UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉLABORATION DE MEMBRANES PHOSPHOLIPIDIQUES SUPPORTÉES SUR DES SURFACES NANOPATTERNÉES EN VUE D'AMÉLIORER LE CRIBLAGE DES MÉDICAMENTS

THÈSE

PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DU DOCTORAT EN CHIMIE

PAR

SOURYVANH NIRASAY

JUIN 2017

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

. .

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé sous la direction des professeurs Isabelle Marcotte et Jérôme Claverie. Je tiens à leur adresser mes sincères remerciements. J'ai été plus que ravie d'avoir été encadrée par ces deux personnes et je souhaite à tout étudiant d'avoir l'opportunité de faire de la recherche et d'évoluer dans des conditions similaires aux miennes. Je me compte chanceuse d'avoir pu bénéficier des conseils de chercheurs aussi talentueux qu'inspirants. Je les remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné les outils pour mener à bien mon projet. Je tiens aussi à souligner toute l'aide et le soutien qu'ils ont su m'apporter dans mes moments les plus difficiles. Rares sont les personnes que l'on croise sur son chemin de vie et qui nous marquent autant. Ces deux êtres font définitivement partie de ceux que l'on admire. Un grand merci à vous pour votre générosité et tous les bons moments partagés.

Mes remerciements s'adressent également à toi, chère professeure Badia. Merci Antonella de m'avoir si bien accueillie dans ton laboratoire, pour tes précieux conseils et tes encouragements tout au long de mon doctorat. Je garderai de merveilleux souvenirs de mon passage au sein de ton groupe.

À Patricia Moraille, notre gourou AFM. Je ne sais pas combien de fois je t'ai sollicitée pour une question, une difficulté, un souci technique. En même temps, c'est de ta faute, tu avais toujours une réponse à m'offrir. Merci pour les moments passés à tes cotés à m'enseigner les principes de la vie. Ton énergie et ta positivité contagieuse m'accompagneront pour longtemps.

Je souhaite aussi remercier l'équipe néo-PAMPA : le Pr. Leclair et ses deux étudiantes Sarra Zaraa et Marie-Ève Leclaire. Merci Grégoire pour la qualité de tes contributions scientifiques et ta gentillesse. Merci à vous, Sarra et Marie-Ève, pour tout votre travail et votre bonne humeur.

J'adresse un grand merci aux professeurs Alexandru Mateescu et Mohamed Siaj pour leur bienveillance, leurs conseils et encouragements depuis le début de ce doctorat. Je les remercie, ainsi que la professeure Zoya Leonenko, pour le temps consacré à avoir lu et corrigé ma thèse.

Je tiens aussi à remercier Yves Mouget. À l'époque où j'étais encore indécise, tu as su trouver les bons mots et me motiver à entreprendre ce doctorat. Merci pour toutes nos discussions et ta disponibilité. Un merci spécial à Bastien Landry pour m'avoir initiée à la technique PAMPA au début du projet et d'avoir ensoleillé mes journées.

Je n'oublie évidemment pas mes collègues avec qui j'ai eu la joie de travailler et que j'ai eu le plaisir de côtoyer durant ces années de doctorat:

- Basile (Zouzou), Laurence, JC, Wei-Heng, Oumar (Moumou), Jules, Mitra, Jianming, Ahmad, Florian, Moubarak, Jonathan, Vladimir, Régis. (Laboratoire Claverie)

- Andrée, Fred, Maïwenn, Marc-Olivier, Marwa, David, Zeineb, André Luiz, Alexandre A. (Laboratoire Marcotte)

- Éric, Catherine, Natyvella, Olga. Je souhaite particulièrement remercier Kim-Ly et Adeline pour ces moments passés en votre compagnie et pour avoir rendu les journées encore plus belles. (Laboratoire Badia)

- Danny, Mathieu Senior, Mathieu Junior, Duc. Merci les filles pour les parties de hockey cosom que nous avons disputées et pour votre bonne humeur continuelle.

J'aimerais remercier les personnes suivantes pour leur soutien technique : Martin Lambert (cellule liquide AFM), Denis Flipo (expériences de FRAP), Pascale Lechevallier (XPS), Marie-Hélène Bernier et Nicole McDonald (MEB), Gwenaël Chamoulaud, le personnel de soutien et en particulier Luc, Marie-Josée et Jacqueline.

Je remercie aussi le personnel du secrétariat, Odette et en particulier Sonia. Une chance que nous avons de pouvoir toujours compter sur toi. Merci pour ton sourire et ta gentillesse.

Mes remerciements vont également aux organismes suivants : l'UQAM, le FRQNT, le programme Chembio de l'Université McGill, Pharmaqam, le CQMF, le Réseau Québécois de recherche sur les médicaments (RQRM), la Biophysical Society, la Société de Biophysique du Canada (Biophysical Society of Canada) pour leur appui financier à travers l'octroi de bourses d'études, de stage ou de voyage pour la participation aux conférences scientifiques.

À mon ami Johan, merci d'être là et de me faire profiter des bons moments de la vie.

À mon ami Thanh-Phuc, merci pour ta précieuse amitié durant toutes ces années.

Je remercie également ma famille de cœur, pour tout l'amour et la générosité que vous m'avez offert sans retenue. Je vous aime.

À ma famille exceptionnelle, je vous remercie de m'avoir encouragée à toujours donner le meilleur de moi-même. Ma réussite est aussi la vôtre. Je vous aime.

À mon Jonathan, je te suis pleinement reconnaissante de m'avoir aidée et surtout, de m'avoir autant soutenue et mille fois encouragée durant ces années de doctorat. Je remercie la vie de t'avoir rencontré. Merci de me rendre meilleure chaque jour passé à tes côtés. Je t'aime.

Enfin, high five ma Yuki ;)



TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURESxi			
LISTE DES TABLEAUXxix			
LISTE DES ABBRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMESxx	ci		
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉSxxx	v		
RÉSUMÉ	ii		
CHAPITRE I			
INTRODUCTION			
1.1 Mise en contexte	1		
1.2 Les membranes biologiques : organisation structurale et fonctionnelle	2		
1.2.1 Structure de la membrane plasmique	3		
1.2.2 Composition lipidique des membranes	4		
1.2.3 Propriétés physiques des membranes	8		
1.2.4 Les radeaux lipidiques	2		
1.3 Les modèles de membranes biologiques : cas des modèles membranaires			
supportés10	6		
1.3.1 Les monocouches et bicouches lipidiques supportées1'	7		
1.3.2 Les bicouches supportées sur polymère	4		
1.3.3 Les membranes suspendues	8		
1.4 Elaboration d'un modèle membranaire plus représentatif des membranes naturelles : objectif général et objectifs spécifiques	3		
CHAPITRE II	CHAPITRE II		
TECHNIQUES DE CARACTÉRISATION DES MEMBRANES			
2.1 La microscopie à force atomique (AFM)			
2.1.1 Principe de l'AFM	9		

	2.1.2 Les différents modes d'imagerie41
	2.1.3 Détermination des propriétés élastiques du film polymère : courbes de force-distance
	2.1.4 Détermination du module d'élasticité (module de Young)44
	2.1.5 Analyse des images d'AFM : détermination du pourcentage de recouvrement de la surface
2.2	La microscopie à fluorescence : recouvrement de la fluorescence après photoblanchiment (FRAP)
	2.2.1 Principe d'une expérience de FRAP47
	2.2.2 Détermination du coefficient de diffusion des lipides48
2.3	La spectroscopie de résonance des plasmons de surface (SPR)49
2.4	La Microbalance à Cristal de Quartz avec Dissipation (QCM-D)52
CHA SUP PAM 3.1	PITRE III PORTED BILAYER ON A NANOPATTERNED MEMBRANE AS MODEL IPA MEMBRANES Résumé de l'article
3.2	Abstract
3.3	Introduction
3.4	Materials and methods60
	3.4.1 Materials60
	3.4.2 Coupling of mPEG-NH ₂ to S1-S3 filters61
	3.4.3 Coating of the filters by polydopamine
	3.4.4 Vesicle fusion
	3.4.5 Permeation measurement, via PAMPA
3.5	Results and discussion
3.6	Acknowledgements71
3.7	Supplementary data71
	3.7.1 AFM images71
	3.7.2 Permeation of Lucifer Yellow as a means to check membrane integrity.74
CHA	APITRE IV
POL	YDOPAMINE-SUPPORTED LIPID BILAYERS
4.1	Resume de l'article

viii

4.2	Abstract
4.3	Introduction
4.4	Results and Discussion
	4.4.1 Polydopamine Film Thickness
	4.4.2 Mica and Polydopamine Film Characterization
4.5	Characterization of DMPC and DOPC Bilayers on Polydopamine-Coated Mica
4.6	Experimental Section
	4.6.1 Materials
	4.6.2 Coating of Mica with Polydopamine
	4.6.3 Deposition of Phospholipid Bilayers
	4.6.4 Ellipsometry
	4.6.5 X-Ray Photoelectron Spectroscopy
	4.6.6 Atomic Force Microscopy (AFM)
	4.6.7 Fluorescence Microscopy and Fluorescence Recovery after
	Photobleaching (FRAP)
4.7	Conclusions
4.8	Acknowledgements
CHA	APITRE V
POR	RE-SPANNING LIPID MEMBRANES WITH NEAR-NATIVE PROPERTIES
5.1	Résumé de l'article
5.2	Abstract 101
53	Introduction 102
54	Results and Discussion 104
5.5	Conclusion 110
5.6	Experimental section 111
5.0	Experimental section
5.7	
5.8	Supporting information
	5.8.1 Materials and methods
	5.8.2 AFM on polydopamine-supported lipid bilayers

5 8 3 AFM on membranes	115
5.8.4 Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) experime	nts119
5.8.5 Surface Plasmon Resonance (SPR) measurements	
5.8.6 Quartz Crystal Microbalance with Dissipation (QCM-D)	129
5.8.7 AFM on polydopamine nanopore-spanning lipid bilayers	133
CONCLUSION	137
RÉFÉRENCES	143

х

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
Figure 1.1	Structure d'une membrane biologique représentée par une bicouche de phospholipides (têtes colorées en vert et queues hydrophobes en jaune sur le schéma) incluant des radeaux lipidiques, zones enrichies avec certains lipides et protéines (sections orangées sur le schéma). Figure modifiée avec permission ²
Figure 1.2	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)
Figure 1.3	Structure générale des sphingolipides et de la sphingomyéline (SM), lorsque la fonction alcool primaire est substituée par une tête phosphatitylcholine
Figure 1.4	A) Structure chimique du cholestérol et B) son orientation dans la bicouche. Schéma B repris avec permission ²²
Figure 1.5	Les différents états physiques des phospholipides ainsi que les coefficients de diffusion D associés. En phase gel, les phospholipides sont très compacts (isomérisation tout-trans des chaînes hydrocarbonées). En phase fluide, les phospholipides perdent ce compactage (isomérisation trans-gauche des chaines hydrocarbonées). L'addition de cholestérol donne lieu à une nouvelle phase, la phase liquide ordonnée, dans laquelle les phospholipides possèdent une mobilité latérale proche de la phase fluide, les chaînes étant ordonnées comme en phase gel. Adapté avec permission ²⁹
Figure 1.6	 A) Représentation d'un radeau planaire et B) d'une cavéole. L'encadré montre comment la protéine cavéoline est insérée dans la membrane, avec les segments N et C terminaux faisant

	face au cytoplasme ainsi que le domaine intramembranaire en forme de tête d'épingle à cheveux. Modifié avec permission ⁵¹ 13
Figure 1.7	Les vésicules ou liposomes, les bicelles et les nanodisques en tant que modèles membranaires libres en solution
Figure 1.8	Schéma d'une bicouche lipidique supportée sur surface solide18
Figure 1.9	 A) Monocouche et B) bicouche supportées obtenues par transfert Langmuir-Blodgett et C) bicouche formée par transfert Langmuir-Schaeffer. 20
Figure 1.10	Processus de fusion de vésicules qui nécessite de travailler à une température supérieure à la T_m des phospholipides. Figure reprise avec permission ¹¹⁰
Figure 1.11	Double membrane supportée : les deux bicouches sont liées par des ponts PEG-biotine-streptavidine-biotine. Schéma adapté avec permission ¹¹⁶
Figure 1.12	Schéma d'une membrane supportée sur support solide : A) dans le cas où une protéine transmembranaire est en contact direct avec la surface B) l'épaisseur entre la membrane et le support peut être ajustée avec l'ajout d'une couche polymère hydratée qui permet d'assurer l'insertion de protéines transmembranaires sans les dénaturer. Adapté avec permission ¹²⁴
Figure 1.13	Schéma d'une membrane suspendue ou membrane noire. Adapté avec permission ¹⁶¹
Figure 1.14	Schéma d'une membrane phospholipidique suspendue sur surface poreuse. Inspiré de la référence ¹⁷⁴
Figure 1.15	Schéma A) d'un puits et B) d'une cellule de Franz pour test PAMPA. Adapté de (http://www.cyprotex.com) et (http://www.permegear.com)
Figure 2.1	 A) Schéma illustrant les composantes principales d'un AFM et B) Diagramme des forces en fonction de la distance pointe- surface. Diagramme traduit avec permission²¹²40
Figure 2.2	Exemple typique d'une courbe force-distance. Traduit avec permission ²¹²
Figure 2.3	Visualisation de l'intervalle d'analyse à considérer pour le calcul du module d'élasticité. Adapté avec permission ²¹⁹ 44

Figure 2.4	Analyse "Bearing" pour déterminer le pourcentage de recouvrement de la surface par la bicouche de DMPC sur du mica. 46
Figure 2.5	Diagramme de Jablonski pour la fluorescence
Figure 2.6	Schéma illustrant une expérience de FRAP et courbe typique d'intensité de fluorescence en fonction du temps. Adapté avec permission ²²³
Figure 2.7	A) Schéma illustrant le principe de la SPR. La puce de détection, qui comprend une lame de verre recouverte d'une fine couche métallique d'or, est placée sur le prisme. Dans les conditions de réflexion totale interne, la lumière est totalement réfléchie et mesurée au niveau du photodétecteur. Le vecteur d'onde k_{sp} varie en fonction de n_2 et le vecteur d'onde k_x peut être modifié en variant l'angle d'incidence et/ou la longueur d'onde. B) Spectre typique en SPR : courbe de l'intensité de la lumière réfléchie (R) pour une lumière incidente monochromatique en fonction de l'angle d'incidence et sensorgramme : variation de l'angle SPR en fonction du temps. Schéma modifié de la référence ²²⁵
Figure 2.8	Schéma d'un cristal de quartz utilisé en Microbalance. Adapté de (http://www.biolinscientific.com/q-sense)
Figure 2.9	Schéma illustrant le principe de la Microbalance à Cristal de Quartz avec Dissipation. Adapté de (http://www.biolinscientific.com/q-sense)
Figure 3.1	Model PAMPA membranes. A lipid bilayer is supported on a polymeric cushion (PEG or polydopamine) which is itself covalently anchored or absorbed at the surface of a nanoporous alumina filter. The assembly is mounted in a Franz cell setup (left) for permeability measurements
Figure 3.2	Surface derivatization of nanoporous alumina filters by mPEG- NH ₂
Figure 3.3	AFM analysis of membrane S3 derivatized by mPEG-NH ₂ in air. (a) Contact mode (scan size $1.78 \ \mu m \ x \ 1.78 \ \mu m$). (b) Tapping mode (scan size $2.25 \ \mu m \ x \ 2.25 \ \mu m$)
Figure 3.4	Polymerization of dopamine onto the surface of a nanoporous alumina filter

Figure 3.5	 (a) Surface of S3 covered by a film of polydopamine. X locates the continuous islands of polydopamine. (b) 3D representation of the surface S3 covered by the polydopamine film and the DMPC bilayer.
Figure 3.6	Diffusion profile of famotidine: (a) classical PAMPA (N = 6) and (b) DMPC bilayer on A1 filter with polydopamine hydrated cushion (N = 5). 69
Figure 3.7	Diffusion profile of acetaminophen: (a) classical PAMPA (N = 6) and (b) DMPC bilayer on A1 filter with polydopamine hydrated cushion (N = 6). $$
Figure 3.S1	Filter + PEG (in air)71
Figure 3.S2	Filter + PEG + DMPC in water
Figure 3.S3	Filter + Dopamine in water
Figure 3.S4	Filter + Dopamine + DMPC in water
Figure 3.S5	Diffusion profile of Lucifer Yellow, DMPC bilayer on filter with polydopamine hydrated cushion ($N = 6$)
Figure 4.1	Preparation of polydopamine-supported membranes and the structure of polydopamine as suggested by Lee <i>et al.</i> (2007) ²⁷⁴ 82
Figure 4.2	Effect of the immersion time (25 °C, phosphate buffer pH 8.5, dopamine = 2 g/L) on the polydopamine coating thickness as determined by ellipsometry in air
Figure 4.3	Surface atomic composition of mica and polydopamine-coated mica as determined by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) 84
Figure 4.4	Atomic force microscopy (AFM) topography of (a) unmodified and (b) polydopamine-coated mica in water using tapping mode (scan size 1.5 μ m × 1.5 μ m). Z-scale is shown on the right side85
Figure 4.5	Force curves obtained (a) in air (b) in water for unmodified and polydopamine-coated mica, with corresponding calculated elastic moduli
Figure 4.6	Tapping mode AFM images in deionized water of DMPC (left) or DOPC (right) supported on polydopamine-coated mica (top: height mode, bottom: phase mode, scan size $1.5 \ \mu m \times 1.5 \ \mu m$)89

Figure 4.7	Fluorescence microscopy recovery after photobleaching (FRAP) images of phospholipid bilayers supported on polydopamine-coated mica: DMPC (a) before; (b) immediately after; (c) 3 s; and (d) 288 s after photobleaching. DOPC: (e) before; (f) immediately after; (g) 3 s; and (h) 201 s after photobleaching. 91
Figure 4.8	Determination of the mobility for (a) OG-DHPE labeled DMPC and (b) DOPC deposited onto polydopamine-coated mica from the FRAP normalised fluorescence intensity as a function of time
Figure 5.1	Chemical structures of A) dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), B) DC-Cholesterol hydrochloride (DC-Chol) and C) dopamine and its polymerization into polydopamine. D) Membrane formation on the polydopamine cushion by the vesicle fusion technique
Figure 5.2	AFM topography images of DOPC/DC-Chol (70/30), (80/20) and (90/10) bilayers deposited on PDA-modified mica (scan size $4x2 \ \mu m^2$). Solution used during vesicle fusion process was either A) water, C) E) G) 10 mM sodium phosphate pH 7.4, or D) F) H) 10 mM sodium phosphate 150 mM NaCl pH 7.4. B) Bearing analysis from image A). 106
Figure 5.3	A) Sensorgram obtained for DOPC/DC-Chol (80/20) membrane formation B) Experimental and simulated SPR angles as well as calculated thicknesses of polydopamine (n=1.45) and bilayer (n=1.49).
Figure 5.4	3D representation of the nanoporous alumina filter: A) without modification, B) polydopamine-coated, C) polydopamine-coated with a DOPC/DC-Chol (70/30) bilayer (scan size 500 x 500 nm ²). Surface roughness analyses were performed on 500 x 500 nm ² areas. D) Height profiles of a single pore at each step of modification.
Figure 5.S1	AFM topography of A) unmodified and B) polydopamine- coated mica in water using tapping mode (scan size $1.5 \times 1.5 \ \mu m^2$). Z-scale is shown on the right side. Figure from reference ²⁸⁷
Figure 5.S2	AFM topography of DOPC/DC-Chol (70/30) patches deposited on PDA B) Measurement of the patch thickness located in the red box in A)

xv

AFM topography images of DOPC/DC-Chol (70/30) bilayers deposited on PDA modified mica (top) with corresponding surface height analysis (bottom). The solution used for the vesicle fusion was : A) 10 mM sodium phosphate, B) 10 mM sodium phosphate + 150 mM NaCl
AFM topography images of DOPC/DC-Chol (80/20) bilayers deposited on PDA modified mica (top) with corresponding surface height analysis (bottom). The solution used for the vesicle fusion was : A) 10 mM sodium phosphate, B) 10 mM sodium phosphate + 150 mM NaCl
AFM topography images of DOPC/DC-Chol (90/10) bilayers deposited on PDA modified mica (top) with corresponding surface height analysis (bottom). The solution used for the vesicle fusion was : A) 10 mM sodium phosphate, B) 10 mM sodium phosphate + 150 mM NaCl
FRAP curve for the DOPC/DC-Chol (80/20) membrane121
FRAP curve for the DOPC/DC-Chol (70/30) membrane121
AFM topography in air using tapping mode (scan size $1x2 \ \mu m^2$). Left) Unmodifed gold surface. A rms (root mean square) roughness value of 0.6 nm for an area of $1x1 \ \mu m^2$ was measured with the NanoScope software. Right) Polydopamine modified-gold. A rms (root mean square) roughness value of 1.9 nm for an area of $1x1 \ \mu m^2$ was measured. This value is small enough to consider the surface still flat
SPR kinetic profiles of lipid fusion on the polydopamine film with vesicles containing: A) DOPC/DC-Chol (70/30) B) DOPC/DC-Chol (80/20) C) DOPC/DC-Chol (90/10) and D) 100% DOPC
Modeling of the minimum SPR angle as a function of the adsorbed lipid layer thickness and equation of the adsorbed layer thickness
A) SPR spectra of a non-modified gold surface: experimental (black), modeled (red). B) SPR spectra of a modeled polydopamine-modified gold surface before and after deposition of a lipid bilayer, with a 20.0 nm thick polydopamine film $(n=1.45)$ and a 5.0 nm thick DOPC supported layer $(n=1.49)$

Figure 5.S12	A) Frequency shift and B) change in dissipation as a function of time during polydopamine formation.	129
Figure 5.S13	A) Frequency shift and B) change in dissipation as a function of time during pure DOPC vesicles fusion on polydopamine	130
Figure 5.S14	A) Frequency shift and B) change in dissipation as a function of time during pure DOPC/DC-Chol (70/30) vesicles fusion on polydopamine.	131
Figure 5.S15	SPR (DOPC/DC-Chol 70/30) vesicles fusion : Experimental curve in black and fitted curve in red.	132
Figure 5.S16	QCM-D (DOPC/DC-Chol 70/30) vesicles fusion : Experimental curve in black and fitted curve in red.	132
Figure 5.S17	AFM topography images of the nanoporous alumina filter : A) without modification B) polydopamine-coated C) polydopamine-coated and after DOPC/DC-Chol (70/30) vesicles fusion (scan size $1 \times 1 \mu m^2$).	133
Figure 5.S18	AFM topography images of DOPC/DC-Chol (70/30) bilayers deposited on PDA-coated nanoporous alumina filter (scan size 500x500 nm ²).	134
Figure 5.S19	Height measurement of one DOPC/DC-Chol (70/30) bilayer. The value was found to be 4.8 nm, which compares well with the thickness of a bilayer.	134
Figure 5.S20	AFM images of the 55-nm pore sized alumina filter, at each step of modification (above), and 2D fast Fourier Transform of the images (below).	135

.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
Tableau 1.1	Tableau donnant les températures de transition des phospholipides usuels dans l'eau (pH 7), traduit avec permission ³⁰ 10
Tableau 1.2	Aperçu des coussins polymères utilisés pour supporter les bicouches lipidiques et coefficients de diffusion des lipides
Table 3.1	Filters used to support floating bilayer membranes
Table 4.1	Lateral diffusion coefficients of lipids supported on various polymer supports, as measured by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)
Table 5.1	Percentage of membrane surface coverage, as determined after bearing analysis of the AFM images on samples incubated with a 2 mM DOPC suspension for 1, 3 and 7 days. Each sample was freshly rinsed with deionised water before analysis in order to remove free and adsorbed vesicles. Bearing analyses were performed on 8 μ m ² areas. 107
Table 5.S1	Refractive index of the solutions used during SPR experiments (measured at 21°C, $\lambda = 589$ nm, the last line corresponds to the average value). 126
Table 5.S2	Fresnel multilayer modeling 127
Table 5.S3	Results of periodicity values after 2D fast Fourier Transform

. .

LISTE DES ABBRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

Al_2O_3	Oxyde d'aluminium
ADMET	Absorption, Distribution, Métabolisme, Élimination et Toxicité
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFM	Microscopie de Force Atomique (Atomic Force Microscopy)
BLM	Membrane lipidique noire (Black Lipid Membrane)
Chol	Cholestérol
DC-Chol	3B-[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)carbamoyl]cholestérol
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholine
DMPE	Dimyristoylphosphatidyléthanolamine
DODAB	Bromure de N,N-diméthyl-N-octadécyl-1-octadécanaminium
DOPC	Dioleoylphosphatidylcholine
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DPPE	Dipalmitoylphosphatidyléthanolamine
DPPG	Dipalmitoylphosphatidylglycérol

FRAP	Recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (Fluorescence Recovery After Photobleaching)
GUV	Vésicule unilamellaire géante (Giant Unilamellar Vesicle)
LB	Langmuir-Blodgett
LC / MS	Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de masse
LS	Langmuir-Schaeffer
LUV	Grande vésicule unilamellaire (Large Unilamellar Vesicle)
NEC	Nouvelle Entité Chimique
p-SLB	Bicouche lipidique supportée sur un polymère (Polymer-Supported Lipid Bilayer)
PAMPA	Parallel Artificial Membrane Permeability Assay
PC	Phosphatidylcholine
PDA	Polydopamine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PEG	Poly(éthylène) glycol
PEM	Multicouches de polyélectrolyte (Polyelectrolyte multilayer)
PG	Phosphatidylglycérol
Pl	Phosphatidylinositol

- PMAA Poly(acide méthacrylique)
- POPC Palmitoyloleoylphosphatidylcholine
- PS Phosphatidylsérine
- QCM Microbalance à cristal de quartz (Quartz Crystal Microbalance)
- QCM-D Microbalance à cristal de quartz avec dissipation (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation)
- s-SLB Bicouche lipidique supportée sur surface solide (Solid-Supported Lipid Bilayer)
- SiO₂ Dioxyde de silicium
- SAM Monocouche autoassemblée (Self-Assembled Monolayer)
- SLB Bicouche lipidique supportée (Supported Lipid Bilayer)
- SM Sphingomyéline
- SOPS Stearoyloleoylphosphatidylsérine
- SPR Résonance des plasmons de surface (Surface Plasmon Resonance)
- TiO₂ Dioxyde de titane
- XPS Spectroscopie photoélectronique par rayons X

.

-4

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

α	Angle de demi-ouverture
δ	Indentation
θ	Angle d'incidence
$\theta_{min} \ ou \ \theta_{SPR}$	Angle minimum ou angle de résonance
λ	Longueur d'onde
μm	Micromètre
ν	Coefficient de Poisson
Å	Angström (10 ⁻¹⁰ m)
d	Déflection du microlevier
D	Coefficient de diffusion latérale
Е	Module de Young
F	Force appliquée
GOhm	Gigaohm
Hz	Hertz

k	Constante de raideur
La	Phase liquide-désordonnée
L_{β}	Phase solide-ordonnée ou liquide cristalline
Lo	Phase liquide ordonnée
m	Mètre
MHz	Mégahertz
mN	Millinewton
ng/cm ²	Nanogramme par centimètre carré
nm	Nanomètre
pg∙mm ⁻²	Picogramme par millimètre carré
S	Seconde
t	Temps
Т	Température
T _m	Température de transition de phase principale (main phase transition temperature)

RÉSUMÉ

Les bicouches lipidiques supportées sur surface solide (s-SLB_S) sont largement utilisées pour mimer les membranes biologiques. Elles consistent en une bicouche lipidique continue déposée directement sur un support solide. Cependant, l'existence d'interactions lipide-solide entraîne une perte de la mobilité des lipides et une diminution de la fluidité naturelle des membranes. Un modèle satisfaisant devrait inclure un recouvrement de surface par la bicouche sur de larges régions ainsi que le maintien de la mobilité latérale des lipides, d'une importance déterminante pour garantir un modèle pertinent des biomembranes.

La première partie de cette recherche visait à résoudre ce problème en élaborant un modèle de bicouche lipidique supportée par un coussin polymère (p-SLB), dans lequel le polymère agirait en tant que couche lubrifiante entre la membrane et le support solide. Le polymère bioinspiré polydopamine (PDA) a été choisi en raison de son aptitude à former facilement des revêtements minces sur une grande variété de surfaces, avec un contrôle de l'épaisseur en fonction du temps d'immersion du substrat. La caractérisation du polymère a été réalisée par des mesures d'angle de contact, spectroscopie photoélectronique par rayons X (XPS), ellipsométrie et microscopie à force atomique (AFM). Une surface de mica modifié avec la PDA a été utilisée pour supporter des bicouches de phospholipides zwitterioniques de dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) ou dioléoylphosphatidylcholine (DOPC) ; la phosphatidylcholine étant le phospholipide le plus abondant dans les membranes des cellules eucaryotes. Cependant, la caractérisation par AFM a révélé la formation de patches lipidiques sur la PDA au lieu d'une bicouche continue.

Sur la base de considérations électrostatiques, nous avons incorporé un lipide cationique, le 3ß-[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)carbamoyl]cholestérol (DC-Chol) dans la composition liposomale afin d'attirer davantage de vésicules à la surface de PDA chargée négativement et ainsi favoriser les interactions vésicules-polymère au cours du processus de fusion de vésicules. Nous avons de nouveau utilisé l'imagerie d'AFM ainsi que des techniques de caractérisation de surface telles que la résonance des plasmons de surface (SPR) et la Microbalance à cristal de quartz avec Dissipation (QCM-D) pour examiner davantage la formation des membranes à la surface du polymère. La microscopie de fluorescence via des expériences de FRAP a été utilisée pour évaluer la mobilité des phospholipides. Les résultats ont prouvé que notre

stratégie permettait l'obtention d'une bicouche continue avec plus de 90% de la surface polymère recouverte par une membrane de DOPC/DC-Chol (70/30). Le film de PDA s'est également avéré efficace pour maintenir la fluidité des bicouches phospholipidiques, améliorant ainsi cette classe de membrane modèle.

Le second objectif de cette recherche fut de développer un modèle amélioré du test Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA). Les tests PAMPA sont largement utilisés dans l'industrie pharmaceutique comme un outil de criblage à haut débit pour prédire l'absorption intestinale des médicaments administrés par voie orale. Ce test mesure la diffusion passive de composés à travers des membranes artificielles constituées de filtres imprégnés avec une solution de lipides dissous dans un solvant organique. L'organisation, la structure et la phase des lipides ne sont pas bien définies dans les membranes PAMPA conventionnelles. Plusieurs limitations reliées à la fluidité membranaire et l'obstruction possible des pores du filtre sont à solutionner. Nous avons préparé nos membranes lipidiques sur filtre nanoporeux en alumine préalablement modifié avec la polydopamine. La formation de bicouches de DOPC/DC-Chol sur le filtre modifié avec la PDA a été réalisée avec succès, comme le confirme nos résultats d'AFM. L'intégrité et la fluidité de nos membranes offrent un modèle synthétique robuste des membranes biologiques. Le fruit de nos travaux pourrait conduire au développement d'une nouvelle plate-forme pour les applications de criblage à haut débit, avec des avantages incluant : une facilité de préparation sans solvant organique, une bonne stabilité et surtout un modèle de membrane pertinent d'un point de vue biologique. Notre PAMPA amélioré contribuerait à accroître la fiabilité des données et, dans un but ultime, réduire le nombre de molécules prometteuses écartées trop tôt dans les premiers stades de développement de médicaments.

Mots-clés : bicouches supportées, bicouches suspendues, filtre nanoporeux, coussin polymère, polydopamine, phospholipide.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Mise en contexte

En biologie, la théorie cellulaire est celle selon laquelle la cellule constitue l'unité fondamentale structurale, fonctionnelle et reproductrice du vivant. Le point clé de cette théorie réside dans l'individualité cellulaire permise grâce à la membrane plasmique, ou cytoplasmique, dont le rôle ne se limite pas seulement à définir les contours physiques de la cellule mais sert également de plateforme d'échanges entre celle-ci et son environnement. La membrane plasmique se compose principalement d'une bicouche lipidique ultrafine dans laquelle sont intégrées ou attachées en périphérie des protéines fonctionnelles. Cet ensemble est impliqué dans une myriade de processus biochimiques parmi lesquels on compte : le transport moléculaire actif et/ou passif, le stockage et transfert d'information et d'énergie dans la cellule, la reconnaissance moléculaire, la catalyse enzymatique, la fusion et l'adhésion cellulaire. Ces processus reposent sur des changements conformationnels et des réarrangements des constituants membranaires, contribuant à l'hétérogénéité spatiale et temporelle des membranes biologiques.

Afin de mieux comprendre ces processus et étudier la structure, les propriétés et fonctions des membranes biologiques, travailler directement sur des cellules vivantes peut s'avérer fastidieux. Le test Caco-2 par exemple est un essai in vitro évaluant la perméabilité intestinale de médicaments à travers une monocouche de cellules cancéreuses du colon humain. Les cellules sont difficiles à maintenir et leur culture est longue (plus de 21 jours), coûteuse, nécessitant précautions et environnement contrôlé. Par ailleurs, la complexité des membranes naturelles rend

difficile l'étude d'une fonction distincte ou d'un constituant en particulier. Les systèmes de modèles membranaires biomimétiques ont ainsi été mis au point dans le but de diminuer ce degré de complexité et faciliter les études ciblant les mécanismes ayant lieu à la surface des membranes ou au sein même de celles-ci. Parmi les modèles de membranes simplifiées existants, les plus populaires sont les membranes dites « supportées » qui consistent en des mono- ou bicouches lipidiques adsorbées sur des surfaces solides. Le développement de telles membranes n'est pas seulement utile d'un point de vue fondamental pour répondre à de nombreuses questions essentielles à l'avancée des connaissances sur la biophysique et biochimie des membranes. Ces systèmes présentent également un intérêt particulier en recherche industrielle et constituent un outil précieux pour des applications médicales et biotechnologiques. Dans la recherche et développement de molécules à visée thérapeutique notamment, il est crucial d'étudier l'interaction de la membrane avec une molécule spécifique¹ (protéine, médicament, nanoparticule, antibiotique) dans des conditions physiologiques et/ou pathologiques, ce qui permet l'amélioration de notre compréhension en général et la création de remèdes efficaces contre les maladies. Pour étudier les membranes biologiques de façon précise et contrôlée, il est alors primordial de disposer des bons outils, avec des modèles membranaires fiables et représentatifs. Le sujet de cette thèse porte sur le modèle de bicouches lipidiques supportées (supported lipid bilayers, SLBs) et l'amélioration de celui-ci grâce à l'insertion d'une fine couche polymère dans le système, formant un système de bicouches dites supportées sur un polymère (polymer-supported lipid bilayers, p-SLBs).

1.2 Les membranes biologiques : organisation structurale et fonctionnelle

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 plus pertinent.

1.2.1 Structure de la membrane plasmique

Les membranes biologiques sont très complexes, tant au niveau de leur organisation que de leur composition, le phospholipide étant l'élément fondamental constitutif de celles-ci. Les phospholipides membranaires sont des molécules amphiphiles dotées d'une tête polaire hydrophile et de deux chaînes hydrocarbonées hydrophobes. En solution aqueuse, celles-ci vont s'auto-assembler spontanément.



Figure 1.1 Structure d'une membrane biologique représentée par une bicouche de phospholipides (têtes colorées en vert et queues hydrophobes en jaune sur le schéma) incluant des radeaux lipidiques, zones enrichies avec certains lipides et protéines (sections orangées sur le schéma). Figure modifiée avec permission².

Cet auto-assemblage est régi par l'effet hydrophobe qui tend à associer les chaînes carbonées entre elles, et par les répulsions stériques et/ou électrostatiques entre les têtes polaires^{3,4}. Ainsi, les chaînes hydrophobes sont orientées vers l'intérieur pour minimiser le contact avec l'eau tandis que les têtes hydrophiles sont orientées vers l'extérieur, en contact avec le milieu aqueux (Figure 1.1). Les dimensions moléculaires correspondant à une bicouche prennent en compte un cœur hydrocarboné d'environ 3 nm d'épaisseur, ainsi qu'une région interfaciale avec les groupements des têtes polaires et des molécules d'eau liées d'environ 1.5 nm⁵. Il en résulte une épaisseur membranaire totale comprise entre 4 et 6 nm^{5,6}. Les interactions qui s'y établissent sont de nature non covalentes, avec des liaisons faibles de type :

ponts hydrogène, interaction de Van der Waals, interactions électrostatiques et effet hydrophobe⁷.

En 1972, le modèle de mosaïque fluide proposé par Singer et Nicolson décrit la membrane cellulaire selon « une solution orientée à deux dimensions de protéines intégrées dans une bicouche visqueuse de phospholipides»⁸. Le terme mosaïque reflète sa composition très hétérogène, et la libre diffusion des lipides et autres constituants membranaires contribue au caractère fluide de la membrane³. Ce modèle a été largement accepté et présente la bicouche comme étant l'élément central, comparable à une mer homogène lipidique dans laquelle baignent des protéines de façon aléatoire. Par la suite, les travaux de Simons^{9,10} et de Brown^{11,12} ont démontré l'existence de petites régions distinctes dans la membrane où les lipides sont en réalité organisés, avec une composition et dynamique moléculaires bien spécifiques, formant ainsi des domaines fonctionnels dénommés radeaux lipidiques (*lipid rafts*) qui flotteraient le long de la bicouche. Ce nouveau concept a ouvert la voie à de nombreux travaux pour comprendre les propriétés et rôle de ces radeaux, leur existence témoignant de toute la complexité au sein des membranes.

