

Thèse

Présentée devant

L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon

Pour l'obtention du

Diplôme de Doctorat

par

Salim ADJILI

Synthèse et caractérisation de sondes lipidiques macromoléculaires fluorescentes émettant dans le rouge lointain pour l'imagerie membranaire.

Soutenue Publiquement le 06 Décembre 2012

Jury :

Rosilio Véronique – Professeur, Université Paris SUD 11	Rapporteur
Tribet Christophe – Directeur de Recherche CNRS, ENS Paris	Rapporteur
Girard-Egrot Agnès – Professeur, UCBL Lyon	Examineur
Fleury Etienne – Professeur, INSA de Lyon	Examineur
Charreyre Marie-Thérèse – Directeur de Recherche CNRS, INSA de Lyon	Directeur de Thèse
Favier Arnaud – Chargé de Recherche CNRS, INSA de Lyon	Co-encadrant

INSA Direction de la Recherche - Ecoles Doctorales – Quinquennal 2011-2015

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
CHIMIE	CHIMIE DE LYON http://www.edchimie-lyon.fr Insa : R. GOURDON	M. Jean Marc LANCELIN Université de Lyon – Collège Doctoral Bât ESCPE 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 13 95 directeur@edchimie-lyon.fr
E.E.A.	ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE http://edeea.ec-lyon.fr Secrétariat : M.C. HAVGOUDOUKIAN eea@ec-lyon.fr	M. Gérard SCORLETTI Ecole Centrale de Lyon 36 avenue Guy de Collongue 69134 ECULLY Tél : 04.72.18 60 97 Fax : 04 78 43 37 17 Gerard.scorletti@ec-lyon.fr
E2M2	EVOLUTION, ECOSYSTEME, MICROBIOLOGIE, MODELISATION http://e2m2.universite-lyon.fr Insa : H. CHARLES	Mme Gudrun BORNETTE CNRS UMR 5023 LEHNA Université Claude Bernard Lyon 1 Bât Forel 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.72.43.12.94 e2m2@biomserv.univ-lyon1.fr
EDISS	INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES- SANTÉ http://ww2.ibcp.fr/ediss Sec : Safia AIT CHALAL Insa : M. LAGARDE	M. Didier REVEL Hôpital Louis Pradel Bâtiment Central 28 Avenue Doyen Lépine 69677 BRON Tél : 04.72.68 49 09 Fax :04 72 35 49 16 Didier.revel@creatis.uni-lyon1.fr
INFOMATHS	INFORMATIQUE ET MATHEMATIQUES http://infomaths.univ-lyon1.fr	M. Johannes KELLENDONK Université Claude Bernard Lyon 1 INFOMATHS Bâtiment Braconnier 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72. 44.82.94 Fax 04 72 43 16 87 infomaths@univ-lyon1.fr
Matériaux	MATERIAUX DE LYON Secrétariat : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12 Bat. Saint Exupéry Ed.materiaux@insa-lyon.fr	M. Jean-Yves BUFFIERE INSA de Lyon MATEIS Bâtiment Saint Exupéry 7 avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.72.43 83 18 Fax 04 72 43 85 28 Jean-yves.buffiere@insa-lyon.fr
MEGA	MECANIQUE, ENERGETIQUE, GENIE CIVIL, ACOUSTIQUE Secrétariat : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12 Bat. Saint Exupéry mega@insa-lyon.fr	M. Philippe BOISSE INSA de Lyon Laboratoire LAMCOS Bâtiment Jacquard 25 bis avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél :04.72.43.71.70 Fax : 04 72 43 72 37 Philippe.boisse@insa-lyon.fr
ScSo	ScSo* M. OBADIA Lionel Sec : Viviane POLSINELLI Insa : J.Y. TOUSSAINT	M. OBADIA Lionel Université Lyon 2 86 rue Pasteur 69365 LYON Cedex 07 Tél : 04.78.69.72.76 Fax : 04.37.28.04.48 Lionel.Obadia@univ-lyon2.fr

*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie

AVANT PROPOS

Ce travail de recherche a été réalisé au sein de l'UMR CNRS 5223 – Ingénierie des Matériaux polymères (IMP@INSA) dirigée par Etienne Fleury, et de l'USR CNRS 3010 – Laboratoire Transdisciplinaire Joliot Curie dirigée par Bertrand Fourcade. Je les remercie tout les deux de m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire respectif pendant mes trois années de thèse.

Je suis très honoré que Madame le Professeur Véronique Rosilio et Monsieur Christophe Tribet aient accepté de juger ce mémoire en tant que rapporteurs, je les en remercie.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Etienne Fleury d'avoir accepté de présider le jury et Madame le Professeur Agnès Girard-Egrot d'avoir accepté de faire partie du jury en tant qu'examinatrice.

Je tiens évidemment à exprimer toute ma gratitude à Marie-Thérèse Charreyre et Arnaud Favier pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce sujet pluridisciplinaire extrêmement intéressant, mais également pour leur disponibilité, leur franchise et leur gentillesse, ce qui a rendu ces trois années de travail très agréables. Je les remercie également d'avoir partagé leurs (nombreuses) connaissances avec moi pendant ces années, ce qui m'a permis d'évoluer.

Je voudrais remercier également tout les collaborateurs du projet :

- Les Biologistes : Delphine Muriaux, pour sa gentillesse, sa disponibilité, ses excellents conseils ainsi que pour m'avoir initié au travail en laboratoire L2. Elise Hamard-Perron et Guillaume Fargier pour m'avoir aidé au début du projet. Cyril Favard, pour sa gentillesse et ses précieux conseils, ainsi que nos nombreuses discussions toujours très intéressantes dans tous les domaines
- Les Chimistes : Yann Bretonnière pour sa disponibilité et ses conseils en spectroscopie, Julien Massin pour le chromophore et évidemment pour m'avoir tout appris en spectroscopie au début de ma thèse

Je remercie également toutes les personnes qui ont contribué à la bonne réalisation de ce projet : Agnès Crepet et Jean Michel Lucas pour leur aide précieuse en chromatographie d'exclusion stérique, Karine Monier pour son aide en microscopie et en culture cellulaire. Je remercie également Christophe Place et Elodie Chatre pour leur bonne humeur, leur gentillesse et pour m'avoir permis de faire de la microscopie en champ sombre. Enfin, je remercie Xavier Gaume et Baptiste Panthu, mes deux fournisseurs officiels de cellules HeLa.

Je souhaite également remercier toutes les personnes qui ont rendu le travail au laboratoire tellement agréable : Fabien, Marc, Laurence, Arezki, Olivier, Hélène, Annamaria, Pradeep, Maryline pour son efficacité et sa bonne humeur (même si t'es stéphanoise !) et Quentin.

Un grand merci également à Maggy, la maman du LJC, pour sa gentillesse, sa bonne humeur, je suis très heureux de t'avoir rencontré Maggy. Quant à Zofia, comme tu dis, nos joutes verbales vont me manquer. Merci également à Pascale, ça a été un plaisir de partager le bureau avec toi, ta bonne humeur et l'odeur de ton vernis à ongle vont me manquer !! (ta veste léopard aussi...)

Merci également à tous les étudiants qui ont animé le labo pendant ces trois années : Benoît, Rong, notre petit indien national Sadhan, Monica, Johan, Anna. Merci aussi à Xavier, pour les soirées foot/pizza, pour le ski, le Karting (on aura notre revanche sur Quentin !!).

Je remercie également les stagiaires que j'ai eu la chance de côtoyer au laboratoire : Yi-Chun et William (qui m'ont bien aidé sur le projet), Jordan, Nicolas.

Je tiens également à remercier les filles de l'équipe polymère Sophie et Edna pour leur bonne humeur et leur gentillesse, mais surtout Cristina d'avoir été là et de m'avoir aidé et soutenu pendant ces trois années de thèse, je suis vraiment content d'avoir fait ma thèse en même temps que toi.

Une petite pensée pour Damien : accroches toi, tu vas t'en sortir !

Enfin, un très grand merci à ma famille pour m'avoir soutenu pendant toutes ces années et surtout pour m'avoir supporté même si je sais que parfois ça n'a pas été facile !!

Liste des abréviations

ADN	: acide désoxyribonucléique
AEM	: Aminoethylmorpholine
AIBN	: azobisisobutyronitrile
ATC	: Agent de transfert de chaînes
ATRP	: Atom Transfert Radical Polymerization
Bio-conjugué LP	: bio-conjugué Lipide-Polymère
Bio-conjugué LPC	: bio-conjugué Lipide-Polymère-Chromophore
BMA	: méthacrylate de n-butyle
BZDC	: Benzoyldihydrocinnamoyl
CAEDB	: Carboxylic Acid EthylDithioBenzoate
Cb	: Cellubrevine
CES	: Chromatographie d'exclusion stérique
DBtB	: Dithiobenzoate de tert-butyle
DCU	: Dicyclohexylurée
DDL	: diffusion de lumière
DMAA	: Diméthylacrylamide
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
DO	: Densité optique
DOPC	: 1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DOPE	: 1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
DPPE	: 1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-Phosphoethanolamine
DPPEHA	: 1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-Phosphoethanolamine- <i>N</i> - (Hexanoylamine)
DP_n	: Degré de polymérisation moyen en nombre
DSPE	: 1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	: Fluorescence-Activated Cell Sorting
FRAP	: Fluorescence Recovery After Photobleaching
FSC	: Forward-scattered
GUV	: Giant unilamellar vesicles (Vésicules unilamellaires géantes)
HIV	: Human immunodeficiency virus
I_p	: Indice de polymolécularité
IRM	: Imagerie par résonance magnétique
ITO	: Indium Tin Oxide
KOH	: Hydroxyde de potassium
LHRH	: Luteinizing hormone-releasing hormone
LUV	: Large unilamellar vesicles (Vésicules unilamellaires de grandes tailles)
LY	: Lucifer Yellow
MEB	: Microscopie électronique à balayage
MET	: Microscopie électronique en transmission
MLV	: Multilamellar vesicles (Vésicules multilamellaires)
M_n	: Masse molaire moyenne en nombre
MPC	: 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine
M_w	: Masse molaire moyenne en masse
NAM	: <i>N</i> -acryloylmorpholine
NAS	: <i>N</i> -acryloxysuccinimide
NB	: 4-hydroxybutyl-1-naphthylamide

NBD	: Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole
NHS	: <i>N</i> -Hydroxysuccinimide
NMP	: Nitroxide-mediated radical polymerization
PAA	: poly(acide acrylique)
PAF	: Platelet Activating Factor
PAMAM	: polyamidoamine
PBS	: Phosphate buffered saline
PC	: Phosphatidylcholine
PDMA	: poly(diméthylacrylamide)
PEG	: poly(éthylène glycol)
PEI	: poly(éthylène imine)
PEO	: poly(oxyde d'éthylène)
PFP	: pentafluorophényle
PI(4,5)P2	: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PMMA	: poly(méthacrylate de méthyle)
PRC	: Polymérisation radicalaire contrôlée
PS	: Phosphatidylserine
PVDF	: poly(fluorure de vinylidène)
RAFT	: Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer
RMN	: Résonance magnétique nucléaire
SEDB	: SuccinimidoxycarbonylEthylDithioBenzoate
SI-ATRP	: Surface-initiated ATRP
SSC	: Side-scattered
SUV	: Small unilamellar vesicles (Vésicules unilamellaires de petites tailles)
TAX	: Paclitaxel
TiVAMP	: Tetanus Neurotoxin Insensitive Vesicles-Associated Membrane Protein
TRITC	: Tetramethyl-rhodamine isothiocyanate
VPBA	: Acide <i>p</i> -vinylphénylboronique

Table des Matières.

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

Chapitre 1 : Etude Bibliographique : Les bio-conjugués lipidiques pour le marquage membranaire de cellules vivantes.

I. INTRODUCTION.....	9
II. Membranes et lipides.....	9
II.1. Les membranes plasmiques cellulaires.	10
II.2. Les lipides membranaires.	15
II.3. Conclusions.	22
III. Les lipides fluorescents.....	22
III.1. Couplage du chromophore sur les chaînes alkyles.....	24
III.2. Couplage du chromophore sur la tête polaire.....	26
III.3. Couplage du chromophore au niveau de la partie centrale du lipide.	28
III.4. Conclusions.	29
IV. Les bio-conjugués Lipide-Polymères.....	30
IV.1. Introduction du lipide en extrémité de chaîne polymère.	32
IV.2. Introduction du lipide en position latérale de la chaîne polymère.	39
IV.3. Les bio-conjugués Lipide-Polymères fluorescents.....	43
IV.4. Conclusions.....	47
V. Conclusions du chapitre 1.....	48

Chapitre 2 : Synthèse de copolymères réactifs fonctionnalisés avec un phospholipide en extrémité alpha de chaîne.

I. INTRODUCTION.	57
II. Synthèse d'Agents de Transfert de Chaîne fonctionnalisés par un phospholipide.....	58
II.1. Synthèse d'un Agent de Transfert de Chaîne précurseur de type dithiobenzoate.	59
II.2. Couplage de phospholipides sur le dithiobenzoate précurseur.	61
II.3. Conclusions.....	64
III. Synthèse de copolymères poly(NAM-co-NAS) portant un lipide en extrémité alpha de chaîne par le procédé RAFT.	65
III.1. Synthèse de copolymères poly(NAM-co-NAS) par voie RAFT avec le DBtB.....	65

III.2. Synthèse de copolymères poly(NAM-co-NAS) portant un lipide en extrémité de chaîne.....	68
III.3. Conclusions.....	74
IV. Partie expérimentale.....	75
IV.1. Matériel.....	75
IV.2. Instruments.....	75
IV.3. Synthèse et purification.....	76
V. Conclusions du chapitre 2.....	79

Chapitre 3 : Couplage de chromophores sur les bio-conjugués Lipide-Polymères et caractérisation spectroscopique.

I. Introduction.....	85
II. Les chromophores émettant dans le rouge lointain : bibliographie.....	86
II.1. Intérêt de l'utilisation de chromophores émettant dans le rouge lointain.....	86
II.2. Structures chimiques de divers chromophores émettant dans le rouge lointain.....	87
II.3. Couplage de chromophores émettant dans le rouge lointain sur des chaînes polymères.....	89
II.4. Conclusions.....	91
III. Synthèse de bio-conjugués Lipide-Polymères fluorescents émettant dans le rouge lointain.....	92
III.1. Présentation du chromophore utilisé pour la synthèse des bio-conjugués LPC.....	92
III.2. Couplage du chromophore par formation de liaison amide via les unités NAS du copolymère.....	93
III.3. Conclusions.....	99
IV. Caractérisation spectroscopique des bio-conjugués LPC synthétisés.....	99
IV.1. Introduction - Définitions.....	99
IV.2. Propriétés optiques du chromophore JM086.....	105
IV.3. Caractérisation optique des bio-conjugués LPC.....	106
IV.4. Conclusions.....	120
V. Partie expérimentale.....	121
V.1. Matériels.....	121
V.2. Instruments.....	121
V.3. Synthèses et purification.....	122
V.4. Méthodes Analytiques.....	123
VI. Conclusions du chapitre 3.....	125

Chapitre 4 : Etude de l'interaction entre les bio-conjugués Lipide-Polymère fluorescents et les bicouches lipidiques modèles.

I. INTRODUCTION.....	133
II. Bibliographie : Les systèmes lipidiques modèles.....	133
II.1. Les différents systèmes lipidiques modèles.....	133
II.2. Les liposomes.....	136

III. Formation de liposomes fluorescents à partir d'un mélange de lipides et de bio-conjugués.....	140
III.1. Formation de LUVs et SUVs par extrusion.	141
III.2. Formation de SUVs par sonication.	147
III.3. Formation de GUVs par électroformation.	149
III.4. Conclusion.	152
IV. Incorporation des bio-conjugués au sein de liposomes préformés.	153
IV.1. Suivi par spectroscopie de Fluorescence de l'incorporation des bio-conjugués dans des LUVs.....	153
IV.2. Suivi par microscopie optique de l'incorporation des bio-conjugués au sein de GUVs.	155
IV.3. Conclusions.....	156
V. Partie expérimentale.....	156
V.1. Matériel.	156
V.2. Instruments.	157
V.3. Formation de liposomes.....	158
V.4. Méthode analytique.	160
VI. Conclusions du chapitre 4.	160

Chapitre 5 : Evaluation des bio-conjugués Lipide-Polymère fluorescents en milieu biologique.

I. Introduction.....	167
II. Evaluation de la cytotoxicité des bio-conjugués en milieu cellulaire.....	167
II.1. Evaluation qualitative sur cellules Hela par microscopie optique.	168
II.2. Evaluation quantitative sur Lymphocyte T par cytométrie en flux.....	172
II.3. Conclusions.....	174
III. Internalisation des bio-conjugués au sein de cellules vivantes.	174
III.1. Etude de l'internalisation du bio-conjugué 33K-9H au sein de cellules Hela par microscopie confocale.	175
III.2. Internalisation du bio-conjugué 33K-9H dans différents types cellulaires.	185
III.3. Etude de l'influence de la structure des bio-conjugués sur l'internalisation cellulaire.	186
III.4. Incubation des cellules en présence de liposomes fluorescents.	198
III.5. Conclusions.	208
IV. Partie expérimentale.	209
IV.1. Matériels.....	209
IV.2. Culture cellulaire.	209
IV.3. Instruments.	210
IV.4. Méthodes Analytiques.....	211
V. Conclusions du Chapitre 5.	214

Conclusion générale.....219

Annexes.....225

INTRODUCTION GENERALE

Les lipides constituent les éléments essentiels des membranes cellulaires¹. Au sein de ces membranes, les lipides jouent non seulement un rôle structural, mais ils sont également impliqués dans de nombreux phénomènes de signalisation.

Par exemple, lors de l'infection d'une cellule hôte par un virus, ce dernier libère dans le cytoplasme de la cellule son matériel génétique ainsi que des enzymes (intégrase, transcriptase inverse...). Ensuite, le virus utilise la machinerie cellulaire pour produire ses propres protéines dont les protéines de structure appelées protéines Gag. Ces protéines Gag contiennent tous les éléments nécessaires à la production des nouveaux virions². Dans le cas du virus HIV-1 (Figure 1), il est fortement supposé que les protéines Gag ciblent des microdomaines spécifiques de la membrane plasmique appelés *radeaux lipidiques* où elles s'assemblent puis induisent le bourgeonnement de nouveaux virions à partir de la membrane plasmique. Ces radeaux lipidiques sont des domaines très riches en cholestérol et en phospholipides particuliers, parmi lesquels le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2). Ce phospholipide semble être directement impliqué dans le phénomène de bourgeonnement des virions HIV-1 par interaction entre la tête polaire et un domaine particulier des protéines Gag^{3,4}.

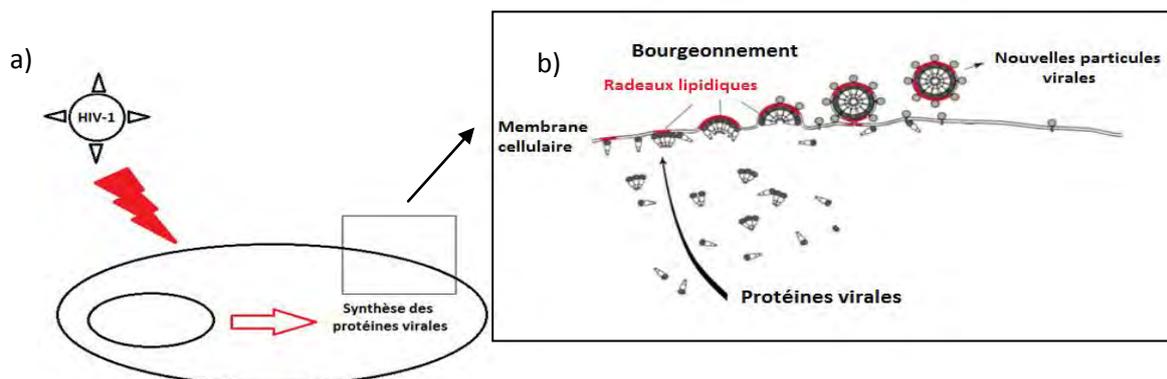


Figure 1. Après infection d'une cellule par le virus HIV-1 (a), les protéines virales Gag s'assemblent à la membrane plasmique de la cellule infectée, induisant le bourgeonnement de particules virales (b)².

Avec le développement des techniques de microscopie de fluorescence, l'utilisation de lipides fluorescents, c'est-à-dire de lipides portant une entité chromophorique soit au niveau de la tête polaire, soit au niveau des chaînes grasses, s'est développée. Ces sondes lipidiques ont permis l'étude de nombreux phénomènes membranaires tels que l'étude de la dynamique membranaire^{5,6,7} ou encore le bourgeonnement viral, comme dans le cas de HIV-1. Les lipides fluorescents constituent donc un outil très intéressant pour les biologistes. Cependant, la localisation du chromophore sur le lipide peut parfois entraîner des problèmes lors de son utilisation⁷ (extinction ou quenching de la fluorescence, altération de l'insertion au sein des membranes biologiques). De plus, la présence d'un seul chromophore par lipide peut conduire à des brillances modérées des sondes ainsi qu'à une photorésistance limitée. Enfin, la gamme de chromophores généralement couplés sur les

lipides est très étroite (la majorité est comprise dans la gamme $450\text{nm} < \lambda_{\text{em}} < 550\text{nm}$), ce qui réduit le choix des longueurs d'ondes⁸ utilisables.

L'objectif à long terme de ce projet pluridisciplinaire, impliquant différents collaborateurs de disciplines différentes (Chimie Organique et Spectroscopie – Equipe de Chantal Andraud, Chimie des polymères – Equipe de Marie-Thérèse Charreyre, Biologie/Virologie – Equipe de Delphine Muriaux) vise à synthétiser de nouveaux bio-conjugués Lipide-Polymère-Chromophores (LPC) constitués d'une chaîne polymère hydrosoluble et biocompatible, comportant d'une part, un lipide de type PIP2 localisé en extrémité de chaîne et, d'autre part, de nombreux chromophores localisés en position latérale le long de la chaîne polymère (Figure 2).

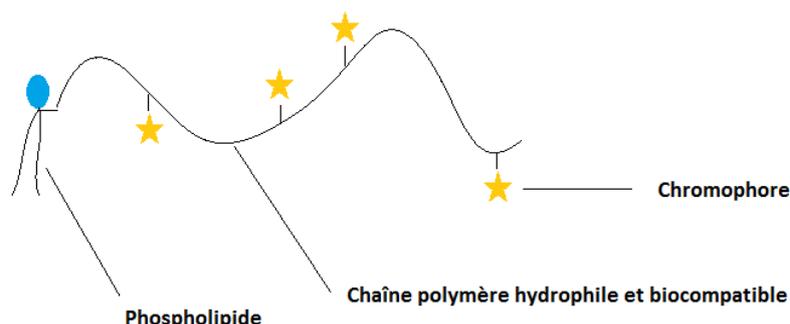


Figure 2. Structure schématique des bio-conjugués Lipide-Polymère-Chromophores (LPC).

La structure particulière de ces bio-conjugués entend apporter des solutions aux problèmes évoqués précédemment : d'une part, la présence de nombreux chromophores sur la chaîne polymère permettrait d'augmenter la brillance des sondes, de limiter les phénomènes d'extinction complète de fluorescence des sondes ; d'autre part, la localisation de la chaîne polymère au niveau de la partie centrale du lipide (PIP2) lui permettrait de conserver ses capacités d'insertion aux sein des bicouches lipidiques et son activité de reconnaissance des protéines Gag via sa tête polaire.

Par ailleurs, le choix des chromophores s'est porté sur des chromophores émettant dans le rouge lointain ($650\text{nm} < \lambda_{\text{em}} < 750\text{nm}$) synthétisés par le Laboratoire de Chimie de l'ENS de Lyon (Figure 3). La zone spectrale correspondant au rouge lointain permet de s'affranchir des phénomènes d'autofluorescence des cellules vivantes souvent gênants lors des observations par microscopie optique⁹.

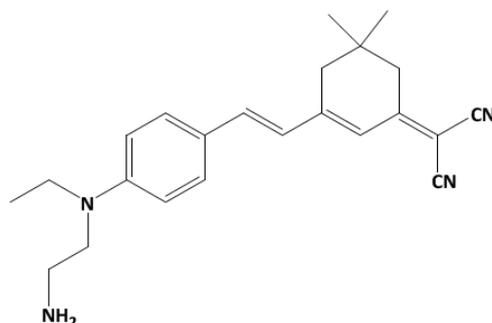


Figure 3. Structure du chromophore émettant dans le rouge lointain utilisé lors de ce projet.

La synthèse d'une telle architecture (Figure 2) nécessite l'utilisation de dérivés lipidiques présentant notamment une fonction amine ($-NH_2$) au niveau de la partie centrale du lipide. Cependant, un dérivé PIP2 portant une fonction amine au niveau de sa partie centrale (de type glycérol) est très difficile à synthétiser (nécessite de nombreuses étapes de synthèse et une chimie assez complexe). De ce fait, dans ce travail de thèse, nous avons décidé en première approche d'utiliser des lipides commerciaux de type dipalmitoyle comportant une fonction amine au niveau de la tête polaire.

Dans le but d'obtenir les architectures envisagées, nous avons développé de nouvelles plateformes polymères modulables, basées sur des copolymères réactifs bien définis fonctionnalisés en extrémité de chaîne α par un lipide via l'utilisation du procédé de polymérisation radicalaire contrôlé RAFT (*Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer*)¹⁰. La stratégie de synthèse choisie dans ce projet permet à la fois le contrôle de l'architecture et de la composition des chaînes polymères formées, mais également de moduler la nature du lipide et la nature et le nombre de chromophores qui seront couplés de manière covalente sur les sites réactifs présents le long des chaînes polymères.

Le procédé RAFT présente de nombreux avantages permettant de répondre aux objectifs fixés¹¹ :

- contrôle de la taille et de la composition des chaînes
- contrôle de l'architecture des chaînes polymères
- distributions de masses molaires étroites (indice de polymolécularité proche de 1)
- contrôle de la fonctionnalisation des extrémités de chaîne
- compatibilité avec de nombreuses familles de monomères (polaires, fonctionnels...)
- conditions de synthèse douces
- Absence de catalyseurs toxiques

La thèse d'Arnaud Favier a permis de montrer que ce procédé RAFT permettait d'obtenir des copolymères réactifs et biocompatibles de type poly(*N*-acryloylmorpholine-co-*N*-acryloxysuccinimide) noté poly(NAM-co-NAS), qui présentent un fort potentiel en vue d'applications biologiques, et qui se caractérisent par un très bon contrôle non seulement au niveau de leur architecture mais également en ce qui concerne leur composition et microstructure^{12,13}.

La *N*-acryloylmorpholine (NAM) est un monomère dérivé de l'acrylamide qui conduit à des chaînes hydrophiles et biocompatibles ayant des propriétés proches de celles du PEG¹⁴. Le *N*-acryloxysuccinimide (NAS) est quant à lui un acrylate présentant une fonction réactive de type ester activé, qui permettra le couplage des chromophores en position latérale par formation d'une liaison amide (liaison stable).

L'étude de la copolymérisation par le procédé RAFT de ces deux monomères a permis de mettre en évidence qu'il existait, comme en polymérisation radicalaire conventionnelle, une composition azéotropique : 60% molaire en NAM et 40% molaire en NAS¹³. A cette composition initiale particulière, les vitesses de consommation des deux monomères est identique ce qui permet de conserver une composition du milieu réactionnel constante au

cours de la polymérisation, et donc d'obtenir une composition des copolymères constante le long de la chaîne et identique à la composition initiale du mélange. Les polymères obtenus sont parfaitement homogènes en terme de composition avec des unités réactives NAS réparties régulièrement le long de la chaîne polymère.

Par ailleurs, les propriétés du procédé RAFT ont également été mises à profit dans la thèse de Maël Bathfield pour l'élaboration de polymères α -fonctionnels, via la synthèse d'agents de contrôle (agents de transfert de chaînes, ATC) fonctionnels^{15,16}. Un de ces ATC, porteur d'un phospholipide, a permis de contrôler efficacement l'homopolymérisation de la NAM. Cette étude a clairement montré que les chaînes conservent le lipide à leur extrémité α et qu'elles peuvent être utilisées pour stabiliser des assemblages de type Lipo-Particules¹⁷.

L'architecture polymère envisagée dans ce projet résulte de la combinaison des deux approches précédemment explorées dans notre équipe, afin de synthétiser non pas un homopolymère mais des copolymères poly(NAM-co-NAS) fonctionnalisés en extrémité α de chaîne avec un phospholipide.

Ce manuscrit comporte cinq chapitres. Une étude bibliographique a tout d'abord été réalisée afin de situer la structure de la sonde lipidique que nous proposons de synthétiser parmi les structures lipidiques fluorescentes déjà existantes (**chapitre 1**).

L'objectif des travaux décrits dans le chapitre 2 était de synthétiser deux ATC lipidiques, de vérifier qu'ils permettent de contrôler la copolymérisation des monomères NAM et NAS par le procédé RAFT, puis de synthétiser des bio-conjugués LPC par couplage de chromophores émettant dans le rouge lointain (**chapitre 2**).

Les bio-conjugués LPC obtenus ont ensuite été caractérisés par spectroscopie UV/Visible et de fluorescence, en collaboration avec l'équipe de Chantal Andraud (ENS de Lyon), dans le but de déterminer leurs propriétés optiques et de vérifier s'il est possible d'augmenter la brillance des sondes en couplant plusieurs chromophores sur la chaîne polymère (**chapitre 3**).

Des tests d'incorporation des bio-conjugués LPC au sein de systèmes lipidiques modèles (SUVs, LUVs et GUVs) ont ensuite été réalisés, en collaboration avec Cyril Favard (CPBS Montpellier), dans le but d'étudier les interactions des bio-conjugués LPC avec des bicouches lipidiques (**chapitre 4**).

Enfin, des tests d'internalisation des bio-conjugués LPC au sein de cellules vivantes ont été réalisés en collaboration avec l'équipe de Delphine Muriaux (ENS de Lyon puis CPBS Montpellier). Ces tests avaient pour objectif d'évaluer la cytotoxicité éventuelle des bio-conjugués LPC puis, d'étudier leur cinétique d'internalisation et leur localisation au sein des cellules (**chapitre 5**).

Bibliographie.

1. Palsdottir, H. & Hunte, C. Lipids in membrane protein structures. *Biochimica et biophysica acta* **1666**, 2–18 (2004).
2. Waheed, A. & Freed, E. O. Lipids and membrane microdomains in HIV-1 replication. *Virus research* **143**, 162–76 (2009).
3. Ono, A., Ablan, S. D., Lockett, S. J., Nagashima, K. & Freed, E. O. Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *PNAS* **101**, 14889–14894 (2004).
4. Saad, J. S. *et al.* Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *PNAS* **103**, 11364–11369 (2006).
5. Gullapalli, R. R., Demirel, M. C. & Butler, P. J. Molecular dynamics simulations of DiI-C18(3) in a DPPC lipid bilayer. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **10**, 3548–60 (2008).
6. Lisboa, S., Scherer, G. E. F. & Quader, H. Localized endocytosis in tobacco pollen tubes: visualisation and dynamics of membrane retrieval by a fluorescent phospholipid. *Plant cell reports* **27**, 21–8 (2008).
7. Maier, O., Oberle, V. & Hoekstra, D. Fluorescent lipid probes: some properties and applications (a review). *Chemistry and physics of lipids* **116**, 3–18 (2002).
8. Rasmussen, J.-A. M. & Hermetter, A. Chemical synthesis of fluorescent glycerol- and sphingolipids.pdf. *Progress in Lipid Research* **47**, 436–460 (2008).
9. Albers, A. E., Dickinson, B. C., Miller, E. W. & Chang, C. J. A Red-Emitting Naphtofluorescein-Based Fluorescent Probe for Selective Detection of Hydrogen Peroxide in Living Cells. *Bioorg Med Chem Lett.* **18**, 5948–5950 (2008).
10. Chiefari, J. *et al.* Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer : The RAFT Process. *Macromolecules* **31**, 5559–5562 (1998).
11. Favier, A. & Charreyre, M.-T. Experimental Requirements for an Efficient Control of Free-Radical Polymerizations via the Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Process. *Macromolecular Rapid Communications* **27**, 653–692 (2006).
12. Favier, A. Thèse, Université Lyon 1. (2002).
13. Favier, A., D'Agosto, F., Charreyre, M.-T. & Pichot, C. Synthesis of N-acryloxysuccinimide copolymers by RAFT polymerization, as reactive building blocks with full control of composition and molecular weights. *Polymer* **45**, 7821–7830 (2004).
14. Bonora, G. M., Baldan, A., Schiavon, O., Ferruti, P. & Veronese, F. M. Poly(*N*-acryloylmorpholine) as a new Soluble Support for the Liquid-Phase Synthesis of Oligonucleotides. *Tetrahedron letters* **37**, 4761–4764 (1996).
15. Bathfield, M. Thèse, Université Lyon 1. (2006).
16. Bathfield, M., D'Agosto, F., Spitz, R., Charreyre, M.-T. & Delair, T. Versatile precursors of functional RAFT agents. Application to the synthesis of bio-related end-functionalized polymers. *Journal of the American Chemical Society* **128**, 2546–2547 (2006).
17. Bathfield, M. *et al.* Synthesis of Lipid-alpha-End-Functionalized Chains by RAFT Polymerization . Stabilization of Lipid / Polymer Particle Assemblies. *Macromolecules* **41**, 8346–8353 (2008).

CHAPITRE 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Les bio-conjugués Lipidiques pour le marquage membranaire de cellules vivantes

Sommaire

I.	INTRODUCTION.....	9
II.	Membranes et lipides.	9
II.1.	Les membranes plasmiques cellulaires.....	10
II.1.1.	Généralités.	10
II.1.2.	Composition chimique des membranes.....	11
II.1.3.	Rôle des membranes plasmiques.....	13
II.2.	Les lipides membranaires.	15
II.2.1.	Les phospholipides.	16
II.2.2.	Les glycolipides.	18
II.2.3.	Les stérols.	19
II.2.4.	Fluidité membranaire et mouvement des lipides.	21
II.3.	Conclusions.	22
III.	Les lipides fluorescents.	22
III.1.	Couplage du chromophore sur les chaînes alkyles.....	24
III.2.	Couplage du chromophore sur la tête polaire.....	26
III.3.	Couplage du chromophore au niveau de la partie centrale du lipide.	28
III.4.	Conclusions.	29
IV.	Les bio-conjugués Lipide-Polymères.	30
IV.1.	Introduction du lipide en extrémité de chaîne polymère.	32
IV.1.1.	Bio-conjugués Lipide-Polymères obtenus autrement que par polymérisation radicalaire contrôlée (PRC).....	32
IV.1.2.	Bio-conjugués Lipide-Polymères obtenus par polymérisation radicalaire contrôlée (PRC).....	36
IV.2.	Introduction du lipide en position latérale de la chaîne polymère.	39
IV.3.	Les bio-conjugués Lipide-Polymères fluorescents.....	43
IV.3.1.	Couplage de chromophores sur des bio-conjugués Lipide-Polymères commerciaux.....	43
IV.3.2.	Couplage de lipides sur des chaînes polymères synthétisées au laboratoire.	44
IV.3.3.	Synthèse de bio-conjugués possédant un squelette polymère fluorescent.	45
IV.3.4.	Cas particulier : Formation d'hydrogels lipidiques fluorescents.....	46
IV.4.	Conclusions.....	47
V.	Conclusions du chapitre 1.	48

I. INTRODUCTION

Les lipides sont des constituants essentiels des membranes cellulaires. En effet, ils sont impliqués dans de nombreux phénomènes importants au sein de la cellule, et notamment dans les voies de signalisation. L'étude de ces différents phénomènes membranaires implique que les membranes et ses constituants, les lipides notamment, puissent être observables. De ce point de vue, la microscopie en général et la microscopie de fluorescence en particulier, semble être un outil de choix permettant de visualiser les membranes cellulaires et leur dynamique.

La visualisation des membranes cellulaires peut également être réalisée grâce à l'utilisation de lipides fluorescents. Il existe différents types de lipides fluorescents, classés en fonction de la localisation du chromophore sur la molécule. Dans cette étude bibliographique, les différents types de lipides fluorescents seront présentés, ainsi que les avantages et les inconvénients de ces structures lors de leur utilisation en biologie.

Lors de ce projet de thèse, notre objectif est de synthétiser de nouveaux bio-conjugués Lipide-Polymère-Chromophores pouvant être utilisés pour le marquage fluorescent des bicouches lipidiques. Ces bio-conjugués présentent un lipide en extrémité de chaîne (permettant l'incorporation au sein des membranes cellulaires) et un nombre modulable de chromophores sur la chaîne polymère (permettant d'améliorer la brillance).

Le second objectif de ce chapitre bibliographique sera donc de réaliser une étude des divers bio-conjugués Lipide-Polymère-Chromophores décrits dans la littérature afin de pouvoir situer la structure que nous proposons de synthétiser par rapport à celles déjà existantes.

Ce chapitre sera donc composé de trois grandes parties. La première partie concernera la présentation des membranes cellulaires ainsi que leurs constituants, et notamment les lipides. Dans la seconde partie, les différents types de lipides fluorescents seront présentés, avec leurs avantages et leurs inconvénients. Enfin, dans la dernière partie, je présenterai les différents types de bio-conjugués Lipide-Polymères, avant de présenter les bio-conjugués Lipide-Polymères fluorescents déjà décrits dans la littérature.

II. Membranes et lipides.

Les membranes, qui sont des assemblages de lipides, de protéines et de sucres, délimitent à la fois la cellule elle-même (dans le cas de la membrane plasmique), mais également les différents organites intracellulaires¹. Dans cette étude bibliographique nous nous intéresserons en particulier aux membranes plasmiques des cellules.

Ces membranes sont des structures indispensables à tout être vivant. En effet, les cellules doivent se nourrir, éliminer leurs déchets et interagir avec le milieu extérieur tout en conservant leur intégrité tant au niveau de la composition que de l'organisation. De ce fait,

la membrane plasmique est un élément essentiel des cellules vivantes puisque c'est le point de contact entre le milieu extérieur et l'intérieur des cellules^{2,3,4,5}.

C'est pourquoi de nombreuses équipes de recherche se sont intéressées à étudier la composition, le fonctionnement et la dynamique de ces membranes plasmiques, mais également à comprendre tous les phénomènes biologiques qui y sont associés comme le bourgeonnement de particules virales.

II.1. Les membranes plasmiques cellulaires.

II.1.1. Généralités.

Dès le début du 19^{ème} siècle, de nombreux travaux ont été menés sur la perméabilité cellulaire. Les naturalistes avaient déjà quelques idées précises sur la nature des membranes cellulaires : une épaisseur inférieure à $0.2\mu\text{m}^6$ (qui correspond à la limite de détection du microscope optique). De plus, après avoir testé la pénétration de différentes substances organiques à l'intérieur de la cellule, ils se sont rendu compte que certains éthers ou cétones (de même que tous les composants solubles dans ces deux solvants) se retrouvaient aisément dans le cytoplasme des cellules étudiées, bien plus rapidement que les substances plus polaires^{2,6,7}. Ces observations les ont conduits à la conclusion que les membranes plasmiques étaient composées de lipides.

En 1926, deux chercheurs hollandais nommés Gorter et Grendel ont étudié la composition chimique de ces membranes et ont mis en évidence le concept de bicouches lipidiques^{2,6,7,8}. Dix ans plus tard, Danielli et Dawson se sont intéressés aux tensions superficielles qui règnent à la surface des cellules vivantes et ont montré que le modèle proposé dix ans plus tôt était incomplet. En 1940, ils ont conçu le modèle du « sandwich lipo-protéique » composé de la bicouche de lipides, comme établit par Gorter et Grandel, prise en sandwich entre deux couches de protéines⁶.

Plus tard, la microscopie électronique a permis de confirmer l'hypothèse de la structure en sandwich lipo-protéique : une couche centrale claire, qui correspondrait à la double-couche de lipides, entourée de deux couches sombres qui elles correspondraient aux têtes polaires des lipides ainsi qu'aux protéines^{6,7}.

Cependant, le concept de sandwich lipo-protéique tel que définit par Danielli et Dawson ne permettait pas d'expliquer la perméabilité des membranes à l'eau ou tout autre composant polaire comme les glucides. C'est pourquoi, Danielli et Stein apportèrent quelques modifications au modèle précédent en imaginant des pores aqueux traversant la membrane et bordés de protéines⁶.

C'est avec la mise au point de la cryofracture que les choses ont pu avancer en ce qui concerne la compréhension de la structure des membranes plasmiques. En effet, les

premières images obtenues ont complètement remis en question le modèle de sandwich lipo-protéique défini précédemment : les surfaces observées semblaient très granuleuses, présentant des sortes de paquets et de grains de tailles variées sur un fond lisse et uniforme. L'étude en cryofracture de liposomes riches en protéines a permis de mettre en évidence le fait que ces grains correspondaient aux protéines de la membrane. Il a ainsi pu être démontré que les protéines membranaires n'étaient pas situées sur les faces internes ou externes de la membrane plasmique, mais qu'elles étaient ancrées au sein de celle-ci. De plus, cette nouvelle approche a permis de mettre en évidence que les protéines se présentaient sous une forme globulaire^{3,7}.

Un modèle a donc été avancé : le modèle de la **mosaïque fluide**^{3,8}. On le dit fluide puisque tout l'édifice est lié par des interactions de faible énergie, que ce soit les interactions lipides-lipides ou les interactions lipides-protéines. Les membranes plasmiques sont donc fluides, et les constituants qui la composent sont très mobiles.

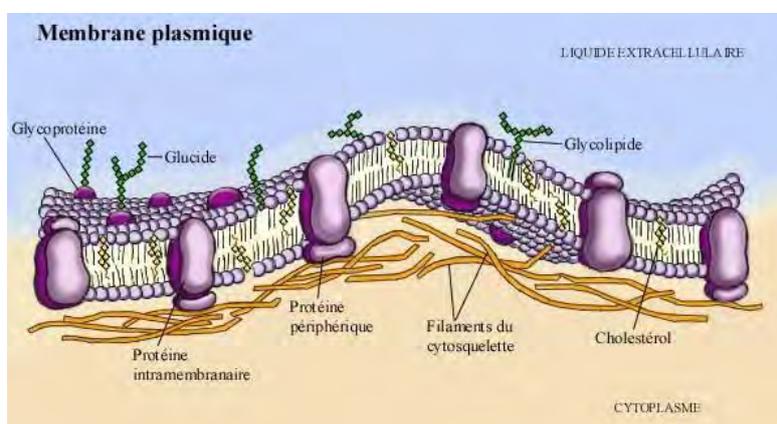


Figure II.1. Modèle de la mosaïque fluide.

(Tirée du site internet : <http://ustboniface.mb.ca/cusb/abernier/biologie/Cellule/membrane.html>)

La figure II.1. est une représentation schématique d'une membrane plasmique selon le modèle de la mosaïque fluide. La membrane est constituée majoritairement de lipides auto-assemblés en bicouche. Les membranes sont également composées de protéines et de sucres présents à la surface externe des membranes.

C'est ce modèle de la mosaïque fluide qui est utilisé de nos jours pour représenter la structure de la membrane plasmique.

II.1.2. Composition chimique des membranes.

Un des rôles de la membrane plasmique est d'assurer les échanges entre le milieu extracellulaire et le milieu cytoplasmique. Cet échange est rendu possible grâce à la présence de deux constituants : les lipides et les protéines.

II.1.2.1. Les lipides membranaires.

Les lipides constituent, avec les protéines, les constituants essentiels des membranes plasmiques cellulaires⁹.

Les membranes cellulaires sont constituées de deux feuillets dans lesquels les lipides sont organisés tête-bêche, les têtes polaires étant dirigées vers les surfaces externe (milieu extracellulaire) et interne (milieu cytoplasmique) tandis que les parties hydrophobes constituent le cœur de la membrane. Cette organisation a pour but de minimiser les interactions entre les parties hydrophobes des lipides et les molécules d'eau¹.

Les compositions en lipides des membranes varient d'un type cellulaire à un autre, et même au sein d'une même cellule^{10,11,12}, le type de lipides constituant une membrane dépend de la fonction qu'assurera l'organe qu'elle délimite.

La partie II.2. de ce chapitre présentera plus en détails les différentes structures des lipides membranaires, ainsi que leurs rôles physiologiques majeurs.

II.1.2.2. Les protéines membranaires.

Les protéines membranaires jouent des rôles très différents au sein de la cellule. En effet, elles peuvent être impliquées aussi bien dans le transfert de molécules ou d'informations que dans la reconnaissance entre cellules, et jouent également un rôle de récepteur^{2,7,8}.

Il existe deux catégories de protéines membranaires selon leur mode d'interaction avec la bicouche de lipides^{1,4,5} :

- Les protéines extrinsèques :

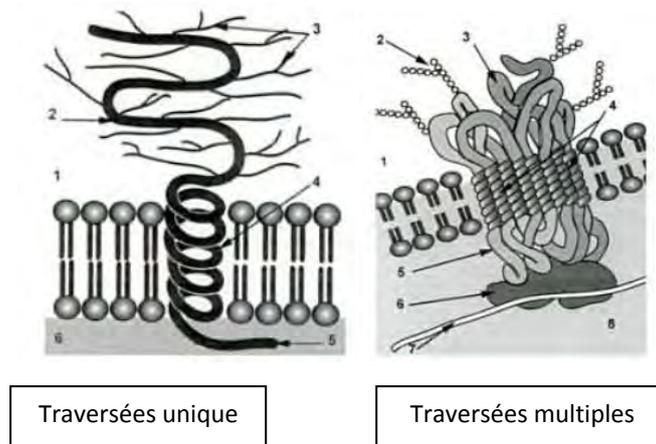
Appelées également protéines périphériques, ces protéines hydrophiles peuvent être éliminées de la surface de la membrane par simple lavage ou changement de pH. Elles sont liées de manière non covalente soit aux têtes polaires des molécules lipidiques qui composent la membrane, soit aux parties hydrophiles des protéines intrinsèques.

- Les protéines intrinsèques :

Appelées également protéines intégrales, ces protéines sont amphipatiques, c'est-à-dire qu'elles comportent différentes parties hydrophiles et hydrophobes dans leur structure ce qui leur permet d'intégrer la membrane plasmique. On peut néanmoins subdiviser cette classe de protéines en deux catégories :

- Les protéines transmembranaires qui traversent de part en part la membrane plasmique, expulsant ainsi les domaines hydrophiles dans les domaines intra et extracellulaires. La partie hydrophobe située au sein de la double couche lipidique adopte une conformation en hélice alpha (le plus souvent) ou une conformation en feuillet bêta.

Il existe également deux sous-catégories au sein même de cette famille : les protéines à traversée unique, c'est-à-dire qui ne traverse la double couche lipidique qu'une seule fois, et les protéines à traversées multiples (Figure II.2.).



1. Milieu extracellulaire
2. Domaine extracellulaire
3. Chaînes oligosaccharidiques
4. Hélices alpha transmembranaires
5. Domaine intracellulaire
6. Cytosol

1. Milieu extracellulaire
2. Chaîne polysaccharidique
3. Domaine extracellulaire
4. Hélices alpha transmembranaires
5. Domaine intracellulaire
6. Ankyrine

Figure II.2. Représentation schématique de l'insertion dans la membrane de protéines à traversée unique et à traversées multiples.

- Les protéines ancrées, ou à pied d'ancrage, ne traversent pas la membrane de part en part, seulement une partie émerge de la membrane du côté extracellulaire ou cytosolique (Figure II.3.). La partie hydrophobe de la protéine adopte également dans ce cas là une conformation en hélice alpha ou en feuillet bêta.

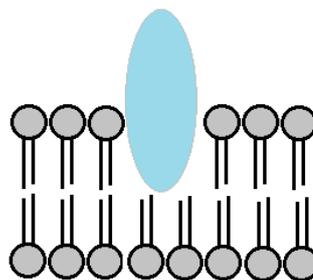


Figure II.3. Représentation schématique d'une protéine ancrée à la membrane plasmique.

II.1.3. Rôle des membranes plasmiques.

II.1.3.1. Barrière physique.

Comme toutes les membranes, la membrane plasmique joue le rôle de barrière physique et sépare l'intérieur de la cellule du milieu environnant^{13,9,14}. En effet, Les

membranes permettent de lutter contre l'entropie, c'est-à-dire qu'elle permet de conserver l'ordre établi au sein de la cellule, notamment en empêchant les ions et les organites cellulaires de diffuser librement à l'extérieur de la cellule⁷.

II.1.3.2. Perméabilité membranaire.

Bien que la membrane plasmique joue le rôle de barrière physique, elle reste néanmoins perméable à différentes substances comme l'eau, les lipides ou les ions. Afin de pouvoir se nourrir ou d'éliminer ses déchets, la cellule, via la membrane plasmique, doit pouvoir contrôler le flux de molécules organiques (sucres, acides aminés...) et d'ions nécessaires au maintien d'une concentration interne optimale : la membrane est donc une barrière sélective^{2,3,7}.

En ce qui concerne les ions et les petites molécules, le passage à travers la membrane se fait par simple transport passif⁴ (c'est-à-dire qui ne nécessite pas un apport d'énergie) qui s'effectue dans le sens normal de la diffusion suivant un gradient de concentration. On a deux types de transports passifs :

- Le transport passif par simple diffusion : il suit le gradient de concentration, c'est le cas des lipides et de l'eau.
- Le transport passif par diffusion accélérée : il fait intervenir des protéines transmembranaires qui forment un conduit continu. Dans le cas de la conduction d'ions, on parle de canaux ioniques.

La membrane plasmique est aussi le lieu de transit de macromolécules et de particules de tailles variables : ces processus sont nommés endocytose (entrée) et exocytose (sortie)^{4,7,8}.

Le processus d'endocytose fait le plus souvent intervenir des récepteurs membranaires situés sur la face externe de la membrane plasmique suivant un processus maintenant assez bien connu :

- Le ligand se fixe sur les récepteurs situés à la surface de la membrane,
- Les récepteurs se regroupent dans des dépressions de la membrane,
- Formation de vésicules,
- Fusion des vésicules et formation d'endosomes, le ligand se sépare des récepteurs et est acheminé vers l'organite cible à l'intérieur de la cellule tandis que les récepteurs sont recyclés (ils sont reconduits vers la face externe de la membrane).

L'exocytose est un processus intervenant lors de l'élimination de déchets ou d'expulsion de macromolécules qui auront un rôle hors de la cellule (par exemple des protéines de la matrice extracellulaire). Cette expulsion a lieu lorsque la membrane de la vésicule de transport fusionne avec la membrane plasmique libérant ainsi son contenu dans l'espace intercellulaire.

Le processus d'endocytose sera présenté plus en détails dans le chapitre 5 de ce manuscrit.

II.1.3.3. Transduction de signaux et transfert d'informations.

