HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Date de la soutenance : **22 juin 2022**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Madame MANITI Ofelia**

Titre de la thèse : *« Analyse des interactions molécules-membranes et conception de vecteurs lipidiques sélectifs »*

Résumé

Mon activité scientifique s'organise, depuis ma thèse, autour des membranes biologiques et des interactions molécules-membranes, en utilisant à la fois des membranes biomimétiques, des membranes de cellules en culture ou des vésicules d'origine naturelle**.** La nature des molécules analysées englobe plusieurs catégories : des protéines, comme la créatine kinase mitochondriale ou les protéines de la famille Ezrine/Radixine/Moésine (ERM), des peptides, comme la pénétratine, des molécules thérapeutiques ou toxiques, incluant des assemblages supramoléculaires de type liposomes.

Pendant ma thèse, soutenue le 2 octobre 2008 devant l'Université Claude Bernard Lyon 1 et réalisée dans l'équipe des Drs Thierry Granjon et Olivier Marcillat, j'ai analysé l'interaction de la créatine kinase mitochondriale (CKmt) avec la membrane interne de la mitochondrie. Dans cette étude, ce n'est pas le partenaire d'interaction qui était recherché, mais les conséquences de l'interaction sur l'organisation protéolipidique de la membrane, notamment la ségrégation de la cardiolipine, un phospholipide anionique présent dans la membrane interne de la mitochondrie, connu comme cible de fixation de la CKmt. L'important dans ces travaux est l'utilisation de trois techniques couplées aux monocouches de Langmuir en tant que modèle membranaire. Ces techniques (microscopie à l'angle de Brewster (BAM), spectroscopie infrarouge à l'interface air-tampon (PM-IRRAS) et mesures de capacité différentielle d'une électrode de mercure en contact avec la monocouche) sont peu connues, mais elles ont donné un nombre important d'informations par rapport aux mécanismes moléculaires de l'interaction. Je décrirai plus loin ces techniques et les résultats majeurs qui ont été obtenus. Mes travaux de thèse ont mené à la publication de 10 articles. J'ai annexé à cette rédaction les 4 articles qui me semblent les plus importants.

En ce qui concerne le premier stage postdoctoral réalisé à l'Université Pierre et Marie Curie, Paris, dans l'équipe du Dr. Jesus Ayala Sanmartin, je me suis intéressée à l'interaction de peptides vecteurs avec les membranes. Ces peptides ont une action de type "Cheval de Troie" : ils pénètrent dans la cellule en entrainant avec eux d'autres molécules. Le mécanisme d'action n'étant pas élucidé, l'hypothèse de travail du laboratoire était une « endocytose physique » : en se fixant sur la membrane, la pénétratine forme des invaginations/tubulations qui sont ensuite internalisées

avec leur contenu par les cellules. Ces phénomènes étant trop rapides *in cellulo*, l'équipe les avait mis en évidence sur des vésicules géantes de type GUV (*Giant unilamellar vesicles*). J'ai tout d'abord adapté au laboratoire un modèle membranaire très intéressant, de vésicules naturelles obtenues à partir de la membrane plasmique par bourgeonnement. L'effet des peptides sur ces vésicules est étonnant. Nous avons pu observer une richesse de structures qui inclue des tubulations vers l'intérieur ou vers extérieur de la vésicule, avec des dynamiques variables, des modifications de courbure membranaire, ainsi que la formation des domaines membranaires très rigides. Dans ce manuscrit, j'ai essayé d'illustrer ces propos avec des images de microscopie confocale. Au vue de ces effets, l'entrée des peptides dans les cellules impliquerait, non pas un seul, mais de multiples mécanismes. Ces travaux ont mené à la publication de 5 articles, dont 2 disponibles en annexes.

