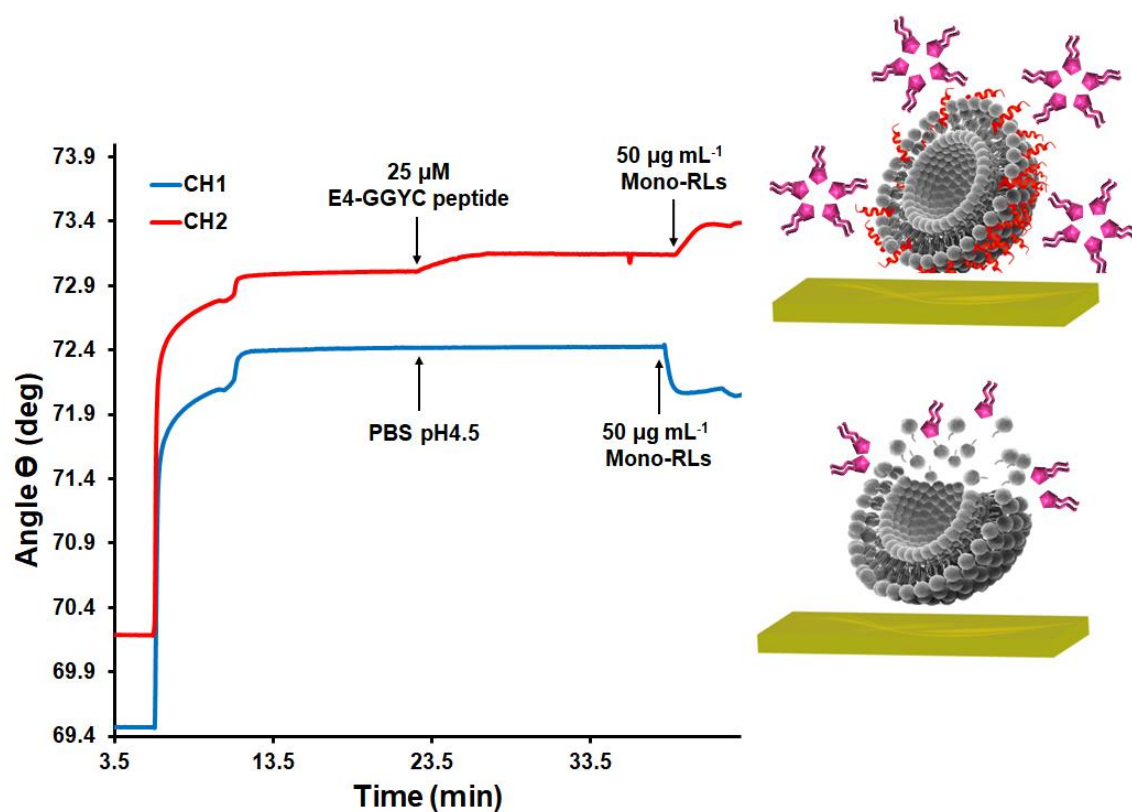


Figure 8. Sensorgrams measured in PBS pH 4.5 and at 670 nm wavelength during mono-RL injection at a concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$ on a pure liposome layer (CH1) and on a liposome layer saturated with 25 μM of E4-GGYC peptide at pH 4.5 (CH2).

During E4-GGYC injection (Figure 8, red curve), we observed a progressive increase in the SPR angle, followed by a stabilization of the signal to a plateau. This variation was characteristic of peptide insertion into the lipid membrane. The subsequent step was the injection of mono-RL in order to study its interaction with the lipidic membrane. The addition of mono-RL led to a further increase in the SPR angle. Thus, the positive change in SPR angle was proportional to the amount of mono-RL deposited on the surface. By contrast, injection of mono-RL onto the peptide-free liposome layer resulted in a significant drop of the SPR signal, showing that mono-RL interacted with liposomes, and started to destroy them. The disruption of tethered liposomes by mono-RL has already been described by our group.¹⁹ We reported that the liposome layer immobilized on a support could be disrupted and restructured with loss of phospholipid material by the action of mono-RL. A clear drop in the SPR signal was observed and optical parameters (d and n) calculated by MP-SPR confirmed the formation of the phospholipid bilayer after complete degradation.¹⁹ Likewise, Bombard *et al.* described the disruption of a liposome-supported surface by an amphiphilic peptide (AH peptide from the Hepatitis C virus) using Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRi) and BALM technique. They recorded an increase in SPRi signal (reflectivity) just after injection of the fusogenic peptide onto the liposome layer, indicating liposome swelling, and afterwards a remarkable signal drop, reflecting lipid material loss and liposome disruption.

Our results confirmed that the presence of E4-GGYC inserted in the double lipid layer of liposomes inhibited mono-RL-triggered disruption by enhancing membrane robustness. In the literature, a number of studies have shown that the HA2 peptide intercalates in the outer leaflet

of the lipid bilayer, increasing the ordering in the head groups of this layer, and thus increasing its robustness.⁴²⁻⁴⁴ Furthermore, studies revealed that the peptide does not cross the double phospholipid layer and remains positioned in the outer part of the membrane.⁴³ It has been described that the coupling between the hardened outer leaflet due to peptide insertion and the softer inner leaflet generates bending stresses in the bilayer. The authors suggested that these stresses may initiate the membrane fusion. In our case, the results obtained by SPR on a layer of supported liposomes did not allow us to observe the fusion mechanism up to 100 μ M peptide in solution.

CONCLUSION

The interaction of E4-GGYC, an analog of HA2 peptide of Influenza virus hemagglutinin, with a biomimetic surface formed with liposomes grafted on a gold substrate was studied by the MP-SPR method. A biotin/streptavidin binding strategy was developed to create a stable layer of liposomes with high coverage, as characterized by AFM. The SPR signal variation clearly illustrated the strong binding of the biotinylated liposomes to the streptavidin-functionalized surface with a calculated K_D of $9.44 \cdot 10^{-12}$ M. We demonstrated the capacity of the MP-SPR technique to characterize the variation of the liposome layer morphology upon injection of E4-GGYC at pH 4.5 and pH 8 and we revealed different interaction mechanisms. At pH 4.5, the peptide first inserted into the liposome membrane to saturation, and then adsorbed on the surface at high concentration, whereas the interaction mechanism did not follow the same mechanism at pH 8. The negative shift in the SPR angle observed upon peptide injection at pH 8 probably originated from morphological changes in the liposome layer. The binding sensorgrams of 5–25 μ M peptide with the liposome layer at pH 4.5 were fitted to calculate an equilibrium dissociation constant K_D of $4.50 \cdot 10^{-7}$ M. In our study, MP-SPR studies showed that liposomes swelled in the presence of peptides in the circulating solution at pH 4.5. This

assumption was proven theoretically by calculating the thickness (d) and refractive index (n) of the liposome layer by the SPR Navi LayerSolver™ software. This pH-dependent swelling was confirmed in solution by Dynamic Light Scattering (DLS) and a NanoSight Nanoparticle-Tracking Analysis (NTA). High concentrations of peptide up to 100 μ M did not break down the structure of the liposomes grafted on the surface. Our studies also revealed that peptide insertion increased the robustness of the lipid membrane. The well-known disruption mechanism by mono-rhamnolipids did not occur after peptide insertion into the liposome membrane. As a further conclusion, MP-SPR analyses of E4-GGYC peptide interaction with immobilized liposomes did not allow us to observe the fusion mechanism up to 100 μ M peptide in solution. In view of the studies presented here, we believe that our MP-SPR approach on liposomes immobilized on solid substrates can provide real-time complementary information for a better mechanistic understanding of biomolecule/lipid membrane interaction.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Tunisian government for financial support of Meryem Belkilani's PhD thesis. The authors also acknowledge Silvia BREUSA (University of Claude Bernard Lyon 1) for the NTA measurement.

SUPPORTING INFORMATION

Error calculation (section 1), E4-GGYC characterization by HPLC (section 2), SPR analysis of liposome immobilization on functionalized surfaces (section 3), passivation of the streptavidin-functionalized surface (section 4), SPR curve modeling before and after liposome injection (section 5), gold surface characterization by AFM (section 6), calculation of the phospholipid concentration in the liposome layer (section 7), fitting and subtraction of the fitted curves of peptide/liposome interaction (section 8)

ABBREVIATIONS

MP-SPR, Multi-parametric surface plasmon resonance; MUA, 11-mercaptoundecanoic acid; PBS, phosphate buffered saline; DLS, Dynamic Light Scattering; *PdI*, polydispersity index; SAM, self-assembled monolayers; *SD*, standard deviation; θ_{SPR} , SPR angular peak minimum, Mono-RL, mono-rhamnolipid.

REFERENCES

- (1) Rafalski, M.; Ortiz, A.; Rockwell, A.; Van Ginkel, L. C.; Lear, J. D.; DeGrado, W. F.; Wilschut, J. Membrane Fusion Activity of the Influenza Virus Hemagglutinin: Interaction of HA2 N-Terminal Peptides with Phospholipid Vesicles. *Biochemistry* **1991**, *30* (42), 10211–10220.
- (2) Wagner, E.; Plank, C.; Zatloukal, K.; Cotten, M.; Birnstiel, M. L. Influenza Virus Hemagglutinin HA-2 N-Terminal Fusogenic Peptides Augment Gene Transfer by Transferrin-Polylysine-DNA Complexes: Toward a Synthetic Virus-like Gene-Transfer Vehicle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, *89* (17), 7934–7938.
- (3) Chaix, C.; Pacard, E.; Elaïssari, A.; Hilaire, J.-F.; Pichot, C. Surface Functionalization of Oil-in-Water Nanoemulsion with a Reactive Copolymer: Colloidal Characterization and Peptide Immobilization. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2003**, *29* (1), 39–52.
- (4) Skehel, J. J.; Cross, K.; Steinhauer, D.; Wiley, D. C. Influenza Fusion Peptides. *Biochem. Soc. Trans.* **2001**, *29* (4), 623–626.
- (5) Russell, C. J. Orthomyxoviruses: Structure of Antigens. *Ref. Module Biomed. Sci.* **2016**.
- (6) Zhelev, D. V.; Stoicheva, N.; Scherrer, P.; Needham, D. Interaction of Synthetic HA2 Influenza Fusion Peptide Analog with Model Membranes. *Biophys. J.* **2001**, *81* (1), 285–304.
- (7) Lüneberg, J.; Martin, I.; Nüßler, F.; Ruyschaert, J. M.; & Herrmann, A. Structure and topology of the influenza virus fusion peptide in lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (46), 27606–27614.
- (8) Vaccaro, L.; Cross, K. J.; Kleinjung, J.; Straus, S. K.; Thomas, D. J.; Wharton, S. A.; Skehel, J. J.; Fraternali, F. Plasticity of Influenza Haemagglutinin Fusion Peptides and Their Interaction with Lipid Bilayers. *Biophys. J.* **2005**, *88* (1), 25–36.
- (9) Mozsolits, H.; Aguilar, M.-I. Surface Plasmon Resonance Spectroscopy: An Emerging Tool for the Study of Peptide–Membrane Interactions. *Pept. Sci. Orig. Res. Biomol.* **2002**, *66* (1), 3–18.