Les membranes plasmiques contiennent des protéines intrinsèques qui font partie de la famille des récepteurs membranaires capables de reconnaître et de fixer des molécules très spécifiques (hormones, neuromédiateurs) grâce à un domaine extracellulaire très volumineux^{2,4,7}. Suite à cette capture, la protéine change de conformation ce qui entraîne souvent une cascade de réactions à l'intérieur de la cellule, par exemple d'activation ou d'inhibition de systèmes enzymatiques, aboutissant à une modification de l'activité cellulaire : c'est la transduction du signal¹⁵.

Ainsi grâce à ces protéines, la cellule peut fixer différentes molécules telles que facteurs de croissance, hormones ou encore des protéines de la matrice extracellulaire.

II.1.3.4. Jonctions entre cellules et adhésion cellulaire.

La formation de tissus au sein des organismes pluricellulaires nécessite la présence de jonctions intercellulaires^{4,7}. La membrane plasmique, via ses protéines transmembranaires, est totalement indispensable à ce type d'ancrage des cellules entre-elles. En effet, les protéines membranaires de deux cellules voisines interagissent les unes avec les autres de façon plus ou moins lâche afin de créer des jonctions d'ancrage ou des jonctions serrées complètement étanches entre les cellules (les membranes plasmiques sont accolées).

La membrane plasmique joue également un rôle dans l'adhésion cellulaire, c'est-à-dire dans la reconnaissance et le contact entre les cellules mais également entre les cellules et les protéines de la matrice extracellulaire (désignant l'ensemble des macromolécules extracellulaires). Ces interactions génèrent de nombreux signaux indispensables. En effet, au cours du développement (notamment embryonnaire) de nombreux tissus se forment à partir de cellules ayant parfois des origines variées. Certaines protéines transmembranaires telles que les CAM (Cell Adhesion Molecules) qui possèdent un domaine d'adhérence extracellulaire permettent une reconnaissance des cellules nécessaire à la formation des tissus et des organes^{4,7}.

II.2. Les lipides membranaires.

Les lipides sont des molécules amphiphiles présentant une extrémité polaire de type phosphate, sucre, amine ou alcool et d'une ou de deux queues hydrophobes constituées de chaînes alkyles plus ou moins longues^{1,5,8} (Figure II.4.). Généralement, une des deux chaînes alkyles est saturée, alors que la seconde présente une ou plusieurs insaturations.

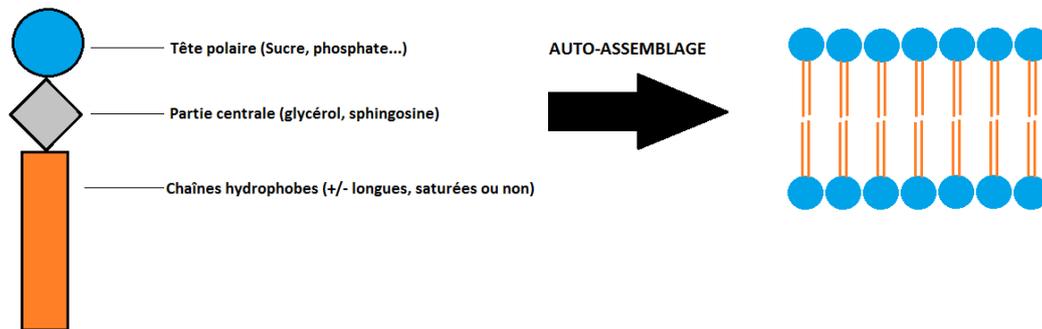


Figure II.4. Représentation schématique d'un lipide et de la formation de bicouches par auto-assemblage.

Ce caractère amphiphile leur confère la capacité de s'auto-assembler en bicouches, qui forment les membranes plasmiques^{1,11} (Figure II.4.).

Il existe différents types de lipides qui peuvent être classés en trois grandes familles en fonction de leur structure chimique : les phospholipides, les glycolipides et les stérols^{7,5,8}.

II.2.1. Les phospholipides.

Le terme de phospholipides vient de la présence d'un groupement phosphate faisant le lien entre la partie centrale et la tête polaire.

La catégorie des phospholipides peut être également divisée en deux sous catégories, en fonction de la structure chimique de la partie centrale reliant la tête polaire et les queues hydrophobes :

- Les glycérophospholipides
- Les sphingophospholipides

II.2.1.1. Les glycérophospholipides.

Cette catégorie regroupe les phospholipides dont la partie centrale est de type glycérol (Figure II.5.).

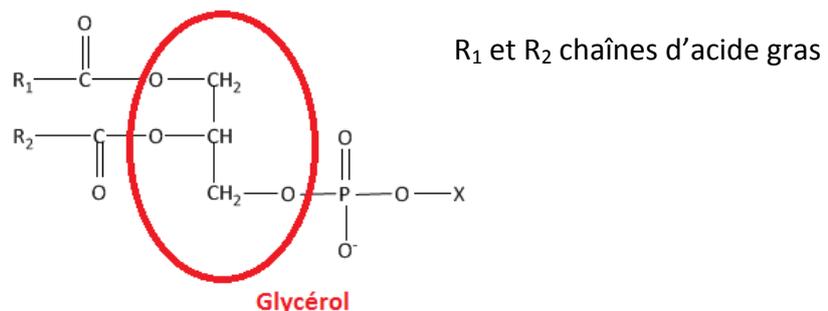


Figure II.5. Structure générale d'un glycérophospholipide.

Deux des fonctions alcool du glycérol sont estérifiées par deux chaînes d'acides gras, saturées ou non (mais jamais ramifiées chez les animaux). Quant à la troisième fonction alcool, elle est liée au phosphate qui sert de lien avec le reste de la tête polaire, le groupement X pouvant être variable^{7,5,8,16} (sucre, amine...).

L'ensemble formé par le glycérol estérifié par deux chaînes d'acides gras et lié de façon covalente à l'acide phosphorique est appelé « groupement phosphatidyl ». Généralement, le nom des phospholipides est composé de « phosphatidyl » suivi du nom de la molécule liée au niveau de l'acide phosphorique : par exemple, lorsque l'acide phosphorique est lié à une molécule de choline, on parle de phosphatidylcholine.

Les phospholipides forment la classe de lipides la plus abondante dans les membranes des cellules animales.

II.2.1.2. Les sphingophospholipides.

Contrairement au cas précédent, les lipides qui composent cette catégorie sont constitués d'une partie centrale dérivée de la sphingosine^{7,2,16}, qui présente deux types de fonctions : alcool et amine (Figure II.6.).

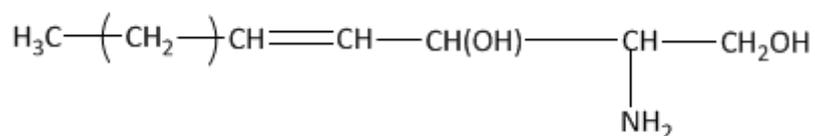


Figure II.6. Structure de la sphingosine.

Lorsque la fonction amine de la sphingosine est amidifiée par un acide gras, on obtient la céramide. La tête polaire est couplée au groupement -OH de la céramide via le groupement phosphate conduisant à la formation d'un sphingophospholipide (Figure II.7.).

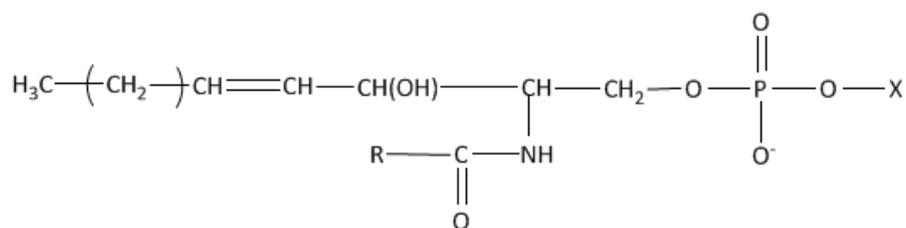


Figure II.7. Structure générale d'un sphingophospholipide.

Le groupement X au niveau du phosphate est généralement de même nature que celui qui est retrouvé dans le cas des glycérophospholipides.

Cette catégorie de phospholipides est beaucoup moins répandue dans les membranes plasmiques que les lipides de la catégorie précédente. Par exemple, la sphingomyéline est le seul phospholipide des membranes plasmiques à ne pas être construit à partir d'une partie centrale de type glycérol². Ce lipide, de structure particulière, est impliqué dans des processus très particuliers comme la mort cellulaire par apoptose¹⁷.

II.2.1.3. Rôle de phospholipides.

Même si leur rôle principal est de nature structural, certains phospholipides ont des propriétés fonctionnelles très importantes. En effet, les lipides peuvent jouer des rôles primordiaux dans différents systèmes biologiques, comme celui de cofacteurs¹⁶ par exemple en permettant l'activation de certaines protéines, comme les enzymes, en se liant à ces dernières.

Les phospholipides membranaires à charge nette négative, par exemple, jouent un rôle important dans le processus de coagulation sanguine en formant un complexe appelé *Complexe Prothrombinase*¹⁶. Ce complexe permet une conversion de la Prothrombine en Thrombine qui est une protéase active qui conduit à la formation de fibrine, constituant majeur du caillot sanguin.

Les phospholipides membranaires jouent également un rôle dans la régulation de certaines protéines telles que les enzymes^{8,16}. Par exemple, l'alpha-hydroxybutyrate déshydrogénase (enzyme présente dans le cytoplasme des hépatocytes) est activée lorsqu'elle est liée à la phosphatidylcholine via la tête choline.

On peut également citer l'exemple du facteur d'activation plaquettaire (Platelet Activating Factor : PAF) qui est un dérivé de la glycérophosphorylcholine et qui provoque l'agrégation des plaquettes sanguines, préalable à la coagulation¹⁶.

Le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P2) est un phospholipide qui est impliqué dans l'assemblage et le bourgeonnement du virus HIV-1. Via sa tête polaire saccharidique, le PI(4,5)P2 participe au ciblage des protéines virales au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique de la cellule hôte^{18,19}.

II.2.2. Les glycolipides.

Par analogie aux phospholipides, les « glycolipides » sont constitués d'une tête polaire saccharidique liée directement à la partie centrale¹ (Figure II.8.). Il existe également deux sous-catégories de glycolipides :

- Les diacylglycoglycérides : Ce sont des lipides également basés sur une partie centrale de type glycérol. Deux des fonctions –OH sont estérifiées par des chaînes d'acides gras mais la troisième fonction alcool est engagée dans le couplage d'un sucre via une liaison glycosidique (Figure II.8.).

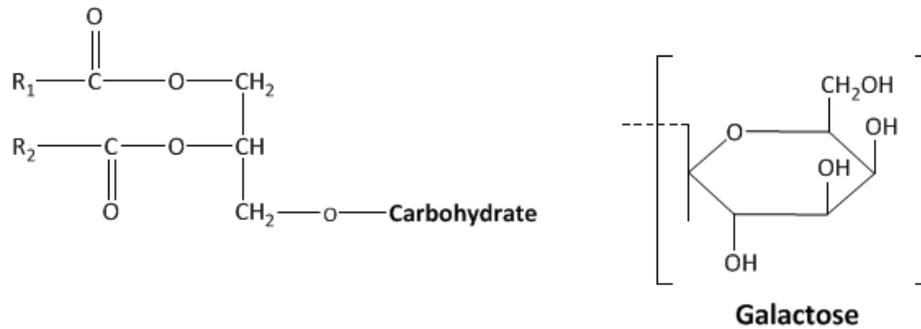


Figure II.8. Structure générale d'un glycolipide (gauche) et d'un exemple de sucre: le galactose (droite).

- Les sphingoglycolipides : Il s'agit de lipides dont la partie centrale est constituée d'un dérivé de la sphingosine. L'alcool primaire de la céramide est utilisé pour le couplage d'un carbohydre via une liaison glycosidique (Figure II.9.).

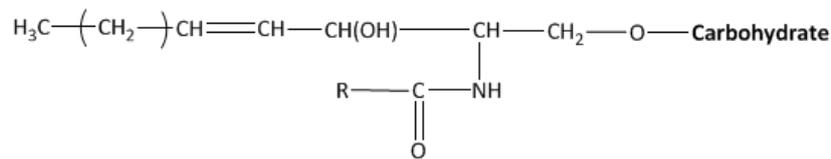


Figure II.9. Structure générale d'un sphingoglycolipide.

Les glycolipides sont surtout présents dans le système nerveux et le cerveau² et, à la différence des phospholipides, ne sont pas chargés.

II.2.3. Les stérols.

Les bactéries mises à part, les membranes cellulaires de tous les êtres vivants contiennent des stérols^{7,2,20}. Ce sont des alcools tétracycliques, alicycliques qui sont dérivés du *Cyclopenténo-perhydro-phénanthrène*.

Le stérol le plus abondant dans les membranes plasmiques est le Cholestérol^{1,5,8,20} de formule brute C₂₇H₄₆O, qui comporte un noyau tétracyclique et une queue hydrocarbonée (Figure II.10.).

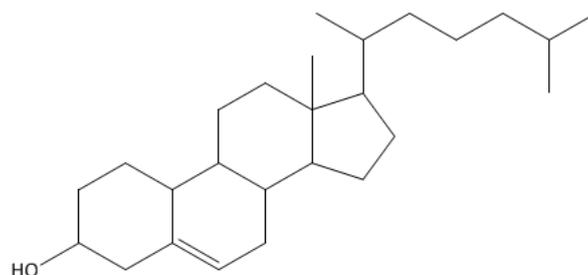


Figure II.10. Structure du cholestérol.

Le cholestérol est une molécule globalement hydrophobe avec un faible caractère amphiphile. En effet, le seul groupement hydrophile est constitué par la fonction hydroxyle libre en position 3 alors que la partie hydrophobe correspond au noyau tétracyclique et à la queue hydrocarbonée¹.

A l'intérieur de la membrane plasmique, le cholestérol est inséré entre les lipides. Le noyau tétracyclique sépare les chaînes aliphatiques phospholipidiques du carbone 1 au carbone 10^{2,5} (Figure II.11.).

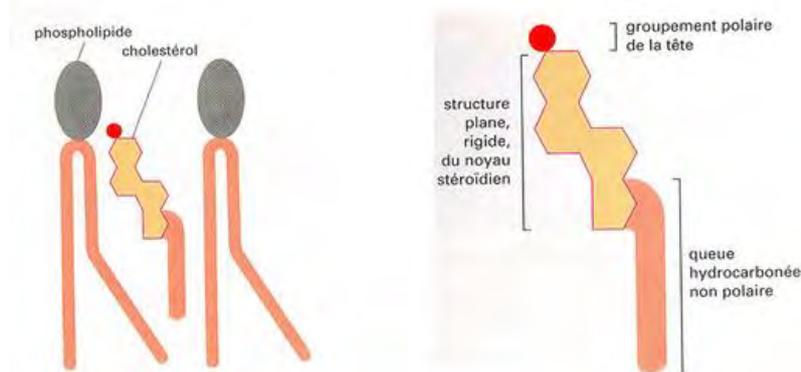


Figure II.11. Représentation schématique de l'insertion du cholestérol dans les bicouches lipidiques.
(Tiré du site web : <http://www.humans.be/pages/biomb.htm>)

Dans la membrane plasmique, le cholestérol joue le rôle de régulateur de la fluidité membranaire : le cholestérol rigidifie la membrane⁵. Sa position au sein de la double-couche de lipides lui permet d'avoir de nombreux autres effets sur les propriétés physiques de la membrane^{5,8} :

- En s'intercalant entre les chaînes d'acides gras, il empêche leur interaction et la cristallisation
- Il augmente « l'ordre » au sein de la bicouche de lipides en diminuant le degré de liberté des chaînes d'acides gras. Le noyau stérol gêne les mouvements des chaînes. La diminution du degré de liberté se fait surtout au voisinage de la tête polaire (au niveau du glycérol ou de la sphingosine), mais le cholestérol n'a aucun effet sur le centre de la bicouche
- En s'insérant entre les lipides, le cholestérol favorise la formation de configurations *Trans* entre les atomes de carbones des lipides insaturés, ce qui a pour conséquence d'étirer les chaînes lipidiques et ainsi d'augmenter l'épaisseur de la membrane
- En s'intercalant entre les chaînes, le cholestérol permet une diminution du volume libre au sein de la bicouche ce qui a pour effet notamment de diminuer la perméabilité membranaire mais surtout de diminuer la mobilité conformationnelle des protéines membranaires intrinsèques, et donc de moduler leur fonctionnement.

Le cholestérol joue donc un rôle prépondérant dans la fluidité des membranes plasmiques.

II.2.4. Fluidité membranaire et mouvement des lipides.

La croissance, la reproduction et le déplacement de la cellule nécessitent une certaine fluidité de la membrane plasmique. Cette fluidité s'explique notamment par le fait que les lipides de la bicouche sont liés non pas par des interactions covalentes mais par attractions hydrophobes et ioniques^{5,21}.

Le caractère fluide de la membrane est directement lié à la structure des lipides qui la constituent ainsi qu'à la présence et à l'abondance de cholestérol. En effet, les chaînes hydrocarbonées courtes ainsi que l'insaturation favorisent la fluidité des membranes alors que la saturation et les longues chaînes lipidiques la diminuent. Les longues chaînes hydrocarbonées permettent la formation de nombreuses interactions hydrophobes ce qui augmente la viscosité de la membrane et diminue la fluidité. En revanche, l'insaturation entraîne des courbures au sein des chaînes hydrocarbonées ce qui diminue la stabilité des interactions de Van der Waals et empêche le compactage et l'organisation des chaînes^{21,22}.

Les bicouches lipidiques sont des systèmes qui présentent une température de transition de phases, qui correspond au passage entre une forme fluide et une forme gel²³. Cette température dépend de la structure des lipides qui la compose : la présence majoritaire de lipides à chaînes hydrocarbonées saturées entraîne une température de transition élevée, en revanche, lorsque les membranes sont majoritairement constituées de lipides à chaînes courtes ou insaturées, cette température de transition est faible.

Le cholestérol joue lui aussi un rôle prépondérant dans la fluidité de la membrane plasmique. Il joue un rôle de régulateur de la fluidité membranaire : lorsque la température de l'environnement cellulaire diminue (en dessous de la température de transition de phase) le cholestérol maintient une certaine fluidité de la membrane en empêchant les chaînes lipidiques d'interagir et ainsi de former un gel (rôle plastifiant). Par contre, lorsque la température de l'environnement de la cellule augmente, le cholestérol tend à diminuer la fluidité de la membrane en interagissant avec la partie supérieure des chaînes d'acides gras et donc en limitant leurs mouvements^{5,21} (rôle rigidifiant).

Au sein de la membrane plasmique, différents types de mouvements des lipides ont pu être observés. La diffusion latérale le long de la surface de la membrane est très rapide, les lipides échangent leur place 10^7 fois par seconde avec leurs voisins. Cette diffusion ne concerne pas que les lipides mais également les protéines membranaires. La diffusion latérale permet également une séparation de phase des lipides de la bicouche et donc la création de microdomaines lipidiques de différentes compositions. La rotation est un autre mouvement très fréquemment observé, les lipides tournent sur eux-mêmes autour de leur axe longitudinal. Enfin, il existe un mouvement de bascule ou « flip-flop » correspondant au passage de lipides du feuillet interne (ou cytosolique) de la membrane au feuillet externe. Ce mouvement est un mouvement très lent, puisqu'il nécessite le passage de la partie hydrophile des lipides à travers la double couche totalement hydrophobe^{5,8}.

II.3. Conclusions.

Les membranes plasmiques sont des structures primordiales des cellules vivantes. En plus de jouer un rôle de barrière physique, elles permettent le passage de nombreuses molécules, d'ions ou de molécules d'eau, essentiels pour la cellule.

Ces membranes cellulaires sont constituées majoritairement de lipides qui sont organisés en bicouche, présentant donc deux feuilletts lipidiques interne (cytosolique) et externe (extracellulaire) généralement de compositions différentes. Il existe une grande diversité de lipides au sein des membranes cellulaires, mais celles-ci sont majoritairement composées de glycérophospholipides, sphingophospholipides et de cholestérol.

III. Les lipides fluorescents.

La microscopie de fluorescence est un outil de choix permettant l'étude de la localisation et du fonctionnement des lipides dans les membranes lipidiques, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, via l'utilisation d'analogues fluorescents de lipides.

En effet, l'utilisation de lipides fluorescents permet d'étudier la dynamique des bicouches de lipides qui composent la membrane des cellules. Par exemple, l'utilisation du FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)²⁴, qui consiste à irradier une zone de la membrane afin de photoblanchir les lipides fluorescents, permet de déterminer le coefficient de diffusion des lipides au sein d'une bicouche et d'étudier la mobilité des lipides dans les membranes cellulaires en mesurant le temps nécessaire aux lipides fluorescents pour venir recoloniser la zone photoblanche.

D'autres équipes utilisent les lipides fluorescents afin d'étudier les phénomènes de fusions membranaires soit entre vésicules lipidiques soit entre vésicules lipidiques et membranes plasmiques de cellules vivantes^{24,25}. Lors de ces tests, le FRET ou transfert d'énergie de type Förster est généralement utilisé. Ce transfert d'énergie implique deux molécules fluorescentes, ici deux lipides, qui présentent une compatibilité en terme d'énergie afin de conduire à un transfert d'énergie non radiatif d'un donneur à un accepteur d'énergie. Cette compatibilité implique que le spectre d'émission de fluorescence du donneur recouvre, au moins partiellement, le spectre d'excitation de l'accepteur. Ainsi, en excitant le donneur, c'est la fluorescence de l'accepteur qui sera majoritairement observée dans le cas où les conditions de FRET sont réunies. Deux méthodes sont donc utilisées pour étudier la fusion membranaire :

- Les lipides donneur et accepteur sont chacun présents dans un type de vésicules. Lorsque le donneur est excité il émet sa propre fluorescence. Après fusion des vésicules, les lipides donneur et accepteur se retrouvent à proximité dans une même membrane et lorsque le donneur est excité, une partie ou la totalité de ses photons de fluorescence sont absorbés par le lipide accepteur et la fluorescence de l'accepteur est observée.

- Dans la deuxième méthode, les deux lipides sont présents dans les mêmes vésicules et donc lorsque le lipide donneur est excité un transfert d'énergie se produit et c'est la fluorescence de l'accepteur qui est observée. En revanche, lorsque les vésicules fusionnent avec d'autres vésicules sans lipides fluorescents ou avec une membrane plasmique cellulaire, la densité de surface de lipides fluorescents diminue ce qui a pour conséquence d'éloigner les lipides donneur et accepteur et donc d'empêcher le transfert d'énergie. Donc, après fusion, lorsque le donneur est excité il émettra sa propre fluorescence.

D'autres équipes de biologistes utilisent également les lipides fluorescents afin d'étudier le transport des lipides dans les cellules à travers les voies d'endocytose^{24,26}.

Les lipides fluorescents sont également utilisés pour étudier la localisation d'un type de lipide particulier au sein de la double-couche de lipides qui composent les membranes plasmiques. Ceci permet notamment de visualiser les différents domaines ou micro-domaines membranaires qui peuvent exister au sein des membranes plasmiques.

On comprend donc pourquoi il existe de nombreux lipides, notamment commerciaux, qui présentent une entité chromophorique soit au niveau d'une des deux chaînes alkyles soit au niveau de la tête polaire. Cependant, ce type de structure peut présenter quelques problèmes lors des utilisations en milieu biologique²⁴, comme expliqué dans les parties qui suivent.

D'autres problèmes plus liés aux propriétés optiques des lipides fluorescents peuvent intervenir lors de l'utilisation de ce genre de sondes. En effet, les lipides sont connus pour être très mobiles au sein des bicouches lipidiques ce qui peut avoir pour conséquence un rapprochement des lipides fluorescents et donc des phénomènes de quenching de la fluorescence par « stacking » des cœurs chromophoriques²⁴. De plus, certains chromophores sont connus pour former des dimères lorsque deux chromophores sont proches l'un de l'autre. Ces dimères peuvent présenter des propriétés optiques (absorption/émission) très différentes des propriétés de chromophores initiaux, ce qui peut poser problème lors des visualisations en microscopie en fluorescence avec notamment des longueurs d'ondes qui ne sont plus comprises dans la gamme de longueurs d'ondes des filtres utilisés. Enfin, il est également possible d'observer avec ce genre de sondes une perte ou une diminution de la fluorescence (photoblanchiment) lors d'une excitation répétée ou prolongée des lipides fluorescents.

De plus, il est très rare de trouver commercialement des lipides fluorescents qui émettent dans le rouge lointain, ce qui peut être extrêmement utile pour s'affranchir de l'autofluorescence parasite des cellules vivantes qui se situe généralement entre 400 et plus de 600 nm avec très souvent un pic d'émission situé autour de 550 nm^{27,28}.

Au vue de la structure générale des lipides, on s'aperçoit qu'il existe trois localisations potentielles des molécules fluorescentes (Figure II.4.) :

- Sur les chaînes alkyles
- Sur la tête polaire
- Au niveau de la partie centrale du lipide (glycérol ou sphingosine)

En fonction des applications visées pour les lipides fluorescents, et surtout de l'activité biologique des lipides marqués, chacune de ces trois positions présente des avantages et des inconvénients.

La diversité des lipides fluorescents, disponibles commercialement ou synthétisés au laboratoire, est très importante. En revanche, la gamme de chromophores couplés sur ces lipides est très étroite. Les chromophores les plus utilisés sont des chromophores de type Bodipy, Pyrène, NBD (nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole), Alexa Fluor^{®29}.

De plus, les lipides disponibles comportent généralement un seul chromophore couplé sur la tête polaire ou sur les chaînes alkyles hydrophobes. La brillance de ces sondes fluorescentes ainsi que les gammes de longueurs d'ondes disponibles sont donc limitées.

III.1. Couplage du chromophore sur les chaînes alkyles.

Le couplage du chromophore sur les chaînes grasses des lipides constitue la voie de marquage la plus répandue pour les lipides.

Différentes chimies sont utilisées pour réaliser le couplage de chromophores sur les chaînes alkyles lipidiques, dont le couplage par liaison amide, qui est la technique la plus couramment utilisée. Par exemple, Boldyrev et Molotkovsky³⁰ ont décrit, en 2005, la synthèse de lipides fluorescents de types sphingomyéline et galactocéramide (Figure III.1.) sur lesquels un chromophore de type BODIPY est couplé au niveau de la partie apolaire des lipides par liaison amide.

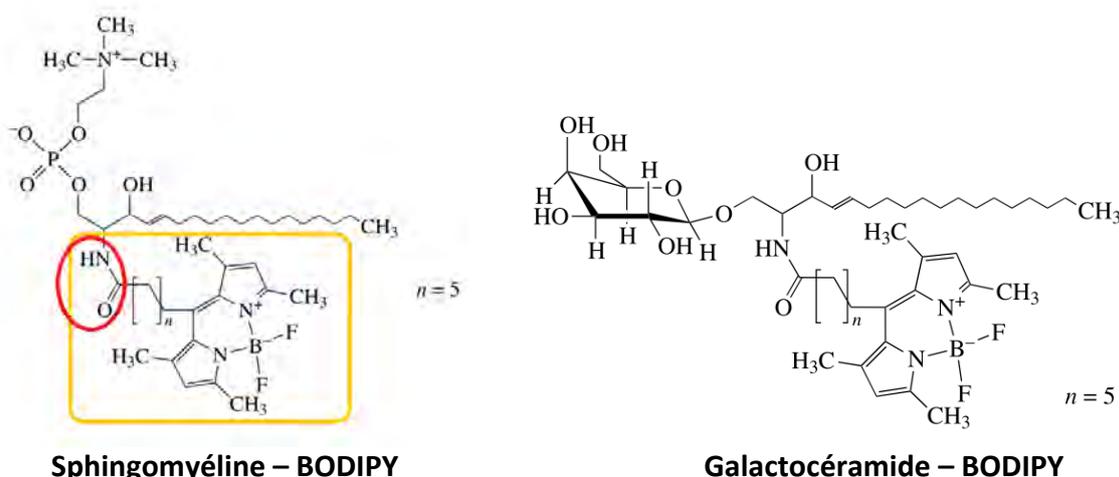
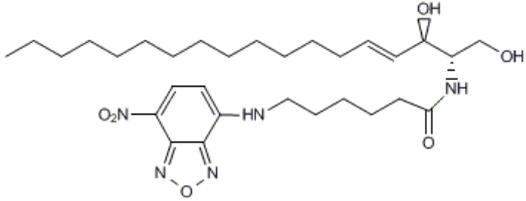
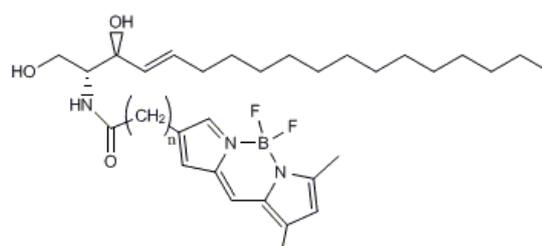
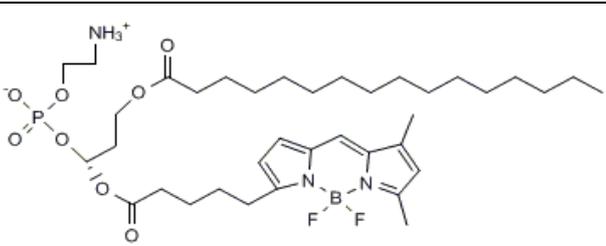
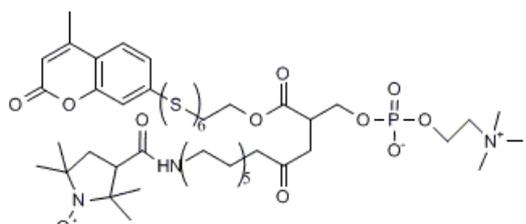
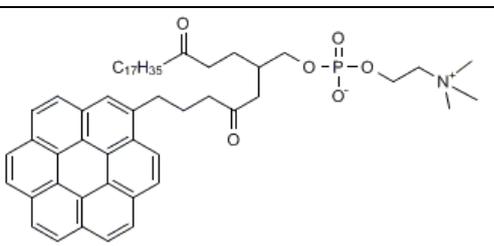
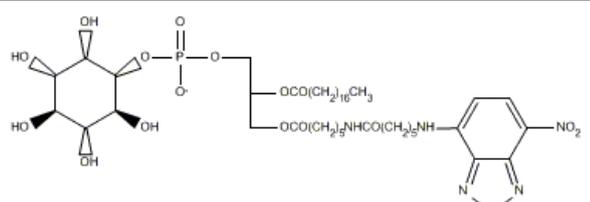
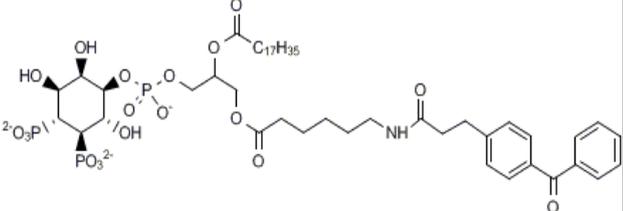
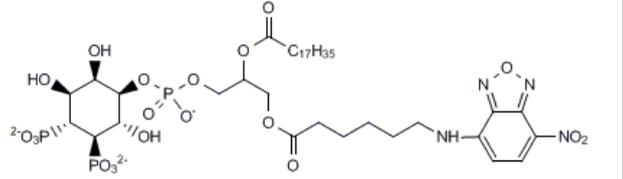


Figure III.1. Structure de la sphingomyéline et de la galactocéramide marquées par un chromophore de type BODIPY au niveau de la partie apolaire via une liaison amide³⁰.

De nombreux autres exemples de lipides fluorescents de structure équivalente sont reportés dans la littérature (Tableau III.1.).

Tableau III.1. Exemples de lipides fluorescents présentant un chromophore sur les chaînes alkyles.

Lipide	Chromophore $\lambda_{ex} / \lambda_{em}$	Structure	Ref
Céramides	NBD (470 nm/530 nm)		31
	Bodipy (490 nm/515 nm)		32
Phosphatidylcholine	Bodipy (490 nm/515 nm)		33
Phosphatidylcholine	Coumarine (373 nm/445 nm)		34
	Coronene (308 nm/448 nm)		35
Phosphatidylinositol PI	NBD (470 nm/530 nm)		36

Phosphatidylinositol -4,5-bisphosphate PI(4,5)P2	BZDC		37
PI(4,5)P2	NBD (470 nm/530 nm)		38

NBD : nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole

BZDC : Benzoyldihydrocinnamoyl

Les chromophores peuvent également être couplés au niveau de la partie apolaire des lipides via une liaison éther. Ce type de liaison est très intéressant notamment en chimie pharmaceutique puisqu'il s'agit d'une liaison très faiblement réactive et très robuste en milieu biologique, c'est un type de liaison qui n'est pas facilement sujet à la dégradation²⁹.

Le couplage de chromophores au niveau des chaînes alkyles des espèces lipidiques présente certains avantages mais également des inconvénients. En effet, la présence du chromophore au niveau des chaînes alkyles permet de conserver l'intégrité de la tête polaire des lipides, souvent impliquée dans les phénomènes de reconnaissance avec les protéines de la cellule. De plus les chromophores couplés sont souvent de nature très hydrophobe et sont donc plus efficace au sein de la bicouche lipidique également très hydrophobe. Cependant, la présence de l'entité chromophorique au niveau des chaînes alkyles des lipides pourrait gêner l'insertion du lipide dans les bicouches lipidiques comme celles qui composent les membranes cellulaires. De plus, la présence d'un chromophore au niveau de ces mêmes chaînes grasses est susceptible d'entraîner une déstabilisation de la bicouche lipidique, notamment dans le cas où des chromophores volumineux sont couplés sur le lipide²⁴.

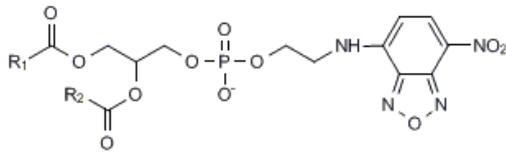
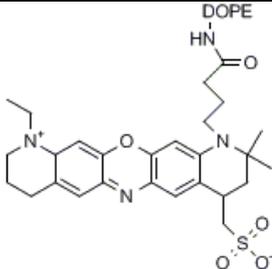
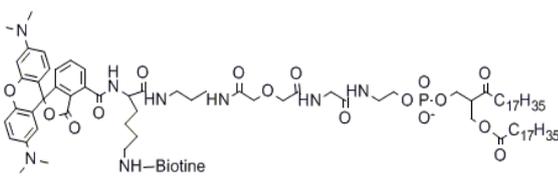
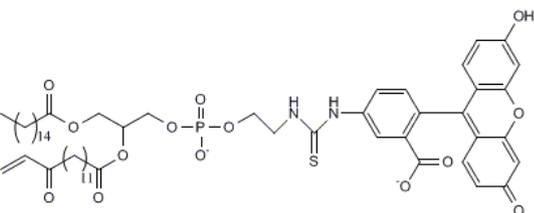
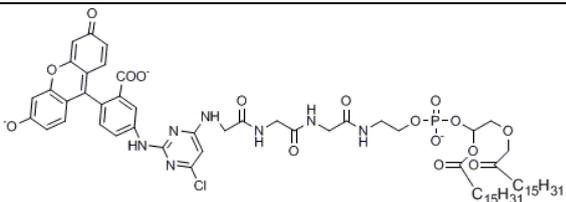
III.2. Couplage du chromophore sur la tête polaire.

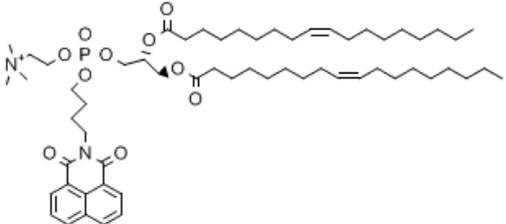
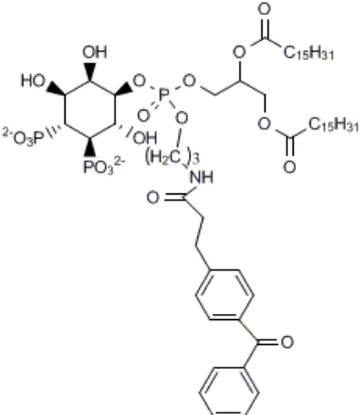
Outre le couplage au niveau des chaînes alkyles, les chromophores peuvent également être couplés au niveau de la tête polaire des lipides. De même que dans le cas précédent, différentes chimies sont utilisées afin de coupler le chromophore au niveau de la tête polaire des lipides (Tableau III.2.).

Le couplage du chromophore au niveau de la tête polaire du lipide peut s'avérer problématique lorsque cette dernière présente une activité biologique. En effet, il est connu que certains lipides ne jouent pas uniquement un rôle structural mais possède également

des fonctions particulières de second messenger au sein des cellules. Ces lipides ont la capacité d'activer certaines protéines ou de cibler les protéines au niveau de la membrane plasmique après interaction entre un domaine particulier des protéines et la tête polaire des lipides membranaires. On peut citer par exemple le cas du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ou PI(4,5)P2 qui est supposé jouer un rôle important dans l'assemblage et le bourgeonnement du virus HIV-1 par reconnaissance entre la tête polaire de type inositol et les protéines virales¹⁹. Toute modification de la tête polaire de ces PI(4,5)P2 entraînerait une modification, voire une inhibition, de l'interaction lipide-protéine.

Tableau III.2. Exemple de lipides fluorescents présentant un chromophore sur la tête polaire.

Lipide	Chromophore $\lambda_{ex} / \lambda_{em}$	Structure	Ref
Phosphatidyl- éthanolamine	NBD (470 nm/530 nm)		39
	Atto 655 (663 nm/684 nm)		40
	Rhodamine (543 nm/568 nm)		41
	Fluorescéine FITC (485 nm/515 nm)		42
Phosphatidyl- éthanolamine	Fluorescéine (485 nm/515 nm)		43

Phosphatidylcholine	Naphthylamide (NB) (340 nm/425 nm)		44
PI(4,5)P2	BZDC		37

NBD : nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole

NB : 4-hydroxybutyl-1-naphthylamide

BZDC : Benzoyldihydrocinnamoyl

III 3. Couplage du chromophore au niveau de la partie centrale du lipide.

Les chromophores peuvent également être couplés au niveau de la partie centrale du lipide, c'est-à-dire au niveau de la jonction entre la tête polaire et les chaînes alkyles. Pour illustrer cela, on peut citer les travaux de Schwarzmann *et al.*⁴⁵ qui ont réalisé le couplage d'un chromophore, le NBD (nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole), au niveau de la partie centrale de deux glycosphingolipides GM1 et GM2 (Figure III.2). Il s'agit dans ce cas là d'un couplage assez complexe qui a nécessité de nombreuses étapes dont une hydrolyse alcaline afin de conduire à un lyso-glycosphingolipide (lipide constitué d'une seule chaîne alkyle). La formation d'azido-GM1 et GM2 est ensuite réalisée par acylation en utilisant le *N*-succinimidyl (2*R/S*)-azido-octadecanoate, puis la réduction de la fonction N₃ en fonction amine NH₂ est réalisée afin de permettre le couplage du chromophore NBD. De plus, ce couplage nécessite, en plus des différentes étapes précédemment évoquées, des étapes de protection et de déprotection de la fonction amine portée par la tête polaire, qui ne doit pas être impliquée dans la réaction.

Le couplage d'un chromophore au niveau de la partie centrale des lipides implique de modifier la nature de cette partie centrale, ce qui nécessite, 7 étapes de synthèse et une chimie assez lourde.

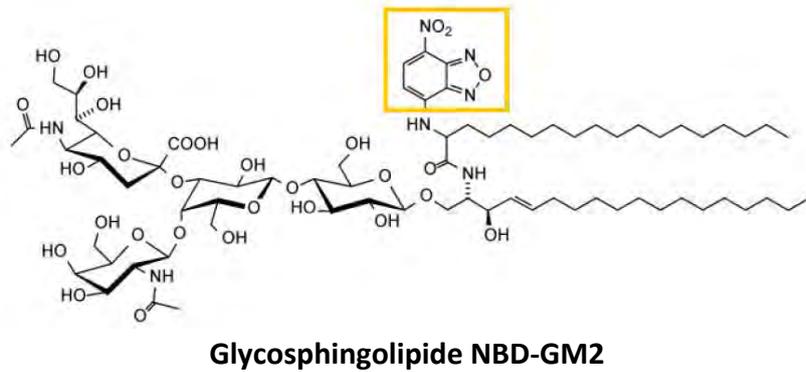


Figure III.2. Structure du lipide fluorescent NBD-GM2 portant le chromophore au niveau de la partie centrale⁴⁵.

Kamaly *et al.*⁴⁶ ont décrit en 2010 un lipide un peu particulier constitué d'une tête polaire servant d'agent de contraste pour l'imagerie (IRM) et de deux chaînes alkyles en C18, avec au centre un chromophore de type Rhodamine (Figure III.3.). Les auteurs espèrent pouvoir utiliser ce lipide bi-fonctionnel pour l'imagerie bimodale (IRM et optique) de cellules et de tumeurs.

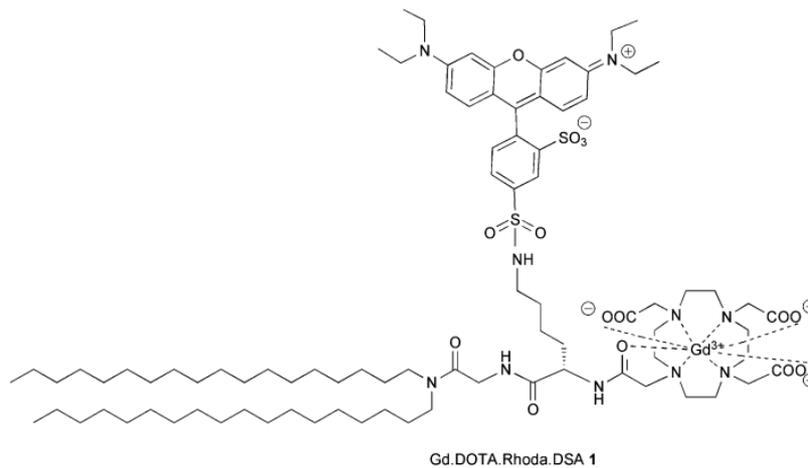


Figure III.3. Structure du lipide bi-fonctionnel décrit par Kamaly *et al.*⁴⁶.

Néanmoins, la localisation du chromophore au niveau de la partie centrale du lipide permet de conserver les chaînes alkyles et la tête polaire intactes. Cependant, la présence du chromophore, même au niveau de la partie centrale, constitue une modification pouvant changer la conformation du lipide dans les membranes ainsi que ses fonctions.

III.4. Conclusions.

Les lipides présents dans les cellules vivantes sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires ; c'est pourquoi, dans le but d'étudier leur comportement et de mieux comprendre certains phénomènes cellulaires, de nombreux analogues fluorescents de lipides ont été développés. Ces analogues lipidiques fluorescents portent le chromophore

soit au niveau de la tête polaire, soit au niveau des chaînes alkyles ou, plus rarement, au niveau de la partie centrale du lipide. Cependant, les chromophores sont très souvent les mêmes, limitant ainsi la gamme de longueurs d'ondes disponibles.

Ces différents analogues lipidiques fluorescents présentent tous des avantages et des inconvénients qu'il faut prendre en compte avant d'établir un protocole d'expérience.

IV. Les bio-conjugués Lipide-Polymères.

Le terme de bio-conjugué est employé lorsqu'une molécule d'intérêt biologique est couplée à une chaîne polymère^{47,48}. La présence des molécules d'intérêt biologique sur les bio-conjugués leur confère des propriétés différentes des propriétés de la seule chaîne polymère. Ainsi, les bio-conjugués formés présentent de nombreuses applications dans des domaines variés comme la transfection de gènes ou d'ADN, la vectorisation de principes actifs ou la formation de puces à ADN⁴⁹.

Les biomolécules qui constituent généralement les bio-conjugués sont de natures très variées. En effet, on retrouve les sucres, les peptides, les acides nucléiques, la biotine et les lipides.

En revanche, la gamme de polymères qui composent les bio-conjugués décrits dans la littérature et disponibles dans le commerce est très étroite. En effet, il s'agit majoritairement de polymères synthétiques biocompatibles tels que le polyéthylène glycol (PEG), le polyNIPAM, la polyéthylène imine (PEI) ou encore la poly-ε-caprolactone. Les polymères utilisés pour la synthèse des bio-conjugués sont très souvent des polymères commerciaux présentant une extrémité réactive permettant le couplage avec les molécules biologiques. Les techniques de polymérisation radicalaires contrôlées sont également très utilisées puisqu'elles permettent généralement un très bon contrôle de la structure des bio-conjugués formés.

Parmi tous les bio-conjugués Polymère-biomolécules, plusieurs familles existent :

- Les bio-conjugués à base de sucre : les glycopolymères^{50,51}.
Les sucres sont des entités biologiques très utilisées pour la synthèse de bio-conjugués. Les glycopolymères sont connus pour parfaitement mimer le comportement des polysaccharides naturels, impliqués dans de nombreux processus biologiques⁵².
- Les bio-conjugués à base d'acides aminés^{53,54,55} :
De nombreux travaux concernant la synthèse de bio-conjugués Polypeptide – Polymères ont également été publiés. Ces bio-conjugués présentent de nombreuses applications en biologie, notamment vecteurs pour le relargage contrôlé de molécules biologiques.

- Les bio-conjugués à base d'acides nucléiques^{56,57} :
De l'ADN peut également être immobilisé sur des chaînes polymères. Différentes applications existent pour ce genre de bio-conjugués, comme par exemple la purification sélective de protéines et la fabrication de puces à ADN.
- Les bio-conjugués Lipide-Polymères (LP) :
Leurs domaines d'application sont très vastes :
 - Conception de biomembranes
 - Synthèse d'hydrogels pour l'ingénierie tissulaire
 - Fixation de membranes lipidiques supportées sur différents types de supports solides
 - Transfection de gènes
 Cependant, la majorité des applications concerne la délivrance contrôlée de principes actifs, avec notamment la stabilisation de liposomes.
Parmi tous les bio-conjugués Lipide-Polymères synthétisés et utilisés en biologie, les bio-conjugués de type PEG-Lipide sont très largement majoritaires. De nombreuses études ont été réalisées avec pour objectif de les incorporer dans des liposomes. La présence de chaînes PEG, hydrophiles et neutres, en surface des liposomes, augmente leur stabilité⁵⁸.

De plus, il est connu que les liposomes ne sont pas les meilleurs vecteurs pour la délivrance de principes actifs, puisqu'ils sont généralement éliminés de l'organisme avant même de pouvoir libérer leur contenu. La présence de chaîne PEG en surface rend les liposomes invisibles pour les cellules du système réticulo-endothélial (liposomes furtifs), ce qui permet d'augmenter leur temps de circulation dans le système sanguin⁵⁸. Les vésicules lipidiques peuvent ainsi remplir leur rôle de vecteur et libérer les molécules d'intérêt biologique qu'elles transportent au sein des cellules cibles.

Au regard de leurs différentes applications potentielles, de nombreuses équipes de recherche se sont intéressées à la synthèse de bio-conjugués Lipide-Polymères. Diverses techniques ont été employées afin d'introduire un lipide sur une chaîne polymère, ce qui permet d'obtenir des architectures très différentes, avec le lipide soit en position latérale, soit en position terminale (Figure IV.1.).

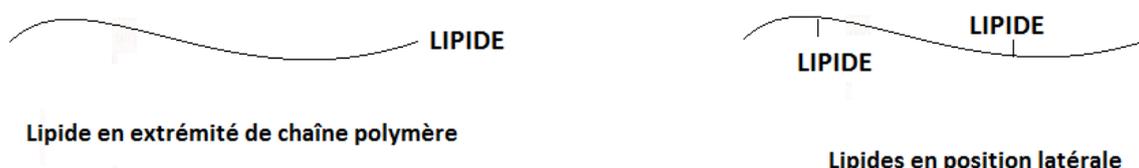


Figure IV.1. Représentation schématique des deux types de bio-conjugués Lipide-Polymères.

Dans les pages qui suivent, l'introduction du lipide en extrémité de chaîne sera traitée de manière plus approfondie que l'introduction de lipides en position latérale. En effet, les structures présentant le lipide en extrémité de chaîne sont les plus fréquemment

rencontrées et c'est également le type de structure que nous proposons de synthétiser dans ce projet.

IV.1. Introduction du lipide en extrémité de chaîne polymère.

Il existe différentes techniques qui permettent de synthétiser des bio-conjugués Lipide-Polymères présentant le lipide en extrémité de chaîne polymère.

IV.1.1. Bio-conjugués Lipide-Polymères obtenus autrement que par polymérisation radicalaire contrôlée (PRC).

La première technique consiste à réaliser une fonctionnalisation des extrémités de chaîne dans le but de pouvoir coupler un lipide par la suite : il s'agit de formation de bio-conjugués Lipide-Polymères par post-modification (Figure IV.2.). Cette post-modification des chaînes polymères peut être réalisée sur des polymères nouvellement synthétisés aussi bien que sur des polymères commerciaux fonctionnels de type PEG.

En effet, la post-modification de PEG commerciaux constitue la principale voie de formation de bio-conjugués Lipide-Polymères. Par exemple, Teramura *et al.*⁵⁹ ont décrit la synthèse de bio-conjugués PEG-Lipide à partir du couplage entre un PEG commercial et un lipide de type DPPE (Dipalmitoyl Phosphatidyléthanolamine). Le couplage se fait par réaction entre la fonction amine du DPPE et une fonction *N*-Hydroxysuccinimide (NHS) présente en extrémité de la chaîne PEG.

Zalipsky *et al.*⁶⁰ ont déposé un brevet (US Patent) dans lequel ils décrivent la synthèse d'un bio-conjugué Lipide-Polymère obtenu par post-modification d'un polymère de type poly(*N*-vinylpyrrolidone) obtenu par polymérisation radicalaire conventionnelle. L'extrémité -COOH du polymère est ensuite activée par réaction avec le *N*-Hydroxysuccinimide pour pouvoir ensuite coupler un lipide de type DSPE (distearyl Phosphatidyléthanolamine).

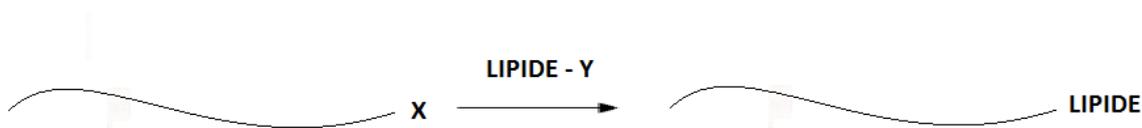


Figure IV.2. Représentation schématique de l'introduction d'un lipide en extrémité de chaîne par post-modification d'une chaîne polymère fonctionnelle.