Le deuxième stage postdoctoral, réalisé au Laboratoire des Matériaux et du Génie Physique, dans l'équipe du Prof. Catherine Picart, à Grenoble, a porté sur l'étude des interactions des protéines de la famille des ERM (ezrine/radixine/moésine) avec la membrane plasmique et les filaments d'actine. Ces protéines participent à la fixation du cytosquelette d'actine à la membrane plasmique et sont impliquées dans les phénomènes liés à la motilité cellulaire. La fonction physiologique de ces protéines implique des mécanismes d'activation complexes, que nous avons réussis en partie à reproduire *in vitro.* Nous avons pu montrer que, lorsque l'ezrine ou la moésine se fixent à la membrane des liposomes, des changements de structure ont lieu, aboutissant à une structure tridimensionnelle de la protéine plus ouverte. Cependant, ces changements ne sont pas suffisants pour entrainer une fixation des filaments d'actine à la protéine et des phosphorylations supplémentaires pourraient se produire *in vivo* pour assurer le lien entre la membrane et le cytosquelette. J'ai également participé à une étude plus large de l'équipe du Prof. Steve Shaw concernant la fixation de la moésine à la membrane, menée à la fois *in vitro* et *in cellulo*. Cette étude est marquante car elle montre encore une fois la complexité de ces interactions. Ces travaux ont mené à 4 publications, dont 2 disponibles en annexe.

Depuis ma nomination comme Maître de conférences à l'Université Claude Bernard Lyon 1 en octobre 2011 à l'Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, dans l'Equipe Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires, mon projet de recherche s'organise autour de la conception sur mesure de vecteurs lipidiques pour la délivrance de composés actifs et le ciblage spécifique de cellules tumorales avec plusieurs directions d'étude. En premier lieu, nous avons pu montrer, lors d'une première thèse encadrée sur le sujet et soutenue en décembre 2020, que nous pouvons cibler des cellules cancéreuses en assurant une compatibilité entre les propriétés physicochimiques des membranes du vecteur et celles de la cellule cible. La sélectivité du ciblage n'est pas due à un ciblage actif, *i.e.* anticorps, mais à une spécificité basée sur la fluidité membranaire qui peut être mesurée à l'aide d'une sonde créée à l'Institut, le Dioll. Ainsi nous avons pu montrer une distribution sélective des molécules vectorisées entre les lignées cellulaires non tumorales et les lignées cellulaires tumorales de prostate, qu'il s'agisse de fluorophores (Bompard *et al.*, 2020) ou de principes actifs (Abawi *et al.*, 2021). Outre les deux bourses obtenues par Julien Bompard et Ariana Abawi lors du concours à l'école doctorale EDISS, plusieurs projets ont permis de financer ces études *(*BQR Université Lyon 1 (2013-2014), Projet Ligue contre le Cancer (2015-2016), Projet ANR via l'institut Carnot-LiSa (2016-2017). J'ai également participé au développement des applications de la sonde Dioll (1 brevet et 2 articles soumis pour publication), qui a été soutenu par plusieurs projets financés (projet pre-maturation CNRS (2018-2019), suivi d'un projet de maturation financé par la SATT Pulsalys (2019-2020), portés par le Dr. Thierry Granjon) et d'un projet collaboratif ICBMS-CRCL, dans le cadre de l'appel d'offre PlasCan (2020-2021) porté par le Dr. Arnaud Vigneron.

Un autre axe de mes recherches actuelles porte sur la purification et l'analyse des propriétés physicochimiques des vésicules extracellulaires de type exosomes, ou *small extracellular vesicles sEV*. L'étude des sEV connaît actuellement un vrai essor car on leur attribue un rôle dans la formation des métastases. Le développement des nouvelles techniques d'analyse et de séparation de ces vésicules constitue le cœur du projet PAR FluiDiPlast, financé pour 5 ans par la région Auvergne Rhones-Alpes, projet collaboratif porté par le Dr. Arnaud Vigneron (CRCL) et impliquant les équipes LCO2-Glyco et GEMBAS de l'ICBMS, l'équipe GeParm du LAGEPP et l'entreprise privée Covalab.