-
- (10) Zhang, L.; Longo, M. L.; Stroeve, P. Mobile Phospholipid Bilayers Supported on a Polyion/Alkylthiol Layer Pair. *Langmuir* **2000**, *16* (11), 5093–5099.
- (11) Luchini, A.; Tidemand, F. G.; Johansen, N. T.; Campana, M.; Sotres, J.; Ploug, M.; Cárdenas, M.; Arleth, L. Peptide Disc Mediated Control of Membrane Protein Orientation in Supported Lipid Bilayers for Surface-Sensitive Investigations. *Anal. Chem.* **2019**, *92* (1), 1081–1088.
- (12) Hwang, B.; Ise, H. Multimeric Conformation of Type III Intermediate Filaments but Not the Filamentous Conformation Exhibits High Affinity to Lipid Bilayers. *Genes Cells* **2020**, *25* (6), 413–426.
- (13) Skyttner, C.; Enander, K.; Aronsson, C.; Aili, D. Tuning Liposome Membrane Permeability by Competitive Coiled Coil Heterodimerization and Heterodimer Exchange. *Langmuir* **2018**, *34* (22), 6529–6537.
- (14) Bompard, J.; Maniti, O.; Aboukhachfe, R.; Ausserre, D.; Girard-Egrot, A. BALM: Watching the Formation of Tethered Bilayer Lipid Membranes with Submicron Lateral Resolution. *Langmuir* **2021**, *37* (31), 9457–9471.
- (15) Chadli, M.; Rebaud, S.; Maniti, O.; Tillier, B.; Cortès, S.; Girard-Egrot, A. New Tethered Phospholipid Bilayers Integrating Functional G-Protein-Coupled Receptor Membrane Proteins. *Langmuir* **2017**, *33* (39), 10385–10401.
- (16) Parkkila, P.; Elderdfi, M.; Bunker, A.; Viitala, T. Biophysical Characterization of Supported Lipid Bilayers Using Parallel Dual-Wavelength Surface Plasmon Resonance and Quartz Crystal Microbalance Measurements. *Langmuir* **2018**, *34* (27), 8081–8091.
- (17) Granqvist, N.; Liang, H.; Laurila, T.; Sadowski, J.; Yliperttula, M.; Viitala, T. Characterizing Ultrathin and Thick Organic Layers by Surface Plasmon Resonance Three-Wavelength and Waveguide Mode Analysis. *Langmuir* **2013**, *29* (27), 8561–8571.
- (18) Kari, O. K.; Rojalín, T.; Salmaso, S.; Barattin, M.; Jarva, H.; Meri, S.; Yliperttula, M.; Viitala, T.; Urtti, A. Multi-Parametric Surface Plasmon Resonance Platform for Studying Liposome-Serum Interactions and Protein Corona Formation. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2017**, *7* (2), 228–240.
- (19) Belkilani, M.; Shokouhi, M.; Farre, C.; Chevalier, Y.; Minot, S.; Bessueille, F.; Abdelghani, A.; Jaffrezic-Renault, N.; Chaix, C. Surface Plasmon Resonance Monitoring of Mono-Rhamnolipid Interaction with Phospholipid-Based Liposomes. *Langmuir* **2021**, *37* (26), 7975–7985.
- (20) Dua, J. S.; Rana, A. C.; Bhandari, A. K. Liposome: Methods of Preparation and Applications. *Int J Pharm Stud Res* **2012**, *3* (2), 14–20.
- (21) Zhao, Y.; Du, D.; Lin, Y. Glucose Encapsulating Liposome for Signal Amplification for Quantitative Detection of Biomarkers with Glucometer Readout. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *72*, 348–354.
- (22) Jakobsen, U.; Vogel, S. Assembly of Liposomes Controlled by Triple Helix Formation. *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24* (9), 1485–1495.

- (23) Albers, W. M.; Vikholm-Lundin, I. Surface plasmon resonance on nanoscale organic films. In *Nano-Bio-Sensing*; Springer: 2011; pp 83-125.
- (24) Zacher, T.; Wischerhoff, E. Real-Time Two-Wavelength Surface Plasmon Resonance as a Tool for the Vertical Resolution of Binding Processes in Biosensing Hydrogels. *Langmuir* **2002**, *18* (5), 1748–1759.
- (25) Zhou, M.; Otomo, A.; Yokoyama, S.; Mashiko, S. Estimation of Organic Molecular Film Structures Using Surface-Plasmon Resonance Spectroscopy. *Thin Solid Films* **2001**, *393* (1), 114–118.
- (26) Viitala, T.; Granqvist, N.; Hallila, S.; Raviña, M.; Yliperttula, M. Elucidating the signal responses of multi-parametric surface plasmon resonance living cell sensing: a comparison between optical modeling and drug-MDCKII cell interaction measurements. *PLoS one* **2013**, *8* (8), e72192.
- (27) Fenzl, C.; Genslein, C.; Domonkos, C.; A. Edwards, K.; Hirsch, T.; J. Baeumner, A. Investigating Non-Specific Binding to Chemically Engineered Sensor Surfaces Using Liposomes as Models. *Analyst* **2016**, *141* (18), 5265–5273.
- (28) Haes, A. J.; Van Duyne, R. P. A nanoscale optical biosensor: sensitivity and selectivity of an approach based on the localized surface plasmon resonance spectroscopy of triangular silver nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (35), 10596-10604.
- (29) Kipriyanov, S. M.; Breitling, F.; Little, M.; Dübel, S. Single-Chain Antibody Streptavidin Fusions: Tetrameric Bifunctional ScFv-Complexes with Biotin Binding Activity and Enhanced Affinity to Antigen. *Hum. Antibodies* **1995**, *6* (3), 93–101.
- (30) Sacconi, A.; Tadini-Buoninsegni, F.; Tiribilli, B.; Margheri, G. A Comparative Study of Phosphatidylcholine versus Phosphatidylserine-Based Solid Supported Membranes for the Preparation of Liposome-Rich Interfaces. *Langmuir* **2018**, *34* (40), 12183–12190.
- (31) Viitala, T.; Hautala, J. T.; Vuorinen, J.; Wiedmer, S. K. Structure of Anionic Phospholipid Coatings on Silica by Dissipative Quartz Crystal Microbalance. *Langmuir* **2007**, *23* (2), 609–618.
- (32) Kilic, A.; Kok, F. N. Biomimetic Lipid Bilayers on Solid Surfaces: Models for Biological Interactions. *Surf. Innov.* **2016**, *4* (3), 141–157.
- (33) Takechi-Haraya, Y.; Goda, Y.; Izutsu, K.; Sakai-Kato, K. Improved Atomic Force Microscopy Stiffness Measurements of Nanoscale Liposomes by Cantilever Tip Shape Evaluation. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (16), 10432–10440.
- (34) Mashaghi, A.; Swann, M.; Popplewell, J.; Textor, M.; Reimhult, E. Optical anisotropy of supported lipid structures probed by waveguide spectroscopy and its application to study of supported lipid bilayer formation kinetics. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (10), 3666-3676.
- (35) Jung, L. S.; Campbell, C. T.; Chinowsky, T. M.; Mar, M. N.; Yee, S. S. Quantitative Interpretation of the Response of Surface Plasmon Resonance Sensors to Adsorbed Films. *Langmuir* **1998**, *14* (19), 5636–5648.

-
- (36) Longo, M. L.; Waring, A. J.; Gordon, L. M.; Hammer, D. A. Area Expansion and Permeation of Phospholipid Membrane Bilayers by Influenza Fusion Peptides and Melittin. *Langmuir* **1998**, *14* (9), 2385–2395.
- (37) Longo, M. L.; Waring, A. J.; Hammer, D. A. Interaction of the Influenza Hemagglutinin Fusion Peptide with Lipid Bilayers: Area Expansion and Permeation. *Biophys. J.* **1997**, *73* (3), 1430–1439.
- (38) Cuerrier, C. M.; Chabot, V.; Vigneux, S.; Aimez, V.; Escher, E.; Gobeil, F.; Charette, P. G.; Grandbois, M. Surface Plasmon Resonance Monitoring of Cell Monolayer Integrity: Implication of Signaling Pathways Involved in Actin-Driven Morphological Remodeling. *Cell. Mol. Bioeng.* **2008**, *1* (4), 229–239.
- (39) Chabot, V.; Cuerrier, C. M.; Escher, E.; Aimez, V.; Grandbois, M.; Charette, P. G. Biosensing Based on Surface Plasmon Resonance and Living Cells. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24* (6), 1667–1673.
- (40) Kanášová, M.; Nesměrák, K. Systematic Review of Liposomes' Characterization Methods. *Monatshefte Für Chem.-Chem. Mon.* **2017**, *148* (9), 1581–1593.
- (41) Kim, A.; Ng, W. B.; Bernt, W.; Cho, N.-J. Validation of Size Estimation of Nanoparticle Tracking Analysis on Polydisperse Macromolecule Assembly. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 1–14.
- (42) Ge, M.; Freed, J. H. Fusion Peptide from Influenza Hemagglutinin Increases Membrane Surface Order: An Electron-Spin Resonance Study. *Biophys. J.* **2009**, *96* (12), 4925–4934.
- (43) Lai, A. L.; Freed, J. H. The Interaction between Influenza HA Fusion Peptide and Transmembrane Domain Affects Membrane Structure. *Biophys. J.* **2015**, *109* (12), 2523–2536.
- (44) Lai, A. L.; Park, H.; White, J. M.; Tamm, L. K. Fusion Peptide of Influenza Hemagglutinin Requires a Fixed Angle Boomerang Structure for Activity. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (9), 5760–5770.

Supporting Information

Mechanisms of influenza virus HA2 peptide interaction with liposomes studied by dual-wavelength MP-SPR

Meryem Belkilani,^{† ‡ §} Carole Farre,[†] Yves Chevalier,[#] Sylvain Minot,[†]

François Bessueille,[†] Adnane Abdelghani,[§] Nicole Jaffrezic-Renault,[†]

Carole Chaix^{†*}

1. Error parameter calculation

Error values of the parameters obtained with three independent measurements were calculated as standard error of the mean (*sem*), defined as :

$$sem = \frac{s}{\sqrt{N}} \quad (S1)$$

where N is the number of experiments and s is the standard deviation.