Cependant, l'efficacité de cette technique de formation des bio-conjugués LP présente des limites. La post-fonctionnalisation des chaînes polymères nécessite une accessibilité des extrémités de chaîne afin que le lipide puisse être couplé, ce qui n'est pas forcément toujours le cas surtout lorsque les chaînes polymères synthétisées sont de tailles importantes. C'est pourquoi, il est nécessaire d'inclure une étape de purification après le couplage afin d'éliminer les chaînes polymères qui ne présentent pas de lipide en extrémité. Cette étape de purification peut ne pas être très évidente à réaliser.

Une autre technique couramment utilisée permettant d'introduire les lipides en extrémité de chaînes polymères consiste à modifier l'amorceur permettant d'initier la réaction de polymérisation (Figure IV.3.). Kitano et Ohno⁶¹ ont décrit la synthèse de bio-conjugués Lipide-Polymères dont la chaîne polymère est constituée de PMEG (poly(2-méthylacryloyloxyethyl- α -D-glucopyranoside)) et obtenue par polymérisation radicalaire conventionnelle. Pour réaliser la synthèse de ce bio-conjugué LP, ils ont utilisé un initiateur de radicaux libres modifié (le DODA 501) qui est un amorceur de type « diazo » présentant deux chaînes alkyles en C18.



Figure IV.3. Représentation schématique de l'introduction d'un lipide en extrémité de chaîne par modification d'amorceur.

Le tableau IV.1. présente différents exemples de synthèses de bio-conjugués Lipide-Polymères par post-modification de chaînes polymères et par modification d'amorceur.

Tableau IV.1. Exemples de synthèses par post-modification ou modification d'amorceur.

	Polymère / Type de polymérisation	Amorceur / Agent de contrôle	Nature de la modification	Type de lipide / position sur la chaîne	Application potentielle	Références
Post-Modification de chaîne polymère	PEG [poly(éthylène glycol)] Commercial	-	Réaction entre -NH ₂ du lipide et fonction NHS de la chaîne PEG (Liaison amide)	DPPE Extrémité de chaîne	Ancrage de biomembranes PVA autour des îlots de Langherans (protection de transplants)	59,62 <i>Réf similaires</i> 63,64
	PEG [poly(éthylène glycol)] Commercial	-	Réaction entre -NH ₂ du lipide et fonction isocyanate du PEG (Liaison urée)	Analogue C18 Extrémité de chaîne	Augmentation du temps de ½ vie de liposomes circulants	65
	PEG [poly(éthylène glycol)] Commercial	-	Réaction entre -NH ₂ du lipide et fonction -COOH activée (liaison amide)	DSPE Extrémité de chaîne	Bio-conjugués LP clivables par la cystéine régénérant le lipide initial (délivrance contrôlée)	66
	PNIPAM [poly (N-isopropylacrylamide)] Commercial	-	Réaction entre -NH ₂ du lipide et fonction -NHS du NIPAM (liaison amide)	DMPE Extrémité de chaîne	Nanostructures thermo-responsive. Délivrance contrôlée	67
	PVP [poly(N-vinylpyrrolidone)] Radicalaire conventionnelle	AIBN	Activation -COOH par NHS puis réaction avec -NH ₂ du lipide (Liaison amide)	DSPE Extrémité de chaîne	Augmentation du temps de ½ vie de liposomes circulants	60

Post-Modification de chaîne polymère	PMOZ (polyméthylloxazoline) Polymérisation cationique	MET (méthyltosylate)	Conversion de –OH en –COOH puis activation par NHS (Liaison amide)	DSPE Extrémité de chaîne	Augmentation du temps de ½ vie de liposomes circulants	60 <i>Réf similaires</i> 68
Modification d'amorceurs	PMEG [poly(2-methacryloyloxyethyl- α -D-glucopyranoside)] Radicalaire Conventionnelle	DODA 501	Incorporation de 2 chaînes alkyls (C18) à un amorceur de type « azo »	Analogue lipide (C18) Extrémité de chaîne	Liposomes fonctionnels (ciblage via les fonctions glucose)	61
	PAA [poly(acide acrylique)] Radicalaire conventionnelle	DODA 501	Incorporation de 2 chaînes alkyls (C18) à un amorceur de type « azo »	Analogue lipide (C18) Extrémité de chaîne	Liposomes pour le relargage contrôlé de principe actif	69 <i>Réf similaires</i> 70,71
	PMOZ (polyméthylloxazoline) Polymérisation cationique	Amorceur de type tosylate	Incorporation de fonctions tosylates sur des dérivés lipidiques (C12) et sur du cholestérol	Analogue lipide (C12) et cholestérol Extrémité de Chaîne	Relargage contrôlé de principe actif	72
	PNCA [poly(N- ϵ -Z-L-lysine N-carboxyanhydride)] Polycondensation par ouverture de cycle	3-aminopropyle dioctadécylamine	Incorporation de 2 chaînes alkyles (C18) sur un amorceur aminé	Analogue lipide (C18) Extrémité de chaîne	Liposomes fonctionnels	73

Tableau IV.1. Exemples de synthèses par post-modification ou modification d'amorceur (suite). 35

IV.1.2. Bio-conjugués Lipide-Polymères obtenus par polymérisation radicalaire contrôlée (PRC).

Le développement de nombreuses techniques de polymérisations radicalaires contrôlées a permis de synthétiser des polymères d'architectures parfaitement contrôlées. De nombreuses équipes ont donc tiré avantage de ces « nouvelles » techniques de polymérisation afin de contrôler non seulement les tailles mais également les architectures des bio-conjugués Lipide-Polymères.

Généralement, l'introduction de lipides en extrémité des chaînes polymères synthétisées par PRC se fait par fonctionnalisation des agents qui contrôlent la polymérisation.

Par exemple, Götz *et al.*⁷⁴ ont publié une étude sur la synthèse d'analogues de lipides portant une fonction alkoxyamine qui sont ensuite utilisés pour initier la polymérisation, par NMP (Nitroxide Mediated Polymerization), de la diméthylacrylamide, qui leur a servi de modèle. Les résultats satisfaisant du contrôle de la polymérisation leur ont permis de passer à l'étape suivante, à savoir la synthèse de lipo-glycopolymères par la même technique. Ils ont réussi à synthétiser un polymère possédant un lipide à une des extrémités (le poly(α -D-glucopyranose-2-propanoate)).

De la même manière, dans l'équipe Bathfield *et al.*⁷⁵ ont décrit la synthèse d'un agent de transfert de chaîne de polymérisation RAFT de type dithiobenzoate modifié par la présence d'un lipide de type dipalmitoyle (deux chaînes grasses en C16). Cet agent RAFT a ensuite été utilisé pour la polymérisation d'un dérivé de l'acrylamide : le *N*-acryloylmorpholine (NAM). Cette voie de synthèse a permis d'obtenir des bio-conjugués Lipide-Polymères très bien définis, présentant le lipide en extrémité α des chaînes polymères.

Le tableau IV.2. présente différents exemples de synthèses de bio-conjugués Lipide-Polymères par polymérisation radicalaire contrôlée.

	Polymère / Type de polymérisation	Amorceur / Agent de contrôle	Nature de la modification	Type de lipide / position sur la chaîne	Application potentielle	Références
Modification d'agents de contrôle ou d'amorceurs	PNAM [poly(<i>N</i> -acryloylmorpholine)] Polymérisation RAFT	Agent de transfert de chaîne (ATC) de type dithiobenzoate modifié	ATC modifié via l'activation de -COOH par NHS (Liaison amide)	DPPE modifié (hexylamine) Extrémité de chaîne	Stabilisation de lipoparticules de PS	75
	PNIPAM [poly(<i>N</i> -isopropylacrylamide)] Polymérisation RAFT	ATC de type trithiocarbonate modifié	ATC modifié par la présence de 2 chaînes en C18 aux extrémités	Analogue lipide (C18) Extrémité de chaîne	Polymères intelligents et formation de structures cœur-écorce contrôlée	76
	PDMA (polydiméthylacrylamide) NMP	Amorceur de type alkoxyamine modifié	Alkoxyamine modifiée par un analogue de lipide en C18	Analogue de lipide en C18 Extrémité de chaîne	Formation de biomembranes	74
	Poly(Ac-VLA) (monomère de type styryle portant un groupement saccharidique) NMP	Amorceur de type alkoxyamine modifié	Alkoxyamine modifiée portant 2 chaînes alkyles en C18	Analogue de lipide en C18 Extrémité de chaîne	Glycolipides artificiels pour l'étude du rôle des sucres à la surface des membranes cellulaires Délivrance contrôlée de principes actifs	77

Tableau IV.2. Exemples de synthèses par polymérisation radicalaire contrôlée.

Modification d'agents de contrôle ou d'amorceurs	Copolymères de polyacrylamide ATRP	Amorceur de type 2-bromopropionamide modifié	2-bromopropionamide substitué par 1 ou 2 chaînes alkyles	Analogues de lipide Extrémité de chaîne	Attachement de membranes supportées via la présence d'une fonction NHS à l'autre extrémité	78 <i>Réf similaire</i> 79
	PMMA [poly(méthacrylate de méthyle)] ATRP	Amorceur de type 2-bromoisobutyrylbromide modifié	2-bromoisobutyrylbromide portant un cholestérol	Cholestérol Extrémité de chaîne	Bio-mimétisme	80
	PtBA [poly(<i>tert</i> -Butyl Acrylate)] ATRP	Amorceur de type 2-isobutyrylbromide modifié	2-isobutyrylbromide portant des chaînes alkyles (C18)	Analogues lipides en C18 (acides linoléique, linoléique et oléique) Extrémité de chaîne	Micelles sensibles au pH Délivrance contrôlée de principes actifs	81

Tableau IV.2. Exemples de synthèses par polymérisation radicalaire contrôlée (suite).

IV.2. Introduction du lipide en position latérale de la chaîne polymère.

Les structures obtenues dans ce cas là sont assez particulières puisque, le plus souvent, seulement une partie du lipide est couplée à la chaîne polymère (la partie polaire ou les chaînes alkyles).

Il existe différentes façon d'introduire une entité de nature lipidique en position latérale des chaînes polymères. La première technique consiste à synthétiser des chaînes polymères qui présentent latéralement des fonctions pouvant permettre, dans un deuxième temps, le couplage de lipides.

Dans leur publication, Bajaj *et al.*⁸² ont décrit la synthèse de bio-conjugués Lipide-Polymères obtenus par l'assemblage de PEI (polyéthylène imine) et de cholestérol, utilisables pour la transfection d'ADN. Le cholestérol a été activé, par transformation de la fonction hydroxyle en fonction tosyle, afin de pouvoir permettre le couplage sur la chaîne polymère via les fonctions amines du PEI. La réaction entre le lipide activé et le polymère permet d'obtenir des bio-conjugués Lipide-Polymères présentant un squelette PEI sur lequel sont disposés, en position latérale, des molécules de cholestérol.

La seconde technique permettant d'introduire des lipides en position latérale de chaînes polymères consiste à utiliser des monomères modifiés. En utilisant des monomères présentant des structures proches de la structure des lipides, il est possible d'introduire des analogues de lipides en position latérale des chaînes polymères après polymérisation.

Konno et Ishihara⁸³ ont décrit la synthèse de bio-conjugués Lipide-Polymères par cette technique, à partir de la polymérisation de différents monomères dont un possède une fonction de type phosphorylcholine : 2-méthacryloyloxyethyl phosphorylcholine. Ce bio-conjugué a été obtenu par copolymérisation radicalaire conventionnelle de trois monomères :

- Le 2-méthacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)
- Le méthacrylate de *n*-butyle (BMA)
- L'acide *p*-vinylphénylboronique (VPBA)

Le bio-conjugué obtenu présente des fonctions de type phosphorylcholine en position latérale mais également des fonctions « acide boronique » qui peuvent former des hydrogels en présence de polyols lorsqu'ils sont sous forme anionique. Les hydrogels obtenus peuvent ensuite être utilisés dans le domaine de l'ingénierie tissulaire notamment grâce à la présence des fonctions phosphorylcholine qui assure une biocompatibilité optimale des hydrogels formés.

Comme évoqué précédemment les structures obtenues sont généralement assez particulières. Il est légitime de se demander si de telles structures peuvent être appelées bio-conjugués LP puisque, comme dans le cas de la structure décrite par Konno et Ishihara⁸³, ces structures ne portent pas de lipides complets mais seulement la partie hydrophile ou les chaînes alkyles. Le tableau IV.3. regroupe quelques exemples de synthèses de bio-conjugués LP présentant le lipide en position latérale.

Tableau IV.3. Exemples de synthèses de bio-conjugués présentant un lipide en position latérale.

	Polymère / Type de polymérisation	Amorceur / Agent de contrôle	Nature de la modification	Type de lipide / position sur la chaîne	Application potentielle	Références
Monomères Fonctionnels	PMBV Poly(MPC-co-n-BMA-co-VPBA) Polymérisation radicalaire conventionnelle	AIBN	Modification de monomères	Phosphorylcholine Position latérale	Formation d'hydrogels pour l'ingénierie tissulaire.	83
	Poly(acrylate-co-acrylamide) NMP	2,2,5-triméthyl-3-(1-phenylethoxy)-4-phenyl-3-azahexane	Monomère de type acrylamide modifié avec 2 chaînes en C18	Analogue de lipide en C18 Position latérale	Formation de biomembranes	74
	PMPC [poly(2-méthacryloyloxyéthyl phosphorylcholine)] SI-ATRP	Amorceur de type ethyl 2-bromoisobutyrate	Monomères fonctionnels de type phosphorylcholine	Phosphorylcholine Position latérale	Micro-puces pour l'étude des interactions lipide/protéines	84 <i>Réf similaire</i> 85
	PLA et PSA [poly(lauryl acrylate) et poly(stéaryl acrylate)] ATRP	CuBr/PMDETA	Monomères fonctionnels portant des chaînes alkyles en C18 et C12	Analogue de lipide en C18 et C12 Position latérale	Thermoplastiques élastomères biocompatibles	86

Monomères Fonctionnels	pMPC-BMA [poly((2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) – co – (n-butylmethacrylate))] RAFT	Dithiobenzoate d'acide 4-cyanopentanique	Monomère fonctionnels de type phosphorylcholine	Phosphorylcholine Position latérale	Délivrance contrôlée de principe actifs	87
	Polyméthacrylates ATRP	Amorceur de type ethyl-2-bromoisobutyrate	Monomères modifiés portant des chaînes alkyles (C10 à C18)	Analogue de lipide en C18, C16, C14, C12 et C10 Position latérale	Polymères biocompatibles issus de ressources naturelles	88
Post-Modification	PEI [polyéthylène imine]	-	Activation du Lipide par groupement tosyle (Liaison éther)	Cholestérol Position latérale	Agent de transfection de gènes	82
	PEI [polyéthylène imine] Commercial	-	Réaction entre fonction-NH2 du PEI et fonction chlorure d'acyle portée par les chaînes alkyles (Liaison amide)	Analogues lipides (C8 à C18) Position Latérale	Agent de transfection de gènes	89
	PEI [polyéthylène imine] Commercial	-	Réaction entre fonction amine du PEI et fonction chlorure d'acyle portée par le lipide (Liaison amide)	Cholestérol Position Latérale	Agent de transfection de gènes	90 <i>Réf similaires</i> 91,92

Tableau IV.3. Exemples de synthèses de bio-conjugués présentant un lipide

Tableau IV.3. Exemples de synthèses de bio-conjugués présentant un lipide en position latérale (suite).

<p>Post-Modification</p>	<p>Amphipols (polymère amphiphile) de type acrylamide [poly(ethylenedioxybis(ethyl)-acrylamide – <i>co</i> – <i>n</i>-octylamcrylamide)]</p> <p>Radicalaire conventionnelle</p>	<p>AIBN</p>	<p>Clivage du groupe protecteur N-<i>t</i>-BOC et couplage du lipide</p> <p>(Liaison amide)</p>	<p>Phosphorylcholine</p> <p>Position latérale</p>	<p>Stabilisation et manipulation de protéines</p>	<p>93</p>
---------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------	---------------------------------------------------	-----------

IV.3. Les bio-conjugués Lipide-Polymères fluorescents.

Commercialement, la grande majorité des bio-conjugués Lipide-Polymère-Chromophores (LPC) disponibles sont constitués d'une chaîne PEG.

De plus, bien que de nombreuses équipes se soient intéressées à la formation de bio-conjugués Lipide-Polymères, la synthèse de bio-conjugués LPC est très peu reportée dans la littérature.

IV.3.1. Couplage de chromophores sur des bio-conjugués Lipide-Polymères commerciaux.

Différentes méthodes de formation de Lipide-Polymères fluorescents à partir de polymères commerciaux sont décrites dans la littérature.

Par exemple, Albertorio *et al.*⁹⁴ ont synthétisé un bio-conjugué LPC à partir d'un bio-conjugué Lipide-Polymère aminé commercial : le $\text{NH}_2\text{-PEG}^{2000}\text{-DSPE}$. Les auteurs ont tout d'abord formés des liposomes de type SUVs (Small Unilamellar Vesicles), avant de les incuber en présence d'un chromophore de type Alexa Fluor 594 (succinimidyl ester) ($\lambda_{\text{ex max}} = 590 \text{ nm}$ – $\lambda_{\text{em max}} = 617 \text{ nm}$). Le chromophore est couplé sur les bio-conjugués Lipide-Polymères via la fonction amine qui est présente à la surface des liposomes (Figure IV.4.).

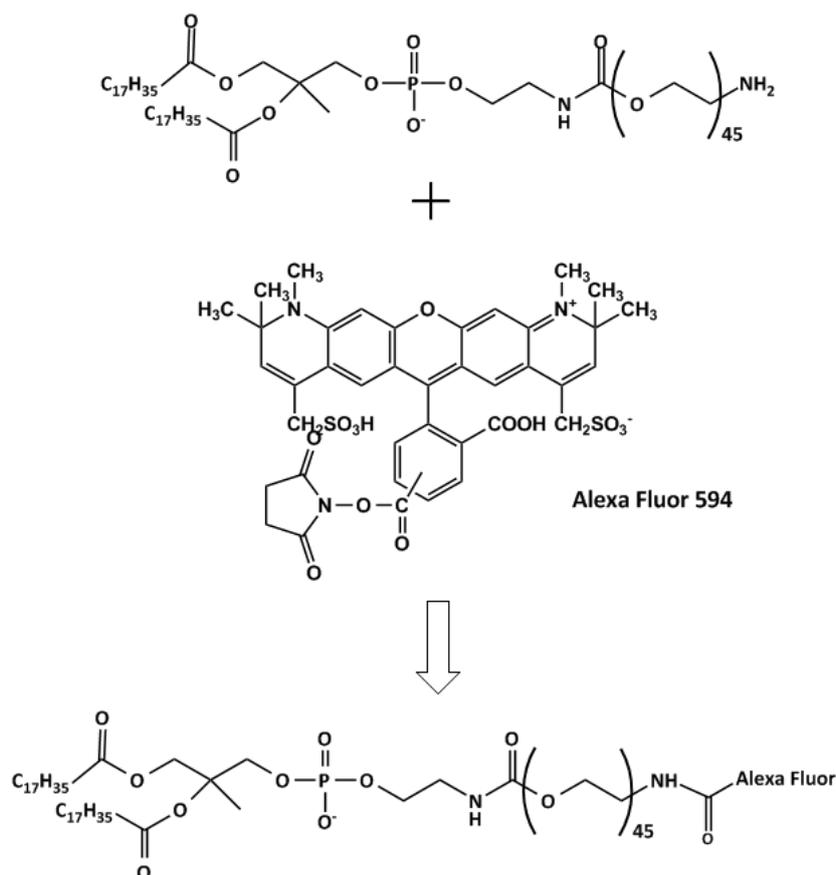


Figure IV.4. Réaction de synthèse du bio-conjugué LPC par réaction entre la fonction amine d'un PEG-DSPE et la fonction ester activé d'un chromophore Alexa Fluor 594.

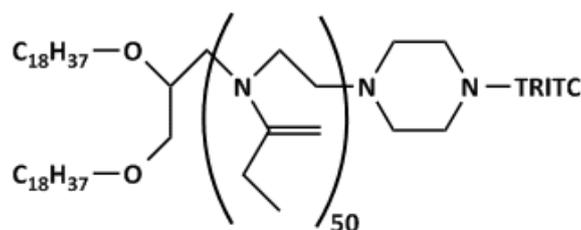
Les bio-conjugués LPC formés sont ensuite utilisés pour étudier leur comportement au sein de bicouches supportées, et notamment afin de savoir s'ils conservent leur mobilité au sein de la bicouche de lipides.

De même, Van Tilborg *et al.*⁹⁵ ont reporté la synthèse de bio-conjugués Lipide-Polymères fluorescents via le couplage entre la fonction amine du même bio-conjugué Lipide-Polymère commercial (NH₂-PEG²⁰⁰⁰-DSPE) et la fonction ester activée du chromophore Cy5.5 (succinimidyl ester) ($\lambda_{\text{ex max}} = 673 \text{ nm} - \lambda_{\text{em max}} = 707 \text{ nm}$). Dans ce cas là, la réaction de couplage du chromophore sur les bio-conjugués Lipide-Polymères est réalisée après que des micelles de bio-conjugué NH₂-PEG²⁰⁰⁰-DSPE soient formées. Notons que le chromophore utilisé ici émet dans le rouge lointain.

IV.3.2. Couplage de lipides sur des chaînes polymères synthétisées au laboratoire.

Très peu d'équipes se sont intéressées à la synthèse de bio-conjugués Lipide-Polymères fluorescents à partir de conjugués Lipide-Polymères fabriqués au laboratoire.

Siegel *et al.*⁹⁶ ont synthétisé un bio-conjugué Lipide-Polymère fluorescent nommé (diC₁₈E₅₀-TRITC) ($\lambda_{\text{ex max}} = 544 \text{ nm} - \lambda_{\text{em max}} = 572 \text{ nm}$) à partir d'une chaîne de poly((2-ethyl-2-oxazoline) de 5 000 g.mol⁻¹ environ. Le monomère a été polymérisé par polymérisation cationique par ouverture de cycle en présence d'un amorceur de type triflate portant deux chaînes alkyles en C18 (Figure IV.5.), puis le chromophore TRITC (Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate) a été couplé sur l'autre extrémité de la chaîne.



DiC₁₈E₅₀-TRITC

Figure IV.5. Structure du bio-conjugués LPC synthétisé par Siegel *et al.*⁹⁶.

Cette stratégie de synthèse comporte plusieurs inconvénients, notamment le choix limité de monomères et les conditions opératoires assez contraignantes de la polymérisation cationique par ouverture de cycle.

Les auteurs utilisent ce bio-conjugué pour étudier la dynamique de bicouches lipidiques, et la formation de compartiments au sein de ces dernières suite à l'application d'une contrainte latérale.

IV.3.3. Synthèse de bio-conjugués possédant un squelette polymère fluorescent.

Une autre voie de formation de bio-conjugués Lipide-Polymères fluorescents consiste à coupler un lipide sur un polymère dont le squelette est constitué de monomères qui présentent des propriétés de fluorescence.

Feng *et al.*⁸⁵ ont reporté en 2009 la synthèse d'un bio-conjugué LPC de type poly(fluorenylene phenylene) modifié par la présence d'un lipide qu'ils nomment PFLP ($\lambda_{\text{ex max}} = 372 \text{ nm} - \lambda_{\text{em max}} = 420 \text{ nm}$). Ce bio-conjugué LPC est obtenu par couplage entre un monomère modifié portant une entité lipidique et un monomère qui présente deux cycles aromatiques conjugués suivant la réaction de Suzuki (Figure IV.6.).

Le bio-conjugué LPC final présente donc un lipide en position latérale et des cycles aromatiques conjugués constituant le squelette de la chaîne polymère, rendant le bio-conjugué fluorescent.

Ainsi, les auteurs ont pu synthétiser deux types de bio-conjugués LPC de 11 000 et 7 600 g.mol^{-1} présentant des indices de polymolécularité de 1,44.

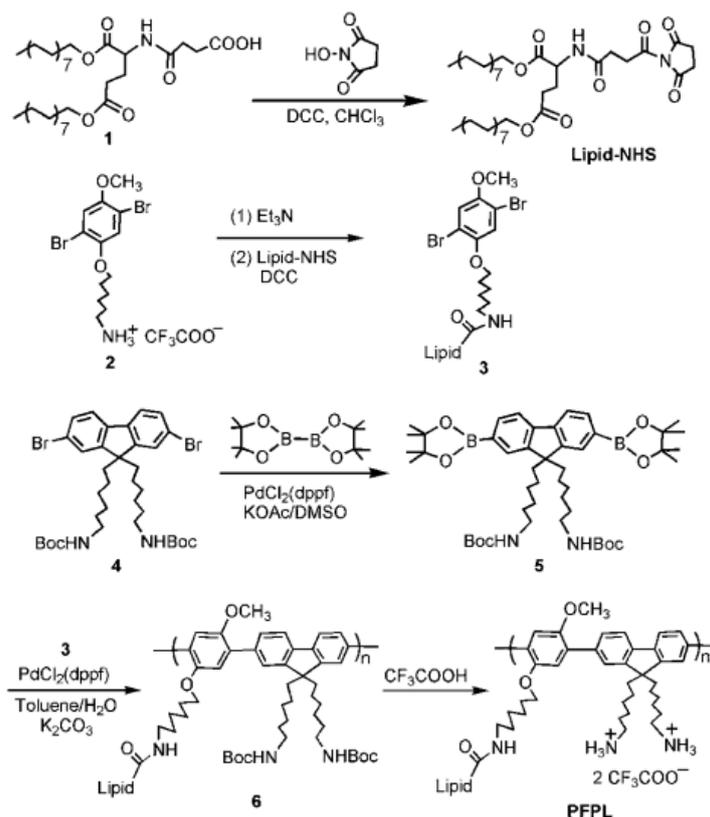


Figure IV.6. Etapes de synthèse des bio-conjugués LPC (PFLP) par la réaction de Suzuki⁸⁵.

Ces bio-conjugués LPC sont des molécules amphiphiles puisque le lipide et le squelette de la chaîne polymère sont de nature plutôt hydrophobe alors que les charges présentes sur les amines quaternaires apportent de l'hydrophilie au bio-conjugué. Cette amphiphilie leur permet de s'agréger afin de former des nanoparticules fluorescentes

présentant des charges de surface et donc pouvant potentiellement être utilisées pour la délivrance de gènes. Selon les auteurs, la présence de lipides permet d'augmenter la biocompatibilité des particules en créant une couche protectrice lipidique autour du squelette polymère. Cependant, le couplage des monomères par la réaction de Suzuki nécessite l'utilisation d'un catalyseur au palladium qui doit être éliminé après réaction pour pouvoir utiliser les nanoparticules en milieu biologique.

IV.3.4. Cas particulier : Formation d'hydrogels lipidiques fluorescents.

Dans la littérature, il est également décrit la synthèse d'un bio-conjugué LPC assez particulier. En effet, Ng *et al.*⁹⁷ ont reporté la formation d'un hydrogel phospholipidique fluorescent, dans lequel un lipide modifié de manière à être fluorescent est polymérisé en présence de NIPAM ou de DMAA.

Dans cet article, les auteurs commencent par transformer un lipide fluorescent de type NBD-PE ($\lambda_{\text{ex max}} = 470 \text{ nm} - \lambda_{\text{em max}} = 530 \text{ nm}$) de façon à le rendre polymérisable en introduisant un groupement vinyle (Figure IV.7).

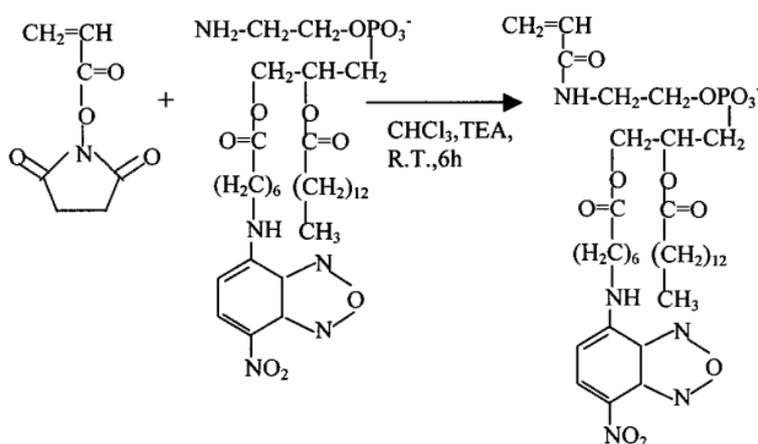


Figure IV.7. Synthèse du lipide Acrylo-PE-NBD par réaction entre la fonction ester activé du N-acryloxysuccinimide et la fonction amine du NBD-PE⁹⁷.

Le lipide fluorescent est ajouté à un mélange diphasique composé d'une solution aqueuse de monomères (DMAA) et d'agent réticulant, ainsi que d'une solution d'hexane. Après émulsification, la polymérisation est initiée.

Du fait de sa nature amphiphile, le lipide fluorescent se situe préférentiellement à l'interface eau/huile avec les chaînes alkyles (qui comportent le chromophore) dans la phase organique et la tête polaire (qui présente le groupement vinyle) dans la phase aqueuse. Le groupe vinyle peut ainsi participer à la réaction de polymérisation.

L'hydrogel obtenu est donc composé de chaînes alkyles de surface présentant un chromophore de type NBD (Figure IV.8.).

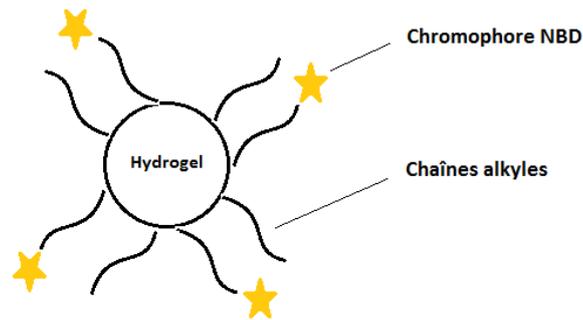


Figure IV.8. Représentation schématique de l'hydrogel lipidique fluorescent synthétisé par Ng et al.⁹⁷

Les auteurs affirment que ces hydrogels peuvent être utilisés pour l'encapsulation de principes actifs ou comme cellules artificielles pour l'étude des interactions avec des protéines membranaires. La présence (en surface des hydrogels) de chaînes alkyles est supposée faciliter l'assemblage de bicouches lipidiques, notamment par contact entre les hydrogels et des liposomes.

IV.4. Conclusions.

Parmi les bio-conjugués existants, les bio-conjugués Lipide-Polymères occupent une place très importante en biologie. En effet, ils sont utilisés pour diverses applications comme la délivrance de principes actifs, comme agents de transfection ou même comme support pour l'ingénierie tissulaire.

Dans la littérature, de nombreuses voies de synthèse de bio-conjugués Lipide-Polymères sont décrites. Ces diverses techniques permettent d'introduire, de manière plus ou moins contrôlée, l'entité lipidique soit en position terminale, soit en position latérale sur les chaînes polymères. Néanmoins, les structures les plus décrites sont constituées d'un lipide situé en extrémité d'une chaîne de type PEG.

En revanche, très peu de travaux relatent la synthèse de bio-conjugués Lipide-Polymères fluorescents. Les quelques exemples de bio-conjugués LPC sont obtenus, soit par couplage d'un chromophore à l'autre extrémité d'un bio-conjugué Lipide-Polymère commercial (très souvent de type polyéthylène glycol, PEG), soit par couplage d'une entité lipidique en position latérale de polymères dits « conjugués », c'est-à-dire présentant des cycles aromatiques rendant le squelette polymère intrinsèquement fluorescent mais conduisant à des bio-conjugués très hydrophobes et peu adaptés pour des applications en milieu biologique.

V. Conclusions du chapitre 1.

Cette étude bibliographique a permis de montrer l'importance des lipides dans le bon fonctionnement des cellules vivantes. En effet, ces derniers jouent à la fois un rôle structural en permettant aux cellules de conserver leur intégrité, mais ils jouent également des rôles fonctionnels fondamentaux notamment dans les processus de signalisation.

Les lipides constituent donc un outil de choix permettant de comprendre le fonctionnement des membranes plasmiques et des cellules elles-mêmes, et la microscopie de fluorescence s'est avérée être un outil très intéressant pour l'étude des membranes et des différents phénomènes associés.

Ainsi, afin de tirer profit des techniques de microscopie de fluorescence, de nombreux lipides fluorescents ont été développés et sont désormais disponibles commercialement. Des équipes de recherche continuent de s'intéresser à la synthèse de nouveaux lipides fluorescents. Ces lipides fluorescents peuvent être classés en différentes catégories selon la position du chromophore sur la molécule (tête polaire, partie centrale ou chaînes hydrophobes). Chacune de ces catégories de lipides fluorescents présente plusieurs inconvénients (problèmes d'insertion dans les membranes, altération des propriétés de reconnaissance, déstabilisation des membranes cellulaires) qu'il convient de prendre en compte.

En ce qui concerne la synthèse des bio-conjugués Lipide-Polymères, cette étude bibliographique a permis de montrer qu'il existe différentes voies qui permettent d'introduire le lipide soit en position latérale, soit en extrémité de la chaîne polymère.

Afin d'obtenir une entité lipidique en position latérale le long des chaînes polymères, deux principales voies sont utilisées : la modification de monomères par des analogues lipidiques qui sont ensuite polymérisés, ou la post-modification des chaînes polymères préformées via une fonction latérale permettant le couplage d'un lipide.

De la même façon, l'introduction d'un lipide en position terminale d'une chaîne polymère peut également être réalisée par post-modification des chaînes polymères préformées. Cependant, les extrémités des chaînes polymères sont parfois difficilement accessibles pour le couplage du lipide, notamment lorsque ces dernières sont très longues. De plus, cette voie de post-modification, , nécessite la mise en place d'une méthode de purification visant à séparer le lipide non couplé et le bio-conjugué Lipide-Polymère, surtout si le rendement de couplage du lipide est limité, ce qui peut s'avérer très fastidieux. Ainsi, l'utilisation récente des techniques de polymérisation radicalaire contrôlées permet de synthétiser des bio-conjugués Lipide-Polymères bien définis tout en s'affranchissant des problèmes précédemment cités. La fonctionnalisation des agents de contrôle (ou des amorceurs) de la polymérisation permet la localisation précise du lipide en extrémité de chaîne, tout en optimisant le rendement de couplage.

Si la synthèse et l'utilisation de bio-conjugués Lipide-Polymères sont très reportées dans la littérature, la synthèse de bio-conjugués Lipide-Polymère-Chromophores l'est en revanche beaucoup moins. En effet, la majorité des quelques travaux reportés concernent le

couplage de chromophores par post-modification de polymères commerciaux fonctionnalisés en extrémité de chaîne (de type $\text{NH}_2\text{-PEG}^{2000}\text{-Lipide}$), présentant le désavantage de ne pouvoir être fonctionnalisés qu'en extrémité de chaîne, d'où la présence d'un seul chromophore par chaîne. Ceci paraît surprenant au vue des nombreuses applications potentielles de ce genre de bio-conjugués fluorescents, aussi bien sur systèmes lipidiques modèles qu'*in vivo*.

Ainsi, cette étude biblio a également permis de mettre en évidence l'originalité de l'objet final qui est visé lors de ce projet de thèse. En effet, les objets que nous proposons sont complètement originaux, puisqu'il n'a encore jamais été reporté dans la littérature de telles structures au sein desquelles il est possible de moduler à la fois le nombre et la nature des chromophores couplés, mais également la nature du lipide porté par la chaîne polymère. Ainsi, des chromophores totalement hydrophobes mais présentant des propriétés optiques intéressantes pourront être utilisés en milieu biologique grâce à la présence de la chaîne polymère permettant leur solubilisation en milieu aqueux. De plus, les phénomènes de photoblanchiment des sondes pourront être limités par la présence de nombreux chromophores en position latérale le long de la chaîne polymère.

Bibliographie du chapitre 1.

1. Girard-Egrot, A. Lipides membranaires. at <<http://www.scribd.com/doc/46509240/17/Liposomes>>
2. Karp, G., Bouharmont, J. & Wissocq, J. C. *Biologie cellulaire et moléculaire 2ème édition*. De Boeck University. 850p. (2004).
3. Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A., Bacq-Calberg, C. M. & Dusard, J. *Microbiologie ème édition française*. De Boeck University. 1164p. (2003).
4. Robert, D. & Vian, B. *Elements de Biologie Cellulaire 3ème édition*. Doin. 428p. (2004).
5. Maillat, M. *Biologie Cellulaire 10ème édition*. Elsevier-Masson. 618p. (2006).
6. Mazliak, P. *Les membranes protoplasmiques*. Doin. 195p. (1971).
7. Callen, J.-C. *Biologie Cellulaire - Des molécules aux organismes*. Dunod. 475p. (1999).
8. Yeagle, P. L. *The Membranes of Cells 2ème édition*. Academic Press. 349p. (1993).
9. Palsdottir, H. & Hunte, C. Lipids in membrane protein structures. *Biochimica et biophysica acta* **1666**, 2–18 (2004).
10. Spector, A. A. & Yorek, M. A. Membrane lipid composition and cellular function. *Journal of lipid research* **26**, 1015–35 (1985).
11. Cullis, P. R. & Hope, M. J. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes - Chapitre 2*. 596 (1991).
12. McMullen, T. P. W., Lewis, R. N. a. H. & McElhaney, R. N. Cholesterol–phospholipid interactions, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **8**, 459–468 (2004).
13. Bevers, E. M., Comfurius, P., Dekkers, D. W. & Zwaal, R. F. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochimica et biophysica acta* **1439**, 317–30 (1999).
14. Tribet, C. & Vial, F. Flexible macromolecules attached to lipid bilayers: impact on fluidity, curvature, permeability and stability of the membranes. *Soft Matter* **4**, 68 (2008).
15. Bartolami, S. Transduction du signal extracellulaire. (2006).at <http://schwann.free.fr/transduction_du_signal.htm>
16. Hanahan, D. J. *Guide to Phospholipid Chemistry*. Oxford University. 214p. (1997).
17. MILHAS, D. Thèse, Univeristé Paul Sabatier - Toulouse III. (2007).
18. Ono, A., Ablan, S. D., Lockett, S. J., Nagashima, K. & Freed, E. O. Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *PNAS* **101**, 14889–14894 (2004).
19. Saad, J. S. *et al.* Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *PNAS* **103**, 11364–11369 (2006).
20. Lederer, E. *Cours de Biochimie : Lipides*. Edisciences. 124p. (1970).
21. Lodish, H. *et al. Molecular Cell Biology*. W.H. Freeman & Co Ltd. 973p. (2003).
22. Cooper, G. M. *La cellule : une approche moléculaire*. De Boeck University. 706p. (1999).
23. Les Lipides. at <<http://espacesciences.com/MolCie/Inex/lipide/ndev/courlipid.htm>>
24. Maier, O., Oberle, V. & Hoekstra, D. Fluorescent lipid probes: some properties and applications (a review). *Chemistry and physics of lipids* **116**, 3–18 (2002).
25. Struck, D. K., Hoekstra, D. & Pagano, R. E. Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry* **20**, 4093–9 (1981).
26. Pagano, R. & Watanabe, R. Use of N-[5-(5, 7-dimethyl boron dipyrromethene difluoride-sphingomyelin to study membrane traffic along the endocytic pathway. *Chemistry and physics of Lipids* **102**, 55–63 (1999).
27. Aubin, J. E. Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **27**, 36–43 (1979).
28. Roederer, M. & Murphy, R. F. Cell-by-cell autofluorescence correction for low signal-to-noise systems: application to epidermal growth factor endocytosis by 3T3 fibroblasts. *Cytometry* **7**, 558–65 (1986).
29. Rasmussen, J.-A. M. & Hermetter, A. Chemical synthesis of fluorescent glycerol- and sphingolipids.pdf. *Progress in Lipid Research* **47**, 436–460 (2008).
30. Boldyrev, I. a. & Molotkovsky, J. G. A synthesis and properties of new 4,4-difluoro-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY)-labeled lipids. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* **32**, 78–83 (2006).

31. Lipsky, N. G. & Pagano, R. E. Intracellular Translocation of Fluorescent Sphingolipids in Cultured Fibroblasts : Endogenously Synthesized Sphingomyelin and Glucocerebroside Analogues Pass through the Golgi Apparatus En Route to the Plasma Membrane Thin-layer Chromatography. *The Journal of cell biology* **100**, 27–34 (1985).
32. Pagano, R. E., Martin, O. C., Kang, H. C. & Haugland, R. P. A novel fluorescent ceramide analogue for studying membrane traffic in animal cells: accumulation at the Golgi apparatus results in altered spectral properties of the sphingolipid precursor. *The Journal of cell biology* **113**, 1267–79 (1991).
33. Boldyrev, I. a *et al.* New BODIPY lipid probes for fluorescence studies of membranes. *Journal of lipid research* **48**, 1518–32 (2007).
34. Rosseto, R., Tcacenco, C. M., Ranganathan, R. & Hajdu, J. Synthesis of Phosphatidylcholine Analogues Derived from Glyceric Acid: a New Class of Biologically Active Phospholipid Compounds. *Tetrahedron letters* **49**, 3500–3503 (2008).
35. Davenport, L., Shen, B., Joseph, T. W. & Straher, M. P. A novel fluorescent coronenyl-phospholipid analogue for submicrosecond lipid fluctuations. *Chemistry and physics of lipids* **109**, 145–156 (2001).
36. Vishwakarma, R. A. *et al.* New fluorescent probes reveal that flippase-mediated flip-flop of phosphatidylinositol across the endoplasmic reticulum membrane does not depend on the stereochemistry of the lipid. *Org. Biomol. Chem.* **3**, 1275–1283 (2005).
37. Chaudhary, A., I, J. C., Witke, W., Kwiatkowski, D. J. & Prestwich, G. D. Probing the phosphoinositide human profilin I binding site of. *Chemistry and Biology* **1**, 273–281 (1998).
38. Chen, J., Profit, A. a. & Prestwich, G. D. Synthesis of Photoactivatable 1,2-O-Diacyl-sn-glycerol Derivatives of 1-L-Phosphatidyl-D-myo-inositol 4,5-Bisphosphate (PtdInsP(2)) and 3,4,5-Trisphosphate (PtdInsP(3)). *The Journal of organic chemistry* **61**, 6305–6312 (1996).
39. Monti, J. a, Christian, S. T. & Shaw, W. a Synthesis and properties of a highly fluorescent derivative of phosphatidylethanolamine. *Journal of lipid research* **19**, 222–8 (1978).
40. Tabarin, T., Martin, A., Forster, R. J. & Keyes, T. E. Poly-ethylene glycol induced super-diffusivity in lipid bilayer membranes. *Soft Matter* **8**, 8743–8751 (2012).
41. Jolimaître, P. *et al.* Synthesis and preliminary physical applications of a rhodamin-biotin phosphatidylethanolamine, an easy attainable lipid double probe. *Chemistry and physics of lipids* **133**, 215–23 (2005).
42. Sun, X., Liu, H., Orban, J. M., Sun, L. & Chaikof, E. L. Synthesis and Terminal Functionalization of a Polymerizable Phosphatidylethanolamine. *Bioconjugate chemistry* **12**, 673–677 (2001).
43. Petrossian, a, Kantor, a B. & Owicki, J. C. Synthesis and characterization of a highly fluorescent peptidyl-phosphatidylethanolamine. *Journal of lipid research* **26**, 767–73 (1985).
44. Koynova, R., Rosenzweig, H. S., Wang, L., Wasielewski, M. & MacDonald, R. C. Novel fluorescent cationic phospholipid. *Chemistry and physics of lipids* **129**, 183–194 (2004).
45. Schwarzmann, G., Wendeler, M. & Sandhoff, K. Synthesis of novel NBD-GM1 and NBD-GM2 for the transfer activity of GM2-activator protein by a FRET-based assay system. *Glycobiology* **15**, 1302–11 (2005).
46. Kamaly, N. *et al.* A novel bimodal lipidic contrast agent for cellular labelling and tumour MRI. *Organic & biomolecular chemistry* **8**, 201–11 (2010).
47. Lutz, J.-F. & Börner, H. G. Modern trends in polymer bioconjugates design. *Progress in Polymer Science* **33**, 1–39 (2008).
48. Börner, H. G. Strategies exploiting functions and self-assembly properties of bioconjugates for polymer and materials sciences. *Progress in Polymer Science* **34**, 811–851 (2009).
49. De Lambert, B. *et al.* Polymer-oligonucleotide conjugate synthesis from an amphiphilic block copolymer. Applications to DNA detection on microarray. *Bioconjugate chemistry* **16**, 265–74 (2005).
50. Eissa, A. M. & Cameron, N. R. Glycopolymer Conjugates. *Adv. Polym. Sci.* 1–44 (2012).
51. Wang, Q., Dordick, J. S. & Linhardt, R. J. Synthesis and Application of Carbohydrate-Containing Polymers. *Chem. Mater* **14**, 3232–3244 (2002).
52. Vázquez-Dorbatt, V., Tolstyka, Z. P., Chang, C.-W. & Maynard, H. D. Synthesis of a pyridyl disulfide end-functionalized glycopolymers for conjugation to biomolecules and patterning on gold surfaces. *Biomacromolecules* **10**, 2207–12 (2009).

53. Klok, H.-A. Peptide/Protein–Synthetic Polymer Conjugates: Quo Vadis. *Macromolecules* **42**, 7990–8000 (2009).
54. Jonker, A. Peptide-and protein-based hydrogels. *Chemistry of Materials* **24**, 759–773 (2012).
55. Sun, H. *et al.* α -Amino acid containing degradable polymers as functional biomaterials: rational design, synthetic pathway, and biomedical applications. *Biomacromolecules* **12**, 1937–55 (2011).
56. Kwak, M. & Herrmann, A. Nucleic acid/organic polymer hybrid materials: synthesis, superstructures, and applications. *Angewandte Chemie (International Ed.)* **49**, 8574–87 (2010).
57. Gary, D. J., Puri, N. & Won, Y.-Y. Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **121**, 64–73 (2007).
58. Sriwongsitanont, S. & Ueno, M. Physicochemical properties of PEG-grafted liposomes. *Chemical & pharmaceutical bulletin* **50**, 1238–44 (2002).
59. Teramura, Y., Kaneda, Y. & Iwata, H. Islet-encapsulation in ultra-thin layer-by-layer membranes of poly(vinyl alcohol) anchored to poly(ethylene glycol)-lipids in the cell membrane. *Biomaterials* **28**, 4818–25 (2007).
60. Zalipsky. Lipid-Polymer conjugates. US Patent (5,395,619) (1995).
61. Kitano, H. & Ohno, K. Sugar-Containing Lipids Prepared by Using a Lipophilic Radical Initiator: Interfacial Recognition by Lectin As Studied by Using The Multiple Internal Reflection Fluorescence Method. *Langmuir* **10**, 4131–4135 (1994).
62. Teramura, Y., Minh, L. N., Kawamoto, T. & Iwata, H. Microencapsulation of islets with living cells using polyDNA-PEG-lipid conjugate. *Bioconjugate chemistry* **21**, 792–6 (2010).
63. Kale, A. A. & Torchilin, V. P. Design, synthesis, and characterization of pH-sensitive PEG-PE conjugates for stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers: the effect of substitutes at the hydrazone linkage on the pH stability of PEG-PE conjugates. *Bioconjugate chemistry* **18**, 363–70 (2007).
64. Takeoka, S., Mori, K., Ohkawa, H., Sou, K. & Tsuchida, E. Synthesis and Assembly of Poly(ethylene glycol) -Lipids with Mono-, Di-, and Tetraacyl Chains and a Poly (ethylene glycol) Chain of Various Molecular Weights. *Journal of the American Chemical Society* **122**, 7927–7935 (2000).
65. Metselaar, J. M. *et al.* A novel family of L-amino acid-based biodegradable polymer-lipid conjugates for the development of long-circulating liposomes with effective drug-targeting capacity. *Bioconjugate chemistry* **14**, 1156–64 (2003).
66. Zalipsky, S. Synthesis of an End-Group Functionalized Polyethylene Glycol-Lipid Conjugate for Preparation of Polymer-Grafted Liposomes. *Bioconjugate chemistry* **4**, 296–299 (1993).
67. Hay, D. N. T., Rickert, P. G., Seifert, S. & Firestone, M. a Thermoresponsive nanostructures by self-assembly of a poly(N-isopropylacrylamide)-lipid conjugate. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 2290–1 (2004).
68. Woodle, M. C., Engbers, C. M. & Zalipsky, S. New amphipatic polymer-lipid conjugates forming long-circulating reticuloendothelial system-evading liposomes. *Bioconjugate chemistry* **5**, 493–6 (1994).
69. Kitano, H., Akatsuka, Y. & Ise, N. pH-Responsive Liposomes Which Contain Amphiphiles Prepared by Using Lipophilic Radical Initiator. *Macromolecules* **24**, 42–46 (1991).
70. Winnik, F. M., Davidson, A. R. & Hamer, G. K. Amphiphilic Poly(N-Isopropylacrylamides) Prepared by Using a Lipophilic Radical Initiator: Synthesis and Solution Properties in Water. *Macromolecules* **25**, 1876–1880 (1992).
71. Kitano, H., Ishino, Y. & Yabe, K. Dehydration Effect on the Recognition of Amphiphiles with Many Pendent Mannose Residues by Concanavalin A †. *Langmuir* **17**, 2312–2316 (2001).
72. Einzmann, M. & Binder, W. H. Novel functional initiators for oxazoline polymerization. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **39**, 2821–2831 (2001).
73. Kitano, H., Sumi, Y. & Tagawa, K. Recognition of novel lipopolypeptides with many pendent sugar residues by lectin. *Bioconjugate chemistry* **12**, 56–61 (2001).
74. Götz, H. *et al.* Synthesis of lipo-glycopolymer amphiphiles by nitroxide-mediated living free-radical polymerization. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **40**, 3379–3391 (2002).
75. Bathfield, M. *et al.* Synthesis of Lipid-alpha-End-Functionalized Chains by RAFT Polymerization . Stabilization of Lipid / Polymer Particle Assemblies. *Macromolecules* **41**, 8346–8353 (2008).