1.2.2 Composition lipidique des membranes

Les principaux constituants formant les membranes plasmiques des cellules mammifères peuvent être regroupés en trois classes : les phospholipides, les sphingolipides et les stérols.

1.2.2.1 Les phospholipides

Ce sont les lipides majoritaires au sein des membranes : les phospholipides sont considérés comme étant l'élément de base des bicouches. Leur structure se compose d'un squelette de glycérol auquel sont greffés deux acides gras à chaîne longue, estérifiés chacun en position sn-1 et sn-2 respectivement (Figure 1.2). À la troisième

fonction alcool du glycérol (position sn-3) est liée la tête polaire^{4,13}. Celle-ci est constituée d'un ester phosphorique (avec un groupement phosphate chargé négativement) lui-même relié : soit à un alcool aminé (choline, éthanolamine ou sérine), soit à un polyol non azoté (inositol)¹³. Suivant les groupements, la tête polaire peut donc être chargée positivement, négativement ou globalement neutre (zwitterionique). Les différences au niveau de la nature de la tête polaire, des chaînes aliphatiques (longueur de chaîne, nombre et position des insaturations) contribuent à moduler l'état physique des membranes et reflètent leur diversité de composition.



Figure 1.2 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).

L'architecture finale adoptée par les lipides en solution aqueuse est dépendante de la géométrie du lipide considéré¹⁴, définie par le facteur de forme, qui rend compte du volume de la tête polaire par rapport à la longueur des chaînes hydrophobes^{15,16}. Ainsi, un lipide peut présenter soit une forme cylindrique, une forme de cône ou de cône inversé. Dû à leur géométrie cylindrique, les PC et PS préfèrent adopter une phase lamellaire (structure de double feuillet, bicouche) tandis que les lipides en forme de cône adoptent une phase hexagonale et ceux en forme de cône inversé une phase micellaire¹⁷. La majorité des lipides qui composent les membranes des cellules eucaryotes sont les PC à chaîne longue (C16, C18), qui s'organisent en phase lamellaire et qui peuvent représenter jusqu'à plus de 50% des lipides totaux¹⁸. La composition lipidique et la structure des membranes sont des paramètres très importants: un changement de composition au niveau local, de très faibles variations d'épaisseur peuvent entrainer une modification de l'élasticité et de la fluidité membranaire et donc son fonctionnement¹⁹.

1.2.2.2 Les sphingolipides

Les sphingolipides dérivent structurellement de la sphingosine et non du glycérol comme c'est le cas des phospholipides. Ils sont constitués d'une sphingosine amidifiée par un acide gras et comportent une substitution au niveau de l'alcool primaire (Figure 1.3). Les sphingolipides constituent 10 à 20% de la membrane plasmique et on distingue la sphingomyéline (SM) comme étant le sphingolipide le plus représenté dans les membranes plasmiques²⁰. Il a été montré que cette classe de lipides est notamment impliquée dans la formation des radeaux lipidiques²¹.



Figure 1.3 Structure générale des sphingolipides et de la sphingomyéline (SM), lorsque la fonction alcool primaire est substituée par une tête phosphatitylcholine.

1.2.2.3 Les stérols en particulier le cholestérol

L'unique stérol retrouvé dans les membranes des mammifères est le cholestérol (Chol). Il peut représenter jusqu'à 40-50% en fraction molaire de la composition lipidique totale d'une membrane plasmique⁶. Sa partie hydrophile est constituée d'un groupement hydroxyle (-OH) et sa partie hydrophobe comprend quatre cycles aromatiques ainsi qu'une chaîne hydrocarbonée (Figure 1.4A). Dans les bicouches, le cholestérol est inséré parallèlement aux chaînes des acides gras des phospholipides, avec son groupement hydroxyle interagissant par des liaisons faibles avec les têtes polaires des phospholipides²² (Figure 1.4B). Le cholestérol joue un rôle important au niveau de la perméabilité et la fluidité des membranes^{23,24} et est impliqué dans la formation des radeaux lipidiques²⁵.


Figure 1.4 A) Structure chimique du cholestérol et B) son orientation dans la bicouche. Schéma B repris avec permission²².

1.2.3 Propriétés physiques des membranes

1.2.3.1 Dynamique moléculaire dans les membranes

Les membranes sont des structures hautement dynamiques, dans lesquelles les molécules sont extrêmement mobiles. Les lipides peuvent être animés de mouvements²⁶:

i) intramoléculaires tels que des mouvements de flexion, isomérisation transgauche des chaînes hydrocarbonées, rotation autour des liaisons carbone-carbone

ii) intermoléculaires par diffusion rotationnelle, par diffusion latérale au sein d'un même feuillet et par diffusion transversale (flip-flop), phénomène lent et plus rare et qui requiert en général l'enzyme flippase pour permettre aux lipides de passer d'un feuillet à l'autre.

1.2.3.2 Transitions de phase dans les membranes et fluidité

Les phospholipides membranaires peuvent exister sous divers états de phase et fluctuent entre deux états extrêmes : la phase gel et la phase fluide²⁷ (Figure 1.5). En phase gel, appelée aussi phase solide-ordonnée (L_{β}), les phospholipides se trouvent dans un état de faible mobilité : les interactions hydrophobes prédominent et les mouvements intra et intermoléculaires sont diminués. En phase fluide, appelée aussi phase liquide-désordonnée ou liquide cristalline (L_{α}), les phopholipides se trouvent dans un état de forte mobilité. Un plus grand nombre de mouvements intramoléculaires s'effectue, ce qui amène un plus grand désordre des chaînes acyles

compte tenu des défauts gauches^{7,26,28}. Les diffusions rotationnelles et latérales sont augmentées. Les phospholipides sont très mobiles les uns par rapport aux autres et peuvent diffuser dans le plan de la membrane. La transition entre la phase gel et la phase fluide se produit à une température appelée température de transition de phase (T_m) , dont la valeur est propre au phospholipide considéré.



Figure 1.5 Les différents états physiques des phospholipides ainsi que les coefficients de diffusion D associés. En phase gel, les phospholipides sont très compacts (isomérisation tout-trans des chaînes hydrocarbonées). En phase fluide, les phospholipides perdent ce compactage (isomérisation trans-gauche des chaines hydrocarbonées). L'addition de cholestérol donne lieu à une nouvelle phase, la phase liquide ordonnée, dans laquelle les phospholipides possèdent une mobilité latérale proche de la phase fluide, les chaînes étant ordonnées comme en phase gel. Adapté avec permission²⁹.

La température de transition varie en fonction de la longueur et du degré d'insaturation des chaînes d'acide gras, ainsi que de la nature du groupement polaire (Tableau 1.1). Pour les phospholipides ayant une même tête polaire, la T_m augmente avec la longueur des chaînes et la présence d'insaturations va au contraire l'abaisser³⁰. Ceci est en grande partie dicté par la force des interactions de Van der Waals entre phospholipides voisins. Les phospholipides dont la chaîne acyle est longue ont plus de surface d'interaction, il faudra donc plus d'énergie pour briser la force de cette interaction (T_m importante).

Tableau 1.1 Tableau donnant les températures de transition des phospholipides usuels dans l'eau (pH 7), traduit avec permission³⁰.

Linide (nombre de	Tempéra sele	ture de tra on le type phospho	ansition Tn de tête du blipide	n (°C)
carbones/chaine)	PC	PG ⁻	PS-	PE
Saturé				
Dilauroyl (12)	-2	0	1	30
Dimyristoyl (14)	23	24	36	49
Dipalmitoyl (16)	41	41	52	64
Distearoyl (18)	55	55	68	74
Insaturé (cis)				
Dioleoyl (18)	-22	-18	-7	-16
PC: phosphatidylcholine (zw	ritterionique), P	G : phosp	hatidylglycérol	(charge

négativement), PS : phosphatidylsérine (chargé négativement) et PE : phosphatidyléthanolamine (zwitterionique).

Dans les conditions physiologiques, il est admis que la phase lipidique des membranes biologiques est la phase fluide. La fluidité membranaire est maintenue par la dynamique moléculaire, par des paramètres externes comme la température (une augmentation de celle-ci entraine une fluidification de la membrane) et aussi par l'influence de paramètres internes : la présence d'insaturations et la longueur des queues hydrophobes des phospholipides comme vu précédemment ou encore la proportion de cholestérol dans la composition lipidique. Ce dernier rigidifie la membrane si celle-ci est en phase fluide et fluidifie la membrane si celle-ci est en phase gel²⁴.

1.2.3.3 Asymétrie et orientation des lipides au sein des membranes

Au sein d'une même membrane, les deux feuillets constituants la bicouche possèdent une composition lipidique hétérogène. On parle dans ce cas d'asymétrie membranaire. Cette asymétrie est primordiale : elle contribue au potentiel électrique, à la stabilité mécanique de la membrane, lui permet de se courber (utile dans le cas de fusion membranaire) et contribue à moduler l'activité des protéines membranaires. On retrouvera principalement les PS et PE dans le feuillet interne, et les PC et SM dans le feuillet externe des membranes eucaryotes. Le cholestérol est libre de diffuser de manière transversale grâce à des mouvements de flip-flop rapide entre les feuillets interne et externe. Il est admis qu'on le retrouve dans les mêmes proportions quelque soit le feuillet.

L'orientation des chaînes aliphatiques par rapport au plan de la bicouche dépend du degré d'hydratation de la membrane, de la nature et de l'état de phase des phospholipides ainsi que de la longueur des chaînes. Elles peuvent être inclinées selon un certain angle : l'angle d'inclinaison (*tilt angle*) est d'autant plus grand que la bicouche est hydratée et que la longueur des chaînes est importante³¹. Pour la DPPC par exemple, les chaînes sont inclinées de 30° par rapport au plan de la bicouche à 19°C.

Les têtes polaires des phospholipides peuvent être assimilées à des dipôles et présentent une orientation par rapport au plan de la bicouche. Le dipôle phosphoreazote (P⁻-N⁺) des PC est parallèle au plan de la bicouche en phase fluide avec un angle moyen de ~0-3° tandis qu'en phase gel, l'angle oscille autour de ~30°. Les têtes polaires des PE sont plutôt orientées parallèlement au plan membranaire avec un angle moyen de ~1-4° en phase fluide et ~4-7° en phase gel^{32,33}.

1.2.4 Les radeaux lipidiques

Les radeaux sont des domaines dont l'arrangement spatial et les propriétés diffèrent du reste de la membrane. Ces hétérogénéités latérales particulières sont principalement fonction de la composition des lipides les formant³⁴. Une définition a été proposée en 2006 au *Symposium Keystone sur les radeaux lipidiques et la fonction cellulaire*³⁵ comme étant la suivante:

"Les radeaux membranaires sont des domaines de petite taille (10-200 nm), hétérogènes, hautement dynamiques, enrichis en stérols et sphingolipides, qui compartimentent des processus cellulaires. Ces petits radeaux peuvent être parfois stabilisés pour former des plateformes plus larges grâce à des interactions protéines-protéines et protéines-lipides."

1.2.4.1 Organisation et formation des radeaux lipidiques

Les membranes naturelles sont constituées d'un grand nombre de lipides de nature différente, si bien qu'un type de lipides peut tendre à s'assembler pour former un ou plusieurs domaines. Les radeaux naissent par l'association latérale de sphingolipides comme les sphingomyélines, qui forment des phases gel à température ambiante et dont les espaces entre les chaînes sont comblés par des molécules de cholestérol³⁴. Le cholestérol contribue de façon importante à la formation des radeaux^{36–40}: il a pour rôle d'ordonner les lipides en interagissant préférentiellement avec les chaînes hydrophobes des sphingolipides^{36,41}. La formation des radeaux s'apparente à la formation de ségrégations de phase provoquées par le décalage entre les épaisseurs hydrophobes des constituants membranaires (*hydrophobic mismatch*)^{42–45} ou par des stimuli extracellulaires comme une variation de température⁴⁶, de force ionique⁴⁷ ou encore par l'intégration d'une protéine^{48,49} qui favorise le réarrangement spatial des molécules lipidiques et mène ainsi à la formation de domaines. La formation de

radeaux peut d'ailleurs impliquer plus de deux types de lipides et rendre le mécanisme de formation encore bien plus complexe⁵⁰.

Les radeaux peuvent se classer en deux types : les radeaux planaires et les cavéoles. Les radeaux planaires sont continus dans le plan de la membrane tandis que les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique⁵¹ (Figure 1.6). Les cavéoles possèdent en plus la cavéoline, protéine non retrouvée dans les rafts planaires⁵². Cette protéine permet de donner aux cavéoles leur forme concave distincte et se lie directement au cholestérol⁵³. Les cavéoles sont surtout retrouvées dans les cellules endothéliales et épithéliales^{54,55} alors que certains types cellulaires comme les neurones et les lymphocytes⁵⁶ présentent uniquement des radeaux planaires. Quant à eux, les radeaux planaires contiennent des protéines flotillines qui joueraient un rôle dans l'organisation des radeaux lipidiques⁵⁶.



Figure 1.6 A) Représentation d'un radeau planaire et B) d'une cavéole. L'encadré montre comment la protéine cavéoline est insérée dans la membrane, avec les segments N et C terminaux faisant face au cytoplasme ainsi que le domaine intramembranaire en forme de tête d'épingle à cheveux. Modifié avec permission⁵¹.

Les radeaux existent dans un état appelé phase liquide ordonnée (L_o), dans lequel les lipides possèdent une mobilité latérale importante (Figure 1.5) similaire à la phase fluide (L_a), leurs chaînes acyles étant cependant allongées et ordonnées comme en phase gel (L_{β})^{21,57}. Les lipides appartenant aux radeaux sont plus resserrés que les lipides formant le reste de la bicouche. Ceci est dû à la présence des chaînes saturées des sphingolipides et phospholipides des radeaux, avec lesquelles le cholestérol interagit préférentiellement par rapport aux chaînes insaturées des acides gras des phospholipides issus de la membrane environnante⁵⁸. On décrit ainsi les radeaux comme des domaines en phase liquide-ordonnée, entourés par une matrice lipidique en phase fluide (non-raft) (Figure 1.6A). Les membranes biologiques sont ainsi bien plus vues comme un composite de lipides et protéines qu'une solution diluée de protéines dans un solvant lipidique tel que décrit dans le modèle de mosaïque fluide^{59,60}.

Expérimentalement, les mélanges ternaires sont largement utilisés comme modèle d'étude des radeaux et de leurs propriétés^{61–64}. Ces systèmes sont constitués de cholestérol et de deux phospholipides de T_m très différentes pour permettre une séparation de phase. Typiquement, une phase fluide dans laquelle on retrouve des phospholipides peu resserrés et de mobilité latérale élevée (DOPC par exemple, $T_m = -20^{\circ}$ C) coexiste avec une phase gel caractérisée par des phospholipides étroitement resserrés ayant une plus faible mobilité latérale (DPPC par exemple, $T_m = 41^{\circ}$ C). La présence de cholestérol dans le système modifie la phase gel en une phase liquide désordonnée⁶⁵. Le cholestérol a pour effet d'étirer les chaînes acyles des phospholipides en augmentant le nombre de conformères trans jusqu'à ce que la longueur des chaînes hydrophobes soit supérieure à celle de la molécule de cholestérol⁶⁶. Ceci implique que l'épaisseur de la bicouche n'est pas constante en tout point de la membrane⁶⁰ et qu'en général, elle est plus importante dans un radeau que dans la membrane environnante⁶⁷. Les diagrammes de phase de tels mélanges ternaires suivant la température ont été répertoriés (Marsh *et al.*⁶⁸).

Les radeaux lipidiques restent néanmoins controversés sur plusieurs points⁶⁹⁻⁷¹. La plupart de leurs propriétés sont établies à partir d'observations sur des membranes modèles synthétiques, sont-elles toutefois la réalité des membranes biologiques ? La situation dans celles-ci est en effet très différente de celle des membranes synthétiques, tant au niveau de la structure avec un ordre à longue distance et à courte distance que de la composition, qui diffère selon le temps et la localisation cellulaire. La taille des radeaux est sujette à discussion car les mesures expérimentales démontrent qu'elle varie de l'échelle nanométrique à micrométrique dépendamment du mélange lipidique⁷². Il en est de même pour la durée de vie des radeaux : allant de la milliseconde⁷³ à quelques secondes⁷⁴ suivant la technique employée. Observer et caractériser ces domaines directement est cependant particulièrement difficile à réaliser sur les membranes naturelles avec une résolution à la fois temporelle et spatiale appropriée, à l'exception des cavéoles qui peuvent être visualisées à l'aide de techniques de microscopie conventionnelles, et qui ont de ce fait été beaucoup plus étudiées que les radeaux planaires. Malgré ces controverses, la notion de radeaux lipidiques est acceptée car leur existence a été considérablement mise en évidence expérimentalement telles que mentionné dans la revue de Jacobson et al.⁵⁹.

1.2.4.2 Rôle des radeaux lipidiques

Les radeaux sont des plateformes fonctionnelles permettant de ségréger latéralement certains composants membranaires (lipide, protéine) et de compartimenter de façon dynamique les membranes⁵⁸. Ils facilitent la réorganisation latérale dans les membranes cellulaires^{75,76}. On les retrouve impliqués dans le trafic membranaire^{34,56,59,77-79}, c'est à dire la communication des cellules avec leur environnement via la sécrétion de molécules de signalisation par exocytose et la capture de nutriments par endocytose. Les radeaux participent ainsi à maintenir l'homéostasie cellulaire et établir, réguler des mécanismes de transmission de signaux cellulaires. De plus, l'étude des radeaux est importante face aux agents pathogènes

comme le virus de l'influenza⁸⁰ et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)⁸¹ qui se servent par exemple des cavéoles comme plateforme d'entrée.

1.3 Les modèles de membranes biologiques : cas des modèles membranaires supportés

Les modèles membranaires ont été développés comme outil de choix pour permettre une meilleure compréhension de l'organisation, de la structure, des propriétés et des aspects dynamiques des membranes biologiques ainsi que des nombreuses interactions interfaciales existantes. On distingue les modèles de membranes libres en solution⁸², représentés à la Figure 1.7, et les modèles de membranes planes à deux dimensions où la membrane est confinée sur un support¹⁷.



Figure 1.7 Les vésicules ou liposomes, les bicelles et les nanodisques en tant que modèles membranaires libres en solution.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous concentrerons surtout sur la description des modèles membranaires supportés, ces derniers étant particulièrement populaires en raison de leur adaptabilité à de nombreuses techniques de caractérisation de surface (microscopie à force atomique (AFM), résonance des plasmons de surface (SPR), microbalance à quartz avec dissipation (QCM-D), fluorescence, spectroscopie infrarouge^{83–86}).

1.3.1 Les monocouches et bicouches lipidiques supportées

1.3.1.1 Les monocouches lipidiques

Dès 1917, Irving Langmuir s'est illustré notamment pour ses travaux sur les films d'huile à la surface de l'eau et l'étude du comportement des molécules à l'interface air/eau⁸⁷. Il introduit la cuve portant son nom, la cuve de Langmuir, avec laquelle il est possible de former des monocouches lipidiques appelés aussi films de Langmuir. Un peu plus tard, Langmuir introduit la technique du transfert d'une monocouche moléculaire sur un support solide en descendant lentement de façon verticale un substrat hydrophile à travers la monocouche à l'interface air-eau. En 1925, Gorter et Grendel utilisèrent la cuve de Langmuir dans leurs expériences et observèrent que l'aire moléculaire des lipides extraits de globules rouges était égale à deux fois l'aire de ces cellules, découvrant ainsi que les membranes cellulaires sont organisées en double couche⁸⁸. Les travaux de Katherine Blodgett en 1937 ont montré comment former des mono, bi ou multicouches uniformes et complètes sur un support solide via des dépôts successifs, donnant lieu à la technique Langmuir-Blodgett⁸⁹.

Les monocouches lipidiques peuvent servir de bons modèles membranaires. Lorsque soumise à des compressions de l'ordre de 30 à 35 mN/m, une monocouche se trouve dans un état comparable à celui d'une bicouche en termes de densité moléculaire, interactions hydrophobes et densité d'énergie libre de surface⁹⁰. Cependant, la principale limitation est la difficulté de reconstituer des protéines transmembranaires aussi bien dans les monocouches à l'interface air/eau que dans les monocouches supportées sur substrat solide⁹¹. Les protéines sont isolées et solubilisées en milieu aqueux par des tensioactifs. L'inconvénient majeur réside dans le fait que ces tensioactifs s'incorporent également dans la monocouche, affectant alors les propriétés des films formés.

1.3.1.2 Les bicouches lipidiques

Dans les années '80, Tamm et McConnell développèrent une nouvelle classe de membranes modèles via la conception de bicouches déposées directement sur des surfaces solides, appelées bicouches lipidiques supportées (*solid-supported lipid bilayer, s-SLB*)^{91,92}. Leurs travaux ont démontré qu'il est possible de former des bicouches de phospholipides zwitterioniques (DMPC, DOPC et DPPC) sur différentes surfaces (verre, quartz et oxyde de silicium)⁹¹. Ils ont également rapporté pour la première fois des mesures de diffusion latérale des phospholipides. Leurs résultats ont montré que leur diffusion au sein des bicouches supportées était équivalente (D =1-8.10⁻⁸ cm²/s) à celle dans les autres systèmes conventionnels (les multicouches à l'époque).



Figure 1.8 Schéma d'une bicouche lipidique supportée sur surface solide.

Dans les systèmes de bicouches supportées, les forces électrostatiques, d'hydratation, stériques ainsi que les interactions de Van der Waals^{30,93} assurent physiquement le maintien de la bicouche à proximité de la surface, ces dernières étant séparées par une fine couche aqueuse d'environ 1 à 3 nm d'épaisseur^{94–97} comme illustré à la Figure 1.8. C'est cette fine couche aqueuse qui permet à la bicouche de conserver une certaine fluidité, avec une libre diffusion translationnelle et rotationnelle des molécules lipidiques. Les bicouches supportées en tant que système membranaire artificiel sont devenues par la suite très populaires en raison de leur facilité de préparation, leur robustesse et adaptabilité à de très nombreuses techniques de caractérisation de surface, ce qui permet entre autre l'appréciation des propriétés

physico-chimiques, l'étude de changements structuraux et des interactions membranaires^{98,99} de même que les propriétés électriques¹⁰⁰. La formation de bicouches de qualité (c'est-à-dire sans défauts ou très peu, avec une mobilité des lipides) nécessitent l'utilisation de surfaces planes et hydrophiles comme le mica^{101,102}, le verre^{91,103,104}, les oxydes métalliques (SiO₂, TiO₂)¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

1.3.1.3 Formation des bicouches supportées

Les bicouches supportées sont formées en général selon trois méthodes : i) par le transfert de deux monocouches par la technique Langmuir-Blodgett/Langmuir-Schaeffer (LB-LS); ii) par auto-assemblage avec la fusion de vésicules phospholipidiques, iii) par la combinaison des deux méthodes précédentes en transférant tout d'abord une monocouche par LB pour former le premier feuillet, suivi d'une fusion de vésicules unilamellaires pour obtenir le deuxième feuillet de la bicouche (LB-fusion de vésicules).

1.3.1.4 Le transfert Langmuir-Blodgett/Langmuir-Schaeffer (LB/LS)

Cette méthode implique un premier transfert de monocouche phospholipidique sur le support solide pour former le feuillet inférieur de la bicouche avec la technique LB¹⁰⁸. Les phospholipides sont dissous dans un solvant très volatil (chloroforme) puis étalés à la surface de la cuve contenant une solution aqueuse. Ils se placent alors à l'interface eau-air avec les têtes hydrophiles plongeant dans la phase aqueuse et les queues hydrophobes exposées à l'air. Des barrières d'asservissement situées de part et d'autre de la cuve permettent de compresser les molécules et de former la monocouche. Le transfert a lieu en sortant lentement et de façon verticale le support solide placé initialement dans la cuve. Les phospholipides sont alors entraînés à la surface du support hydrophile. Une deuxième monocouche peut être déposée sur la première en redescendant le support solide dans la cuve mais est difficile à réussir si le support est descendu de façon verticale. C'est pourquoi un second transfert est opéré avec la technique LS, où le support est amené horizontalement pour créer le

feuillet supérieur de la bicouche¹⁰⁹ comme illustré sur la Figure 1.9. Ce second transfert ne requiert pas le maintien d'une pression de surface spécifique. Ceci permet l'obtention de bicouches plus homogènes avec un meilleur taux de succès.





1.3.1.5 La fusion de vésicules

La méthode de fusion de vésicules est la plus employée car elle ne nécessite pas d'équipement spécifique (bain Langmuir) en plus d'être simple et rapide à réaliser. Il s'agit tout d'abord de préparer une suspension de vésicules phospholipidiques unilamellaires (LUVs) puis de la déposer sur une surface solide, en général un support hydrophile inorganique (mica, verre). La fusion de vésicules peut également se faire sur des surfaces déjà recouvertes d'une monocouche lipidique ou d'une monocouche autoassemblée de thioalcanes (*Self-Assembled Monolayer, SAM*).

Le mécanisme de fusion de vésicules illustré à la Figure 1.10 peut se décrire de la façon suivante :

(i) Étape d'adhésion: les vésicules s'adsorbent sur la surface (Fig 1.10A) ; à son contact, elles se déforment jusqu'à se rompre pour amorcer la formation des premiers patches lipidiques (Fig 1.10B-E).

(ii) Étape de croissance et fusion des patches pour former une bicouche de plus en plus étendue (Fig 1.10F-G).

(iii) Interactions de type hydrophobes des bords de la bicouche avec les vésicules adsorbées ou celles recrutées en solution (Fig 1.10H).

(iv) La désorption de la surface des vésicules en excès : la surface est rincée à la fin du processus afin d'éliminer les vésicules non fusionnées.



Figure 1.10 Processus de fusion de vésicules qui nécessite de travailler à une température supérieure à la T_m des phospholipides. Figure reprise avec permission¹¹⁰.

De nombreux travaux ont été réalisés pour en étudier les conditions optimales. Les facteurs influençant la fusion de vésicules sont essentiellement : la nature de la surface sur laquelle se fera la fusion, la concentration en phospholipides, la composition de la solution tampon, le pH, la force ionique, la valence des ions présents en solution, la température^{102,111–115}. Dans des conditions non optimisées, il peut se former une bicouche incomplète, une couche de vésicules adsorbées ou encore des patches lipidiques à défaut d'une bicouche complète.

La technique de fusion de vésicules permet de former des bicouches symétriques, avec deux feuillets de même composition tandis que le transfert par LB offre la possibilité de former des bicouches asymétriques, avec des feuillets de composition lipidique différente.

Il existe par ailleurs d'autres modèles de membranes supportées : Murray *et al.*(2009) ont récemment développé un système de doubles membranes comme modèle du périplasme des bactéries ou des mitochondries, ou encore pour mimer l'espace pré- et post-synaptique entre les membranes neuronales¹¹⁶. Dans ce modèle, une première membrane de palmitoyloleoylphosphatidylcholine (POPC) contenant 1 mol.% de biotine-polyéthylène glycol-dipalmitoylphosphatidyléthanolamine (biotine-PEG-DPPE) est préalablement supportée sur une surface de quartz (Figure 1.11). La seconde membrane est ensuite formée par fusion de grandes vésicules unilamellaires (*Large Unilamellar Vesicles, LUVs*) incluant de la streptavidine, ce qui permet l'obtention de deux membranes superposées reliées entre elles via des interactions streptavidine.



Figure 1.11 Double membrane supportée : les deux bicouches sont liées par des ponts PEG-biotine-streptavidine-biotine. Schéma adapté avec permission¹¹⁶.

Les bicouches supportées servent ainsi depuis de plusieurs décennies comme un outil indispensable pour étudier les différents aspects fondamentaux des membranes cellulaires. Ce modèle présente cependant des limitations. Premièrement, le support solide constitué par une surface inorganique dure est responsable des interactions entre la tête des lipides et le support solide. Ceci entraine une perte de la mobilité de lipides et diminue le caractère fluide de la membrane, ce qui contribue à la formation de défauts dans la membrane^{91,117}. Plusieurs travaux ont mis en évidence que la nature du support solide, les interactions entre celui-ci et la tête polaire des lipides influencent fortement la mobilité, le degré d'hydratation et la répartition des lipides de la membrane¹¹⁸⁻¹²⁰. Deuxièmement, la proximité de la bicouche avec le support empêche l'intégration de protéines transmembranaires dans le modèle si l'on désire un modèle incluant une fonction biologique. La couche d'hydratation de 1 à 3 nm d'épaisseur n'est pas suffisante pour apporter l'espace nécessaire au domaine cytosolique de la plupart des protéines transmembranaires, amenant celles-ci à être immobiles, en contact direct avec le support solide. Les protéines interagissent avec la surface et se déforment, ce qui perturbe leur conformation et de ce fait leur fonction, provoquant éventuellement leur dénaturation^{121,122}. Ceci est particulièrement vrai dans le cas des récepteurs d'adhésion cellulaire dont les domaines fonctionnels extracellulaires peuvent s'étendre sur plusieurs dizaines de nanomètres¹²³. C'est pourquoi il a été envisagé d'introduire une plus grande séparation entre la bicouche et le support afin de palier aux effets de proximité bicouche-support. Une des stratégies émergentes est de recourir à une fine couche hydratée en polymère dans les systèmes dits de bicouches supportées sur polymère.

1.3.2 Les bicouches supportées sur polymère

Les membranes supportées sur polymère (*polymer-supported lipid bilayers*, *p-SLBs*) furent développées plus récemment pour répondre aux limitations des membranes supportées sur support solide énoncées ci-dessus. Ces membranes consistent en l'insertion d'une couche polymère entre la bicouche lipidique et le support solide (Figure 1.12B). Le polymère pourra être physisorbé ou lié de façon covalente au support.



Figure 1.12 Schéma d'une membrane supportée sur support solide : A) dans le cas où une protéine transmembranaire est en contact direct avec la surface B) l'épaisseur entre la membrane et le support peut être ajustée avec l'ajout d'une couche polymère hydratée qui permet d'assurer l'insertion de protéines transmembranaires sans les dénaturer. Adapté avec permission¹²⁴.

Les avantages d'un tel système sont multiples. Tout d'abord la présence du polymère réduirait les frictions entre la membrane et le support solide, jouant le rôle d'un coussin déformable sur lequel pourra reposer la bicouche, ce qui minimiserait le risque de dénaturation des protéines transmembranaires^{105,125,126}. Le polymère peut également mimer le cytosquelette des cellules eucaryotes, une matrice protéique constituée de filaments d'actine, situé au niveau de la face interne des cellules. Il permet de supporter la bicouche, donner sa forme distincte à la cellule et lui conférer ses propriétés mécaniques^{123,127,128}. Le polymère peut tout aussi bien mimer le glycocalyx, une couche composée de polysaccharides présente dans la membrane externe des cellules eucaryotes, dont le rôle est de contribuer aux propriétés mécaniques des cellules et de maintenir une pression osmotique suffisante pour séparer les cellules d'une distance de l'ordre de 10 à 100 nm les unes des autres^{123,128}. La couche polymère formée se compare à une couche lubrifiante qui conservera la mobilité des lipides et la fluidité membranaire comme c'est le cas des membranes biologiques. De plus, la diffusion latérale des composants membranaires permettrait de combler les défauts éventuels, ce qui permettrait d'obtenir un système avec des propriétés d'autoguérison^{123,129,130}.

Le polymère idéal nécessitera de répondre aux exigences suivantes. La nature et l'architecture du polymère devront faciliter la déposition de la membrane. Celui-ci devra être hydrophile, relativement inerte et pas trop chargé pour éviter des interactions spécifiques non désirées avec la membrane et ses composantes¹⁰⁵. Il devra permettre de former un film fin uniforme, dont l'épaisseur pourra être contrôlée idéalement. Afin d'éviter tout contact possible entre une protéine transmembranaire et le support, son épaisseur doit être suffisante, typiquement entre 10 et 100 nm¹²³. L'hydratation du film polymère est également primordiale pour éviter tout phénomène de démouillage à l'interface bicouche/polymère et assurer la stabilité du système^{129,131,132}. La mouillabilité du polymère est déterminée par la mesure de l'angle de contact d'une goutte d'eau déposée à sa surface. Une valeur comprise entre 30 et 70° serait appropriée^{99,133}. Ainsi, des matériaux tels que les hydrogels

constituent un excellent choix pour cette application car ils peuvent absorber/contenir de grandes quantités d'eau.

Parmi les systèmes de membranes supportées sur coussin polymère qui ont été systèmes indépendants des systèmes distingue les développés, on polymère/membrane couplés. Dans le premier cas, la membrane est formée par transfert LB/LS ou par fusion de vésicules ; il n'y a pas de liaison chimique entre la membrane et le film polymère, celle-ci est physisorbée^{105,122,123}. Dans le second cas, le film polymère est totalement ou partiellement lié chimiquement à la membrane (covalent tethering); il présente à sa surface un ou plusieurs éléments de la membrane auquel il est attaché (par exemple un lipide)^{134,135}. Nous nous intéresserons davantage aux systèmes de membranes physisorbées sur film polymère (polymer-cushioned) qu'aux systèmes présentant des liens covalents (polymer-tethered). Ces derniers présentent une bonne stabilité mécanique mais la bicouche comporte des segments immobiles, expliqué en grande partie à cause des liens covalents, ce qui est moins représentatif de la mobilité et fluidité membranaire.

mesurés poi	ur ces systèmes.			
Polymère	Structure chimique	Lipide	$D \ (\mu m^2/s)$	Référence
Poly(acrylamide) (PA)	× a	DMPC	1-2	Kuhner et al. ¹³⁶
	ANA,	POPC	$(0.2 - 1.2).10^{-2}$	Smith <i>et al.</i> ¹³⁷
Poly(acide acrylique) (PAA)	THE STREET	DMPC	2.56 ± 0.84	El-Khouri et al. ¹³⁸
Poly(L-acide lactique) (PLLA)	Ho to the children of the chil	DPPG	p.u	Wang et al. ¹³⁹
Poly(éthylène)glycol (PEG)	Ho - Of	DOPC	2.16 ± 0.07	Mulligan <i>et al.</i> ¹⁴⁰
Poly(éthylèneimine) (PEI)		DMPC	n.d	Majewski et al. ^[6,7,8]
Poly(chlorure de diallyldiméthylammonium) (PDDA)	Hao Cotta	SOPS, POPC, SOPS/Chol	0.1-0.2	Zhang et al. ^{144,145}
Cellulose	HQ HQ	PC (lécithine)	1	Sigl et al. ¹⁴⁶
	of to to	DMPC/Chol/PEG-DMPE(1%)	3.3 ± 0.2	Goennenwein et al. ¹⁴⁷
Agarose	PHOH S	PC (lécithine)	p.u	Leitmannova-Ottova and Tien ^[12,13]
	to to to	DMPC	p.u	Baumgart and Offenhäuser ¹³⁵
Chitosane	HO HO HO	DMPC	0.825 - 3.98	Sterling et al. ¹⁵⁰
	HO-T-O HO T-O HO T-O HO T-O HO HO HO	DMPC	p.u	Baumgart and Offenhäuser ¹³⁵
(Chitosane/Acide hyaluronique) _n	Lo of the state of	DOPC	2.8±0.2	Mulligan <i>et al.</i> ¹⁴⁰
Acide maléique copolymère, avec R = éthylène, propène.	R C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	PC/PE/PS/Chol	0.26 – 2.6	Renner <i>et al.</i> ¹⁵¹
Palmitovloleovlphosphatidvlcholine (POPC) Dinalmitovlnhosnhatidvlelvcérol	(DPPG). Stearovloleovlnhosnhatidvls	sérine (SOPS).	

Tableau 1.2 Aperçu des coussins polymères utilisés pour supporter les bicouches lipidiques et coefficients de diffusion des lipides

Dimyristoylphosphatidyléthanolamine (DMPE), Cholestérol (Chol) - n.d : non déterminé.

27

1.3.3 Les membranes suspendues

1.3.3.1 Les membranes « noires »

Muller et al. (1963) ont développé le premier système de membranes suspendues afin d'étudier les propriétés électriques d'une bicouche^{152–154}. Les membranes suspendues consistent en une bicouche lipidique formée sur un pore de 0.1 à 1 mm de diamètre d'un matériau hydrophobe (Téflon, polysulfone ou autre support polymère hydrophobe)^{155,156}. Une représentation schématique en est donnée Figure 1.13. Ces membranes sont également appelées « membranes noires » (*Black Lipid Membrane, BLM*) car celles-ci apparaissent noires ou grises lorsqu'elles sont imagées en microscopie optique¹⁵³. Ceci s'explique par les interférences destructives de la lumière réfléchie suite à son passage à travers l'interface eau/lipide¹⁵⁷, propriété commune aux films minces bi-moléculaires de tensioactifs, appelés aussi films noirs (*black films*). La préparation des BLMs peut se faire par étalement, en « peignant » l'ouverture micrométrique avec une solution lipidique dissoute dans un solvant organique (bien souvent du n-décane)^{158,159}, par la technique de fusion de vésicules unilamellaires géantes (*Giant Unilamellar Vesicles, GUVs*)¹⁶⁰ ou encore via la technique de déposition développée par Montal et Mueller¹⁵⁵.