2. E4-GGYC peptide characterization

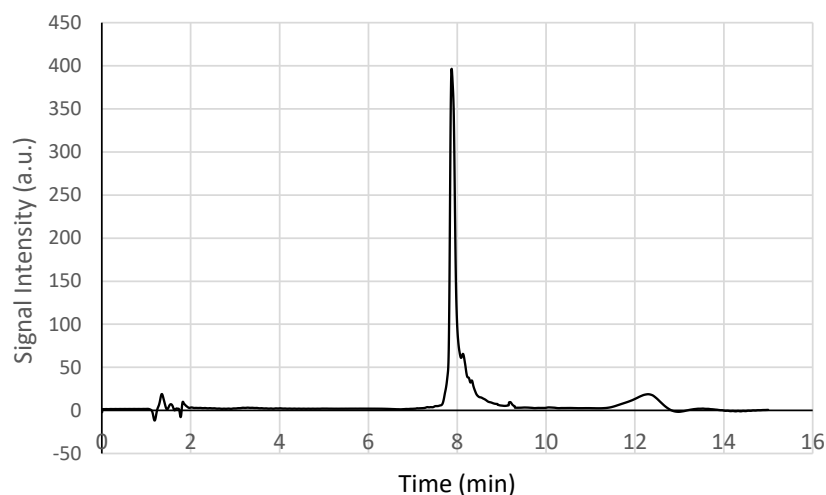


Figure S1 : RP HPLC analysis of E4-GGYC peptide. Gradient : from 5 to 100 % AcCN in 0.1% formic acid in 7 min and 100% AcCN in 0.1% formic acid during 1min, flow 0.3 mL/min.

3. Liposome immobilization

After a thorough cleaning and functionalization of the SPR gold chip with amino SAM, alkyl SAM, acidic SAM and streptavidin, a continuous flow (50 $\mu\text{L}/\text{min}$) of 0.15 M NaCl solution was first injected for approximately 20 min until the SPR sensorgram signal was stabilized in order to accurately measure changes in the optical parameters during manipulation. Afterwards, the freshly prepared solutions of liposomes in a concentration range from 1×10^{11} to 5×10^{12} lipo/mL in 0.15 M NaCl solution (corresponding to 1.5×10^{-5} to 6×10^{-4} M HSPC+DSPE-PEG phospholipid content), which cover the concentration range usually used in analytical applications, were consecutively injected for 4 min at a flow rate of 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ to interact with the four modified surfaces. Each injection was followed by a 4 min washing step in 0.15 M NaCl solution to remove all loosely bound liposomes. Then, the surface was cleaned and regenerated by a 4 min injection of Triton X-100 (1 %) in 0.15 M NaCl solution at a flow rate of 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. Since the biotinylated liposomes interact with the streptavidin protein through strong interactions, regeneration of the streptavidin surface was not possible without removing the streptavidin layer. Thus, in this case, the experimental set-up consisted in cumulative injections of liposomes (4 min) on the streptavidin-functionalized SPR substrate, followed by 4 min washing in 0.15 M NaCl solution. The resulting sensograms were extracted with MP-SPR Navi Data viewer and analyzed through Trace DrawerTM software.

Figures S2a-c illustrate the real-time SPR responses of the surfaces functionalized with alkyl SAM, acidic SAM and amino SAM, respectively, against different concentrations of liposomes.

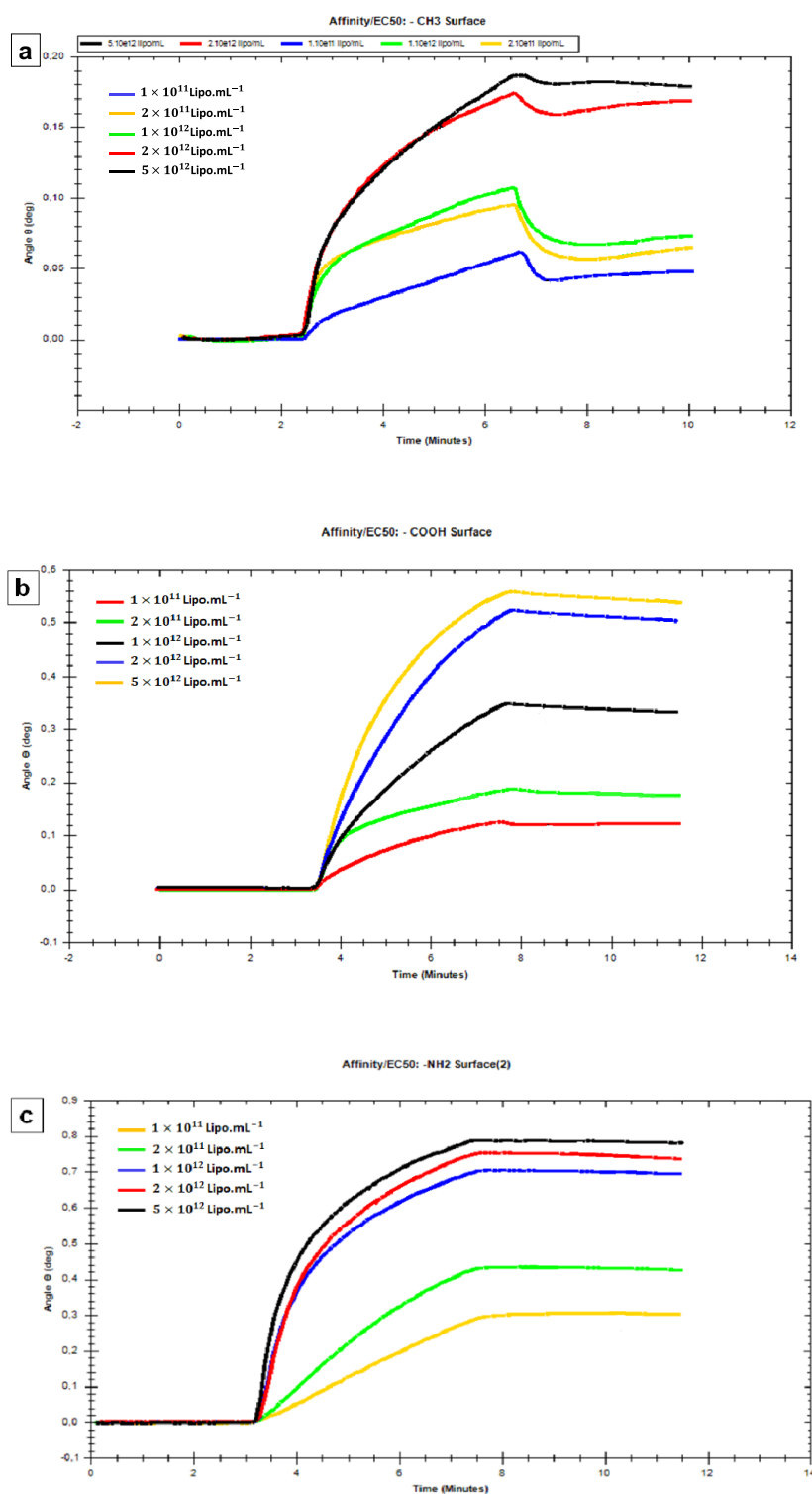


Figure S2. SPR sensorgrams (peak angular position versus time), extracted with MP-SPR Navi Data viewer, of the interaction of (a) –CH₃ surface, (b) –COOH surface and (c) -NH₂ surfaces with 1×10^{11} , 2×10^{11} , 1×10^{12} , 2×10^{12} and 5×10^{12} lipo/mL biotinylated liposomes. Light source at 670 nm.

The binding curves of the three surfaces were fitted to the ‘Affinity’ model following equation S2 through Trace Drawer™ software and shown in Figure S3:

$$Y = \frac{B_{max} \times C}{C + K_D} \quad (S2)$$

Where Y is the recorded signal (deg), C is the concentration of the ligand (concentration of phospholipids in mol/L), K_D (M) is the equilibrium dissociation constant and B_{max} (deg) represents the maximum signal, dependent on the number of receptors.

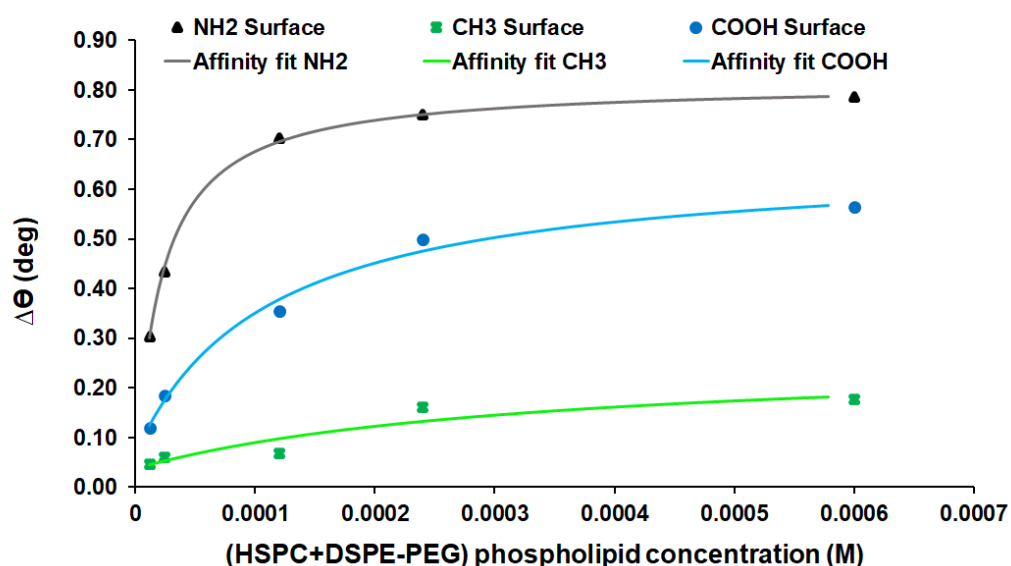


Figure S3. Fitted curves of resonance peak angular shifts ($\Delta\theta_{SPR}$) in SPR measurement at 670nm vs phospholipid concentration (M) by the ‘Affinity’ fitting model with Trace Drawer™ software, for liposome injection on –CH3 (1-dodecanethiol), –COOH (11-mercaptoundecanoic acid) and –NH2 (11-amino-1-undecanethiol)-modified SPR gold surfaces.

Figure S4 shows the overlay of the SPR sensorgram of biotinylated liposome interaction with streptavidin surface and the best fitted theoretical sensorgram.

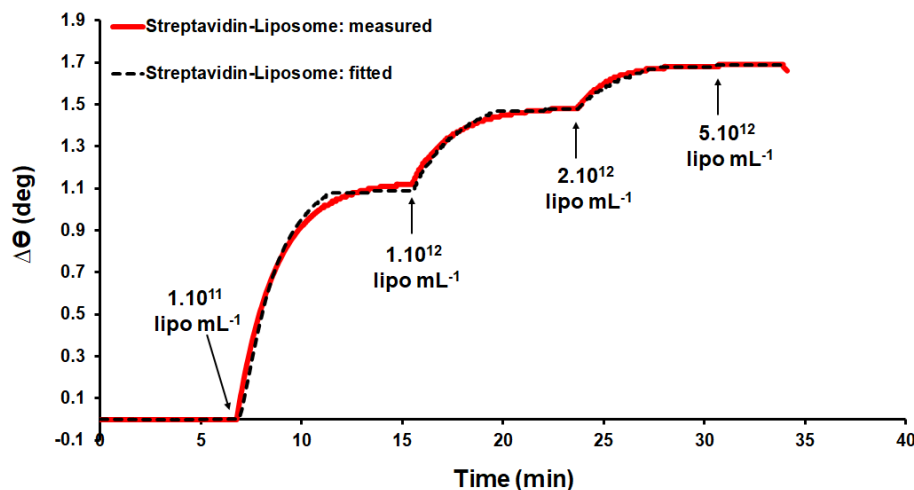


Figure S4. Sensorgrams (solid lines) and fitted curves (dashed lines) of biotinylated liposomes interacting with streptavidin-functionalized SPR gold chip (light source at 670 nm).