76. Kujawa, P. *et al.* Impact of End-Group Association and Main-Chain Hydration on the Thermosensitive Properties of Hydrophobically Modified Telechelic Poly(N -isopropylacrylamides) in Water. *Macromolecules* **39**, 341–348 (2006).
77. Ohno, K., Fukuda, T. & Kitano, H. Free radical polymerization of a sugar residue-carrying styryl monomer with a lipophilic alkoxyamine initiator: synthesis of a well-defined novel glycolipid. *Macromolecular Chemistry and Physics* **199**, 2193–2197 (1998).
78. Théato, P., Zentel, R. & Schwarz, S. Synthesis of End-Functionalized Lipopolymers and Their Characterization with Regard to Polymer-Supported Lipid Membranes. *Macromolecular Bioscience* **2**, 387–394 (2002).
79. Théato, P., Preis, E., Brehmer, M. & Zentel, R. New Lipopolymers for the Fixation of Lipid Bilayers. *Macromol. Symp.* **164**, 257–267 (2001).
80. Haddleton, D. M., Edmonds, R., Heming, A. M., Kelly, E. J. & Kukulj, D. Atom transfer polymerisation with glucose and cholesterol derived initiators. *New Journal of Chemistry* **23**, 477–479 (1999).
81. Hespel, L. *et al.* Synthesis of pH-sensitive micelles from linseed oil using atom transfer radical polymerisation (ATRP). *Polymer* **53**, 4344–4352 (2012).
82. Bajaj, A., Kondaiah, P. & Bhattacharya, S. Synthesis and gene transfection efficacies of PEI-cholesterol-based lipopolymers. *Bioconjugate chemistry* **19**, 1640–51 (2008).
83. Konno, T. & Ishihara, K. Cell-Container Prepared with Cytocompatible Phospholipid Polymers for Cell and Tissue Engineering. *Polymers for Biomedical Applications - ACS Symposium Series* **977**, 336–345 (2008).
84. Nakai, K., Morigaki, K. & Iwasashi, Y. Molecular recognition on fluidic lipid bilayer microarray corralled by well-defined polymer brushes. *Soft Matter* **6**, 5937–5943 (2010).
85. Feng, X., Tang, Y., Duan, X., Liu, L. & Wang, S. Lipid-modified conjugated polymer nanoparticles for cell imaging transfection. *J. Mater. Chem.* **20**, 1312–1316 (2010).
86. Dutertre, F., Pennarun, P.-Y., Colombani, O. & Nicol, E. Straightforward synthesis of poly(lauryl acrylate)-b-poly(stearyl acrylate) diblock copolymers by ATRP. *European Polymer Journal* **47**, 343–351 (2011).
87. Yusa, S.-I., Fukuda, K., Yamamoto, T., Ishihara, K. & Morishima, Y. Synthesis of well-defined amphiphilic block copolymers having phospholipid polymer sequences as a novel biocompatible polymer micelle reagent. *Biomacromolecules* **6**, 663–70 (2005).
88. Çayli, G. & Meier, M. a. R. Polymers from renewable resources: Bulk ATRP of fatty alcohol-derived methacrylates. *European Journal of Lipid Science and Technology* **110**, 853–859 (2008).
89. Neamark, A. *et al.* articles Aliphatic Lipid Substitution on 2 kDa Polyethylenimine Improves Plasmid Delivery and Transgene Expression. *Molecular Pharmaceutics* **6**, 1798–1815 (2009).
90. Wang, D. *et al.* Novel branched poly(ethylenimine)-cholesterol water-soluble lipopolymers for gene delivery. *Biomacromolecules* **3**, 1197–207 (2002).
91. Mahato, R. I., Lee, M., Han, S., Maheshwari, a & Kim, S. W. Intratumoral delivery of p2CMVml12 using water-soluble lipopolymers. *Molecular therapy* **4**, 130–8 (2001).
92. Han So, Mahato, R. I. & Kim, S. W. Water-soluble lipopolymer for gene delivery. *Bioconjugate chemistry* **12**, 337–45 (2001).
93. Diab, C., Winnik, F. M. & Tribet, C. Enthalpy of interaction and binding isotherms of non-ionic surfactants onto micellar amphiphilic polymers (amphipols). *Langmuir* **23**, 3025–35 (2007).
94. Albertorio, F. *et al.* Fluid and air-stable lipopolymer membranes for biosensor applications. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **21**, 7476–82 (2005).
95. van Tilborg, G. a F. *et al.* Annexin A5-functionalized bimodal nanoparticles for MRI and fluorescence imaging of atherosclerotic plaques. *Bioconjugate chemistry* **21**, 1794–803 (2010).
96. Siegel, A. P. *et al.* Compartmentalizing a lipid bilayer by tuning lateral stress in a physisorbed polymer-tethered membrane. *Soft Matter* **6**, 2723 (2010).
97. Ng, C. C., Cheng, Y.-L. & Pennefather, P. S. One-Step Synthesis of a Fluorescent Phospholipid-Hydrogel Conjugate for Driving Self-Assembly of Supported Lipid Membranes. *Macromolecules* **34**, 5759–5765 (2001).

CHAPITRE 2

SYNTHESE DE COPOLYMERES REACTIFS FONCTIONNALISES PAR UN PHOSPHOLIPIDE EN EXTREMITE ALPHA DE LA CHAÎNE

Sommaire

I. INTRODUCTION.	57
II. Synthèse d'Agents de Transfert de Chaîne fonctionnalisés par un phospholipide.	58
II.1. Synthèse d'un Agent de Transfert de Chaîne précurseur de type dithiobenzoate.	59
II.2. Couplage de phospholipides sur le dithiobenzoate précurseur.	61
II.3. Conclusions.	64
III. Synthèse de copolymères poly(NAM-co-NAS) portant un lipide en extrémité alpha de chaîne par le procédé RAFT.	65
III.1. Synthèse de copolymères poly(NAM-co-NAS) par voie RAFT avec le DBtB.....	65
III.2. Synthèse de copolymères poly(NAM-co-NAS) portant un lipide en extrémité de chaîne.....	68
III.3. Conclusions.	74
IV. Partie expérimentale.	75
IV.1. Matériel.	75
IV.2. Instruments.	75
IV.2.1. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	75
IV.2.2. Chromatographie d'exclusion Stérique couplée à un détecteur à diffusion de lumière multi-angles (CES / DDL).....	76
IV.3. Synthèse et purification.....	76
IV.3.1. Synthèse des Agents de Transfert de Chaînes lipidiques.	76
IV.3.2. Procédure de polymérisation.....	77
V. Conclusions du chapitre 2.	79

I. INTRODUCTION.

L'objectif de ce sujet de thèse est de synthétiser des bio-conjugués Lipide-Polymère-Chromophores (LPC) fluorescents constitués d'une chaîne polymère hydrophile présentant un lipide localisé en extrémité α de la chaîne et de multiples chromophores couplés de manière covalente en position latérale le long de la chaîne (Figure I.1).



Figure I.1. Représentation schématique des bio-conjugués LPC envisagés.

Comme le montre l'étude bibliographique du Chapitre 1, cette structure est tout à fait originale. Afin d'accéder à la structure recherchée, nous avons procédé en trois étapes (Figure I.2.) :

- Fonctionnalisation d'un Agent de Transfert de Chaîne (ATC) précurseur par un phospholipide (Etape 1)
- Synthèse de copolymères réactifs poly(*N*-acryloylmorpholine-co-*N*-acryloxysuccinimide) notés poly(NAM-co-NAS) par le procédé RAFT en présence de l'ATC lipidique (Etape 2)
- Couplage covalent de chromophores en position latérale, le long de la chaîne (Etape 3)

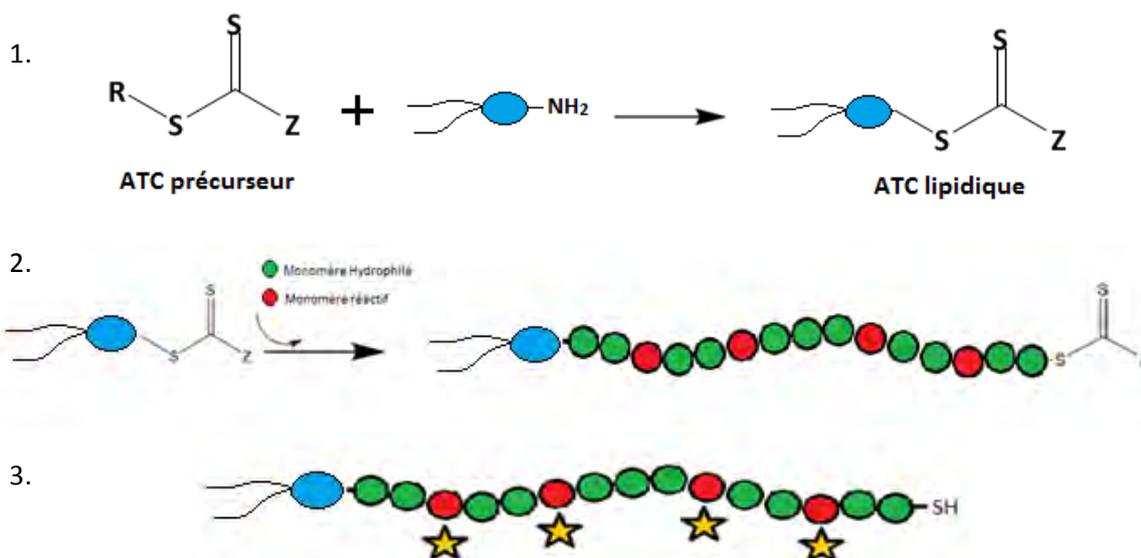


Figure I.2. Stratégie de synthèse des bio-conjugués LPC.

Cette stratégie a été choisie car elle permet la synthèse d'une plateforme i) à **architecture contrôlée** en utilisant le **procédé de polymérisation RAFT** (*Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer*)¹⁻⁴ (cf. annexe 1) et ii) **modulable**. Ainsi, il est possible de contrôler, non seulement l'architecture et la composition des chaînes polymères, mais il est

également possible de moduler le nombre et la nature des chromophores ainsi que la nature du lipide.

Notre approche a consisté à combiner plusieurs résultats précédemment obtenus dans l'équipe, à savoir :

- Les travaux d'Arnaud Favier concernant la synthèse, par le procédé RAFT, de copolymères poly(NAM-co-NAS). L'utilisation de la composition azéotrope propre à ce couple de monomères (Figure 1.3.) permet d'obtenir des chaînes d'architecture, de composition et de microstructure bien contrôlées^{5,6,7}.
- Les travaux de Maël Bathfield concernant la synthèse de polymères α -fonctionnels via la synthèse d'agents de transfert de chaînes fonctionnels, notamment d'ATC lipidiques^{8,9,10}. Cependant, ces ATC lipidiques n'ont jusqu'à présent été utilisés que pour la synthèse d'homopolymères et non de copolymères, ce que nous proposons de réaliser dans ce chapitre¹¹.

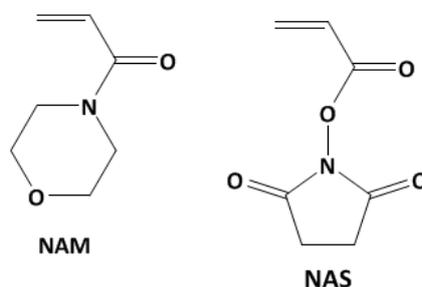


Figure 1.3. Structure du monomère NAM conduisant à des polymères hydrophiles et biocompatibles et du monomère réactif NAS.

Ce chapitre sera donc composé de deux grandes parties. La première partie concernera la synthèse d'agents de transfert de chaînes (ATC) fonctionnalisés par un phospholipide tandis que la seconde partie traitera de la synthèse de copolymères hydrophiles et réactifs poly(*N*-acryloylmorpholine-co-*N*-acryloxysuccinimide) [poly(NAM-co-NAS)] à partir de ces ATC lipidiques.

II. Synthèse d'Agents de Transfert de Chaîne fonctionnalisés par un phospholipide.

Il existe différentes techniques permettant d'introduire une entité lipidique en extrémité de chaîne polymère (cf. chapitre 1) : la modification d'amorceurs ou d'agents de contrôle de polymérisation, ou la post-modification de chaînes polymères.

La technique de polymérisation radicalaire contrôlée RAFT permet une fonctionnalisation des extrémités de chaîne via la fonctionnalisation des ATC nécessaires au contrôle de la polymérisation. L'entité d'intérêt couplée à l'ATC (ici le phospholipide) sera alors localisée, après polymérisation, en extrémité α des chaînes polymères (Figure 1.2.).

La synthèse d'un dithioester lipidique a été précédemment décrite par Maël Bathfield en 2008¹¹. Lors de cette étude, il a couplé un lipide de type DPPEHA (1,2-Dipalmitoyl-*sn*-

glycero-3-Phosphoethanolamine-*N*-(Hexanoylamine)) sur un ATC précurseur réactif de type dithiobenzoate. A partir de ces travaux, la synthèse des ATC précurseurs a été reprise en améliorant les étapes de purifications puis un nouvel ATC lipidique a été synthétisé.

II.1. Synthèse d'un Agent de Transfert de Chaîne précurseur de type dithiobenzoate.

Afin d'accéder aux ATC fonctionnalisés, le dithioester précurseur, nommé SEDB (**S**uccinimidoxycarbonyl**E**thyl**D**ithio**B**enzoate) (Figure II.1.) a été synthétisé. Il porte en effet une fonction réactive de type ester activé de *N*-Hydroxysuccinimide (NHS), permettant le couplage très efficace, par liaison amide, d'entités (biologiques) (*e.g.* biotine, sucre, lipide...) présentant une fonction amine primaire.

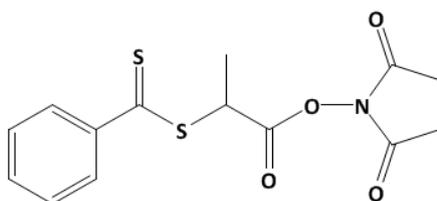
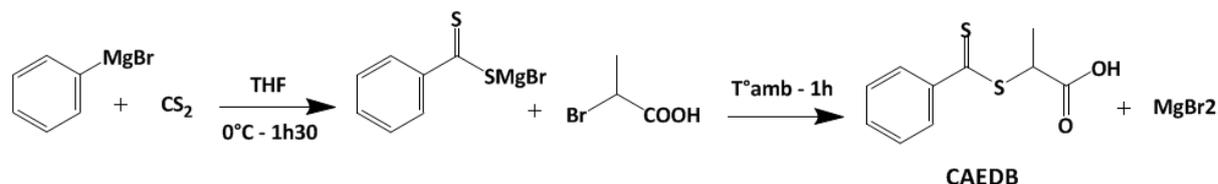


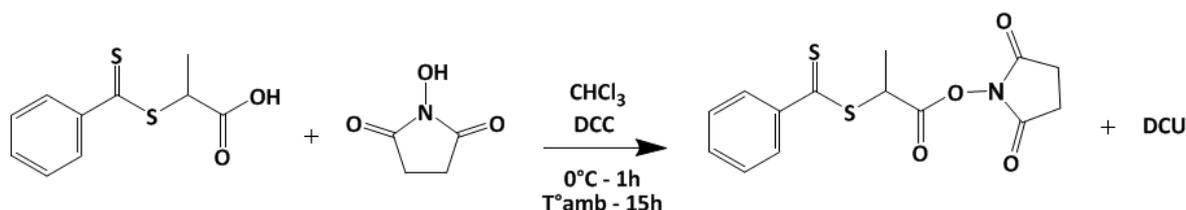
Figure II.1. Structure du SEDB.

La synthèse du SEDB comporte deux étapes :

- a) Synthèse d'un dérivé de type acide carboxylique (**C**arboxylic **A**cid **E**thyl**D**ithio**B**enzoate - CAEDB)¹²



- b) Activation de l'acide carboxylique par le NHS

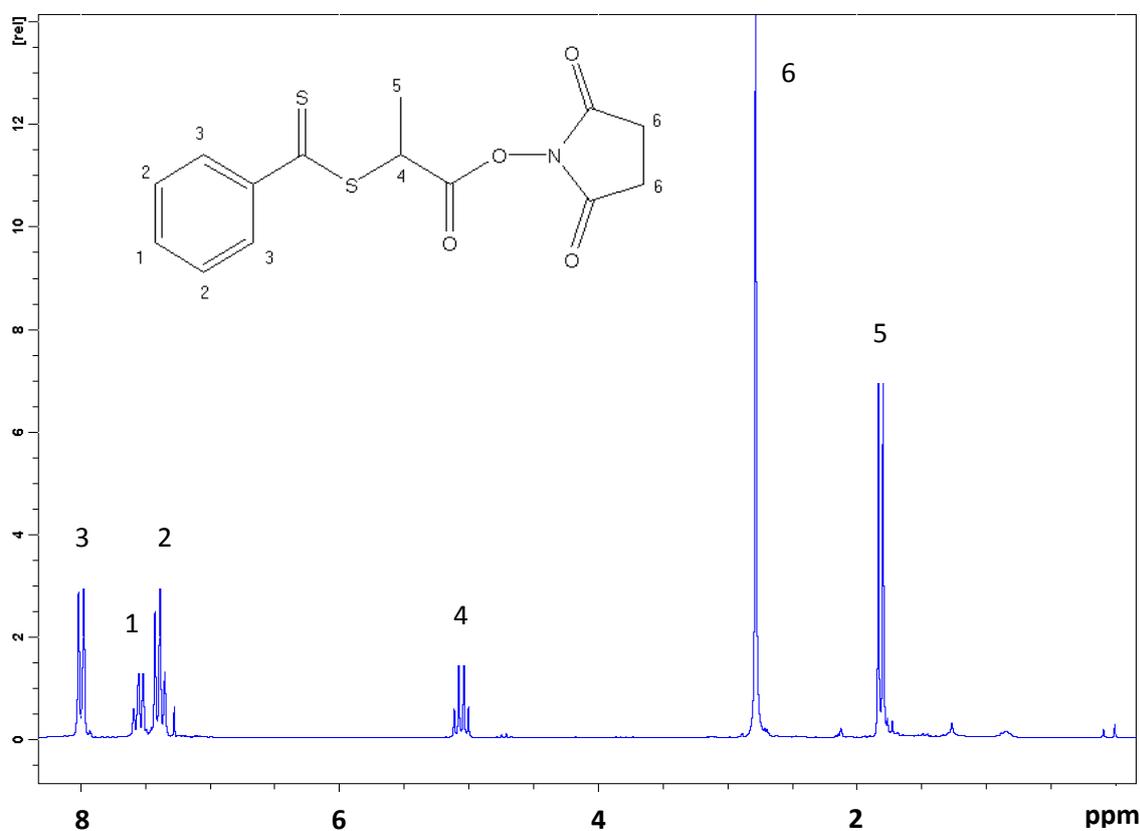


Les purifications du CAEDB et du SEDB ont été améliorées. En effet, la pureté des ATC lipidiques est très importante pour le contrôle de la polymérisation par voie RAFT. La présence d'impuretés peut avoir des conséquences importantes sur les cinétiques de polymérisation et le contrôle des masses molaires. Comme il sera discuté par la suite, l'obtention d'agents de contrôle très purs nécessite notamment d'optimiser la purification des produits obtenus en amont.

En ce qui concerne le CAEDB, une étape d'extraction du milieu réactionnel avec une solution de potasse KOH a été ajoutée par rapport au mode opératoire initial. Cette étape a

pour but de transformer les fonctions acides carboxyliques en fonctions carboxylates qui rendent alors le CAEDB soluble en solvant aqueux, permettant une élimination plus facile des impuretés restant solubles en milieu organique. Le CAEDB est ensuite récupéré par ré-acidification de la phase aqueuse avant une dernière étape de purification par chromatographie sur silice. Cette étape de purification supplémentaire rend la purification par chromatographie sur colonne de silice plus facile à réaliser.

En ce qui concerne la synthèse du SEDB, elle conduit à la formation de dicyclohexylurée (DCU) qui est initialement éliminée par deux reprises successives dans l'acétate d'éthyle suivies d'une filtration (cf. partie expérimentale). Cependant, cette étape ne permet pas d'éliminer totalement la DCU, c'est pourquoi, une purification du SEDB par recristallisation dans un solvant organique (le Pentane) a été mise au point. Le SEDB pur est obtenu sous forme de cristaux rouge alors que les impuretés comme la DCU en plus faible quantité restent solubles dans le pentane.



δ (ppm, 300K, CDCl₃) : 1,78 (d, H5) ; 2,77 (s, H6) ; 5,05 (q, H4) ; 7,38 (dd, H2) ; 7,55 (dd, H1) ; 8 (d, H3)

Figure II.2. Spectre RMN ¹H du SEDB purifié par recristallisation.

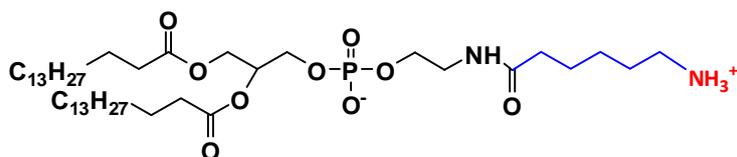
Le spectre RMN ¹H (Figure II.2.) permet de mettre en évidence la très bonne pureté des échantillons. Cette technique de purification du SEDB permet donc d'obtenir, après séchage, une poudre rouge/rose d'une pureté molaire estimée par RMN ¹H supérieure à 95%, alors que la technique de purification habituellement utilisée conduisait à un SEDB sous forme d'huile rouge présentant une pureté molaire de 67% environ.

Lors de ses travaux de thèse⁹, Maël Bathfield a également mis en évidence des problèmes liés au stockage du SEDB. En effet, il a observé que la présence d'impuretés entraînait sa dégradation, même lorsqu'il est conservé sous atmosphère inerte et au congélateur. La très haute pureté du SEDB et le fait qu'il soit obtenu sous forme solide après recristallisation pourrait donc permettre de limiter ces problèmes de dégradation au stockage. De plus, on peut également envisager de stocker l'ATC à long terme sous sa forme CAEDB moins sensible à la dégradation puis d'activer la fonction acide carboxylique uniquement en cas de besoin.

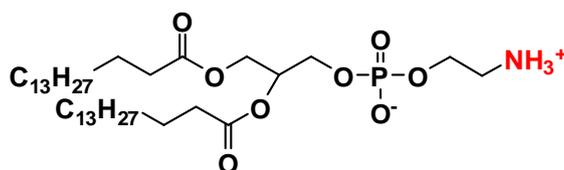
L'utilisation du SEDB est très intéressante et efficace puisqu'elle permet le couplage d'entités biologiques portant une fonction amine sur les agents de contrôle de polymérisation RAFT.

II.2. Couplage de phospholipides sur le dithiobenzoate précurseur.

Après avoir synthétisé et purifié le SEDB, deux phospholipides de type dipalmitoyle (deux chaînes alkyles saturées en C16) possédant une fonction amine primaire au niveau de leur tête polaire (Figure II.3.) ont été couplés via la fonction ester activé. Le couplage du lipide DPPEHA (1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-Phosphoethanolamine-*N*-(Hexanoylamine)) sur l'agent de contrôle a déjà été décrit par Maël Bathfield¹¹.



1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-Phosphoethanolamine-*N*-(Hexanoylamine)



1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-Phosphoethanolamine

Figure II.3. Structure des lipides utilisés pour la synthèse des ATC lipidiques
1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-Phosphoethanolamine-*N*-(Hexanoylamine) noté DPPEHA
1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-Phosphoethanolamine noté DPPE.

La synthèse de l'ATC portant le lipide DPPEHA a été reproduite, puis un nouvel agent de contrôle portant le lipide DPPE a été synthétisé en suivant la même procédure. Les deux lipides diffèrent par la présence d'un bras espaceur entre la fonction amine et le groupement phosphate dans le cas du DPPEHA. Cela pourra permettre d'étudier l'influence de ce bras espaceur sur la synthèse des ATC et des polymères mais surtout sur les propriétés des bio-conjugués finaux.

Le couplage des lipides se fait par formation d'une liaison amide via la réaction entre la fonction ester activé de l'ATC et la fonction amine primaire des lipides, selon le schéma de la figure II.4.

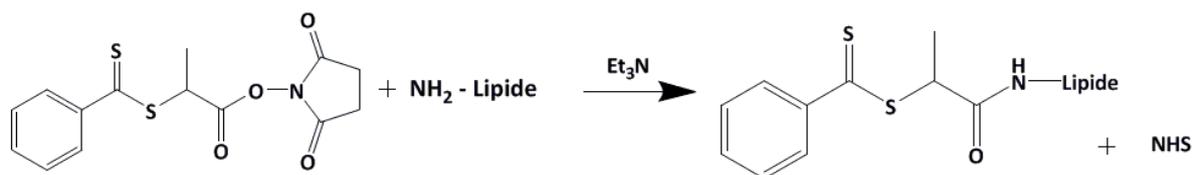


Figure II.4. Schéma réactionnel général de la formation d'un ATC lipidique à partir du SEDB.

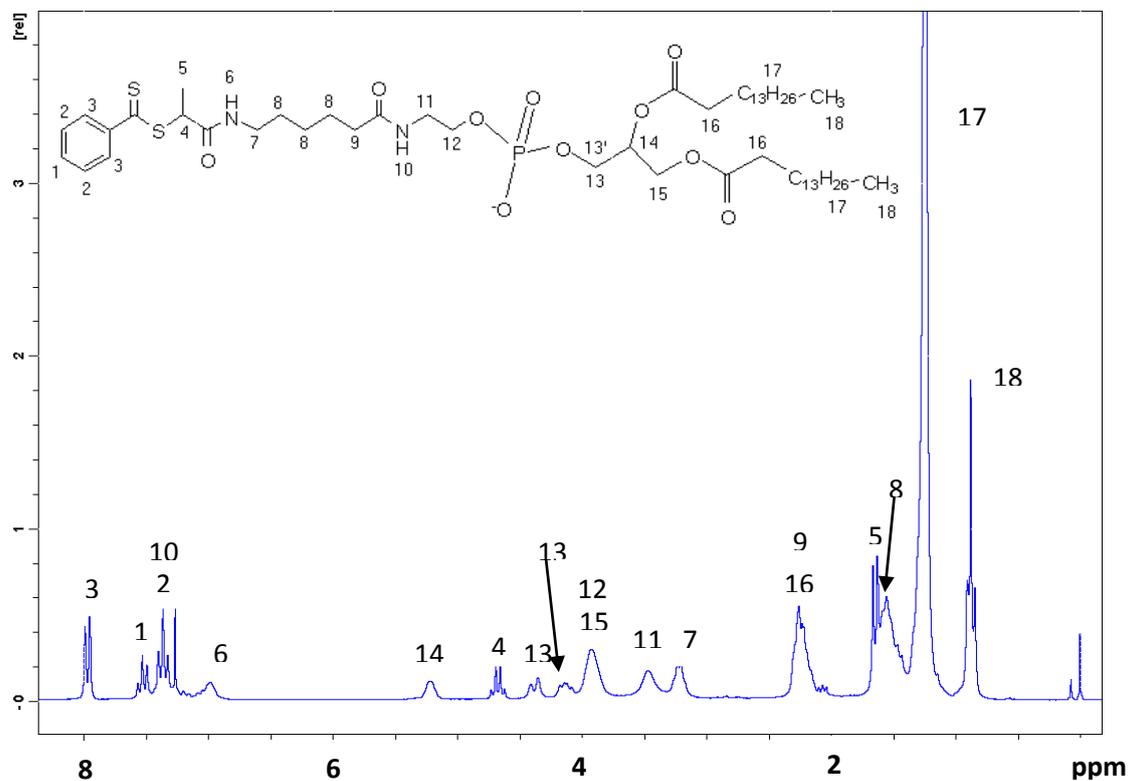
Il est important de noter que la réaction d'amidation sur la fonction ester activé pourrait être en compétition avec la réaction d'aminolyse de la fonction dithiobenzoate. Or, dans sa thèse, Maël Bathfield a montré que dans certaines conditions notamment de stœchiométrie (léger défaut en lipide), la réaction d'amidation est beaucoup plus rapide que la réaction de thioamidation. Lors de l'ajout du lipide-NH₂, la thioamidation a lieu après consommation de toutes les fonctions ester activé. C'est un des aspects qui rendent importante la purification du SEDB. En effet, la stoechiométrie de la réaction de couplage du lipide peut être bien mieux contrôlée lorsque cette pureté est très élevée.

Le NHS formé pendant la réaction de couplage a été éliminé par lavage de la phase organique. Néanmoins, il a été mis en évidence, par RMN ¹H notamment, que le dernier lavage à l'eau pure n'est pas suffisant pour éliminer tous les sels résiduels.

Une étape de filtration sur silice (éluant chloroforme puis éthanol) du produit obtenu après extraction a donc été ajoutée au mode opératoire initial, afin d'être sûr d'éliminer totalement tous les sels présents dans l'échantillon.

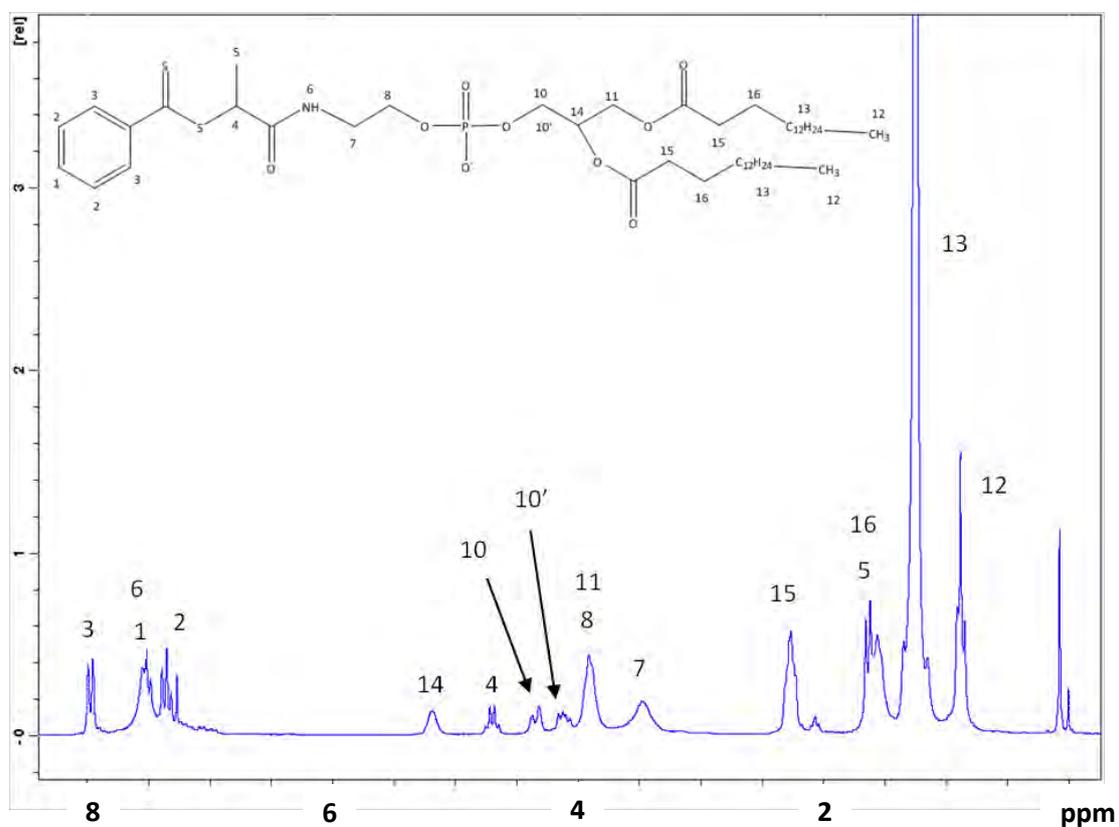
Le spectre RMN ¹H obtenu pour l'ATC-DPPEHA (Figure II.5.) est cohérent avec ceux obtenus par Maël Bathfield lors des précédents couplages de ce lipide DPPEHA sur le SEDB¹¹.

De même, le spectre RMN ¹H de l'ATC-DPPE correspond à la structure attendue (Figure II.6.).



δ (ppm, 300K, CDCl_3) : 0,87 (t, H18) ; 1,24 (s, H17) ; 1,55 (H8) ; 1,64 (H5) ; 2,23 (H9 et H16) ; 3,22 (H7) ; 3,47 (H11) ; 3,93 (H12 et H15) ; 4,12 (H13') ; 4,37 (H13) ; 4,67 (H4) ; 5,21 (H14) ; 6,98 (H6) ; 7,36 (dd, H2 et H10) ; 7,53 (dd, H1) ; 7,97 (d, H3).

Figure II.5. Spectre RMN ^1H de l'ATC-DPPEHA purifié (pureté 90%).



δ (ppm, 300K, CDCl_3) : 0,88 (H12) ; 1,24 (H13) ; 1,56 (H16) ; 1,63 (H5) ; 2,26 (H15) ; 3,47 (H7) ; 3,91 (H11 et H8) ; 4,10 (H10') ; 4,34 (H10) ; 4,69 (H4) ; 5,18 (H14) ; 7,35 (dd, H2) ; 7,51 (dd, H1 et H6) ; 7,97 (d, H3).

Figure II.6. Spectre RMN ^1H de l'ATC-DPPE purifié (pureté 90%).

Dans les deux cas, les ATC lipidiques synthétisés ne montrent que très peu d'impuretés (< 10%). Les différentes analyses RMN ¹H réalisées ont permis de mettre en évidence que la seule impureté présente dans les échantillons correspond au lipide seul qui n'a pas été couplé au SEDB. Cette impureté s'est avérée très difficile à éliminer, même par chromatographie sur colonne de silice.

Comme précisé précédemment, l'utilisation d'ATC précurseurs (SEDB) très purs (95% molaire) permet un bon contrôle de la stoechiométrie de la réaction de couplage, de limiter la présence de lipide résiduel en fin de réaction et donc d'améliorer la pureté des ATC lipidiques.

En revanche, la pureté des lipides commerciaux aminés de départ n'est pas connue. Il est possible qu'il contienne une proportion de lipides non fonctionnalisés, ce qui tend à limiter la pureté des ATC lipidique après couplage.

Dans notre cas, des ATC lipidiques présentant une pureté molaire de 90% chacun (estimée par RMN ¹H) ont ainsi été obtenus et ont ensuite été utilisés pour contrôler la polymérisation RAFT de copolymères poly(NAM-co-NAS).

II.3. Conclusions.

Le couplage de lipides présentant une fonction amine sur des ATC précurseurs activés a été décrit et étudié par le passé par Maël Bathfield¹¹. Cette synthèse comporte deux étapes :

- La synthèse d'un ATC précurseur réactif (SEDB)
- Le couplage des phospholipides aminés sur les ATC précurseurs.

Tableau II.1. Caractéristiques et structures des ATC lipidiques synthétisés.

	Pureté molaire (%)	Structures
ATC DPPEHA 1 011 g.mol ⁻¹	90	
ATC DPPE 898 g.mol ⁻¹	90	

Différentes étapes de purifications ont été ajoutées dans le but d'obtenir *in fine* des agents de contrôle de pureté améliorée, permettant un bon contrôle de la polymérisation. Après de nombreuses optimisations, l'ATC précurseur SEDB a été obtenu avec une pureté

supérieure à 95%, au lieu de 67%. Au final, deux ATC lipidiques présentant une pureté molaire de 90% ont été obtenus (Tableau II.1.) et pourront d'être utilisés pour le contrôle de la copolymérisation des monomères NAM et NAS.

III. Synthèse de copolymères poly(NAM-co-NAS) portant un lipide en extrémité alpha de chaîne par le procédé RAFT.

La technique de polymérisation radicalaire contrôlée de type RAFT permet d'envisager, via l'utilisation d'agents de contrôle fonctionnalisés, la synthèse de bio-conjugués dont les chaînes polymères portent une entité biologique en extrémité α de la chaîne (Figure III.1.).

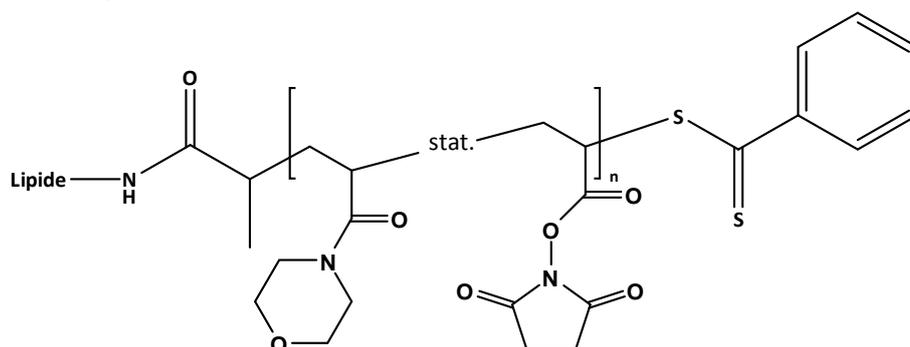


Figure III.1. Structure des bio-conjugués poly(NAM-co-NAS) présentant un lipide en extrémité α des chaînes.

En se basant sur les précédents travaux réalisés dans l'équipe sur la synthèse d'une part d'homopolymères de NAM à partir de l'ATC-DPPEHA¹¹ et d'autre part de poly(NAM-co-NAS) à partir d'ATC non fonctionnels⁶, des bio-conjugués LP multifonctionnels, parfaitement définis et portant l'entité lipidique en extrémité α de chaîne polymère ont été développés.

Dans un premier temps, je présenterai brièvement les résultats obtenus lors d'essais préliminaires de copolymérisation des monomères NAM et NAS via l'utilisation d'un ATC non fonctionnel de type dithiobenzoate (le dithiobenzoate de tert-butyle (DBtB)), avant de passer dans un second temps à la description des résultats obtenus lors de la copolymérisation de ces mêmes monomères via l'utilisation d'ATC lipidiques.

III.1. Synthèse de copolymères poly(NAM-co-NAS) par voie RAFT avec le DBtB.

Avant la copolymérisation par voie RAFT des monomères NAM et NAS en utilisant les ATC lipidiques, une première copolymérisation a été réalisée en utilisant le DBtB (Figure III.2) qui est un très bon agent de contrôle pour la copolymérisation des monomères NAM et NAS⁶.

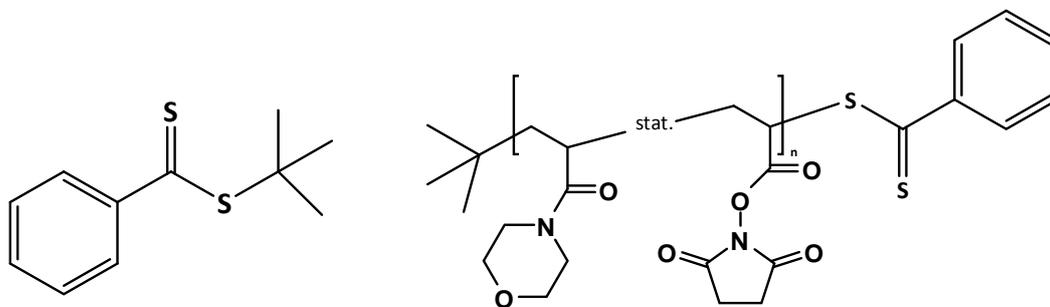


Figure III.2. Structure du DBtB (à gauche) et des copolymères formés (à droite).

Cette première polymérisation avait deux objectifs :

- Etablir la cinétique de copolymérisation dans des conditions expérimentales légèrement différentes de celles utilisées jusqu'à présent, afin de mieux anticiper la cinétique des copolymérisations réalisées en présence des ATC lipidiques.
- Obtenir des copolymères références sans lipide en extrémité de chaîne.

Conditions de polymérisation :

La réaction de polymérisation utilisant l'ATC DBtB a été réalisée à partir des conditions opératoires suivantes, qui diffèrent quelque peu de celles précédemment utilisées⁶ :

- Amorceur de polymérisation : AIBN
- [Monomères] : 2 M (dans le but de limiter la viscosité du milieu sans trop diminuer la vitesse de polymérisation)
- [ATC]₀ / [AIBN]₀ : 10 (afin d'optimiser la fonctionnalisation des chaînes formées)
- Température de polymérisation : 80°C (pour limiter les réactions de transferts et diminuer la vitesse de décomposition de l'amorceur tout en conservant une vitesse de polymérisation satisfaisante)
- Polymérisation sous atmosphère d'azote et dans le dioxane distillé
- Composition azéotrope NAM/NAS – 60%/40% molaire (permettant un bon contrôle de la composition des chaînes formées)

Les calculs ont été réalisés en visant une masse molaire moyenne à 100% de conversion de 20 000 g.mol.⁻¹ (cf. annexe 1).

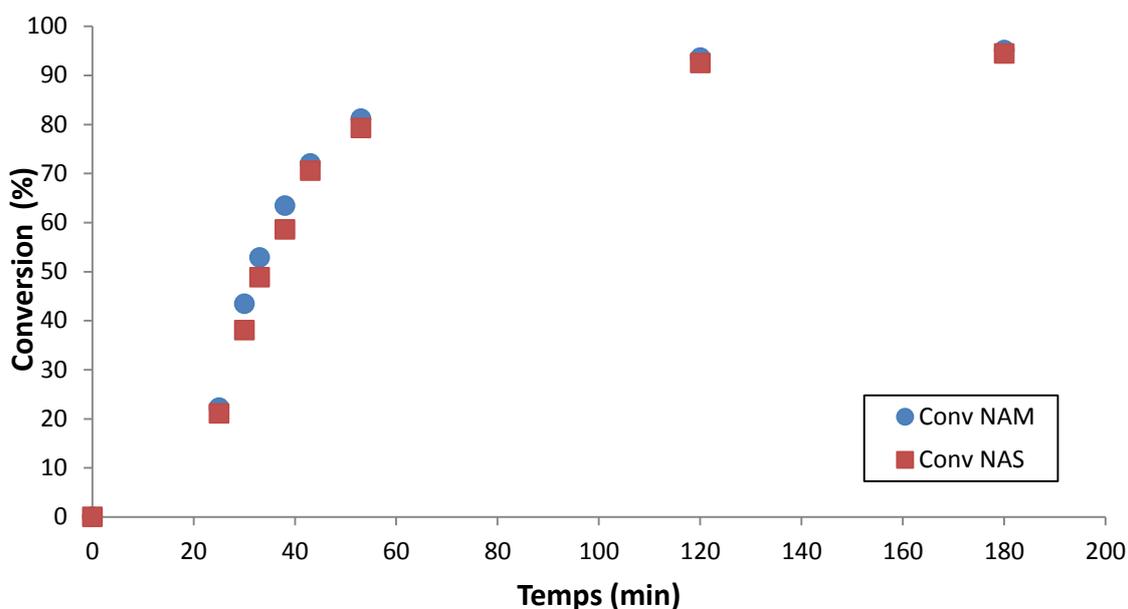


Figure III.3. Cinétique de copolymérisation des monomères NAM et NAS par voie RAFT. ATC : DBtB ; [Monomères] = 2 M ; Amorceur AIBN ; $[ATC]_0 / [AIBN]_0 : 10$; $T = 80^\circ\text{C}$; dioxane.

La courbe cinétique (Figure III.3.) confirme que les conversions des deux monomères NAM et NAS sont très similaires lorsque ces derniers sont introduits dans le milieu réactionnel à la composition azéotropique. Elle présente une période d'induction de 15 à 20 minutes en début de réaction, comme généralement observé⁶. Expérimentalement, cette période d'induction est marquée par un changement de coloration du milieu réactionnel, qui passe du violet (couleur de l'ATC DBtB) à l'orange/saumon (couleur des chaînes polymères terminées par la fonction dithiobenzoate).

Après cette période d'induction, la coloration du milieu réactionnel n'évolue plus et la conversion des monomères augmente très rapidement, avant d'atteindre un plateau à 90% de conversion au bout de 2 heures (Figure III.3.).

D'une manière générale, la cinétique est très similaire à celles précédemment reportées⁶. La majorité des changements apportés aux conditions expérimentales a donc été conservée pour la suite de l'étude.

Les différents échantillons de polymères obtenus après précipitation des prélèvements du milieu réactionnel ont ensuite été analysés par chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur à diffusion de lumière multi-angles (CES/DDL). L'objectif était de pouvoir déterminer les masses molaires absolues ainsi que les indices de polymolécularité (I_p) de nos échantillons et de vérifier le bon contrôle de la polymérisation (Figure III.4.).

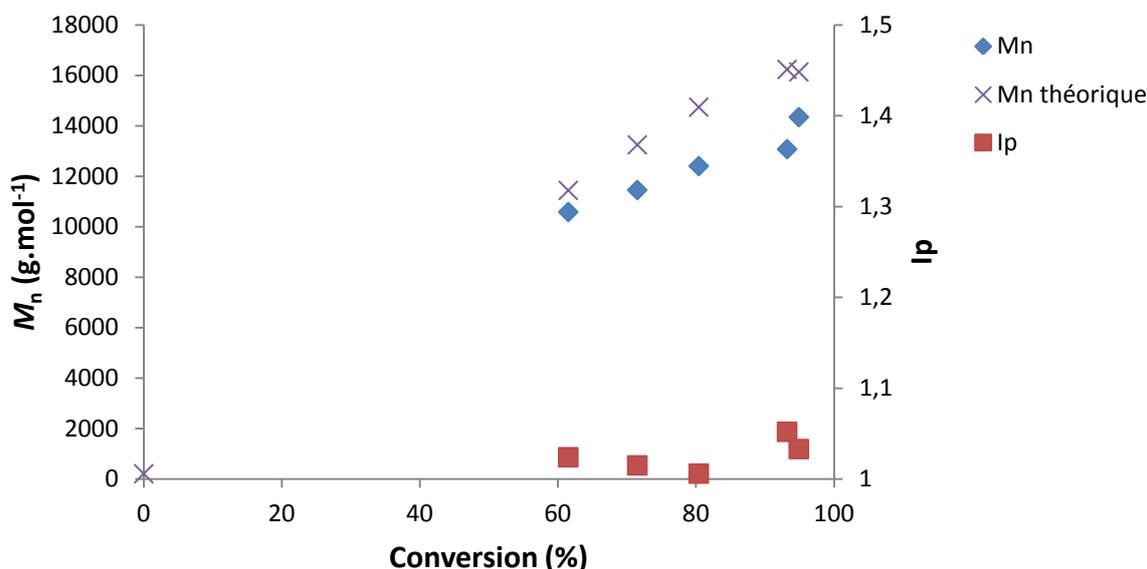


Figure III.4. Evolution de M_n et de I_p avec la conversion pour la copolymérisation des monomères NAM et NAS par voie RAFT : ATC : DBtB ; [Monomères] = 2 M ; Amorceur AIBN ; [ATC]₀ / [AIBN]₀ : 10 ; T = 80°C ; dioxane.

La figure III.4 représente l'évolution des M_n et I_p en fonction de la conversion en monomères. En ce qui concerne les M_n , les valeurs expérimentalement obtenues sont très proches des valeurs théoriques calculées (cf. annexe 1), en accord avec ce qui avait été précédemment obtenu. La faible quantité des échantillons prélevés à conversion < 60% n'a pas permis de convenablement les analyser. Cependant, l'évolution des masses molaires semble linéaire à faible conversion avec une légère déviation par rapport à linéarité à fortes conversions, ce qui est généralement observé^{13,14}.

NB : Dans le cas d'un copolymère ce n'est pas M_n qui évolue linéairement avec la conversion mais plutôt le degré de polymérisation moyen en nombre (DP_n), sauf si les deux monomères ont des masses molaires très proches et/ou si la copolymérisation est réalisée à l'azéotrope, ce qui est le cas ici.

Les indices de polymolécularité des échantillons de polymères sont faibles, inférieurs à 1,1 (Figure III.4.). L'évolution linéaire de M_n en fonction de la conversion et les I_p faibles confirment que l'ATC DBtB permet un bon contrôle de la copolymérisation des monomères NAM et NAS.

III.2. Synthèse de copolymères poly(NAM-co-NAS) portant un lipide en extrémité de chaîne.

Dans un second temps, les ATC lipidiques ont été utilisés comme agents de contrôle de la copolymérisation des monomères NAM et NAS par le procédé RAFT. Les conditions de polymérisation choisies sont similaires à celles utilisées dans le cas de la polymérisation en présence du DBtB. La seule différence concerne le rapport [ATC]₀ / [AIBN]₀ qui a été diminué pour passer de 10 à 5 compte tenu de la pureté des ATC lipidiques utilisés. En effet, les ATC

lipidiques présentent une pureté inférieure (90%) à celle du DBtB (>99%), or la présence de ces impuretés pourrait impacter la cinétique de polymérisation des monomères NAM et NAS, par exemple en désactivant les radicaux¹³. Ainsi, en augmentant la quantité d'AIBN il est possible de conserver un flux suffisant de radicaux afin d'initier la polymérisation (même si le taux de fonctionnalisation des chaînes peut diminuer légèrement).

Dans un premier temps, deux tests de synthèse de bio-conjugués LP multifonctionnels ont été réalisés avec l'ATC-DPPEHA. Deux échantillons de bio-conjugués LP ont ainsi été obtenus avec une masse molaire de 20 300 et 33 200 g.mol⁻¹ respectivement et des indices de polymolécularité faibles (Tableau III.1).

Tableau III.1. Caractéristiques des conjugués Lipide-Polymères obtenus lors des premiers tests de copolymérisation. ATC : ATC-DPPEHA ; [Monomères] = 2 M ; Amorceur AIBN ; [ATC]₀ / [AIBN]₀ : 5 ; T = 80°C ; dioxane.

	M_n (g.mol ⁻¹)	Indices de polymolécularité (Ip)	Nombre de motifs NAS par chaîne	Lipide en extrémité de chaîne
AF500-T2	20 300	1,04	50	DPPEHA
AF500-T3	33 200	1,11	87	DPPEHA

Dans un second temps, de nouveaux bio-conjugués LP ont été synthétisés, avec pour objectifs :

- De réaliser un suivi cinétique des copolymérisations
- De faire varier les masses molaires des polymères
- De faire varier la nature du lipide en extrémité de chaîne.

a) Copolymérisation en présence de l'ATC-DPPEHA.

La copolymérisation des monomères NAM et NAS a été réalisée, suivant les conditions évoquées plus haut (cf. III.2.), en utilisant l'ATC-DPPEHA (Tableau II.1.).

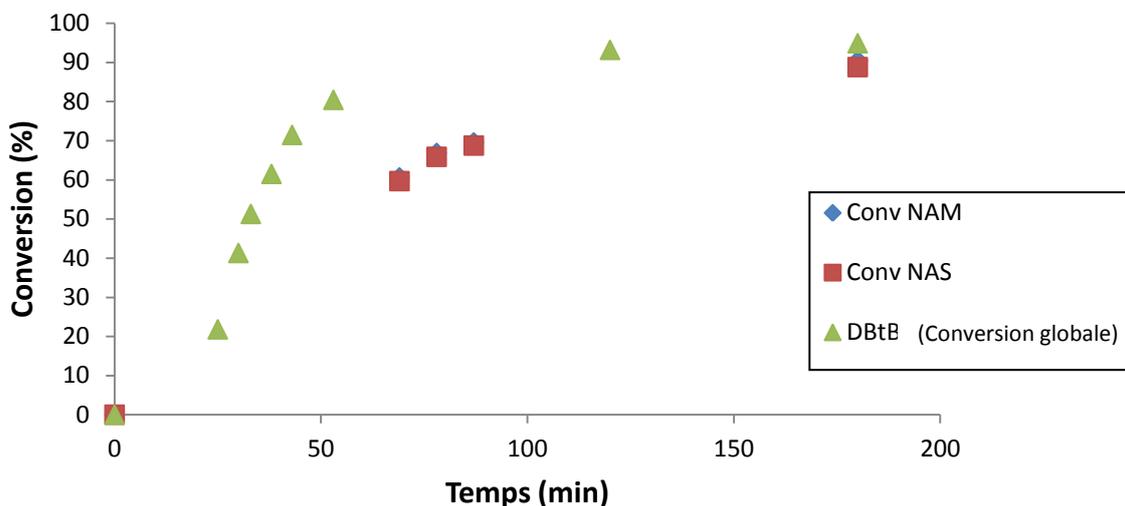


Figure III.5. Cinétique de polymérisation des monomères NAM et NAS par voie RAFT.
 ATC : ATC-DPPEHA ; [Monomères] = 2 M ; Amorceur AIBN ; $[ATC]_0 / [AIBN]_0 : 5$; $T = 80^\circ C$; dioxane.