Figure 1.13 Schéma d'une membrane suspendue ou membrane noire. Adapté avec permission¹⁶¹.

Les membranes noires constituent une classe de membranes représentatives des membranes biologiques puisque la bicouche est libre, ses deux côtés faisant face à une solution aqueuse. Il est alors facile de mimer les conditions physiologiques, d'accéder aux compartiments séparés par la bicouche et de venir y apposer des électrodes. Ainsi, le recours aux BLMs est approprié pour des études physicochimiques des membranes et notamment pour la détermination de paramètres de propriétés électriques tels que la conductance et la constante diélectrique^{155,162}. Ces membranes modèles sont en outre utilisées pour comprendre les fonctions de régulation des canaux ioniques^{163,164}, la diffusion de protéines membranaires¹⁶⁵ ou encore le passage de molécules thérapeutiques à travers la membrane¹⁶⁶. Malgré leur bonne représentativité biologique, la souplesse et l'instabilité mécanique des membranes noires les rendent fragiles et dans ce modèle, la bicouche se rompt facilement, ce qui constitue un facteur limitant leur pleine exploitation. Les membranes formées sur des ouvertures de large diamètre sont en effet hautement sensibles aux variations de pression, aux vibrations mécaniques et perturbations électriques¹⁶⁷. Les membranes ont typiquement une durée de vie de l'ordre de quelques minutes à quelques heures suivant leur formation^{167,168}. En plus de leur manque de robustesse et de reproductibilité, la présence dans le système de traces de solvant organique dû au mode de préparation des BLMs peut donner lieu à des interactions avec les molécules testées et perturber les mesures¹⁶⁹.

Une stratégie efficace pour augmenter la stabilité mécanique des BLMs est de réduire la taille du pore à l'échelle du nanomètre. Ceci a été démontré dans les travaux de Simon *et al.* (2007) avec la caractérisation par AFM de BLMs préparées par transfert LB sur des pores de 300, 600 et 1000 nm de diamètre. Celles préparées sur la plus petite taille de pores ont été les plus stables avec une durée de vie d'environ 24 heures¹⁷⁰. Les travaux de Cremer *et al.* (2002, 2006) ont rapporté la formation d'une bicouche sur un nanopore conique en verre de diamètre compris entre 100 et 400 nm, et montré une durée de vie de la membrane de deux semaines^{167,171}. Toutefois, les

29

travaux se poursuivent pour appliquer ce système dans la mesure de courants ioniques¹⁶⁷.

1.3.3.2 Les membranes suspendues sur surface poreuse (micro et nano-BLMs)

Les membranes suspendues sur surface poreuse furent développées dans le but de palier aux inconvénients des BLMs et des SLBs, ainsi que pour répondre aux besoins de miniaturisation et d'automatisation des tests^{160,172,173}. Au lieu d'un unique pore, la membrane est formée sur un matériau à haute densité de pores; le système consiste alors en l'alternance de régions où la bicouche est déposée à la surface, comme c'est le cas dans les membranes supportées, et de régions où celle-ci est suspendue audessus d'un pore, semblable aux BLMs (Figure 1.14). Ainsi, la bicouche présente à la fois un comportement de membrane libre dans les régions au-dessus des pores et sa composante membrane supportée lui assure sa stabilité.





Suivant la taille des pores du matériau, on parlera de micro-BLMs ou de nano-BLMs lorsque la bicouche est déposée sur des pores dont le diamètre est à l'échelle du micromètre ou du nanomètre respectivement. Selon la nature chimique du support poreux, la bicouche est formée par fusion de vésicules, par étalement, en « peignant » l'ouverture micrométrique avec une solution lipidique dissoute dans un solvant organique ou dans une moindre mesure par transfert LB.

Les premiers travaux décrivant le développement de telles membranes sont ceux du groupe Steinem en 2000 qui ont utilisé l'alumine poreuse comme support pour la bicouche¹⁷⁵. Les surfaces poreuses en oxyde d'aluminium présentent tout d'abord un avantage au niveau structural : l'organisation hexagonale des pores est très homogène et la taille des pores peut être contrôlée. De plus, la stabilité chimique et thermique de ce matériau en font un excellent candidat. Dans cette étude, la surface en alumine présentant des pores de ~60 nm de diamètre a été recouverte d'une fine couche d'or puis traitée par l'acide 3-mercaptopropionique pour permettre l'adsorption d'une bicouche de lipides cationiques de bromure de N,N-diméthyl-N-octadécyl-1octadécanaminium (DODAB) sur la surface hydrophile chargée négativement^{175,176}. Ils ont également étendu leurs travaux en fabriquant des nano-BLMs sur de l'alumine avec des pores de 280 nm¹⁷⁷, des micro-BLMs sur de l'oxyde de silicium de 1 et 7 um de taille de pores^{178,179} et effectué des mesures d'impédance. Les valeurs mesurées ont donné des résistances de l'ordre du GOhm, significatif d'une seule bicouche intacte, ce qui permet des mesures de canaux ioniques (single channel measurements); avec des membranes stables au moins 40 heures^{177,178}. Steinem et al. (2004) ont réalisé des travaux majeurs en réussissant à intégrer dans la membrane un domaine transmembranaire du virus VIH-1¹⁷⁸ ou encore la protéine membranaire OmpF de la bactérie E.coli¹⁸⁰. Le groupe s'est aussi intéressé aux propriétés mécaniques des nano-BLMs en mesurant leur réponse élastique par nanoindentation¹⁸¹⁻¹⁸³ et plus récemment, celui-ci a développé des nano-BLMS à l'aide de GUVs pour investiguer l'action de peptides antimicrobiens sur les membranes^{184,185}.

D'autres matériaux ont servi à réaliser des membranes sur surface poreuse : Tiefenhauer *et al.* (2009) ont utilisé du nitrure de silicium avec des pores de 200, 400 et 800 nm de diamètre pour préparer des nano-BLMs par étalement de lipides dissous dans du décane qui se sont révélées stables jusqu'à 3-4 jours¹⁸⁶. Korman *et al.* (2013) se sont également servi du nitrure de silicium avec des pores de 130 nm qu'ils ont modifié avec un organosilane avant de procéder à la fusion de vésicules¹⁸⁷. Le nitrure de silicium constitue une surface populaire pour reconstituer des canaux ioniques avec la gramicidine¹⁸⁷ ou encore le Human Ether-a-go-go-Related Gene (hERG)¹⁸⁸.

Favero *et al.* (2002) ont montré la formation d'une membrane de PC/cholestérol sur filtre en polycarbonate de taille de pores de l μ m, préalablement recouvert d'or et d'une monocouche autoassemblée de thioalcanes et ont introduit dans la membrane un récepteur glutamate^{189–191}. Schuster *et al.* (2003) ont déposé des membranes sur des filtres de taille de pores de 400 nm modifiés avec une couche de surface cristalline (couche S), qui est une enveloppe bactérienne constituée de protéines, afin de garantir plus de stabilité au système^{192–194}.

Du fait que la taille des pores est de dimension plus faible, ces membranes présentent davantage de stabilité mécanique que les BLMs et possèdent une durée de vie allant jusqu'à plusieurs jours^{170,195}. Dans le cas d'une rupture membranaire dans une BLM classique, celle-ci perd totalement sa fonctionnalité, contrairement au micro/nano-BLMs où une rupture de la bicouche se fait un pore à la fois de manière individuelle¹⁷⁹. C'est ce découplage mécanique entre les pores qui leur confère plus de stabilité. Les micro/nano-BLMs sont compatibles avec des systèmes miniaturisés pour la biodétection ou encore pour réaliser des tests de haut débit, ce qui est un atout majeur comparativement aux BLMs classiques. En plus d'intégrer des peptides ou des protéines modèles dans les micro/nano-BLMs, il est possible de former des nanopores d'ADN pour des études plus spécifiques^{196,197}.

Les travaux les plus récents tendent vers le développement de membranes suspendues sur surface poreuse modifiée avec des polymères :

- Sugihara et al. (2010) ont fonctionnalisé un nanopore de nitrure de silicium de 800 nm de diamètre avec plusieurs couches de polyélectrolytes (polyelectrolyte multilayer, PEM). Le groupe a pu insérer un peptide (la mélittine) dans la bicouche et effectuer des mesure d'impédance pendant 2,5 semaines¹⁹⁸.
- Santonicola *et al.* (2014) ont modifié une surface nanoporeuse en nitrure de silicium avec du poly(acide méthacrylique) (PMAA) et déposé une bicouche de PC¹⁹⁹.
- 1.4 Elaboration d'un modèle membranaire plus représentatif des membranes naturelles : objectif général et objectifs spécifiques

Les systèmes de modèles membranaires ont grandement attiré l'attention car ils constituent une interface utile et intéressante pour la recherche sur les membranes et les cellules, tant au niveau fondamental qu'en pratique, dans des domaines tels que les sciences médicales et la pharmaceutique. Les systèmes les plus populaires sont les membranes lipidiques supportées. Dans ce modèle, l'armature intracellulaire que constitue le cytosquelette peut être assimilée au support solide (verre, mica) sur lequel repose la membrane. Ce support ne peut cependant pas retranscrire la dynamique associée aux membranes biologiques. Il existe une perte de mobilité des lipides et de la fluidité membranaire due, notamment, aux interactions de frictions entre la tête des lipides et le support solide qui se comporte comme une couche dure. Dans le cas des membranes supportées par un polymère, le principal désavantage des systèmes actuels est la complexité de leur préparation. Beaucoup plus d'étapes sont nécessaires

pour leur fabrication, augmentant le nombre de défauts et les risques d'échec. Dans le cas de formation de membranes par transfert Langmuir-Blodgett, ceci requiert l'utilisation d'équipement spécifique, plus de temps et de ressources comparé à la fusion de vésicules. Malgré la simplicité de mise en oeuvre de la fusion de vésicules, le recouvrement de la surface par la bicouche reste un point à améliorer. Les membranes formées directement sur des supports lisses et hydrophiles tels que le mica ou le verre présentent une bicouche continue⁹³, tandis que celles formées sur les polymères se révèlent incomplètes^{125,141}.

L'objectif principal de cette thèse est de développer un modèle de membranes supportées sur un coussin polymère pertinent d'un point de vue biologique, avec un support de bicouche qui participera à conserver l'environnement hydrophile naturel des membranes, leur fluidité ainsi que la mobilité des lipides les constituant. Ce nouveau modèle sera constitué d'un support (qui peut aussi bien être une surface solide qu'une surface poreuse), d'un coussin polymère qui assure le maintien de la dynamique membranaire et d'une bicouche lipidique déposée sur le coussin de polymère.

De manière plus spécifique, les objectifs de ce travail sont de :

- Déterminer le polymère qui convient le mieux pour supporter une bicouche lipidique et définir les propriétés physiques, chimiques, mécaniques de celui-ci. Idéalement, il devrait permettre de former des films de manière simple et peu coûteuse.

- Déterminer une méthode reproductible pour préparer une bicouche lipidique continue et fluide sur le polymère choisi.

- Apprécier la qualité des membranes obtenues en termes d'homogénéité (présence de défauts ou non, pourcentage de surface recouverte par une seule bicouche), de mobilité des lipides au sein de la membrane et de stabilité dans le temps.

- Optimiser la composition lipidique pour améliorer la qualités des membranes.

- Appliquer nos nouvelles membranes pour améliorer un test utilisé dans l'industrie pharmaceutique dans les premières phases de découverte et développement de molécules thérapeutiques, le test PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay).

Il permet l'évaluation et la prédiction de la perméation passive de médicaments administrés par voie orale. Décrit dans la littérature pour la première fois en 1998 par Kansy *et al.*²⁰⁰, le PAMPA se présente sous la forme de plaque de 96 puits (Figure 1.15A) ou peut être effectué à l'aide de cellules de Franz (Figure 1.15B). Chaque puits se divise en deux compartiments, un donneur et un accepteur, remplis d'une solution mimant le milieu biologique, séparés par la membrane artificielle. Le composé à tester (sous forme solide ou en solution) est ajouté dans le compartiment donneur. Le gradient de concentration créé entre les deux compartiments permet d'évaluer la diffusion passive indépendamment des autres mécanismes de transport. Le test est réalisé à température contrôlée (37 °C, température physiologique), pendant une durée de 1 à 18h. La quantité diffusée du composé est mesurée dans le compartiment accepteur grâce à des techniques de détection rapides et peu coûteuses comme la spectrophotométrie UV et de fluorescence.



Figure 1.15 Schéma A) d'un puits et B) d'une cellule de Franz pour test PAMPA. Adapté de (http://www.cyprotex.com) et (http://www.permegear.com).

Dans les membranes PAMPA, l'organisation, la structure et la phase des lipides immobilisés sur le filtre ne sont pas connues avec certitude. Il est supposé que les lipides forment des couches multilamellaires à l'intérieur des pores du filtre²⁰¹. Une telle structure entrainerait le blocage des pores et la diffusion s'avèrerait anormalement lente, non représentative de celle de la molécule testée. Ceci soulève un premier point sur la pertinence des membranes PAMPA. Deuxièmement, leur préparation se fait selon divers protocoles et plusieurs travaux ont montré une variation de la perméabilité selon la composition de la membrane^{201–203}. Malgré les efforts mis dans certains modèles pour mieux représenter la composition hétérogène en lipides, la fluidité membranaire reste un paramètre à améliorer. En effet, l'adsorption des lipides à la surface du filtre donne lieu à des interactions de friction. Ces frictions induisent une perte de la mobilité des lipides. Par conséquent, le caractère fluide de la membrane est diminué¹²³.

Un défi urgent est d'augmenter le taux de succès du développement de nouvelles entités chimiques (NECs) en médicaments grâce à l'effort porté sur l'optimisation des membranes PAMPA. Malgré un fort potentiel thérapeutique, beaucoup de NECs ne sont pas développées en médicament. 40% de ces échecs sont dus notamment à des problèmes d'Absorption, Distribution, Métabolisme, Élimination et Toxicité (ADMET)²⁰⁴. Une faible absorption du médicament par le corps humain entraine une faible biodisponibilité de celui-ci, ce qui le rend alors moins efficace. Un modèle inapproprié de prédiction de la perméabilité peut expliquer le rejet de certains candidats prometteurs après tant de temps, de ressources et de millions investis. Nos membranes seraient plus représentatives d'un point de vue biologique dans la mesure où la perméabilité des molécules est étudiée au travers d'une seule bicouche lipidique comparativement au test PAMPA classique dans lequel le modèle membranaire fait défaut. L'objectif dans ce contexte est d'adapter nos membranes sur des filtres poreux, de les monter sur des plaques multipuits, d'évaluer la perméabilité de médicaments modèles et comparer nos résultats à ceux des tests existants.

1.5 Structure de la thèse

Cette thèse est composée de trois articles, deux ont été acceptés et publiés et le troisième est en voie de soumission.

Le Chapitre III porte sur l'application de nos membranes dans le domaine pharmaceutique, dans l'évaluation et la prédiction de la perméabilité intestinale de médicaments administrés par voie orale. Le coussin en polydopamine a été formé sur des filtres poreux nanostructurés comme support pour les membranes. La diffusion passive de deux médicaments (l'acétaminophène et la famotidine) a été étudiée afin de démontrer la preuve de concept de l'utilisation de nos membranes pour une telle application. Les résultats ont été publiés dans le journal *International Journal of Pharmaceutics* sous la référence :

Nirasay S., Mouget Y., Marcotte I., Claverie J. P. (2011) Supported bilayer on a nanopatterned membrane as model PAMPA membranes, Int. J. Pharm., 421(1), 170-175.

Suite à cet article, un travail plus poussé a été réalisé en collaboration avec le Pr. Grégoire Leclair de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Montréal. Deux étudiantes à la Maîtrise (Sarra Zaraa et Marie-Ève Leclaire) ont participé au développement et à l'optimisation de ce nouveau modèle de membrane représentative de la barrière intestinale, appelé néo-PAMPA. Plus particulièrement, il s'agissait de la mise en place d'une cassette de médicaments modèles pour les tests de perméabilité, l'adaptation du test sur des plaques multi-puits pour permettre un criblage à haut débit, le développement et la validation d'une méthode analytique pour la quantification par spectro LC/MS des molécules étudiées, la comparaison du néo-PAMPA avec deux tests de référence : le PAMPA traditionnel²⁰⁰ développé par Kansy *et al.*(1998) et le test Caco-2, qui repose sur l'évaluation de la perméabilité des

médicaments à travers une monocouche de cellules cancéreuses du colon humain. Ces travaux sont décrits dans leurs mémoires de maîtrise, sous les références :

Zaraa, Sarra (2014) Optimisation et évaluation d'un nouveau test PAMPA amélioré pour la prédiction de l'absorption intestinale de médicaments.

Leclaire, Marie-Ève (2015) Validation et conditionnement d'un test PAMPA amélioré pour l'évaluation de la perméabilité membranaire de médicaments.

Dans le Chapitre IV, nous avons caractérisé le film en polydopamine et mis en évidence la formation de bicouches constituées soit de DMPC, soit de DOPC, sur le polymère. Ceci est le premier exemple rapporté du développement de membranes phospholipidiques sur la polydopamine. Les résultats ont été publiés dans le journal *Materials* pour un numéro spécial sur les membranes lipidiques supportées, sur invitation de l'éditeur invité et leader dans ce domaine, le Prof. Dr. Motomu Tanaka. Cet article a été publié sous la référence :

Nirasay S., Badia A., Leclair G., Claverie J. P., Marcotte I. (2012) Polydopamine-supported lipid bilayers, Materials, 5(12), 2621-2636.

Dans le Chapitre V, nous nous sommes intéressés à améliorer la qualité des bicouches sur la polydopamine. Pour ce faire, nous avons modifié les interactions électrostatiques en faisant varier la force ionique du milieu et en intégrant du cholestérol chargé positivement dans la composition lipidique des membranes afin de favoriser les interactions des lipides avec le coussin de polymère. Ce travail est en voie de soumission au journal *Angewandte Chemie International Edition*.

Enfin, le dernier chapitre porte sur les conclusions générales et les futures voies de recherche pouvant faire suite à ce travail.

CHAPITRE II

TECHNIQUES DE CARACTÉRISATION DES MEMBRANES

2.1 La microscopie à force atomique (AFM)

La microscopie à effet tunnel (Scanning tunneling microscopy, STM) inventée par Binnig et Rohrer²⁰⁵ repose sur la mesure du courant électrique induit par effet tunnel entre la pointe métallique et l'échantillon et ne s'applique cependant qu'à des surfaces conductrices. Le besoin d'utiliser cette technique quelque soit le type d'échantillon (conducteur, semi-conducteur ou isolant) a donné naissance à la microscopie à force atomique (Atomic Force Microscopy, AFM)²⁰⁶. Elle permet la caractérisation d'une surface à l'échelle atomique en combinant les principes de la STM et du stylet profilométrique^{207,208}. Cette technique appartient à la famille des microscopies à sonde balayante où la sonde est composée d'une pointe très effilée montée sur un microlevier²⁰⁹.

2.1.1 Principe de l'AFM

La surface de l'échantillon est balayée par la pointe et l'appareil enregistre les forces d'interaction s'établissant entre la pointe et la surface. Le déplacement de la pointe dans les trois dimensions (x,y,z) est ajusté par un scanner piézoélectrique, assurant ainsi des mouvements de haute précision (Figure 2.1A). Un faisceau laser est focalisé sur le dessus de l'extrémité de la pointe. Sa réflexion vers un système optique de photodiode segmentée (deux ou quatre quadrants) permet de suivre les mouvements de déflection de la pointe, lorsque celle-ci rencontre un élément de topographie. C'est à partir des mouvements de déflection verticale (variation en z) que l'image en

hauteur sera construite ligne par ligne, permettant ainsi une reconstitution en trois dimensions de la surface de l'échantillon et d'en apprécier le relief^{208,210,211}.



Figure 2.1 A) Schéma illustrant les composantes principales d'un AFM et B) Diagramme des forces en fonction de la distance pointe-surface. Diagramme traduit avec permission²¹².

Les forces d'interactions qui s'exercent entre la pointe et la surface sont de plusieurs nature: forces électrostatiques, forces de Van der Waals, forces de répulsion ionique, forces capillaires²⁰⁹. Elles dépendent de la distance séparant la pointe de l'échantillon ainsi que de la nature physicochimique de la pointe et de celle de la surface²¹³ (Figure 2.1B). À longue distance (zone de non-contact), les forces attractives de Van der Waals sont prédominantes (force dite de longue portée sur des distances jusqu'à 100 Å). Inversement, à très courte distance (zone de contact), les forces sont répulsives : les nuages électroniques des atomes de la pointe et ceux de l'échantillon se repoussent mutuellement. Ceci entraîne la déflection de la pointe-microlevier et/ou la déformation de la surface de l'échantillon^{209,213}.

2.1.2 Les différents modes d'imagerie

En AFM, il existe plusieurs modes pour imager la topographie d'une surface, qui diffèrent selon la façon dont la pointe se déplace et interagit avec l'échantillon. On distingue :

- Le mode non-contact dans lequel la pointe n'entre jamais en contact avec la surface et convient à la caractérisation d'échantillons déformables.
 Cependant, les forces mises en jeu sont attractives et de faible intensité donc difficiles à enregistrer, ce qui donne une faible résolution²¹⁴.
- Le mode contact, basé sur les forces répulsives avec une distance pointesurface inférieure à 0,5 nm. L'imagerie se fait : i) soit à force constante pour conserver la déflexion du microlevier constante: le scanner se réajuste alors en z, ii) soit à hauteur constante et on enregistre la déflection du microlevier. Ce mode présente une vitesse d'acquisition plus élevée et une haute résolution. Cependant, les échantillons souples et déformables comme les échantillons biologiques, plus fragiles, peuvent être endommagés à cause des forces verticales et latérales importantes dues à la pression et au balayage de la pointe²¹⁴.
- Le mode contact intermittent (*Tapping Mode*) dans lequel on applique un potentiel qui fait vibrer le microlevier à une fréquence proche de sa fréquence de résonance. La pointe n'interagit que de manière périodique avec l'échantillon, une boucle d'asservissement permettant de maintenir constante l'amplitude d'oscillation et d'ajuster la hauteur lorsque la pointe rencontre un élément de topographie. Ce mode est le plus utilisé car il est le moins dommageable pour l'échantillon : les forces latérales et verticales sont réduites puisque le contact entre la pointe et la surface est limité^{215,216}.

Le mode *Peak Force Tapping*, développé récemment, qui analyse la déflection du microlevier versus la hauteur pour chaque pixel et permet de contrôler précisément la force appliquée (sensibilité en piconewton)²¹². Des images de très haute résolution d'échantillons fragiles peuvent être obtenues aussi bien à l'air qu'en milieu liquide. Ce mode est notamment approprié pour imager les échantillons biologiques en milieu liquide car il ne requiert pas d'ajuster constamment la pointe, principal inconvénient en tapping liquide.

Dans le cadre de cette thèse, les images d'AFM ont été principalement acquises en mode *Tapping*, à l'air ou en milieu liquide. Pour les mesures effectuées à l'air, l'amplitude de travail est fixée à 75% de l'amplitude d'oscillation de la pointe dans l'air. Pour les mesures effectuées en liquide, l'amplitude de travail est fixée à 90% de l'amplitude d'oscillation de la pointe dans l'eau, ce qui minimise la force appliquée et évite ainsi une compression de la bicouche et du film polymère.

En ce qui concerne les résultats des bicouches supportées sur filtre poreux, le mode *Peak Force Tapping* s'est révélé indispensable pour les caractérisations. Par ailleurs, une cellule liquide a été fabriquée spécifiquement pour permettre l'immobilisation non destructive de ce type d'échantillon et accommoder les dimensions de la tête du scanner AFM.

2.1.3 Détermination des propriétés élastiques du film polymère : courbes de forcedistance

Ce mode permet une mesure des propriétés mécaniques d'un échantillon donné²¹⁶⁻²¹⁸. Par indentation de la pointe AFM sur la surface de l'échantillon, la déviation du microlevier est enregistrée en fonction du déplacement en z.



Figure 2.2 Exemple typique d'une courbe force-distance. Traduit avec permission²¹².

À l'aller, la pointe est suffisamment loin de la surface, les forces d'interactions sont faibles; la déflection du microlevier est nulle et correspond à la partie horizontale de la courbe présentée sur la Figure 2.2. À l'approche de la surface, l'interaction pointesurface est attractive et entraine une légère déflection du microlevier, qui se traduit par un saut vertical vers le bas (saut au contact)²¹⁵. Lorsqu'on continue à s'approcher de la surface, la déflection croît linéairement avec la distance de la pointe-échantillon. Au retour, la courbe suit le même chemin qu'à l'aller puis dépasse le saut au contact à cause de l'adhésion due aux forces de Van der Waals (et aux forces capillaires). Cette adhésion se caractérise par une hystérèse sur la courbe de force. Tant que le point de rupture de contact n'est pas atteint, la courbe suit le prolongement de la droite caractéristique du contact. Lorsque celui-ci est atteint, la courbe retourne à sa position initiale, la pointe ne subissant pas de déflection hors contact²¹⁵. Il est possible à partir de telles courbes d'évaluer certaines propriétés de l'échantillon comme son élasticité.
2.1.4 Détermination du module d'élasticité (module de Young)

La méthode décrite dans les travaux de Domke et Radmacher²¹⁹ permet de calculer le module de Young, noté E, à partir des courbes force-distance. Comme la déflection est une mesure de la force entre la surface de l'échantillon et la pointe, on peut accéder à la valeur de la force en suivant l'évolution de la déflection en fonction du déplacement en z via la loi de Hooke, représentée par l'équation suivante:

$$F = kd = k(z - \delta) \tag{2.1}$$

avec F la force appliquée, k la constante de raideur de la pointe, d la déflection du microlevier et δ l'indentation.

Le modèle de Hertz relie l'indentation à la force appliquée, en faisant intervenir le module d'élasticité dans l'équation (2.2) :

$$F = \frac{2}{\pi} \frac{E}{(1-\nu^2)\delta^2 \tan \alpha}$$
(2.2)

Avec v le coefficient de Poisson de l'échantillon, α l'angle de demi-ouverture de la pointe (18° selon les données du fabricant).



Figure 2.3 Visualisation de l'intervalle d'analyse à considérer pour le calcul du module d'élasticité. Adapté avec permission²¹⁹.

En prenant deux points situés sur la pente de la courbe tel qu'illustré sur la figure 2.3 ci-dessus, les valeurs de déflection et les valeurs en z correspondantes sont utilisées dans l'équation (2.3) pour en déduire le module d'élasticité.

$$z - z_0 = d - d_0 + \sqrt{\frac{k(d - d_0)}{\pi [E(1 - \nu^2)] \tan(\alpha)}}$$
(2.3)

Avec : d_0 la déflection zéro, z_0 le point de contact de la pointe avec la surface

Pour augmenter la justesse de nos calculs, les pointes ont été calibrées par détermination de la réponse mécanique du microlevier au bruit thermique, afin d'obtenir la valeur de k propre à la pointe utilisée lors de l'expérience.

2.1.5 Analyse des images d'AFM : détermination du pourcentage de recouvrement de la surface

Cette dernière est effectuée à l'aide de l'analyse "Bearing" du logiciel NanoScope Analysis version 1.30 (Bruker, Santa Barbara, CA, USA). Elle permet d'apprécier la distribution des hauteurs de l'image d'AFM de l'échantillon, que ce soit sur l'image complète ou une section de celle-ci. Il est possible, par cette analyse, de déterminer le pourcentage de surface située au-dessus ou en-dessous d'une hauteur fixée arbitrairement.

La Figure 2.4 montre à gauche l'image d'AFM d'une bicouche de DMPC sur du mica, les défauts étant désignés par les flèches vertes. L'analyse "Bearing" donne la distribution des hauteurs de l'échantillon sous forme de graphique du pourcentage en fonction de la hauteur en nm (Figure 2.4). Un plan de référence, pour lequel 100% de la surface serait occupée par la bicouche, est dans un premier temps défini (Figure 2.4A). Ensuite, un seuil situé à 4 nm (épaisseur d'une bicouche) en-dessous de ce plan de référence est fixé (Figure 2.4B). Ceci permet de faire apparaître la partie correspondant à la bicouche en couleur bleue et les défauts en noir. L'analyse "Bearing" donne ainsi la valeur du pourcentage de surface recouverte par la bicouche de DMPC, soit 97.9% dans cet exemple.



Figure 2.4 Analyse "Bearing" pour déterminer le pourcentage de recouvrement de la surface par la bicouche de DMPC sur du mica.

2.2 La microscopie à fluorescence : recouvrement de la fluorescence après photoblanchiment (FRAP)

Depuis les 30 dernières années, le recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (Fluorescence Recovery after photobleaching, FRAP) est la principale méthode utilisée pour déterminer la mobilité latérale des lipides dans les membranes^{127,187,220,221}.

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 (Figure 2.5). Le photoblanchiment est le phénomène dans lequel la molécule perd de façon irréversible sa capacité à émettre de la fluorescence suite à une excitation lumineuse de très forte intensité.



Figure 2.5 Diagramme de Jablonski pour la fluorescence.

2.2.1 Principe d'une expérience de FRAP

Dans une expérience de FRAP, la membrane est marquée avec une sonde lipidique fluorescente. Les molécules lipidiques fluorescentes sont réparties uniformément dans l'échantillon à l'état initial. À un temps donné t, une région choisie de la membrane est illuminée fortement à l'aide d'un faisceau laser durant quelques secondes afin de photoblanchir les molécules fluorescentes, ce qui entraine alors une extinction de la

fluorescence dans cette région spécifiquement. On mesure ensuite l'intensité de fluorescence de l'échantillon en fonction du temps^{220,222}. Si les molécules sont mobiles, la région photoblanchie récupère progressivement de la fluorescence suite au déplacement des molécules fluorescentes provenant des régions adjacentes non photoblanchies^{220,222,223}. Au contraire, si les molécules sont immobiles, les molécules fluorescentes des régions adjacentes ne vont pas diffuser vers la région photoblanchie, la fluorescence restera éteinte dans cette zone^{220,222–224} (Figure 2.6).



Figure 2.6 Schéma illustrant une expérience de FRAP et courbe typique d'intensité de fluorescence en fonction du temps. Adapté avec permission²²³.

L'analyse de l'intensité de fluorescence en fonction du temps à l'aide d'un modèle théorique permet d'accéder au coefficient de diffusion latérale D, caractéristique de la vitesse de déplacement des lipides au sein de la membrane^{220,224}.

2.2.2 Détermination du coefficient de diffusion des lipides.

Comme décrit dans les travaux de Soumpasis²²⁴, il est possible d'évaluer de façon quantitative la mobilité des lipides, en calculant le coefficient de diffusion d'après l'équation suivante :

$$D = 0.224 \ \frac{\omega^2}{t_{1/2}} \tag{2.4}$$

avec D le coefficient de diffusion latérale (en μ m²/s), ω le rayon de la zone photoblanchie (en μ m) et t_{1/2} (en s) le temps auquel la moitié de la fluorescence est récupérée.

2.3 La spectroscopie de résonance des plasmons de surface (SPR)

La SPR est une technique optique qui permet d'observer des interactions moléculaires se déroulant à l'interface d'un métal et d'un milieu diélectrique (eau, air, solvant) en temps réel et sans marquage préalable des molécules étudiées. Elle est utilisée pour la caractérisation de couches minces, le suivi de processus biologiques spécifiques (association/dissociation ligand-récepteur), l'étude de changements physicochimiques tels que l'adsorption/désorption de molécules, la réorientation moléculaire, la protonation/déprotonation. C'est une technique hautement sensible qui utilise les plasmons de surface comme sonde.

Principe de la SPR

Les plasmons de surface désignent l'oscillation collective des électrons libres à l'interface entre le métal et le milieu diélectrique. La résultante de ces oscillations est une onde électromagnétique qui se propage le long de cette interface sur des distances pouvant aller jusqu'à des centaines de microns.

L'excitation des plasmons se produit lorsqu'un faisceau de lumière polarisée-p monochromatique est envoyé et interagit avec les électrons libre du métal. À un angle précis, une partie de la lumière est absorbée et induit une oscillation ondulatoire des électrons libres appelée Résonance des plasmons de surface (SPR). Ces oscillations se caractérisent par une onde évanescente dont l'amplitude diminue exponentiellement depuis la surface sur une distance maximale de 200 nm. À cet angle d'incidence précis, appelé angle de résonance ou angle SPR (θ_{SPR} Ou θ_{min}), a lieu le couplage entre le vecteur d'onde des photons (représenté par k_x sur la Figure 2.7A) et le vecteur d'onde des plasmons de surface (représenté par k_{sp} sur la Figure 2.7A). L'amplitude et la direction du vecteur d'onde des photons sont égales à celles du vecteur d'onde des plasmons le long de l'interface. L'absorption de l'énergie des photons à l'angle SPR se traduit alors par la perte d'une partie du signal lumineux réfléchi (Figure 2.7B) et une chute brutale de l'intensité de la lumière réfléchie, l'angle SPR correspondant à l'angle d'incidence au minimum d'intensité.



Figure 2.7 A) Schéma illustrant le principe de la SPR. La puce de détection, qui comprend une lame de verre recouverte d'une fine couche métallique d'or, est placée sur le prisme. Dans les conditions de réflexion totale interne, la lumière est totalement réfléchie et mesurée au niveau du photodétecteur. Le vecteur d'onde k_{sp} varie en fonction de n_2 et le vecteur d'onde k_x peut être modifié en variant l'angle d'incidence et/ou la longueur d'onde. B) Spectre typique en SPR : courbe de l'intensité de la lumière réfléchie (R) pour une lumière incidente monochromatique en fonction de l'angle d'incidence et sensorgramme : variation de l'angle SPR en fonction du temps. Schéma modifié de la référence²²⁵.

Le moindre changement à la surface (adsorption de phospholipides par exemple) induit un changement d'indice de réfraction du milieu. Ceci implique la modification de l'énergie nécessaire pour exciter les plasmons de surface et entraine donc un déplacement de l'angle SPR. C'est ce changement qui est mesuré comme réponse. L'enregistrement des changements de l'angle SPR en fonction du temps permet de suivre dans nos travaux le phénomène de fusion de vésicules avec une puce de détection préalablement modifiée avec la polydopamine. La différence entre l'état final et initial ($\Delta \theta_{min}$) permet de déterminer l'épaisseur, notée d_{lipides}, de la matière adsorbée sur la surface selon l'équation :

$$d_{lipides} = \frac{\Delta \theta_{min}}{0.05468} \tag{2.5}$$

La méthode est détaillée dans la partie information supplémentaire dans le Chapitre V de la thèse (5.8. Supporting information). La SPR peut détecter des changements d'indice de réfraction de l'ordre de 10^{-5} ou des changements de masse de l'ordre du pg·mm⁻² de protéine.

2.4 La Microbalance à Cristal de Quartz avec Dissipation (QCM-D)

La Microbalance à Cristal de Quartz (*Quartz Crystal Microbalance, QCM*) est une technique extrêmement sensible, permettant la mesure de très faibles masses^{226,227}, de l'ordre du nanogramme par centimètre carré (ng/cm²). Elle est employée pour l'étude de phénomènes de surface, incluant la formation de films fins, les interactions et réactions de surface²²⁸⁻²³¹. La QCM repose sur l'emploi d'un matériau piézoélectrique, un disque fin de quartz dont les deux faces sont partiellement recouvertes d'électrodes en or. Un courant électrique est appliqué au cristal de quartz, causant la vibration de celui-ci à une fréquence spécifique²³².



Figure 2.8 Schéma d'un cristal de quartz utilisé en Microbalance. Adapté de (http://www.biolinscientific.com/q-sense).

Dans le cas de la QCM, on applique un courant constant et l'on mesure les changements de fréquence. Un changement de masse (Δm) à la surface du cristal entraine une variation de la fréquence de résonance (Δf) selon l'équation de Sauerbrey²³³:

$$\Delta m = -\frac{c}{n} \Delta f \tag{2.6}$$

Avec C la constante de sensibilité (C = 17,7 ng·cm⁻²·Hz⁻¹ pour des cristaux dont la fréquence de résonance fondamentale est de 5 MHz) et n (= 1, 3, 5, ...) désigne une des harmoniques.

Cette relation n'est toutefois valide que dans le cas de matériaux rigides et n'est pas applicable pour des matériaux mous et flexibles (viscoélastiques). La QCM démontre un intérêt lorsqu'appliquée à la mesure de variations de masse en milieu liquide en temps réel, notamment pour le suivi de phénomènes tels que l'adsorption de protéines^{227,234–237}. En milieu liquide, les variations de fréquence sont plus complexes du fait de l'interaction du quartz avec le fluide environnant et les molécules adsorbées. Ainsi, la QCM fut optimisée avec la mesure en simultanée de la fréquence de résonance et du facteur de dissipation^{228,232,238,239}.