En parallèle, dans le cadre des projets portés par le Prof. Agnès Girard-Egrot, j'ai participé au développement de nouvelles membranes biomimétiques, à base de bicouches supportées sur des pilotis peptidiques (brevet). Ces membranes, très flexibles en termes de composition lipidiques, sont découplées du substrat et peuvent trouver de multiples applications comme l'insertion des protéines transmembranaires (Chadli *et al.*, 2017, 2018), ou l'analyse par des techniques microscopiques des phénomènes de fusion membranaire (Bompard *et al.*, 2021).

Enfin, je m'intéresse également aux vésicules synoviales, structures lipidiques multilamellaires secrétées par les synoviocytes au niveau de l'articulation. Les pathologies ostéoarticulaires, comme l'arthrose et l'arthrite rhumatoïde, induisent une déstructuration de ces assemblages vésiculaires. En collaboration avec le Dr. Ana-Maria Trunfio-Sfarghiu de l'équipe MecaLip du LaMCoS, nous cherchons à comprendre le rôle de ces assemblages moléculaires sur les performances des articulations, dans le but de proposer des vésicules de substitution mimant les propriétés mécaniques et lubrifiantes des vésicules saines. Deux articles sont en préparation.

D'autres sujets/collaborations ont permis de diversifier mon activité de recherche dans différents projets, qui ont abouti à la publication de 15 articles en dehors de ceux mentionnés plus haut.

En conclusion, mes projets en cours et à court terme ont pour axe central la conception des vecteurs sur mesure pour la délivrance de composés actifs et le ciblage spécifique des cellules tumorales. A l'intérieur de cet axe, plusieurs directions se dessinent. En premier lieu, l'originalité du projet réside en la corrélation entre les propriétés physicochimiques du vecteur et celle de la cellule cible. La sélectivité de ciblage n'est pas due à un ciblage actif, comme les anticorps, mais à une spécificité de composition, mesurée par le paramètre fluidité membranaire. La fluidité des membranes telle que mesurée à l'aide de l'outil Dioll est très facilement quantifiable. Les projets parallèles, comme les mesures de la fluidité des exosomes dans le cadre du projet FluiDiPlast, menées en collaboration avec Arnaud Vigneron du CRCL viendront nourrir avec des informations importantes cette partie du projet.

En vue d'une application thérapeutique, il est également important que l'étude des interactions vecteur/membrane cible ne se limitent pas au niveau des cellules en culture. Pour cela, à court terme, la stabilité des vecteurs sera analysée dans des divers milieux biologiques et des études de biodistribution seront menées, avec la collaboration du dr Giovanna Lollo du LAGEPP.

Toujours dans le cadre du projet PAR FluiDiPlast, des modèles tumoraux murins seront obtenus. Après validation de la sélectivité sur cellules in vitro nous pouvons envisager, en collaboration avec le dr Samia Ruby, CRCL, une validation du ciblage tumoral chez la souris.

Les premiers tests d'encapsulation ont été encourageants: nous avons pu montrer une action sélective du dérivé lipidique MMAE intégré dans les liposomes vers les lignées tumorale. Une autre série de tests est en cours de réalisation avec la vincristine encapsulée dans les liposomes. Nous sommes toujours à la recherche de composés dont l'efficacité ou la sélectivité pourraient être augmentée par l'encapsulation dans les liposomes.

Finalement, un faisceau d'indices montrent que l'internalisation du composé actif est principalement due à des mécanismes de fusion membranaire. Sont-ils uniquement dus, comme

la compatibilité entre les deux membranes l'indique, à des interactions entre les lipides? Quel est le rôle des protéines de fusion à la membrane? Nous souhaitons analyser ces interactions en utilisant un modèle membranaire biomimétique mis au point dans le laboratoire, constitué de bicouches supportées sur des pilotis peptidiques obtenues à partir des phospholipides extraits de membranes plasmiques des lignées tumorales ou contrôles.

1. Activité pédagogique

Mon activité d'enseignement se concentre dans les unités d'enseignement (UE) de Licence 2ème année (environ 90 ECTS) et 3ème année du parcours Biochimie de la licence SVT (environ 60 ECTS). J'interviens également dans la Licence Professionnelle Analyse des Aliments et Substances Naturelles (15 ECTS) et dans les UE du tronc commun de L1 SVT (10 ECTS).