Dans ce cas également, les vitesses de polymérisation des monomères NAM et NAS sont identiques (Figure III.5.). La copolymérisation semble plus lente que dans le cas de l'ATC DBtB puisque 70% de conversion des monomères sont atteints en 80 minutes contre seulement 40 minutes dans le cas de l'ATC DBtB. Cependant, il est difficile de comparer les deux polymérisations sachant que le rapport $[ATC]_0 / [AIBN]_0$ est différent.

Ceci est lié à une période d'induction de 40 minutes, deux fois plus longue que dans le cas précédent. Expérimentalement, et contrairement au cas du DBtB, la fin de la période d'induction est très difficile à observer puisque la variation de couleur du milieu réactionnel n'est pas très marquée (du rouge/orange à orange saumon). Différentes hypothèses peuvent être émises afin de tenter d'expliquer l'augmentation de la période d'induction. La première concerne les impuretés résiduelles, issues de la synthèse des ATC, introduites dans le milieu réactionnel. Ces impuretés pourraient agir comme quencheurs de radicaux libres et ralentiraient la cinétique de polymérisation¹³. D'autres hypothèses liées à la structure de l'ATC lipidique par rapport à celle du DBtB peuvent également être avancées¹⁵ :

- Une différence de nature du groupe partant lipidique par rapport au groupe partant du DBtB
- Une diminution de la vitesse de réamorçage par le radical primaire formé

Néanmoins ces dernières semblent peu probables. Les travaux de Maël Bathfield⁹ ont en effet montré que les polymérisations du monomère NAM en présence de l'ATC-DPPEHA ou de DBtB avaient des cinétiques similaires. Sachant que l'homopolymérisation du monomère NAM et la copolymérisation des monomères NAM et NAS sont similaires dans le cas du DBtB, ces résultats suggèrent donc que l'augmentation de la période d'induction dans notre cas est liée aux impuretés en mélange avec l'ATC lipidique.

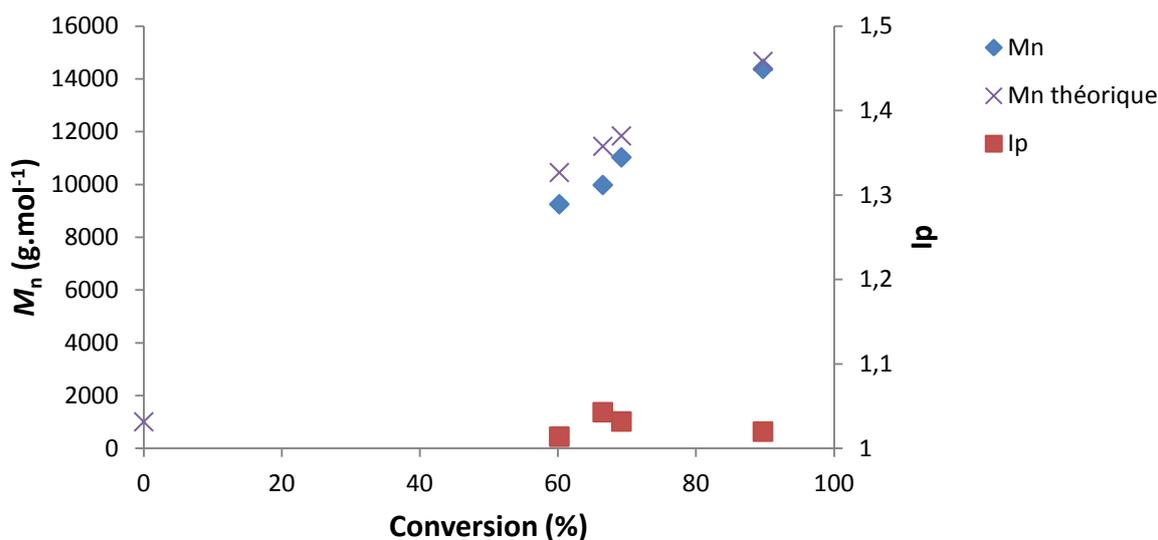


Figure III.6. Evolution de M_n et de I_p avec la conversion pour la copolymérisation des monomères NAM et NAS par voie RAFT : ATC : ATC-DPPEHA ; $[Monomères] = 2 M$; Amorceur AIBN ; $[ATC]_0 / [AIBN]_0 : 5$; $T = 80^\circ C$; dioxane.

Les masses molaires des polymères (CES/DDL) augmentent avec la conversion en accord avec les valeurs théoriques (Figure III.6.). Enfin, les indices de polymolécularité des échantillons de polymères obtenus sont très faibles, inférieurs à 1,1.

Ces différents résultats suggèrent donc que, même si la cinétique de polymérisation est ralentie, un très bon contrôle de la polymérisation des monomères NAM et NAS est observé.

b) Polymérisation en présence de l'ATC-DPPE.

Le nouvel agent de contrôle lipidique sans bras espaceur, l'ATC-DPPE, a également été utilisé pour la copolymérisation des monomères NAM et NAS selon les mêmes conditions opératoires que celles utilisées lors de l'utilisation de l'ATC-DPPEHA. Le premier objectif était d'obtenir des copolymères réactifs portant le lipide sans bras espaceur dans le but d'étudier l'influence de structure du lipide sur les propriétés finales des bio-conjugués. Le second était de vérifier si le changement de structure du lipide, et notamment l'absence du bras espaceur entre la tête polaire phosphate et la fonction dithiobenzoate, a un impact sur la copolymérisation des monomères NAM et NAS.

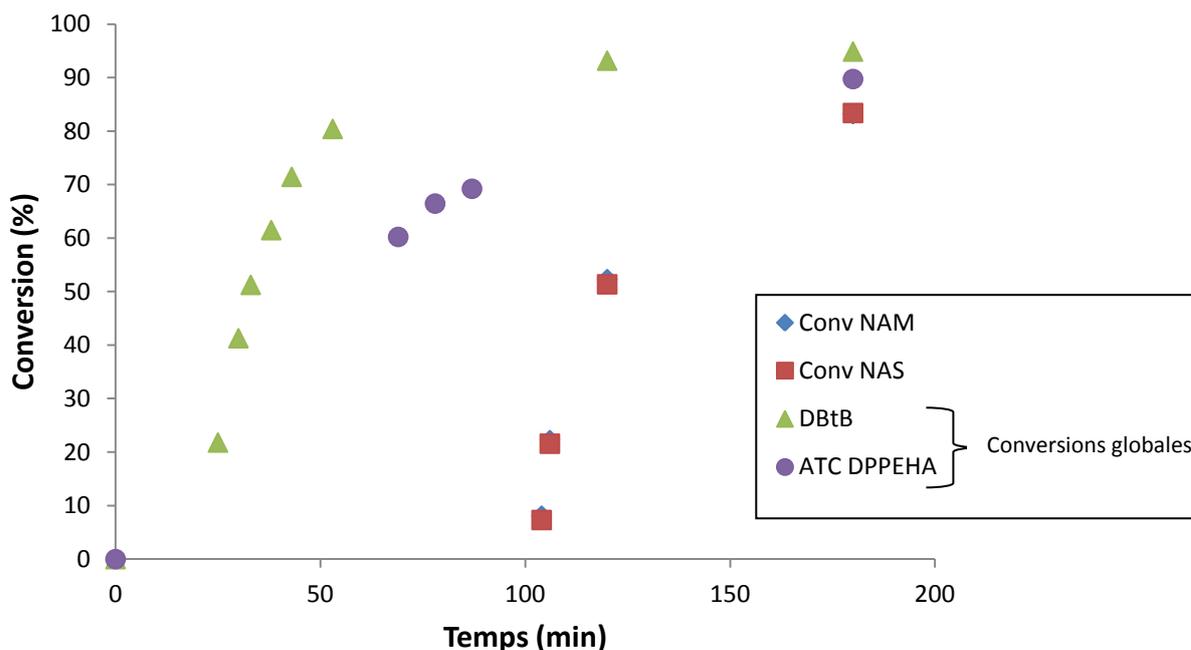


Figure III.7. Cinétique de polymérisation des monomères NAM et NAS par voie RAFT. ATC : ATC-DPPE ; [Monomères] = 2 M ; Amorceur AIBN ; $[ATC]_0 / [AIBN]_0 : 5$; $T = 80^\circ\text{C}$; dioxane.

Les vitesses de polymérisation des deux monomères sont identiques, et semblent diminuer après 90% de conversion (Figure III.7.). La cinétique de polymérisation des monomères NAM et NAS en présence de l'ATC-DPPE présente une période d'induction très longue (100 minutes), plus longue encore que dans le cas de la polymérisation en présence de l'ATC-DPPEHA (40 minutes). En revanche, lorsque la période d'induction est terminée, la vitesse de polymérisation est très élevée, comparable à la vitesse observée dans le cas du DBtB.

La différence entre les cinétiques des deux ATC lipidiques pourrait éventuellement être expliquée par la différence de structure des deux ATC, même si cela paraît peu probable. Dans le cas de l'ATC-DPPE, la liaison C-S impliquée dans le contrôle de la polymérisation est proche de la tête polaire phosphate chargée, ce qui pourrait entraîner une modification de l'activité de l'ATC, par exemple de la constante de fragmentation du fragment radical lipidique (cf. annexe 1).

L'explication la plus probable concerne la présence d'impuretés dans le milieu réactionnel. Il est possible que la quantité d'impuretés soit plus importante que dans le cas de la polymérisation réalisée en utilisant l'ATC-DPPEHA.

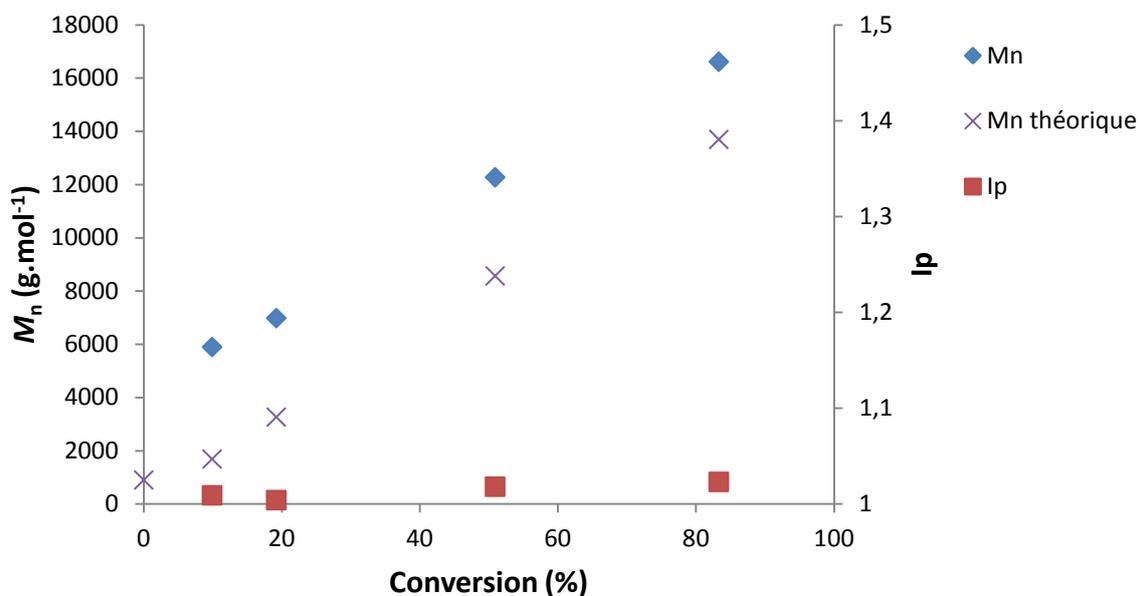


Figure III.8. Evolution de M_n et de I_p avec la conversion pour la copolymérisation des monomères NAM et NAS par voie RAFT : ATC : ATC-DPPE ; $[Monomères] = 2 M$; Amorceur AIBN ; $[ATC]_0 / [AIBN]_0 : 5$; $T = 80^\circ C$; dioxane.

Les masses molaires moyennes en nombre des échantillons de polymères croissent linéairement avec la conversion en monomères, et ce, jusqu'à des conversions élevées (Figure III.8.). Elles sont cependant supérieures aux masses molaires théoriques. De plus, on observe une ordonnée à l'origine de l'ordre de $4\ 000\ g.mol^{-1}$ au lieu des $900\ g.mol^{-1}$ attendus (correspondant à la masse molaire de l'ATC-DPPE) et l'écart entre masses molaires expérimentales et théoriques tend à diminuer avec l'augmentation de la conversion.

Ces observations suggèrent un phénomène d'amorçage lent des chaînes en début de polymérisation¹⁶ mais également que le nombre de chaînes polymères formées est plus faible que le nombre attendu. En début de polymérisation, les premières chaînes formées ont eu le temps d'ajouter plusieurs unités monomères avant que la majorité ne soit amorcée, ce qui se traduit par une ordonnée à l'origine plus élevée de la courbe M_n en fonction de la conversion. De plus, les masses molaires expérimentales restant supérieures aux masses molaires théoriques à conversion élevée, cela signifie que le nombre de chaînes formées durant la polymérisation est plus faible que celui prévu théoriquement à partir des quantités initiales de réactifs. Plusieurs raisons peuvent être avancées pour expliquer ce dernier point:

- Des réactions de terminaison entre les radicaux issus de l'amorceur I° et les fragments radicaux R° issu de la fragmentation de l'ATC
- Une dégradation de l'ATC DPPE conduisant à une perte de chaînes potentielles. En effet, dans la théorie, on considère qu'un ATC entraîne l'amorçage d'une chaîne polymère. Or, si une partie de l'ATC se dégrade pendant la période d'induction, le nombre de chaînes amorcées est plus faible, conduisant à des masses molaires plus élevées que prévu.

Les résultats obtenus sont donc très probablement à relier à la durée inhabituellement longue de la période d'induction, et donc éventuellement à l'absence de

bras espaceur entre la tête polaire du lipide et la liaison C-S. Il conviendra à l'avenir d'étudier leur reproductibilité, sachant qu'il a été observé par le passé que cette durée de la période d'induction peut être assez variable d'un essai à l'autre.

Les indices de polymolécularité des échantillons de polymères sont inférieurs à 1,1 (Figure III.8.), ce qui suggère que la distribution des masses molaires reste étroite et que les chaînes polymères formées, bien qu'ayant des masses molaires un peu supérieures à ce qui était prévu, sont bien contrôlées.

III.3. Conclusions.

La copolymérisation des monomères NAM et NAS à la composition azéotrope par voie RAFT a été réalisée, ce qui a permis la synthèse de chaînes polymères de composition parfaitement contrôlée. L'utilisation des ATC lipidiques (ATC-DPPEHA et ATC-DPPE) a permis d'obtenir des bio-conjugués LP présentant différentes masses molaires comprises entre 5 900 et 33 200 g.mol⁻¹ (Tableau III.2).

Tableau III.2. Liste des bio-conjugués Lipide-Polymères Lipide-poly(NAM-co-NAS) multifonctionnels obtenus.

	M_n (g.mol ⁻¹)	Indice de polymolécularité	Type de lipide en extrémité de chaîne	Nombre de fonctions NAS par chaîne
DPPEHA-8K	7 900	1,06	DPPEHA	21
DPPEHA-9K	9 250	1,01		24
DPPEHA-10K	10 000	1,04		26
DPPEHA-11K	11 000	1,03		29
DPPEHA-14K	14 400	1,02		38
DPPEHA-20K	20 300	1,04		50
DPPEHA-33K	33 200	1,11		87
DPPE-6K	5 900	1,01	DPPE	16
DPPE-7K	7 000	1,01	DPPE	18
DPPE-12K	12 300	1,02		32
DPPE-17K	16 600	1,02		44

Dans un premier temps, les résultats obtenus dans le cas du DBtB ont mis en évidence un bon contrôle de la polymérisation des monomères NAM et NAS. L'évolution de M_n avec la conversion est linéaire et les indices de polymolécularité des échantillons obtenus sont inférieurs à 1,1.

Ce premier essai a ensuite servi de base pour la copolymérisation des monomères NAM et NAS en présence des deux ATC lipidiques ATC-DPPEHA et ATC-DPPE. Dans les deux cas, des cinétiques de polymérisation plus lentes que dans le cas du DBtB ont été observées, avec des périodes d'induction plus élevées : 40 minutes dans le cas de l'agent de contrôle ATC-DPPEHA et 100 minutes dans le cas de l'agent de contrôle ATC-DPPE. La cause la plus probable de ces longues périodes d'induction en début de polymérisation semble être la présence d'impuretés dans les échantillons d'ATC lipidiques. Ces résultats permettent donc de mettre en évidence la nécessité d'utiliser des ATC très purs et donc l'importance des étapes de purification des produits intermédiaires SEDB et CAEDB.

Dans les deux cas, l'évolution de M_n avec la conversion est linéaire et les indices de polymolécularité des échantillons obtenus sont inférieurs à 1,1 suggérant un bon contrôle des polymérisations. Les valeurs des masses molaires des échantillons obtenus dans le cas de l'ATC-DPPEHA sont très proches des valeurs théoriques. En ce qui concerne l'ATC-DPPE, les masses molaires expérimentales obtenues sont supérieures aux valeurs théoriques, ce qui peut être expliqué par un nombre de chaînes plus faible que prévu initialement et par un phénomène d'amorçage lent.

IV. Partie expérimentale.

IV.1. Matériel.

N-Acryloylmorpholine (NAM) (Aldrich, 97%) a été distillé sous pression réduite (120 °C, 10 mmHg). *N*-acryloxysuccinimide (NAS) a été synthétisé comme décrit précédemment¹⁷. 4,4'-Azobis(isobutyronitrile) (AIBN) (Fluka, 98%) a été purifié par recristallisation dans l'éthanol. 1,4-Dioxane (Acros, 99%) a été distillé sur LiAlH₄ (110 °C). Tetrahydrofurane (Aldrich, >99.5%) a été distillé (en présence de benzophénone).

Solution de Bromure de Phénylmagnésium (1.0 M dans le tetrahydrofurane, Aldrich), Disulfure de Carbone (Aldrich, >99%), Acide 2-bromopropanoïque (Aldrich, >99%), *N*-Hydroxysuccinimide (Aldrich, 98%), *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide (Aldrich, 99%), 4-(2-aminoethyl)morpholine (Aldrich, 99%), trioxane (Acros, 99%), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (Avanti Polar Lipids, >99%), 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamine-*N*-(hexanoylamine) synthétique (Avanti Polar Lipids, >99%) et les autres solvants ont été utilisés sans autre purification supplémentaire.

IV.2. Instruments.

IV.2.1. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).

Les analyses RMN ¹H ont été enregistrées dans du chloroforme deutéré à température ambiante (298K) en utilisant un spectromètre Brüker DPX 200 opérant à 200,13

MHZ. Les déplacements chimiques des échantillons sont reportés en ppm en utilisant le tétraméthylsilane (TMS) comme référence interne.

IV.2.2. Chromatographie d'exclusion Stérique couplée à un détecteur à diffusion de lumière multi-angles (CES / DDL).

Les masses molaires absolues des échantillons polymères ont été déterminées en utilisant la chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur à diffusion de lumière multi-angles, en collaboration avec Agnès Crépet et Jean-Michel Lucas (IMP@UCBL – Lyon). Le système est composé d'une pompe shimadzu LC-6A liquid chromatography et d'une colonne PLgel 5 μ m Mixed-C column. L'utilisation d'un réfractomètre différentiel (DRI Waters 410) et d'un détecteur à diffusion de lumière trois-angles (46°, 90°, 133°) de type MiniDAWN TREOS light scattering photometer (Wyatt Technologies) opérant à 658 nm permet une double détection en ligne. Les analyses ont été réalisées par injection de 100 μ L d'une solution de polymère (5 mg.mL⁻¹) dans le chloroforme dans une boucle d'injection de 70 μ L. L'incrément d'indice de réfraction (dn/dc) du poly(NAM-co-NAS) (sans lipide) (0,130 mL.g⁻¹) a été précédemment déterminé, dans le chloroforme, en utilisant un interféromètre de type NFT ScanRef monocolour interferometer opérant à 633 nm. La détermination des masses molaires et des indices de polymolécularité des échantillons analysés a été réalisée via l'utilisation du logiciel Wyatt ASTRA SEC/LS.

IV.3. Synthèse et purification.

IV.3.1. Synthèse des Agents de Transfert de Chaînes lipidiques.

IV.3.1.1. Synthèse du SEDB (SuccinimidoxycarbonylEthylDithioBenzoate).

Cette synthèse se fait en deux étapes :

a) Synthèse du CAEDB (Carboxylic Acid EthylDithioBenzoate).

La synthèse du CAEDB a été réalisée en suivant le mode opératoire précédemment décrit par Bathfield *et al.*⁹

La purification du produit a été améliorée par ajout d'une étape d'extraction du milieu réactionnel avec une solution de potasse (KOH 1M) dans le but de transformer les fonctions acides carboxyliques en fonctions carboxylates solubles dans les solvants aqueux et d'éliminer les impuretés organosolubles. Le produit ainsi obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (Silica gel 60, Merck ; éluant : chloroforme, puis chloroforme/acétate d'éthyle 90/10 puis 80/20 v/v). Le produit purifié est obtenu avec un rendement d'environ 45% et une pureté de 95%.

b) Synthèse du SEDB par activation du CAEDB.

Dans ce cas également la synthèse a été réalisée en suivant le mode opératoire décrit par Bathfield *et al.*⁹

L'étape de purification du SEDB a été améliorée en ajoutant, une étape de recristallisation dans un solvant organique (le pentane). Cette technique, relativement difficile à mettre en place, a consisté à solubiliser le SEDB obtenu, après les deux reprises à l'acétate d'éthyle, dans un minimum de chloroforme puis à ajouter un grand volume de pentane (1 :10 v/v – CHCl₃/Pentane). Après recristallisation, le SEDB pur est obtenu sous forme de cristaux rouge et les impuretés comme la DCU restent solubles partiellement dans le pentane. Après séchage sous vide, une poudre rouge/rose est obtenue (pureté 95%) avec un rendement de 5 % après la première recristallisation et un rendement final de produit purifié de 30% environ.

RMN ¹H :

δ (ppm, 300K, CDCl₃) : 1,78 (d, H5) ; 2,77 (s, H6) ; 5,05 (q, H4) ; 7,38 (dd, H2) ; 7,55 (dd, H1) ; 8 (d, H3)

IV.3.1.2. Couplage du lipide sur le SEDB.

Les ATC lipidiques ont été synthétisés en utilisant le mode opératoire décrit par Bathfield *et al.*⁹

Le milieu réactionnel est ensuite lavé trois fois avec une solution de NaCl (100 g.L⁻¹) et deux fois à l'eau distillée. L'étape classique de séchage est évitée puisque l'ATC lipidique s'adsorbe irréversiblement sur le sulfate de magnésium anhydre. Une étape de filtration sur gel de silice (Silica gel 60, Merck ; éluant : chloroforme/éthanol 70/30 v/v) suivies d'une filtration sur verre fritté ont été ajoutées dans le but d'éliminer les sels résiduels.

Le produit séché est obtenu sous forme de poudre rouge/rose, le rendement de couplage est supérieur à 90% et les ATC lipidiques présentent une pureté de 90% environ.

IV.3.2. Procédure de polymérisation.

Les différents réactifs (NAM, NAS, AIBN, ATC lipidique) sont introduits dans un réacteur de type Schlenk à température ambiante. Le trioxane (référence interne pour le calcul des conversions) est ensuite ajouté. Le mélange est ensuite dégazé par une succession de 3 cycles congélation / vide / décongélation puis mis sous azote. Le mélange réactionnel est ensuite porté à 80°C et mis sous agitation.

Les différents prélèvements, correspondants à des polymères de masses molaires moyennes différentes, sont réalisés en utilisant une canule. Le polymère est ensuite

précipité au moins une fois dans l'éther diéthylique puis séché sous le vide d'une pompe à palette avant d'être analysé par CES / DDL.

Le suivi de la consommation en monomère est réalisé par RMN ^1H . Les échantillons à analyser sont préparés en mélangeant 100 μL de chaque prélèvement de milieu réactionnel à 500 μL de solvant deutéré (CHCl_3)¹⁸. Les taux de conversions des monomères sont calculés en comparant l'aire sous les pics des protons vinyliques relatifs aux monomères à l'aire sous le pic du trioxane choisi comme référence interne (Figure IV.1.).

La conversion est obtenue par la formule :

$$\text{Conv NAM} = 1 - \frac{\left(\frac{\text{HNAM}}{\text{Htrioxane}}\right) t}{\left(\frac{\text{HNAM}}{\text{Htrioxane}}\right) t_0}$$

Et

$$\text{Conv NAS} = 1 - \frac{\left(\frac{\text{HNAS}}{\text{Htrioxane}}\right) t}{\left(\frac{\text{HNAS}}{\text{Htrioxane}}\right) t_0}$$

Avec : *Conv NAM/NAS* = Conversion en NAM et en NAS

HNAM/ HNAS = aire sous le pic correspondant à un proton du NAM et du NAS

Htrioxane = aire sous le pic correspondant à six protons du trioxane.

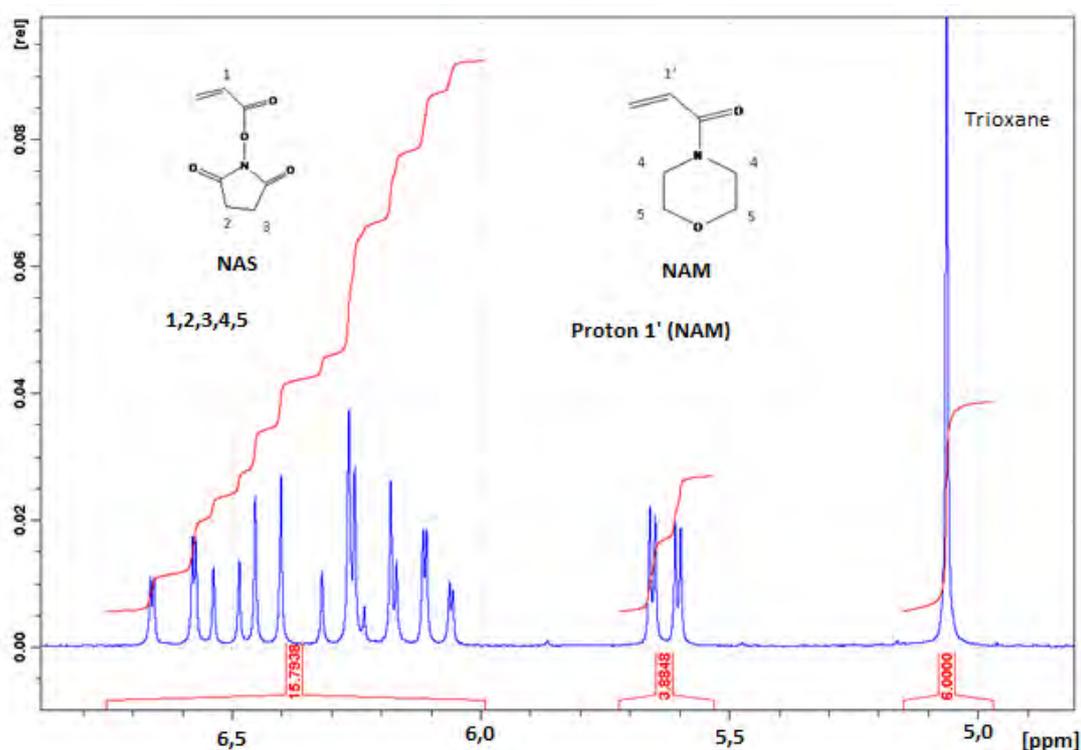


Figure IV.1. Spectre RMN ^1H des protons vinyliques permettant le calcul des conversions en monomères pendant la polymérisation.

V. Conclusions du chapitre 2.

L'objectif de ce chapitre était de synthétiser des bio-conjugués LPC de structure contrôlée composés d'une chaîne de copolymère fonctionnalisée par un lipide. Les structures que nous avons proposé de synthétiser sont basées sur des copolymères poly(NAM-co-NAS) réactifs et modulables portant un lipide en extrémité α de chaîne, obtenus via le procédé de polymérisation RAFT.

Dans un premier temps, deux agents de contrôle lipidiques adaptés à la polymérisation RAFT ont été synthétisés. Cette synthèse a consisté à coupler un lipide sur un agent de transfert de chaîne (ATC) précurseur (SEDB) par formation d'une liaison amide. Une attention particulière a été portée sur les étapes de purifications du CAEDB et du SEDB, puisque la pureté de ces ATC précurseurs a un impact direct à la fois sur la pureté des ATC lipidiques et sur la polymérisation. En effet, une étape d'extraction du CAEDB avec une solution de potasse a été rajoutée dans le mode opératoire ce qui a permis ensuite de faciliter la purification par chromatographie sur colonne de silice. En ce qui concerne le SEDB, une purification par recristallisation a été mise au point, permettant d'obtenir un produit avec une pureté molaire supérieure à 95%.

Deux lipides de type dipalmitoyle ont été couplés sur l'ATC précurseur (SEDB) : DPPEHA et DPPE. La réaction de couplage s'est avérée rapide et très efficace et l'utilisation de SEDB de pureté améliorée a permis d'obtenir des ATC lipidiques présentant des puretés molaires de 90% sans purification particulière.

Les ATC lipidiques ont été utilisés comme agents de contrôle de la copolymérisation des monomères NAM et NAS. Les cinétiques de polymérisation semblent être influencées par la pureté des ATC. Les différents essais ont également montré que ces ATC permettent d'obtenir de copolymères poly(NAM-co-NAS) de structures bien définies et de composition contrôlées, notamment grâce à l'utilisation de la composition azéotrope du couple NAM/NAS permettant un contrôle de la microstructure des chaînes formées. La stratégie de synthèse utilisée permet de faire varier de manière efficace à la fois la nature du lipide (DPPE et DPPEHA) et les masses molaires des chaînes synthétisés (de 5 900 à 33 200 g.mol⁻¹).

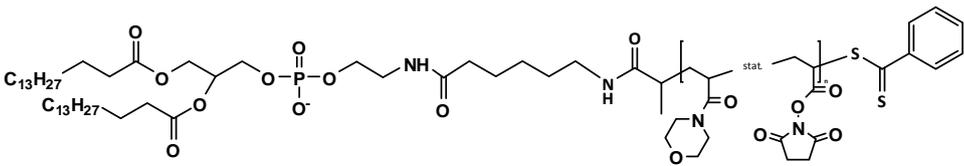
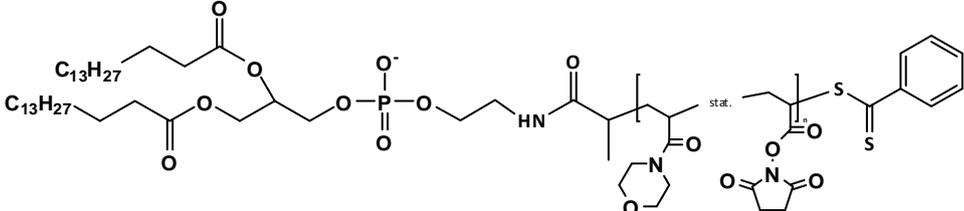
Il resterait néanmoins à approfondir les études cinétiques dans le but de comprendre dans le détail les différences observées lors de la polymérisation à partir des différents ATC, notamment au niveau de la période d'induction (40 minutes dans le cas de l'ATC-DPPEHA et 100 minutes dans le cas de l'ATC-DPPE).

L'optimisation des purifications des ATC lipidiques doit être poursuivie afin d'améliorer le contrôle des cinétiques de polymérisation. La purification du SEDB par recristallisation reste également à être optimisée (notamment le volume des deux phases chloroforme et pentane) dans le but d'améliorer le rendement de la purification.

A plus long terme, il serait intéressant de coupler d'autres lipides sur les ATC précurseurs, comme par exemple un dérivé aminé de PIP2 (cf. Introduction Générale).

Les bio-conjugués LP décrits dans ce chapitre ont ensuite été utilisés pour le couplage de chromophores en position latérale. Les bio-conjugués Lipide-Polymère-Chromophores obtenus ont ensuite été caractérisés par spectroscopie UV/Visible et de fluorescence (cf. chapitre 3).

Tableau V.1. Architectures des bio-conjugués Lipide-poly(NAM-co-NAS) synthétisés.

Lipide	Structure	DP _n
DPPEHA		218
		133
		95
		72
		66
		61
52		
DPPE		109
		81
		46
		39

NB: Tous les bio-conjugués Lipide-poly(NAM-co-NAS) n'ont pas été utilisés pour le couplage des chromophores en position latérale.

Bibliographie du chapitre 2.

1. Moad, G., Rizzardo, E. & Thang, S. H. Living Radical Polymerization by the RAFT Process. *Australian Journal of Chemistry* **58**, 379 (2005).
2. Chiefari, J. *et al.* Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer : The RAFT Process. *Macromolecules* **31**, 5559–5562 (1998).
3. Favier, A. & Charreyre, M.-T. Experimental Requirements for an Efficient Control of Free-Radical Polymerizations via the Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Process. *Macromolecular Rapid Communications* **27**, 653–692 (2006).
4. Lowe, A. B. & McCormick, C. L. Reversible addition–fragmentation chain transfer (RAFT) radical polymerization and the synthesis of water-soluble (co)polymers under homogeneous conditions in organic and aqueous media. *Progress in Polymer Science* **32**, 283–351 (2007).
5. Favier, A. Thèse, Université Lyon 1. (2002).
6. Favier, A., D’Agosto, F., Charreyre, M.-T. & Pichot, C. Synthesis of N-acryloxysuccinimide copolymers by RAFT polymerization, as reactive building blocks with full control of composition and molecular weights. *Polymer* **45**, 7821–7830 (2004).
7. Charreyre, M.-T., D’Agosto, F., Favier, A., Pichot, C. & Mandrand, B. biocompatible polymer for fixing biological ligands. US Patent (2004/0091451 A1) - 2004.
8. Bathfield, M., D’Agosto, F., Spitz, R., Charreyre, M.-T. & Delair, T. Versatile precursors of functional RAFT agents. Application to the synthesis of bio-related end-functionalized polymers. *Journal of the American Chemical Society* **128**, 2546–2547 (2006).
9. Bathfield, M. Thèse, Université Lyon 1. (2006).
10. D’Agosto, F., Bathfield, M. & Charreyre, M.-T. Novel functionalised transfer agents for controlled radical polymerization RAFT, RAFT methods using said transfer agents and polymers obtainable thereby. Patent (WO2007/003782 A2) - 2007.
11. Bathfield, M. *et al.* Synthesis of Lipid-alpha-End-Functionalized Chains by RAFT Polymerization . Stabilization of Lipid / Polymer Particle Assemblies. *Macromolecules* **41**, 8346–8353 (2008).
12. D’Agosto, F., Hughes, R., Charreyre, M. T., Pichot, C. & Gilbert, R. G. Molecular weight and functional end group control by RAFT polymerization of a bisubstituted acrylamide derivative. *Macromolecules* **36**, 621–629 (2003).
13. Favier, A., Barner-Kowollik, C., Davis, T. P. & Stenzel, M. H. A Detailed On-Line FT/NIR and ¹H NMR Spectroscopic Investigation into Factors Causing Inhibition in Xanthate-Mediated Vinyl Acetate Polymerization. *Macromolecular Chemistry and Physics* **205**, 925–936 (2004).
14. Roos, S. G. & Müller, A. H. E. Evidence for chain transfer in the atom transfer radical polymerization of butyl acrylate. *Macromol. Rapid Commun.* **21**, 864–867 (2000).
15. Monteiro, M. J. & de Brouwer, H. Intermediate Radical Termination as the Mechanism for Retardation in Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer Polymerization. *Macromolecules* **34**, 349–352 (2001).
16. Favier, A., Charreyre, M.-T., Chaumont, P. & Pichot, C. Study of the RAFT Polymerization of a Water-Soluble Bisubstituted Acrylamide Derivative . 1 . Influence of the Dithioester Structure. *Macromolecules* **35**, 8271–8280 (2002).
17. D’Agosto, F., Charreyre, M.-T. & Pichot, C. Side-Product of N-Acryloyloxysuccinimide Synthesis or Useful New Bifunctional Monomer? *Macromolecular Bioscience* **1**, 322–328 (2001).
18. Agosto, F. D., Charreyre, M.-T., Veron, L., Llauro, M. & Pichot, C. Kinetic Study of Free-Radical Solution Copolymerization of N-Acryloylmorpholine with an Activated Ester-Type Monomer, N-Acryloxysuccinimide. *Macromol. Chem. Phys.* **202**, 1689–1699 (2001).

CHAPITRE 3

COUPLAGE DES CHROMOPHORES SUR LES BIO-CONJUGUES LIPIDE-POLYMERES ET CARACTERISATION SPECTROSCOPIQUE

Les expériences présentées dans ce chapitre 3 ont toutes été réalisées par moi-même, en bénéficiant des conseils de Yann Bretonnière (laboratoire de Chimie de l'ENS de Lyon) pour la caractérisation par spectroscopie optique des bio-conjugués Lipide-Polymère-Chromophores.

Certains conjugués (ceux marqués par un chromophore commercial F647H présentés en annexe 5) ont été synthétisés et caractérisés par William Lacour lors de son stage de Master 2 que j'ai co-encadré.

Sommaire

I.	Introduction.....	85
II.	Les chromophores émettant dans le rouge lointain : bibliographie.	86
II.1.	Intérêt de l'utilisation de chromophores émettant dans le rouge lointain.	86
II.2.	Structures chimiques de divers chromophores émettant dans le rouge lointain.....	87
II.3.	Couplage de chromophores émettant dans le rouge lointain sur des chaînes polymères.....	89
II.4.	Conclusions.....	91
III.	Synthèse de bio-conjugués Lipide-Polymères fluorescents émettant dans le rouge lointain.....	92
III.1.	Présentation du chromophore utilisé pour la synthèse des bio-conjugués LPC.....	92
III.2.	Couplage du chromophore par formation de liaison amide via les unités NAS du copolymère.	93
III.2.1.	Suivi du couplage des chromophores sur les bio-conjugués LP et purification des bio-conjugués LPC.....	94
III.2.2.	Post-traitement des bio-conjugués LPC obtenus.	96
III.3.	Conclusions.....	99
IV.	Caractérisation spectroscopique des bio-conjugués LPC synthétisés.	99
IV.1.	Introduction - Définitions.....	99
IV.1.1.	Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence.	100
IV.1.2.	Le coefficient d'extinction molaire (ϵ).	100
IV.1.3.	Le rendement quantique de fluorescence.....	100
IV.1.4.	Brillance.....	102
IV.2.	Propriétés optiques du chromophore JM086.	105
IV.2.1.	Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence.	105
IV.2.2.	Détermination du rendement quantique de fluorescence et du coefficient d'extinction molaire.	105
IV.3.	Caractérisation optique des bio-conjugués LPC.	106
IV.3.1.	Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence.	107
IV.3.2.	Coefficients d'extinction molaire.....	110
IV.3.3.	Rendements quantiques de fluorescence.	111
IV.3.4.	Brillance des bio-conjugués LPC.	119
IV.4.	Conclusions.	120
V.	Partie expérimentale.....	121
V.1.	Matériels.....	121
V.2.	Instruments.....	121
V.2.1.	Chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur UV (CES/UV).	121
V.2.2.	Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).	121
V.2.3.	Spectromètre UV/Visible.....	121
V.2.4.	Spectromètre de fluorescence.	121
V.3.	Synthèses et purification.....	122
V.3.1.	Couplage du chromophore JM086 sur le copolymère.....	122
V.3.2.	Post-traitement des bio-conjugués Lipide-Polymère-Chromophores.	122
V.4.	Méthodes Analytiques.....	123
V.4.1.	Détermination du nombre moyen de chromophore par chaîne (n_c).	123
V.4.2.	Coefficient d'extinction molaire (ϵ).	123
V.4.3.	Rendement quantique de fluorescence (Φ).	124
VI.	Conclusions du chapitre 3.	125

I. Introduction.

Dans le chapitre 2, la synthèse de nouveaux bio-conjugués Lipide-Polymères (LP) multifonctionnels a été décrite. Ces bio-conjugués de longueur et de composition très bien définies ont été obtenus par polymérisation RAFT, en utilisant un agent de transfert de chaîne fonctionnel afin d'introduire une entité lipidique en extrémité α de la chaîne polymère.

Les bio-conjugués LP sont constitués d'une chaîne polymère poly(NAM-co-NAS) présentant un grand nombre de fonctions réactives de type ester activé en position latérale. Ces dernières ont ensuite été utilisées pour le couplage de chromophores, dans le but d'obtenir des sondes lipidiques fluorescentes de brillance améliorée par rapport au chromophore seul (Figure I.1).

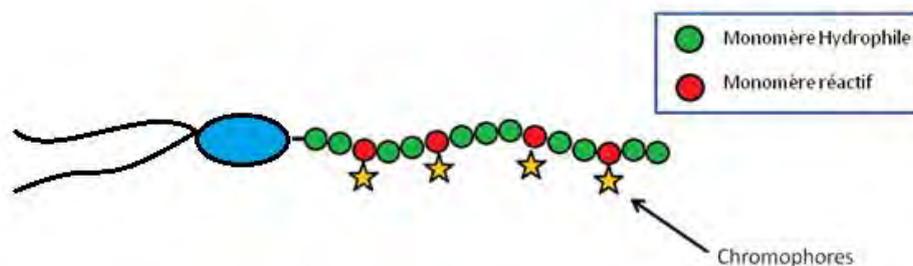


Figure I.1. Représentation schématique des bio-conjugués LPC visés.

Nous avons choisi un chromophore émettant dans le rouge lointain. Ce type de chromophore présente de nombreux intérêts comme expliqué dans la partie I. de ce chapitre.

Après cette courte partie bibliographique sur les chromophores émettant dans le rouge lointain, la seconde partie de ce Chapitre 3 présentera la synthèse, la purification et la caractérisation physico-chimique des bio-conjugués fluorescents (LPC). Enfin, dans une troisième partie, ces bio-conjugués fluorescents seront caractérisés par spectroscopie UV/Visible et par fluorescence avec pour objectif :

- De déterminer les propriétés optiques des bio-conjugués LPC
- D'évaluer l'influence de différents paramètres (densité en chromophores, architecture du squelette polymère...) sur ces mêmes propriétés optiques
- De déterminer s'il est possible d'obtenir des sondes lipidiques de brillance améliorée par rapport au chromophore seul.

II. Les chromophores émettant dans le rouge lointain : bibliographie.

II.1. Intérêt de l'utilisation de chromophores émettant dans le rouge lointain.

Après avoir synthétisé les bio-conjugués LP nous avons décidé de coupler sur la chaîne polymère des chromophores émettant dans le rouge lointain ($650 \text{ nm} < \lambda_{em} < 750 \text{ nm}$)¹. Ce choix a fait suite à une réflexion concernant les futures applications des bio-conjugués synthétisés.

La microscopie de fluorescence est un des outils les plus puissants et les plus simples à utiliser permettant de visualiser, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, de nombreux phénomènes cellulaires en temps réel et de manière précise. C'est pourquoi, de nombreuses sondes moléculaires ou macromoléculaires fluorescentes ont été développées, avec des propriétés différentes en fonction des applications envisagées.

Parmi ces molécules fluorescentes, des chromophores émettant dans le rouge lointain ont été développés pour plusieurs types d'applications, notamment en optoélectronique et en biologie^{2,3}. Dans ce dernier cas, les applications sont très vastes et concerne aussi bien le marquage des cellules que la cytométrie en flux ou les tests ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)⁴. Dans le cadre de la microscopie, l'un des principaux avantages des chromophores émettant dans le rouge lointain est de limiter le problème d'autofluorescence parasite des cellules vivantes.

Afin de limiter le problème d'autofluorescence des milieux biologiques, deux voies peuvent être empruntées :

- Modifier les sondes fluorescentes de telle sorte à déplacer l'absorption de ces dernières³. Il est ainsi possible d'exciter les sondes fluorescentes non plus dans le visible mais dans le rouge voire le rouge lointain, ce qui permet de moins exciter les molécules fluorescentes présentent intrinsèquement dans les cellules, telles que les protéines et les composés de nature aromatique qui absorbent dans le visible^{5,6} (Figure II.1.). L'utilisation de sondes fluorescentes excitables dans le rouge lointain permet également d'imager les tissus plus en profondeur, puisqu'à ces longueurs d'ondes les tissus absorbent très peu.

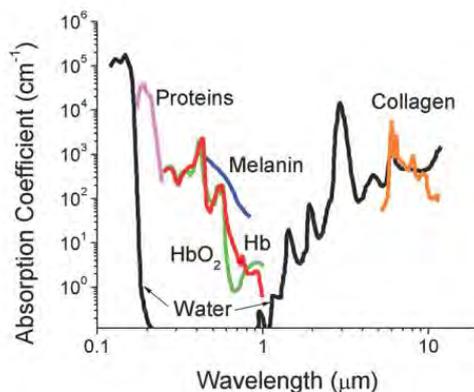


Figure II.1. Graphique représentant l'absorption de divers tissus et composants sanguins pour des longueurs d'ondes comprises entre 100 nm et 10 µm⁶.

- Utiliser des chromophores qui émettent dans le rouge lointain ou le proche infra rouge. En effet, les longueurs d'ondes d'autofluorescence cellulaires s'étendent sur une gamme très large allant de 400 nm à un peu plus de 600 nm avec un pic d'émission généralement situé autour de 550 nm^{5,7}. Ainsi, en utilisant des chromophores émettant dans le rouge lointain (et absorbant généralement dans le rouge voire le rouge lointain), et en utilisant des filtres appropriés, il est possible de supprimer les effets de l'autofluorescence parasite lors des observations par microscopie de fluorescence.

Les chromophores émettant dans le proche infrarouge peuvent également permettre de s'affranchir de l'autofluorescence. En revanche, l'utilisation de ce type de chromophore nécessite l'utilisation d'un appareillage très particulier pour les observations par microscopie (détecteurs, filtres, lasers...). Les chromophores émettant dans le rouge lointain permettent donc de résoudre le problème de l'autofluorescence des cellules sans pour autant nécessiter ce genre d'appareillage spécifique.

II.2. Structures chimiques de divers chromophores émettant dans le rouge lointain.

Compte tenu des différentes applications potentielles et des avantages apportés par les chromophores émettant dans le rouge lointain, de nombreuses équipes se sont penchées sur leur synthèse.

Il existe de nombreux types de chromophores qui émettent dans cette gamme de longueurs d'ondes, et qui présentent des structures chimiques très différentes. Parmi ces structures, on trouve les dérivés de type oxazine (Figure II.2.)^{8,9}.

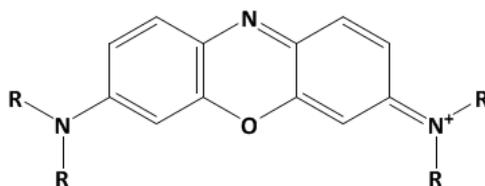


Figure II.2. Structure des chromophores de type oxazine.

Il s'agit de chromophores dont les longueurs d'ondes maximales d'émission s'étendent de 550 à 700 nm selon les fonctions présentes au niveau des atomes d'azote (Figure II.2.).

Les thiazines constituent une autre famille de chromophores émettant dans le rouge lointain, et présentent une structure très proche des oxazines (Figure II.3.)⁸.

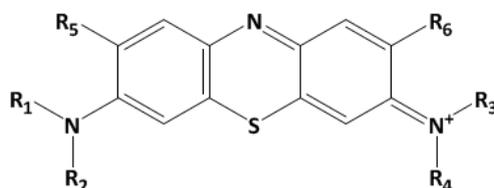


Figure II.3. Structure des chromophores de type thiazine.

En fonction de la nature des substituants R, les longueurs d'ondes maximales d'émission s'étendent de 610 à 710 nm.

Les cyanines constituent une autre famille très répandue de ce type de chromophores (Figure II.4.)^{8,10}.

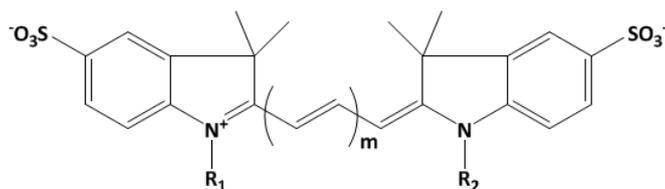


Figure II.4. Structure des chromophores de type cyanine.

Lorsque « m » est égale à 2, le chromophore est appelé Cy5. Il s'agit du chromophore de type cyanine et émettant dans le rouge lointain le plus fréquemment rencontré, et qui présente une longueur d'onde maximale d'émission de 660 nm.

Une autre famille de chromophore, basée sur une structure contenant un noyau pyrane, a été décrite. Cette famille est constituée de différentes molécules dont les longueurs d'ondes maximales d'émission se situent entre 630 et 680 nm¹¹.

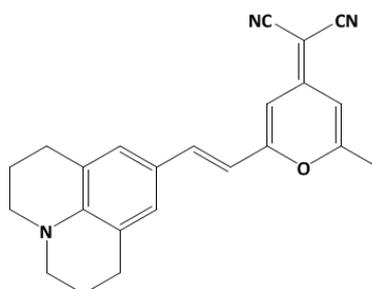


Figure II.5. Exemple d'un chromophore basé sur une structure de type pyrane : le DCM2 (4-(dicyanométhylène)-2-méthyl-6-[4-diméthylaminostyryl]-4H-pyran]).

Enfin, il existe une autre famille de chromophores émettant à la limite entre le rouge lointain et le proche infra-rouge : les pyrrolopyrroles cyanines (Figure II.6.)¹². Il s'agit d'une classe de molécule assez récente basée sur un cœur pyrrolo pyrrole, présentant des longueurs d'ondes maximales d'émission comprises entre 700 et 800 nm.