The “OneToOne” model gave the best fit to the experiments for liposome interaction study on the streptavidin surface. Equation S3 was considered to estimate the binding constants.

$$\frac{dY(t)}{dt} = (k_a \times C - k_d) \times Y(t) \quad (\text{S3})$$

where $Y(t)$ is the recorded signal ($Y(0) = 0$), C is the ligand (liposome) concentration in the bulk liquid, t is the time in seconds, k_a [$1/\text{M} \times \text{s}$] is the association rate constant and k_d [$1/\text{s}$] the dissociation rate constant. Calculation of the binding kinetic parameters is necessary to estimate the binding affinity constant. The equilibrium dissociation constant K_D is defined as in equation S4.

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} \quad (\text{S4})$$

K_D values of the interaction of liposomes with the $-\text{CH}_3$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$ and streptavidin-functionalized surfaces were calculated and displayed in Table 2.

4. Passivation step of the streptavidin-functionalized surface

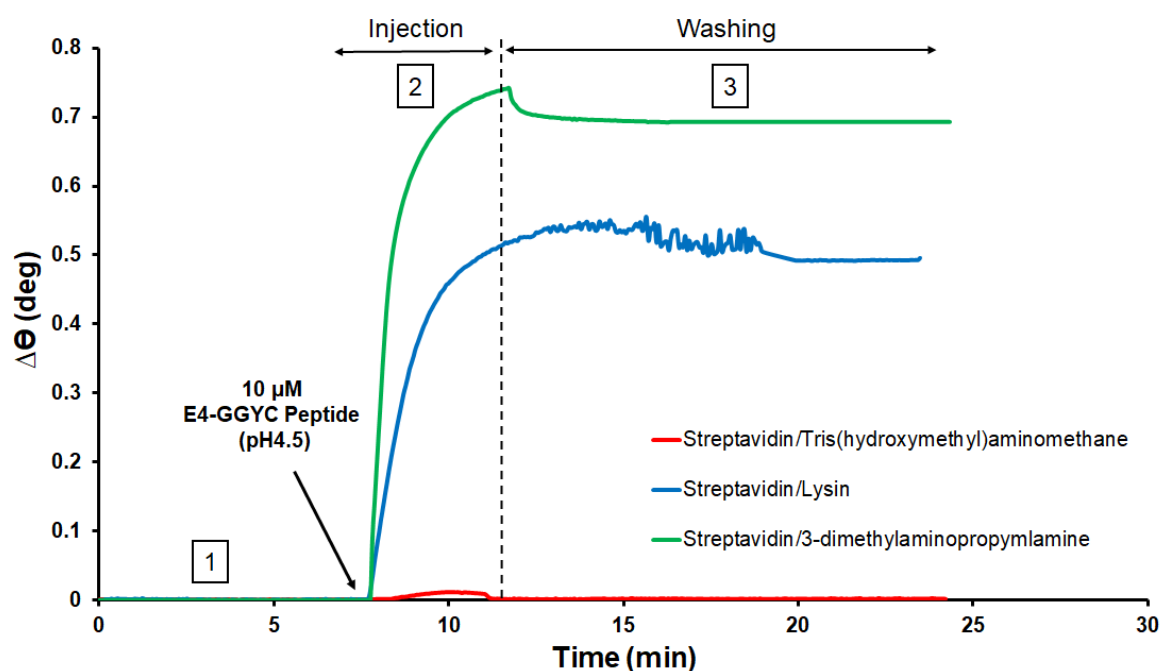


Figure S5. Negative controls without liposomes for studying the non specific interaction of E4-GGYC peptide with the streptavidin layer after passivation with three different molecules. (1) overlaid signals after passivation with either lysine, TRIS or DMAP, (2) Injection of 10 μM of E4-GGYC in PBS pH4.5 on each surface for 4 min at a flow rate of 50 $\mu\text{L}/\text{min}$.

E4-GGYC bound significantly to the surface passivated with lysine (blue curve) and 3-dimethylaminopropylamine (green curve), but no significant interaction occurred with the surface passivated with the tris(hydroxymethyl)aminomethane (red curve). After interaction, (3) injections were followed by a washing step in PBS buffer pH4.5.

5. Full SPR angular spectra of the streptavidin-functionalized surface and the liposome-supported surface

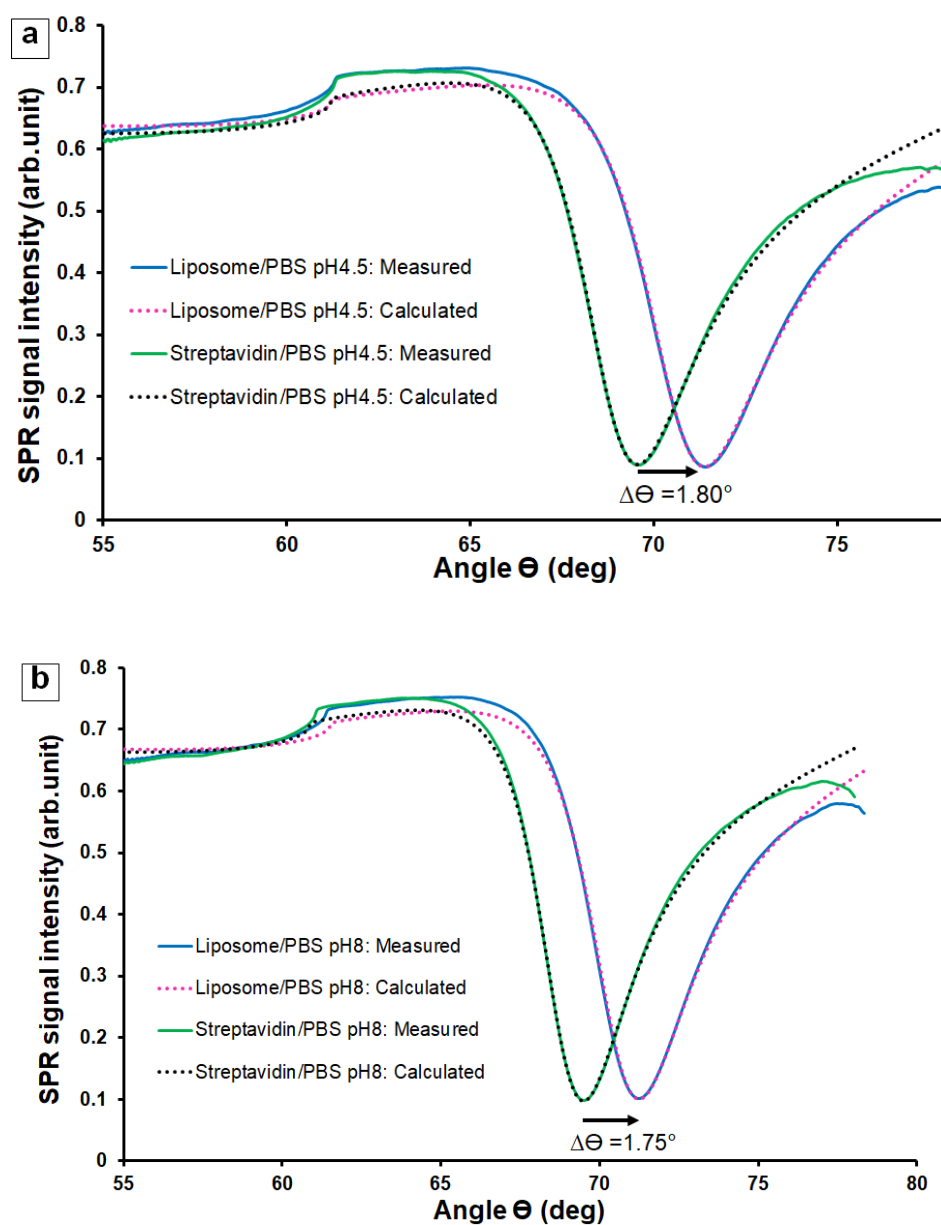


Figure S6. SPR modeling of streptavidin and liposome layers using the measured full SPR angular spectra at the 670 nm wavelength. SPR peak angular position shift for measured and modeled phases, from streptavidin layer (green line) to immobilized liposome layer (blue line) in (a) PBS pH4.5 and (b) PBS pH8.

6. AFM characterization of the gold surface

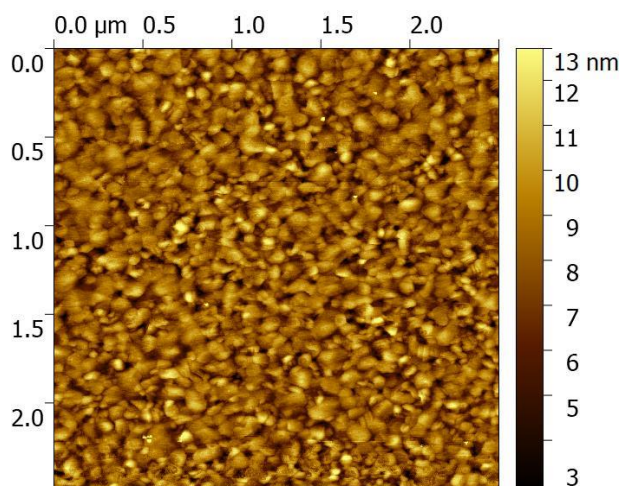


Figure S7. AFM topographic images of the gold substrate.

7. Calculation of the phospholipid concentration C_p in the liposome layer

Based on the De Feijter formula,¹ the refractive index (n_L) of the adsorbed layer is proportional to its concentration. In our case, the concentration of the initial adsorbed liposome layer is the concentration of phospholipids C_{p1} .

$$n_L = n_{PBS} + \frac{dn}{dc} \times C_{p1}$$

$$C_{p1} = \frac{n_L - n_{PBS}}{dn/dc} \quad (S5)$$

where n_L is the refractive index of the corresponding layer L, n_{PBS} is the refractive index of the PBS buffer at pH4.5, and dn/dc is the refractive index increment of the dispersion of liposomes. dn/dc was determined experimentally from the slope of the linear variation of the refractive index as a function of liposome concentrations. The obtained value was $dn/dc \approx 0.134 \text{ cm}^3/\text{g}$.