Dans le cas de la Microbalance à Cristal de Quartz avec Dissipation (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation, QCM-D), le principe est le suivant :

-On applique un courant électrique qui cause la vibration du cristal de quartz ;

-On stoppe le courant électrique, ce qui permet au cristal de revenir à son état initial ;

-Le courant électrique est activé et désactivé de façon périodique (courant alternatif) ;

-La courbe de réponse du cristal est décrite par une sinusoïde à décroissance exponentielle qui peut être modélisée selon l'expression mathématique donnée à la Figure 2.9 ;

-En ajustant numériquement cette courbe au modèle mathématique, la fréquence de résonance (f) et le facteur de dissipation (D) sont obtenus simultanément.



Figure 2.9 Schéma illustrant le principe de la Microbalance à Cristal de Quartz avec Dissipation. Adapté de (http://www.biolinscientific.com/q-sense).

La dissipation est reliée aux propriétés rigides/viscoélastiques de la couche adsorbée. Par exemple, une faible variation de l'énergie de dissipation indique une couche rigide²²⁸. De nombreux travaux utilisent la QCM-D pour l'étude de la fusion de vésicules ainsi que la formation de bicouches lipidiques supportées^{84,85,106,229,239-241}.

CHAPITRE III

SUPPORTED BILAYER ON A NANOPATTERNED MEMBRANE AS MODEL PAMPA MEMBRANES

Souryvanh Nirasay^a, Yves Mouget^b, Isabelle Marcotte^a, Jerome P. Claverie^{a*}

- a Quebec Center for Functional Materials, UQAM, Dept of Chemistry, Succ Centre-Ville, CP8888, Montreal, QC H3C3P8, Canada
- b Corealis Pharma, 200 Boulevard Armand Frappier, Laval, QC H7V 4A6, Canada

International Journal of Pharmaceutics 2011, 421, 1, 170–175

Contribution des auteurs : IM, JPC ont conçu, coordonné l'étude et participé à l'analyse des résultats. IM, JPC et SN ont rédigé l'article. SN a réalisé toute la partie expérimentale (conception des membranes, mesures de perméation via PAMPA), la partie caractérisation des membranes (mesures d'angle de contact, images d'AFM à l'air) et l'analyse des résultats. YM a apporté une contribution intellectuelle et scientifique au travail. Tous les auteurs ont approuvé la version finale du manuscrit.

3.1 Résumé de l'article

Les membranes PAMPA classiques consistent en un filtre poreux imprégné d'une. solution des lipides dissous dans du n-décane²⁰⁰. Ce modèle comporte toutefois des faiblesses. L'organisation, la structure et la phase des lipides immobilisés sur le filtre ne sont pas connues avec certitude. Il est supposé que les lipides forment des couches multilamellaires à l'intérieur des pores du filtre²⁰¹, ce qui entrainerait un blocage des pores et une diffusion anormalement lente des molécules testées. De plus, la préparation des membranes PAMPA a été décrite dans la littérature selon divers protocoles^{200,201,242–245} et plusieurs travaux ont montré une variation de la perméabilité selon la composition de la membrane^{201,202}. Il a été rapporté qu'avec des membranes composées uniquement de lipides saturés ou insaturés de PC, PE et PS, certains composés perméables étaient plus sensibles à la fluidité de la membrane²⁰³.

L'hypothèse est de déposer un film polymère sur le filtre pour supporter une bicouche phospholipidique. Son rôle est de conserver la mobilité des phospholipides en diminuant leur interaction avec le filtre support. Plusieurs paramètres ont été étudiés : structure des filtres et taille de pores, choix du polymère, technique de dépôt de la bicouche lipidique. Deux polymères, le PEG et la polydopamine, ont été testés sur différents filtres (alumine nanostructurée, Anodics[®] et polysulfone hydrophile). La bicouche de phospholipides a été déposée par fusion de vésicules unilamellaires de DMPC. L'ensemble fut caractérisé à l'aide de mesures d'angle de contact et par AFM à l'air et en milieu aqueux. Les membranes supportées ont été montées sur des cellules de Franz pour évaluer la perméabilité de deux médicaments : l'acétaminophène et la famotidine. Les profils de perméabilité obtenus expérimentalement ont été comparés à ceux du PAMPA classique.

Les résultats d'AFM ont démontré un meilleur recouvrement de la surface des filtres avec la polydopamine, donnant un film plus uniforme. Lors des tests de perméation, les filtres en alumine se sont révélés fragiles comparativement aux Anodics[®] plus adéquats à une application de haut débit. Les profils de diffusion des deux molécules testées sont reproductibles et il y a un effet de la taille des pores sur la quantité diffusée. Une bicouche lipidique supportée sur polymère en tant que membrane modèle donne des résultats prometteurs. La validation du modèle nécessite des tests sur un plus grand nombre de médicaments. Les nouveaux essais de perméation permettront d'optimiser les propriétés d'absorption des molécules, de

réduire le dosage et d'éventuels effets secondaires des médicaments dans le but d'améliorer la santé des patients.

3.2 Abstract

Parallel-artificial membrane permeation assay (PAMPA) is widely used to rapidly measure drug permeability across a biological membrane. We have prepared model PAMPAs by supporting a lipid bilayer on a hydrated polymeric cushion adsorbed at the surface of a nanoporous alumina filter. In contrast to conventional PAMPAs, the natural fluidity of the bilayer is expected to be conserved in these model PAMPAs. The assembly was characterized by contact angle measurement and atomic force microscopy (AFM) and the supported membranes were mounted in a Franz cell setup to assess the permeability of acetaminophen and famotidine. The permeability profiles for the model PAMPA were compared to those of conventional PAMPA.

3.3 Introduction

A major bottleneck in drug discovery is the poor intestinal absorption of promising new chemical entities (NCEs) intended for oral administration. Currently, it is estimated that over 80% of orally administered drugs are absorbed via a passive absorption mechanism at the level of epithelial cells²⁴⁶. The NCEs often lack suitable amphiphilic balance required for absorption because the lead optimization effort of high throughput screening (HTS) has mostly been governed by potency rather than the drug-like properties considerations that are required to ensure adequate absorption, stability and safety²⁴⁷. Inappropriate *in vitro* prediction of drug bioavailability is suspected to be one of the reasons explaining the late rejection of many promising drug candidates, even when considerable amounts of money have already been engaged for the research²⁴⁸. A particular challenge is, thus, to provide just-in time information about drug-like properties to orient the medicinal chemistry lead optimization effort and minimize the resources wasted in the synthesis of poorquality series. Acceptable human intestinal absorption is critical to the successful development of drug products because it is determinant to the bioavailability of an NCE. The passive intestinal absorption of a drug depends on the balance between its permeability, solubility and also pKa (for ionisable compounds). Work by Amidon et al.^{249,250}, pioneered the establishment of the Biopharmaceutical Classification System (BCS) which facilitates the evaluation of generic drug products bioequivalence. To assess the ability of a compound to cross the intestinal barrier, several tools were developed over the years ranging from empirical ones^{251,252} to complex animal studies such as *in situ* perfusion and hepatic portal vein canulation²⁵³. More relevant to the pre-clinical development phase of drug products, different cellular and noncellular assays were elaborated to rapidly screen the permeability of pre-clinical drug candidates. The Caco-2 cell permeability assay is considered as the gold standard to evaluate intestinal permeability. Even though this test takes into account several active transport proteins that are present in the enterocyte membrane, it comes with all the tedious drawbacks associated with cellular assays: in addition to being time and resource-consuming, low-throughput and a high rate of variability is observed between assay conditions^{200,246,254}.

Non-cellular *parallel-artificial membrane permeation assays* (PAMPAs)^{255–262} were designed to be easily and rapidly performed. They enable to obtain preliminary permeability data when compounds need to be analyzed rapidly during the preclinical development and led to the publication of at least 32 primary publications since 1998²⁵⁶. Recent research efforts include the development of PAMPAs simulating the blood-brain barrier²⁶³, the evaluation of the predictive power of the PAMPA assay²⁶⁴ as well as developing PAMPA assays suitable for the early discovery phase of drug R&D²⁶⁵. However, the PAMPA screening suffers from several experimental limitations. First, the phospholipids deposited on the filters are often dissolved in n-dodecane^{255,256}, thus provoking the formation of multilamellar bilayers inside the filter channels when the membrane is in contact with the aqueous

environment of the donor and receptor compartments²⁰¹. As a consequence, the filter pores can be blocked and the drug permeation can be abnormally slow and nonrepresentative of the molecule "true" permeability. Studies have shown that variation in compound permeability depends on the filter coating^{201,203,266}. Therefore, another issue of the PAMPA membrane is its biological relevance which involves two main parameters, i.e. its fluidity and composition. A study performed by Seo et al. (2006) with membranes made of individual saturated and unsaturated PC, PE and PS showed that permeable compounds are more sensitive to the membrane fluidity²⁶⁷. Although "biomimetic PAMPA" is carried out using membranes made of a mixture of phospholipids, the preparation of the filter coating generates an inherent problem of membrane fluidity that will not be improved by using unsaturated lipids. *De facto*, an interaction between the deposited lipid bilayer and the filter is responsible for a decreased mobility of the lipid and of the fluid character of the membrane¹²³. This situation cannot be correlated to the in vivo situation where the drug only penetrates a single well-defined fluid bilayer.

To address these issues, we aimed at preparing a model system which will be amenable to HTS, but where the drug will diffuse through only one single bilayer (Fig. 3.1). For this purpose, a lipid bilayer was supported on a hydrated polymeric cushion which was itself immobilized at the surface of a filter with controlled porosity. Polymer-supported membranes are excellent models of the cell surface¹²³ because they retain their native fluidity and they exhibit excellent mechanical stability in comparison to free-standing black lipid films. Furthermore, the lipid membrane can rapidly be deposited on a polymeric cushion, even when large areas are to be covered; therefore, it is conceivable that this technique could be implemented in a high throughput procedure. Finally, it is possible to insert membrane proteins in the bilayer, yielding functional lipid membranes. Such membranes proved to be excellent models for the study of various biochemical processes^{98,268} as they were representative of in vivo membranes. In this first report, we wish to describe the preparation of such supported bilayer system (Fig. 3.1). We will also examine the influence of the nature and porosity of the filter and of the polymeric cushion. Ideally, neither the filter nor the cushion should influence the permeability of the drug, as the permeability of drug through the bilayer only should be assessed. This can be achieved by selecting a polymeric layer and a filter which imparts negligible resistance to diffusion in comparison to diffusion through the bilayer. Thus, to assess the influence of the support, permeability profiles have been measured for two model drugs, famotidine and acetaminophen. This proof of concept study will be followed by a more complete assessment of the permeability of a wide of drugs in comparison to Caco-2 and conventional PAMPA diffusion profiles.



Figure 3.1 Model PAMPA membranes. A lipid bilayer is supported on a polymeric cushion (PEG or polydopamine) which is itself covalently anchored or absorbed at the surface of a nanoporous alumina filter. The assembly is mounted in a Franz cell setup (left) for permeability measurements.

3.4 Materials and methods

3.4.1 Materials

Membranes S1–S3 were purchased from Synkera (USA), Anodisc A1 from Whatman (USA), amino-PEG (mPEG-NH₂, $M_n = 1000$ g/mol) from Nanocs (USA), dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) from Avanti Polar (Alabaster, AL,

USA) and all other chemicals from Aldrich. Water was nanopure grade. Contact angles were measured using a digital camera equipped with a MSN 505 UltraMacro lens from Raynox (32 diopters), and images were analyzed using ImageJ software and Contact Angle plugin, both freely downloadable from internet. Atomic force microscopy pictures taken in air were collected with a NscriptorTM DPN[®] System DS006 (NanoInk, USA). Data analysis was performed using the InkCAD software. Pictures taken in water were obtained with a Multimode Dimension 3100 atomic force microscope equipped with a NanoScope IIIa controller (Digital Instruments, Santa Barbara, CA) operated in tapping mode using aluminum-coated silicon tips from NanoWorld (ARROW-NCR-20). Data analysis was performed using the NanoScope III software (version5.30r3). All images were taken at 25 °C.

3.4.2 Coupling of mPEG-NH₂ to S1–S3 filters

The filters (25 mm diameter) were heavily rinsed with acetone (HPLC grade), dried in a dessicator and then immersed in hydrogen peroxide (30%) for 15 min at 55°C. It was then transferred in 100 mL of water for 15 min at 55 °C. The water was removed under a stream of nitrogen. They were then incubated with a 5% solution of aminopropyl trimethoxysilane (APS) in toluene for 2 h at room temperature. The filters were then rinsed with chloroform, acetone, water and then dried under a gentle stream of nitrogen.

The silanized filters were then incubated in a 25% solution of glutaraldehyde in a pH = 5 buffer at room temperature for 1 h. They were then rinsed six times with water and dried under a gentle stream of nitrogen. The filters were incubated in a solution of mPEG-NH₂ (0.2 g/L) in anhydrous toluene for 1 h at room temperature, then rinsed successively with anhydrous toluene, acetone, water and dried with a gentle stream of nitrogen.

3.4.3 Coating of the filters by polydopamine

A pH = 8.5 buffer was prepared by mixing 2.62 mL of 0.5 molar solution of NaH₂PO₄ and 98.69 mL of a 1 molar solution of NaHPO₄ and 900 mL of water. A dopamine solution (c = 2 g/L) was prepared by dissolving 12 mg of dopamine powder in 6 mL of buffer. Immediately after, one filter was transferred to this solution, and left for 4 h in the solution which gradually turned green. The filter was then extensively rinsed with water. Rinsing was continued until no dopamine could be detected by UV–Vis spectrophotometry at 280 nm. At this point, the filter was green, whereas the rinsing water was colorless.

3.4.4 Vesicle fusion

The experimental procedure was adapted from the one developed by Johnson *et al.* $(2002)^{269}$. In short, lipids were hydrated in a buffer solution (pH = 8), then the resulting multilamellar vesicles were freezed-thawed five times. The resulting liposomes were sonicated with a sonicating probe (20 W, 15 s pulses for 20 min, each pulse being separated by a dead time of 30 s). Then, they were centrifuged during 30 min at 5000 rpm. The supernatant was collected and was extruded at 46 °C through an Avanti miniextruder equipped with 200 nm polycarbonate membranes, yielding a solution of unilamellar vesicles. In order to induce fusion, a filter, freshly coated by polydopamine was completely immersed in the vesicle solution overnight at 40 °C. In order to wash the excess of lipids, the filter was then immersed in 4 mL of 10 mM Tris buffer solution (pH 8, 300 mOsm/L). After removal from the solution, the filter was immediately used for PAMPA experiments. The membrane was never left to dry.

3.4.5 Permeation measurement, via PAMPA

For permeation measurements, vertical diffusion cells were used as described by Loftsson et al. (2006). In short, Franz cells (Hanson, 7 mL) were filled with water at 37 °C. The PAMPA membrane was positioned at the interface between the donor and acceptor compartments. Great care was necessary in order to avoid the formation of air bubbles at the lower side of the membrane. Then, the donor compartment was filled with an aqueous solution of acetaminophen (c = 0.4 mg/mL). In the case of famotidine, a 1 mg/mL solution in 10^{-3} mol/L HCl was used instead of pure water (the lower compartment was also filled with 10^{-3} mol/L HCl). Stirring in the lower cell was set at 400 rpm and the cell was maintained at 37 °C during all the experiment (2 h). Every 15 min, 1 mL was aliquoted from the lower compartment and replaced by water (or 10^{-3} mol/L HCl) in order to work at constant volume. The permeated drug concentration was evaluated by UV–Vis spectrophotometric concentration measurement ($\lambda = 243$ nm for acetaminophen and $\lambda = 265$ nm for famotidine). Permeation of Lucifer Yellow was also assessed by this method (results shown in supplementary content). Since the permeation rate of Lucifer Yellow was negligible, we could conclude that the membrane was integral.

3.5 Results and discussion

Several filters were selected for this work (Table 3.1). A first type consists of commercial nanoporous alumina filters from Synkera with uniform pores (18 nm, 73 nm and 150 nm diameter) regularly distributed in a 2D square array. Commercial alumina filters (Anodisc from Whatman) having pores of uniform diameter (200 nm) randomly distributed were also used in this study. Finally, a polysulfone membrane with an average pore diameter of 450 nm was also used in this study. The surface functionalization of these filters by amino ended polyethylene glycol (mPEG-NH₂) was performed using the procedure developed by Popat et al. (2004)²⁷⁰ and Tanvir et al. (2009)²⁷¹. In short, freshly washed filters were first activated with 3-aminopropyl trimethoxysilane (APS) followed by reaction with first glutaraldehyde then amino-PEG (Fig. 3.2). Unsurprisingly, this procedure proved to be inefficient for polysulfone filters (as these filters do not bear any surface hydroxyl groups).





The functionalization reaction was followed by surface contact angle measurement after extensive washing (Table 3.1). After mPEG-NH₂ coupling, the membrane surface was found to be more hydrophilic, as shown by a significant decrease in contact angle. Interestingly, there is an inverse correlation between pore size and surface hydrophilicity, as measured by contact angle after mPEG treatment (51° for membrane S1 vs less than 25° for membrane S3). This may indicate that the coupling is more successful for the filters with the largest pore sizes; however, it is also important to remember that contact angles are also very dependent upon surface roughness which is obviously not identical for the membrane S1 and S3.

Filter	Nanoporous alumina (Anodisc) A1	Nanoporous alumina (Synkera)		
		S1	S2	\$3
Pore size (nm)	200	18	73	150
Thickness (µm)	60	53	54	52
Contact angle (°)				
Untreated filter	nd	32	97	nd
After H ₂ O ₂ activation	65	61	63	38
After APS treatment	45	52	61	nd
After glutaraldehyde	32	57	73	54
After mPEG coupling	44	51	28	≤25

Table 3.1Filters used to support floating bilayer membranes.

nd, not determined.

The mPEG-NH₂ grafting was also assessed by atomic force microscopy (AFM) in air. In contact mode, the pores of the filter are clearly apparent (measured with a diameter 124 nm, $\sigma = 23$ nm, N = 53) (Fig. 3.3a). The polymer can be visualized in tapping mode (Fig. 3.3b) under the form of isolated islands, indicating that the grafting process was not uniform.



Figure 3.3 AFM analysis of membrane S3 derivatized by mPEG-NH₂ in air. (a) Contact mode (scan size 1.78 μ m x 1.78 μ m). (b) Tapping mode (scan size 2.25 μ m x 2.25 μ m).

Albeit not perfectly covered by mPEG-NH₂, these filters were nonetheless used to support floating bilayer membranes, using the well-known vesicle fusion method^{112,113}. The resulting substrates were characterized by AFM (tapping mode) in water (see Supporting information) indicating that the lipids are adsorbed at the alumina surface and are not supported by the PEG chains in regions with low PEG density. Domains with high PEG density appear to be protruding above the lipidcoated alumina surface. Consequently, the PEG functionalization strategy failed for two reasons. First, the grafting density was not sufficient, leaving bare spots of alumina with which the phospholipid head groups had a strong affinity. Furthermore, PEG chains are not easily amenable to support lipid bilayers due to the lack of sufficiently strong interactions between the lipid and the PEG^{272,273}.

In view of the failure of the PEG strategy, we selected polydopamine as a possible candidate to support the bilayers. The rationale for this choice is that dopamine spontaneously forms cross-linked polymeric films onto a wide range of inorganic and organic surfaces when introduced in an aqueous solution at pH 8.5^{274,275} (Fig. 3.4). The film thickness can easily be controlled by adjusting the polymerization time. However, the exact polymerization mechanism as well as the nature of the resulting film is still under scrutiny²⁷⁴⁻²⁷⁶. Thus nanoporous alumina surfaces were immerged in aqueous solution of dopamine (c = 2 mg/mL) at pH 8.5 for 4 h, resulting in the formation of 20 nm thick films (the 20 nm thickness is based on literature data for dry films)²⁷⁴. The resulting greenish film was monitored by AFM (tapping mode in water), indicating that most of the surface (contrasted in clear) is uniformly coated by polydopamine, but most pores (contrasted in dark) are unblocked. In several regions, the film of dopamine also covers the pores, making continuous islands of up to 0.6 µm dimension (X in Fig. 3.5a). Elsewhere, a thin layer of polydopamine, which was measured to be in average 35 nm thick (hydrated thickness), was found to cover the filter. Therefore, polydopamine is more efficient than PEG in making a hydrated cushion over the alumina filter.



Figure 3.4 Polymerization of dopamine onto the surface of a nanoporous alumina filter.

The polydopamine covered filters were then used to support DMPC membranes, using the vesicle fusion protocol. To our knowledge, direct fusion of a vesicle on polydopamine has never been reported before. However, we were encouraged by the fact that polydopamine has recently been shown to interact attractively with cellular walls^{277–279}. Additionally, we observed that during the fusion process, the greenish film turned to a brown tinge (and the solution remained colorless), indicating that the vesicles interacted with the absorbed polydopamine film. Fusion of the bilayer was evidenced by AFM (tapping mode in water, Fig. 3.5b): in stark contrast to the perforated PEGylated surface, the DMPC-dopaminefilter assembly has a very uniform surface. The topography shows only valleys and peaks, all of the same height which are regularly aligned in a square array. The lower zones correspond to the free standing bilayer which is supported on polydopamine pillars (the higher zones). Therefore, the bilayer follows the topography of the cushion covered filter. The roughness parameter increases from 14.6 nm (for the polydopamine only membrane) to 20.1 nm for the DMPC containing film. This increase of roughness is associated to an increase of surface material of approx. 5.5 nm which is consistent with the thickness of a fully hydrated bilayer. Anodisc (A1) filters were also coated with a film of polydopamine which was then used to support the bilayer. We were unable to unambiguously interpret AFM pictures of the resulting films, probably because the pore arrangement is random unlike the S1-S3 filters for which it is periodic. As A1 Anodisc filters and S1-S3 filters are all made of nanoporous alumina, it can be assumed that the cushion is adsorbed at the surface and the bilayer is properly deposited.



Figure 3.5 (a) Surface of S3 covered by a film of polydopamine. X locates the continuous islands of polydopamine. (b) 3D representation of the surface S3 covered by the polydopamine film and the DMPC bilayer.

Permeation tests were performed using two model drugs, famotidine and acetaminophen, both of which contain chromophores easily detected by UV–Vis spectrophotometry. Acetaminophen is included in group 1 of the biopharmaceutical classification system, whereas famotidine is in group 2. Diffusion profiles, collected with Franz static diffusion cells, are shown in Figs. 3.6 and 3.7. With filters S1 and S2 (with nominal pores of respective diameter of 18 and 73 nm), neither famotidine nor acetaminophen diffused. These results suggest that the pores were clogged by polydopamine, in agreement with the 35 nm polydopamine layer thickness. Furthermore, filters S1–S3 were found to be extremely mechanically fragile (rapid formation of holes through the membrane). Therefore, the S1–S3 membranes were not further employed for these tests.



Figure 3.6 Diffusion profile of famotidine: (a) classical PAMPA (N = 6) and (b) DMPC bilayer on A1 filter with polydopamine hydrated cushion (N = 5).

While Fig. 3.6a (resp. Fig. 3.7a) represents the diffusion profile using a classical PAMPA setup, Fig. 3.6b (Fig. 3.7b) shows the diffusion of famotidine (resp acetaminophen) on supported DMPC bilayers. First, it is clear that the supported bilayers yield reproducible results, as seen by the dispersion of the results which is comparable to conventional PAMPA. Furthermore, it is clear that the model PAMPA yields diffusion profiles which are different from the classical PAMPA one (at least in the case of acetaminophen), indicating that the drug diffuses through different environments, a legacy of the change of fluidity between the supported bilayer vs adsorbed lipid on the filter. Last, for the conventional PAMPA, the diffusion profile of famotidine is similar to the one of acetaminophen (comparing Figs. 3.6a and 3.7a). This is not the case for the model PAMPA. Therefore, it seems that the model PAMPAs might be more discriminative than conventional ones, although this will only be proved after testing a very large number of drugs.



Figure 3.7 Diffusion profile of acetaminophen: (a) classical PAMPA (N = 6) and (b) DMPC bilayer on A1 filter with polydopamine hydrated cushion (N = 6).

Clearly, this very first report on freely supported PAMPA seemingly indicates that supporting the lipid bilayer is a promising strategy to quickly assess the passive permeability of drugs. In order to further assess this phenomenon, we will need to examine longer permeation profiles (up to 8 h) for a wider range of drugs. Our approach will conceptually allow us to study the effect of bilayer composition, bilayer fluidity and elasticity on drug permeability without interference from the filter, since the bilayer is not in contact with it. This is currently not possible with conventional PAMPA as the lipid is adsorbed at the filter surface. We will also be in measure to assess the influence of the nature of the hydrated layer and of the filter porosity on permeability. Finally, neither the cushion nor the filter should influence the drug permeability. Finally, our approach could be used to insert membrane proteins in the bilayer, which we envision should yield a higher absorption predictability compared to conventional PAMPA approaches.

3.6 Acknowledgements

The authors wish to thank Pharmaqam, the UQAM Research Center for Drug Discovery, Delivery, Toxicity and Action Mechanism for financial support and Mrs Jacqueline Sanchez from the LCM (University of Montreal) for technical assistance with the AFM pictures.

3.7 Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ijpharm.2011.09.013.

3.7.1 AFM images



topography of filter S1 with grafted PEG tapping mode (scan size : 50 µm) in air



topography of filter N1 with grafted PEG tapping mode (scan size : 5 μm) in air



topography offliter 51 with grafted PEG tapping mode (scan size : 2.5 µm) in air



topography of filter S1 with grafted PEG - scanning mode (scan size : 2.25 μm) in air



topography of filter S1 with grafted PEG - scanning mode (scan size : 1.8 µm) in air

Figure 3.S1 Filter + PEG (in air).



Topography of filter + PEG + bilayer on filter S1 (scan size 10µm) – in water tapping mode



Topography of filter + PEG + bilayer on filter S2 (scan size 10µm) – in water tapping mode

Figure 3.S2 Filter + PEG + DMPC in water.



Topography of filter + PEG + bilayer on filter S1 (scan size 2.5 μm) – in water - tapping mode



Phase image of filter + PEG + bilayer on filter S2 (scan size 2.5 μm) – in water



72

Topography of filter + PEG + bilayer on filter S1 (scan size 1 μm) – in water - tapping mode



Phase image of filter + PEG + bilayer on filter S1 (scan size 2.5 $\mu m)$ – in water





Topograpy of filter S3 + polydopamine (scan size 5µm) – tapping mode in water

Topograpy of filter S3 + polydopamine (scan size 5μm) – tapping mode in water





Figure 3.S4 Filter + Dopamine + DMPC in water.

3.7.2 Permeation of Lucifer Yellow as a means to check membrane integrity Permeation experiment was performed as described in section 2.5 of the article. The donor compartment was filled with an aqueous solution of Lucifer Yellow (c=0.16mg/mL). The permeated compound concentration was evaluated by UV-Vis spectrophotometric measurement ($\lambda = 280$ nm). According to the obtained profile, less than 1% diffused over 2 hour, indicating that Lucifer Yellow transport is negligible in comparison to famotidine and acetaminophen. This indicates the membrane is not leaking.



Figure 3.S5 Diffusion profile of Lucifer Yellow, DMPC bilayer on filter with polydopamine hydrated cushion (N = 6).

.

CHAPITRE IV

POLYDOPAMINE-SUPPORTED LIPID BILAYERS

Souryvanh Nirasay¹, Antonella Badia², Grégoire Leclair³, Jerome P. Claverie¹ and Isabelle Marcotte^{1*}

- ¹ Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3P8, Canada
- ² Department of Chemistry, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada
- ³ Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

Materials 2012, 5(12), 2621-2636

Contribution des auteurs : IM, JPC ont conçu, coordonné l'étude et participé à l'analyse des résultats. IM, JPC et SN ont rédigé l'article. SN a réalisé toute la partie expérimentale avec la conception des membranes, la partie caractérisation des membranes (mesures d'angle de contact, images d'AFM, ellipsométrie) et l'analyse des résultats. AB et GL ont apporté une contribution intellectuelle et scientifique au travail. Tous les auteurs ont approuvé la version finale du manuscrit.

4.1 Résumé de l'article

Les bicouches lipidiques sur support solide (s-SLBs) sont constituées d'une bicouche lipidique continue déposée directement sur une surface plane. Il existe toutefois une fine couche aqueuse située entre le feuillet inférieur de la membrane et le support solide, dont l'épaisseur ne suffit pas à prévenir les interactions lipide-solide. Ceci induit une diminution de la mobilité des lipides et également la dénaturation des protéines transmembranaires lorsque celles-ci sont présentes. Une approche largement considérée pour résoudre ce problème est de déposer la bicouche lipidique sur un coussin de polymère. Dans ce travail, nous décrivons la préparation de membranes lipidiques supportées sur du mica fonctionnalisé par un coussin de polydopamine. Nous avons évalué l'intégrité ainsi que la mobilité des lipides dans les membranes.

Nous avons démontré que les bicouches de phospholipides zwitterioniques peuvent être supportées sur du mica recouvert avec un film de polydopamine (PDA). Les caractérisations du coussin de polymère ont été réalisées par Spectroscopie photoélectronique par rayons X, ellipsométrie, AFM et ont confirmé le recouvrement complet du mica par un film de PDA de 20 ± 2 nm d'épaisseur avec une faible rugosité. La présence de la bicouche sur le polymère a été évaluée par AFM qui révéla la présence de patches phospholipidiques dont l'épaisseur correspond à une seule bicouche. La capacité du coussin de polydopamine à préserver la mobilité des phospholipides a été démontrée par des mesures de FRAP. Les coefficients de diffusion calculés se sont révélés semblables aux valeurs trouvées pour des lipides dans les membranes libres. Les biofilms de polydopamine sont extrêmement faciles à préparer et adhèrent à un très grand nombre de supports sans nécessiter de modification covalente de la surface de départ. De plus, les coussins de polydopamine conservent la mobilité latérale des phospholipides dans la bicouche. Ils constituent ainsi un excellent choix pour la préparation de membranes supportées sur film polymère.

4.2 Abstract

We report the formation of lipid membranes supported by a soft polymeric cushion of polydopamine. First, 20 nm thick polydopamine films were formed on mica substrates. Atomic force microscopy imaging indicated that these films were also soft with a surface roughness of 2 nm under hydrated conditions. A zwitterionic phospholipid bilayer was then deposited on the polydopamine cushion by fusion of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) vesicles. Polydopamine films preserved the lateral mobility of the phospholipids as shown by fluorescence microscopy recovery after photobleaching (FRAP) experiments. Diffusion coefficients of ~5.9 and 7.2 μ m² s⁻¹ were respectively determined for DMPC and DOPC at room temperature, values which are characteristic of lipids in a free standing bilayer system.

4.3 Introduction

First reported in the early 1980s by McConnell *et al.*(1984, 1985), supported lipid bilayers (SLBs) are commonly used as versatile biological membrane mimics^{91,92}. These two-dimensional soft systems are choice models to study the structure and function of the cellular membrane and its components. For example, they allow the investigation of lipid-lipid and cell-cell interactions, cell fusion, the functional role of membrane proteins, membrane-protein interactions, as well as other biochemical processes such as molecular transport, signaling, and catalysis²⁸⁰. Solid-supported membranes or solid-supported lipid bilayers (s-SLBs) consist of a continuous lipid bilayer deposited onto a planar solid substrate. An ultrathin water layer separates the membrane from the solid surface by a distance of 10–20 Å⁹⁹. Mica, glass, and silicon oxide are the most commonly used substrates for s-SLBs^{85,104,106}. In fact, hydrophilic, smooth, and clean substrates with little or no defects over a large area (of the order of 1 cm²) are preferred to support a high quality membrane⁹⁹.
SLBs can be prepared with different lipid mixtures and characterized with a wide array of surface-sensitive characterization techniques including atomic force microscopy (AFM), fluorescence microscopy, surface plasmon resonance, and ellipsometry. The distance between the lower leaflet of the bilayer and the solid support is not sufficient to prevent lipid-solid surface interactions and ensuing frictions¹²³. This leads to a decrease in lipid mobility and, often, denaturation of incorporated transmembrane proteins¹²³. Therefore s-SLBs do not fully account for the natural fluidity of biological membranes. One popular approach to address this issue is to deposit the lipid bilayer on a soft hydrated polymeric cushion. This system, called "polymer-supported membrane" was developed in the 1990s by Sackmann *et al.* (1996, 1999)^{105,143}. The polymeric cushion acts as a lubricating layer between the bilayer and the solid surface, thus preserving the lipid mobility and membrane fluidity. According to Sackmann and coworkers, the polymer cushion should be soft, hydrophilic, not too highly charged, and not extensively cross-linked¹⁰⁵ with a thickness less than 100 nm¹²³.

In this work, we describe the preparation of polymer-supported lipid membranes using polydopamine as a soft polymeric cushion. Polydopamine films were introduced a few years ago as multifunctional and versatile polymer coatings^{274,275}. They have the interesting ability to adhere on to either hydrophilic or hydrophobic materials. Polydopamine-based coatings form an efficient platform for the elaboration of antibacterial materials^{281,282}, the grafting of biomolecules, protein immobilization in biosensing devices²⁸³, and controlling cell adhesion²⁷⁹. Inspired by the chemical composition of mussel adhesive proteins, they are prepared in a one-step process via oxidative self-polymerization of dopamine when introduced in alkaline solution^{274,275}. The film thickness can be easily controlled by the immersion time of the substrate in the dopamine solution.

The mechanism of polydopamine polymerization is not completely understood.

Recent progress by Dreyer *et al.* (2012) suggests that polydopamine is a supramolecular aggregate of monomers instead of a covalent $polymer^{284}$. The

formation of polydopamine would involve three characteristic steps, i.e., oxidation of phenolic hydroxyls to carbonyls, cyclization of the pendant amine and polymerization via charge transfer, and hydrogen bonding and/or π -stacking. Hong *et al.* (2012), however, proposes that polydopamine is formed following two distinct pathways, i.e., a non-covalent self-assembly of dopamine and its oxidative product leading to the formation of a supramolecular complex, whereas the second one is a covalent oxidative polymerization²⁸⁵. While further efforts are needed to elucidate the mechanism of polydopamine formation, it remains a facile and versatile method to obtain coatings for biocompatible applications.

In a previous report, we demonstrated that polydopamine was a suitable candidate for the preparation of polymer-supported membranes over nanoporous alumina filters containing pores of 73 to 200 nm in diameter²⁸⁶. The resulting assembly (nanoporous alumina surface + polydopamine cushion + supported lipid bilayer) was found to be useful to assess drug permeability. In short, we demonstrated that a continuous lipid bilayer was supported over polydopamine pillars separated by 73–200 nm holes. However, the integrity and fluidity of the lipid bilayer in this complex system was not examined. In this work, we have prepared polymer-supported membranes over a continuous polydopamine film and assessed their fluidity (Figure 4.1).



Figure 4.1 Preparation of polydopamine-supported membranes and the structure of polydopamine as suggested by Lee *et al.* $(2007)^{274}$.

4.4 Results and Discussion

4.4.1 Polydopamine Film Thickness

In this study, we used mica as a solid support because its surface is smooth and flat at the atomic level after cleaving (in contrast to the nanoporous alumina used in our previous study²⁸⁷). The cleaved mica substrate was immersed in a dopamine solution of pH 8.5 (phosphate buffer) at room temperature, resulting in the formation of a polydopamine film (Figure 4.1). The polydopamine thickness as a function of immersion time was assessed by ellipsometry, as shown in Figure 4.2. Since this technique requires a reflective surface, the polydopamine coating was deposited on a substrate covered with a 50 nm aluminum layer obtained via thermal evaporation. For all other experiments, pure mica (no aluminum coating) was employed. A 20 nm thickness (dry film state) was determined after a 4 h immersion (Figure 4.2), in agreement with the literature²⁷⁴. The layer thickness did not increase linearly with immersion time and tends to level off after prolonged immersions (e.g., 33 nm for 12 h), suggesting that highly porous films are obtained at short immersion times which

become denser with an increased immersion period. Previous studies showed that prolonging the immersion time to 24 h leads to a plateau and that the thickness gradually reaches a constant value^{274,288}. In view of supporting lipid membranes, we selected an immersion time of 4 h as it yields a polydopamine coating thick enough to prevent the presence of uncoated spots on the substrate.



Figure 4.2 Effect of the immersion time (25 °C, phosphate buffer pH 8.5, dopamine = 2 g/L) on the polydopamine coating thickness as determined by ellipsometry in air.

4.4.2 Mica and Polydopamine Film Characterization

The chemical composition of the mica surface and its modification by polydopamine were determined using X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analysis. This technique provides the atomic percentage of elements in the first 10 nm of the surface. Analyses were carried out on freshly cleaved mica and polydopamine-coated mica. Results are presented in Figure 4.3.



Figure 4.3 Surface atomic composition of mica and polydopamine-coated mica as determined by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS).

Percentage values obtained in the case of cleaved mica are similar to those from Shlyakhtenko *et al.* (1999)²⁸⁹. The presence of adventitious carbon as contaminant is expected. After polydopamine modification, we observe a significant increase in carbon as well as nitrogen concentrations, and a concomitant decrease in Si, Al and K content. This indicates the effective deposition of a polydopamine layer on the surface as C and N are polydopamine elements whereas Si, Al and K are mica constituents. Our XPS results are in agreement with those found by Li *et al.* (2009) for a polydopamine layer²⁹⁰. Calculation of the N/C percentage ratio for the polydopamine-coated mica reveals a value of 0.110 close to the theoretical value of 0.125 (1N for 8C) for pure dopamine. We also notice only traces of phosphorus originating from the phosphate buffer, probably due to insufficient rinsing, indicating that this element is not incorporated into the composition of polydopamine during the film formation.