Depuis 2017, je suis responsable de l'UE de L3 Techniques Spectroscopiques en Biochimie. Dans le cadre de cette UE, j'encadre depuis mon recrutement les TP portant sur l'analyse de l'activité enzymatique de l'invertase par polarimétrie et, plus récemment, les TD portant sur les applications des méthodes spectroscopiques optiques. Depuis 2020, je suis responsable de l'UE Prélèvement Echantillonnage Analyse et Traitement (PEAT) de la LPro Analyse des Aliments et Substances Naturelles. J'ai contribué à mettre en place cette UE, qui se déroule sur le site de l'Université et sur celui du Lycée Jean-Baptiste de la Salle, à Lyon, avec une équipe pédagogique mixte université/lycée.

Lors de mon recrutement, j'ai pu mettre en place une série de travaux dirigés portant sur l'expression de résultats et l'analyse de données dans l'UE de L2 Biochimie Expérimentale 1. J'ai mis en place, sur la même thématique, une série de TD dans le cadre de l'UE PEAT de la LPro Analyse des Aliments et Substances Naturelles.

De mes compétences en recherche, j'ai cherché à intervenir dans les enseignements portant sur la biochimie des lipides. J'assure une séance de travaux pratiques dans l'UE Projets Tuteurés et Biomolécules (2ème année licence Biochimie) sur l'encapsulation de l'acide ascorbique dans les liposomes, j'interviens en cours magistraux sur la structure des lipides dans la même UE. En 3ème année de licence, j'assure les CM et TD portant sur les membranes biologiques dans l'UE Biochimie Structurale et Fonctionnelle 1. J'interviens également dans l'UE optionnelle Biomolécules et Applications Industrielles sur la vectorisation de principes actifs. Une autre thématique que j'ai privilégiée concerne la purification de protéines. J'assure deux séries de TP, l'une sur la purification du lysozyme à partir de blanc d'œuf dans l'UE de L2 Biochimie Techniques Préparatives et Analytiques en Biochimie, et l'autre sur la purification de la lactate déshydrogénase à partir d'un homogénat de foie de rat dans l'UE de L2 Sciences de la vie, Enzymologie et métabolisme. Depuis 2011, j'interviens également dans l'UE enzymologie en assurant les enseignements d'un groupe de TD.

J'interviens ponctuellement dans les UE de première année de L1 en tant qu'intervenant en TP et TD.

Présentation synthétique des enseignements :

Enseignement	Niveau	Nature	Volume horaire*	Effectif de l'UE*
Techniques Spectroscopiques en Biochimie	L3	TD et TP	43	120
Biochimie Structurale et Fonctionnelle	L3	CM et TD	31	120
Enzymologie et métabolisme	L2	TP	32	500
Techniques préparatives et analytiques en Biochimie	L2	TP	32	120
Biochimie expérimentale	L2	TD	12	120
Enzymologie	L2	TD	10	120
Projets tutorés et Biomolécules	L2	TP	28	120
Biomolécules et applications industrielles	L2	CM	4.5	40
Biomolécules A	L1	TP	12	700
Prélévement, échantillonage, analyse et traitement	LPro	TD	18	12

* en moyenne, peut varier légèrement selon le nombre d'inscrits

2. Responsabilités pédagogiques

Je suis actuellement responsable de deux Unités d'Enseignement : Techniques Spectroscopiques en Biochimie de L3 Biochimie (6 crédits, UE obligatoire) et Prélèvement, Echantillonnage, Analyse et Traitement de la Licence professionnelle Analyse des aliments et des Substances Naturelles-Qualité.

Depuis 2013, je suis référent pédagogique, j'assure le suivi pédagogique de 60 étudiants de première et deuxième année de licence, portail SVT – Université Lyon 1.

Je suis aussi membre de la Commission Pédagogique en charge d'instruire les dossiers d'admission en Licence SVT.

Depuis 2014, je suis responsable de la planification des enseignements (gestion des emplois du temps) de 2ème et 3ème année de Licence SVT, parcours Biochimie.