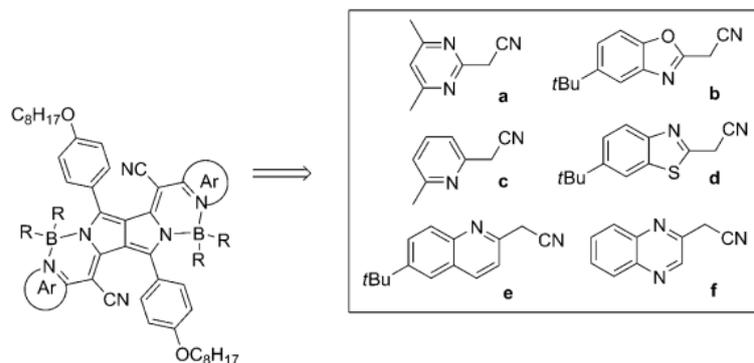


Figure II.6. Structure des chromophores de type pyrrolopyrrole cyanine¹².

Cette liste ne se prétend pas exhaustive mais apporte un aperçu de la variété des structures utilisées pour la synthèse de chromophores émettant dans le rouge lointain et/ou le proche infra rouge, de plus en plus utilisés pour l'imagerie cellulaire.

Il existe également de nombreux chromophores commerciaux émettant dans cette gamme de longueurs d'ondes, parmi lesquels¹³ :

- Alexa 633 ($\lambda_{\text{abs max}}$ 632 nm / $\lambda_{\text{em max}}$ 647 nm) basé sur une structure de type Rhodamine
- Alexa 647 ($\lambda_{\text{abs max}}$ 650 nm / $\lambda_{\text{em max}}$ 668 nm) basé sur une structure de type cyanine
- Evoblue 30 ($\lambda_{\text{abs max}}$ 635 nm / $\lambda_{\text{em max}}$ 666 nm) basé sur une structure de type oxazine
- Atto 647N ($\lambda_{\text{abs max}}$ 644 nm / $\lambda_{\text{em max}}$ 670 nm) basé sur une structure de type carbopyronine.

Ces chromophores sont très utilisés en microscopie de fluorescence. Cependant, certains présentent des inconvénients qui limitent leur utilisation dans le domaine de la biologie. Par exemple, la solubilité limitée du chromophore Atto 647N dans les solvants polaires, ou encore la faible photostabilité du chromophore Alexa 633. C'est pourquoi des équipes ont synthétisé des analogues de ces chromophores commerciaux permettant de résoudre ces différents problèmes^{13,14}.

II.3. Couplage de chromophores émettant dans le rouge lointain sur des chaînes polymères.

Plusieurs équipes se sont intéressées à l'utilisation de polymères en imagerie optique, et les ont notamment utilisés pour réaliser le couplage de chromophores émettant dans le rouge lointain.

Roth *et al.*¹⁵ ont, par exemple, synthétisé des chaînes de PDEGMA [poly(diéthylène glycol méthacrylate)] par polymérisation RAFT en utilisant un ATC de type dithioester portant une fonction ester activé (pentafluorophényle, PFP). L'extrémité α des chaînes

polymères portant la fonction PFP a été utilisée pour le couplage d'un chromophore de type Oregon Green Cadaverine, alors que l'extrémité ω des chaînes (portant la fonction dithibenzoate) a été utilisée pour le couplage du chromophore Texas Red présentant une longueur d'onde maximale d'émission de 600 nm mais dont la fluorescence s'étend jusqu'à une longueur d'onde de plus de 650 nm. Les auteurs ont également synthétisés des chaînes de PDEGMA portant uniquement le chromophore Texas Red en extrémité ω des chaînes après avoir aminolysé l'extrémité α de ces mêmes chaînes (Figure II.7.).



Figure II.7. Représentation schématique des structures synthétisées par Roth et al.¹⁵.

Lucas *et al.*¹⁶ ont quant à eux décrit le couplage du chromophore de type cyanine Cy5 ($\lambda_{em\ max} = 660\ nm$) sur des chaînes de poly(L-lysine). Les auteurs ont utilisé un chromophore portant une fonction ester activé de type *N*-Hydroxysuccinimide qui a permis le couplage du chromophore sur les fonctions amines présentes le long de la chaîne polymère. Le couplage de ce chromophore a également été réalisé sur des copolymères PEG-PDMAEMA-AEMA (poly[2-(diméthylamino)éthyl]méthacrylate-co-aminoéthyl méthacrylate pegylés) en position latérale via les fonctions amines présentes sur les motifs AEMA (Figure II.8.).

Ces deux polymères fluorescents ont été utilisés pour étudier le relargage d'oligonucléotides et d'ADN après transfection dans les cellules vivantes.

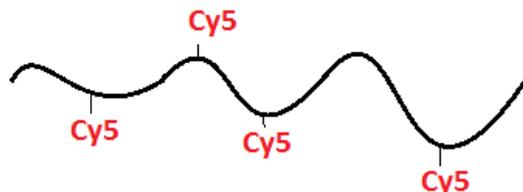


Figure I.8. Représentation schématique des structures synthétisées par Lucas et al.¹⁶.

Saad *et al.*¹⁷ ont notamment décrit la synthèse de dendrimères PAMAM (polyamidoamine). Différentes molécules ont ensuite été couplées à la surface des dendrimères : un analogue du peptide luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) qui constitue un agent de ciblage des molécules cancéreuses, le chromophore Cy5.5 ($\lambda_{em\ max} = 710\ nm$) et paclitaxel (TAX) qui est une molécule anticancéreuse. Le Cy5.5 et le LHRH sont liés aux chaînes de PAMAM par une liaison amide alors que le TAX est lié aux chaînes par une liaison ester biodégradable (Figure II.9). L'objectif est d'utiliser cette structure afin de traiter de manière spécifique les cellules cancéreuses.

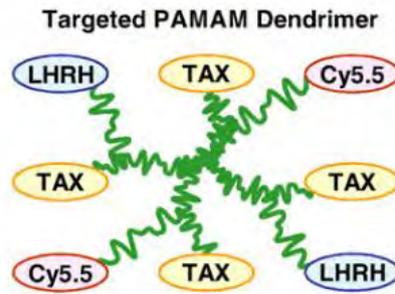


Figure II.9. Représentation schématique des dendrimères « multifonctionnels » portant des entités de ciblage (LHRH), des chromophores émettant dans le rouge lointain (Cy5.5) et une molécule anticancéreuse (TAX)¹⁷.

Enfin, Wang *et al.*¹⁸ ont introduit un chromophore de type fullerène C₆₀ ($\lambda_{em\ max} = 750\ nm$) à l'interface entre deux blocs d'un copolymère poly(éthylène oxide)-*b*-polystyrène (PEG-*b*-PS). Le copolymère est obtenu par ATRP en utilisant le PEG portant une fonction azide comme macroamorceur pour la polymérisation du bloc PS. Le fullerène a ensuite été couplé sur la fonction azide par chimie « click » pour obtenir des copolymères portant un seul chromophore en position latérale et situé exactement entre les deux blocs PEO et PS (Figure II.10.).

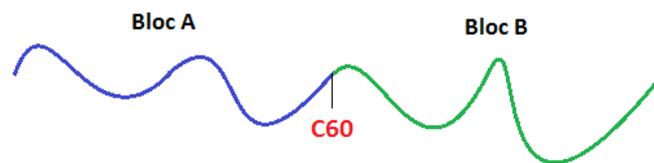


Figure II.10. Représentation schématique des structures synthétisées par Wang *et al.*¹⁸.

II.4. Conclusions.

Les chromophores émettant dans le rouge lointain constituent donc des outils très intéressants pour l'imagerie, notamment l'imagerie de cellules vivantes, puisqu'ils permettent de s'affranchir de l'autofluorescence parasite des cellules. Cette autofluorescence peut s'avérer très gênante lors des observations en microscopie de fluorescence, et peut même conduire parfois à des résultats erronés. L'utilisation de chromophores émettant dans le rouge lointain, voire le proche infrarouge, et de filtres adéquats permet de résoudre ce problème.

Ce type de chromophores est généralement de nature très hydrophobe, leur utilisation en milieu biologique peut donc parfois poser problème. Certaines équipes se sont donc intéressées à coupler sur ces chromophores des fonctions polaires permettant de les rendre plus hydrophiles (SO₃⁻) ou de coupler ces chromophores sur des chaînes polymères hydrophiles.

III. Synthèse de bio-conjugués Lipide-Polymères fluorescents émettant dans le rouge lointain.

La synthèse du bio-conjugué Lipide-Polymère (LP) a été décrite dans le chapitre 2. Cette partie concerne le couplage de chromophores sur le bio-conjugué LP synthétisé de façon à obtenir des bio-conjugués fluorescents, notés LPC, qui pourront être par la suite utilisés comme sondes en imagerie.

Un chromophore, émettant dans le rouge lointain, a été couplé sur les chaînes polymères des bio-conjugués, en position latérale par liaison amide entre une fonction amine présente sur le chromophore et les fonctions ester activé présentes le long des chaînes polymères. L'utilisation de la technique de polymérisation RAFT pour la synthèse des polymères poly(NAM-co-NAS) (cf. chapitre 2) permet de pouvoir contrôler par la suite le nombre moyen de chromophores couplés par chaîne polymère.

III.1. Présentation du chromophore utilisé pour la synthèse des bio-conjugués LPC.

Le chromophore utilisé lors de la synthèse des bio-conjugués LPC est un chromophore qui est synthétisé et qui nous est fourni par le laboratoire de chimie de l'ENS de Lyon et plus précisément par l'équipe de Chantal Andraud. Il a été développé par Yann Bretonnière et Julien Massin lors de la thèse de ce dernier¹⁹.

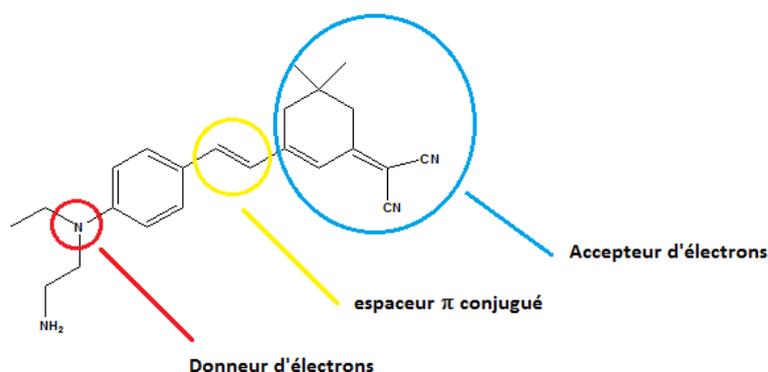


Figure III.1. Structure du chromophore JM086 de type « push-pull » utilisé pour la synthèse des bio-conjugués LPC.

La figure III.1. représente la formule du chromophore JM086 utilisé pour la synthèse des bio-conjugués fluorescents. Il s'agit d'un chromophore synthétisé sur la base d'une structure de type dicyanoisophorone et présentant une structure de type « push-pull » avec un donneur et un accepteur d'électrons liés par un espaceur π -conjugué²⁰. Dans le cas du JM086, le donneur est constitué par l'atome d'azote N de l'extrémité portant l'espaceur aminé, et l'accepteur est composé du motif dicyanoisophorone.

Ce chromophore est synthétisé de façon à présenter une fonction amine. Cette fonction permettra le couplage du chromophore sur diverses molécules présentant une fonction électrophile telle que les acides carboxyliques. Il est donc possible de coupler ce

chromophore JM086 sur les copolymères lipidiques poly(NAM-co-NAS) dont la synthèse a été décrite dans le chapitre 2.

JM086 est un chromophore de nature hydrophobe, soluble uniquement dans les solvants organiques. Il présente des longueurs d'ondes maximales d'absorption et d'émission de 505 et 644 nm respectivement dans le chloroforme, ainsi que la capacité de pouvoir être excité à 2 photons. Les propriétés optiques de ce chromophore seront plus détaillées dans la partie IV.2. de ce chapitre.

Il a été choisi pour la synthèse des bio-conjugués LPC car, en plus d'émettre de la fluorescence dans le rouge lointain, il présente un déplacement de Stokes très important ce qui est très intéressant pour l'imagerie. De plus, ce chromophore présente la particularité d'émettre de la fluorescence à l'état solide, ce qui constituait un critère intéressant compte tenu de la structure des bio-conjugués, à savoir de nombreux chromophores proches les uns des autres qui peuvent s'agréger en fonction de la conformation de la chaîne polymère en solution. Cette caractéristique permettra d'éventuellement éviter une extinction de la fluorescence.

III.2. Couplage du chromophore par formation de liaison amide via les unités NAS du copolymère.

Dans le chapitre 2, la synthèse du copolymère poly(NAM-co-NAS) par la voie de polymérisation radicalaire contrôlée RAFT a été décrite. Ce copolymère est composé des monomères *N*-acryloylmorpholine (NAM) qui apporte de l'hydrophilie au copolymère, et *N*-acryloxysuccinimide (NAS) qui présente une fonction ester activé qui permet le couplage très efficace du chromophore aminé en position latérale de la chaîne polymère par formation de liaisons amides (Figure III.2.).

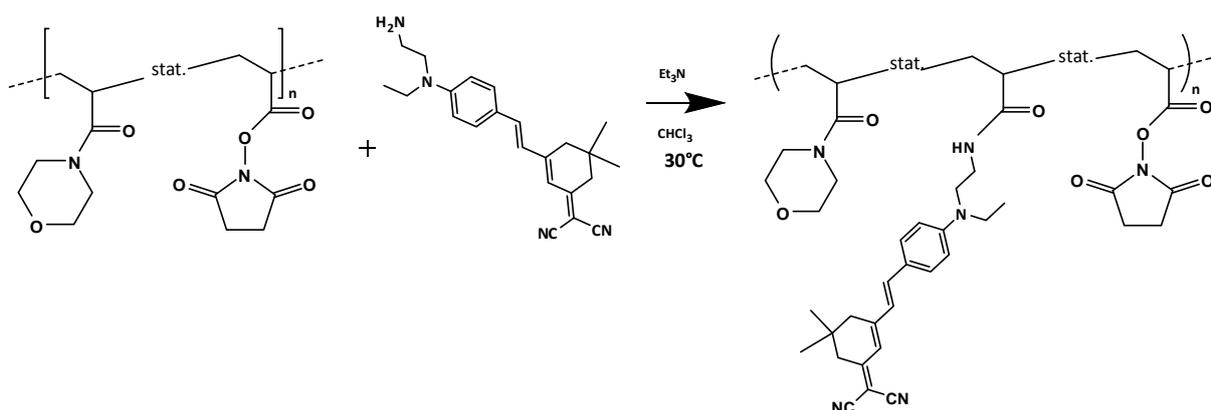


Figure III.2. Schéma réactionnel du couplage du chromophore JM086 par liaison amide via le monomère NAS.

Les chromophores de type JM086 sont donc couplés sur les copolymères statistiques poly(NAM-co-NAS) portant un lipide en extrémité α des chaînes. Les motifs NAS, présentant une fonction ester activé de type *N*-Hydroxysuccinimide, permettent un couplage très rapide, efficace et très reproductible des chromophores le long de la chaîne polymère. Ce

type d'ester activé présente le grand avantage de conduire à un produit de réaction soluble dans l'eau après couplage des chromophores, ce qui facilite son élimination sans l'utilisation de solvants organiques. De plus, contrairement aux liaisons esters, les liaisons amides obtenues sont très résistantes, notamment à l'hydrolyse, permettant d'éviter la dégradation en milieu biologique des bio-conjugués synthétisés.

L'utilisation de la polymérisation RAFT, qui permet le contrôle des tailles et de l'architecture des chaînes polymères formées, et de la composition azéotrope en monomères (cf. chapitre 2) permettant de contrôler la composition des chaînes synthétisées, rend possible le contrôle du nombre moyen de chromophores couplés par chaîne (n_c) via le contrôle du nombre de motif NAS de la chaîne polymère. En effet, en connaissant le nombre moyen de motif NAS des chaînes polymères, il est possible de moduler n_c en modulant la stoechiométrie de la réaction de couplage. De plus, le bon contrôle de la composition des chaînes polymères d'une part, et l'utilisation d'une méthode de couplage des chromophores rapide, efficace et reproductible d'autre part, permet de limiter les variabilités de n_c d'une chaîne polymère à l'autre et de donc de réduire la polydispersité des bio-conjugués en terme de nombre de chromophores par chaîne.

III.2.1. Suivi du couplage des chromophores sur les bio-conjugués LP et purification des bio-conjugués LPC.

La réaction de couplage des chromophores aminés JM086 sur les copolymères poly(NAM-co-NAS) est réalisée dans le chloroforme pendant plusieurs heures. L'avancement du couplage des chromophores est suivi par chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur Ultraviolet (CES/UV) (cf. Partie Expérimentale).

L'utilisation du détecteur UV, dont la longueur d'onde d'absorption est réglée à 488 nm, permet de visualiser le chromophore JM086. De plus, la colonne d'exclusion stérique permet de discriminer le chromophore JM086 libre et le bio-conjugué fluorescent :

- Le chromophore JM086 est visualisé sur le chromatogramme sous la forme d'un pic présentant un temps d'élution long (de l'ordre de la vingtaine de minutes sur ce type de colonne)
- Le copolymère fluorescent est quant à lui visualisé sur le chromatogramme sous la forme d'un pic présentant un temps d'élution plus court (de l'ordre de 12 à 15 minutes sur la même colonne).

Les chromatogrammes obtenus par détection UV présentent donc deux pics distincts, correspondant au chromophore couplé au bio-conjugué et au chromophore libre non couplé (Figure III.3.).

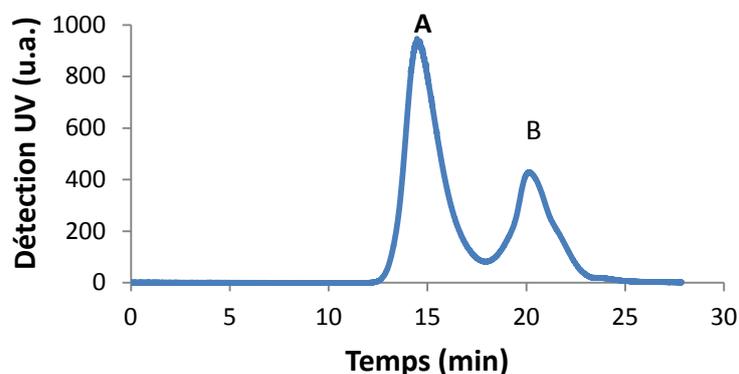


Figure III.3. Chromatogramme CES/UV obtenu lors de l'analyse du rendement de couplage du chromophore sur les copolymères poly(NAM-co-NAS).

En connaissant l'aire sous chaque pic il est donc possible de déterminer un pourcentage de chromophores couplés sur le copolymère et donc d'estimer un rendement de couplage grâce à la formule suivante (Equation 1) :

$$\text{Rendement de couplage} = \frac{\text{Aire sous le pic du copolymère (A)}}{\text{Aire totale (A+B)}} \times 100 \quad (1)$$

L'aire sous les pics est déterminée grâce au logiciel *Breeze* qui permet de piloter le système de CES/UV. Lors de la détermination du rendement de couplage, nous avons fait l'hypothèse que le coefficient d'extinction moléculaire (ϵ) du chromophore reste inchangé après couplage sur la chaîne polymère.

Ainsi, connaissant la quantité de chromophore JM086 introduite initialement, et connaissant le rendement de couplage, il est possible de déterminer le nombre moyen de chromophores par bio-conjugué, n_c (Tableau III.1.).

$$n_c = \frac{n(\text{JM086 initial}) \times \text{Rendement}}{m(\text{polymère initial}) / M_n} \quad (2)$$

Après avoir été synthétisés, les bio-conjugués doivent être purifiés afin d'éliminer les chromophores résiduels. La méthode choisie pour l'élimination des chromophores est basée sur la précipitation du polymère dans un non solvant.

Une fois la réaction de couplage terminée, le polymère fluorescent est précipité dans l'éther diéthylique. Ce solvant est à la fois un non solvant du polymère, mais également un bon solvant du chromophore JM086. A la fin de la réaction de couplage, la précipitation du polymère dans un grand volume d'éther est réalisée dans un tube à centrifugation :

- Le polymère fluorescent précipite sous forme de flocons fins très colorés (rouge très foncé) qui sédimentent au fond du tube à centrifugation
- Le chromophore libre reste en solution dans l'éther qui se colore en rouge (couleur du JM086)

Une fois la précipitation réalisée, le polymère et le chromophore libre sont séparés par centrifugation ce qui permet, après élimination du surnageant contenant le chromophore libre, d'obtenir les bio-conjugués purifiés. On notera également qu'il est généralement nécessaire de réaliser plusieurs fois les étapes de précipitation/centrifugation afin d'obtenir des bio-conjugués LPC totalement purs, c'est-à-dire des surnageants incolores témoignant d'une élimination totale du chromophore libre.

III.2.2. Post-traitement des bio-conjugués LPC obtenus.

Après avoir réalisé le couplage des chromophores le long des chaînes polymères des bio-conjugués, il reste généralement de nombreuses fonctions réactives résiduelles de type ester activé, qui n'ont pas été utilisées pour le couplage des chromophores.

Ces fonctions doivent donc être « désactivées » afin d'éviter qu'elles ne réagissent de façon aléatoire, par exemple en présence de fonctions NH_2 présentes sur des protéines lorsque les bio-conjugués seront utilisés en milieu biologique. De plus, la présence de ces fonctions activées résiduelles permet également de pouvoir contrôler la structure, la nature et donc la conformation de la chaîne polymère des bio-conjugués.

En hydrolysant les fonctions ester activé résiduelles, il est possible d'introduire des charges négatives le long de la chaîne polymère et ainsi d'obtenir des bio-conjugués globalement chargés négativement. De même, il est possible de moduler la balance hydrophile/hydrophobe des bio-conjugués en couplant, via les fonctions ester activé résiduelles, divers amines primaires ou secondaires.

En ce qui concerne les conjugués qui ont été synthétisés, les deux types de traitement ont été réalisés :

- Une hydrolyse des fonctions ester activé : après séchage des bio-conjugués, un large volume de tampon borate (50 mM - pH 9) est ajouté. Les bio-conjugués sont agités jusqu'à solubilisation complète puis laissés sous agitation pendant plusieurs jours, à température ambiante et à l'abri de la lumière afin d'être certain d'hydrolyser toute les fonctions réactives résiduelles. Lors de l'hydrolyse, les fonctions ester activé sont transformées en fonctions carboxylate (Figure III.4.) qui, à pH physiologique, sont chargées négativement (pK_a 4,7). Ces bio-conjugués sont très solubles dans les solvants polaires (eau) et insolubles dans les solvants apolaires (chloroforme).

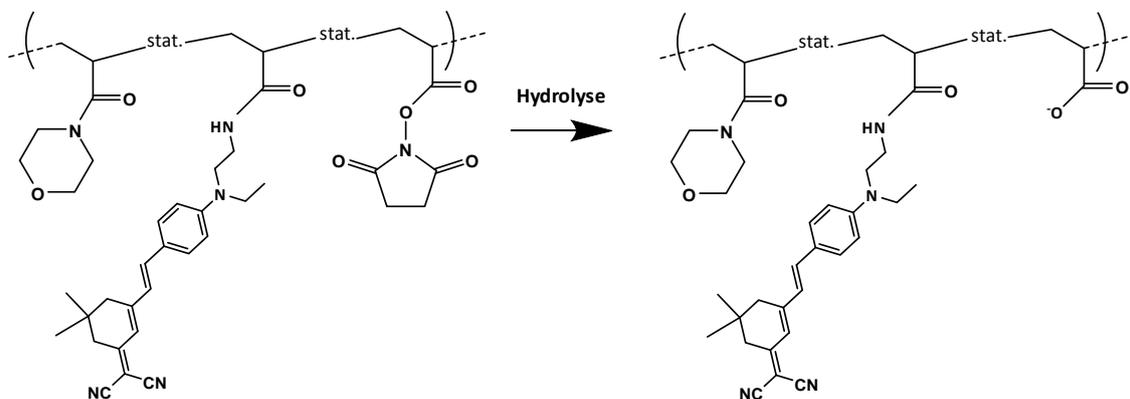


Figure III.4. Structure de la chaîne polymère après hydrolyse des fonctions ester activé.

- Un capping des fonctions ester activé par la 4-(2-Aminoéthyl)morpholine (AEM).

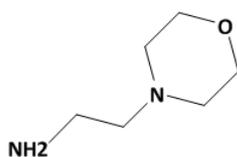


Figure III.5. Structure de la 4-(2-Aminoéthyl)morpholine (AEM) utilisée pour le capping des fonctions ester activé restantes après couplage des chromophores.

Il s'agit donc d'une amine primaire qui présente un cycle morpholine, ce qui permet de capter les fonctions résiduelles réactives tout en permettant aux bio-conjugués de conserver une hydrophilie compatible avec les applications en milieu biologique. Pour réaliser ce capping, les bio-conjugués sont dissous dans un minimum de chloroforme, puis l'AEM est ajouté en excès de 10 par rapport au nombre de moles de fonctions NAS. La réaction est laissée pendant 15 heures, sous agitation et à température ambiante. Contrairement aux bio-conjugués LPC hydrolysés, chargés négativement et seulement solubles dans les solvants polaires, les bio-conjugués cappés sont électriquement neutres (si on ne tient pas compte de la charge apportée par le lipide) et solubles dans les solvants polaires et apolaires.

Après avoir réalisé le post-traitement des bio-conjugués, ces derniers sont purifiés par dialyse pendant 3 à 5 jours (cf. partie expérimentale). Cette étape permet d'éliminer les sous produits de la réaction de couplage des chromophores (comme le *N*-Hydroxysuccinimide) ainsi que les ions apportés lors de l'hydrolyse au tampon borate.

Les bio-conjugués dialysés sont ensuite lyophilisés afin d'obtenir des produits d'aspects cotonneux faciles à manipuler. Avant de réaliser les différentes caractérisations spectroscopiques et biologiques, les bio-conjugués sont conservés à -20°C dans des piluliers hermétiquement fermés.

NB : Il a été mis en évidence que les bio-conjugués LPC sont très hygroscopiques. En effet, ils présentent des masses plus importantes après quelques jours au congélateur (-20°C) qu'en sortie de lyophilisation. Après un second séchage sous vide (pompe à palettes), les bio-conjugués retrouvent leurs masses initiales. Donc, avant de réaliser les différentes

caractérisations (spectroscopiques et biologiques) les bio-conjugués sont séchés 24 heures sous vide (pompe à palettes) afin de ne pas fausser les masses pesées.

Tableau III.1. Récapitulatif des propriétés physico-chimiques des bio-conjugués synthétisés.

	M_n polymère (g.mol ⁻¹)	M_n conjugués (g.mol ⁻¹)	Présence du lipide en extrémité	n_c	$n_{\text{COO-}}$	Rendement de couplage (%)	Post- traitement	Solubilité
8K-2H	7 900	7 200	Oui	2	17	70	Hydrolyse	Eau
8K-4H		7 800	Oui	4,1	15	72		Eau
20K-4H	20 300	17 300	Oui	3,8	49	60		Eau
20K-11H		19 700	Oui	10,8	42	70		Eau
34K-9H (SL)	34 200	28 600	Non	8,5	81	66		Eau
33K-9H	33 200	28 000	Oui	8,5	78	65		Eau
33K- 9AEM	33 200	36 600	Oui	8,9	-	65	Capping AEM	Eau / CHCl ₃
33K- 38AEM		44 500	Oui	37,8	-	63		CHCl ₃
33K-38H	33 200	39 100	Oui	37,8	49	63	Hydrolyse	Eau
33K- 1Href	33 200	25 100	Oui	0,7	86	46	Hydrolyse	Eau

M_n polymère = M_n du squelette polymère initial

M_n conjugué = M_n du bio-conjugué final après le couplage des chromophores et post-traitement

n_c = Nombre moyen de chromophore par chaîne (déterminé par analyses CES/UV)

$n_{\text{COO-}}$ = Nombre moyen de charges négatives par chaîne polymère

Nomenclature : 33K = M_n du squelette polymère (33 200 g.mol⁻¹)

9H = nombre moyen de chromophores par chaîne + post-traitement (9 – hydrolysé)

NB : Tous les bio-conjugués LPC synthétisés n'ont pas été utilisés pour les différents tests réalisés sur systèmes lipidiques modèles (chapitre 4) et en milieu cellulaire (chapitre 5).

III.3. Conclusions.

Des chromophores émettant dans le rouge lointain ont été couplés par formation de liaisons amides entre la fonction NH_2 présente sur les chromophores et la fonction ester activé présente en position latérale le long des chaînes polymères.

Le couplage des chromophores s'est avéré être très rapide et efficace, et a pu être suivi par CES couplée à un détecteur UV. Ceci nous a permis de déterminer le rendement de couplage ainsi que le nombre moyen de chromophores couplés par chaîne polymère. Les bio-conjugués LPC obtenus ont ensuite été purifiés par précipitation/centrifugation afin d'éliminer le chromophore libre résiduel. Cette étape peut s'avérer longue et fastidieuse, mais, dans le cas du chromophore JM086, elle est très efficace.

Ensuite, les bio-conjugués ont été post-traités dans le but de désactiver les fonctions réactives résiduelles, non utilisées pour le couplage des chromophores. Deux post-traitements ont été réalisés permettant d'obtenir des bio-conjugués LPC de structures différentes. Une hydrolyse des fonctions réactives permet de former des bio-conjugués négativement chargés et très solubles dans les solvants aqueux, alors que le capping de ces mêmes fonctions conduit à la formation de bio-conjugués à squelette neutre et soluble à la fois dans les solvants aqueux et organiques. La présence de la chaîne polymère hydrophile permet donc la solubilisation dans les solvants polaires d'un chromophore hydrophobe (JM086), permettant ainsi son utilisation pour des applications en milieu biologique.

IV. Caractérisation spectroscopique des bio-conjugués LPC synthétisés.

IV.1. Introduction - Définitions.

Après synthèse et purification, les bio-conjugués LPC ont ensuite été caractérisés en spectroscopie UV-Visible et par fluorescence de façon à confirmer dans un premier temps une émission de fluorescence, puis afin de déterminer les principaux paramètres relatifs aux molécules fluorescentes. Dans cette étude, quatre paramètres optiques ont été étudiés : les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence, le coefficient d'extinction molaire (noté ϵ), le rendement quantique de fluorescence (noté ϕ) et la brillance. L'influence de différents paramètres structuraux sur ces paramètres optiques a également été étudiée : la densité en chromophore D_c , le post-traitement, la présence du lipide en extrémité de chaîne polymère.

Je présenterai donc dans cette partie les différents résultats obtenus pour les bio-conjugués et le chromophore JM086. Dans chaque cas, l'influence des différents paramètres structuraux sera discutée lorsqu'elle est significative.

IV.1.1. Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence.

Les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence font parties des paramètres déterminés lors de la caractérisation de nouvelles molécules fluorescentes. Il s'agit de courbes caractéristiques de la lumière absorbée et des rayonnements de fluorescence émis par un chromophore.

IV.1.2. Le coefficient d'extinction molaire (ϵ).

Le coefficient d'extinction molaire, noté ϵ , est un autre paramètre très important à déterminer dans le but de caractériser les molécules fluorescentes.

Le coefficient d'extinction molaire (ou coefficient d'absorption molaire) traduit la probabilité de la molécule à absorber la lumière²¹. Il est déterminé pour des chromophores en solution via la loi de Beer-Lambert (Equation 3).

$$A = \epsilon \times l \times c \quad (3)$$

Avec : A = Absorbance de la solution (doit être < 1 pour conserver la linéarité de la loi)

l = Longueur du trajet optique (largeur de la cuve de mesure) – [cm]

c = Concentration de la solution – [M]

ϵ = Coefficient d'extinction molaire – [$M^{-1}.cm^{-1}$]

Pour un même échantillon de bio-conjugué, plusieurs mesures indépendantes de ϵ ont été réalisées à partir de solutions d'absorbance inférieure à 1. Les valeurs données sont des valeurs moyennes des résultats les plus reproductibles (cf. Partie Expérimentales).

IV.1.3. Le rendement quantique de fluorescence.

Le rendement quantique de fluorescence (Φ) est une caractéristique physique importante à déterminer. C'est un paramètre qui est impliqué dans le calcul de nombreux phénomènes comme les transferts d'énergie, le quenching de fluorescence et les calculs des constantes radiatives et non radiatives.

Le rendement quantique de fluorescence peut être défini comme l'efficacité de fluorescence de la sonde. Cette grandeur physique caractérise la proportion de molécules excitées qui se désexcitent en émettant de la fluorescence, en d'autres termes il s'agit du rapport entre le nombre de photons de fluorescence émis et le nombre de photons absorbés (Equation 4)^{22,23}.

$$\Phi = \frac{N \text{ photons fluo émis}}{N \text{ photons absorbés}} \quad (4)$$

Il existe deux méthodes afin de déterminer un rendement quantique de fluorescence⁹ :

- La méthode absolue : cette méthode consiste à mesurer directement le nombre de photons émis par des méthodes optiques ou à mesurer l'énergie libérée par désexcitation non radiative par des méthodes calorimétriques
- La méthode relative : dans cette méthode, il s'agit de déterminer le rendement quantique de fluorescence par comparaison avec une molécule standard dont le rendement quantique est connu.

La méthode absolue est une méthode qui nécessite d'avoir à disposition un appareillage très spécifique, contrairement à la seconde méthode qui nécessite un spectromètre UV/Visible et un spectromètre de fluorescence qui sont des appareils communément trouvés dans les laboratoires s'intéressant à la synthèse de molécules fluorescentes.

Cependant, lorsque la méthode relative est utilisée, il est nécessaire de choisir le standard fluorescent adéquat²⁴. Ce standard doit être une molécule fluorescente facile à utiliser, c'est-à-dire dont les propriétés peuvent être mesurées de façon routinière avec les appareillages conventionnels, il doit absorber et émettre dans les mêmes zones spectrales que l'échantillon dont le rendement quantique doit être déterminé. Le standard choisi doit présenter un rendement quantique stable, indépendant des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission et de la température. Il doit également présenter le plus faible recouvrement possible entre les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence dans le but de limiter les phénomènes de ré-absorption.

Dans notre étude, le mode opératoire utilisé pour la détermination de Φ est très similaire à celui décrit par Rurack et Spieles⁹. Typiquement, une solution de chromophore est préparée dans le chloroforme de façon à présenter une absorbance inférieure à 0,1. Une fois l'absorbance mesurée, la fluorescence de cette même solution est mesurée. La solution initiale est ensuite diluée et les mesures d'absorbance et de fluorescence sont à nouveau réalisées. En tout, 6 à 8 mesures sont réalisées, à la fois pour l'échantillon et pour la référence, qui dans notre cas est l'Erythrosine B (cf. partie expérimentale).

Le rendement quantique (Φ) est ensuite déterminé en utilisant la formule générale suivante (Equation 5) :

$$\Phi = \Phi_{ref} \times \frac{F}{F_{ref}} \times \frac{f_{ref}}{f} \times \frac{n^2}{n_{ref}^2} \quad (5)$$

Avec : Φ = rendement quantique de la référence (ref) et de l'échantillon

F = Aire sous le spectre d'émission

f = facteur d'absorption correspondant à la fraction de lumière absorbée par le chromophore

n = indices de réfractions des solvants utilisés dans le cas de la référence et de l'échantillon

Dans notre cas la formule utilisée pour la détermination du rendement quantique de fluorescence est dérivée de la précédente (Equation 6) :

$$\Phi = \Phi_{ref} \times \frac{s}{s_{ref}} \times \frac{n^2}{n_{ref}^2} \quad (6)$$

Dans cette équation, « s » correspond à la pente de la droite obtenue lors du tracé de l'évolution de l'aire sous le spectre d'émission en fonction de l'absorbance des solutions analysées, pour chaque échantillon et pour la référence.

IV.1.4. Brillance.

La brillance est un paramètre utilisé par les microscopistes permettant de caractériser une molécule fluorescente, il s'agit de l'intensité de fluorescence émise par la molécule excitée. Elle est proportionnelle au coefficient d'extinction molaire et au rendement quantique de fluorescence²¹ (Equation 7).

$$Brillance = Nc \times \varepsilon \times \Phi \quad (7)$$

Avec : Nc = nombre de molécule fluorescentes (chromophores) par chaîne polymère
 Φ = rendement quantique de fluorescence d'un chromophore fixé sur la chaîne
 ε = coefficient d'extinction molaire

Le tableau IV.1 récapitule les propriétés chimiques et photophysiques des bio-conjugués LPC synthétisés et du chromophore JM086 seul.

Tableau IV.1. Récapitulatif des propriétés chimiques et photophysiques du chromophore JM086 et des bio-conjugués LPC synthétisés.

	M_n polymère (g.mol ⁻¹)	n_{NAS}	M_w conjugués (g.mol ⁻¹)	n_c	n_{COO-}	D_c	D_{COO-}	Post- traitement	Solvant	$\lambda_{max\ abs} /$ $\lambda_{max\ em}$ (nm)	Φ	$\epsilon_c /$ ϵ_B (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	Brillance	Stokes shift (cm ⁻¹)						
JM086	-	-	360,5	-	-	-	-	-	CHCl ₃	505/644	0,07	20 000	1 400	4 190						
8K-2H	7 900	21	7 200	2	19	0,04	0,37	Hydrolyse	Eau	506/688	0,06	15 950 / 31 900	1 900	5 240						
8K-4H			7 800	4,1	17	0,08	0,33			502/688	0,03	13 950 / 57 200	1 700	5 400						
20K-4H	20 300	53	17 300	3,8	49	0,03	0,37			508/688	0,08	14 600 / 55 500	4 400	5 160						
20K- 11H			19 700	10,8	42	0,08	0,32			501/691	0,03	10 700 / 115 600	3 500	5 480						
34K-9H (SL)	34 200	90	28 600	8,5	81	0,04	0,36			501/690	0,05	15 200 / 129 200	6 640	5 480						
33K-9H	33 200	87	28 000	8,5	78	0,04	0,36			Capping AEM	CHCl ₃	505/645	0,07	24 000 / 213 600	15 000	4 350				
33K- 9AEM			36 600	8,9	-	0,04	-										Eau	501/690	0,02	26 000 / 231 400
33K- 38AEM			44 500	37,8	-	0,17	-	CHCl ₃	502/650								0,06	22 200 / 839 200	50 300	4 510
33K- 38H	33 200	87	39 100	37,8	49	0,17	0,22	Hydrolyse	Eau	503/692	0,003	n/a	n/a	5 430						

33K-1Href	33 200	87	25 100	0,7	86	0,003	0,4	Hydrolyse	Eau	509/688	0,1	16 900	1 200	5 160
------------------	--------	----	--------	-----	----	-------	-----	-----------	-----	---------	-----	--------	-------	-------

M_n polymère = M_n du squelette polymère

M_w conjugué = Masse molaire du bio-conjugué final

n_{NAS} = Nombre de fonctions NAS réactives par chaîne polymère

n_c = Nombre moyen de chromophore par chaîne déterminé par analyses CES/UV

n_{COO^-} = Nombre moyen de charges négatives par chaîne polymère

D_c = Densité en chromophore par bio-conjugué ($D_c = n_c / DP_n$)

D_{COO^-} = Densité en charge par bio-conjugué ($D_{COO^-} = n_{COO^-} / DP_n$)

$\lambda_{max\ abs} / \lambda_{max\ em}$ = Longueurs d'onde maximales d'absorption et d'émission de fluorescence déterminés par spectroscopie UV/Visible et de Fluorescence (Eau et Chloroforme)

ϕ = Rendement Quantique de Fluorescence déterminé en utilisant l'Erythrosine B comme référence (MeOH – 0.09 – $\lambda_{exc} = 510$ nm)

ϵ_c = Coefficient d'absorption molaire par chromophore déterminé par spectroscopie UV/Visible

ϵ_B = Coefficient d'absorption molaire du bio-conjugué déterminé par spectroscopie UV/Visible

Brillance = Calculée en utilisant la formule $n_c \cdot \epsilon_c \cdot \phi$

Tableau IV.1. Récapitulatif des propriétés chimiques et photophysiques du chromophore JM086 et des bio-conjugués LPC synthétisés (suite).

IV.2. Propriétés optiques du chromophore JM086.

Le chromophore utilisé lors de cet étude (partie III.1.) a été caractérisé par spectroscopie UV/Visible et de fluorescence. Les longueurs d'ondes maximales d'absorption et d'émission de fluorescence dans différents solvants, ainsi que le rendement quantique et le coefficient d'extinction molaire ont été déterminés.

IV.2.1. Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence.

Les spectres d'absorption et d'émission du JM086 ont été enregistrés dans différents solvants et sont présentés en annexe 2.

Le chromophore présente une longueur d'onde maximale d'absorption comprise entre 490 nm dans le cas de l'eau et 540 nm dans le cas du DMSO : le chromophore JM086 présente donc un faible solvatochromisme en absorption. Il est intéressant de noter que dans l'eau, le pic du chromophore est très large, suggérant la présence de nombreux agrégats en solution expliqués par la nature hydrophobe du chromophore.

Les spectres d'émission de fluorescence ont également été enregistrés dans les mêmes solvants, ce qui a permis de mettre en évidence dans ce cas là un solvatochromisme plus important que dans le cas de l'absorption. En effet, la longueur d'onde maximale d'émission de fluorescence du chromophore JM086 s'étend de 620 nm dans le cas du dichlorométhane à une longueur d'onde de 710 nm dans le cas du DMSO.

Les deux spectres obtenus permettent également de voir que le chromophore présente un déplacement de Stokes très important dans les différents solvants (entre 4 000 et 6 000 cm^{-1}), ce qui peut être très utile, notamment en microscopie.

IV.2.2. Détermination du rendement quantique de fluorescence et du coefficient d'extinction molaire.

Deux autres paramètres optiques ont été déterminés : le coefficient d'extinction molaire (ϵ) et le rendement quantique de fluorescence (ϕ).

Le coefficient d'extinction molaire a été déterminé par l'équipe de chimie de l'ENS de Lyon qui a synthétisé le chromophore, en suivant le mode opératoire décrit en partie expérimentale. Un coefficient de 20 000 $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ a été estimé dans le chloroforme.

Le rendement quantique de fluorescence relatif a été déterminé en utilisant l'Erythrosine B comme référence (cf. partie expérimentale). Ainsi un rendement quantique de 0,07 a été déterminé pour le chromophore JM086 dans le chloroforme. (Tableau IV.1.)

Enfin, après calcul, le chromophore JM086 présente donc une brillance de $1\,400\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ dans le chloroforme. Il s'agit d'une brillance assez élevée en ce qui concerne les chromophores émettant dans le rouge et le rouge lointain. Seuls peu de chromophores existant commercialement présentent des brillances supérieures à $1\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ dans ces gammes de longueurs d'ondes²⁵ (Figure IV.1.).

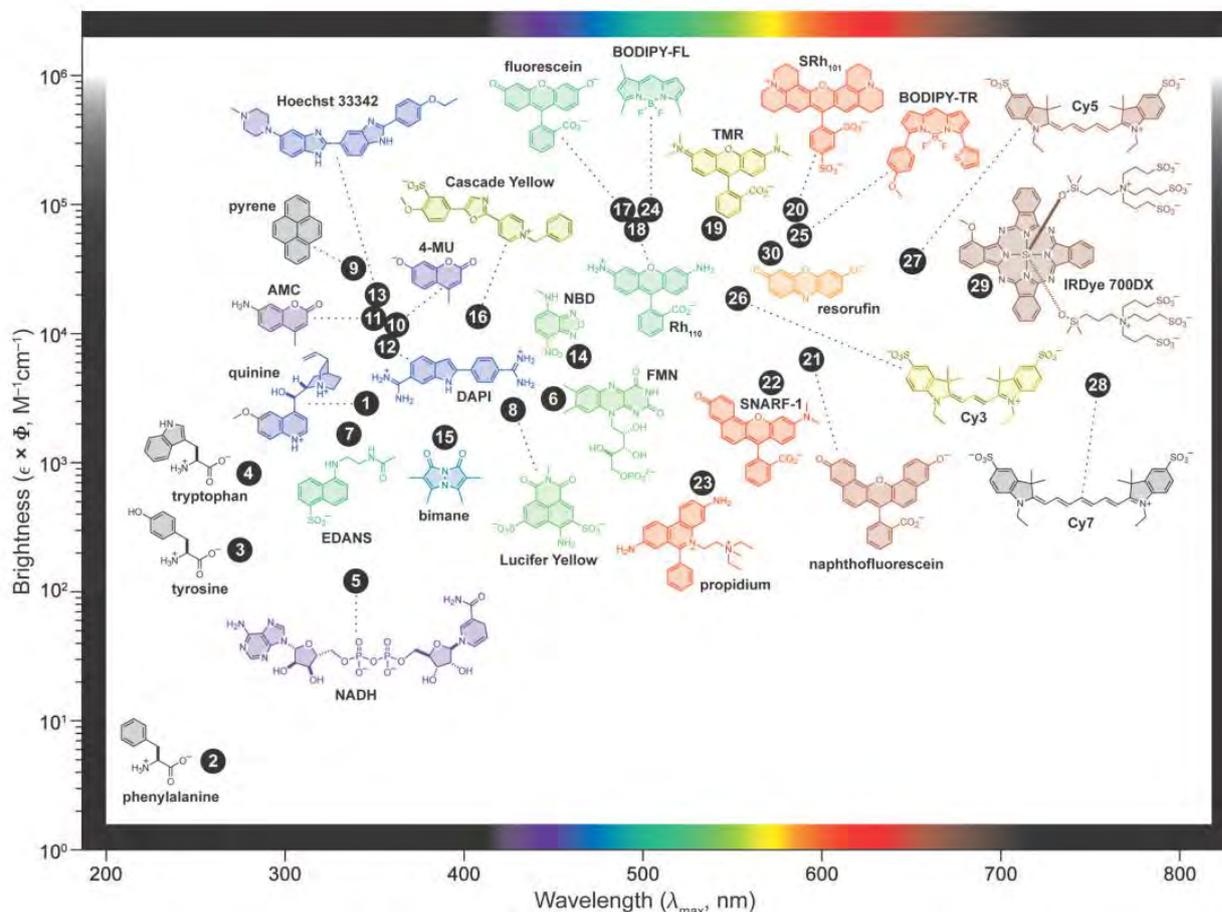


Figure IV.1. Graphique représentant la brillance en fonction de la longueur maximale d'absorption de différentes molécules fluorescentes. Peu de chromophores émettant dans le rouge lointain présentent des brillances supérieures à $1\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ⁽²⁵⁾.

L'objectif de notre projet est de développer des structures de sondes fluorescentes présentant des brillances supérieures à celle du chromophore JM086 seul, et solubles en milieu aqueux.

IV.3. Caractérisation optique des bio-conjugués LPC.

Après avoir réalisé le couplage du chromophore JM086 sur les copolymères poly(NAM-co-NAS) portant un lipide en extrémité α des chaînes polymères, des bio-conjugués fluorescents LPC ont été obtenus.

Ces bio-conjugués ont ensuite été caractérisés par spectroscopie UV-Visible et par spectroscopie de fluorescence dans le but de déterminer les longueurs d'ondes maximales d'absorption et d'émission de fluorescence ainsi que les rendements quantiques de

fluorescence et les coefficients d'extinction molaire qui pourront être éventuellement comparés avec ceux obtenus dans le cas du chromophore seulⁱ.

Les bio-conjugués LPC présentent la propriété d'être solubles dans les tampons aqueux. Il est donc possible, grâce à la présence de la chaîne polymère hydrophile poly(NAM-co-NAS), de solubiliser un chromophore très hydrophobe comme le JM086 dans des solvants aqueux. Ceci permet donc de bénéficier des nombreux avantages très intéressants de ce chromophore (émission dans le rouge lointain, large déplacement de Stokes et fluorescence à l'état solide) en milieu biologique, pour imager les cellules vivantes.

D'autre part, les bio-conjugués cappés par l'AEM présentent également l'avantage d'être solubles dans les solvants organiques tels que le chloroforme. Ceci rend possible une étude comparative des propriétés spectroscopiques de ces bio-conjugués avec le chromophore seul hydrophobe.

IV.3.1. Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence.

Tous les bio-conjugués LPC fluorescents synthétisés (Tableau III.1.) ont été caractérisés en spectroscopie UV et de fluorescence. Les différentes caractéristiques optiques ont été reportées dans le Tableau IV.1. Contrairement au chromophore JM086, les bio-conjugués sont hydrosolubles et ont donc pu être caractérisés dans l'eau, mais également dans le chloroforme en ce qui concerne les bio-conjugués cappés par l'AEM.

IV.3.1.1. Spectres du bio-conjugué 33K-9AEM vs. Chromophore JM086 dans le chloroforme.

La comparaison des spectres du bio-conjugué 33K-9AEM et du chromophore JM086 dans le même solvant, le chloroforme, a été réalisée (Figure IV.2.).

Aucune différence n'est observée sur les spectres d'absorption et d'émission, les spectres sont parfaitement superposables. Les longueurs d'ondes maximales d'absorption et d'émission de fluorescence restent inchangées après couplage du chromophore sur la chaîne polymère. La présence de la chaîne polymère ne semble donc pas avoir d'influence sur les valeurs de $\lambda_{\max \text{ abs}}$ et $\lambda_{\max \text{ em}}$.

ⁱ L'absence d'agrégats dans les solutions aux concentrations utilisées pour les caractérisations optiques et biologiques a été vérifiée par diffusion dynamique de la lumière (DLS).

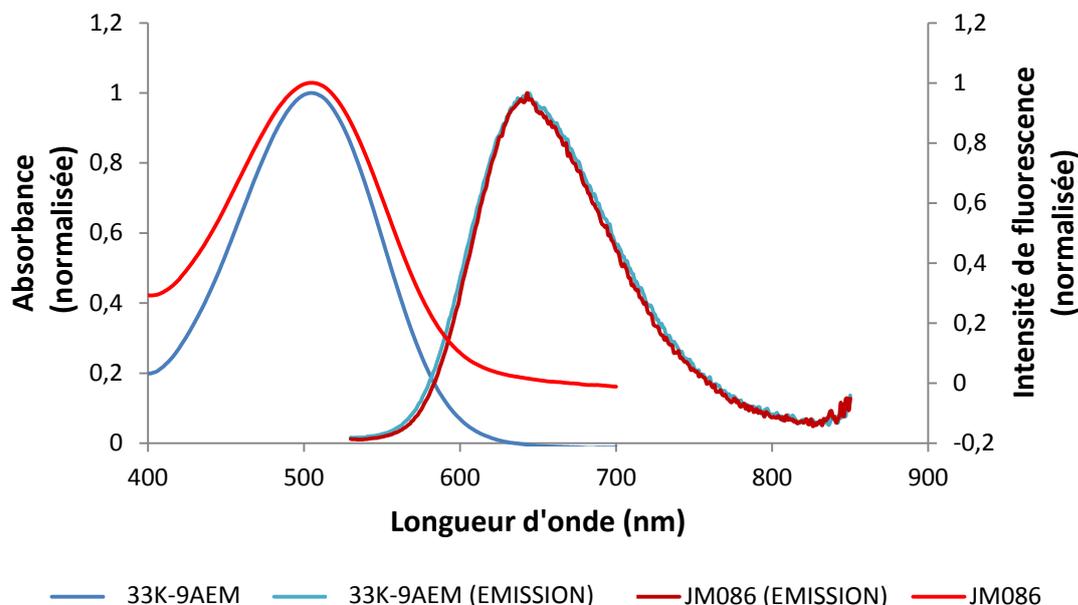


Figure IV.2. Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence ($\lambda_{exc} = 505 \text{ nm}$) du bio-conjugué 33K-9AEM et du chromophore JM086 dans le chloroforme.