The polydopamine film was further characterized by atomic force microscopy (AFM) in tapping mode in deionized water. Images of the mica surface before and after polydopamine coating are shown in Figure 4.4. Unmodified mica has an atomically flat surface as indicated by the root mean squared (RMS) roughness value

of the bare substrate of ~0.2 nm for an area of $5 \times 5 \,\mu\text{m}^2$. After polydopamine film formation, a uniformly covered surface can be observed in addition to an increase in the surface roughness ~2.1 nm for an identical surface area. This value is small enough to consider the surface still flat²⁹¹. Moreover, according to Richter *et al.* (2006), roughness in the nanometer range has little effect on the bilayer formation¹¹³. Interestingly, the film morphology reveals the presence of round and packed particles with a diameter of ~30 nm, suggesting that the polymer grows with a granular structure on the mica surface. Altogether, our XPS and AFM results show that a thin cushion of polydopamine can fully cover the mica surface.





To investigate the mechanical properties of the polydopamine film, AFM was used to obtain force distance curves (commonly called force curves). By indenting the AFM tip on the sample surface, the cantilever deflection is recorded as a function of the piezoelectric displacement z. Because the deflection is a measure of the force between the sample surface and the tip, the force value can be extracted, providing valuable information on the elastic properties of the sample. Indeed the slope of the curve allows calculating the elastic Young modulus E as described by Domke and Radmacher²¹⁹. Combination of Hooke's law (relation between the cantilever deflection and the applied force) with the Hertz model (relation between the indentation and the applied force) gives the following equation:

$$z - z_0 = d - d_0 + \sqrt{\frac{k(d - d_0)}{\frac{2}{\pi} [E(1 - v^2)] \tan(\alpha)}}$$
(4.1)

where d_0 is the zero deflection, z_0 is the contact point, v is the Poisson ratio of the sample and α is the half opening angle of the tip (18° according to the manufacturer). The parameter k is the force constant of the cantilever and represents its stiffness. By taking two points on the slope of the curve, deflection values and their corresponding z values are used to deduce Young's modulus E. To improve the accuracy of our measurements, tips were calibrated by determining the cantilever's mechanical response to thermal noise. We found a k value of 0.046 N/m as compared to the manufacturer's nominal value of ~0.03 N/m.

Figure 4.5 shows the results of the measurements carried out on dry as well as humid uncoated and polydopamine-coated mica. For the measurements corresponding to the plateau section of the curve, the tip is above the surface. Once the tip touches the surface, the deflection starts to increase. From the slope of the deflection as a function of the tip position, it is possible to assess the Young modulus of the material.

The small negative indentation for dry mica (also present to a smaller extent for polydopamine in air) is an expected phenomenon which is attributed to the presence of capillary and van der Waals forces when the tip is close to the surface²¹⁸. A Young's modulus of 1.97 GPa was calculated for dry mica whereas the value obtained in water was 33.20 GPa. The difference of Young modulus between mica in air and in water is expected as the contribution of van der Waals forces is different in both environments²¹⁸. In the case of dry polydopamine-coated mica, a Young modulus of 0.87 GPa is found, i.e., 2.2 times smaller than unmodified mica. In water, though, E is 27 times smaller (1.24 GPa) than that of unmodified mica. We can thus conclude that the polymer cushion is significantly softer than mica, most notably in water, where the polymer is probably hydrated and swollen by water.



Figure 4.5 Force curves obtained (a) in air (b) in water for unmodified and polydopamine-coated mica, with corresponding calculated elastic moduli.

4.5 Characterization of DMPC and DOPC Bilayers on Polydopamine-Coated Mica

Dimyristoylphosphatiylcholine (DMPC) and dioleoylPC (DOPC) bilayers were deposited on the polydopamine-coated mica using direct vesicle fusion. The choice of these lipids was motivated by the abundance of phosphatidylcholines in the eukaryote membrane composition and their widespread use in membrane mimetics⁸². In addition, their deposition on polymer supports has already been extensively scrutinized (see below, Table 4.1). The fusion is achieved by heating the system above the phase transition temperature of the phospholipids, which is 23 °C for DMPC and -20 °C for DOPC²⁹². After fusion, samples were rinsed with deionized water to remove the excess of vesicles and they were never left to dry.

SLB formation by thermal vesicle fusion depends on several factors associated to the nature of both the polymer support and lipids which will affect the interaction between them. More specifically, the polymer surface charge, hydrophilicity, and roughness play an important role, as well as the lipid charge, size, and phase^{135,138,293–295}. Other parameters such as the buffer composition, pH, and ionic strength need to be considered¹¹³. The formation of SLBs occur after adsorption of the vesicles onto the support and fusion of neighboring vesicles to form bigger ones, followed by their rupture into bilayer patches. Then adjacent bilayers patches coalesce and ideally grow until a complete supported phospholipid bilayer is obtained¹¹³.

Table 4.1Lateral diffusion coefficients of lipids supported on various polymersupports, as measured by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP).

Lipid	Polymer	Support	$D(\mu m^2/s)$	Reference
DMPC	PAA	glass, quartz or silicon oxide	2.56 ± 0.84	138
DMPC/cholesterol/PEG- DMPE(1 mol.%)	cellulose	glass	3.3±0.2	147
DOPC	PEG	glass	2.16±0.07	140
DOPC	(CHI/HA) ₅	glass	2.8±0.2	140
PC/PE/PS/cholesterol	maleic acid	silicon oxide	0.26-2.6	151

PAA: poly(acrylic acid), PEG : (poly)ethylene glycol, CHI: chitosan, HA: hyaluronic acid.

AFM imaging was performed to verify the deposition of the bilayers on the polydopamine cushion. As shown in the topography images presented in Figure 4.6a and Figure 4.6b, both phospholipids do not fully cover the polymer surface. Wagner and Tamm observed that lipid bilayers formed on polymers are often patchy and present structural defects¹²⁵. Such bilayer spots of DMPC (Figure 4.6c) and DOPC

(Figure 4.6d) are easier to visualize on phase images, contrasted in dark. AFM phase imaging is sensitive to the viscoelastic behavior and chemical heterogeneities of the material, and therefore, the phospholipid bilayer, which is softer than the polymer, can be clearly distinguished by this method. We also measured bilayer thicknesses of 3.5 ± 1.5 nm for DMPC and 4.0 ± 1.5 nm for DOPC. These values are comparable to other reported data for DMPC^{296,297} and DOPC²⁹⁸ bilayers formed on mica. In addition, RMS roughness values of ~1.3 nm for DMPC and ~1.7 nm for DOPC (area of 5 µm × 5 µm) were determined for the bilayers. These values are larger compared to those of DMPC and DOPC bilayers supported on mica (~0.4 nm, results not shown). However, they are slightly smaller than the RMS roughness of the polydopamine-coated surface ~2.1 nm, indicating the bilayers follow the topography of the polymer.



Figure 4.6 Tapping mode AFM images in deionized water of DMPC (left) or DOPC (right) supported on polydopamine-coated mica (top: height mode, bottom: phase mode, scan size $1.5 \,\mu m \times 1.5 \,\mu m$).

The adsorption of the vesicles onto the polydopamine cushion can first be explained by the use of a phosphate buffer which favors the contact of the vesicles with the polymer cushion surface, leading to bilayer formation for lipids containing PC head groups. Indeed at this ionic strength, the Debye length is very small (0.7 nm)²⁹⁹ but the Na⁺ ions located in the electrical double layer of the surface are small enough to allow the approach of the vesicles to the surface¹¹¹. When a vesicle comes near the surface. Na⁺ ions must remain in the vicinity of the negative charge (either on the surface or on the phospholipid) in order to maintain electroneutrality. Secondly, the interactions between the polydopamine cushion surface and DMPC or DOPC vesicles are sufficiently attractive to allow adsorption of the vesicles. DMPC and DOPC are zwitterionic phospholipids while the polydopamine film contains amine, catechol and quinone groups²⁸³ and is negatively charged at physiological pH due to the deprotonation of one catechol (OH) group³⁰⁰. To our knowledge, the surface charge density of polydopamine has not been precisely measured but it can be estimated using space filling considerations³⁰⁰. 5,6-dihydroxy indole - the repeat unit of polydopamine (as indicated in Figure 4.1) - is essentially a flat molecule as modelled by molecular mechanics using MM2 as force field³⁰¹. The Connolly molecular area calculated with this force field is 157 Å², thus, with one face of the molecule exposed to the surface (the other side facing the bulk of the polymer), one deprotonated OH group occupies a surface of 157/2 = 78 Å². This leads to an approximate charge density of 1.3×10^{14} negative charges per cm² of polydopamine. Cha et al. (2006) have recently demonstrated that phospholipid vesicles are adsorbed via attractive electrostatic interactions between the positive charge of the choline headgroups and negative charges of a surface¹¹¹, provided the surface charge density is larger than a critical surface charge density of 3×10^{14} negative charges per cm². The presence of bilayer patches on the polydopamine cushion can most likely be ascribed to insufficient surface charge covering $(1.3 \times 10^{14} \text{ negative charges per cm}^2)$ vs. 3×10^{14} measured for a full covering).

The mobility of phospholipids in the polydopamine supported bilayers was verified by fluorescence microscopy recovery after photobleaching (FRAP) experiments which allow calculation of the diffusion coefficient from the recovery of the fluorescence curve. Vesicles containing DMPC and DOPC with an Oregon green 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (OG-DHPE) label were incubated with polydopamine-coated mica as previously described. Figure 4.7 shows the process of fluorescence recovery for DMPC (Figure 4.7a–d) and DOPC (Figure 4.7e–h) bilayers after bleaching a spot of 27 μ m diameter. Almost complete recovery occurred after 5 min for DMPC and 4 min for DOPC bilayers.





Diffusion coefficients were calculated using the Soumpasis method²²⁴ (see Experimental Section) from the recovery curves displayed in Figure 4.8. Diffusion coefficients of $5.9 \pm 2.1 \ \mu\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ and $7.2 \pm 1.1 \ \mu\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ were respectively determined for DMPC and DOPC. This compares very well with the value of 7.8 $\mu\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ reported for free standing DOPC bilayers³⁰². In comparison, a diffusion coefficient of

about 3.1 μ m² s⁻¹ is reported on mica³⁰² while values of 2.16 to 3.20 μ m² s⁻¹ have been found for polymer-cushioned membranes (see Table 4.1 which lists diffusion coefficients reported by other groups^{138,140,151,272}).

The higher diffusion coefficients found for DMPC and DOPC bilayers supported on the polydopamine cushion as compared to unmodified mica indicate that the presence of the polymer coating enables the lateral mobility of the phospholipids. Moreover, the diffusion coefficients calculated for both lipids are characteristic of a fluid phase and similar to a free standing bilayer system. Our results also reveal that the diffusion coefficients achieved by DMPC and DOPC on polydopamine-coated mica surpass those reached for these lipids on other polymer cushions. We can thus conclude that the polydopamine coating fulfills its role of maintaining the membrane fluidity by reducing the frictional coupling between the bilayer and the mica surface.



Figure 4.8 Determination of the mobility for (a) OG-DHPE labeled DMPC and (b) DOPC deposited onto polydopamine-coated mica from the FRAP normalised fluorescence intensity as a function of time.

4.6 Experimental Section

4.6.1 Materials

Ruby muscovite mica, ASTM V-1 quality, was obtained from B&M Mica Co. Inc. (Flushing, NY, USA). 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Oregon green 488 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (OG-DHPE) was bought from Life Technologies Inc. (Burlington, ON, Canada), while dopamine hydrochloride and all other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada).

4.6.2 Coating of Mica with Polydopamine

A 2 g/L dopamine solution was prepared by dissolving 10 mg of dopamine hydrochloride powder in 5 mL of sodium phosphate buffer (100 mM, pH 8.5) prepared using nanopure water. The freshly cleaved mica substrate was immediately immersed in the solution and left for 4 h at room temperature. The mica substrate was then removed from the solution and extensively rinsed with deionized water, and finally dried under a stream of nitrogen.

4.6.3 Deposition of Phospholipid Bilayers

For AFM imaging. DMPC or DOPC were hydrated in sodium phosphate buffer (10 mM, pH 7.4) and submitted to a series of five freeze-thaw-vortex shaking cycle. The resulting multilamellar vesicles were then sonicated with a titanium sonicator probe (20 W, 15 s pulses for 20 min, each pulse separated by a 30 second dead time). They were then centrifuged at 5000 rpm for 30 min. The supernatant was extruded 30 times through 200 nm polycarbonate membranes at 40 °C for the DMPC suspension and at room temperature for DOPC. Freshly-prepared polydopaminecoated mica substrates were then immersed in the unilamellar vesicle suspensions and incubated overnight at 40 °C for DMPC bilayer formation and room temperature for DOPC. Finally, the samples were rinsed with deionized water to remove excess vesicles and these were never left to dry before imaging.

For Fluorescence Microscopy and FRAP experiments. Chloroform solutions of either DMPC/OG-DHPE or DOPC/OG-DHPE (molar ratio of 49:1) were first prepared with a total lipid concentration of 1 mM. Chloroform was then removed by rotary evaporation at 30 °C resulting in the formation of a dry lipid film on the inner surface of the round-bottom flask. An appropriate volume of sodium phosphate buffer (10 mM, pH 7.4) was added in each flask and films were allowed to hydrate for 1 h at 30 °C for the DMPC/OG-DHPE mixture and room temperature for DOPC/OG-DHPE. The resulting aqueous suspensions were also agitated and vortex shaken. This led to the obtention of multilamellar vesicles solutions. Unilamellar vesicles solutions were then obtained by bath-sonication (Branson B2510) for 10 min followed by extrusion as described above. The vesicle suspension was then deposited on polydopamine films using the procedure described above.

4.6.4 Ellipsometry

Thickness measurements of dry polydopamine films were carried out on monocrystalline silicon substrates coated with a 50 nm aluminum layer by thermal evaporation. Prior to metal surface deposition, silicon substrates were treated with H_2SO4/H_2O_2 , heavily rinsed with deionized water, and dried under a stream of nitrogen. The aluminum-coated silicon substrates were then immersed in a freshly prepared dopamine solution (as described above) for different times at room temperature. At the end of the incubation period, the samples were removed from the polydopamine solution, extensively rinsed with deionized water and dried with a gentle stream of nitrogen. The ellipsometry measurements were performed in air with a M-2000 spectroscopic ellipsometer (Woollam, Lincoln, NE, USA) with a wavelength scan from 370 to 1000 nm and at an angle of incidence of 75°. The polydopamine layer thickness was determined by fitting the plots of ψ and $\Delta \nu s$. wavelength to a four-layer Si/SiO_x/Al/polydopamine model using the Levenberg-

Marquardt non-linear optimization algorithm of the vendor's WVASE32[®]. The polydopamine layer was modeled as a Cauchy layer using the dispersion equation: $n(\lambda/\mu m) = A + B/\lambda^2 + C/\lambda^4$. A = 1.45, B = 0.01, and C = 0 were used to fit the data [20]. The results were repeated using three replicate samples (N = 3) and three measurements were performed on each sample.

4.6.5 X-Ray Photoelectron Spectroscopy

XPS experiments were performed with a PHI 5600-ci spectrophotometer (Physical Electronics, Eden Prairie, MN, USA). A standard Mg anode operated at 300 W was used for survey scans. Spectra were obtained with an electron take-off angle of 45° relative to the surface sample and a 0.8 mm area was analyzed. A charge neutralizer was used to avoid charging effect. Survey scans were obtained using pass energies between 0 and 1200 eV with a duration of 8 min for acquisition. XPS analyses were carried out on freshly cleaved/made mica and polydopamine-coated mica. The experiments were repeated with three different samples (N = 3).

4.6.6 Atomic Force Microscopy (AFM)

Topography imaging. Atomic force microscopy (AFM) pictures were taken in water with a Veeco Dimension 5000 microscope equipped with a Nanoscope V controller (Bruker/Veeco, Santa Barbara, CA, USA). Gold coated silicon nitride tips purchased from Bruker with a nominal spring constant of ~0.1 N/m and resonance frequencies between 8 and 25 kHz were used. Data analysis was performed using the NanoScope Analysis software (Version 1.30). All images were taken at room temperature using tapping mode.

Force distance curves. Force distance curves were obtained with a Veeco Dimension 5000 microscope equipped with a Nanoscope V controller. Gold-coated silicon nitride tips from Veeco with a nominal spring constant of ~0.03 N/m were used. To improve the accuracy of the measurements, tips were calibrated by measuring the cantilever's mechanical response to thermal noise. Studies were

performed in contact mode at 23 °C. Data analysis was performed using the NanoScope Analysis software (Version 1.30).

4.6.7 Fluorescence Microscopy and Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)

Fluorescence images were taken using a Nikon Ti A1R confocal laser scanning microscope equipped with a 100X/1.45 NA Plan Apo TIRF objective. Microscope examination was done using 488 and 515 \pm 30 nm as excitation and emission wavelengths, respectively. FRAP experiments were performed by bleaching a 27 μ m diameter spot during 8 s with full power laser using a 488 nm excitation wavelength. The FRAP was recorded at 3 s interval between images at a reduced power laser (3%). Data were analyzed using ImageJ software and diffusion coefficients determined using the Soumpasis method [42]. The diffusion coefficient was calculated using the following equation:

$$D = 0.224 \ \frac{\omega^2}{t_{1/2}} \tag{4.2}$$

where D is the diffusion coefficient, ω is the radius of the photobleached spot and $t_{1/2}$ the time at which half of the intensity was recovered. The experiment was repeated three times.

4.7 Conclusions

We have demonstrated that zwitterionic phospholipid bilayers can be supported on polydopamine-coated mica. Characterization of the modified mica surface by XPS, ellipsometry, and AFM confirmed full coating by a 20 nm soft polydopamine cushion with little surface roughness. The phospholipid bilayer was deposited by vesicle fusion and shown to follow the cushion topology. The capacity of the polydopamine cushion to preserve the phospholipid mobility was demonstrated by the diffusion coefficient of the phospholipids measured by FRAP, which are similar to values found for fluid-phase lipids in liposomes. Polydopamine biofilms are extremely easy to prepare and strongly adhere to a very large number of substrates without the need for covalent modification of the surface. Coupled to the fact that polydopamine cushions preserve lateral phospholipid mobility in the bilayer, the aforementioned advantages all point to polydopamine as an excellent choice to prepare polymersupported membranes.

4.8 Acknowledgements

The authors wish to acknowledge P. Moraille (Laboratoire de Caractérisation des Matériaux, Université de Montréal) for technical assistance with AFM images, D. Flipo (Université du Québec à Montréal (UQAM)) with fluorescence microscopy, and the Laboratoire d'Ingénierie de Surface (Université Laval) with XPS analysis. They also thank Y. Mouget (Corealis Pharma Inc.) for insightful discussions. S.N. would like to thank UQAM for the award of scholarships. This work was supported by a Collaborative Health Research Projects grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada and Canadian Institutes of Health Research (CIHR). I.M. and J.P.C. are members of the Centre Québécois sur les Matériaux Fonctionnels (CQMF) and A.B. is a member of the Centre for Self-Assembled Chemical Structures (CSACS).

CHAPITRE V

PORE-SPANNING LIPID MEMBRANES WITH NEAR-NATIVE PROPERTIES SUPPORTED ON POLYDOPAMINE RIMS

Souryvanh Nirasay^a, Patricia Moraille^b, Antonella Badia^b, Isabelle Marcotte^a and Jerome P. Claverie^{a*}

^a Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, P.O. Box. 8888, Downtown Station, Montreal, QC H3C 3P8 (Canada)
^b Department of Chemistry, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Downtown Station, Montréal, QC H3C 3J7 (Canada)

En voie de soumission au journal Angewandte Chemie International Edition.

Contribution des auteurs : IM et JPC ont conçu, coordonné l'étude et participé à l'analyse des résultats. IM, JPC et SN ont rédigé l'article. SN a réalisé toute la partie expérimentale avec la conception des membranes, la partie caractérisation des membranes (images d'AFM, mesures FRAP, SPR, QCM-D) et l'analyse des résultats. SN a préparé les échantillons et PM a réalisé la partie AFM liquide des filtres en alumine de taille de pore 55 nm. AB a apporté une contribution scientifique et intellectuelle au travail, notamment en SPR et AFM. Tous les auteurs ont approuvé la version finale du manuscrit.

5.1 Résumé de l'article

Jusqu'à présent, les bicouches supportées sur PDA ont été préparées par fusion de vésicules contenant des phospholipides zwitterioniques de DMPC ou de DOPC. Leurs interactions avec la PDA chargée négativement sont suffisamment attractives pour permettre l'adsorption des vésicules, mais ne permettent pourtant pas la formation de bicouches complète. Le travail a été poursuivi avec la DOPC car la fusion de vésicules peut s'effectuer à température ambiante, ce qui facilite les manipulations. Il a été envisagé de modifier la composition des vésicules et d'ajouter des charges aux liposomes puisque des bicouches lipidiques exemptes de défauts peuvent être obtenues en mélangeant des lipides zwitterioniques avec des lipides 3B-[N-(N',N'cationiques³⁰³. intégré le Ainsi avons nous diméthylaminoéthane)carbamoyl] cholestérol (DC-Chol) dans la composition liposomale pour attirer davantage de vésicules à surface négative de la PDA. L'utilisation du cholestérol est avantageuse car il est le principal stérol des membranes des cellules eucaryotes et joue un rôle important dans de nombreux processus métaboliques et la régulation de la fluidité membranaire. Sur la base de considérations électrostatiques, le DC-Chol peut améliorer les interactions liposomespolymère au cours du processus de fusion, ainsi que les interactions entre les phospholipides.

Dans un premier temps, des bicouches de DOPC contenant 10, 20 ou 30 mol% de DC-Chol ont été préparées sur du mica modifié avec le coussin de polydopamine. Les meilleurs résultats ont été obtenus pour les membranes contenant 20 et 30% de DC-Chol avec un recouvrement de surface supérieur à 90%. Les membranes de DOPC/DC-Chol ont aussi démontré une fluidité et une grande stabilité d'après les résultats d'AFM et de FRAP. L'importance d'interactions électrostatiques favorables pour garantir l'obtention de bicouches continues a été mise en évidence, d'une part avec l'incorporation de DC-Chol dans la composition membranaire, et d'autre part avec l'addition de chlorure de sodium dans la solution tampon. Cette méthode a permis le renforcement des interactions entre les phospholipides et entre la

bicouche et le coussin de PDA, contribuant ainsi à stabilisér et à protéger la membrane contre les défauts.

Dans un second temps, nous avons démontré que le support de polydopamine n'avait pas besoin d'être continu puisque nous avons réussi à former des membranes suspendues sur un filtre d'alumine modifié avec le polymère. L'imagerie d'AFM atteste que les pores sont moins visibles après la fusion des vésicules comparé à la surface modifiée avec la PDA seule. Une analyse plus poussée de la profondeur de pénétration de la pointe dans les pores a été réalisée à chaque étape de modification du filtre. La diminution des valeurs de profondeur de pénétration confirme le dépôt de la PDA ainsi que la formation de bicouches lipidiques suspendues.

En raison de leur grande stabilité, fluidité et intégrité, nos bicouches supportées sur coussin de polydopamine ainsi développées présentent des caractéristiques de membrane quasi-native et constituent, de ce fait, un modèle synthétique robuste des membranes biologiques.

5.2 Abstract

We report the formation of lipid bilayers supported on a polydopamine film with near surface mobility. complete coverage, lateral and long-term stability. Dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) bilayers containing 10, 20 or 30 mol% of positively-charged 3B-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol (DC-Chol) were prepared on polydopamine-modified mica. Best results were obtained for 20% and 30% DC-Chol-containing membranes with surface coverages greater than 90%. The DOPC/DC-Chol membranes exhibited fluidity and high stability as assessed by Atomic Force Microscopy and fluorescence recovery after photobleaching investigations. The polydopamine support does not need to be continuous, and a pore-spanning bilayer was shown to extend between the polydopamine-coated rims surrounding 67-nm pores of an alumina filter. Due to their high stability, fluidity and integrity over a large scale, as well as facile preparation, these lipid bilayers with near-native characteristics provide a robust synthetic model of biological membranes.

5.3 Introduction

Polymer-supported membranes are a cell membrane model composed of a single lipid bilayer deposited on a soft polymer chemically or physically adsorbed to an underlying solid surface. They are a popular approach to overcome the lipid-solid interaction drawbacks of largely used solid-supported lipid bilayers (s-SLBs)^{92,105,123,134,304} because the polymer acts as a lubricating layer to better preserve the natural structure and dynamics of free membranes^{293,305,306}. A satisfying model should provide a large bilayer surface coverage and maintain the lateral mobility of the lipids as these parameters are of great importance to guarantee the biological relevance of the biomembrane mimic.Membranes directly supported on smooth and hydrophilic solid substrates such as mica or glass exhibit continuous bilayer deposition over large surface areas^{93,307}, whereas those formed on polymers are found to be patchy with structural defects^{125,141}.Therefore, no suitable method currently exists to support integral lipid bilayers on polymer surfaces on a large scale while maintaining fluidity. Understandably, a free-standing membrane would represent the ideal mimetic of the biological environment^{178,179,183,308}.

Herein, we report the preparation of high quality polydopamine-supported membranes with near-complete membrane surface coverage, where lipid bilayers are obtained via direct vesicle fusion onto the polymer surface. These membranes span 67-nm pores of an alumina filter, thereby providing a simple and efficient method to prepare pore- spanning lipid bilayers. Since a report by the Messersmith group, PDA films have been largely employed as multifunctional, versatile and biocompatible polymer coatings³⁰⁹⁻³¹¹. So far, PDA-supported membranes have been prepared with liposomes containing only zwitterionic phospholipids such as dimyristoyl-phosphatidylcholine (DMPC) or dioleoylPC (DOPC)²⁸⁷ (Fig.5.1A). Their interactions

with negatively-charged PDA at physiological pH were not sufficiently attractive to obtain complete bilayer coverage of the surface, thus leading to the formation of membrane patches. One strategy to obtain bilayers on mica (also negatively charged) with large surface coverage is to modify the vesicle composition to add charge to the liposomes^{113,312}. Mica-supported lipid bilayers that are free of defects can be obtained by mixing zwitterionic lipids with cationic lipids such as 1,2-dimyristoyl-3-trimethylammonium-propane (DMTAP)³⁰³. To enhance the bilayer surface coverage on PDA, we added cationic 3ß-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl] cholesterol (DC-Chol, Fig.5.1B) to the liposomal composition to attract more vesicles at the negative polymer surface. The use of cholesterol is advantageous because it is the main sterol component of eukaryotic cell membranes, plays an important role in many metabolic processes and in the regulation of the membrane fluidity³¹³. Based on electrostatic considerations, positively-charged cholesterol can improve the liposome-polymer interactions during the fusion process as well as interactions between the phospholipids.



Figure 5.1 Chemical structures of A) dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), B) DC-Cholesterol hydrochloride (DC-Chol) and C) dopamine and its polymerization into polydopamine. D) Membrane formation on the polydopamine cushion by the vesicle fusion technique.

5.4 Results and Discussion

We thus prepared 200-nm unilamellar vesicles of binary mixtures of DOPC/DC-Chol (90/10), DOPC/DC-Chol (80/20) or DOPC/DC-Chol (70/30) and investigated their fusion onto PDA-modified mica substrate, as illustrated in Fig.5.1C,D. The resulting system was characterized by Atomic Force Microscopy (AFM) to visualize the defects as well as to determine the membrane surface coverage using surface height (bearing) analysis. Characterization of the mica substrate before and after PDA modification has been previously detailed²⁸⁷, showing a uniform 20-nm thick polymer coating with root-mean-square (rms) roughness of 2.1 nm over 5 μ m length scale.

The fusion of vesicles onto the PDA cushion was assessed by AFM on an $8 \mu m^2$ area, using a bearing analysis of the surface. An example is shown in Fig.5.2A and 5.2B. A reference plane (corresponding to the top surface of the PDA layer) was taken as the highest plane for which 100% of the surface was covered. The bearing analysis measured the percentage of the surface which lies 4 nm above this reference plane (i.e., expected thickness of DOPC bilayer). When the vesicle fusion was carried out in water (Fig.5.2A), only 28% of the PDA cushion was covered by a bilayer. Surface coverage was improved when fusion was performed in a phosphate buffer (10mM) (Fig.5.2C, E and G) at low ionic strength. At high ionic strength (150 mM NaCl added, Fig.5.2D, F and H), the surface appears completely covered. Buffer composition, ionic strength^{113,314} and sodium chloride^{114,315,316} are some of the parameters known to influence SLB formation on solid substrates. We found that sodium chloride and high ionic strength can also enhance bilayer formation on the PDA polymer. In particular, a better deposition was observed for membranes containing 30% (Fig.5.2D) and 20% DC-Chol (Fig.2F) compared to the 10% DC-Chol-containing membrane (Fig.5.2H), with bilayer surface coverages of 96%, 92% and 42% respectively. Scanning other areas of the surface for membranes containing 20% and 30% DC-Chol led to similar results, whereas, a greater variability was observed for the membranes containing 10% DC-Chol, which can be explained by the fact that in partially covered fragile membranes, lipids can be pushed by the AFM tip¹⁰².



Figure 5.2 AFM topography images of DOPC/DC-Chol (70/30), (80/20) and (90/10) bilayers deposited on PDA-modified mica (scan size $4x2 \ \mu m^2$). Solution used during vesicle fusion process was either A) water, C) E) G) 10 mM sodium phosphate pH 7.4, or D) F) H) 10 mM sodium phosphate 150 mM NaCl pH 7.4. B) Bearing analysis from image A).

Each membrane (with 10, 20 or 30% DC-Chol) was also imaged by AFM at three different time points (on the first day, the third day and finally after one week in the presence of a 2 mM DOPC solution when stored between imaging). Results indicate that the membranes were stable for at least 7 days (Table 5.1). Again, DOPC membranes mixed with 20 or 30% DC-Chol gave the best AFM images with more than 90% of the surface covered. By contrast, membranes containing 10% DC-Chol showed lower and variable surface coverages. In all cases, the surface coverage improved over time. This first indicates that complete vesicle fusion is a slow process (approximately 7 days in order to reach 100%) which contrasts with the rapid fusion observed on solid mica surfaces¹⁰². This also shows that supported bilayers can be stored in a DOPC solution for several days with no significant deterioration.

106

Table 5.1 Percentage of membrane surface coverage, as determined after bearing analysis of the AFM images on samples incubated with a 2 mM DOPC suspension for 1, 3 and 7 days. Each sample was freshly rinsed with deionised water before analysis in order to remove free and adsorbed vesicles. Bearing analyses were performed on 8 μ m² areas.

Membrane	Bilay	Bilayer surface coverage (%)			
(DOPC/DC-Cho	ol) Day 1	Day 3	Day 7		
90/10	47 ± 4	42 ± 3	51 ± 11		
80/20	89 ± 7	97 ± 4	100 ± 3		
70/30	96 ± 4	99 ± 3	100 ± 7		

The mobility of the phospholipids was determined by Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) experiments by adding 2 mol% of Oregon green 488 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (OG-DHPE) to the liposomal composition. Diffusion coefficients of the lipids, calculated using the Soumpasis method²²⁴ from the recovery curves of the 20% and 30% DC-Chol-containing membranes were found to be 2.4 and 1.5 μ m²/s, respectively. These values compare well with those obtained for polymer-supported membranes, which are typically in the 1-3 μ m²/s range^{138,140,147,151}. Therefore, the membranes formed on PDA are integral and stable over time while maintaining lateral lipid mobility.

Bilayer formation from pure DOPC or DOPC/DC-Chol (90/10, 80/20, 70/30) 200nm vesicles in phosphate buffer (10 mM sodium phosphate with 150 mM NaCl, pH 7.4) was also investigated by surface plasmon resonance (SPR) using a PDA-coated gold sensor chip. The SPR response (θ_{min}) increases with time of exposure of the PDA surface to the lipid vesicles as a result of an increase in mass due to the adsorption and fusion of the lipid vesicles inducing a shift of the resonance angle to larger values (Fig.5.3A). After one hour, the SPR response reaches a plateau, indicating a rapid, but not 100%-complete (in agreement with Table 5.1) fusion of the vesicles. Below we will show that the observed process is indeed vesicle fusion and not only vesicle adsorption. After rinsing with water, then buffer, no mass loss is observed, indicating that the supported bilayer is well-anchored to the surface. The adsorbed layer thickness was determined from the $\Delta \theta_{min}$ values using Fresnel multilayer modeling (see supporting information). The membrane thicknesses are given in Fig.5.3B. In the case of pure DOPC membrane, the calculated lipid layer thickness is consistent with the value of a single bilayer (~4 nm), indicating that vesicle fusion has occurred. With the positively-charged DOPC vesicles containing 10, 20 or 30% DC-Chol, the calculated lipid bilayer thicknesses are slightly greater, but still consistent with a supported bilayer (and not to a layer of adsorbed vesicles). This discrepancy may be accounted for by the fact that the bilayer is supported on a soft water-swellable polymeric material not fully captured by the Fresnel multilayer model that only considers planar solid interfaces³¹⁷.



Figure 5.3 A) Sensorgram obtained for DOPC/DC-Chol (80/20) membrane formation B) Experimental and simulated SPR angles as well as calculated thicknesses of polydopamine (n=1.45) and bilayer (n=1.49).

The formation of lipid membranes was also tested on PDA-coated alumina filters. The alumina filter, with 55 nm pore size according to the manufacturer, was imaged prior to PDA coating (Fig.5.4A),. An average pore size of 67 ± 1 nm was calculated by performing a 2D-fast Fourier transform of the AFM images to locate the periodic features in each image (See supporting information). Upon coating with PDA, the pores become smaller (62 ± 0.2 nm) indicating that a 2.5 nm-thick layer of PDA surrounds the pore inlet.

The DOPC/DC-Chol (70/30) vesicles were then fused onto the PDA-coated filter surface. The vesicle size (200 nm) was larger than the diameter of the pores to exclude them from the holes and to force their spreading on the surface. Membrane formation was confirmed by AFM imaging which shows that the pores are less visible after the vesicle fusion (Fig.5.4C) compared to the PDA-modified surface (Fig.5.4B).Further analysis of the tip penetration depth into the pores has been conducted (Fig.5.4D). The decrease of the tip penetration at each step of the filter modification indicates the effective deposition of the PDA and the formation of suspended lipid bilayers.



Figure 5.4 3D representation of the nanoporous alumina filter: A) without modification, B) polydopamine-coated, C) polydopamine-coated with a DOPC/DC-Chol (70/30) bilayer (scan size 500 x 500 nm²). Surface roughness analyses were performed on 500 x 500 nm² areas. D) Height profiles of a single pore at each step of modification.

5.5 Conclusion

We described the simple preparation of lipid membranes supported on a polymeric cushion with near-native properties. The addition of positively-charged cholesterol in the membrane composition enabled the enhancement of the surface coverage by strengthening the interactions between the phospholipids and between the bilayer and PDA, which stabilize and protect the membrane against defects. Electrostatic interactions are thus the main driving force for the formation of PDA-supported phospholipid bilayers. The use of a readily-prepared PDA polymer inspired from the mussel anchoring glue provides a versatile support for lipid membranes on continuous as well as nanoporous surfaces. The successful formation of free-standing DOPC/DC-Chol membranes on PDA-modified nanoporous alumina offers a new platform for parallel drug screening assays, with the advantages of a facile and

organic solvent-free preparation, stability, fluidity, while enabling the design of a biologically-relevant model membrane structure.

5.6 Experimental section

Ruby muscovite mica, ASTM V-1 quality, was obtained from B&M Mica Co. Inc. (Flushing, NY, USA). Plain Gold surface sensor chips (50 nm gold-coated glass slide) were purchased from Reichert (Depew, NY, USA). Nanoporous Anodic Aluminum Oxide filters (55 nm pores according to the manufacturer) were obtained from Synkera Technologies Inc. (USA). 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) and 3ß-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl] cholesterol hydrochloride (DC-Chol) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) and used without further purification. Oregon green 488 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (OG-DHPE) was bought from Life Technologies Inc. (Burlington, ON, Canada). Dopamine hydrochloride and all other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada).

2 mM vesicle suspensions of DOPC/DC-Chol in 10 mM sodium phosphate buffer with 150 mM NaCl (pH 7.4) were prepared by extrusion through 200 nm polycarbonate membranes. For AFM experiments, DOPC vesicle suspensions containing DC-Chol (10, 20 or 30% mol/mol) were prepared. For FRAP experiments, OG-DHPE was added to the DOPC/DC-Chol mixture at 2% molar ratio. Freshlyprepared polydopamine-coated mica substrates prepared as previously described were immersed in the vesicle suspensions and incubated overnight at room temperature. Finally, the samples were rinsed with deionised water to remove excess vesicles and these were never left to dry before AFM imaging or FRAP experiments.

Details for all experiments are given in the supporting information.