The concentration of phospholipids C_{p2} in the liposome layer after the injection of 5–25 μM peptide was calculated as follows, considering that the increase in calculated thickness d was an increase in volume of the liposome layer:

$$\frac{d_2}{d_1} = \frac{V_2}{V_1} = \frac{C_{p1}}{C_{p2}} \Leftrightarrow C_{p2} = \frac{d_1 \times C_{p1}}{d_2} \quad (\text{S6})$$

Where d_1 is the calculated thickness of the initial liposome layer, V_1 is the volume of the initial liposome layer, C_{p1} is the concentration of phospholipids in the initial adsorbed liposomes, d_2 is the calculated thickness of the liposome layer after 5–25 μM peptide injection, V_2 is the volume of the liposome layer after 5–25 μM peptide injection and C_{p2} is the concentration of phospholipids in the liposome layer after 5–25 μM peptide injection.

8. Fitted and residual curves of peptide/liposome interaction by Trace Drawer™ software

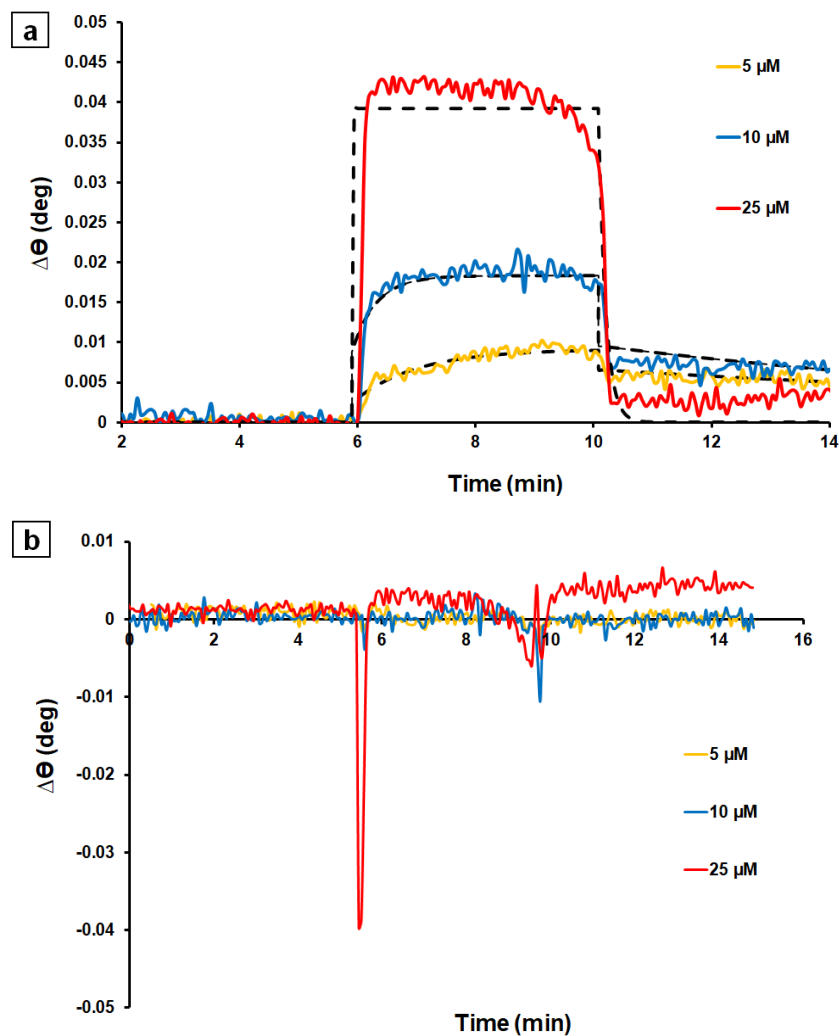


Figure S8. (a) MP-SPR sensorgrams (bold lines) and fitted curves (dashed lines) of 5–25 μM E4-GGYC peptide interacting with immobilized liposomes at pH 4.5. (b) Residual SPR angular response from subtraction of the fitted curves to the experimental sensorgrams.

REFERENCES

(1) Chattoraj, D. K.; Birdi, K. S. *Adsorption and the Gibbs surface excess*, 1st ed.; Springer: Boston, 1984.

IV. Etude de l'interaction du peptide BK avec une membrane modèle

Cette partie est décrite dans ce chapitre comme une étude mécanistique complémentaire de la première étude avec le peptide HA2. Nous avons réalisé cette étude afin de mettre en évidence d'autres types d'interaction biomoléculaire avec la même membrane biomimétique déjà utilisée pour faire interagir le peptide HA2, et de prouver l'efficacité de la technique MP-SPR dans la caractérisation d'autres phénomènes d'interaction avec la membrane.

Cette étude est en cours de développement et elle fera l'objet d'une 3^{ème} publication.

IV.1. Analyse de l'interaction peptide BK/liposome par MP-SPR

Après avoir formé une couche de liposomes stable sur la surface de streptavidine dans les deux tampons PBS à pH 4 et à pH 7, nous avons étudié l'interaction du peptide BK en enregistrant la variation de l'angle SPR en fonction du temps. Pour cette étude, des solutions de peptide BK de concentrations croissantes dans le PBS à pH 7 ou à pH 4 ont été injectées chacune sur une couche de liposomes purs pendant 15 min, à un débit constant de 12 $\mu\text{L}/\text{min}$. Chaque injection a été suivie par une étape de lavage à un débit constant de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant une période de 30 min. L'étude à pH 4 a été réalisée avec de fortes concentrations 50-100 μM comme étude supplémentaire pour montrer le rôle du pH sur le comportement du peptide BK vis-à-vis de la membrane modèle.

Les Figures 15.a et 15.b montrent respectivement les sensorgrammes superposés obtenus suite à l'interaction du peptide BK à différentes concentrations dans le PBS à pH 7 et à pH 4 avec la couche de liposomes. Ces sensorgrammes montrent que l'interaction du peptide induit une augmentation du signal SPR dépendante de la concentration. L'inspection initiale de la forme de chaque sensorgramme révèle des cinétiques de liaison comparable, avec une similarité significative dans les taux d'association et de dissociation. En particulier, les variations des signaux SPR sont apparues clairement indépendantes du pH du milieu d'étude. Ceci nous permet de constater que le peptide BK dans les deux pHs se lie de manière semblable aux surfaces de la couche de liposomes, ce qui résulte probablement des mêmes modes d'interaction avec les liposomes lors du passage du pH physiologique au pH acide.

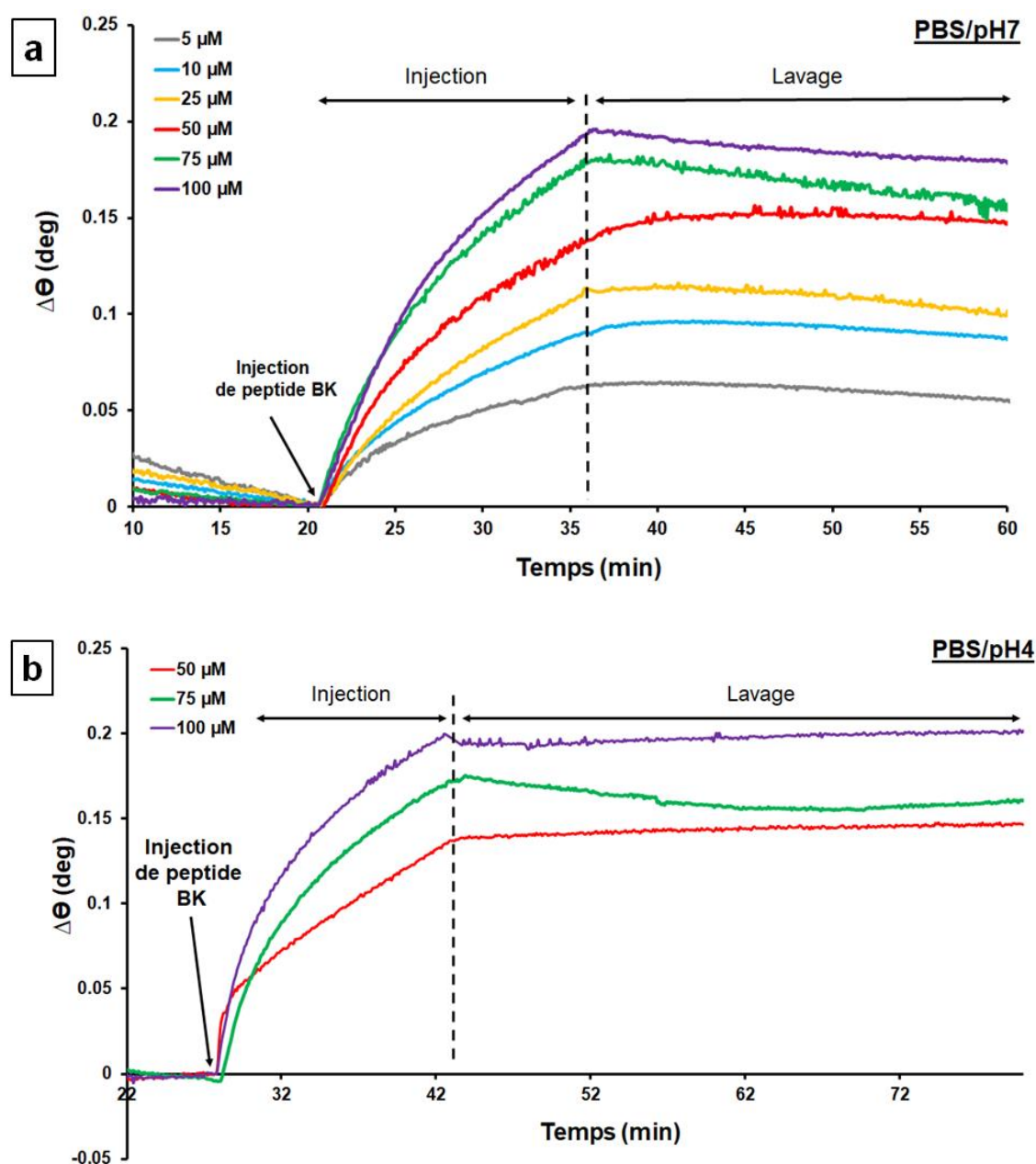


Figure 15. Sensorgrammes superposés de l'injections de peptide BK à différentes concentrations sur la surface recouverte de liposomes à pH 7 (a) et pH 4 (b)

Dans les deux tampons, nous constatons que l'adsorption du peptide BK sur la couche de liposomes commence comme un processus significativement lent qui n'atteint pas l'équilibre avant la fin de l'injection du peptide. Après l'étape de lavage avec du PBS à pH7 ou pH4, nous remarquons que le signal SPR diminue mais très lentement bien que le peptide ne soit plus présent dans la solution et que l'écoulement du tampon élimine les peptides libres ou faiblement liés. En effet, les sensorgrammes ne sont pas revenus à zéro pendant toute la durée du lavage, ce qui indique que le peptide BK est resté lié à la surface ou inséré dans la bicouche lipidique

du liposome. Une irréversibilité de l'interaction a bien été observée lorsque la solution d'injection a été remplacée par une solution PBS à pH 7 ou à pH 4.