Dans le chloroforme, le bio-conjugué 33K-9AEM et le chromophore JM086 présentent tous deux un déplacement de Stokes très important : $4\,190 \text{ cm}^{-1}$ et $4\,350 \text{ cm}^{-1}$ pour le bio-conjugué et le chromophore seul respectivement.

IV.3.1.2. Spectres du bio-conjugué 33K-9AEM : Chloroforme vs. Eau.

Les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence du bio-conjugué 33K-9AEM, soluble à la fois dans les solvants aqueux et organiques, ont été enregistrés également dans l'eau (Figure IV.3.).

Aucune influence de la nature du solvant n'est observée en ce qui concerne la longueur d'onde maximale d'absorption du bio-conjugué 33K-9AEM. En effet, bien que le pic soit légèrement élargit, ce qui est causée par la nature polaire du solvant, la valeur de $\lambda_{max\ abs}$ reste inchangée (Figure IV.3.).

Comme attendu pour ce type de chromophores dipolaires « push-pull », les résultats obtenus montrent un déplacement de la longueur d'onde maximale d'émission du bio-conjugué vers les hautes longueurs d'ondes (vers le rouge) dans un solvant polaire. Ce solvatochromisme est généralement observé lorsque la polarité du solvant est augmentée^{26,27}. Les chromophores JM086 utilisés semblent très sensibles à leur environnement, notamment à la nature du solvant.

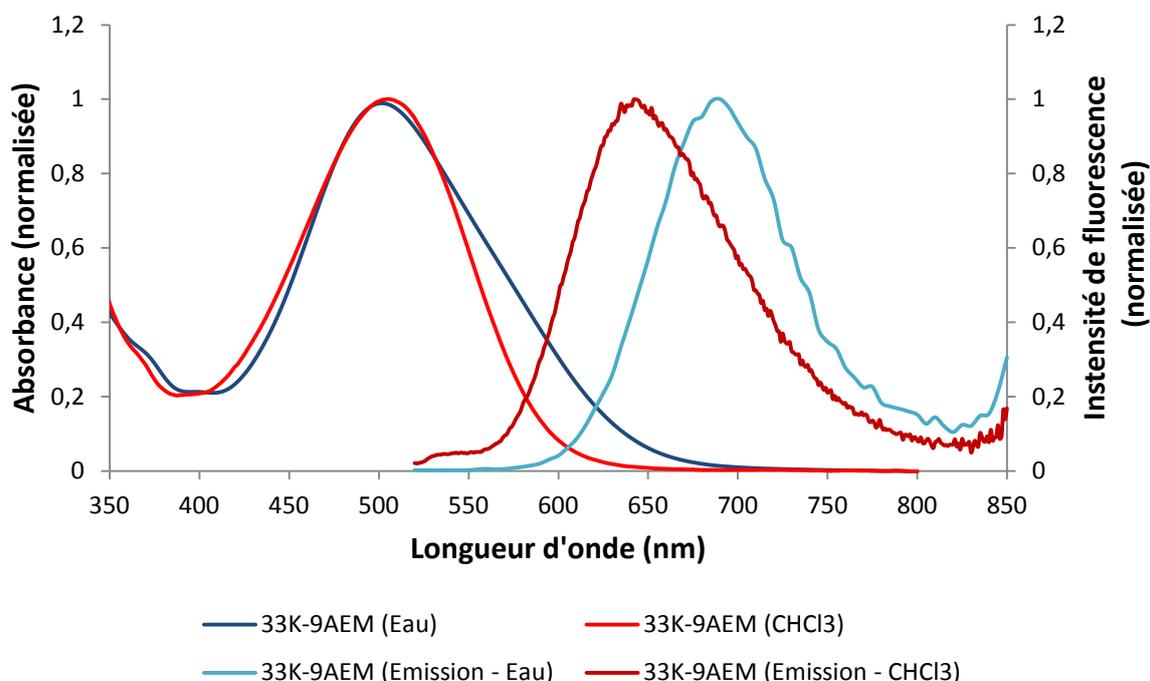


Figure IV.3. Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence ($\lambda_{exc} = 505 \text{ nm}$) du bio-conjugué 33K-9AEM dans le chloroforme et l'eau.

Ces résultats apportent également des informations intéressantes, notamment à propos du déplacement de Stokes des bio-conjugués. En effet, le changement de nature du solvant permet de moduler le déplacement de Stokes : ainsi, les bio-conjugués présentent un déplacement de Stokes augmenté lorsqu'ils sont analysés dans les solvants aqueux (5480 cm^{-1}), ce qui constitue un avantage non négligeable lors des observations par microscopie de fluorescence.

IV.3.1.3. Spectre du bio-conjugué 33K-9AEM vs. Spectre du bio-conjugué 33K-9H dans l'eau.

La comparaison des spectres du bio-conjugué 33K-9AEM et du bio-conjugué 33K-9H dans le même solvant, l'eau, a également été réalisée (Figure IV.4.). Ces deux bio-conjugués sont très similaires : ils ont été synthétisés à partir de chaînes polymères de mêmes tailles, ils portent le même lipide en extrémité de chaîne et un nombre moyen de chromophores par chaîne polymère équivalent. En revanche, ces deux bio-conjugués ont subi des post-traitements différents : le bio-conjugué 33K-9H a été hydrolysé (il s'agit donc d'un bio-conjugué chargé négativement) alors que le bio-conjugué 33K-9AEM a été cappé par l'AEM (il est donc neutre, si on ne tient pas compte de la charge apportée par le lipide). Cette différence de structure pourrait avoir une influence sur les propriétés d'absorption et d'émission des bio-conjugués puisqu'il est connu que les chromophores sont très sensibles à leur environnement (notamment électronique).

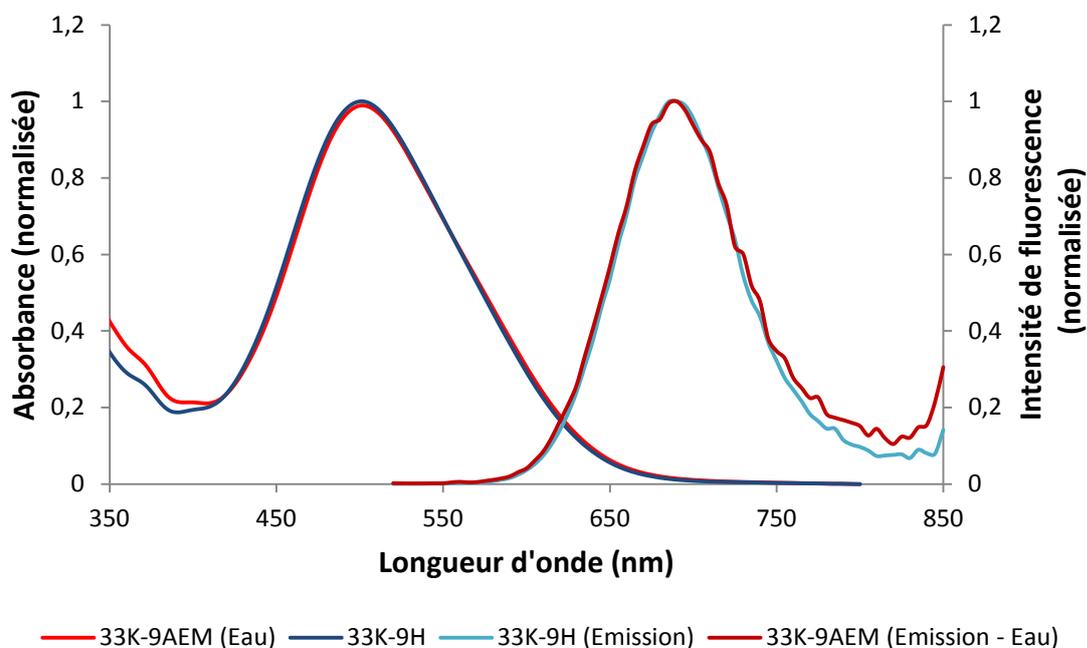


Figure IV.4. Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence ($\lambda_{exc} = 505 \text{ nm}$) des bio-conjugués 33K-9H et 33K-9AEM dans l'eau.

Les spectres obtenus pour les deux bio-conjugués sont parfaitement superposables (Figure IV.4.). Ces résultats suggèrent que les post-traitements réalisés ne semblent pas avoir d'influence sur les longueurs d'ondes d'absorption et d'émission des bio-conjugués. Ceci paraît surprenant sachant qu'il a été mis en évidence que les chromophores couplés sont très sensibles à leur environnement, il était donc logique de s'attendre à des spectres d'absorption et d'émission différents entre les bio-conjugués hydrolysés (chargés) et capés par l'AEM (neutres).

IV.3.2. Coefficients d'extinction molaire.

Les valeurs des coefficients d'extinction molaire (ϵ) sont des valeurs expérimentalement déterminées en utilisant le mode opératoire décrit en partie expérimentale. Les différentes erreurs expérimentales potentielles, notamment liées à la pesée des bio-conjugués pour la préparation des solutions, doivent être pris en compte. De plus, lors des analyses réalisés, il a été mis en évidence le fait que les bio-conjugués étaient très hygroscopiques ce qui a rendu parfois délicat le contrôle des concentrations des solutions préparées.

Les valeurs de coefficients d'extinction molaire obtenues pour les bio-conjugués sont donc des valeurs estimées dont l'écart type peut être estimé à 15 voire 20%.

IV.3.2.1. Influence du couplage du chromophore sur le coefficient d'extinction molaire.

Les coefficients d'extinction molaire des bio-conjugués 33K-9AEM et 33K-38AEM ont été déterminés dans le chloroforme et les valeurs obtenues ont pu être comparées avec celle du chromophore JM086 seul (Tableau IV.1.). Les valeurs obtenues, 20 000 M.⁻¹cm⁻¹ pour le chromophore seul, 24 000 M.⁻¹cm⁻¹ pour le bio-conjugué 33K-9AEM et 22 000 M.⁻¹cm⁻¹ pour le bio-conjugué 33K-38AEM sont très proches. Ces résultats étaient plus ou moins attendus puisque les phénomènes de dimérisation des chromophores pouvant survenir lors de la formation d'agrégats ont une influence surtout sur les propriétés d'émission de fluorescence et très peu sur les propriétés d'absorption des molécules.

IV.3.2.2. Influence de la nature du solvant.

Les coefficients d'extinction molaire des bio-conjugués ont été déterminés dans l'eau (Tableau IV.1.). Des valeurs très proches ont été obtenues, comprises entre 11 000 M.⁻¹cm⁻¹ et 17 000 M.⁻¹cm⁻¹, et ce pour tous les bio-conjugués. Ces valeurs sont plus faibles que celles obtenues pour les bio-conjugués et le chromophore seul dans le chloroforme. Ces résultats paraissent cohérents puisque le coefficient d'extinction molaire dépend de la polarité du solvant et des orientations que prennent les molécules en solution. Or, dans les solvants polaires, les chromophores peuvent interagir avec le solvant par liaisons hydrogènes par exemple ce qui peut modifier leurs orientations et donc leur propriétés d'absorption.

On notera également que les deux bio-conjugués 33K-9H et 33k-9AEM présentent des coefficients d'extinction molaire élevés dans l'eau par rapport aux autres bio-conjugués hydrolysés (Tableau IV.1.). Néanmoins, si on prend en compte les 20% d'erreurs évoqués précédemment pour la détermination des ϵ , on peut dire que les valeurs obtenues pour ces deux bio-conjugués ne sont pas très éloignées des valeurs de ϵ des autres bio-conjugués hydrolysés.

IV.3.3. Rendements quantiques de fluorescence.

Les rendements quantiques de fluorescence des différents bio-conjugués synthétisés ont également été déterminés en utilisant le mode opératoire décrit plus haut (cf. partie IV.1.). Contrairement aux deux paramètres précédents, il semblerait que la structure et la nature des bio-conjugués LPC aient une influence non négligeable sur le rendement quantique de fluorescence. C'est pourquoi, l'influence des paramètres structuraux sur Φ est discutée de manière plus détaillée ci-dessous.

IV.3.3.1. Influence de la densité de chromophores sur les propriétés optiques.

a) Cas des bio-conjugués hydrolysés dans l'eau.

Différents bio-conjugués LPC hydrolysés ont été synthétisés, à partir de copolymères présentant des masses molaires moyennes différentes : 33 000, 20 000 et 8 000 g.mol⁻¹. De plus, différentes quantités de chromophores JM086 ont été greffées sur ces chaînes polymères, ce qui a permis d'obtenir des bio-conjugués LPC présentant des densités moyennes en chromophores, D_C , variables.

D_C dépend de la longueur de la chaîne polymère et du nombre de chromophores couplés sur cette chaîne. Elle est calculée en utilisant la formule suivante (Equation 9) :

$$D_C = \frac{nc}{DP_n} \times 100 \quad (9)$$

Avec : n_c = nombre moyen de chromophores par chaîne polymère (déterminé par CES/UV)
 DP_n = Degré de polymérisation moyen des chaînes polymères

L'influence de D_C sur le rendement quantique des bio-conjugués hydrolysés a donc été étudiée. Les différents résultats obtenus sont présentés dans le graphique ci-dessous (Figure IV.5.).

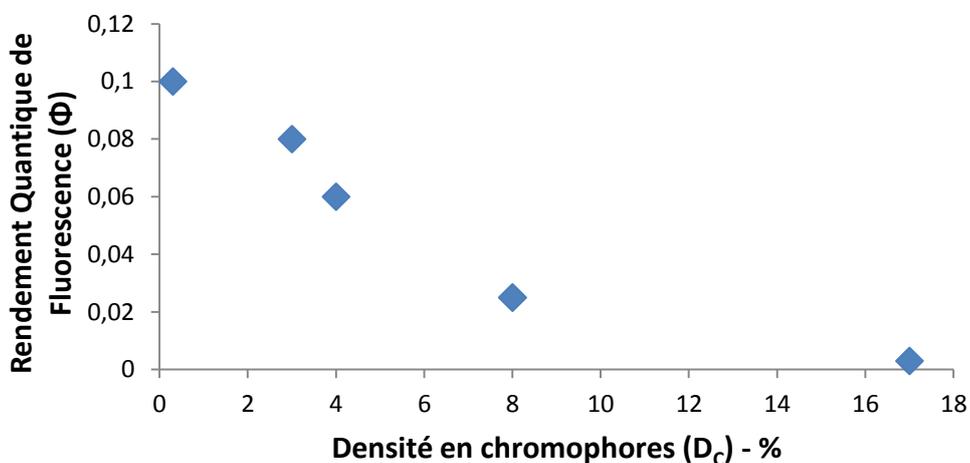


Figure IV.5. Evolution du rendement quantique (Φ) en fonction de la densité en chromophores pour des bio-conjugués hydrolysés.

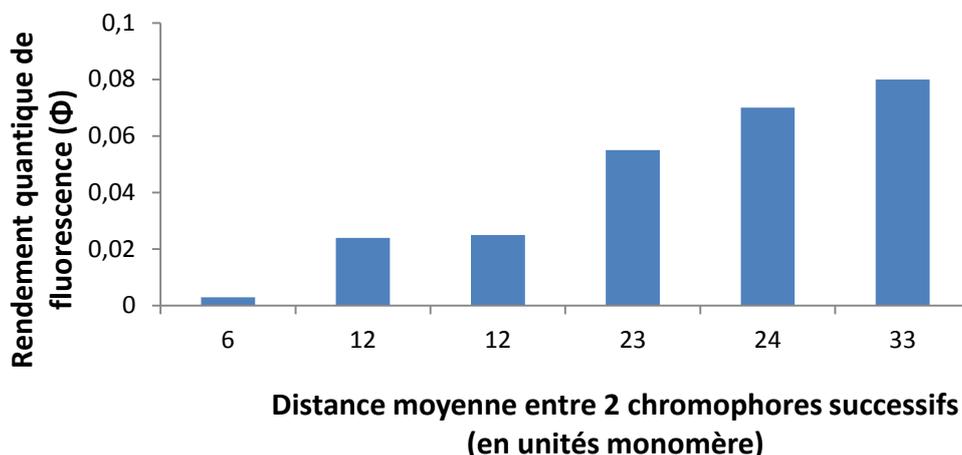


Figure IV.6. Evolution du rendement quantique (Φ) en fonction de la distance moyenne entre 2 chromophores le long de la chaîne polymère sur des bio-conjugués hydrolysés.

Même si les valeurs de Φ sont faibles, et impactés par les potentielles erreurs expérimentales, les graphiques permettent de mettre en évidence une diminution du rendement quantique de fluorescence avec l'augmentation de D_c d'une part (Figure IV.5.), et la diminution de la distance moyenne entre deux chromophores d'autre part (Figure IV.6.). Lorsque la densité en chromophores des bio-conjugués est très faible (0,3%) un rendement quantique de fluorescence de 0,1 est observé. En revanche, pour les bio-conjugués présentant une forte densité en chromophores (17%), le rendement quantique diminue de façon significative à 0,003. De même, lorsque deux chromophores sont espacés par trente-trois unités monomères en moyenne, le rendement quantique de fluorescence est de 0,08 alors que dans le cas où seulement six unités monomères séparent deux chromophores le rendement quantique est de 0,003.

Cette tendance peut être expliquée par la présence de phénomènes de self-quenching de la fluorescence concernant certains des bio-conjugués. En effet, lorsque la concentration en chromophores sur la chaîne polymère est très élevée, la probabilité que les chromophores entre en interaction (de type interaction π - π ou liaisons H) est très élevée. Or, ces interactions ont été proposées comme étant des interactions provocatrices de quenching de la fluorescence^{1,28,29}. En revanche, lorsque la densité en chromophores est faible, les chromophores sont assez éloignés les uns des autres ce qui permet de prévenir une diminution du rendement quantique de fluorescence (Figure IV.5.).

Ces deux graphiques, représentant i) l'évolution de Φ en fonction de la densité en chromophores des bio-conjugués hydrolysés (chargés négativement) et ii) l'évolution Φ de en fonction de la distance moyenne entre deux chromophores le long d'une chaîne (Figure IV.5. et IV.6.), constituent deux visions complémentaires permettant de mieux comprendre le comportement général des bio-conjugués.

En effet, la copolymérisation des monomères NAM et NAS étant effectuée à l'azéotrope (cf. chapitre 2), les sites réactifs ester activé impliqués dans le couplage des chromophores sont répartis de manière régulière le long de la chaîne polymère. Le couplage des chromophores s'effectuant en milieu homogène, ces derniers se répartissent donc de

manière statistique le long de la chaîne polymère permettant d'obtenir des bio-conjugués LPC très homogènes en termes de structure, ce qui donne encore plus de sens à ces valeurs de distances moyennes entre deux chromophores. Néanmoins, la flexibilité des polymères en solution leur permet de se replier sur eux-mêmes ce qui peut également avoir comme conséquence de rapprocher deux chromophores situés très loin l'un de l'autre sur la chaîne polymère lorsque cette dernière est en conformation étendue, et donc d'augmenter la concentration locale en chromophores. Dans ce cas là, les valeurs de distance entre chromophores n'ont plus de sens. La notion de densité en chromophore (D_C) paraît plus appropriée dans ce cas là puisqu'elle correspond au rapport entre le nombre moyen de chromophores et le degré de polymérisation de la chaîne polymère. Dans le cas de D_C , c'est la totalité de la chaîne polymère qui est prise en compte et on s'affranchit ainsi des repliements de chaînes qui rapprocheraient les chromophores (la densité en chromophore ne change pas). C'est pourquoi il semble que ces deux visions (distance moyenne entre deux chromophores et densité en chromophores) sont très complémentaires et très utiles pour comprendre le comportement général des bio-conjugués.

b) Cas des bio-conjugués cappés par l'AEM dans le chloroforme.

De même, l'influence de la densité en chromophores sur les propriétés optiques a été étudiée avec les bio-conjugués cappés par l'AEM, dans le chloroforme.

Les résultats obtenus sont différents de ceux observés précédemment pour les bio-conjugués hydrolysés dans l'eau. En effet, les rendements quantiques de fluorescence des bio-conjugués 33K-9AEM et 33K-38AEM sont très similaires dans le chloroforme. Une augmentation de la densité en chromophores ne semble donc pas influencer sur l'efficacité de la fluorescence des bio-conjugués lorsque ces derniers sont analysés dans le chloroforme.

Ces résultats surprenants suggèrent que dans le chloroforme, les phénomènes de self-quenching par interactions π - π sont limités.

IV.3.3.2. Influence du post-traitement des bio-conjugués.

Après couplage des chromophores, les bio-conjugués ont été traités dans le but de désactiver les fonctions réactives résiduelles (cf. partie III.3.2.2.). Cette désactivation des fonctions de type ester activé a été réalisée soit par hydrolyse soit par capping permettant d'obtenir des bio-conjugués présentant des propriétés différentes, notamment en terme de charge. La présence ou non des charges peut avoir une influence à la fois sur la conformation de la chaîne polymère en solution mais également sur les propriétés optiques des bio-conjugués (les chromophores étant très sensibles à leur environnement).

Deux bio-conjugués, hydrolysé et cappé, ont été synthétisés (33K-9H et 33K-9AEM) à partir d'un même copolymère poly(NAM-co-NAS) présentant une masse molaire moyenne de 33 200 g.mol⁻¹. Le copolymère a ensuite été séparé en deux aliquots et le chromophore

JM086 a ensuite été couplé de façon à obtenir en moyenne 9 chromophores par chaîne polymère. La seule différence entre ces deux bio-conjugués réside donc dans le post-traitement qui leur a été appliqué après couplage des chromophores.

Le fait que ces deux bio-conjugués aient été synthétisés à partir de polymères de mêmes longueurs et qu'ils portent en moyenne un nombre identique de chromophores par chaîne nous permet de nous affranchir du paramètre « densité en chromophores » afin de ne visualiser que l'influence du post-traitement sur les propriétés optiques.

Les résultats obtenus pour ces deux bio-conjugués sont présentés dans le Tableau IV.1. Ils présentent des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence identiques ($\lambda_{\max \text{ abs}} = 505 \text{ nm} / \lambda_{\max \text{ exc}} = 690 \text{ nm}$) (Figure IV.4.).

Outre les différences de solubilités en milieu aqueux et organiques, ces bio-conjugués (33K-9H et 33K-9AEM) présentent des différences au niveau des rendements quantiques de fluorescence. En effet, le rendement quantique, dans l'eau, du bio-conjugué 33K-9H a été évalué à 0,07 alors que celui du bio-conjugué 33K-9AEM a été évalué à 0,02. Cette diminution du rendement quantique du bio-conjugué cappé peut être expliquée par la différence de structure entre les deux bio-conjugués entraînant des différences de conformation en solution. La présence de charges carboxylates (33K-9H) favorise une conformation expansée des chaînes polymères via les répulsions électrostatiques, permettant aux chromophores de conserver une distance suffisante entre eux limitant le quenching de la fluorescence.

En ce qui concerne le bio-conjugué cappé 33K-9AEM, les fonctions carboxylates sont remplacées par des fonctions éthylmorpholine qui rendent les bio-conjugués moins hydrophiles et non chargés, pouvant adopter une conformation plus agrégée (couronne de polymère renfermant un cœur hydrophobe au sein duquel les chromophores seraient concentrés). Dans ce genre de conformation, les interactions entre les chromophores sont favorisées ce qui peut entraîner un quenching de la fluorescence et une diminution du rendement quantique.

IV.3.3.3. Influence de la présence du lipide en extrémité de chaîne.

Parmi les nombreux bio-conjugués de structures différentes (Tableau III.1.), on trouve les bio-conjugués 33K-9H, 34K-9H (SL) qui ont été synthétisés afin de vérifier l'influence de la présence du lipide en extrémité de chaîne, notamment sur les propriétés optiques des bio-conjugués.

En effet, la présence du lipide en extrémité de la chaîne polymère pourrait avoir une influence directe sur la conformation de la chaîne du bio-conjugué en solution. Pour un même nombre de chromophores, la présence du lipide sur la chaîne polymère rend le bio-conjugué plus hydrophobe que la même chaîne polymère fluorescente sans lipide. Cette différence d'hydrophobie peut entraîner des conformations différentes des bio-conjugués en solution aqueuse :

- La présence du lipide peut favoriser la formation de structures micellaires renfermant un cœur hydrophobe dans lequel pourrait venir se concentrer les chromophores, favorisant les phénomènes de quenching de fluorescence.
- En revanche, l'absence du lipide ainsi que la présence de charges négatives sur la chaîne polymère des bio-conjugués permettrait de limiter les agrégations et donc les phénomènes de quenching.

Les résultats obtenus pour les bio-conjugués 33K-9H et 34K-9H (SL) sont présentés dans le Tableau IV.1. Une légère tendance est observée : en ce qui concerne les valeurs du rendement quantique de fluorescence, une valeur de 0,05 est obtenue pour le bio-conjugué 34K-9H (SL) contre une valeur de 0,07 pour 33K-9H. Même si la différence est très légère, ces résultats peuvent surprendre si on considère les hypothèses émises précédemment. En effet, l'ajout du lipide sur le bio-conjugué augmente l'hydrophobie des objets formés, donc il paraît surprenant d'obtenir un rendement quantique plus important que dans le cas où il n'y a pas de lipide sur la chaîne polymère.

Cependant, le chromophore JM086 est un chromophore qui possède la particularité d'être fluorescent à l'état solide. La formation d'agrégats potentiellement induite par la présence du lipide en extrémité de chaîne polymère pourrait induire une exaltation de fluorescence suite à l'arrangement des chromophores en structure pseudo-cristalline, ce qui est le cas par exemple lors de la formation d'agrégats de type J, conduisant à une exaltation de la fluorescence^{19,30}. Néanmoins, dans le cas où les propriétés de fluorescence d'une molécule sont augmentées après agrégation (AIEE), les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence sont décalés vers les hautes longueurs d'ondes (effet bathochrome)³⁰. Or dans notre cas les spectres des deux bio-conjugués sont identiques et superposables ce qui suggère que cette augmentation du rendement quantique des bio-conjugués présentant le lipide en extrémité de chaîne n'est pas causée par ce phénomène d'agrégation J.

Une autre explication, concernant la valeur plus élevée du rendement quantique du bio-conjugué LPC 33K-9H par rapport à son homologue sans lipide, concerne la formation d'un environnement plus hydrophobe en présence du lipide. En effet, il est possible que les lipides de plusieurs bio-conjugués différents s'associent sous forme de micelles qui comprennent un cœur de nature hydrophobe contenant à la fois les chaînes alkyles lipidiques mais également les chaînes polymères des bio-conjugués. Les chromophores se retrouvent donc au sein d'un environnement dans lequel l'eau est exclue, ce qui peut avoir comme effet d'augmenter son rendement quantique de fluorescence, puisqu'il est connu que les chromophores hydrophobes sont plus fluorescents dans un milieu non polaire²⁶.

IV.3.3.4. Chromophore couplé vs. Chromophore seul.

Les différentes études réalisées ont permis de mettre en évidence l'influence de nombreux paramètres sur les propriétés optiques des bio-conjugués, comme la densité en chromophores, le post-traitement ou la présence du lipide en extrémité de chaîne.

Cependant, un autre paramètre peut également jouer un rôle sur les propriétés intrinsèques du chromophore cette fois-ci, la présence de la chaîne polymère.

a) Bio-conjugué 33K-9AEM vs. Chromophore JM086 dans le chloroforme.

La possibilité de solubiliser le bio-conjugué 33K-9AEM dans les solvants organiques comme le chloroforme permet vérifier, dans le même solvant, l'influence du couplage du chromophore sur la chaîne polymère sur le rendement quantique de fluorescence.

Les résultats obtenus (Tableau IV.1.) permettent de mettre en évidence que le rendement quantique du chromophore couplé sur la chaîne est très similaire à celui du chromophore libre en solution (0,07) : le couplage du chromophore sur la chaîne polymère ne semble pas affecter (ou très peu) le rendement quantique de fluorescence. Ceci semble surprenant puisque l'on aurait pu s'attendre à observer une différence entre les deux valeurs, et ce, pour plusieurs raisons :

- La transformation de la fonction amine (NH_2) sur le chromophore seul en fonction amide après couplage
- La présence de la chaîne polymère à proximité du groupement donneur d'électrons.

Néanmoins, il est difficile de comparer les résultats obtenus pour ces (macro)molécules puisque le bio-conjugué 33K-9AEM porte en moyenne neuf chromophores par chaîne polymère. En effet, il est possible que le couplage du chromophore sur la chaîne polymère entraîne une augmentation du rendement quantique de fluorescence de ce dernier, mais que cette augmentation soit masquée par les phénomènes de self-quenching consécutifs à la présence de nombreux chromophores sur la chaîne polymère. Donc finalement, plutôt que d'observer une augmentation du rendement quantique de fluorescence par rapport au chromophore seul, on observe des rendements quantiques similaires.

b) Bio-conjugué 33K-1H vs. Chromophore JM086.

Un bio-conjugué référence, 33K-1H ref, ne portant qu'un chromophore par chaîne en moyenne a été synthétisé. Ce bio-conjugué a été utilisé pour comparer les propriétés du chromophore couplé sur la chaîne polymère à celles du chromophore seul en solution, en nous affranchissant cette fois-ci du paramètre n_c .

Tout d'abord, le couplage du chromophore sur la chaîne polymère a permis de modifier significativement les propriétés physico-chimiques et optiques de ce dernier :

- Une solubilisation possible dans les solvants aqueux grâce à la chaîne polymère
- Un déplacement de la longueur d'onde d'émission de fluorescence du chromophore vers le rouge dans l'eau (645 nm \rightarrow 690 nm)
- Une augmentation du rendement quantique de fluorescence : 0,07 dans le chloroforme pour le JM086 seul contre 0,1 dans l'eau pour le bio-conjugué 33K-1H ref

Différentes explications peuvent être apportées pour expliquer l'augmentation du rendement quantique de fluorescence du chromophore après couplage du chromophore sur la chaîne polymère :

- Une influence de la polarité du solvant. Néanmoins, lorsque la polarité du solvant augmente, le rendement quantique a plutôt tendance à diminuer²⁶
- La présence de la chaîne polymère qui change la structure et l'environnement du chromophore.

On peut supposer que la seconde hypothèse soit la plus probable. La présence du polymère et de la fonction amide résultante du couplage change en effet la structure chimique du chromophore, qui est finalement différente de la structure initiale.

En effet, dans leur article, Massin *et al.*¹⁹ ont décrit la synthèse de chromophores basés sur une structure de type dicyanoisophorone, similaires au chromophore JM086. Dans cet article, les auteurs ont montré que, en fonction du type de fonctions liées à l'atome d'azote électro-donneur, les propriétés optiques des chromophores sont modifiées et notamment le rendement quantique de fluorescence. Il semble donc difficile de tirer des conclusions sachant qu'en changeant le groupement lié à l'atome d'azote, les propriétés du chromophore changent.

Il est également possible d'imaginer synthétiser un dérivé du chromophore JM086 portant une fonction amide à la place de la fonction amine. La caractérisation de ce dérivé (dans le chloroforme) permettrait de vérifier si la différence de rendement quantique observée est réellement causée par la présence de la liaison amide ou par la présence de la chaîne polymère.

IV.3.3.5. Bilan.

L'étude de l'influence de différents paramètres structuraux a permis de mettre en évidence un impact non négligeable de la conformation qu'adopte la chaîne polymère en solution sur les propriétés optiques des bio-conjugués, et notamment le rendement quantique de fluorescence.

Lorsque la concentration locale en chromophores augmente (densité en chromophores élevée ou repliement de la chaîne polymère), deux phénomènes sont susceptibles de se produire :

- Un quenching de la fluorescence
- Une exaltation de la fluorescence suite à l'agrégation des chromophores (AIEE)

Dans le cas des bio-conjugués LPC, le phénomène d'exaltation de la fluorescence a été écarté. En revanche, des phénomènes de quenching de la fluorescence semblent se produire lorsque la concentration locale en chromophores augmente. Cependant, la particularité du chromophore JM086 à émettre de la fluorescence à l'état solide pourrait limiter ce phénomène de quenching et éviter une extinction complète de la fluorescence des sondes.

Enfin, une étude sur l'influence du couplage des chromophores sur la chaîne polymère a également été réalisée. Les résultats semblent suggérer une influence positive de la formation de la liaison amide (consécutives au couplage des chromophores) ou de la présence de la chaîne polymère sur le rendement quantique de fluorescence. Néanmoins, les résultats ne permettent pas de tirer de conclusions définitives et d'autres analyses sont nécessaires, notamment en utilisant des dérivés du chromophore JM086.

IV.3.4. Brillance des bio-conjugués LPC.

IV.3.4.1. Cas de la brillance des bio-conjugués hydrolysés.

La brillance des sondes fluorescentes, telle qu'elle a été définie précédemment (cf. partie IV.1.), dépend à la fois du rendement quantique de fluorescence (Φ), du coefficient d'extinction molaire (ϵ) mais également du nombre d'espèce émettant de la fluorescence (chromophores).

Les différents résultats obtenus pour les bio-conjugués hydrolysés ont mis en évidence que le rendement quantique de fluorescence (Φ) varie de manière significative avec les différents paramètres structuraux, notamment la densité en chromophore D_c (lorsque la densité en chromophores augmente, le rendement quantique de fluorescence diminue) (cf. partie IV.3.3.1.). Ceci suggère qu'il est possible d'atteindre une brillance optimale pour les bio-conjugués en modulant à la fois le nombre de chromophores couplés par chaîne polymère et la longueur de ces mêmes chaînes polymères. En trouvant un juste équilibre entre la taille de la chaîne et le nombre de chromophores couplés, il est possible de conserver un rendement quantique de fluorescence optimal (limitation du self-quenching) ce qui permet ensuite d'augmenter la brillance des sondes synthétisées de manière significative.

Ainsi, il a été possible de synthétiser des bio-conjugués LPC de brillance nettement améliorée par rapport à la brillance du chromophore seul en solution. En effet, le bio-conjugué 33K-9H présente une brillance de $13\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ dans l'eau alors que la brillance du chromophore JM086 est de $1\,400\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ dans le chloroforme.

De plus, même dans le cas où cet équilibre optimal (nombre de chromophores couplés/taille de la chaîne polymère) n'est pas atteint, les bio-conjugués LPC présentent des brillances supérieures à la brillance du chromophore seul. La diminution de la valeur de rendement quantique est compensée par la présence de nombreux chromophores sur la chaîne polymère.

IV.3.4.2. Cas de la brillance des bio-conjugués capés par l'AEM.

En ce qui concerne les bio-conjugués capés par l'AEM dans le chloroforme, les résultats sont différents. En effet, les résultats obtenus précédemment ont mis en évidence

que le rendement quantique de fluorescence (Φ) ne dépend pas (ou très peu) de la densité en chromophores (D_C). Ceci suggère donc que le seul paramètre qui influe directement sur la brillance des bio-conjugués est le nombre de chromophores couplés sur la chaîne polymère : plus n_C est grand et plus la brillance est augmentée.

Ainsi, les bio-conjugués cappés par l'AEM présentent tous des brillances supérieures à la brillance du chromophore seul. La brillance du bio-conjugué 33K-38AEM a été évaluée à $50\,300\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ soit trente-huit fois plus importante que celle du chromophore seul.

IV.4. Conclusions.

Après avoir couplé les chromophores sur les chaînes polymères, les bio-conjugués LPC ainsi que le chromophore JM086 ont été caractérisés par spectroscopie.

La présence de la chaîne polymère permet de rendre les bio-conjugués LPC solubles en milieu aqueux, ce qui est une condition indispensable pour l'utilisation de ces sondes fluorescentes en vue d'applications biologiques. Les caractérisations optiques des bio-conjugués ont donc pu être également réalisées dans l'eau.

Lors de cette étude, l'influence de différents paramètres structuraux tels que D_C , le post-traitement ou la présence de lipide en extrémité de chaîne, sur les propriétés optiques a été vérifiée.

Effectivement, il a été montré que la structure chimique des bio-conjugués joue un rôle majeur sur leurs propriétés optiques. En effet, en modulant le post-traitement apporté à la chaîne polymère et également la densité en chromophores par chaîne polymère, il est possible d'obtenir des bio-conjugués LPC présentant une brillance améliorée par rapport à celle du chromophore JM086 seul.

Plusieurs résultats intéressants ont pu être tirés de cette étude. Tout d'abord, la densité en chromophores des bio-conjugués joue un rôle essentiel sur l'efficacité de fluorescence des sondes synthétisées (rendement quantique de fluorescence) : plus la densité en chromophores augmente, plus le rendement quantique de fluorescence diminue (phénomène de self-quenching).

Ensuite, le post-traitement réalisé sur les bio-conjugués s'est avéré également très important. En effet, les bio-conjugués cappés par l'AEM présentent l'avantage d'être solubles à la fois dans les solvants polaires et apolaires, mais les études spectroscopiques réalisées ont mis en évidence une diminution du rendement quantique de ces bio-conjugués, dans l'eau, par rapport aux bio-conjugués LPC hydrolysés. Ceci a été expliqué par un caractère moins hydrophile des bio-conjugués cappés par l'AEM induisant une modification de la conformation des chaînes en solution dans l'eau, favorisant les phénomènes de self-quenching.

V. Partie expérimentale.

V.1. Matériels.

Triéthylamine (Sigma Aldrich, 99,5%) ; 4-(2-Aminoethyl)morpholine (Sigma Aldrich, 99%) ; Erythrosine B extra bluish (Fluka, 99%) ; Bromure de Lithium (Acros Organics, 99% anhydre). Chloroforme (Sigma Aldrich, spectrophotometric grade, >99,8%). Les produits et solvants ont été utilisés sans purification particulière.

V.2. Instruments.

V.2.1. Chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur UV (CES/UV).

Le système composé d'une pompe Waters 1515 isocratic HPLC pump (débit : 1 mL.min⁻¹) et d'une colonne Waters column Styragel HR4E (7.8x300 mm²). Le diméthylformamide (DMF) comportant du LiBr (0,05 mol.L⁻¹) a été utilisé comme éluant pour les analyses. La détection a été réalisée en utilisant deux détecteurs : un détecteur réfractométrique Waters 2410 et un détecteur UV/Visible Waters 2489 dont la longueur d'onde a été réglée à 488 nm pour le chromophore JM086. Les analyses des échantillons ont été réalisées par injection de 10 µL de solution de polymère (5 mg.mL⁻¹) dans le DMF. L'acquisition et le traitement des données ont été réalisés via le logiciel Breeze.

V.2.2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).

Les analyses RMN ¹H ont été enregistrées dans du chloroforme deutéré à température ambiante (298K) en utilisant un spectromètre Brüker DPX 200 opérant à 200,13 MHz. Les déplacements chimiques des échantillons sont reportés en ppm en utilisant le tétraméthylsilane (TMS) comme référence interne.

V.2.3. Spectromètre UV/Visible.

Les spectres d'absorption ont été enregistrés en utilisant un spectrophotomètre Jasco V-670, à température ambiante et en utilisant des cuves en quartz de 1 cm.

V.2.4. Spectromètre de fluorescence.

Les spectres d'émission de fluorescence ont été enregistrés en utilisant un spectromètre Horiba-Jobin Yvon Fluorolog-3® à température ambiante, en utilisant des cuves en quartz de 1 cm. Les échantillons ont été excités par une lumière non polarisée

provenant d'une lampe 450 W xenon CW et la fluorescence a été détectée selon un angle de 90° par un photomultiplicateur Hamamatsu R928. (fentes 3/3 ; $\lambda_{exc} = 510$ nm lors des mesures de rendements quantiques et 505 nm lors de l'acquisition des spectres d'émission).

V.3. Synthèses et purification.

Couplage du chromophore JM086 sur les copolymères poly(NAM-co-NAS) et post-traitement.

V.3.1. Couplage du chromophore JM086 sur le copolymère.

Tous les couplages de chromophores ont été réalisés selon le même mode opératoire général. Je ne présenterai ici, pour exemple, que le couplage des chromophores du bio-conjugué 8K-4H.

Dans un ballon monocol de 10 mL, 1 mL de solution de polymère (solution à 25 mg.mL⁻¹), 652 μ L d'une solution de JM086 dans le chloroforme (solution à 10 mg.mL⁻¹) et 189 μ L de solution de triéthylamine (solution à 9,68 mg.mL⁻¹) sont ajoutés. Ensuite, 659 μ L de chloroforme sont ajoutés dans le but de conserver une concentration en polymère de 10 mg.mL⁻¹. Le ballon est ensuite mis dans un bain d'huile à 40°C et sous agitation magnétique.

Les bio-conjugués LPC sont ensuite purifiés par précipitation dans du diéthyle éther. Le polymère précipité et le chromophore libre sont ensuite séparés par centrifugation (Eppendorf centrifuge 5810 R) à 4°C, pendant 10 minutes à 8 000 rpm. Le surnageant est retiré et le polymère est à nouveau dissous dans du chloroforme pour être à nouveau précipité et centrifugé. Les cycles précipitation/centrifugation sont répétés jusqu'à ce que les surnageants de centrifugation soient incolores témoignant d'une élimination complète du chromophore libre.

A la fin de la purification, les bio-conjugués sont séchés sous vide et se présentent sous forme d'une poudre rouge.

V.3.2. Post-traitement des bio-conjugués Lipide-Polymère-Chromophores.

V.3.2.1. Hydrolyse des bio-conjugués.

Les bio-conjugués sont redispersés dans 45 mL de tampon borate (50 mM, pH = 9). L'hydrolyse des fonctions réactives résiduelles en fonctions carboxylates est réalisée à température ambiante et sous agitation magnétique pendant 3 jours. Après hydrolyse, les

bio-conjugués sont purifiés par dialyse (membranes Spectra/Por®6 – 132 625 – MWCO = 2000 g.mol.⁻¹) contre de l'eau distillée, pendant 3 à 5 jours puis lyophilisés.

V.3.2.2. Capping par l'AEM des bio-conjugués.

Les bio-conjugués sont redissous dans 3 mL de chloroforme. Un excès d'AEM est ensuite ajouté (10 équivalents par rapport aux fonctions des unités NAS réactives). La réaction de capping est ensuite réalisée à température ambiante sous agitation magnétique pendant 15 heures. Les bio-conjugués sont purifiés par dialyse (membranes Spectra/Por®6 – 132 625 – MWCO = 2000 g.mol.⁻¹) contre de l'eau distillée, pendant 3 à 5 jours puis lyophilisés.

V.4. Méthodes Analytiques.

V.4.1. Détermination du nombre moyen de chromophore par chaîne (n_C).

La CES/UV a été utilisée pour suivre et déterminer le rendement de couplage des chromophores sur le copolymère poly(NAM-co-NAS). Des prélèvements sont réalisés en cours de réaction, puis dilués avec de l'éluant (DMF + LiBr 0,05 mol.L⁻¹) à 5 mg.mL⁻¹ en polymère avant injection.

Le nombre moyen de chromophore couplé par chaîne polymère (n_C) a été déterminé en utilisant l'équation 1.

$$n_C = \frac{n (JM086 \text{ initial}) \times \text{Rendement}}{m (\text{polymère initial}) / Mn} \quad (1)$$

V.4.2. Coefficient d'extinction molaire (ϵ).

Des solutions de bio-conjugués (ou de chromophore) sont réalisées dans un solvant (chloroforme ou eau) de telle sorte que l'absorbance des solutions mesurées par le spectromètre UV ne soit pas supérieure à 1.

Les coefficients d'extinction molaire ont été calculés en utilisant la loi de Beer-Lambert (Equation 2) à la longueur d'onde maximale de chaque bio-conjugué.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c \quad (2)$$

Avec :

- A = absorbance
- l = Distance du trajet de la lumière (épaisseur de la cuve en quartz) (cm)
- c = Concentration molaire des espèces absorbantes (M)
- ϵ = Coefficient d'extinction molaire (M⁻¹.cm⁻¹)

Des mesures indépendantes du coefficient d'extinction molaire ont été réalisées sur différents échantillons afin de vérifier la reproductibilité des mesures. Les valeurs données sont des moyennes des résultats reproductibles obtenus.

NB : Les échantillons de bio-conjugués se sont avérés être très hygroscopiques. Ils doivent donc être séchés au minimum 15 heures sous vide avant de réaliser les mesures des coefficients d'extinction molaire afin de ne pas fausser le calcul des concentrations des solutions indispensables au calcul de ϵ .

V.4.3. Rendement quantique de fluorescence (Φ).

Les rendements quantiques de fluorescence des bio-conjugués et du chromophore ont été déterminés en solution dans différents solvants (chloroforme ou eau) par comparaison avec des molécules références dont les rendements quantiques sont connus. Dans notre cas, la référence choisie est l'Erythrosine B dont le rendement quantique de le méthanol et à 510 nm est de 0,09³¹.

Des solutions diluées de la référence et des différents échantillons à analyser sont préparées dans des cuves en quartz de 1 cm. Après avoir mesuré l'absorbance des différentes solutions (référence et échantillons), les spectres d'émission de fluorescence sont enregistrés en conservant les mêmes paramètres d'acquisition (fentes d'excitation et d'émission, temps d'intégration, $\lambda_{exc} = 510$ nm).

Les solutions initiales de bio-conjugués et de chromophores sont ensuite diluées et les étapes décrites précédemment sont répétées. Les solutions initiales de bio-conjugué et de chromophore à partir desquelles les dilutions sont réalisées sont généralement préparées de telle sorte qu'elles présentent des absorbance inférieure à 0,1 dans le but de minimiser les phénomènes de réabsorption.

Les spectres d'émission de fluorescence obtenus permettent de calculer l'aire sous le pic d'émission dans chaque cas et ainsi de tracer la droite Aire = f(Absorbance) dont la pente permet de déterminer le rendement quantique de fluorescence de la molécule ou macromolécule par rapport à celui de la molécule référence, en utilisant l'équation 3 :

$$\Phi = \Phi_{ref} \times \frac{s}{s_{ref}} \times \frac{n^2}{n_{ref}^2} \quad (3)$$

Avec : Φ = rendement quantique de la référence (ref) et de l'échantillon

s = Pente de la droite Aire = f(Absorbance) obtenue pour la référence et les échantillons.

f = facteur d'absorption correspondant à la fraction de lumière absorbée par le chromophore

n = indices de réfractions des solvants utilisés dans le cas de la référence et de l'échantillon.

VI. Conclusions du chapitre 3.

L'objectif de notre projet est de synthétiser des bio-conjugués Lipide-Polymère-Chromophores (LPC) permettant, à terme, d'imager par microscopie de fluorescence des cellules vivantes. C'est pourquoi, après avoir synthétisé les bio-conjugués LP (cf. chapitre 2) nous avons couplé plusieurs chromophores par chaîne polymère. Le chromophore choisi (JM086) émet dans le rouge lointain et présente un large déplacement de Stokes, deux paramètres très intéressants pour la microscopie de fluorescence.

La première étape a donc consisté à coupler de manière covalente le chromophore JM086 sur les chaînes polymères des bio-conjugués LP de masses molaires variables. Ce couplage, réalisé par formation d'une liaison amide entre les fonctions ester activé du polymère et la fonction amine du chromophore, s'est avéré être à la fois très efficace, rapide et reproductible, permettant un très bon contrôle de la structure finale de la sonde fluorescente. Le rendement de couplage (situé entre 60 et 70%), ainsi que le nombre de chromophores couplés par chaîne polymère (de 2 à 38) ont pu être déterminés par CES couplée à un détecteur UV/Vis.

Un post-traitement des bio-conjugués LPC a ensuite été réalisé dans le but de désactiver les fonctions réactives résiduelles. Cette désactivation a été réalisée selon deux méthodes différentes : une hydrolyse conduisant à des bio-conjugués à squelette négativement chargé et un capping par l'Aminoéthylmorpholine (AEM) conduisant à des bio-conjugués à squelette hydrophile et neutre.

La présence de la chaîne polymère hydrophile permet, après post-traitement, de solubiliser les bio-conjugués LPC en phase aqueuse alors que le chromophore seul n'est pas soluble dans l'eau.

Les bio-conjugués LPC obtenus ont ensuite été analysés par spectroscopie UV/Vis et de fluorescence dans le but de déterminer leurs propriétés optiques, telles que le coefficient d'extinction molaire, le rendement quantique de fluorescence ou encore la brillance. Cette étude spectroscopique systématique a permis d'étudier l'influence des divers paramètres structuraux (comme la densité en chromophores, le type de post-traitement réalisé, ou encore la présence ou non du lipide) sur les propriétés optiques des bio-conjugués LPC.

Les résultats obtenus ont mis en évidence, notamment, que le rendement quantique de fluorescence augmente lorsque la densité en chromophores diminue. Chacun des bio-conjugués synthétisés présentent une brillance améliorée, jusqu'à $13\ 000\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ dans l'eau et $50\ 000\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ dans le chloroforme, par rapport à la brillance du chromophore seul en solution dans le chloroforme ($1\ 400\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

L'utilisation de nouveaux chromophores couplés sur la chaîne polymère des bio-conjugués permettrait éventuellement de vérifier les différentes tendances observées.