5.7 Acknowledgements

The authors wish to acknowledge M. Lambert (Dpt of Chemistry, Université de Montréal) for technical assistance with the AFM liquid cell. They also thank G. Leclair (Faculty of Pharmacy, Université de Montréal) for stimulating discussions. This work was supported by a Collaborative Health Research Projects grant from the NSERC (Canada) and the CIHR (Canada). I.M. and J.P.C. are members of the Centre Québécois sur les Matériaux Fonctionnels (CQMF) and A.B. is a member of the Centre for Self-Assembled Chemical Structures (CSACS). S.N. is grateful to FRQNT (Québec) and UQAM for the award of scholarchips.

5.8 Supporting information

5.8.1 Materials and methods

5.8.1.1 Materials

Ruby muscovite mica, ASTM V-1 quality, was obtained from B&M Mica Co. Inc. (Flushing, NY, USA). Plain Gold surface sensorchips (50 nm gold-coated glass slide) were purchased from Reichert (Depew, NY, USA). Nanoporous Anodic Aluminum Oxide filters (55 nm pores) were obtained from Synkera Technologies Inc. (USA). 3B-[N-(N',N'-(DOPC) and 1.2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine dimethylaminoethane)-carbamoyl] cholesterol hydrochloride (DC-Chol) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) and used without any 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-488 purification. Oregon green further phosphoethanolamine (OG-DHPE) was bought from Life Technologies Inc. (Burlington, ON, Canada). Dopamine hydrochloride and all other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada).

5.8.1.2 Preparation of the dopamine solution

A 2 g/L dopamine solution was prepared by dissolving 8 mg of dopamine hydrochloride powder in 4 mL of sodium phosphate buffer (100 mM, pH 8.5) prepared using deionised water.

5.8.1.3 Preparation of mica substrates modified with polydopamine

Freshly cleaved mica was immersed in a dopamine solution (as described above) for 4 h at room temperature. At the end of the incubation period, the sample was removed from the polydopamine solution, extensively rinsed with deionised water and finally dried with a gentle stream of nitrogen.

5.8.1.4 Preparation of DOPC/DC-Chol liposomes and deposition of lipid bilayers

In a round bottom-flask, lipids were dissolved and mixed in chloroform solution. Chloroform was then evaporated with a stream of nitrogen resulting in the formation of a dry lipid film on the inner surface of the round-bottom flask. An appropriate volume of vesicles buffer was added into the flask and the lipid film was allowed to hydrate for minimum 1 h at room temperature. The resulting aqueous suspension was also agitated and vortex shaken. This led to the obtention of multilamellar vesicles solution. The solution was then extruded 30 times using an extruder (LiposoFast: Avestin, Ottawa, Canada) through 200 nm polycarbonate membranes to finally obtain a solution of unilamellar DOPC/DC-Chol vesicles. The total lipid concentration was 2 mM. For AFM experiments, DOPC vesicle suspensions containing DC-Chol (10, 20 or 30% mol/mol) were prepared. For FRAP experiments, OG-DHPE was added to the DOPC and DC-Chol mixture at 2% molar ratio. Freshly-prepared polydopaminecoated mica substrates were then immersed in the unilamellar vesicle suspensions and incubated overnight at room temperature. Finally, the samples were rinsed with deionized water to remove excess vesicles and never left to dry before AFM imaging or FRAP experiments.

5.8.2 AFM on polydopamine-supported lipid bilayers

5.8.2.1 AFM measurements

AFM topography imaging was conducted with a Veeco Dimension 5000 microscope equipped with a Nanoscope V controller (Bruker/Veeco, Santa Barbara,CA, USA).

Silicon nitride tips purchased from Bruker with a nominal spring constant of ~0.1 N/m and resonance frequencies between 8 and 25 kHz were used. NanoScope Analysis software (Version 1.30) was used for data analysis. All samples were imaged in pure water or in sodium phosphate buffer (10mM, pH 6.4) at room temperature using tapping mode. The topography images were characterized quantitatively by a roughness analysis and a bearing analysis (surface height analysis) for membrane surface coverage determination.

5.8.2.2 AFM on polydopamine

AFM imaging of polydopamine-coated mica has been previously detailed²⁸⁷. Images of the mica surface before and after polydopamine coating are shown in Figure 5.S1. Root mean squared (RMS) roughness value of the bare mica substrate was found to be ~0.2 nm ($5x5\mu m^2$ analyzed area), which confirms unmodified mica has an atomically flat surface. After polydopamine film formation, a uniformly covered surface can be observed in addition to an increase in the surface roughness ~2.1 nm ($5x5\mu m^2$ analyzed area). This value is small enough to consider the surface still flat²⁹¹ and roughness in the nanometer range has little effect on the bilayer formation according to Richter *et al.*¹¹³. All our previous results showed that the cushion of polydopamine fully covers the mica surface. Moreover, the film morphology reveals the presence of round and packed particles with a diameter of ~30 nm, suggesting that the polymer grows with a granular structure on the mica surface.



Figure 5.S1 AFM topography of A) unmodified and B) polydopamine-coated mica in water using tapping mode (scan size $1.5 \times 1.5 \ \mu m^2$). Z-scale is shown on the right side. Figure from reference²⁸⁷.

5.8.3 AFM on membranes

The objective of this part is to optimize the composition of the solution used during the vesicle fusion process, as bilayers can be formed from vesicles in pure water¹⁰² or in various solutions containing buffer and salts^{318–320}. DOPC/DC-Chol vesicles were prepared either in deionised water, in a phosphate buffer (10 mM sodium phosphate, pH 7.4) or in a phosphate buffer containing sodium chloride salt (10 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4). After fusion of DOPC/DC-Chol vesicles on polydopamine-modified mica, samples were rinsed with deionised water and AFM imaging was conducted in sodium phosphate buffer (10 mM).

When vesicle fusion was performed in deionised water, the formation of bilayer patches was clearly observed (Fig.5.S2A). The surface coverage was estimated to 28% with surface height analysis. The dimension of the patches was approximately 220 nm in diameter and the bilayer thickness was found to be ~4 nm (Fig.5.S2B).


Figure 5.S2 AFM topography of DOPC/DC-Chol (70/30) patches deposited on PDA B) Measurement of the patch thickness located in the red box in A).

When vesicle fusion was performed in 10 mM phosphate buffer at pH 7.4, improvement of the bilayer surface coverage was observed compared to water. Topography images are presented in figures 5.S3A, 5.S4A and 5.S5A. We obtained the best results for the 30% DC-Chol containing membrane with 96% of the surface covered. The addition of 150 mM NaCl in the buffer enables even better surface coverage for the DOPC/DC-Chol (80/20) membrane with surface coverage greater than 90% (Fig.5.S4B). The greater variability observed for membranes containing 10% DC-Chol can be explained by the fact that in partially covered fragile membranes, lipids can be pushed by the AFM tip¹⁰².



Figure 5.S3 AFM topography images of DOPC/DC-Chol (70/30) bilayers deposited on PDA modified mica (top) with corresponding surface height analysis (bottom). The solution used for the vesicle fusion was : A) 10 mM sodium phosphate, B) 10 mM sodium phosphate + 150 mM NaCl.



Figure 5.S4 AFM topography images of DOPC/DC-Chol (80/20) bilayers deposited on PDA modified mica (top) with corresponding surface height analysis (bottom). The solution used for the vesicle fusion was : A) 10 mM sodium phosphate, B) 10 mM sodium phosphate + 150 mM NaCl.



Figure 5.S5 AFM topography images of DOPC/DC-Chol (90/10) bilayers deposited on PDA modified mica (top) with corresponding surface height analysis (bottom). The solution used for the vesicle fusion was : A) 10 mM sodium phosphate, B) 10 mM sodium phosphate + 150 mM NaCl.

These results provide evidence of surface coverage improvement when vesicle fusion is performed at high ionic strength. The addition of sodium ions in the solution strengthens ion-lipid interactions, leading to a higher degree of membrane organization^{114,315,321}. Thus, all the samples for the following experiments were prepared using the phosphate buffer containing sodium chloride salt for the vesicle fusion.

5.8.4 Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) experiments

5.8.4.1 FRAP measurements

The mobility of the phospholipids was determined with Fluorescence Recovery After Photobleaching experiments by adding Oregon green 488 1,2-dihexadecanoyl-snglycero-3-phosphoethanolamine (OG-DHPE) to the liposomal composition at 2% (molar). Fluorescence images were taken using a Nikon Ti A1R confocal laser scanning microscope equipped with a 100X/1.45 NA Plan Apo TIRF objective. Microscope examination was done using 488 and 515 \pm 30 nm as excitation and emission wavelengths, respectively. FRAP experiments were performed by bleaching a 20 µm diameter circular spot during 10 s with full power laser using a 405 nm excitation wavelength using the resonant mode. Data were analyzed using ImageJ software and diffusion coefficients determined using the Soumpasis method ²²⁴. The diffusion coefficient was calculated using the following equation:

$$D = 0.224 \frac{\omega^2}{t_{1/2}} \tag{5.2}$$

where D is the diffusion coefficient, ω is the radius of the photobleached spot and $t_{1/2}$ the time at which half of the intensity was recovered. The experiment was repeated three times.

5.8.4.2 FRAP curve results

Diffusion coefficients were determined for the 20% and 30% DC-Chol containing membranes, as these showed the best surface coverage. Diffusion coefficients of the lipids, from the recovery curves of the 20% and 30% DC-Chol containing membranes (Fig.5.S6 and 5.S7), were found to be 2.4 and 1.5 μ m²/s respectively, which compares well with values obtained for polymer supported membranes, which are typically in the 1-3 μ m²/s range.



Figure 5.S6 FRAP curve for the DOPC/DC-Chol (80/20) membrane.



Figure 5.S7 FRAP curve for the DOPC/DC-Chol (70/30) membrane.

5.8.5 Surface Plasmon Resonance (SPR) measurements

5.8.5.1 Preparation of gold substrates modified with polydopamine

Sensor chip handle and surface treatment were done with caution as the technique relies on molecular events occurring closest to the surface. First, the gold sensor chip was treated two times with a Piranha solution (H_2SO_4/H_2O_2 , 70:30), each time during 10 min, then heavily rinsed with deionised water and dried under a stream of nitrogen. The cleaned gold sensor chip was then immersed in a freshly prepared dopamine solution for 4 h at room temperature. At the end of the incubation period, the sample was removed from the polydopamine solution, extensively rinsed with deionised water and finally dried with a gentle stream of nitrogen. To verify the deposition of the polymer, surface morphology of the gold sensor chip before and after polydopamine modification was assessed using AFM. After 4h immersion of the gold sensor chip in the dopamine solution, the Au surface appears to be homogeneously covered by polydopamine, with a granular arrangement and small roughness (Fig. 5.S8, left). The wettability of the surface was also assessed via measurement of the contact angle between a water drop and the surface. Contact angle for non-modified Au decreases from 66° to 37° after polydopamine coating, indicating the hydrophilic nature of the polymer.



Figure 5.S8 AFM topography in air using tapping mode (scan size $1x2 \ \mu m^2$). Left) Unmodifed gold surface. A rms (root mean square) roughness value of 0.6 nm for an area of $1x1 \ \mu m^2$ was measured with the NanoScope software. Right) Polydopamine modified-gold. A rms (root mean square) roughness value of 1.9 nm for an area of $1x1 \ \mu m^2$ was measured. This value is small enough to consider the surface still flat.

5.8.5.2 Preparation of DOPC/DC-Chol liposome injection solution

DOPC and DOPC/DC-Chol liposomes were prepared at total lipid concentration of 0.5 mM. All solutions were freshly prepared for SPR experiments.

5.8.5.3 SPR measurements

SPR measurements were carried out with a SR7000 SPR instrument (Reichert Inc., Depew, NY). Gold sensor chips (obtained from Reichert Inc.) were optically coupled to the prism using immersion oil (Cargille type A liquid). A detailed description of the mode of operation of the SPR instrument is reported here ³²². In brief, light from a 15 mW GaAlAs emitter at a wavelength of 780 nm was used to excite surface plasmons in the Kretschmann-type attenuated total reflection configuration. The incident light is then focused through a sapphire prism onto the underside of the sensor chip with an angle distribution of ~21°. The irradiated gold surface area is ~1 mm × 1.5 mm. Light total internally reflected from the gold/solution interface is

detected with a CCD linear array. SR7000 Alpha Instrument software (version 2.24) is used to acquire and transfer data. All experiments were performed at 25 °C. Vesicle buffer was used as the running solution. All the solutions were filtered through a 0.22 μ m filter and the running solution was degassed. The flow rate was set at 8.3 μ L/min during the experiment including vesicle deposition. The polymer was left to equilibrate during 10 min in the running solution before starting experiments. Also, refractive index of pure water, buffer and liposome solutions were measured at room temperature using a refractometer with a wavelength of 589 nm.

5.8.5.4 Vesicles deposition followed by SPR: sensorgram results

SPR experiments were first carried out by flowing the buffer solution (10 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4) followed by a pure water solution injection. A decrease of the SPR signal is observed due to the lower refractive index of pure water solution (n=1.333) compared to the running buffer (n=1.335). After that, the buffer was allowed to flow back again to ensure obtention of a correct baseline before the liposomes solution injection (Figure 5.S9). The lipid vesicles solution (n=1.335) was then allowed to flow across the surface of polydopamine-modified gold.



Figure 5.S9 SPR kinetic profiles of lipid fusion on the polydopamine film with vesicles containing: A) DOPC/DC-Chol (70/30) B) DOPC/DC-Chol (80/20) C) DOPC/DC-Chol (90/10) and D) 100% DOPC.

We observe an increase of the SPR response with time after the injection of the vesicles solution. Because the running buffer and the vesicles solution have the same refractive index (see Table 5.S1), the increase of the SPR response can only be attributed to a mass augmentation due to the adsorption and fusion of the lipid vesicles. The SPR response reaches a plateau. After rinsing with water then buffer, no mass loss is observed, indicating that the supported bilayer is well-anchored to the surface. Finally, the buffer was allowed to flow until the obtention of a final baseline. The difference between the initial and final baselines ($\Delta \theta_{min, exp}$) will be used for the adsorbed layer thickness calculations.

Water	Buffer	DOPC/DC-Chol (70/30) vesicles
1,3329	1,3349	1,3349
1,3329	1,3349	1,3350
1,3330	1,3350	1,3350
1,3330	1,3350	1,3348
1,3329	1,3349	1,3350
1,3329	1,3349	1,3349

Table 5.S1 Refractive index of the solutions used during SPR experiments (measured at 21°C, $\lambda = 589$ nm, the last line corresponds to the average value).

5.8.5.5 Modeling and adsorbed layer thickness calculations

Modeled minimum SPR angle (in degree) for different adsorbed lipid thickness values was generated using the Fresnel multilayer model given in Table 5.S2 and SPR software (Resonant Probes GmbH). Angular reflectivity curves were generated for angles of incidence from 48 to 56° using increments of 0.005°, $\lambda = 780$ nm, and a hemicylindrical prism geometry. Generated minimum SPR angles and modeling equation of the adsorbed layer thickness are given in Fig. 5.S10. The shifts in the minimum pixel recorded were converted to resonance angle changes using the pixel-to-incident angle relation (1 pixel = 0.00506°), provided through calibration of the SR7000 instrument³²³. The adsorbed layer thickness was then determined by dividing $\Delta\theta_{min,exp}$ by the slope (=0.05468) of the modeling equation of the adsorbed layer thickness (Fig. 5.S10).

Table 5.S2	Fresnel	multilayer	modeling
------------	---------	------------	----------

Layer	Label	Thickness (nm)	e'	e''
1	Prism	∞ ⁸	3.1002 ^b	0
2	Cr	1 ^c	-2.0185 ^d	35.755 ^d
3	Au	50 ^e	-23.886 ^e	1.7435 ^e
4	PDA polymer	20 ^f	2.1025 ^g	0
5	Lipid (adsorbed layer)	0 to 10 nm	2.2201 ^h	0
6	Solution	∞ ^a	1.7639 ⁱ	0

^a The prism and liquids are both >1 μ m and thus considered infinitely thick.

^b Dielectric constant from reference³²⁴

^c Nominal thickness given by supplier Reichert Inc. (Depew, NY)

^d Dielectric constant from reference³²⁵

^e Nominal thickness given by supplier Reichert Inc. (Depew, NY)

^f Polydopamine thickness value obtained by ellipsometry²⁸⁷

^g Dielectric constant for polymers (refractive index 1.45²⁸⁸)

^h Dielectric constant for long chain length lipids (refractive index is 1.49³²⁶⁻³²⁸)

 $^{\rm i}$ Water value, relative to air, at 780 nm and 25°C $^{\rm 329}$



Figure 5.S10 Modeling of the minimum SPR angle as a function of the adsorbed lipid layer thickness and equation of the adsorbed layer thickness.



Figure 5.S11 A) SPR spectra of a non-modified gold surface: experimental (black), modeled (red). B) SPR spectra of a modeled polydopamine-modified gold surface before and after deposition of a lipid bilayer, with a 20.0 nm thick polydopamine film (n=1.45) and a 5.0 nm thick DOPC supported layer (n=1.49).

5.8.6 Quartz Crystal Microbalance with Dissipation (QCM-D)

QCM-D experiments were performed at room temperature with a Q-sense D300 system from Q-Sense, BiolinScientific AB (Gothenburg, Sweden) equipped with a gold-coated quartz crystal (fundamental resonance frequency of 5 MHz) and a flow chamber. The quartz crystal was excited at its fundamental resonance frequency and during crystal oscillation, both frequency and dissipation were measured in real-time. The frequency shift is related to the adsorbed mass and change in dissipation to the surface viscoelastic behavior. Data were analysed using the third overtone (n=3).

5.8.6.1 Polydopamine deposition on the QCM-D crystal

The quartz crystal was first treated with a Piranha solution (H_2SO_4/H_2O_2 , 70:30) then heavily rinsed with deionised water and dried under a stream of nitrogen. The sodium phosphate buffer (100 mM, pH 8.5) was allowed to flow at 100 µL/min until a stable baseline was obtained. The chamber was then filled with a dopamine solution (2 mg/mL) and the flow stopped for 4h. The surface was rinsed with the buffer solution and then with deionised water. Finally, lipid buffer solution was allowed to flow before lipid deposition.



Figure 5.S12 A) Frequency shift and B) change in dissipation as a function of time during polydopamine formation.

After injection of the dopamine solution and rinsing, the frequency shifted by 73 Hz (Fig 5.S12) and change in dissipation was observed, thus confirming the formation and the deposition of polydopamine at the crystal surface.

5.8.6.2 Lipid deposition on polydopamine-modified crystal

After a stable baseline with the lipid buffer was obtained, the lipid vesicles solution (0.5 mM) was allowed to flow in the chamber for 1 h at 10 μ L/min, followed by rinsing with the buffer. Results obtained in case of DOPC and DOPC/DC-Chol (70/30) are presented in Fig. 5.S13 and 5.S14 respectively.



Figure 5.S13 A) Frequency shift and B) change in dissipation as a function of time during pure DOPC vesicles fusion on polydopamine.

۴





The surface was rinsed with water then buffer and after this process, no mass loss is observed, indicating that the supported bilayer is well-anchored to the surface.

We also processed the data obtained by SPR and QCM-D experiments to compare the responses of the increasing part of the SPR curve and the decreasing part of the QCM-D curve. These parts of the experimental curves were fitted with an exponential function (Fig. 5.S15 and 5.S16). Both t_1 values were found to be quite identical, confirming that the same phenomenon (vesicle fusion) is observed in QCM-D and in SPR.



Figure 5.S15 SPR (DOPC/DC-Chol 70/30) vesicles fusion : Experimental curve in black and fitted curve in red.



Figure 5.S16 QCM-D (DOPC/DC-Chol 70/30) vesicles fusion : Experimental curve in black and fitted curve in red.

5.8.7 AFM on polydopamine nanopore-spanning lipid bilayers

5.8.7.1 AFM measurements

AFM topography imaging was conducted with a Bruker Dimension Icon microscope equipped with a Nanoscope V controller (Bruker, Santa Barbara, CA, USA). ScanAsyst-Fluid probes from Bruker with a nominal spring constant of ~0.7 N/m and resonance frequencies between 100 and 200 kHz were used. NanoScope Analysis software (Version 1.30) was used for data analysis. All samples were imaged in pure water at room temperature using ScanAsyst mode.

5.8.7.2 AFM imaging results



Figure 5.S17 AFM topography images of the nanoporous alumina filter : A) without modification B) polydopamine-coated C) polydopamine-coated and after DOPC/DC-Chol (70/30) vesicles fusion (scan size $1 \times 1 \mu m^2$).



Figure 5.S18 AFM topography images of DOPC/DC-Chol (70/30) bilayers deposited on PDA-coated nanoporous alumina filter (scan size 500x500 nm²).



Figure 5.S19 Height measurement of one DOPC/DC-Chol (70/30) bilayer. The value was found to be 4.8 nm, which compares well with the thickness of a bilayer.



Figure 5.S10 AFM images of the 55-nm pore sized alumina filter, at each step of modification (above), and 2D fast Fourier Transform of the images (below).

 Table 5.S3
 Results of periodicity values after 2D fast Fourier Transform.

	Periodicity (nm)	
Non modified	67 ± 1	
PDA-coated	62 ± 1	
PDA-coated + DOPC/DC-Chol (70/30) bilayer	139 ± 13	
	N=30	



CONCLUSION

Les bicouches supportées sur coussin de polymère constituent une approche de plus en plus populaire qui tend à remplacer les bicouches supportées sur surface solide en tant que modèle des surfaces cellulaires. La stratégie est basée sur le cousin de polymère en tant qu'interface entre les surfaces inorganiques dures et les bicouches phospholipidiques, matériaux biologiques plus mous et fragiles. Les conclusions portées sur les travaux de cette thèse se divisent en deux parties :

-La préparation des membranes sur surface plane recouverte avec la polydopamine ;

-La préparation des membranes sur filtre nanoporeux recouvert avec la polydopamine.

1- La préparation des membranes sur surface plane recouverte avec la polydopamine

Il est bien important de connaitre les propriétés du polymère, du support et des phospholipides. Par exemple, un mauvais choix du coussin polymérique, comme les films de polyélectrolytes, peuvent donner lieu à un modèle sans intégrité membranaire. Un tel type de polymère peut très bien convenir à la préparation de bicouches zwitterioniques mais s'avérer inefficace pour celles chargées négativement³³⁰, dû au couplage trop important du coussin avec la membrane. De plus, s'assurer des bonnes propriétés mécaniques du polymère est crucial puisqu'une situation où le polymère est aussi dur qu'une surface inorganique reviendrait à préparer les bicouches sur surface solide. En tenant compte du type de membrane que l'on souhaite déposer, il est donc primordial d'évaluer les propriétés physicochimiques et mécaniques du polymère (via sa mouillabilité, sa morphologie et rugosité, son module d'élasticité). Les caractéristiques de la polydopamine ont été repertoriées dans

la littérature^{310,331} à l'aide de méthodes expérimentales variées incluant la technique AFM^{288,332,333}. Nos travaux de caractérisation de la polydopamine complètent les travaux précédents et constituent un apport précieux si l'on souhaite étendre son application à d'autres types de bicouches lipidiques.

Dans les systèmes de bicouches supportées sur coussin polymérique, il n'existe pas de liaison covalente entre le polymère et la bicouche; les forces mises en jeu sont uniquement attractives et répulsives. Cependant, il est difficile de quantifier la contribution de chaque force. Comme illustré dans nos travaux, la formation d'une bicouche complète repose sur l'ajustement de paramètres basés sur des considérations électrostatiques. L'addition de cholestérol chargé positivement dans la composition de la membrane et une fusion de vésicules effectuée à haute force ionique ont permis l'amélioration du recouvrement de la membrane sur la polydopamine et la formation d' une bicouche complète au lieu de patches lipidiques. La stratégie employée a contribué à favoriser les interactions électrostatiques entre les phospholipides et la PDA, participant à stabiliser et protéger la membrane contre les défauts. De plus, nous avons pu déterminer de façon quantitative le pourcentage de surface de polydopamine recouverte par la membrane, avec des valeurs supérieures à 90%, en particulier pour les membranes contenant 20 et 30% de DC-Chol. Enfin la stabilité des membranes sur une semaine a été démontrée par AFM.

La fluidité membranaire est une caractéristique distinctive et cruciale des membranes cellulaires. La capacité des lipides à diffuser sur de longues distances est un bon indicateur de l'intégrité membranaire et cette mobilité joue un rôle dans de nombreux processus cellulaires, y compris la facilitation de la signalisation et l'adhésion cellulaire. La fluidité joue également un rôle important dans la résistance des micro-organismes et des plantes face aux stress de l'environnement extérieur. Les plantes sont, par exemple, capables d'altérer la composition lipidique de leur membrane afin d'en optimiser la fluidité³³⁴. Nous avons démontré dans nos travaux la

capacité de la polydopamine à conserver la mobilité des phospholipides, assurant de ce fait le maintien de la fluidité membranaire. Nos membranes supportées sur un coussin en polydopamine constituent ainsi un système modèle pertinent au regard des membranes biologiques.

2- La préparation des membranes sur filtre nanoporeux recouvert avec la polydopamine

Les résultats issus des travaux de cette partie révèlent que l'obtention de membranes intègres peut également se faire lorsque le coussin de polydopamine n'est pas continu. Nous avons utilisé des filtres en alumine à haute densité de pores (taille des pores de 55 nm) que nous avons recouvert de polydopamine. La transformée de Fourier des images d'AFM nous a permis de calculer qu'un coussin de PDA de 3 nm d'épaisseur en moyenne se formait sur les parois à l'entrée d'un pore. Le support peut alors être décrit comme une série de piliers de polydopamine espacés de 67 nm. Nous avons réussi à former des membranes de DOPC/DC-Chol suspendues, dont la stabilité est assurée par les piliers de polydopamine. La conception d'un tel type de modèle membranaire peut servir pour des tests de criblage à haut débit, dans le cas du test PAMPA employé dans les premiers stade de découverte et développement de médicaments. Nous avons proposé d'améliorer ce test en fournissant un modèle membranaire plus représentatif des membranes naturelles, contrairement aux membranes PAMPA conventionnelles (filtre imprégné d'une solution lipidique dans du n-décane) et la preuve de concept de nos membranes supportées sur PDA a été démontrée pour cette application. Ainsi, nos travaux constituent un premier exemple de formation de bicouches phospholipidiques supportées sur un coussin en polydopamine, dont la fluidité des biomembranes est conservée et qui peuvent se préparer aussi bien sur surface plane que nanoporeuse.

Les avantages de notre système se retrouvent dans les points suivants :

- La formation du film en polydopamine ainsi que la formation de la bicouche s'effectuent par auto-assemblage. Ainsi, aucun équipement spécifique n'est requis, ce qui rend notre méthode facilement reproductible pour du personnel de laboratoire non spécialisé et transférable en industrie. De plus, les films en polydopamine sont extrêmement simples à préparer et adhèrent à un très grand nombre de supports sans nécessiter de modification covalente de la surface de départ, diminuant ainsi le nombre d'étapes dans la fabrication des membranes comparativement à la majorité des méthodes de préparation de bicouches supportées sur coussin polymère.

- La préparation de nos membranes ne nécessite pas le recours aux solvants organiques comme c'est le cas dans d'autres méthodes (chloroforme dans le cas du Langmuir-Blodgett) ou dans les composants-mêmes des membranes (n-décane des membranes PAMPA conventionnelles), ce qui permet de mimer correctement des conditions *in vivo* normales, c'est à dire des bicouches lipidiques hydratées en milieu physiologique (pH 7.4, 150 mM NaCl).

- La reproductibilité et la stabilité (une semaine testée) de nos membranes modèles.

- L'adaptation de nos membranes sur une variété de techniques de caractérisation de surface : imagerie par microscopie de fluorescence et AFM, microbalance à cristal de quartz avec dissipation, résonance de plasmons de surface.

Il reste cependant à approfondir nos tests PAMPA. À ce jour, les tests réalisés avec une cassette de huit médicaments modèles n'ont pas permis d'observer une discrimination satisfaisante entre les molécules; et ceci malgré les efforts d'optimisation apportés (composition de la membrane, choix du filtre, développement d'une méthode de quantification par LC/MS). Cependant, les tests PAMPA n'ont pas encore été réalisés avec les filtres nanoporeux en alumine de 55 nm de taille de pores, qui ont été caractérisés expérimentalement. Il faudrait résoudre leur difficulté d'utilisation car ce type de filtres s'est révélé inadéquat (fragile et cassant) lors de leur emploi avec les cellules de Franz. Leur adaptation sur des plaques multi-puits n'a pas été réalisée. De plus, il serait pertinent de réaliser un PAMPA avec le Jaune Lucifer ou recourir à des mesures de résistance électrique transépithéliale (TEER) pour confirmer l'intégrité des membranes développées.

3- Perspectives

La motivation principale de recourir au coussin polymère dans les membranes supportées réside dans la possibilité d'insérer une protéine transmembranaire sans dénaturer celle-ci, puisqu'on évite le contact direct entre celle-ci et la surface solide. Une prochaine étape dans les expérimentations futures serait d'insérer une protéine telle que OmpF de la bactérie *E. coli* dont la structure et l'activité sont bien caractérisées^{335,336}. On pourrait s'intéresser par exemple aux interactions protéine-lipide ainsi qu'à la mobilité de la protéine dans la membrane.

Il pourrait être envisagé de représenter dans notre modèle d'autres types de membranes, avec des compositions lipidiques plus complexes. Il serait intéressant de former par exemple des membranes constituées d'un mélange ternaire (DOPC/SM/cholestérol par exemple) sur le coussin de polydopamine et voir s'il serait possible de reconstituer des microdomaines (radeaux lipidiques) comme c'est le cas dans les membranes supportées sur mica³³⁷. Observerait-on aussi des séparations de phase en phases liquide désordonnée et liquide ordonnée? Si tel est le cas, les propriétés et le comportement des radeaux sur coussin polymère seraient-elles semblables? Comment interagirait une protéine avec les radeaux dans le cas d'un système supporté sur coussin polymère?

Il est également possible d'envisager l'utilisation de nos membranes dans l'étude du transport d'ions par des mesures électriques (spectroscopie par impédance) ou dans

l'étude de la liaison de molécules d'intérêt à la membrane par détection optique (SPR). En SPR par exemple, étant donné que nos travaux ont démontré la capacité de la polydopamine à maintenir la mobilité des phospholipides, les bicouches supportées sur polydopamine préparées sur une puce de détection pourraient être utilisées comme nouvelle plateforme modèle des biomembranes pour l'évaluation des interactions membrane-médicaments et compléter ainsi les essais PAMPA.

Le développement des membranes micropatternées et des plateformes microfluidiques suscitent un intérêt majeur pour réaliser des tests à large échelle et obtenir une grande quantité de données rapidement. Plusieurs travaux dans ce sens ont été réalisés. Groves *et al.* (1997) furent les premiers à développer des surfaces patternées avec des bicouches lipidiques supportées⁹³. De telles surfaces peuvent être obtenues par photolithographie^{338,339} et impression par microcontact³⁴⁰⁻³⁴². La polydopamine se prête bien à ces méthodes^{310,311,331,343} et des exemples montrent déjà son utilisation en microfluidique^{278,344}. Il pourrait être envisagé de réaliser des surfaces micropatternées de membranes supportées sur coussin de polydopamine et de réaliser un dispositif microfluidique pour tester des interactions protéine-membrane. Ces plateformes seraient utiles en protéomique pour accélérer la découverte de nouveaux médicaments, étant donné que la moitié des cibles sont les protéines associées aux membranes³⁴⁵.

RÉFÉRENCES

- (1) Mouritsen, O. G.; Jørgensen, K. A New Look at Lipid-Membrane Structure in Relation to Drug Research. *Pharm. Res.* **1998**, *15* (10), 1507–1519.
- Scheme of the cell membrane.
 (http://www.lanl.gov/science/1663/august2011/story3full.shtml).
- (3) Sackmann, E. Physical Basis of Self-Organization and Function of Membranes: Physics of Vesicles. In Handbook of Biological Physics; 1995; Vol. 1, pp 213-304.
- (4) Dowhan, W.; Bogdanov, M.; Mileykovskaya, E. Chapter 1 Functional Roles of Lipids in Membranes. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*; 2008; pp 1–37.
- (5) Bowie, J. U. Solving the Membrane Protein Folding Problem. *Nature* 2005, 438 (7068), 581–589.
- (6) van Meer, G.; Voelker, D. R.; Feigenson, G. W. Membrane Lipids: Where They Are and How They Behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2008**, *9* (2), 112–124.
- (7) Sackmann, E. Physical Basis of Self-Organization and Function of Membranes: Physics of Vesicles; 1995; Vol. 1, pp 213-304.
- (8) Singer, S. J.; Nicolson, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. Science 1972, 175 (4023), 720–731.
- (9) Simons, K.; Ikonen, E. Functional Rafts in Cell Membranes. *Nature* **1997**, *387*, 569–572.
- (10) Simons, K.; van Meer, G. Lipid Sorting in Epithelial Cells. *Biochemistry* **1988**, 27, 6197–6202.
- (11) Brown, D. A.; Rose, J. K. Sorting of GPI-Anchored Proteins to Glycolipid-Enriched Membrane Subdomains during Transport to the Apical Cell Surface. *Cell* 1992, 68 (3), 533–544.
- (12) Brown, D. GPI-Anchored Proteins and Detergent-Resistant Membrane Domains. Braz. J. Med. Biol. Res. 1994, 27, 309-315.
- (13) Lipowsky, R.; Sackmann, E. Handbook of Biological Physics; 1995.
- (14) Simons, K.; Sampaio, J. L. Membrane Organization and Lipid Rafts. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2011, 3 (10), a004697-a004697.
- (15) Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. Theory of Self-Assembly of Lipid Bilayers and Vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *470* (2), 185–201.
- (16) Cullis, P. R.; de Kruijff, B. Lipid Polymorphism and the Functional Roles of Lipids in Biological Membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1979, 559 (4), 399– 420.

- (17) Mouritsen, O. G. Life As a Matter of Fat; The Frontiers Collection; Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg, 2005.
- (18) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. Molecular Biology of the Cell, 4th ed.; Garland Science: New York, 2002.
- (19) Mouritsen, O. G. Life as a Matter of Fat. The Emerging Science of Lipidomics; Nature Publishing Group, 2005.
- (20) Holthuis, J. C.; Pomorski, T.; Raggers, R. J.; Sprong, H.; Van Meer, G. The Organizing Potential of Sphingolipids in Intracellular Membrane Transport. *Physiol. Rev.* 2001, 81 (4), 1689–1723.
- (21) Brown, D. A.; London, E. Structure and Function of Sphingolipid- and Cholesterol-Rich Membrane Rafts. J. Biol. Chem. 2000, 275 (23), 17221– 17224.
- (22) Drolle, E.; Kučerka, N.; Hoopes, M. I.; Choi, Y.; Katsaras, J.; Karttunen, M.; Leonenko, Z. Effect of Melatonin and Cholesterol on the Structure of DOPC and DPPC Membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 2013, *1828* (9), 2247–2254.
- (23) Rubenstein, J. L.; Smith, B. a; McConnell, H. M. Lateral Diffusion in Binary Mixtures of Cholesterol and Phosphatidylcholines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* A. 1979, 76 (1), 15–18.
- (24) Filippov, A.; Orädd, G.; Lindblom, G. The Effect of Cholesterol on the Lateral Diffusion of Phospholipids in Oriented Bilayers. *Biophys. J.* 2003, 84 (5), 3079–3086.
- (25) Crane, J. M.; Tamm, L. K. Role of Cholesterol in the Formation and Nature of Lipid Rafts in Planar and Spherical Model Membranes. *Biophys. J.* 2004, 86 (5), 2965–2979.
- (26) Eeman, M.; Deleu, M. From Biological Membranes to Biomimetic Model Membranes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2010, 14 (4), 719–736.
- (27) Janiak, M. J.; Small, D. M.; Shipley, G. G. Temperature and Compositional Dependence of the Structure of Hydrated Dimyristoyl Lecithin. J. Biol. Chem. 1979, 254 (13), 6068–6078.
- (28) Eibl, H. Phospholipids as Functional Constituents of Biomembranes. Angew. Chemie Int. Ed. 1984, 23 (4), 257–271.
- (29) Giocondi, M.-C.; Yamamoto, D.; Lesniewska, E.; Milhiet, P.-E.; Ando, T.; Le Grimellec, C. Surface Topography of Membrane Domains. *Biochim. Biophys.* Acta 2010, 1798 (4), 703-718.
- (30) Israelachvili, J. N. Interactions of Biological Membranes and Structures. In Intermolecular and Surface Forces; Elsevier, 2011; pp 577-616.
- (31) Tristram-Nagle, S.; Zhang, R.; Suter, R. M.; Worthington, C. R.; Sun, W. J.; Nagle, J. F. Measurement of Chain Tilt Angle in Fully Hydrated Bilayers of Gel Phase Lecithins. *Biophys. J.* 1993, 64 (4), 1097–1109.
- (32) Pink, D. A.; Belaya, M.; Levadny, V.; Quinn, B. A Model of Polar Group Statics in Lipid Bilayers and Monolayers. *Langmuir* **1997**, *13* (6), 1701–1711.
- (33) Hauser, H.; Pascher, I.; Pearson, R. H.; Sundell, S. Preferred Conformation and Molecular Packing of Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylcholine.