A partir de ces résultats préliminaires, nous pouvons confirmer la forte affinité du peptide BK à la surface des liposomes à pH physiologique et aussi à pH acide. En effet, dans la littérature, il est rapporté que la BK a une forte affinité avec les surfaces membranaires, modifiant potentiellement la structure de la membrane lipidique en augmentant l'encombrement et la robustesse de la bicouche [13,17]. Par ailleurs, la BK est sensible à la courbure de la membrane lipidique, avec une affinité particulière pour les petites nanovésicules (~50-150 nm) et dans notre cas le diamètre hydrodynamique mesuré par DLS des liposomes était 87 nm et 85 nm dans le PBS à pH 7 ou à pH 4 respectivement. Saludes *et al.* [30] ont montré que le peptide BK interagit avec la bicouche lipidique sous une conformation active en forme de pince permettant l'orientation cruciale des résidus arginine terminaux sur la même face du peptide. Ainsi, la forte affinité du BK avec les composants hautement anioniques suggère le rôle principal des résidus arginine pour former des liaisons électrostatiques. Les acides aminés proline au sein des séquences jouent un rôle dans la structuration du peptide sous la forme d'une pince, tandis que les deux résidus phénylalanine hydrophobes jouent un rôle dans l'insertion du peptide dans la bicouche lipidique ou dans l'interaction avec son récepteur [31]. Il va être intéressant de poursuivre ce travail en calculant les épaisseurs et les indices de réfraction des différentes couches formées. Le calcul de la constante de dissociation à l'équilibre K_D sera également très informative. Ce travail en cours n'a pas pu être finalisé par manque de temps dans le cadre de cette thèse.

IV.2. Protocole expérimental

The interaction between BK peptide and the liposomes immobilized on the surface as a model cell membrane was evaluated using the MP-SPR method. After functionalization of the SPR gold chip surface with streptavidin and passivation with TRIS as described in the experimental part of publication 2, we inserted this chip into the BioNavis system. A continuous flow (50 $\mu\text{L}/\text{min}$) of PBS at pH 4 (0.1 M NaH_2PO_4 , 0.05 M NaCl , pH 4) or PBS at pH 7 (0.1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 0.15 M NaCl , pH 7) was first injected for approximately 20 min until a stable baseline was reached. After stabilization of the signal intensity, a liposome concentration of 1×10^{14} lipo mL^{-1} in a PBS at pH 4 or pH 7 was injected on the streptavidin surface in both flow channels for 4 min at a flow rate of 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. BK peptide solutions were prepared immediately before injection by diluting the peptide mother solution in the PBS buffers.

For the experiments in PBS pH 7, a range of peptide concentrations from 5 to 100 μM in PBS pH 7 were successively injected on the liposome-coated surface. Each concentration was injected for 15 min at a flow rate of 12 $\mu\text{L}/\text{min}$. The injections were followed by a washing step with the PBS buffer at pH 7 at a flow rate of 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ until the signal was stabilized with the objective of achieving a new baseline.

In order to study the behavior of this peptide in an acidic medium, we performed the same previous experiment with the same injection and washing cycles for higher BK peptide concentrations (50, 75 and 100 μM) in PBS pH 4.

As the liposomes were immobilized on two flow cells, one was used to inject the samples and the other was used to inject PBS buffer as control.

The MP-SPR signals vs. time at different BK peptide concentrations were recorded. Measurements were triplicated for each BK peptide concentration.

V. Conclusion

Dans ce travail, nous avons étudié par la méthode MP-SPR l'interaction de E4-GGYC, un analogue du peptide HA2 de l'hémagglutinine du virus de la grippe et du peptide BK, avec une surface biomimétique formée de liposomes greffés sur un substrat d'or. Une stratégie de liaison biotine/streptavidine a été développée pour créer une couche stable de liposomes avec une couverture élevée, caractérisée par AFM. La variation du signal SPR a clairement illustré la forte liaison des liposomes biotinylés à la surface fonctionnalisée par la streptavidine avec un K_D calculé de $9,44 \cdot 10^{-12}$ M. Nous avons démontré la capacité de la technique MP-SPR à caractériser la variation de la morphologie de la couche de liposomes après injection de E4-GGYC à pH 4,5 et pH 8 et nous avons révélé différents mécanismes d'interaction. À pH 4,5, le peptide s'insère d'abord dans la membrane du liposome jusqu'à saturation, puis s'adsorbe à la surface à une concentration élevée, alors que le mécanisme d'interaction ne suit pas le même mécanisme à pH 8. Le décalage négatif de l'angle SPR observé lors de l'injection du peptide à pH 8 provient probablement de changements morphologiques de la couche de liposomes. Les sensorgrammes résultant de l'interaction de E4-GGYC aux concentrations 5-25 μM avec la couche de liposomes à pH 4,5 ont été ajustés pour calculer une constante de dissociation à l'équilibre K_D de $4,50 \cdot 10^{-7}$ M. Les études MP-SPR ont montré que les liposomes gonflaient en présence de peptides dans la solution circulante à pH 4,5. Cette hypothèse a été prouvée théoriquement en calculant l'épaisseur (d) et l'indice de réfraction (n) ainsi que la concentration

en phospholipides (*Cp*) de la couche de liposomes par le logiciel LayerSolver™. Ce gonflement dépendant du pH a été confirmé en solution par diffusion dynamique de la lumière (DLS) et par une analyse du suivi individuel de nanoparticules NanoSight (NTA). De fortes concentrations de peptide jusqu'à 100 μM n'ont pas dégradé la structure des liposomes greffés à la surface. Nos études ont également révélé que l'insertion du peptide augmentait la robustesse de la membrane lipidique. Le mécanisme bien connu de perturbation des double couches phospholipidiques par des mono-rhamnolipides ne se produisait pas après l'insertion du peptide dans la membrane du liposome. Comme autre conclusion, les analyses MP-SPR de l'interaction du peptide E4-GGYC avec les liposomes immobilisés ne nous ont pas permis d'observer le mécanisme de fusion jusqu'à 100 μM de peptide en solution.

La seconde analyse MP-SPR de l'interaction du peptide BK avec le même modèle de membrane a été réalisée dans deux tampons PBS à pH 7 et pH 4. Les résultats ont montré la haute affinité du peptide BK pour la membrane du liposome dans les deux pHs avec une quasi irréversibilité de la liaison. La désorption complète du peptide peut être possible si un cycle de lavage plus long est effectué. Contrairement à la liaison du peptide HA2, le peptide BK interagit avec les liposomes avec une cinétique très lente qui peut être liée à un autre changement conformationnel ou à une modification de la bicouche lipidique. Cette étude nous permet de faire apparaître la capacité de la technique MP-SPR à suivre en temps réel d'autres mécanismes d'interaction avec le même modèle de membrane biomimétique montrant la spécificité de l'interaction du peptide HA2 avec les liposomes supportés par rapport au peptide BK. Au vu des études présentées ici, nous pensons que notre approche MP-SPR sur des liposomes immobilisés sur des substrats solides peut fournir des informations complémentaires en temps réel pour une meilleure compréhension mécanistique de l'interaction biomolécule/membrane lipidique.

En perspective, nous envisageons d'étudier plus en détails la cinétique et le mécanisme d'interaction du peptide BK avec les liposomes dans le but de montrer les changements morphologiques qui peuvent être dus à l'adsorption de ce peptide.

Références

- [1] Deber, C. M., & Li, S. C. (1995). Peptides in membranes: helicity and hydrophobicity. *Bio polymers: Original Research on Biomolecules*, 37(5), 295-318.
- [2] Shai, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1462(1-2), 55-70.
- [3] Burch, J., Paulden, M., Conti, S., Stock, C., Corbett, M., Welton, N. J., ... & Palmer, S. (2009). Antiviral drugs for the treatment of influenza: a systematic review and economic evaluation.
- [4] Hsieh, Y. C., Wu, T. Z., Liu, D. P., Shao, P. L., Chang, L. Y., Lu, C. Y., ... & Huang, L. M. (2006). Influenza pandemics: past, present and future. *Journal of the Formosan Medical Association*, 105(1), 1-6.
- [5] Rafalski, M., Ortiz, A., Rockwell, A., Van Ginkel, L. C., Lear, J. D., DeGrado, W. F., & Wilschut, J. (1991). Membrane fusion activity of the influenza virus hemagglutinin: interaction of HA2 N-terminal peptides with phospholipid vesicles. *Biochemistry*, 30(42), 10211-10220.
- [6] Wagner, E., Plank, C., Zatloukal, K., Cotten, M., & Birnstiel, M. L. (1992). Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(17), 7934-7938.
- [7] Chaix, C., Pacard, E., Elaïssari, A., Hilaire, J. F., & Pichot, C. (2003). Surface functionalization of oil-in-water nanoemulsion with a reactive copolymer: Colloidal characterization and peptide immobilization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 29(1), 39-52.
- [8] Skehel, J. J., Cross, K., Steinhauer, D., & Wiley, D. C. (2001). Influenza fusion peptides. *Biochemical Society Transactions*, 29(4), 623-626.
- [9] Russell, C. J. (2016). Orthomyxoviruses: Structure of Antigens. *Ref. Module Biomed. Sci.*
- [10] Zhelev, D. V., Stoicheva, N., Scherrer, P., & Needham, D. (2001). Interaction of synthetic HA2 influenza fusion peptide analog with model membranes. *Biophysical journal*, 81(1), 285-304.
- [11] Lüneberg, J., Martin, I., Nüßler, F., Ruysschaert, J. M., & Herrmann, A. (1995). Structure and topology of the influenza virus fusion peptide in lipid bilayers. *Journal of Biological Chemistry*, 270(46), 27606-27614.
- [12] Vaccaro, L., Cross, K. J., Kleinjung, J., Straus, S. K., Thomas, D. J., Wharton, S. A., ... & Fraternali, F. (2005). Plasticity of influenza haemagglutinin fusion peptides and their interaction with lipid bilayers. *Biophysical journal*, 88(1), 25-36.
- [13] Bonechi, C., Ristori, S., Martini, G., Martini, S., & Rossi, C. (2009). Study of bradykinin conformation in the presence of model membrane by Nuclear Magnetic Resonance and molecular modelling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(3), 708-716.

-
- [14] Roche, J. A., & Roche, R. (2020). A hypothesized role for dysregulated bradykinin signaling in COVID-19 respiratory complications. *The FASEB Journal*, 34(6), 7265-7269.
- [15] Kotovych, G., Cann, J. R., Stewart, J. M., & Yamamoto, H. (1998). NMR and CD conformational studies of bradykinin and its agonists and antagonists: application to receptor binding. *Biochemistry and cell biology*, 76(2-3), 257-266.
- [16] Lopez, J. J., Shukla, A. K., Reinhart, C., Schwalbe, H., Michel, H., & Glaubitz, C. (2008). The structure of the neuropeptide bradykinin bound to the human G-protein coupled receptor bradykinin B2 as determined by solid-state NMR spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(9), 1668-1671.
- [17] Turchiello, R. F., Juliano, L., Ito, A. S., & Lamy-Freund, M. T. (2000). How bradykinin alters the lipid membrane structure: a spin label comparative study with bradykinin fragments and other cations. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 54(3), 211-221.
- [18] Mozsolits, H., & Aguilar, M. I. (2002). Surface plasmon resonance spectroscopy: an emerging tool for the study of peptide–membrane interactions. *Peptide Science: Original Research on Biomolecules*, 66(1), 3-18.
- [19] Zhang, L., Longo, M. L., & Stroeve, P. (2000). Mobile phospholipid bilayers supported on a polyion/alkylthiol layer pair. *Langmuir*, 16(11), 5093-5099.
- [20] Luchini, A., Tidemand, F. G., Johansen, N. T., Campana, M., Sotres, J., Ploug, M., ... & Arleth, L. (2019). Peptide disc mediated control of membrane protein orientation in supported lipid bilayers for surface-sensitive investigations. *Analytical Chemistry*, 92(1), 1081-1088.
- [21] Hwang, B., & Ise, H. (2020). Multimeric conformation of type III intermediate filaments but not the filamentous conformation exhibits high affinity to lipid bilayers. *Genes to Cells*, 25(6), 413-426.
- [22] Skyttner, C., Enander, K., Aronsson, C., & Aili, D. (2018). Tuning liposome membrane permeability by competitive coiled coil heterodimerization and heterodimer exchange. *Langmuir*, 34(22), 6529-6537.
- [23] Bompard, J., Maniti, O., Aboukhachfe, R., Ausserre, D., & Girard-Egrot, A. (2021). BALM: Watching the Formation of Tethered Bilayer Lipid Membranes with submicron lateral resolution. *Langmuir*, 37(31), 9457-9471.
- [24] Chadli, M., Rebaud, S., Maniti, O., Tillier, B., Cortès, S., & Girard-Egrot, A. (2017). New tethered phospholipid bilayers integrating functional G-protein-coupled receptor membrane proteins. *Langmuir*, 33(39), 10385-10401.
- [25] Longo, M. L., Waring, A. J., Gordon, L. M., & Hammer, D. A. (1998). Area expansion and permeation of phospholipid membrane bilayers by influenza fusion peptides and melittin. *Langmuir*, 14(9), 2385-2395.
- [26] Longo, M. L., Waring, A. J., & Hammer, D. A. (1997). Interaction of the influenza hemagglutinin fusion peptide with lipid bilayers: area expansion and permeation. *Biophysical Journal*, 73(3), 1430-1439.

- [27] Ge, M., & Freed, J. H. (2009). Fusion peptide from influenza hemagglutinin increases membrane surface order: an electron-spin resonance study. *Biophysical journal*, 96(12), 4925-4934.
- [28] Lai, A. L., & Freed, J. H. (2015). The interaction between influenza HA fusion peptide and transmembrane domain affects membrane structure. *Biophysical journal*, 109(12), 2523-2536.
- [29] Lai, A. L., Park, H., White, J. M., & Tamm, L. K. (2006). Fusion peptide of influenza hemagglutinin requires a fixed angle boomerang structure for activity. *Journal of Biological Chemistry*, 281(9), 5760-5770.
- [30] Saludes, J. P., Morton, L. A., Coulup, S. K., Fiorini, Z., Cook, B. M., Beninson, L., ... & Yin, H. (2013). Multivalency amplifies the selection and affinity of bradykinin-derived peptides for lipid nanovesicles. *Molecular BioSystems*, 9(8), 2005-2009.
- [31] Turchiello, R. F., Lamy-Freund, M. T., Hirata, I. Y., Juliano, L., & Ito, A. S. (2002). Ortho-aminobenzoic acid-labeled bradykinins in interaction with lipid vesicles: Fluorescence study. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 65(5), 336-346.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les bicouches lipidiques constituent le squelette des membranes biologiques. En raison de la complexité des membranes naturelles, de nombreux modèles biomimétiques sont développés afin d'étudier les divers processus biologiques qui se produisent au niveau cellulaire. Les efforts se concentrent sur l'amélioration de ces modèles afin de se rapprocher de l'état naturel des membranes et d'ouvrir la voie à de nouvelles techniques d'étude.

Dans une revue de la littérature présentée dans le premier chapitre de ce mémoire, nous avons mis en évidence le développement de modèles de membrane biomimétique et les techniques permettant leur caractérisation, en particulier celles adaptées aux analyses sur une surface solide. A cet égard, nous avons souligné le rôle critique des liposomes dans le processus d'élaboration des deux principaux modèles de membrane tels que la bicouche lipidique supportée (SLB) et la couche vésiculaire supportée (SVL).

L'objectif de cette thèse était de développer une couche vésiculaire supportée (SVL) formée de liposomes intacts sur un substrat d'or par une stratégie d'ancrage stable, pour mener des études d'interaction avec des biomolécules d'intérêt. Ce type de membrane a été adopté en raison de sa structure semblable à celle des membranes cellulaires et grâce au fait qu'elle peut être caractérisée à l'aide de nombreuses techniques analytiques. En tant que méthode biophysique principale de la thèse, la résonance plasmonique de surface multiparamétrique (MP-SPR) dans un format à double longueurs d'onde a été employée, permettant la caractérisation à l'échelle nanométrique de structures lipidiques et l'analyse quantitative des interactions entre les membranes et les biomolécules d'intérêt.

Nous avons consacré le deuxième chapitre de cette thèse à la compréhension du phénomène SPR et à la présentation du principe physique de l'approche MP-SPR utilisée dans cette thèse. Nous avons appris que la base de la SPR repose sur la notion du « plasmon de surface » existant à l'interface entre un métal et un diélectrique. Nous avons montré à l'aide de la théorie de Maxwell que ces ondes de surface ont une polarisation transverse magnétique notée (TM) et qu'elles ont un caractère évanescent. Nous avons également montré que le plasmon de surface ne pouvait pas être excité par une onde lumineuse incidente qui proviendrait directement du

vide. Leur excitation était possible si nous utilisions un troisième milieu. Cette idée a été introduite par Otto puis par Krestchmann-Reather qui ont utilisé un prisme en verre et la méthode de la réflexion totale atténuée (ATR). Cela a permis d'obtenir la résonance plasmonique de surface. Ensuite, nous avons démontré qu'une analyse basée sur la MP-SPR, en particulier à double longueurs d'onde, était une approche efficace pour déterminer les valeurs uniques de l'épaisseur et de l'indice de réfraction des films ultraminces par rapport à la SPR traditionnelle. Une évaluation minutieuse des publications présentant des résultats sur les mesures de films ultra-minces indique que l'approche de l'analyse MP-SPR est capable de caractériser des couches minces avec une bonne précision.

Dans cette étude et pour la première fois, la MP-SPR à double longueur d'onde a été combinée à l'emploi d'une couche vésiculaire supportée formée de liposomes intacts pour étudier les mécanismes d'interaction membranaire du mono-rhamnolipide produit par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, du peptide E4-GGYC, un analogue du peptide HA2 du virus de la grippe et du peptide bradykinine (BK). Le principal défi était de suivre en temps réel, sans aucun marquage et dans différentes conditions expérimentales, les effets de l'interaction de ces trois biomolécules sur la structure et la morphologie des liposomes supportés afin de mieux comprendre leurs mécanismes d'action sur les membranes. Une analyse théorique basée sur les mesures à double longueur d'onde de la couche de Fresnel a été utilisée pour la caractérisation des changements au niveau de la couche de liposomes.

Dans le troisième chapitre, nous avons étudié l'interaction du mono-rhamnolipide avec la couche de liposomes intacts supportés sur l'or. Dans un premier temps, nous avons montré par une étude comparative MP-SPR que les liposomes biotinylés interagissent de façon forte et stable avec la surface d'or fonctionnalisée par la streptavidine. Ensuite, nous avons suivi en temps réel les étapes de changement de la couche de liposomes suite à l'effet déstabilisant du mono-rhamnolipide à différentes concentrations et finalement avec le Triton X-100 (1%). Nous avons ainsi démontré l'efficacité de la méthode MP-SPR pour caractériser les différents états de l'architecture des liposomes et distinguer une monocouche de liposomes, une bicouche lipidique et une monocouche lipidique. Grâce à la modélisation théorique, nous avons déterminé les valeurs uniques de l'épaisseur (d), l'indice de réfraction (n) et la densité de masse surfacique (I) de ces structures lipidiques et avons pu valider nos hypothèses concernant la rupture de la couche de liposomes. Nous avons également montré la haute sensibilité de cet outil analytique pour la détection des mono-RLs, avec une limite de détection de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$.

D'autres études sont encore nécessaires pour valider notre méthode dans des échantillons réels. Sur ce point, il est important de noter que, bien que le test ne soit probablement pas spécifique pour la détection des rhamnolipides de *P.aeruginosa*, il peut être intéressant pour la détection sensible de toxines bactériennes au stade précoce d'une infection.

Dans le dernier chapitre, nous avons mis en évidence l'interaction d'autres biomolécules ayant une activité biologique différente de celle des rhamnolipides avec le même modèle de membrane. Ainsi nous avons choisi d'étudier l'interaction du peptide E4-GGYC et du peptide BK avec une couche de liposomes supportés dont la taille de liposomes est < 100 nm. Ces deux peptides ont un mécanisme d'action et une structure secondaire différents lorsqu'ils sont associés à la membrane biomimétique. Nous avons adopté la même stratégie de liaison biotine/streptavidine pour immobiliser les liposomes. Nous avons ainsi calculé l'affinité de la liaison entre les liposomes biotinylés et la surface de streptavidine ($K_D = 9,44 \cdot 10^{-12}$ M). Ensuite, nous avons montré par AFM la couverture élevée de la surface de streptavidine par les liposomes. Pour le peptide E4-GGYC, nous avons démontré la variation de la morphologie de la couche de liposomes après injection de E4-GGYC à pH 4,5 et pH 8 et nous avons révélé différents mécanismes d'interaction pH-dépendants. Par le calcul théorique de l'épaisseur (d), de l'indice de réfraction (n) ainsi que la concentration en phospholipides (C_p), nous avons pu identifier un mécanisme de gonflement et de dégonflement partiel de la couche de liposomes lié à l'insertion et à la désorption du peptide E4-GGYC (5-25 μ M) à pH 4,5. Par une étude complémentaire, nous avons confirmé ce résultat et aussi la dépendance au pH de l'interaction peptide E4-GGYC/ liposomes en solution par DLS et par NanoSight (NTA). Il est à noter que contrairement à ce qui est décrit dans la littérature, nous n'avons pas observé par MP-SPR de mécanisme de rupture, de dégradation ou de fusion des liposomes greffés en augmentant la concentration en peptide jusqu'à 100 μ M. Néanmoins, nous avons montré que l'insertion du peptide E4-GGYC à pH 4,5 augmente la robustesse de la membrane. Dans le cadre de l'étude d'interaction avec la bradykinine, nous avons discerné d'autres mécanismes d'interaction dans un tampon à pH 7 et pH 4 avec le même modèle de membrane. Les résultats ont montré la haute affinité du peptide BK pour la membrane du liposome aux deux pH, avec une quasi irréversibilité de la liaison. Ces études préliminaires nous permettent de confirmer que le peptide BK interagit avec les liposomes avec une cinétique très lente et indépendante du pH du milieu d'analyse contrairement au peptide E4-GGYC.