Biochim. Biophys. Acta 1981, 650 (1), 21-51.

- (34) Simons, K.; Ikonen, E. Functional Rafts in Cell Membranes. Nature 1997, 387 (6633), 569–572.
- (35) Pike, L. J. Rafts Defined: A Report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. J. Lipid Res. 2006, 47, 1597–1598.
- (36) Silvius, J. R. Role of Cholesterol in Lipid Raft Formation: Lessons from Lipid Model Systems. *Biochim. Biophys. Acta* 2003, *1610* (2), 174–183.
- (37) Simons, K.; Ikonen, E. How Cells Handle Cholesterol. Science 2000, 290 (5497), 1721–1726.
- (38) Crane, J. M.; Tamm, L. K. Role of Cholesterol in the Formation and Nature of Lipid Rafts in Planar and Spherical Model Membranes. *Biophys. J.* 2004, 86 (5), 2965–2979.
- (39) Dietrich, C.; Bagatolli, L. A.; Volovyk, Z. N.; Thompson, N. L.; Levi, M.; Jacobson, K.; Gratton, E. Lipid Rafts Reconstituted in Model Membranes. *Biophys. J.* 2001, 80 (3), 1417–1428.
- (40) Lawrence, J. C.; Saslowsky, D. E.; Edwardson, J. M.; Henderson, R. M. Real-Time Analysis of the Effects of Cholesterol on Lipid Raft Behavior Using Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.* 2003, 84 (3), 1827–1832.
- (41) Slotte, J. P. Sphingomyelin-Cholesterol Interactions in Biological and Model Membranes. *Chem. Phys. Lipids* **1999**, *102* (1-2), 13-27.
- (42) Mouritsen, O. G.; Bloom, M. Mattress Model of Lipid-Protein Interactions in Membranes. *Biophys. J.* **1984**, 46 (2), 141–153.
- (43) Almeida, P. F. F.; Pokorny, A.; Hinderliter, A. Thermodynamics of Membrane Domains. *Biochim. Biophys. Acta* 2005, 1720 (1-2), 1–13.
- (44) Bartels, T.; Lankalapalli, R. S.; Bittman, R.; Beyer, K.; Brown, M. F. Raftlike Mixtures of Sphingomyelin and Cholesterol Investigated by Solid-State 2 H NMR Spectroscopy. J. Am. Chem. Soc. 2008, 130 (44), 14521–14532.
- (45) Ziblat, R.; Kjaer, K.; Leiserowitz, L.; Addadi, L. Structure of Cholesterol/Lipid Ordered Domains in Monolayers and Single Hydrated Bilayers. Angew. Chemie Int. Ed. 2009, 48 (47), 8958–8961.
- (46) Shimshick, E. J.; McConnell, H. M. Lateral Phase Separation in Phospholipid Membranes. *Biochemistry* 1973, 12 (12), 2351–2360.
- (47) Papahadjopoulos, D.; Poste, G. Calcium-Induced Phase Separation and Fusion in Phospholipid Membranes. *Biophys. J.* **1975**, *15* (9), 945–948.
- (48) Brown, D. A.; Rose, J. K. Sorting of GPI-Anchored Proteins to Glycolipid-Enriched Membrane Subdomains during Transport to the Apical Cell Surface. *Cell* 1992, 68 (3), 533–544.
- (49) Epand, R. M.; Vuong, P.; Yip, C. M.; Maekawa, S.; Epand, R. F. Cholesterol-Dependent Partitioning of PtdIns(4,5)P2 into Membrane Domains by the N-Terminal Fragment of NAP-22 (neuronal Axonal Myristoylated Membrane Protein of 22 kDa). *Biochem. J.* 2004, 379 (Pt 3), 527–532.
- (50) Binder, W. H.; Barragan, V.; Menger, F. M. Domains and Rafts in Lipid Membranes. Angew. Chemie Int. Ed. 2003, 42 (47), 5802-5827.

- (51) Parton, R. G.; Simons, K. The Multiple Faces of Caveolae. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2007, 8 (3), 185–194.
- (52) Rothberg, K. G. Caveolin, a Protein Component of Caveolae Membrane Coats. *Cell* **1992**, *68*, 673–682.
- (53) Murata, M.; Peränen, J.; Schreiner, R.; Wieland, F.; Kurzchalia, T. V; Simons, K. VIP21/caveolin Is a Cholesterol-Binding Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.* S. A. 1995, 92 (22), 10339–10343.
- (54) Kurzchalia, T. V; Partan, R. G. Membrane Microdomains and Caveolae. Curr. Opin. Cell Biol. 1999, 11 (4), 424–431.
- (55) Parton, R. G. Caveolae--from Ultrastructure to Molecular Mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003, 4, 162–167.
- (56) Rajendran, L.; Simons, K. Lipid Rafts and Membrane Dynamics. J. Cell Sci. 2005, 118, 1099-1102.
- (57) Pike, L. J. Lipid Rafts: Heterogeneity on the High Seas. Biochem. J. 2004, 378 (Pt 2), 281–292.
- (58) Simons, K.; Vaz, W. Model Systems, Lipid Rafts, and Cell Membranes. Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2004, 33, 269–295.
- (59) Jacobson, K.; Mouritsen, O. G.; Anderson, R. G. W. Lipid Rafts: At a Crossroad between Cell Biology and Physics. *Nat. Cell Biol.* 2007, 9 (1), 7–14.
- (60) Engelman, D. M. Membranes Are More Mosaic than Fluid. Nature 2005, 438 (7068), 578–580.
- (61) Goksu, E. I.; Longo, M. L. Ternary Lipid Bilayers Containing Cholesterol in a High Curvature Silica Xerogel Environment. Langmuir 2010, 26 (11), 8614– 8624.
- (62) Veatch, S. L.; Keller, S. L. Separation of Liquid Phases in Giant Vesicles of Ternary Mixtures of Phospholipids and Cholesterol. *Biophys. J.* 2003, 85 (5), 3074–3083.
- (63) Heberle, F. A.; Wu, J.; Goh, S. L.; Petruzielo, R. S.; Feigenson, G. W. Comparison of Three Ternary Lipid Bilayer Mixtures: FRET and ESR Reveal Nanodomains. *Biophys. J.* 2010, 99 (10), 3309–3318.
- (64) Feigenson, G. W. Phase Diagrams and Lipid Domains in Multicomponent Lipid Bilayer Mixtures. *Biochim. Biophys. Acta* 2009, 1788 (1), 47-52.
- (65) Hjort Ipsen, J.; Karlström, G.; Mourtisen, O. G.; Wennerström, H.; Zuckermann, M. J. Phase Equilibria in the Phosphatidylcholine-Cholesterol System. *Biochim. Biophys. Acta* 1987, 905 (1), 162–172.
- (66) Sankaram, M. B.; Thompson, T. E. Modulation of Phospholipid Acyl Chain Order by Cholesterol. A Solid-State 2H Nuclear Magnetic Resonance Study. *Biochemistry* 1990, 29 (47), 10676–10684.
- (67) Pike, L. J. The Challenge of Lipid Rafts. J. Lipid Res. 2009, 50 Suppl, S323– S328.
- (68) Goñi, F. M.; Alonso, A.; Bagatolli, L. A.; Brown, R. E.; Marsh, D.; Prieto, M.; Thewalt, J. L. Phase Diagrams of Lipid Mixtures Relevant to the Study of Membrane Rafts. *Biochim. Biophys. Acta 1781* (11-12), 665–684.

- (69) Munro, S. Lipid Rafts: Elusive or Illusive? Cell 2003, 115, 377-388.
- (70) Edidin, M. The State of Lipid Rafts: From Model Membranes to Cells. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2003, 32, 257–283.
- (71) Shaw, A. S. Lipid Rafts: Now You See Them, Now You Don't. Nat. Immunol. 2006, 7 (11), 1139–1142.
- (72) de Almeida, R. F.; Loura, L.; Fedorov, A.; Prieto, M. Lipid Rafts Have Different Sizes Depending on Membrane Composition: A Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer Study. J. Mol. Biol. 2005, 346, 1109–1120.
- (73) Kusumi, A.; Koyama-Honda, I.; Suzuki, K. Molecular Dynamics and Interactions for Creation of Stimulation-Induced Stabilized Rafts from Small Unstable Steady-State Rafts. *Traffic* 2004, 5 (4), 213–230.
- (74) Brameshuber, M.; Weghuber, J.; Ruprecht, V.; Gombos, I.; Horvath, I.; Vigh, L.; Eckerstorfer, P.; Kiss, E.; Stockinger, H.; Schutz, G. J. Imaging of Mobile Long-Lived Nanoplatforms in the Live Cell Plasma Membrane. J. Biol. Chem. 2010, 285 (53), 41765–41771.
- (75) Lingwood, D.; Kaiser, H.-J.; Levental, I.; Simons, K. Lipid Rafts as Functional Heterogeneity in Cell Membranes. *Biochem. Soc. Trans.* 2009, 37 (5), 955– 960.
- (76) Lingwood, D.; Simons, K. Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. Science 2010, 327 (5961), 46–50.
- (77) Simons, K.; Toomre, D. Lipid Rafts and Signal Transduction. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2000, 1, 31-39.
- (78) Hanzal-Bayer, M. F.; Hancock, J. F. Lipid Rafts and Membrane Traffic. FEBS Lett. 2007, 581 (11), 2098–2104.
- (79) Parton, R. G.; Richards, A. A. Lipid Rafts and Caveolae as Portals for Endocytosis: New Insights and Common Mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003, 4 (11), 724–738.
- (80) Takeda, M.; Leser, G. P.; Russell, C. J.; Lamb, R. A. Influenza Virus Hemagglutinin Concentrates in Lipid Raft Microdomains for Efficient Viral Fusion. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2003, 100 (25), 14610–14617.
- (81) Aloia, R. C.; Tian, H.; Jensen, F. C. Lipid Composition and Fluidity of the Human Immunodeficiency Virus Envelope and Host Cell Plasma Membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993, 90 (11), 5181–5185.
- (82) Warschawski, D. E.; Arnold, A. A.; Beaugrand, M.; Gravel, A.; Chartrand, É.; Marcotte, I. Choosing Membrane Mimetics for NMR Structural Studies of Transmembrane Proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 2011, 1808 (8), 1957–1974.
- (83) Dufrêne, Y. F.; Lee, G. U. Advances in the Characterization of Supported Lipid Films with the Atomic Force Microscope. *Biochim. Biophys. Acta* 2000, 1509 (1-2), 14–41.
- (84) Richter, R.; Mukhopadhyay, A.; Brisson, A. Pathways of Lipid Vesicle Deposition on Solid Surfaces: A Combined QCM-D and AFM Study. *Biophys.* J. 2003, 85 (5), 3035–3047.

- (85) Richter, R. P.; Brisson, A. R. Following the Formation of Supported Lipid Bilayers on Mica: A Study Combining AFM, QCM-D, and Ellipsometry. *Biophys. J.* 2005, 88 (5), 3422–3433.
- (86) Gözen, I.; Jesorka, A. Instrumental Methods to Characterize Molecular Phospholipid Films on Solid Supports. Anal. Chem. 2012, 84 (2), 822–838.
- (87) Langmuir, I. The Shapes of Group Molecules Forming the Surfaces of Liquids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1917**, *3* (4), 251–257.
- (88) Gorter, E.; Grendel, F. On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood. J. Exp. Med. 1925, 41 (4), 439–443.
- (89) Blodgett, K.; Langmuir, I. Built-Up Films of Barium Stearate and Their Optical Properties. *Phys. Rev.* **1937**, *51* (11), 964–982.
- (90) Marsh, D. Lateral Pressure in Membranes. Biochim. Biophys. Acta 1996, 1286
 (3), 183-223.
- (91) Tamm, L. K.; McConnell, H. M. Supported Phospholipid Bilayers. *Biophys. J.* 1985, 47 (1), 105–113.
- (92) Brian, A. A.; McConnell, H. M. Allogeneic Stimulation of Cytotoxic T Cells by Supported Planar Membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1984, 81 (19), 6159–6163.
- (93) Groves, J. T.; Ulman, N.; Boxer, S. G. Micropatterning Fluid Lipid Bilayers on Solid Supports. Science 1997, 275 (5300), 651–653.
- (94) Bayerl, T. M.; Bloom, M. Physical Properties of Single Phospholipid Bilayers Adsorbed to Micro Glass Beads. *Biophys. J.* 1990, 58, 357–362.
- (95) Koenig, B. W.; Krueger, S.; Orts, W. J.; Majkrzak, C. F.; Berk, N. F.; Silverton, J. V; Gawrisch, K. Neutron Reflectivity and Atomic Force Microscopy Studies of a Lipid Bilayer in Water Adsorbed to the Surface of a Silicon Single Crystal. *Langmuir* 1996, 12, 1343–1350.
- (96) Johnson, S. J.; Bayerl, T. M.; McDermott, D. C.; Adam, G. W.; Rennie, A. R.; Thomas, R. K.; Sackmann, E. Structure of an Adsorbed Dimyristoylphosphatidylcholine Bilayer Measured with Specular Reflection of Neutrons. *Biophys. J.* 1991, 59 (2), 289–294.
- (97) Kiessling, V.; Tamm, L. K. Measuring Distances in Supported Bilayers by Fluorescence Interference-Contrast Microscopy: Polymer Supports and SNARE Proteins. *Biophys. J.* 2003, 84 (1), 408–418.
- (98) McConnell, H. M.; Watts, T. H.; Weis, R. M.; Brian, A. A. Supported Planar Membranes in Studies of Cell-Cell Recognition in the Immune System. *Biochim. Biophys. Acta* 1986, 864 (1), 95–106.
- (99) Castellana, E. T.; Cremer, P. S. Solid Supported Lipid Bilayers: From Biophysical Studies to Sensor Design. Surf. Sci. Rep. 2006, 61 (10), 429–444.
- (100) Tien, H. T.; Ottova, A. L. Supported Planar Lipid Bilayers (s-BLMs) as Electrochemical Biosensors. *Electrochim. Acta* **1998**, *43* (23), 3587–3610.
- (101) Zasadzinski, J. A.; Helm, C. A.; Longo, M. L.; Weisenhorn, A. L.; Gould, S. A.; Hansma, P. K. Atomic Force Microscopy of Hydrated Phosphatidylethanolamine Bilayers. *Biophys. J.* 1991, 59 (3), 755-760.

- (102) Attwood, S. J.; Choi, Y.; Leonenko, Z. Preparation of DOPC and DPPC Supported Planar Lipid Bilayers for Atomic Force Microscopy and Atomic Force Spectroscopy. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14 (2), 3514–3539.
- (103) Cremer, P. S.; Boxer, S. G. Formation and Spreading of Lipid Bilayers on Planar Glass Supports. J. Phys. Chem. B 1999, 103 (13), 2554–2559.
- (104) Schönherr, H.; Johnson, J. M.; Lenz, P.; Frank, C. W.; Boxer, S. G. Vesicle Adsorption and Lipid Bilayer Formation on Glass Studied by Atomic Force Microscopy. *Langmuir* 2004, 20, 11600–11606.
- (105) Sackmann, E. Supported Membranes: Scientific and Practical Applications. Science 1996, 271 (5245), 43-48.
- (106) Reimhult, E.; Zäch, M.; Höök, F.; Kasemo, B. A Multitechnique Study of Liposome Adsorption on Au and Lipid Bilayer Formation on SiO₂. Langmuir 2006, 22 (7), 3313–3319.
- (107) Starr, T. E.; Thompson, N. L. Formation and Characterization of Planar Phospholipid Bilayers Supported on TiO₂ and SrTiO₃ Single Crystals. *Langmuir* 2000, 16 (26), 10301–10308.
- (108) Girard-Egrot, A. P.; Blum, L. J. Langmuir-Blodgett Technique for Synthesis of Biomimetic Lipid Membranes. In Nanobiotechnology of Biomimetic Membranes; Springer US: Boston, MA; pp 23-74.
- (109) Liu, J.; Conboy, J. C. Structure of a Gel Phase Lipid Bilayer Prepared by the Langmuir-Blodgett/Langmuir-Schaefer Method Characterized by Sum-Frequency Vibrational Spectroscopy. Langmuir 2005, 21 (20), 9091–9097.
- (110) Hardy, G. J.; Nayak, R.; Zauscher, S. Model Cell Membranes: Techniques to Form Complex Biomimetic Supported Lipid Bilayers via Vesicle Fusion. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2013, 18 (5), 448–458.
- (111) Cha, T.; Guo, A.; Zhu, X.-Y. Formation of Supported Phospholipid Bilayers on Molecular Surfaces: Role of Surface Charge Density and Electrostatic Interaction. *Biophys. J.* 2006, 90 (4), 1270–1274.
- (112) Johnson, J. M.; Ha, T.; Chu, S.; Boxer, S. G. Early Steps of Supported Bilayer Formation Probed by Single Vesicle Fluorescence Assays. *Biophys. J.* 2002, 83 (6), 3371–3379.
- (113) Richter, R. P.; Bérat, R.; Brisson, A. R. Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View. Langmuir 2006, 22 (8), 3497–3505.
- (114) Seantier, B.; Kasemo, B. Influence of Mono- and Divalent Ions on the Formation of Supported Phospholipid Bilayers via Vesicle Adsorption. *Langmuir* 2009, 25 (10), 5767–5772.
- (115) Lind, T. K.; Cárdenas, M.; Wacklin, H. P. Formation of Supported Lipid Bilayers by Vesicle Fusion: Effect of Deposition Temperature. *Langmuir* 2014, 30 (25), 7259–7263.
- (116) Murray, D. H.; Tamm, L. K.; Kiessling, V. Supported Double Membranes. J. Struct. Biol. 2009, 168 (1), 183–189.
- (117) Groves, J. T.; Ulman, N.; Cremer, P. S.; Boxer, S. G. Substrate-Membrane Interactions: Mechanisms for Imposing Patterns on a Fluid Bilayer Membrane.

Langmuir 1998, 14 (12), 3347-3350.

- (118) Scomparin, C.; Lecuyer, S.; Ferreira, M.; Charitat, T.; Tinland, B. Diffusion in Supported Lipid Bilayers: Influence of Substrate and Preparation Technique on the Internal Dynamics. *Eur. Phys. J. E* 2009, 28 (2), 211–220.
- (119) Richter, R. P.; Maury, N.; Brisson, A. R. On the Effect of the Solid Support on the Interleaflet Distribution of Lipids in Supported Lipid Bilayers. *Langmuir* 2005, 21 (1), 299–304.
- (120) Hetzer, M.; Heinz, S.; Grage, S.; Bayerl, T. M. Asymmetric Molecular Friction in Supported Phospholipid Bilayers Revealed by NMR Measurements of Lipid Diffusion. *Langmuir* 1998, 14 (5), 982–984.
- (121) Spinke, J.; Yang, J.; Wolf, H.; Liley, M.; Ringsdorf, H.; Knoll, W. Polymer-Supported Bilayer on a Solid Substrate. *Biophys. J.* **1992**, *63* (6), 1667–1671.
- (122) Sackmann, E.; Tanaka, M. Supported Membranes on Soft Polymer Cushions: Fabrication, Characterization and Applications. *Trends Biotechnol.* 2000, 18 (2), 58-64.
- (123) Tanaka, M.; Sackmann, E. Polymer-Supported Membranes as Models of the Cell Surface. *Nature* 2005, 437 (7059), 656–663.
- (124) Tanaka, M. Polymer-Supported Membranes: Physical Models of Cell Surfaces. MRS Bull. 2006, 31 (07), 513–520.
- (125) Wagner, M. L.; Tamm, L. K. Tethered Polymer-Supported Planar Lipid Bilayers for Reconstitution of Integral Membrane Proteins: Silane-Polyethyleneglycol-Lipid as a Cushion and Covalent Linker. *Biophys. J.* 2000, 79 (3), 1400-1414.
- (126) Knoll, W.; Frank, C. W.; Heibel, C.; Naumann, R.; Offenhäusser, A.; Rühe, J.; Schmidt, E. K.; Shen, W. W.; Sinner, A. Functional Tethered Lipid Bilayers. *Rev. Mol. Biotechnol.* 2000, 74 (3), 137–158.
- (127) Jacobson, K.; Sheets, E.; Simson, R. Revisiting the Fluid Mosaic Model of Membranes. Science 1995, 268 (5216), 1441–1442.
- (128) Tanaka, M.; Rossetti, F. F.; Kaufmann, S. Native Supported Membranes: Creation of Two-Dimensional Cell Membranes on Polymer Supports (Review). *Biointerphases* 2008, 3 (2), FA12.
- (129) Nissen, J.; Gritsch, S.; Wiegand, G.; Rädler, J. O. Wetting of Phospholipid Membranes on Hydrophilic Surfaces - Concepts towards Self-Healing Membranes. *Eur. Phys. J. B* 1999, 10 (2), 335-344.
- (130) Raedler, J.; Strey, H.; Sackmann, E. Phenomenology and Kinetics of Lipid Bilayer Spreading on Hydrophilic Surfaces. *Langmuir* 1995, 11 (11), 4539– 4548.
- (131) Elender, G.; Sackmann, E. Wetting and Dewetting of Si/SiO₂ -Wafers by Free and Lipidmonolayer Covered Aqueous Solutions under Controlled Humidity. J. Phys. II 1994, 4 (3), 455–479.
- (132) Tanaka, M.; Rehfeldt, F.; Schneider, M. F.; Mathe, G.; Albersdörfer, A.; Neumaier, K. R.; Purrucker, O.; Sackmann, E. Wetting and Dewetting of Extracellular Matrix and Glycocalix Models. J. Phys. Condens. Matter 2005,

17 (9), S649–S663.

- (133) Rios, P. F.; Dodiuk, H.; Kenig, S.; McCarthy, S.; Dotan, A. The Effect of Polymer Surface on the Wetting and Adhesion of Liquid Systems. J. Adhes. Sci. Technol. 2007, 21 (3-4), 227–241.
- (134) Beyer, D.; Elender, G.; Knoll, W.; Kühner, M.; Maus, S.; Ringsdorf, H.; Sackmann, E. Influence of Anchor Lipids on the Homogeneity and Mobility of Lipid Bilayers on Thin Polymer Films. Angew. Chem. Int. Ed. 1996, 35 (15), 1682–1685.
- (135) Baumgart, T.; Offenhäusser, A. Polysaccharide-Supported Planar Bilayer Lipid Model Membranes. *Langmuir* 2003, 19 (5), 1730–1737.
- (136) Kühner, M.; Tampé, R.; Sackmann, E. Lipid Mono- and Bilayer Supported on Polymer Films: Composite Polymer-Lipid Films on Solid Substrates. *Biophys.* J. 1994, 67 (1), 217–226.
- (137) Smith, E. A.; Coym, J. W.; Cowell, S. M.; Tokimoto, T.; Hruby, V. J.; Yamamura, H. I.; Wirth, M. J. Lipid Bilayers on Polyacrylamide Brushes for Inclusion of Membrane Proteins. *Langmuir* 2005, 21 (21), 9644–9650.
- (138) El-khouri, R. J.; Bricarello, D. A.; Watkins, E. B.; Kim, C. Y.; Miller, C. E.; Patten, T. E.; Parikh, A. N.; Kuhl, T. L. pH Responsive Polymer Cushions for Probing Membrane Environment Interactions. *Nano Lett.* 2011, 11, 2169– 2172.
- (139) Wang, T.; Li, D.; Lu, X.; Khmaladze, A.; Han, X.; Ye, S.; Yang, P.; Xue, G.; He, N.; Chen, Z. Single Lipid Bilayers Constructed on Polymer Cushion Studied by Sum Frequency Generation Vibrational Spectroscopy. J. Phys. Chem. C. Nanomater. Interfaces 2011, 115 (15), 7613-7620.
- (140) Mulligan, K.; Jakubek, Z. J.; Johnston, L. J. Supported Lipid Bilayers on Biocompatible Polysaccharide Multilayers. *Langmuir* **2011**, 27, 14352–14359.
- (141) Majewski, J.; Wong, J. Y.; Park, C. K.; Seitz, M.; Israelachvili, J. N.; Smith, G. S. Structural Studies of Polymer-Cushioned Lipid Bilayers. *Biophys. J.* 1998, 75 (5), 2363-2367.
- (142) Wong, J. Y.; Majewski, J.; Seitz, M.; Park, C. K.; Israelachvili, J. N.; Smith, G. S. Polymer-Cushioned Bilayers. I. A Structural Study of Various Preparation Methods Using Neutron Reflectometry. *Biophys. J.* 1999, 77 (3), 1445–1457.
- (143) Wong, J. Y.; Park, C. K.; Seitz, M.; Israelachvili, J. Polymer-Cushioned Bilayers. II. An Investigation of Interaction Forces and Fusion Using the Surface Forces Apparatus. *Biophys. J.* 1999, 77 (3), 1458–1468.
- (144) Zhang, L.; Longo, M. L.; Stroeve, P. Mobile Phospholipid Bilayers Supported on a Polyion/Alkylthiol Layer Pair. *Langmuir* **2000**, *16* (11), 5093–5099.
- (145) Zhang, L.; Booth, C. A.; Stroeve, P. Phosphatidylserine/Cholesterol Bilayers Supported on a Polycation/Alkylthiol Layer Pair. J. Colloid Interface Sci. 2000, 228 (1), 82–89.
- (146) Sigl, H.; Brink, G.; Seufert, M.; Schulz, M.; Wegner, G.; Sackmann, E. Assembly of Polymer/lipid Composite Films on Solids Based on Hairy Rod
LB-Films. Eur. Biophys. J. 1997, 25 (4), 249-259.

- (147) Goennenwein, S.; Tanaka, M.; Hu, B.; Moroder, L.; Sackmann, E. Functional Incorporation of Integrins into Solid Supported Membranes on Ultrathin Films of Cellulose: Impact on Adhesion. *Biophys. J.* 2003, 85 (1), 646–655.
- (148) Yuan, H.; Leitmannova-Ottova, A.; Tien, H. T. An Agarose-Stabilized BLM: A New Method for Forming Bilayer Lipid Membranes. *Mater. Sci. Eng. C* 1996, 4 (1), 35–38.
- (149) Lu, X.; Leitmannova-Ottova, A.; Tien, H. T. Biophysical Aspects of Agar-Gel Supported Bilayer Lipid Nembranes: A New Method for Forming and Studying Planar Bilayer Lipid Membranes. *Bioelectrochemistry Bioenerg.* 1996, 39 (2), 285-289.
- (150) Sterling, S. M.; Allgeyer, E. S.; Fick, J.; Prudovsky, I.; Mason, M. D.; Neivandt, D. J. Phospholipid Diffusion Coefficients of Cushioned Model Membranes Determined via Z-Scan Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Langmuir* 2013, 29 (25), 7966–7974.
- (151) Renner, L.; Osaki, T.; Chiantia, S.; Schwille, P.; Pompe, T.; Werner, C. Supported Lipid Bilayers on Spacious and pH-Responsive Polymer Cushions with Varied Hydrophilicity. J. Phys. Chem. B 2008, 112 (20), 6373-6378.
- (152) Mueller, P.; Rudin, D. O.; Ti Tien, H.; Wescott, W. C. Reconstitution of Cell Membrane Structure in Vitro and Its Transformation into an Excitable System. *Nature* 1962, 194 (4832), 979–980.
- (153) Mueller, P.; Rudin, D. O.; Tien, H. T.; Wescott, W. C. Methods for the Formation of Single Bimolecular Lipid Membranes in Aqueous Solution. J. Phys. Chem. 1963, 67 (2), 534–535.
- (154) Mueller, P.; Rudin, D. O. Action Potential Phenomena in Experimental Bimolecular Lipid Membranes. *Nature* 1967, 213 (5076), 603–604.
- (155) Montal, M.; Mueller, P. Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of Their Electrical Properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U. S. A. 1972, 69 (12), 3561–3566.
- (156) Tien, H. T.; Ottova, A. L. Membrane Biophysics: As Viewed from Experimental Lipid Membranes (Planar Lipid Bilayers and Spherical Liposomes); Elsevier Science B.V.: Amsterdam, 2000.
- (157) Winterhalter, M. Black Lipid Membranes. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2000, 5 (3-4), 250–255.
- (158) Jain, M. K.; Strickholm, A.; Cordes, E. H. Reconstitution of an ATP-Mediated Active Transport System across Black Lipid Membranes. *Nature* 1969, 222 (5196), 871-872.
- (159) Jain, M. K.; Strickholm, A.; White, F. P.; Cordes, E. H. Electronic Conduction across a Black Lipid Membrane. *Nature* **1970**, 227 (5259), 705–707.
- (160) Schmidt, C.; Mayer, M.; Vogel, H. A Chip-Based Biosensor for the Functional Analysis of Single Ion Channels. Angew. Chemie Int. Ed. 2000, 112 (17), 3267-3270.
- (161) Needham, D. Lipid Structures: A Brief History of Multisomes. Nat.

Nanotechnol. 2011, 6 (12), 761-762.

- (162) Benz, R.; Fröhlich, O.; Läuger, P.; Montal, M. Electrical Capacity of Black Lipid Films and of Lipid Bilayers Made from Monolayers. *Biochim. Biophys.* Acta 1975, 394 (3), 323–334.
- (163) Heitz, B. A.; Xu, J.; Jones, I. W.; Keogh, J. P.; Comi, T. J.; Hall, H. K.; Aspinwall, C. A.; Saavedra, S. S. Polymerized Planar Suspended Lipid Bilayers for Single Ion Channel Recordings: Comparison of Several Dienoyl Lipids. Langmuir 2011, 27 (5), 1882–1890.
- (164) Friddin, M. S.; Smithers, N. P.; Beaugrand, M.; Marcotte, I.; Williamson, P. T.
 F.; Morgan, H.; de Planque, M. R. R. Single-Channel Electrophysiology of Cell-Free Expressed Ion Channels by Direct Incorporation in Lipid Bilayers. *Analyst* 2013, 138 (24), 7294.
- (165) Weiß, K.; Neef, A.; Van, Q.; Kramer, S.; Gregor, I.; Enderlein, J. Quantifying the Diffusion of Membrane Proteins and Peptides in Black Lipid Membranes with 2-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biophys. J.* 2013, 105 (2), 455–462.
- (166) Mensch, J.; Melis, A.; Mackie, C.; Verreck, G.; Brewster, M. E.; Augustijns, P. Evaluation of Various PAMPA Models to Identify the Most Discriminating Method for the Prediction of BBB Permeability. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2010, 74 (3), 495–502.
- (167) White, R. J.; Ervin, E. N.; Yang, T.; Chen, X.; Daniel, S.; Cremer, P. S.; White, H. S. Single Ion-Channel Recordings Using Glass Nanopore Membranes. J. Am. Chem. Soc. 2007, 129 (38), 11766–11775.
- (168) Heitz, B. A.; Xu, J.; Hall, H. K.; Aspinwall, C. A.; Saavedra, S. S. Enhanced Long-Term Stability for Single Ion Channel Recordings Using Suspended Poly(lipid) Bilayers. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131 (19), 6662-6663.
- (169) Reimhult, E.; Kumar, K. Membrane Biosensor Platforms Using Nano- and Microporous Supports. *Trends Biotechnol.* 2008, 26 (2), 82–89.
- (170) Simon, A.; Girard-Egrot, A.; Sauter, F.; Pudda, C.; Picollet D'Hahan, N.; Blum, L.; Chatelain, F.; Fuchs, A. Formation and Stability of a Suspended Biomimetic Lipid Bilayer on Silicon Submicrometer-Sized Pores. J. Colloid Interface Sci. 2007, 308 (2), 337–343.
- (171) White, R. J.; Zhang, B.; Daniel, S.; Tang, J. M.; Ervin, E. N.; Cremer, P. S.; White, H. S. Ionic Conductivity of the Aqueous Layer Separating a Lipid Bilayer Membrane and a Glass Support. *Langmuir* 2006, 22 (25), 10777– 10783.
- (172) Pantoja, R.; Sigg, D.; Blunck, R.; Bezanilla, F.; Heath, J. R. Bilayer Reconstitution of Voltage-Dependent Ion Channels Using a Microfabricated Silicon Chip. *Biophys. J.* **2001**, *81* (4), 2389–2394.
- (173) Malmstadt, N.; Nash, M. A.; Purnell, R. F.; Schmidt, J. J. Automated Formation of Lipid-Bilayer Membranes in a Microfluidic Device. *Nano Lett.* 2006, 6 (9), 1961–1965.
- (174) Kocun, M.; Lazzara, T. D.; Steinem, C.; Janshoff, A. Preparation of Solvent-

Free, Pore-Spanning Lipid Bilayers: Modeling the Low Tension of Plasma Membranes. *Langmuir* **2011**, 27 (12), 7672–7680.

- (175) Hennesthal, C.; Steinem, C. Pore-Spanning Lipid Bilayers Visualized by Scanning Force Microscopy. J. Am. Chem. Soc. 2000, 122 (33), 8085–8086.
- (176) Hennesthal, C.; Drexler, J.; Steinem, C. Membrane-Suspended Nanocompartments Based on Ordered Pores in Alumina. *Chemphyschem* 2002, 3 (10), 885–889.
- (177) Römer, W.; Steinem, C. Impedance Analysis and Single-Channel Recordings on Nano-Black Lipid Membranes Based on Porous Alumina. *Biophys. J.* 2004, 86 (2), 955–965.
- (178) Römer, W.; Lam, Y. H.; Fischer, D.; Watts, A.; Fischer, W. B.; Göring, P.; Wehrspohn, R. B.; Gösele, U.; Steinem, C. Channel Activity of a Viral Transmembrane Peptide in Micro-BLMs: Vpu(1-32) from HIV-1. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126 (49), 16267-16274.
- (179) Weiskopf, D.; Schmitt, E. K.; Klühr, M. H.; Dertinger, S. K.; Steinem, C. Micro-BLMs on Highly Ordered Porous Silicon Substrates: Rupture Process and Lateral Mobility. *Langmuir* 2007, 23 (18), 9134–9139.
- (180) Schmitt, E. K.; Vrouenraets, M.; Steinem, C. Channel Activity of OmpF Monitored in Nano-BLMs. *Biophys. J.* 2006, 91 (6), 2163–2171.
- (181) Steltenkamp, S.; Müller, M. M.; Deserno, M.; Hennesthal, C.; Steinem, C.; Janshoff, A. Mechanical Properties of Pore-Spanning Lipid Bilayers Probed by Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.* 2006, *91* (1), 217–226.
- (182) Lorenz, B.; Mey, I.; Steltenkamp, S.; Fine, T.; Rommel, C.; Müller, M. M.; Maiwald, A.; Wegener, J.; Steinem, C.; Janshoff, A. Elasticity Mapping of Pore-Suspending Native Cell Membranes. *Small* **2009**, *5* (7), 832–838.
- (183) Mey, I.; Stephan, M.; Schmitt, E. K.; Müller, M. M.; Ben Amar, M.; Steinem, C.; Janshoff, A. Local Membrane Mechanics of Pore-Spanning Bilayers. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131 (20), 7031–7039.
- (184) Lazzara, T. D.; Carnarius, C.; Kocun, M.; Janshoff, A.; Steinem, C. Separating Attoliter-Sized Compartments Using Fluid Pore-Spanning Lipid Bilayers. ACS Nano 2011, 5 (9), 6935–6944.
- (185) Neubacher, H.; Mey, I.; Carnarius, C.; Lazzara, T. D.; Steinem, C. Permeabilization Assay for Antimicrobial Peptides Based on Pore-Spanning Lipid Membranes on Nanoporous Alumina. *Langmuir* 2014, 30 (16), 4767– 4774.
- (186) Studer, A.; Han, X.; Winkler, F. K.; Tiefenauer, L. X. Formation of Individual Protein Channels in Lipid Bilayers Suspended in Nanopores. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 2009, 73 (2), 325–331.
- (187) Korman, C. E.; Megens, M.; Ajo-Franklin, C. M.; Horsley, D. A. Nanopore-Spanning Lipid Bilayers on Silicon Nitride Membranes That Seal and Selectively Transport Ions. *Langmuir* 2013, 29 (14), 4421–4425.
- (188) Oshima, A.; Hirano-Iwata, A.; Mozumi, H.; Ishinari, Y.; Kimura, Y.; Niwano, M. Reconstitution of Human Ether-a-Go-Go-Related Gene Channels in

Microfabricated Silicon Chips. Anal. Chem. 2013, 85 (9), 4363-4369.

- (189) Favero, G.; D'Annibale, A.; Campanella, L.; Santucci, R.; Ferri, T. Membrane Supported Bilayer Lipid Membranes Array: Preparation, Stability and Ion-Channel Insertion. Anal. Chim. Acta 2002, 460 (1), 23–34.
- (190) Favero, G.; Campanella, L.; D'Annibale, A.; Santucci, R.; Ferri, T. Mixed Hybrid Bilayer Lipid Membrane Incorporating Valinomycin: Improvements in Preparation and Functioning. *Microchem. J.* 2003, 74 (2), 141–148.
- (191) Favero, G.; Campanella, L.; Cavallo, S.; D'Annibale, A.; Perrella, M.; Mattei, E.; Ferri, T. Glutamate Receptor Incorporated in a Mixed Hybrid Bilayer Lipid Membrane Array, as a Sensing Element of a Biosensor Working under Flowing Conditions. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127 (22), 8103–8111.
- (192) Schuster, B.; Weigert, S.; Pum, D.; Sára, M.; Sleytr, U. B. New Method for Generating Tetraether Lipid Membranes on Porous Supports. *Langmuir* 2003, 19 (6), 2392–2397.
- (193) Gufler, P. C.; Pum, D.; Sleytr, U. B.; Schuster, B. Highly Robust Lipid Membranes on Crystalline S-Layer Supports Investigated by Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 2004, *1661* (2), 154–165.
- (194) Schuster, B.; Pum, D.; Sleytr, U. B. S-Layer Stabilized Lipid Membranes (Review). *Biointerphases* 2008, 3 (2), FA3.
- (195) Han, X.; Studer, A.; Sehr, H.; Geissbühler, I.; Di Berardino, M.; Winkler, F. K.; Tiefenauer, L. X. Nanopore Arrays for Stable and Functional Free-Standing Lipid Bilayers. Adv. Mater. 2007, 19 (24), 4466–4470.
- (196) Burns, J. R.; Stulz, E.; Howorka, S. Self-Assembled DNA Nanopores That Span Lipid Bilayers. *Nano Lett.* 2013, 13 (6), 2351–2356.
- (197) Seifert, A.; Göpfrich, K.; Burns, J. R.; Fertig, N.; Keyser, U. F.; Howorka, S. Bilayer-Spanning DNA Nanopores with Voltage-Switching between Open and Closed State. ACS Nano 2014.
- (198) Sugihara, K.; Vörös, J.; Zambelli, T. A Gigaseal Obtained with a Self-Assembled Long-Lifetime Lipid Bilayer on a Single Polyelectrolyte Multilayer-Filled Nanopore. ACS Nano 2010, 4 (9), 5047-5054.
- (199) de Groot, G. W.; Demarche, S.; Santonicola, M. G.; Tiefenauer, L.; Vancso, G. J. Smart Polymer Brush Nanostructures Guide the Self-Assembly of Pore-Spanning Lipid Bilayers with Integrated Membrane Proteins. *Nanoscale* 2014, 6 (4), 2228–2237.
- (200) Kansy, M.; Senner, F.; Gubernator, K. Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes. J. Med. Chem. **1998**, 41 (7), 1007–1010.
- (201) Avdeef, A.; Strafford, M.; Block, E.; Balogh, M. P.; Chambliss, W.; Khan, I. Drug Absorption in Vitro Model: Filter-Immobilized Artificial Membranes. 2. Studies of the Permeability Properties of Lactones in Piper Methysticum Forst. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2001, 14 (4), 271–280.
- (202) Hämäläinen, M. D.; Frostell-Karlsson, A. Predicting the Intestinal Absorption Potential of Hits and Leads. Drug Discov. Today Technol. 2004, 1 (4), 397-

405.

- (203) Seo, P. R.; Teksin, Z. S.; Kao, J. P. Y.; Polli, J. E. Lipid Composition Effect on Permeability across PAMPA. Eur. J. Pharm. Sci. 2006, 29 (3-4), 259–268.
- (204) Di, L.; Kerns, E. H. Profiling Drug-like Properties in Discovery Research. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2003, 7 (3), 402–408.
- (205) Binnig, G.; Rohrer, H.; Gerber, C.; Weibel, E. Tunneling through a Controllable Vacuum Gap. Appl. Phys. Lett. 1982, 40 (2), 178-180.
- (206) Prater, C. B.; Butt, H. J.; Hansma, P. K. Atomic Force Microscopy. *Nature* **1990**, *345* (6278), 839–840.
- (207) Binnig, G.; Quate, C. F. Atomic Force Microscope. Phys. Rev. Lett. 1986, 56 (9), 930-933.
- (208) Colton, R. J.; Baselt, D. R.; Dufrêne, Y. F.; Green, J. B.; Lee, G. U. Scanning Probe Microscopy. Curr. Opin. Chem. Biol. 1997, 1 (3), 370-377.
- (209) Moraille, P. La Microscopie à Sonde Balayante (SPM), Notes de Cours, CHM-3483, Université de Montréal (UdeM), 2012.
- (210) Müller, D. J.; Dufrêne, Y. F. Atomic Force Microscopy as a Multifunctional Molecular Toolbox in Nanobiotechnology. Nat. Nanotechnol. 2008, 3 (5), 261–269.
- (211) El Kirat, K.; Morandat, S.; Dufrêne, Y. F. Nanoscale Analysis of Supported Lipid Bilayers Using Atomic Force Microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 2010, 1798 (4), 750-765.
- (212) Kaemmer, S. B. Introduction to Bruker's ScanAsyst and PeakForce Tapping AFM Technology http://www.bruker.com.
- (213) Haugstad, G. Atomic Force Microscopy; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2012.
- (214) Goksu, E. I.; Vanegas, J. M.; Blanchette, C. D.; Lin, W.-C.; Longo, M. L. AFM for Structure and Dynamics of Biomembranes. *Biochim. Biophys. Acta* 2009, 1788 (1), 254–266.
- (215) Jandt, K. D. Atomic Force Microscopy of Biomaterials Surfaces and Interfaces. Surf. Sci. 2001, 491 (3), 303-332.
- (216) Magonov, S. N.; Reneker, D. H. Characterization of Polymer Surfaces With Atomic Force Microscopy. Annu. Rev. Mater. Sci. 1997, 27 (1), 175-222.
- (217) Picas, L.; Milhiet, P.-E.; Hernández-Borrell, J. Atomic Force Microscopy: A Versatile Tool to Probe the Physical and Chemical Properties of Supported Membranes at the Nanoscale. *Chem. Phys. Lipids* **2012**, *165* (8), 845–860.
- (218) Cappella, B.; Dietler, G. Force-Distance Curves by Atomic Force Microscopy. Surf. Sci. Rep. 1999, 34 (1-3), 1-104.
- (219) Domke, J.; Radmacher, M. Measuring the Elastic Properties of Thin Polymer Films with the Atomic Force Microscope. *Langmuir* **1998**, *14* (12), 3320– 3325.
- (220) Axelrod, D.; Koppel, D. E.; Schlessinger, J.; Elson, E.; Webb, W. W. Mobility Measurement by Analysis of Fluorescence Photobleaching Recovery Kinetics. *Biophys. J.* 1976, 16 (9), 1055–1069.

- (221) Yguerabide, J.; Schmidt, J. A.; Yguerabide, E. E. Lateral Mobility in Membranes as Detected by Fluorescence Recovery after Photobleaching. *Biophys. J.* 1982, 40 (1), 69–75.
- (222) Jovin, T. M.; Vaz, W. L. Rotational and Translational Diffusion in Membranes Measured by Fluorescence and Phosphorescence Methods. *Methods Enzymol.* 1989, 172, 471–513.
- (223) García-Sáez, A. J.; Schwille, P. Surface Analysis of Membrane Dynamics. Biochim. Biophys. Acta 2010, 1798 (4), 766–776.
- (224) Soumpasis, D. M. Theorotical Analysis of Fluorescence Photobleaching Recovery Experiments. *Biophys. J.* **1983**, *41* (1), 95–97.
- (225) Bourgault, S. Études Spectroscopiques Des Systèmes Biologiques Chapitre 6: Résonance Des Plasmons de Surface. Notes de Cours, Université du Québec À Montréal (UQAM), 2013.
- (226) Deakin, M. R.; Buttry, D. A. Electrochemical Applications of the Quartz Crystal Microbalance. Anal. Chem. 1989, 61 (20), 1147A 1154A.
- (227) Ward, M. D.; Buttry, D. A. In Situ Interfacial Mass Detection with Piezoelectric Transducers. *Science* 1990, 249 (4972), 1000–1007.
- (228) Rodahl, M.; Höök, F.; Fredriksson, C.; Keller, C. A.; Krozer, A.; Brzezinski, P.; Voinova, M.; Kasemo, B. Simultaneous Frequency and Dissipation Factor QCM Measurements of Biomolecular Adsorption and Cell Adhesion. *Faraday Discuss.* **1997**, No. 107, 229–246.
- (229) Keller, C. A.; Kasemo, B. Surface Specific Kinetics of Lipid Vesicle Adsorption Measured with a Quartz Crystal Microbalance. *Biophys. J.* 1998, 75 (3), 1397–1402.
- (230) Janshoff, A.; Galla, H. J.; Steinem, C. Piezoelectric Mass-Sensing Devices as Biosensors-An Alternative to Optical Biosensors? Angew. Chemie Int. Ed. 2000, 39 (22), 4004–4032.
- (231) Liu, G.; Zou, S.; Fu, L.; Zhang, G. Roles of Chain Conformation and Interpenetration in the Growth of a Polyelectrolyte Multilayer. J. Phys. Chem. B 2008, 112 (14), 4167–4171.
- (232) Rodahl, M.; Höök, F.; Krozer, A.; Brzezinski, P.; Kasemo, B. Quartz Crystal Microbalance Setup for Frequency and Q -factor Measurements in Gaseous and Liquid Environments. *Rev. Sci. Instrum.* **1995**, *66* (7), 3924–3930.
- (233) Sauerbrey, G. The Use of Quartz Crystal Oscillators for Weighing Thin Layers and for Microweighing Applications. *Zeitschrift für Phys.* **1959**, *155* (2), 206– 222.
- (234) Köβlinger, C.; Uttenthaler, E.; Drost, S.; Aberl, F.; Wolf, H.; Brink, G.; Stanglmaier, A.; Sackmann, E. Comparison of the QCM and the SPR Method for Surface Studies and Immunological Applications. *Sensors Actuators B Chem.* 1995, 24 (1-3), 107–112.
- (235) Hook, F.; Rodahl, M.; Kasemo, B.; Brzezinski, P. Structural Changes in Hemoglobin during Adsorption to Solid Surfaces: Effects of pH, Ionic

Strength, and Ligand Binding. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1998, 95 (21), 12271–12276.

- (236) Peh, W. Y. X.; Reimhult, E.; Teh, H. F.; Thomsen, J. S.; Su, X. Understanding Ligand Binding Effects on the Conformation of Estrogen Receptor α-DNA Complexes: A Combinational Quartz Crystal Microbalance with Dissipation and Surface Plasmon Resonance Study. *Biophys. J.* 2007, 92 (12), 4415–4423.
- (237) Weber, N.; Pesnell, A.; Bolikal, D.; Zeltinger, J.; Kohn, J. Viscoelastic Properties of Fibrinogen Adsorbed to the Surface of Biomaterials Used in Blood-Contacting Medical Devices. *Langmuir* 2007, 23 (6), 3298–3304.
- (238) Rodahl, M.; Kasemo, B. A Simple Setup to Simultaneously Measure the Resonant Frequency and the Absolute Dissipation Factor of a Quartz Crystal Microbalance. *Rev. Sci. Instrum.* 1996, 67 (9), 3238–3241.
- (239) Bailey, C. M.; Kamaloo, E.; Waterman, K. L.; Wang, K. F.; Nagarajan, R.; Camesano, T. A. Size Dependence of Gold Nanoparticle Interactions with a Supported Lipid Bilayer: A QCM-D Study. *Biophys. Chem.* 2015, 203, 51–61.
- (240) Cho, N.-J.; Frank, C. W. Fabrication of a Planar Zwitterionic Lipid Bilayer on Titanium Oxide. *Langmuir* 2010, 26 (20), 15706–15710.
- (241) Wang, K. F.; Nagarajan, R.; Mello, C. M.; Camesano, T. A. Characterization of Supported Lipid Bilayer Disruption By Chrysophsin-3 Using QCM-D. J. Phys. Chem. B 2011, 115 (51), 15228–15235.
- (242) Wohnsland, F.; Faller, B. High-Throughput Permeability pH Profile and High-Throughput Alkane/water Log P with Artificial Membranes. J. Med. Chem. 2001, 44 (6), 923–930.
- (243) Sugano, K.; Hamada, H.; Machida, M.; Ushio, H. High Throughput Prediction of Oral Absorption: Improvement of the Composition of the Lipid Solution Used in Parallel Artificial Membrane Permeation Assay. J. Biomol. Screen. 2001, 6 (3), 189–196.
- (244) Zhu, C.; Jiang, L.; Chen, T.-M.; Hwang, K.-K. A Comparative Study of Artificial Membrane Permeability Assay for High Throughput Profiling of Drug Absorption Potential. *Eur. J. Med. Chem.* 2002, 37 (5), 399–407.
- (245) Bermejo, M.; Avdeef, A.; Ruiz, A.; Nalda, R.; Ruell, J. a; Tsinman, O.; González, I.; Fernández, C.; Sánchez, G.; Garrigues, T. M.; et al. PAMPA—a Drug Absorption in Vitro Model. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2004, 21 (4), 429–441.
- (246) KV, S.; Devi, G. S.; Mathew, S. T. Liposomal Formulations of Serratiopeptidase: In Vitro Studies Using PAMPA and Caco-2 Models. *Mol. Pharm.* 2008, 5 (1), 92–97.
- (247) Avdeef, A. Physicochemical Profiling (solubility, Permeability and Charge State). Curr. Top. Med. Chem. 2001, 1 (4), 277-351.
- (248) Hartmann, T.; Schmitt, J. Lipophilicity beyond Octanol/water: A Short Comparison of Modern Technologies. Drug Discov. Today Technol. 2004, 1 (4), 431–439.
- (249) Amidon, G. L.; Lennernäs, H.; Shah, V. P.; Crison, J. R. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug

Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. Pharm. Res. 1995, 12 (3), 413-420.

- (250) Takagi, T.; Ramachandran, C.; Bermejo, M.; Yamashita, S.; Yu, L. X.; Amidon, G. L. A Provisional Biopharmaceutical Classification of the Top 200 Oral Drug Products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. *Mol. Pharm.* 2006, 3 (6), 631–643.
- (251) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. Adv. Drug Deliv. Rev. 2001, 46 (1), 3– 26.
- (252) Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. J. Med. Chem. 2002, 45 (12), 2615–2623.
- (253) Lennernäs, H. Intestinal Drug Absorption and Bioavailability: Beyond Involvement of Single Transport Function. J. Pharm. Pharmacol. 2003, 55 (4), 429–433.
- (254) Ungell, A.-L. B. Caco-2 Replace or Refine? Drug Discov. Today Technol. 2004, 1 (4), 423–430.
- (255) Kansy, M.; Senner, F.; Gubernator, K. Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes. J. Med. Chem. **1998**, 41 (7), 1007–1010.
- (256) Kansy, M.; Avdeef, A.; Fischer, H. Advances in Screening for Membrane Permeability: High-Resolution PAMPA for Medicinal Chemists. Drug Discov. Today Technol. 2004, 1 (4), 349–355.
- (257) Avdeef, A.; Bendels, S.; Di, L. i.; Faller, B.; Kansy, M.; Sugano, K.; Yamauchi, Y. PAMPA—Critical Factors for Better Predictions of Absorption. J. Pharm. Sci. 2007, 96 (11), 2893–2909.
- (258) Avdeef, A.; Kansy, M.; Bendels, S.; Tsinman, K. Absorption-Excipient-pH Classification Gradient Maps: Sparingly Soluble Drugs and the pH Partition Hypothesis. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2008, 33 (1), 29–41.
- (259) Fischer, H.; Kansy, M.; Avdeef, A.; Senner, F. Permeation of Permanently Positive Charged Molecules through Artificial membranes—Influence of Physico-Chemical Properties. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2007, *31* (1), 32–42.
- (260) Flaten, G. E.; Bunjes, H.; Luthman, K.; Brandl, M. Drug Permeability across a Phospholipid Vesicle-Based Barrier: 2. Characterization of Barrier Structure, Storage Stability and Stability towards pH Changes. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2006, 28 (4), 336–343.
- (261) Flaten, G. E.; Skar, M.; Luthman, K.; Brandl, M. Drug Permeability across a Phospholipid Vesicle Based Barrier: 3. Characterization of Drug-membrane Interactions and the Effect of Agitation on the Barrier Integrity and on the Permeability. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2007, 30 (3), 324–332.
- (262) Li, C.; Wainhaus, S.; Uss, A. S.; Cheng, K.-C. High-Throughput Screening Using Caco-2 Cell and PAMPA Systems. In *Drug Absorption Studies*;

Springer US: Boston, MA; pp 418-429.

- (263) Di, L.; Kerns, E. H.; Fan, K.; McConnell, O. J.; Carter, G. T. High Throughput Artificial Membrane Permeability Assay for Blood-brain Barrier. *Eur. J. Med. Chem.* 2003, 38 (3), 223–232.
- (264) Avdeef, A.; Artursson, P.; Neuhoff, S.; Lazorova, L.; Gråsjö, J.; Tavelin, S. Caco-2 Permeability of Weakly Basic Drugs Predicted with the Double-Sink PAMPA pKaflux Method. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2005, 24 (4), 333–349.
- (265) Kerns, E. H.; Di, L.; Petusky, S.; Farris, M.; Ley, R.; Jupp, P. Combined Application of Parallel Artificial Membrane Permeability Assay and Caco-2 Permeability Assays in Drug Discovery. J. Pharm. Sci. 2004, 93 (6), 1440– 1453.
- (266) Hämäläinen, M. D.; Frostell-Karlsson, A. Predicting the Intestinal Absorption Potential of Hits and Leads. Drug Discov. Today Technol. 2004, 1 (4), 397– 405.
- (267) Seo, P. R.; Teksin, Z. S.; Kao, J. P. Y.; Polli, J. E. Lipid Composition Effect on Permeability across PAMPA. Eur. J. Pharm. Sci. 2006, 29 (3), 259–268.
- (268) Sackmann, E.; Bruinsma, R. F. Cell Adhesion as Wetting Transition? *ChemPhysChem* 2002, 3 (3), 262.
- (269) Johnson, J. M.; Ha, T.; Chu, S.; Boxer, S. G. Early Steps of Supported Bilayer Formation Probed by Single Vesicle Fluorescence Assays. *Biophys. J.* 2002, 83 (6), 3371–3379.
- (270) Popat, K. C.; Mor, G.; Grimes, C. A.; Desai, T. A. Surface Modification of Nanoporous Alumina Surfaces with Poly(ethylene Glycol). *Langmuir* 2004, 20 (19), 8035–8041.
- (271) Tanvir, S.; Pantigny, J.; Boulnois, P.; Pulvin, S. Covalent Immobilization of Recombinant Human Cytochrome CYP2E1 and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Alumina Membrane for Drug Screening Applications. J. Memb. Sci. 2009, 329 (1), 85–90.
- (272) Goennenwein, S.; Tanaka, M.; Hu, B.; Moroder, L.; Sackmann, E. Functional Incorporation of Integrins into Solid Supported Membranes on Ultrathin Films of Cellulose: Impact on Adhesion. *Biophys. J.* 2003, 85 (1), 646–655.
- (273) Demé, B.; Marchal, D. Polymer-Cushioned Lipid Bilayers in Porous Alumina. Eur. Biophys. J. 2005, 34 (2), 170–179.
- (274) Lee, H.; Dellatore, S. M.; Miller, W. M.; Messersmith, P. B. Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings. *Science* 2007, 318 (5849), 426–430.
- (275) Waite, J. H. Mussel Power. Nat. Mater. 2008, 7 (1), 8-9.
- (276) Yu, F.; Chen, S.; Chen, Y.; Li, H.; Yang, L.; Chen, Y.; Yin, Y. Experimental and Theoretical Analysis of Polymerization Reaction Process on the Polydopamine Membranes and Its Corrosion Protection Properties for 304 Stainless Steel. J. Mol. Struct. 2010, 982 (1), 152–161.
- (277) Kang, S.; Elimelech, M. Bioinspired Single Bacterial Cell Force Spectroscopy. Langmuir 2009, 25 (17), 9656–9659.

- (278) Ku, S. H.; Lee, J. S.; Park, C. B. Spatial Control of Cell Adhesion and Patterning through Mussel-Inspired Surface Modification by Polydopamine. *Langmuir* 2010, 26 (19), 15104–15108.
- (279) Ku, S. H.; Ryu, J.; Hong, S. K.; Lee, H.; Park, C. B. General Functionalization Route for Cell Adhesion on Non-Wetting Surfaces. *Biomaterials* 2010, 31 (9), 2535–2541.
- (280) Kiessling, V.; Domanska, M. K.; Murray, D.; Wan, C.; Tamm, L. K. Supported Lipid Bilayers: Development and Applications in Chemical Biology. Wiley Encyclopedia of Chemical Biology, John Wiley & Sons, Hoboken; 2008; Vol. 4, pp 411-422.
- (281) Sileika, T. S.; Kim, H.-D.; Maniak, P.; Messersmith, P. B. Antibacterial Performance of Polydopamine-Modified Polymer Surfaces Containing Passive and Active Components. ACS Appl. Mater. Interfaces 2011, 3 (12), 4602– 4610.
- (282) Xu, H.; Shi, X.; Ma, H.; Lv, Y.; Zhang, L.; Mao, Z. The Preparation and Antibacterial Effects of Dopa-cotton/AgNPs. Appl. Surf. Sci. 2011, 257 (15), 6799–6803.
- (283) Lee, H.; Rho, J.; Messersmith, P. B. Facile Conjugation of Biomolecules onto Surfaces via Mussel Adhesive Protein Inspired Coatings. Adv. Mater. 2009, 21 (4), 431–434.
- (284) Dreyer, D. R.; Miller, D. J.; Freeman, B. D.; Paul, D. R.; Bielawski, C. W. Elucidating the Structure of Poly(dopamine). *Langmuir* 2012, 28 (15), 6428– 6435.
- (285) Hong, S.; Na, Y. S.; Choi, S.; Song, I. T.; Kim, W. Y.; Lee, H. Non-Covalent Self-Assembly and Covalent Polymerization Co-Contribute to Polydopamine Formation. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, 1–7.
- (286) Nirasay, S.; Mouget, Y.; Marcotte, I.; Claverie, J. P. Supported Bilayer on a Nanopatterned Membrane as Model PAMPA Membranes. Int. J. Pharm. 2011, 421 (1), 170–175.
- (287) Nirasay, S.; Badia, A.; Leclair, G.; Claverie, J.; Marcotte, I. Polydopamine-Supported Lipid Bilayers. *Materials* **2012**, *5* (12), 2621–2636.
- (288) Jiang, J.; Zhu, L.; Zhu, L.; Zhu, B.; Xu, Y. Surface Characteristics of a Self-Polymerized Dopamine Coating Deposited on Hydrophobic Polymer Films. *Langmuir* 2011, 27 (23), 14180–14187.
- (289) Shlyakhtenko, L. S.; Gall, A. A.; Weimer, J. J.; Hawn, D. D.; Lyubchenko, Y. L. Atomic Force Microscopy Imaging of DNA Covalently Immobilized on a Functionalized Mica Substrate. *Biophys. J.* 1999, 77 (1), 568–576.
- (290) Li, B.; Liu, W.; Jiang, Z.; Dong, X.; Wang, B.; Zhong, Y. Ultrathin and Stable Active Layer of Dense Composite Membrane Enabled by Poly(dopamine). *Langmuir* 2009, 25 (13), 7368–7374.
- (291) Mellott, N. P.; Brantley, S. L.; Hamilton, J. P.; Pantano, C. G. Evaluation of Surface Preparation Methods for Glass. Surf. Interface Anal. 2001, 31 (5), 362–368.

- (292) Marsh, D. CRC Handbook of Lipid Bilayers; CRC Press: Boca Raton, FLA, USA, 1990.
- (293) Smith, H. L.; Jablin, M. S.; Vidyasagar, A.; Saiz, J.; Watkins, E.; Toomey, R.; Hurd, A. J.; Majewski, J. Model Lipid Membranes on a Tunable Polymer Cushion. *Phys. Rev. Lett.* **2009**, *102* (22), 228102(1–4).
- (294) Jablin, M. S.; Zhernenkov, M.; Toperverg, B. P.; Dubey, M.; Smith, H. L.; Vidyasagar, A.; Toomey, R.; Hurd, A. J.; Majewski, J. In-Plane Correlations in a Polymer-Supported Lipid Membrane Measured by off-Specular Neutron Scattering. *Phys. Rev. Lett.* 2011, 106 (138101), 1–4.
- (295) Jablin, M. S.; Dubey, M.; Zhernenkov, M.; Toomey, R.; Majewski, J. Influence of Lipid Membrane Rigidity on Properties of Supporting Polymer. *Biophys. J.* 2011, 101 (1), 128–133.
- (296) Nussio, M. R.; Oncins, G.; Ridelis, I.; Szili, E.; Shapter, J. G.; Sanz, F.; Voelcker, N. H. Nanomechanical Characterization of Phospholipid Bilayer Islands on Flat and Porous Substrates : A Force Spectroscopy Study. J. Phys. Chem. B 2009, 113, 10339-10347.
- (297) Charrier, A.; Thibaudau, F. Main Phase Transitions in Supported Lipid Single-Bilayer. *Biophys. J.* 2005, 89 (2), 1094–1101.
- (298) Leonenko, Z. V; Carnini, A.; Cramb, D. T. Supported Planar Bilayer Formation by Vesicle Fusion: The Interaction of Phospholipid Vesicles with Surfaces and the Effect of Gramicidin on Bilayer Properties Using Atomic Force Microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 2000, 1509 (1-2), 131–147.
- (299) Vacic, A.; Criscione, J. M.; Rajan, N. K.; Stern, E.; Fahmy, T. M.; Reed, M. A. Determination of Molecular Configuration by Debye Length Modulation. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133 (35), 13886–13889.
- (300) Yu, B.; Liu, J.; Liu, S.; Zhou, F. Pdop Layer Exhibiting Zwitterionicity: A Simple Electrochemical Interface for Governing Ion Permeability. *Chem. Commun.* 2010, 46 (32), 5900–5902.
- (301) Engler, E. M.; Andose, J. D.; Schleyer, P. V. R. Critical Evaluation of Molecular Mechanics. J. Am. Chem. Soc. 1973, 95 (24), 8005-8025.
- (302) Przybylo, M.; Sýkora, J.; Humpolíckova, J.; Benda, A.; Zan, A.; Hof, M. Lipid Diffusion in Giant Unilamellar Vesicles Is More than 2 Times Faster than in Supported Phospholipid Bilayers under Identical Conditions. *Langmuir* 2006, 22 (22), 9096–9099.
- (303) Zhang, L.; Spurlin, T. A.; Gewirth, A. A.; Granick, S. Electrostatic Stitching in Gel-Phase Supported Phospholipid Bilayers. J. Phys. Chem. B 2006, 110 (1), 33-35.
- (304) Liu, Y.; Young, M. C.; Moshe, O.; Cheng, Q.; Hooley, R. J. A Membrane-Bound Synthetic Receptor That Promotes Growth of a Polymeric Coating at the Bilayer-Water Interface. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2012**, *51* (31), 7748– 7751.
- (305) Roder, F.; Waichman, S.; Paterok, D.; Schubert, R.; Richter, C.; Liedberg, B.; Piehler, J. Reconstitution of Membrane Proteins into Polymer-Supported

Membranes for Probing Diffusion and Interactions by Single Molecule Techniques. Anal. Chem. 2011, 83 (17), 6792–6799.

- (306) Tanaka, M.; Hermann, J.; Haase, I.; Fischer, M.; Boxer, S. G. Frictional Drag and Electrical Manipulation of Recombinant Proteins in Polymer-Supported Membranes. *Langmuir* **2007**, *23* (10), 5638–5644.
- (307) Simonsson, L.; Gunnarsson, A.; Wallin, P.; Jönsson, P.; Höök, F. Continuous Lipid Bilayers Derived from Cell Membranes for Spatial Molecular Manipulation. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133 (35), 14027–14032.
- (308) Böcker, M.; Muschter, S.; Schmitt, E. K.; Steinem, C.; Schäffer, T. E. Imaging and Patterning of Pore-Suspending Membranes with Scanning Ion Conductance Microscopy. *Langmuir* 2009, 25 (5), 3022–3028.
- (309) Lee, H.; Dellatore, S. M.; Miller, W. M.; Messersmith, P. B. Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings. *Science* 2007, *318*, 426–430.
- (310) Liu, Y.; Ai, K.; Lu, L. Polydopamine and Its Derivative Materials: Synthesis and Promising Applications in Energy, Environmental, and Biomedical Fields. *Chem. Rev.* 2014, *114* (9), 5057–5115.
- (311) Liu, X.; Cao, J.; Li, H.; Li, J.; Jin, Q.; Ren, K.; Ji, J. Mussel-Inspired Polydopamine: A Biocompatible and Ultrastable Coating for Nanoparticles in Vivo. ACS Nano 2013, 7 (10), 9384–9395.
- (312) Puu, G.; Gustafson, I. Planar Lipid Bilayers on Solid Supports from Liposomes

 Factors of Importance for Kinetics and Stability. *Biochim. Biophys. Acta* 1997, 1327 (2), 149–161.
- (313) Scheidt, H. A.; Meyer, T.; Nikolaus, J.; Baek, D. J.; Haralampiev, I.; Thomas, L.; Bittman, R.; Müller, P.; Herrmann, A.; Huster, D. Cholesterol's Aliphatic Side Chain Modulates Membrane Properties. Angew. Chem. Int. Ed. 2013, 52 (49), 12848–12851.
- (314) Dekkiche, F.; Corneci, M. C.; Trunfio-Sfarghiu, A.-M.; Munteanu, B.; Berthier, Y.; Kaabar, W.; Rieu, J.-P. Stability and Tribological Performances of Fluid Phospholipid Bilayers: Effect of Buffer and Ions. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 2010, 80 (2), 232–239.
- (315) Boudard, S.; Seantier, B.; Breffa, C.; Decher, G.; Félix, O. Controlling the Pathway of Formation of Supported Lipid Bilayers of DMPC by Varying the Sodium Chloride Concentration. *Thin Solid Films* 2006, 495 (1-2), 246–251.
- (316) Reimhult, E.; Höök, F.; Kasemo, B. Intact Vesicle Adsorption and Supported Biomembrane Formation from Vesicles in Solution: Influence of Surface Chemistry, Vesicle Size, Temperature, and Osmotic Pressure. Langmuir 2003, 19 (5), 1681–1691.
- (317) Schasfoort, R. B. M.; Tudos, A. J. Handbook of Surface Plasmon Resonance; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2008.
- (318) Nollert, P.; Kiefer, H.; Jähnig, F. Lipid Vesicle Adsorption versus Formation of Planar Bilayers on Solid Surfaces. *Biophys. J.* **1995**, *69* (4), 1447–1455.
- (319) Reviakine, I.; Brisson, A. Formation of Supported Phospholipid Bilayers from Unilamellar Vesicles Investigated by Atomic Force Microscopy. Langmuir

2000, No. 16, 1806–1815.

- (320) Seantier, B.; Breffa, C.; Félix, O.; Decher, G. Dissipation-Enhanced Quartz Crystal Microbalance Studies on the Experimental Parameters Controlling the Formation of Supported Lipid Bilayers. J. Phys. Chem. B 2005, 109 (46), 21755-21765.
- (321) Böckmann, R. a; Hac, A.; Heimburg, T.; Grubmüller, H. Effect of Sodium Chloride on a Lipid Bilayer. *Biophys. J.* 2003, 85 (3), 1647–1655.
- (322) Norman, L. L.; Badia, A. Electrochemical Surface Plasmon Resonance Investigation of Dodecyl Sulfate Adsorption to Electroactive Self-Assembled Monolayers via Ion-Pairing Interactions. *Langmuir* 2007, 23 (20), 10198– 10208.
- (323) Badia, A.; Chen, C.-I.; Norman, L. L. Calibration of a Fan-Shaped Beam Surface Plasmon Resonance Instrument for Quantitative Adsorbed Thin Film Studies - No Metal Film Thickness or Optical Properties Required. Sens Actuators B Chem. 2013, 176, 736–745.
- (324) Gray, D. E. American Institute of Physics Handbook, 3rd ed.; McGraw-Hill, New York, 1972.
- (325) Palik, E. D. Handbook of Optical Constants of Solids; Academic Press: Orlando, 1985.
- (326) Ma, C.; Srinivasan, M. P.; Waring, A. J.; Lehrer, R. I.; Longo, M. L.; Stroeve, P. Supported Lipid Bilayers Lifted from the Substrate by Layer-by-Layer Polyion Cushions on Self-Assembled Monolayers. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2003, 28 (4), 319-329.
- (327) Morigaki, K.; Tawa, K. Vesicle Fusion Studied by Surface Plasmon Resonance and Surface Plasmon Fluorescence Spectroscopy. *Biophys. J.* 2006, 91 (4), 1380–1387.
- (328) Santonicola, M. G.; Memesa, M.; Meszyńska, A.; Ma, Y.; Vancso, G. J. Surface-Grafted Zwitterionic Polymers as Platforms for Functional Supported Phospholipid Membranes. Soft Matter 2012, 8 (5), 1556.
- (329) Schiebener, P.; Straub, J.; Levelt Sengers, J. M. H.; Gallagher, J. S. Refractive Index of Water and Steam as Function of Wavelength, Temperature and Density. J. Phys. Chem. Ref. Data 1990, 19 (3), 677.
- (330) Tanaka, M.; Kaufmann, S.; Nissen, J.; Hochrein, M. Orientation Selective Immobilization of Human Erythrocyte Membranes on Ultrathin Cellulose Films. Phys. Chem. Chem. Phys. 2001, 3 (18), 4091–4095.
- (331) Yang, H.-C.; Luo, J.; Lv, Y.; Shen, P.; Xu, Z.-K. Surface Engineering of Polymer Membranes via Mussel-Inspired Chemistry. J. Memb. Sci. 2015, 483, 42-59.
- (332) Zangmeister, R. A.; Morris, T. A.; Tarlov, M. J. Characterization of Polydopamine Thin Films Deposited at Short Times by Autoxidation of Dopamine. *Langmuir* 2013, 29 (27), 8619–8628.
- (333) Zhang, W.; Yang, F. K.; Han, Y.; Gaikwad, R.; Leonenko, Z.; Zhao, B. Surface and Tribological Behaviors of the Bioinspired Polydopamine Thin

Films under Dry and Wet Conditions. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (2), 394–405.

- (334) Gounaris, K.; Mannock, D. A.; Sen, A.; Brain, A. P. R.; Williams, W. P.;
 Quinn, P. J. Polyunsaturated Fatty Acyl Residues of Galactolipids Are Involved in the Control of Bilayer/non-Bilayer Lipid Transitions in Higher Plant Chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1983, 732 (1), 229-242.
- (335) Cowan, S. W.; Schirmer, T.; Rummel, G.; Steiert, M.; Ghosh, R.; Pauptit, R. A.; Jansonius, J. N.; Rosenbusch, J. P. Crystal Structures Explain Functional Properties of Two E. Coli Porins. *Nature* **1992**, *358* (6389), 727–733.
- (336) Schabert, F.; Henn, C.; Engel, A. Native Escherichia Coli OmpF Porin Surfaces Probed by Atomic Force Microscopy. *Science* 1995, 268 (5207), 92– 94.
- (337) Alessandrini, A.; Facci, P. Phase Transitions in Supported Lipid Bilayers Studied by AFM. Soft Matter 2014, 10 (37), 7145.
- (338) Orth, R. N.; Kameoka, J.; Zipfel, W. R.; Ilic, B.; Webb, W. W.; Clark, T. G.; Craighead, H. G. Creating Biological Membranes on the Micron Scale: Forming Patterned Lipid Bilayers Using a Polymer Lift-Off Technique. *Biophys. J.* 2003, 85 (5), 3066–3073.
- (339) Yee, C. K.; Amweg, M. L.; Parikh, A. N. Membrane Photolithography: Direct Micropatterning and Manipulation of Fluid Phospholipid Membranes in the Aqueous Phase Using Deep-UV Light. *Adv. Mater.* **2004**, *16* (14), 1184–1189.
- (340) Sapuri, A. R.; Baksh, M. M.; Groves, J. T. Electrostatically Targeted Intermembrane Lipid Exchange with Micropatterned Supported Membranes. *Langmuir* 2003, 19 (5), 1606–1610.
- (341) Majd, S.; Mayer, M. Hydrogel Stamping of Arrays of Supported Lipid Bilayers with Various Lipid Compositions for the Screening of Drug-Membrane and Protein-Membrane Interactions. Angew. Chemie Int. Ed. 2005, 44 (41), 6697-6700.
- (342) Hovis, J. S.; Boxer, S. G. Patterning and Composition Arrays of Supported Lipid Bilayers by Microcontact Printing. *Langmuir* **2001**, *17* (11), 3400–3405.
- (343) Sun, K.; Xie, Y.; Ye, D.; Zhao, Y.; Cui, Y.; Long, F.; Zhang, W.; Jiang, X. Mussel-Inspired Anchoring for Patterning Cells Using Polydopamine. *Langmuir* 2012, 28 (4), 2131–2136.
- (344) You, I.; Kang, S. M.; Lee, S.; Cho, Y. O.; Kim, J. B.; Lee, S. B.; Nam, Y. S.; Lee, H. Polydopamine Microfluidic System toward a Two-Dimensional, Gravity-Driven Mixing Device. Angew. Chemie Int. Ed. 2012, 51 (25), 6126– 6130.
- (345) Drews, J. Drug Discovery: A Historical Perspective. Science 2000, 287 (5460), 1960–1964.