Les travaux de cette thèse ont permis de mettre en évidence l'intérêt de la technique MP-SPR à double longueur d'onde dans la caractérisation et la compréhension des interactions biomoléculaires avec des modèles de membrane cellulaire. Cette technique est générique et peut être adaptée à tout système multicouche subissant des transformations morphologiques quantitatives pendant l'adsorption de biomolécules à leur surface. La thèse décrit également les protocoles d'analyse par modélisation pouvant aider les futurs développements de technologies analytiques sensibles à la surface utilisant des membranes lipidiques modèles.

Différentes plateformes analytiques associant membrane biomimétique et technique MP-SPR pourront probablement être construites dans les années à venir pour obtenir des informations fondamentales sur les propriétés de différents systèmes biologiques ou organiques et développer possiblement de nouveaux types de capteur.

En perspectives à ce travail, nous envisageons :

- de finaliser l'étude cinétique de la liaison du peptide BK avec les liposomes et mener une étude théorique de son mécanisme d'action sur la membrane modèle dans le but de montrer les changements morphologiques qui peuvent être dus à son adsorption.
- d'utiliser d'autres techniques de caractérisation comme l'ellipsométrie, l'interférométrie à double polarisation ou une technique basée sur la fluorescence pour identifier le mode et l'emplacement de la liaison des peptides E4-GGYC et BK avec la membrane. Cela permettrait de compenser les limites de précision de l'analyse MP-SPR.
- de varier la composition lipidique des liposomes utilisés dans cette thèse et voir l'impact de ce changement sur la membrane formée.
- d'étudier enfin par MP-SPR l'interaction d'autres types de biomolécules, ayant des activités biologiques plus complexes, avec la membrane biomimétique formée de liposomes

Annexe 1 : Equations de Maxwell et équation de propagation

Les interactions des ondes électromagnétiques avec la matière sont décrites par les équations de Maxwell :

$$\text{Equation de Maxwell-Gauss : } \nabla \cdot \mathbf{E}(r, t) = \frac{\rho(r, t)}{\epsilon_0} \quad (1.1)$$

$$\text{Equation de Maxwell-Thomson : } \nabla \cdot \mathbf{B}(r, t) = 0 \quad (1.2)$$

$$\text{Equation de Maxwell-Faraday : } \nabla \wedge \mathbf{E}(r, t) = -\frac{\partial \mathbf{B}(r, t)}{\partial t} \quad (1.3)$$

$$\text{Equation de Maxwell-Ampère : } \nabla \wedge \mathbf{H}(r, t) = \mathbf{J}(r, t) + \frac{\partial \mathbf{D}(r, t)}{\partial t} \quad (1.4)$$

Ces équations relient les variations dans l'espace et dans le temps du champ électrique $\mathbf{E}(r, t)$ et le champ magnétique $\mathbf{H}(r, t)$. Nous notons $\mathbf{D}(r, t)$ le déplacement électrique défini par :

$$\mathbf{D}(r, t) = \epsilon_0 \mathbf{E}(r, t) + \mathbf{P}(r, t) \quad (1.5)$$

$\mathbf{P}(r, t)$ étant le moment dipolaire électrique par unité de volume et $\mathbf{B}(r, t)$ l'induction magnétique définie par :

$$\mathbf{H}(r, t) = \frac{\mathbf{B}(r, t)}{\mu_0} - \mathbf{M}(r, t) \quad (1.6)$$

$\mathbf{M}(r, t)$ étant le moment dipolaire magnétique par unité de volume. ϵ_0 et μ_0 étant la permittivité diélectrique et la perméabilité magnétique du vide respectivement.

$\rho(r, t) = \rho_{\text{ext}}(r, t) + \rho_{\text{int}}(r, t)$ représente la densité de charge volumique et $\mathbf{J}(r, t)$ représente la densité de courant surfacique.

Nous nous plaçons dans le cas où les deux milieux sont linéaires, homogènes et isotropes :

- La linéarité du milieu fait que $\mathbf{P}(r, t) = \epsilon_0 \chi_e \mathbf{E}(r, t)$. Le déplacement devient alors $\mathbf{D}(r, t) = \epsilon_0 \epsilon \mathbf{E}(r, t)$ avec $\epsilon = 1 + \chi_e$ étant la constante diélectrique du matériau ou permittivité relative.
- L'homogénéité fait que la constante diélectrique ne dépendra plus de r ce qui facilitera le reste du travail, hypothèse valable également pour les couches minces.

- Nous supposons aussi, pour faciliter le travail, que les matériaux sont considérés non-magnétiques, ce qui nous permettra de mettre $M = 0$ et $\mu_r = 1$
- Pour finir, nous considérons le cas où il n'y a aucune source de courant extérieur :
 $j_{ext} = 0$ et $\rho_{ext} = 0$

Toutes ces conditions réunies nous permettent d'obtenir les équations de Maxwell :

$$\nabla \cdot D = 0, \nabla \times E = -\frac{\partial B}{\partial t} \quad (1.7)$$

$$\nabla \times H = \frac{\partial D}{\partial t}, \nabla \cdot H = 0$$

Ces équations sont utilisées pour la détermination de l'équation de propagation **1.8** :

$$\nabla^2 E - \frac{\varepsilon}{c^2} \frac{\partial^2 E}{\partial t^2} = 0 \quad (1.8)$$

Où ε est la permittivité diélectrique et c la célérité de la lumière dans le vide.

Si nous considérons que le champ électrique et magnétique respectivement, sont des équations harmoniques dépendantes du temps, E et H s'écriront d'une manière générale :

$E(r, t) = E(r)e^{-i\omega t}$ (1.9) et $H(r, t) = H(r)e^{-i\omega t}$ (1.10) [1]. Celles-ci permettent de modifier l'équation (1.8) qui devient **Equation 1** (dans le chapitre 2).

Référence :

[1] Bonnard, C. (2006). Couplage fort entre plasmons de surface et excitons de semiconducteur organique (Doctoral dissertation, Université Claude Bernard-Lyon I).

Annexe 2 : Existence du plasmon de surface

Les SP étant évanescents dans la direction z , les solutions cherchées doivent contenir cette évanescence. Elles sont donc, pour les deux modes (TE) qui lie $\{E_y, H_x, H_z\}$ et (TM) qui lie $\{H_y, E_x, E_z\}$ écrites de la façon générale suivante :

-Pour le mode (TE) :

Pour $z > 0$

$$E_y(z) = A_d e^{ik_{SP}x} e^{-k_d z} \quad (2.1.a)$$

$$H_x(z) = -iA_d \frac{1}{\omega\mu_0} k_d e^{ik_{SP}x} e^{-k_d z} \quad (2.2.a)$$

$$H_z(z) = A_d \frac{k_{SP}}{\omega\mu_0} e^{ik_{SP}x} e^{-k_d z} \quad (2.3.a)$$

Pour $z < 0$

$$E_y(z) = A_m e^{ik_{SP}x} e^{k_m z} \quad (2.1.b)$$

$$H_x(z) = iA_m \frac{1}{\omega\mu_0} k_m e^{ik_{SP}x} e^{k_m z} \quad (2.2.b)$$

$$H_z(z) = A_m \frac{k_{SP}}{\omega\mu_0} e^{ik_{SP}x} e^{k_m z} \quad (2.3.b)$$

-Pour le mode (TM) :

Pour $z > 0$

$$H_y(z) = A_d e^{ik_{SP}x} e^{-k_d z} \quad (2.1.c)$$

$$E_x(z) = iA_d \frac{1}{\omega\epsilon_0\epsilon_d} k_d e^{ik_{SP}x} e^{-k_d z} \quad (2.2.c)$$

$$E_z(z) = -A_d \frac{k_{SP}}{\omega\epsilon_0\epsilon_d} e^{ik_{SP}x} e^{-k_d z} \quad (2.3.c)$$

Pour $z < 0$

$$H_y(z) = A_m e^{ik_{SP}x} e^{k_m z} \quad (2.1.d)$$

$$E_x(z) = -iA_m \frac{1}{\omega\epsilon_0\epsilon_d} k_m e^{ik_{SP}x} e^{k_m z} \quad (2.2.d)$$

$$E_z(z) = -A_m \frac{k_{SP}}{\omega\epsilon_0\epsilon_d} e^{ik_{SP}x} e^{k_m z} \quad (2.3.d)$$

Avec A_d et A_m constantes associées aux milieux diélectrique et métallique respectivement, ϵ_0 est la permittivité du vide et $k_{d,m} = k_{z,d/m}$ sont les composantes du vecteur d'onde, constantes positives, perpendiculaires à l'interface au niveau du métal et du diélectrique et le terme

$e^{-|z|k_{z,d/m}}$ traduit l'évanescence dans les deux milieux (métal et diélectrique) dans la direction z . On note également $k_{x,m} = k_{x,d} = k_{SP}$.

-Pour le mode (TE) :

L'application des conditions de continuité à l'interface entre le métal et le diélectrique en $z = 0$, fait que :

$$E_{y,m} = E_{y,d} \text{ et } \frac{\partial E_{y,m}}{\partial z} = \frac{\partial E_{y,d}}{\partial z} \Leftrightarrow E_{0,m} = E_{0,d} \text{ et } -k_{z,m}E_{0,m} = k_{z,d}E_{0,d}$$

— $k_{z,m} = k_{z,d}$, ce qui est impossible puisque $k_{z,m}$ et $k_{z,d}$ sont des constantes positives. Ceci implique qu'un plasmon de surface n'existe pas en polarisation transverse électrique (TE). Ce n'est pas une onde électromagnétique de polarisation transverse électrique.

-Pour le mode (TM) :

L'application des conditions de continuité à l'interface entre le métal et le diélectrique en $z = 0$ fait que :

$$H_{y,m} = H_{y,d} \text{ et } \frac{1}{\varepsilon_m} \frac{\partial H_{y,m}}{\partial z} = \frac{1}{\varepsilon_d} \frac{\partial H_{y,d}}{\partial z}, \text{ donnent, en posant } A_d = A_m, \text{ l'équation 2.4 suivante :}$$

$$\frac{k_d}{k_m} = -\frac{\varepsilon_d}{\varepsilon_m} \quad (2.4)$$

Cela impose que les constantes diélectriques sont de signes opposés et que $k_{z,m}$ et $k_{z,d}$ soient toujours des constantes positives. Un plasmon de surface n'existe donc qu'en polarisation (TM) et entre deux milieux de fonctions diélectriques de signes opposés.