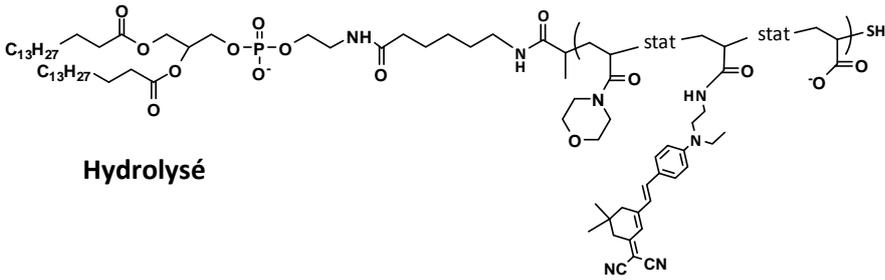
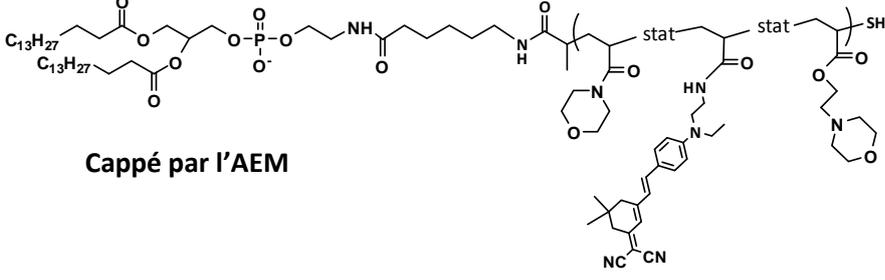
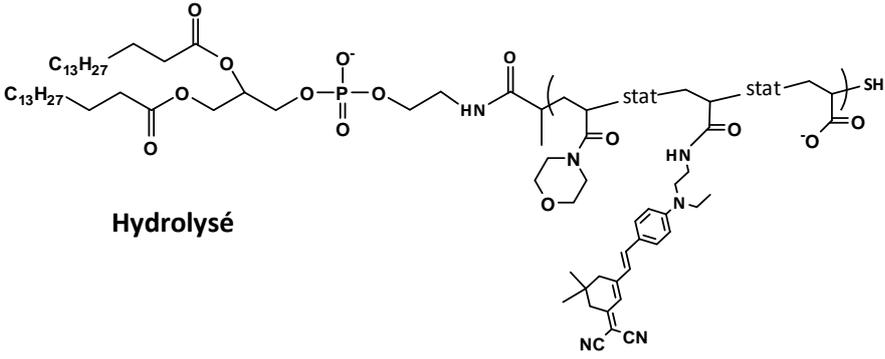
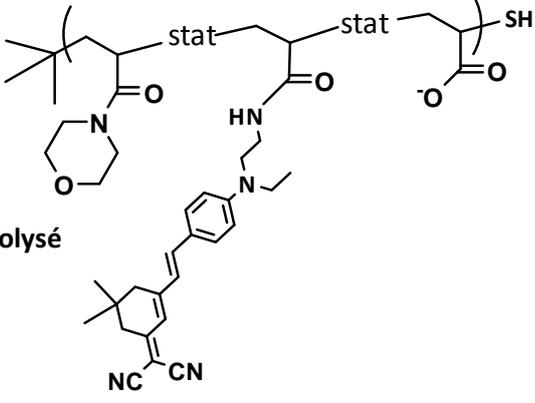
Les sondes lipidiques ainsi synthétisées présentent l'avantage d'être à la fois solubles dans l'eau, très brillantes, avec un déplacement de Stokes très important ($> 5\ 000\ \text{cm}^{-1}$) et émettent dans le rouge lointain (690 nm dans l'eau), caractéristiques très intéressantes pour

la microscopie. C'est pourquoi, leur interaction potentielle avec des bicouches lipidiques a ensuite été évaluée, à la fois sur des systèmes modèles (cf. chapitre 4) et sur des cellules vivantes (cf. chapitre 5).

Concernant les perspectives de ce chapitre, il serait intéressant de moduler la nature des chromophores qui seront couplés sur la chaîne polymère puisque la modularité des structures synthétisées lors de ce projet le permet. Ainsi la gamme de chromophores pourrait être élargie, ce qui permettra des applications variées. Des travaux préliminaires ont déjà été réalisés dans ce sens par William Lacour lors de son stage de M2, avec le couplage de chromophores commerciaux émettant dans proche infrarouge. Ces essais préliminaires ont permis d'étendre la stratégie de couplage à des chromophores de nature différente de celle du JM086. Il serait intéressant de poursuivre ces travaux afin d'obtenir une gamme de bio-conjugués LPC émettant dans le rouge lointain et le proche infrarouge, ce qui nous permettrait d'établir des relations structure/propriétés (optiques et biologiques) de ces différentes sondes fluorescentes.

Il serait également intéressant de coupler d'autres molécules en position latérale de bio-conjugués LP, en plus des chromophores. Par exemple, des molécules de ciblage comme des peptides pourraient permettre éventuellement de cibler un organite à l'intérieur de la cellule. De même, le couplage d'une molécule spécifique d'un récepteur membranaire pourrait permettre de favoriser un marquage membranaire après interaction spécifique entre la molécule d'intérêt et le récepteur membranaire.

Tableau VI.1. Architectures des bio-conjugués Lipide-Polymère-Chromophores synthétisés.

Références	Structure	DP _n	n _C
8K-4H 8K-2H 20K-11H 20K-4H 33K-1Href* 33K-9H 33K-38H	 <p>Hydrolysé</p> <p>DPPEHA (avec bras espaceur)</p>	52 133	4 2 4 11
33K-9AEM 33K-38AEM	 <p>Cappé par l'AEM</p> <p>DPPEHA (avec bras espaceur)</p>	218	9 38
17K-4H*	 <p>Hydrolysé</p> <p>DPPE (sans bras espaceur)</p>	109	4
34K-9H* (SL)	 <p>Hydrolysé</p> <p>Sans Lipide</p>	224	9

* Bio-conjugués synthétisés par William Lacour lors de son stage de M2

Bibliographie du chapitre 3.

1. Qin, W. *et al.* Biocompatible Nanoparticles with Aggregation-Induced Emission Characteristics as Far-Red/Near-Infrared Fluorescent Bioprobes for In Vitro and In Vivo Imaging Applications. *Advanced Functional Materials* **22**, 771–779 (2012).
2. Klonis, N., Quazi, N. H., Deady, L. W., Hughes, A. B. & Tilley, L. Characterization of a series of far-red-absorbing thiobarbituric acid oxonol derivatives as fluorescent probes for biological applications. *Analytical Biochemistry* **317**, 47–58 (2003).
3. Lu, Z. *et al.* Bright, Red Single-Molecule Emitters: Synthesis and Properties of Environmentally Sensitive Dicyanomethylenedihydrofuran (DCDHF) Fluorophores with Bisaromatic Conjugation. *Chemistry of materials* **21**, 797 (2009).
4. Klonis, N., Wang, H. & Quazi, N. Characterization of a series of far red absorbing perylene diones: a new class of fluorescent probes for biological applications. *Journal of fluorescence* **11**, (2001).
5. Aubin, J. E. Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **27**, 36–43 (1979).
6. Pansare, V., Hejazi, S., Faenza, W. & Prud'homme, R. K. Review of Long-Wavelength Optical and NIR Imaging Materials: Contrast Agents, Fluorophores and Multifunctional Nano Carriers. *Chemistry of materials* **24**, 812–827 (2012).
7. Roederer, M. & Murphy, R. F. Cell-by-cell autofluorescence correction for low signal-to-noise systems: application to epidermal growth factor endocytosis by 3T3 fibroblasts. *Cytometry* **7**, 558–65 (1986).
8. Dsouza, R. N., Pischel, U. & Nau, W. M. Fluorescent dyes and their supramolecular host/guest complexes with macrocycles in aqueous solution. *Chemical reviews* **111**, 7941–80 (2011).
9. Rurack, K. & Spieles, M. Fluorescence quantum yields of a series of red and near-infrared dyes emitting at 600–1000 nm. *Analytical chemistry* **83**, 1232–42 (2011).
10. Mujumdar, R. B., Ernst, L. a, Mujumdar, S. R., Lewis, C. J. & Waggoner, a S. Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjugate chemistry* **4**, 105–11 (1993).
11. Chen, C.-T. Evolution of Red Organic Light-Emitting Diodes: Materials and Devices. *Chemistry of Materials* **16**, 4389–4400 (2004).
12. Qian, G. & Wang, Z. Y. Near-infrared organic compounds and emerging applications. *Chemistry, an Asian journal* **5**, 1006–29 (2010).
13. Kolmakov, K. *et al.* Red-emitting rhodamine dyes for fluorescence microscopy and nanoscopy. *Chemistry* **16**, 158–66 (2010).
14. Kolmakov, K. *et al.* A Versatile Route to Red-Emitting Carbopyronine Dyes for Optical Microscopy and Nanoscopy. *European Journal of Organic Chemistry* **2010**, 3593–3610 (2010).
15. Roth, P. J., Haase, M., Basché, T., Theato, P. & Zentel, R. Synthesis of Heterotelechelic R, ω Dye-Functionalized Polymer by the RAFT Process and Energy Transfer between the End Groups. *Macromolecules* **43**, 895–902 (2010).
16. Lucas, B. *et al.* Studying the intracellular dissociation of polymer-oligonucleotide complexes by dual color fluorescence fluctuation spectroscopy and confocal imaging. *Biochemistry* **44**, 9905–12 (2005).
17. Saad, M. *et al.* Receptor targeted polymers, dendrimers, liposomes: which nanocarrier is the most efficient for tumor-specific treatment and imaging? *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **130**, 107–14 (2008).
18. Wang, X., Zhang, Y., Zhu, Z. & Liu, S. Fabrication of Fullerene-Containing Hybrid Vesicles via Supramolecular Self-Assembly of a Well-Defined Amphiphilic Block Copolymer Incorporated with a Single C60 Moiety at the Diblock Junction Point. *Macromolecular Rapid Communications* **29**, 340–346 (2008).
19. Massin, J. *et al.* Near-Infrared Solid-State Emitters Based on Isophorone: Synthesis, Crystal Structure and Spectroscopic Properties. *Chemistry of Materials* **23**, 862–873 (2011).
20. Milián, B. & Ortí, E. Spectroscopic and theoretical study of push-pull chromophores containing thiophene-based quinonoid structures as electron spacers. *The journal of physical chemistry. B* **107**, 12175–12183 (2003).
21. Tounsia, A.-S. Principe physique de la Fluorescence. at <http://www.edu.upmc.fr/sdv/docs_sdvbmc/Master/ue/MV426/fluo89.pdf>
22. Fery-Forgues, S. & Lavabre, D. Are Fluorescence Quantum Yields So Tricky to Measure? A Demonstration Using Familiar Stationery Products. *Journal of Chemical Education* **76**, 1260 (1999).
23. Grabolle, M. *et al.* Determination of the Fluorescence Quantum Yield of Quantum Dots: Suitable Procedures and Achievable Uncertainties. *Analytical Chemistry* **81**, 6285–6294 (2009).

24. Wolfbeis, O. S. *Fluorescence Methods and Applications: Spectroscopy, Imaging and Probes*. Blackwell Pub. on behalf of the New York Academy of Sciences. 328p. (2008).
25. Lavis, L. D. & Raines, R. T. Bright ideas for chemical biology. *ACS chemical biology* **3**, 142–55 (2008).
26. Lord, S. J. *et al.* Photophysical properties of acene DCDHF fluorophores: long-wavelength single-molecule emitters designed for cellular imaging. *The journal of physical chemistry. A* **111**, 8934–41 (2007).
27. Valeur, B. *Molecular Fluorescence. Principles and Applications*. Wiley-VCH. 381p. (2001).
28. Ning, Z. *et al.* Aggregation-induced Emission (AIE)-active Starburst Triarylamine Fluorophores as Potential Non-doped Red Emitters for Organic Light-emitting Diodes and Cl₂ Gas Chemodosimeter. *Advanced Functional Materials* **17**, 3799–3807 (2007).
29. Li, H. *et al.* New aggregation-induced emission enhancement materials combined triarylamine and dicarbazolyl triphenylethylene moieties. *Journal of Materials Chemistry* **20**, 6103 (2010).
30. Luo, J. *et al.* Aggregation-induced emission of 1-methyl-1,2,3,4,5-pentaphenylsilole. *Chemical Communications* **381**, 1740–1741 (2001).
31. Qin, W. *et al.* Fluorescence Lifetime Standards for Time and Garry Rumbles and David Phillips. *Analytical Chemistry* **79**, 2137–2149 (2007).

CHAPITRE 4

ETUDE DE L'INTERACTION ENTRE LES BIO-CONJUGUES LIPIDE-POLYMERES FLUORESCENTS ET DES BICOUCHES LIPIDIQUES MODELES

Les expériences présentées dans ce chapitre ont principalement été réalisées par moi-même, en bénéficiant des conseils de Cyril Favard (CPBS – Montpellier) et du savoir-faire de Elise Hamard-Perron pour la formation des liposomes. Les visualisations des GUVs en champ sombre et en fluorescence ont été réalisées grâce au savoir-faire d'Elodie Châtre et de Christophe Place (LJC – ENS de Lyon).

Certaines expériences de formation de LUVs ont été réalisées par Yi-Chun Lin que j'ai co-encadré lors de son stage de Master 2.

Sommaire

I.	INTRODUCTION	133
II.	Bibliographie : Les systèmes lipidiques modèles	133
	II.1. Les différents systèmes lipidiques modèles.....	133
	II.2. Les liposomes.....	136
III.	Formation de liposomes fluorescents à partir d'un mélange de lipides et de bio-conjugués	140
	III.1. Formation de LUVs et SUVs par extrusion.	141
	III.1.1. Principe de formation et optimisation.	141
	III.1.2. Visualisation par microscopie optique de fluorescence de la formation des LUVs par extrusion. .	146
	III.2. Formation de SUVs par sonication.	147
	III.3. Formation de GUVs par électroformation.	149
	III.4. Conclusion.	152
IV.	Incorporation des bio-conjugués au sein de liposomes préformés	153
	IV.1. Suivi par spectroscopie de Fluorescence de l'incorporation des bio-conjugués dans des LUVs.....	153
	IV.2. Suivi par microscopie optique de l'incorporation des bio-conjugués au sein de GUVs.	155
	IV.3. Conclusions.....	156
V.	Partie expérimentale	156
	V.1. Matériel.	156
	V.2. Instruments.	157
	V.2.1. Diffusion dynamique de la lumière (DLS).	157
	V.2.2. Microscopie optique.	157
	V.3. Formation de liposomes.	158
	V.3.1. Formation de liposomes fluorescents par extrusion (protocole optimisé).	158
	V.3.2. Formation de SUVs par sonication.	158
	V.3.3. Formation de GUVs fluorescentes par électroformation.....	159
	V.3.4. Incubation de GUVs en présence de bio-conjugué.	159
	V.4. Méthode analytique.	160
VI.	Conclusions du chapitre 4	160

I. INTRODUCTION

Nous avons mis en évidence, dans le chapitre 2, qu'il était possible de synthétiser des bio-conjugués Lipide-Polymères (LP) multifonctionnels de composition et de taille contrôlées, via la technique de polymérisation radicalaire contrôlée de type RAFT.

Des chromophores émettant dans le rouge lointain ont ensuite été couplés en position latérale des chaînes conduisant à l'obtention de bio-conjugués Lipide-Polymères fluorescents (LPC) de structure bien définie, hydrosolubles et de brillances fortement améliorées (cf. chapitre 3).

En parallèle à l'évaluation biologique sur cellules vivantes de ces bio-conjugués LPC (cf. chapitre 5), des tests sur systèmes lipidiques modèles ont été mis en place. Le but était de montrer la capacité des nouvelles sondes lipidiques fluorescentes à :

- Former des liposomes fluorescents (à partir d'un mélange de bio-conjugué LPC et d'autres lipides)
- S'incorporer dans des liposomes préformés.

Il est évident que ces systèmes lipidiques modèles ne permettent pas de mimer la complexité du contexte cellulaire, cependant ils devraient offrir des enseignements précieux quant aux propriétés et comportement physico-chimiques des bio-conjugués LPC.

Parmi tous les bio-conjugués LPC synthétisés (cf. Tableau V.1. du chapitre 3), ceux utilisés lors de cette étude sur systèmes lipidiques modèles sont les bio-conjugués 33K-9H, 33K-9AEM, 8K-4H et 8K-2H.

Ce chapitre sera composé de deux parties : dans la première, je présenterai les différentes optimisations visant à obtenir des liposomes fluorescents, puis, dans la seconde partie, j'évoquerai les différentes méthodes et tests réalisés afin d'étudier l'incorporation des bio-conjugués LPC au sein de liposomes préformés.

II. Bibliographie : Les systèmes lipidiques modèles.

Avant de présenter mes travaux, il me semble intéressant de revenir sur les différents systèmes lipidiques modèles rencontrés dans la littérature.

II.1. Les différents systèmes lipidiques modèles.

Il existe plusieurs types de systèmes lipidiques modèles qui sont très utilisés dans de nombreux domaines, notamment en biologie¹, et qui diffèrent les uns des autres par leur géométrie et par leur méthode de formation. On retrouve parmi ces systèmes les bicouches lipidiques supportées, les films de Langmuir-Blodgett et les liposomes.

Les liposomes (Figure II.1.) sont des systèmes basés sur les propriétés d'auto-assemblage que présentent certains lipides^{2,3,4}. Les systèmes résultants sont de type vésiculaire, c'est-à-dire présentant un cœur liquide (pouvant servir de réservoir pour l'encapsulation de principes actifs par exemple). C'est vers ce genre de système que nous avons choisi de nous orienter pour étudier les bio-conjugués LPC puisqu'il s'agit de systèmes modèles faciles à former. Je vais donc les présenter d'une manière plus détaillée dans la partie II.2. suivante.

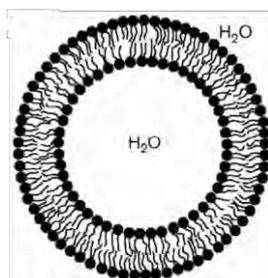


Figure. II.1. Représentation schématique d'un liposome⁵.

Il existe également d'autres systèmes très décrits dans la littérature : les couches de Langmuir. Il s'agit dans ce cas là également de monocouches de lipides situées à l'interface air/eau^{6,7,8}, et nécessitant l'utilisation d'un appareillage spécifique de type « balance de Langmuir ». Les lipides en solution aqueuse dans un bain se disposent à l'interface entre l'air et l'eau, de telle sorte que les têtes polaires soient dirigées vers la phase aqueuse et les chaînes grasses en direction de l'air. Deux barrières situées de part et d'autre du bain permettent de contrôler la pression appliquée latéralement sur les lipides de manière à former une monocouche compacte à la surface de l'eau⁹.

Enfin, concernant les bicouches lipidiques supportées, deux types sont décrits dans la littérature :

- Les bicouches planes : il s'agit de bicouches de lipides qui sont déposées à la surface de supports plans solides. La plus méthode la plus généralement utilisée pour la formation de ces bicouches supportées consiste à faire fusionner des liposomes à la surface d'un support solide traité, souvent du verre^{10,11}. Cette méthode de formation permet d'obtenir des systèmes modèles qui présentent une fine couche d'eau entre la surface du support et le feuillet inférieure de la membrane. Cette structure particulière permet à ces systèmes de conserver une fluidité qui peut mimer la fluidité des membranes cellulaires. Ainsi, ces systèmes modèles peuvent être utilisés pour étudier la dynamique des membranes et la formation de micro-domaines lipidiques¹². Ces systèmes sont également très utilisés pour étudier les interactions de type enzyme-substrat et ainsi comprendre le fonctionnement de certaines protéines membranaires. La Figure II.2. montre les différentes étapes de la formation des bicouches supportées planes par fusion de liposomes à la surface d'un support solide.

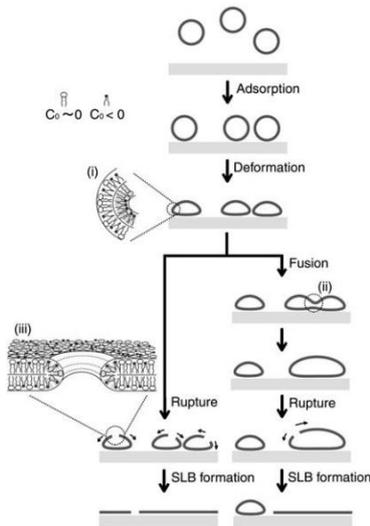


Figure II.2. Différents mécanismes possibles de formation des bicouches lipidiques supportées planes à partir de liposomes¹³.

Les bicouches de Langmuir-Blodgett sont également décrites dans la littérature. Cette technique comporte deux étapes (Figure II.3.) :

- Formation d'une monocouche compacte de lipides à l'interface air/eau en utilisant une balance de Langmuir
- Un support traité de façon à ce qu'il soit hydrophile est retiré du bain, à travers la monocouche de lipides. La tête polaire de ces derniers s'adsorbe à la surface du support créant ainsi une monocouche de lipides dont les chaînes alkyles sont dirigées en direction de l'air. La monocouche de lipides à l'interface air/eau du bain de la balance est ensuite compactée et le support est plongé dans le bain. Une seconde couche de lipides se forme à la surface du support par interactions hydrophobes entre les chaînes grasses.

Cette technique permet de contrôler parfaitement l'arrangement des couches au niveau moléculaire, contrairement à la formation des bicouches supportées formées par fusion de liposomes, rendant très facile la formation de domaines particuliers au sein des bicouches.

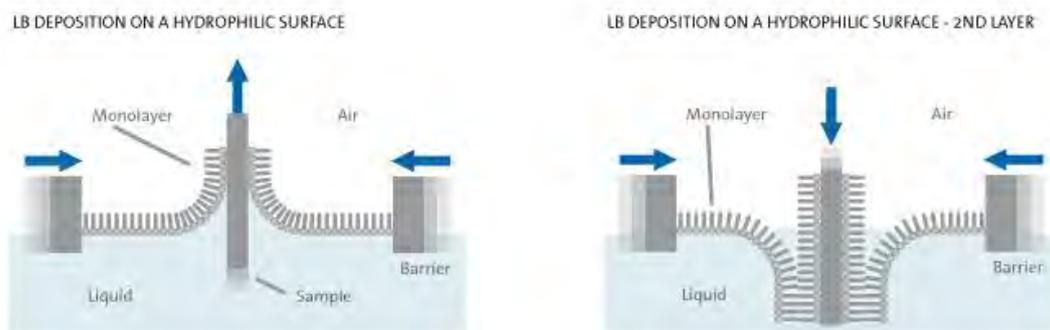


Figure II.3. Principe de formation des bicouches de Langmuir-Blodgett.
(Schéma tiré du site web KSV NIMA)

- Les bicouches lipidiques sphériques : il s'agit dans ce cas là de bicouches de lipides qui sont adsorbées à la surface de supports solides sphériques. Les types de systèmes décrits dans la littérature sont très souvent constitués de nanoparticules de silice

poreuses^{14,15}. En effet, les nanoparticules de silice sont généralement utilisées car, en plus d'être biocompatibles, elles présentent l'avantage de posséder des pores dont le diamètre peut être contrôlé. Ce contrôle du diamètre des pores est très intéressant, notamment lorsqu'il s'agit de créer des systèmes de relargage de principes actifs. Les principes actifs peuvent donc être encapsulés au sein de la nanoparticule de silice, puis la particule est recouverte d'une double-couche de lipides. Cette bicouche lipidique permet aux nanoparticules de traverser les membranes plasmiques de cellules et de délivrer le principe actif.

La Figure II.4. présente le principe de formation des nanoparticules de silice recouverte d'une double-couche de lipide, ainsi que l'internalisation au sein de cellules vivantes pour le relargage de principes actifs. Ces systèmes sont obtenus par fusion de liposomes chargés positivement à la surface de nanoparticules de silice chargées négativement. Après mise en contact des liposomes et des nanoparticules de silice, les liposomes fusionnent et recouvrent la surface des nanoparticules en formant une bicouche lipidique.

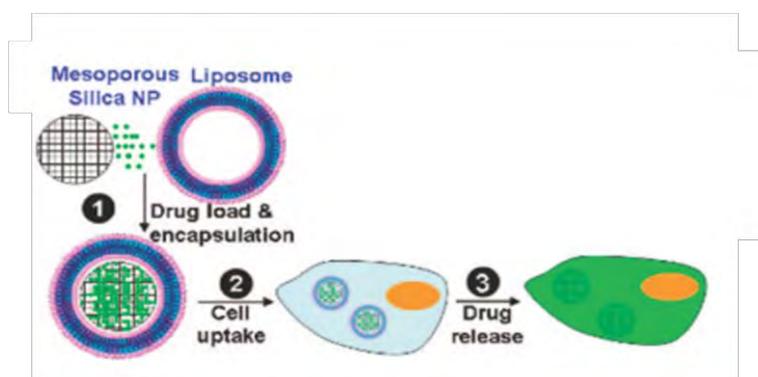


Figure II.4. Formation des nanoparticules de silice recouvertes d'une bicouche de lipides pour la délivrance de principes actifs¹⁵.

II.2. Les liposomes.

La nature amphiphile et la structure des lipides (cf. chapitre 1) leur permet de s'auto-assembler en solution afin de conduire à des systèmes vésiculaires réservoirs, sphériques : les liposomes^{16,17,4,3}.

Les liposomes sont les systèmes lipidiques modèles les plus utilisés dans de nombreux domaines comme la biochimie, la pharmacie et même la cosmétologie notamment comme vecteur de principe actif^{18,19}. Ce sont des vésicules de lipides, sphériques dont la surface est composée d'une (ou plusieurs) double-couche de lipides. Ces vésicules renferment un milieu aqueux, qui correspond au milieu dans lequel elles ont été formées, entouré d'une couronne hydrophobe, c'est pourquoi elles constituent un excellent système réservoir pour la délivrance de principes actifs hydrophiles^{18,20,17}. La présence de la couronne hydrophobe permet d'empêcher la diffusion des molécules « encapsulées » hors de la vésicule.

Les liposomes sont classés en fonction du nombre de bicouches lipidiques les composant et de leurs diamètres^{21,2,5} (les limites restant encore très discutées) :

- Vésicules Unilamellaires de Petites Tailles (Small Unilamellar Vesicles – SUV) : présentant une seule bicouche lipidique et un diamètre inférieur à 100 nm.
- Vésicules Unilamellaires de Grandes Tailles (Large Unilamellar Vesicles – LUV) : présentant une seule bicouche lipidique et un diamètre généralement égal à 100 – 200 nm et pouvant aller jusqu'à quelques micromètres.
- Vésicules Unilamellaires Géantes (GUV) : présentant une seule bicouche lipidique et un diamètre généralement supérieur à 5 μ M.
- Vésicules Multilamellaires (Multilamellar Vesicles – MLV) : vésicules présentant plusieurs bicouches de lipides.

Le Tableau II.1. résume les caractéristiques des différents types de liposomes, ainsi que leurs principales voies de formation.

Diverses techniques sont utilisées pour former les liposomes (SUVs, LUVs et GUVs), cependant, pour chaque type de liposomes, une technique est plus particulièrement utilisée que les autres.

En effet, en ce qui concerne la formation de SUVs, la sonication est la technique la plus souvent employée. Cette technique permet de former, via l'utilisation d'ultrasons, des liposomes unilamellaires à partir de MLVs (Figure II.5.)

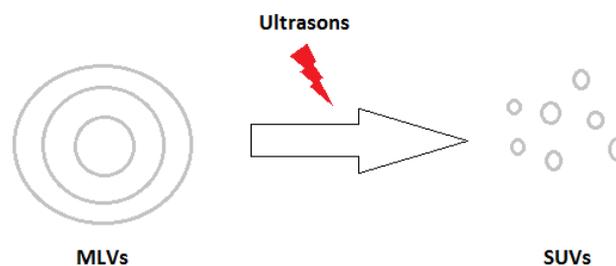


Figure II.5. Représentation schématique du principe de formation de SUVs par la technique de sonication.

L'ultrasonication permet l'obtention, de manière rapide, de liposomes de très petites tailles (jusqu'à 25 nm)²². Elle présente également l'avantage par rapport aux autres techniques (Tableau II.1.) de limiter les pertes de lipides causées par le passage des solutions à travers des faibles orifices, comme les pores des membranes d'extrusion par exemple.

Tableau II.1. Récapitulatif des caractéristiques, méthodes de formations et de caractérisation et les différentes applications des différents types de liposomes.

Type de système	Diamètre	Mode de formation	Mode de Caractérisation	Applications
SUV	< 100-200 nm	<ul style="list-style-type: none"> - Extrusion : Réhydratation d'un film de lipide. Extrusion de la solution à travers des membranes en polycarbonate de 50 ou 30 nm - Sonication²³ : Réhydratation d'un film de lipide. Sonication de la solution (bain à Ultrasons (US) ou sonde US). - Par Presse de French²⁴ : Réhydratation d'un film de lipide. Extrusion rapide de la solution à travers un petit orifice (aiguille). 	<ul style="list-style-type: none"> - Diffusion quasi-élastique de la Lumière - Microscopie Electronique à Transmission 	<ul style="list-style-type: none"> - Délivrance de principes actifs
LUV	Entre 200nm et quelques micromètres	<ul style="list-style-type: none"> - Extrusion²⁵ : (cf. SUV). Extrusion à travers des membranes de 100 nm et plus. - Evaporation en phase inverse²⁶ : Solubilisation d'un film de lipides dans un solvant organique (CHCl₃ ou Et₂O). Ajout de tampon aqueux et sonication (obtention d'un système monophasique stable) puis évaporation du solvant et dialyse des liposomes. - Par élimination de tensio-actifs²⁷ : Réhydratation d'un film de lipides avec un tampon aqueux. Agitation et dialyse. 	<ul style="list-style-type: none"> - Diffusion quasi-élastique de la Lumière - Microscopie Electronique à Transmission 	<ul style="list-style-type: none"> - Délivrance de principes actifs
GUV	> 5 µm	<ul style="list-style-type: none"> - Evaporation de solvants²⁸ : Solubilisation du film de lipides dans un solvant organique (CHCl₃). Ajout d'un tampon aqueux et évaporation du solvant. - Dialyse : Solubilisation du film de lipides dans un solvant organique miscible avec l'eau (MeOH). Dialyse contre un tampon aqueux. - Réhydratation de films obtenus par fusion de SUVs²⁹ : Formation d'un film de lipides à la surface d'un support par fusion de SUVs, puis réhydratation lente dans un tampon aqueux. - Electroformation³⁰ : cf. texte 	<ul style="list-style-type: none"> - Diffusion quasi-élastique de la Lumière - Microscopie Electronique à Transmission - Microscopie Optique 	<ul style="list-style-type: none"> - Etude de la dynamique membranaire (flip-flop, bourgeonnement) - Etude de la diffusion des lipides membranaires (vitesse des lipides, création de microdomaines lipidiques)

De même, de nombreuses méthodes sont décrites pour former les LUVs, parmi lesquels la technique d'extrusion. Cette technique consiste à faire passer une solution de lipides à travers une membrane poreuse en polycarbonate (Figure II.6.).

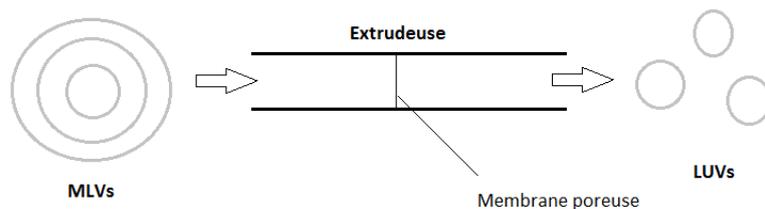
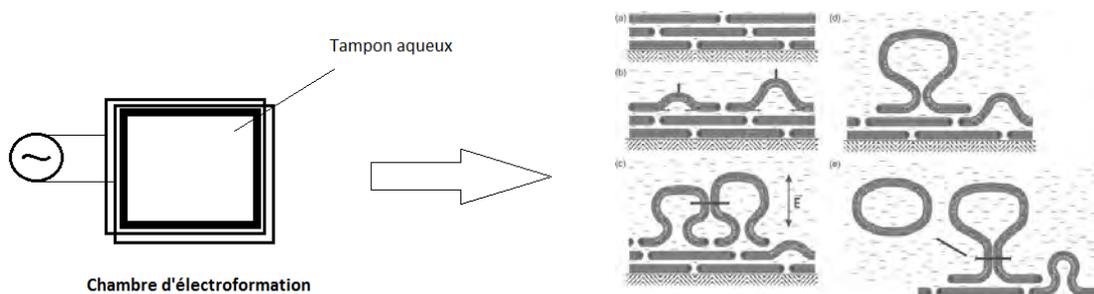


Figure II.6. Représentation schématique de la formation de LUVs par extrusion à travers une membrane poreuse.

Le passage à travers les pores de la membrane permet de transformer des MLVs, spontanément formés en solution, en LUVs (Figure II.6.). La technique d'extrusion est assez simple à mettre en œuvre et permet d'obtenir des LUVs de différents diamètres en fonction de la taille des pores de la membrane utilisée.

Enfin, concernant la formation de GUVs, la technique la plus souvent décrite dans la littérature reste la technique d'électroformation, où les GUVs sont formées par bourgeonnement à partir d'un film de lipides déposé sur des électrodes métalliques (Figure II.7.).



Puff, N. and Angelova, M.I.
Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes,
Vol 5, 2006, 173-228

Figure II.7. Représentation schématique de la formation de GUVs par électroformation.

C'est une méthode de formation de GUVs utilisant un champ électrique et décrite pour la première fois par Angelova et Dimitrov, où deux électrodes recouvertes d'un métal conducteur, initialement du platine, sont recouvertes par un film de lipides sec³¹. Ces électrodes, présentes dans une chambre hermétique, sont immergées dans un tampon aqueux et connectées à un générateur de tension qui va délivrer une tension de l'ordre de 0,2 V. Cette tension est ensuite augmentée progressivement jusqu'à une valeur de 1 à 4 V ce qui permet un bourgeonnement des GUVs à partir des films de lipides se trouvant sur les électrodes.

Cette technique permet la formation de liposomes plus homogènes en termes de taille et de forme que les autres techniques (Tableau II.1.), qui peuvent conduire à des GUVs de tailles différentes et surtout de formes hétérogènes.

Les liposomes obtenus par ces différentes techniques présentent donc des tailles différentes, ce qui va en grande partie guider les utilisations qui en seront faites.

Les LUVs, qui sont les systèmes les plus stables, et les SUVs sont très utilisées pour la délivrance de principes actifs^{2,21}, contrairement aux GUVs qui présentent des diamètres beaucoup plus grands, parfois de l'ordre du diamètre d'une cellule vivante. Ces dernières ne sont pas très stables et n'ont pas la capacité d'être endocytées ou de fusionner sans dommage avec la membrane plasmique des cellules.

Concernant les techniques employées pour caractériser les liposomes unilamellaires, seules les GUVs peuvent être visualisées par microscopie optique³¹ puisqu'elles présentent des tailles supérieures à la limite de résolution des microscopes optique (≈ 250 nm), contrairement aux LUVs et SUVs.

III. Formation de liposomes fluorescents à partir d'un mélange de lipides et de bio-conjugués.

L'objectif des tests réalisés est de vérifier la possibilité de formation de liposomes fluorescents à partir d'un mélange initial de lipides et de bio-conjugués LPC (Figure III.1.), en utilisant certaines des techniques décrites précédemment : l'extrusion, la sonication et l'électroformation (cf. partie II.).

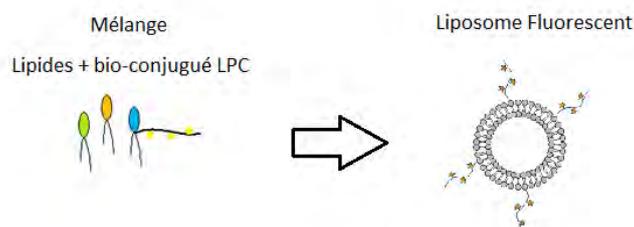
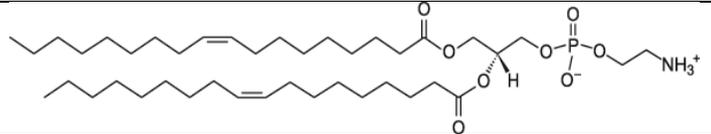
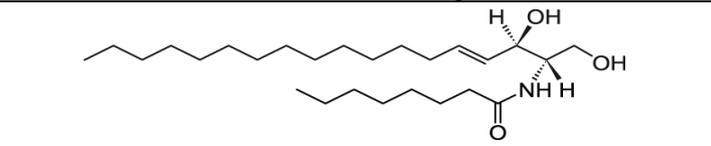
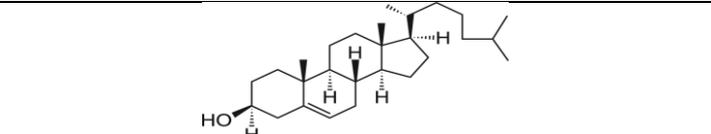


Figure III.1. Représentation schématique de la stratégie de formation des liposomes fluorescents à partir d'un mélange de lipides et de bio-conjugué LPC.

Tableau III.1. Structure des lipides utilisés lors de cette étude.

Lipide	Structure	Charge
EggPC*		zwitterionique
Brain PS*		Négative
DOPC		zwitterionique

DOPE		Zwitterionique
C8-céramide		Neutre
Cholestérol		Neutre

* Egg PC et Brain PS : mélanges de lipides de type PC et PS respectivement constitués de chaînes alkyles variables.

III.1. Formation de LUVs et SUVs par extrusion.

III.1.1. Principe de formation et optimisation.

Lorsqu'un conjugué Lipide-Polymère est inclus dans la formulation, la méthode de formation de LUVs par extrusion est la méthode la plus souvent utilisée^{32,33}, comme par exemple pour la formation de LUVs comportant des lipides PEGylés³⁴. L'utilisation de membranes en polycarbonate présentant des pores de différentes tailles permet d'obtenir des liposomes de tailles variables, et la présence de la chaîne PEG à la surface des LUVs permet à la fois d'augmenter la stabilité des liposomes (en évitant les phénomènes de fusion), mais également d'augmenter le temps de vie des liposomes dans le sang et empêche leur élimination par le système réticuloendothélial ce qui maximise les chances de délivrance des principes actifs aux organes cibles^{27,35}.

Nous nous sommes donc inspiré de cette technique afin de former des LUVs fluorescentes comportant des bio-conjugués lipidiques fluorescents.

Le principe consiste à faire passer une solution de lipides (et de bio-conjugués LPC) à travers une membrane poreuse dont le diamètre des pores est contrôlé et connu, en utilisant une mini-extrudeuse (Figure III.2.).



Figure III.2. Mini-extrudeuse Avanti Polar et son support chauffant utilisés pour la formation des liposomes. (photo Avanti Polar).

Les premiers tests de formation de LUVs fluorescentes (10 mg.mL^{-1} de lipides) ont été réalisés à température ambiante avec des membranes de porosité 100 nm et un mélange de composition EggPC/BrainPS (80/20 – %massique) comportant 1% molaire de bio-conjugués LPC. Cependant, des difficultés d'extrusion lors de l'utilisation des bio-conjugués 33K-9H et 33K-9AEM (colmatage des membranes) n'ont pas permis la formation des liposomes fluorescents. Etant donné que ce genre de problème n'est pas rencontré lorsqu'il s'agit d'extruder un mélange de lipides classiques (type PC-PS), cela suggère qu'il est lié à la présence des bio-conjugués. Plusieurs hypothèses peuvent par conséquent être émises :

- Formation d'agrégats avec les bio-conjugués qui colmatent les membranes : Même en pré-filtrant la solution de lipides et de bio-conjugués avant de réaliser l'extrusion à travers une membrane PVDF de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$, l'extrusion reste impossible.
- Taille de la chaîne polymère trop importante : Dans la littérature, des LUVs composées de conjugués PEG-lipides sont formées par extrusion sans problèmes rapportés, cependant la masse molaire moyenne des chaînes PEG utilisées est généralement comprise entre 900 et 5000 g.mol^{-1} ⁽³⁴⁾. Dans notre cas, la chaîne polymère présente une taille six fois plus importante. Néanmoins une chaîne polymère de $33\,000 \text{ g.mol}^{-1}$ présente un rayon de giration d'environ 6 nm, il est donc difficile de penser que le bio-conjugué ne puisse pas passer à travers des pores de 100 nm alors que le diamètre de la pelote statistique ne dépasse pas 15 nm. Des tests d'extrusion auraient pu être réalisés dans le but de vérifier cette influence de la taille de la chaîne polymère, mais lors de la mise en place de ces tests aucun autre bio-conjugué LPC n'était disponible.
- Structure du chromophore : Le chromophore couplé sur le polymère est hydrophobe, il est donc possible que les bio-conjugués LPC s'adsorbent sur les membranes d'extrusion. Cette hypothèse reste la plus plausible, d'autant qu'après filtration des solutions sur filtre PVDF $0,45 \text{ }\mu\text{M}$ la membrane reste teintée rose tout comme les membranes utilisées lors des tests d'extrusion.

Les conditions expérimentales pourraient également avoir une influence sur l'extrusion. Le protocole de formation des LUVs a donc été optimisé avec Yi-Chun Lin lors de son stage de Master en variant différents paramètres :

- La température d'extrusion : Les lipides peuvent se présenter sous différents états parmi lesquels les phases gel et fluide ^{36,37}. Dans la phase gel, les lipides sont ordonnés et il existe des liaisons faibles de types Van der Waals et hydrogènes entre les chaînes alkyles des lipides. En augmentant la température au-dessus d'une de leur « température de transition de phases » il est possible d'augmenter la fluidité des chaînes alkyles des lipides. En ce qui concerne les lipides de type dipalmitoylphosphoethanolamine (DPPE) comme ceux constituant les bio-conjugués LPC, cette température est de l'ordre de $60\text{-}65^\circ\text{C}$. Or la présence d'une chaîne polymère au niveau de la tête polaire du lipide aurait tendance à diminuer cette température de

transition, donc, il pourrait être possible de favoriser l'extrusion en chauffant le mélange au-dessus de cette température (50°C).

- Le volume de la solution extrudée (la concentration restant identique) : Durant sa thèse, Elise Hamard-Péron avait observé, dans le cas des liposomes PC/PS, que l'extrusion était facilitée lorsque le volume était doublé (50 → 100 µL). Une augmentation du volume d'extrusion (100 → 200 µL) permettrait peut-être de faciliter l'extrusion des mélanges lipides+bio-conjugués LPC.
- La concentration en lipides et en bio-conjugué LPC : Une diminution de la concentration en lipides, et en bio-conjugués notamment, pourrait faciliter le passage à travers les pores des membranes d'extrusion. C'est pourquoi la concentration en lipides a été diminuée de moitié (10 mg.mL⁻¹ à 5 mg.mL⁻¹). Nous avons également diminué la quantité molaire de bio-conjugué introduit dans la formulation, de 1% à 0,1% molaire afin de travailler en conditions diluées tout en conservant un marquage fluorescent efficace.
- Les cycles congélation/décongélation : Dans la littérature, plusieurs auteurs décrivent une étape de congélation/décongélation des solutions avant extrusion. Le but de ces cycles est de réduire la taille des vésicules obtenues après réhydratation des films de lipides^{27,38}. Le fait de congeler brutalement les vésicules (généralement à l'azote liquide) puis de les décongeler en les plongeant dans une eau à 37°C permet de réduire le nombre de bicouches lipidiques de surface des systèmes multilamellaires (MLV). Des séquences de 6 ou 12 cycles ont donc été ajoutées au protocole.

Ces différents tests d'optimisation ont finalement permis de correctement extruder la solution de lipides et de bio-conjugués, même en utilisant le bio-conjugué LPC composé de la chaîne polymère la plus longue (33K-9H). Il a été mis en évidence que le facteur prépondérant est la température d'extrusion : Augmentation de la température >> Diminution de la concentration en lipides > Augmentation du volume d'extrusion.

Une augmentation de la température d'extrusion (50°C) au-dessus de la température de transition des lipides de type dipalmitoylé (42°C) permet donc d'augmenter la fluidité des chaînes alkyles des lipides qui constituent les bio-conjugués LPC et de faciliter leur passage à travers les membranes PC. On peut également penser que ce paramètre joue un rôle sur la mobilité de la chaîne polymère des bio-conjugués en solution facilitant le passage à travers la membrane d'extrusion.

Le protocole optimisé pour la formation de LUVs fluorescentes est le suivant :

- Concentration en lipides : 10 mg.mL⁻¹
- Volume d'extrusion : 200 µL
- Température d'extrusion : 50°C
- Nombre de cycles congélation/décongélation : 12

Tableau III.2. Récapitulatif des différentes conditions et observations réalisées lors des tests de formation des LUVs fluorescentes par extrusion (membranes 100 nm – 0,1% molaire en bio-conjugué 33K-9H – 10 mg.mL⁻¹ en lipides) ainsi que le diamètre des vésicules obtenues mesuré par DLS (dilution ×6 dans PBS 1X de la solution de liposomes).

Bio-conjugués	M _n chaîne polymère (g.mol ⁻¹)	Volume d'extrusion	Température d'extrusion	Cycles congélation/dé congélation	Pression lors de l'extrusion	Diamètre (nm)
33K-9H	33 200	100 µL	25 °C	0	+++++++	-
33K-9AEM		100 µL	25 °C	0	+++++++	
33K-9H	33 200	200 µL	50 °C	12	+++	128

* La ligne surlignée en bleu correspond aux tests réalisés en utilisant le protocole non optimisé

Comme le montre le Tableau III.2., ce protocole optimisé permet de grandement faciliter l'extrusion de la solution de lipides et d'obtenir des LUV marquées par le bio-conjugué dont la taille mesurée par diffusion dynamique de la lumière (DLS) est de 128 nm dans le cas du conjugué 33K-9H. Ce résultat est très reproductible, les liposomes formés dans ces conditions présentent généralement des diamètres compris entre 100 et 130 nm.

D'autres LUVs ont également été formés en utilisant le protocole optimisé mais à partir de bio-conjugués LPC présentant des tailles de chaînes polymères plus faibles, de l'ordre de 8 000 g.mol.⁻¹ Tableau III.3.

Tableau III.3. Récapitulatif des différentes conditions et observations réalisées lors des tests de formation des LUVs fluorescentes par extrusion (membranes 100 nm – 0,1% molaire en bio-conjugués – 10 mg.mL⁻¹ en lipides) ainsi que le diamètre des vésicules obtenues mesuré par DLS (dilution ×6 dans PBS 1X de la solution de liposomes).

Bio-conjugués	M _n chaîne polymère (g.mol ⁻¹)	Volume d'extrusion	Température d'extrusion	Cycles congélation/dé congélation	Pression lors de l'extrusion	Diamètre (nm)
8K-4H	7 900	200 µL	50 °C	12	+	120
8K-2H		200 µL	50 °C	12	+	120

Dans ce cas là également des liposomes de 120 nm de diamètre ont été obtenus. Lors de la formation des LUVs une légère pression a été ressentie lors de l'extrusion, bien

inférieure à celle ressentie lors de l'extrusion du bio-conjugué 33K-9H. Ceci suggère que le paramètre de taille de la chaîne polymère joue effectivement un rôle important lors de l'extrusion à travers les pores de la membrane.

Les conditions optimisées ont ensuite été utilisées pour tester la formation de SUVs fluorescentes par extrusion, en changeant le diamètre des pores des membranes d'extrusion. Dans ce cas là, le mélange lipides+bio-conjugués LPC a été extrudé à travers des membranes en polycarbonates de 50 nm, puis les liposomes ont été analysés par diffusion dynamique de la lumière. Les résultats sont présentés dans le Tableau III.4.

Tableau III.4. Récapitulatif des différentes conditions et observations réalisées lors des tests de formation des SUVs fluorescentes (membranes 50 nm – 0,1% molaire en bio-conjugués – 10 mg.mL⁻¹ en lipides) ainsi que le diamètre des vésicules obtenues mesuré par DLS (dilution $\times 6$ dans PBS 1X de la solution de liposomes).

Bio-conjugués	M _n chaîne polymère (g.mol ⁻¹)	Volume d'extrusion	Température d'extrusion	Cycles congélation/dé congélation	Pression lors de l'extrusion	Diamètre (nm)
33K-9H	33 200	200 μ L	50 °C	12	++++	95
8K-4H	7 900	200 μ L	50 °C	12	++	94
8K-2H		200 μ L	50 °C	12	++	91
PC/PS	-	200 μ L	50 °C	12	-	137 (LUVs)

L'utilisation du protocole optimisé a permis de former des SUVs fluorescentes par extrusion. Une pression plus forte que dans le cas de la formation des LUVs a été ressentie lors de l'extrusion. Cette pression semblait également plus élevée dans le cas du bio-conjugué le plus long (33K-9H) par rapport à ceux de masses molaires inférieures. De plus, une légère perte de coloration des solutions a été observée, comme dans le cas de la formation des LUVs, même si les solutions de vésicules étaient dans tous les cas toujours très colorées en rouge.

Le diamètre des SUVs a ensuite été déterminé par DLS, ce qui nous a permis de mettre en évidence qu'une fois encore le diamètre mesuré des vésicules est plus important que celui des pores de la membrane d'extrusion. Les SUVs obtenues présentent même un diamètre (\approx 90 nm) presque deux fois supérieur au diamètre des pores de la membrane.

La formation de liposomes fluorescents (SUVs et LUVs) par la technique d'extrusion à travers des membranes en polycarbonate a donc nécessité d'optimiser le protocole classiquement utilisé. Parmi tous les paramètres étudiés, la température s'est avérée être le paramètre ayant le plus d'impact sur l'extrusion des solutions de lipides et de bio-conjugués LPC. En effet, une augmentation de la température d'extrusion permet à la fois d'augmenter

la fluidité de certains lipides mais permet également d'augmenter la mobilité des chaînes polymères qui composent les bio-conjugués LPC, rendant l'extrusion plus facile.

III.1.2. Visualisation par microscopie optique de fluorescence de la formation des LUVs par extrusion.

La taille des LUVs ne leur permet généralement pas d'être bien résolues en microscopie optique (limites de résolution de l'ordre de 200 à 250 nm), au contraire des techniques de microscopie électronique (MET, MEB) qui bénéficient de meilleures résolutions.

Néanmoins, la visualisation des liposomes fluorescents, même non résolus, pourrait nous apporter des informations sur l'incorporation des bio-conjugués LPC au sein de liposomes. C'est pourquoi, des clichés de microscopie confocale ont été réalisés sur une solution de LUVs EggPC/BrainPS (80/20 - %massique) + 0,1% molaire de bio-conjugué 33K-9H, de 110 nm de diamètre (mesurée par DLS) formées par extrusion à travers une membrane de 100 nm (Figure III.3.).

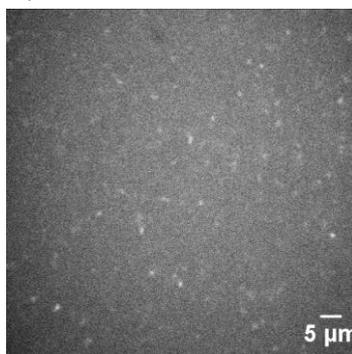


Figure III.3. Cliché de microscopie confocale de fluorescence (63×) des LUVs EggPC/PS (80/20 - %massique) + 0,1% molaire 33K-9H formées par extrusion (membrane 100 nm).
(Excitation = 491 nm / filtre émission = 675/67)

De nombreux spots fluorescents et très mobiles sont visualisés sur un fond fluorescent continu. Ces clichés sont très différents de ceux obtenus avec le même bio-conjugué LPC seul en solution qui est probablement responsable du fond continu fluorescent observé. Les spots plus fluorescents correspondent donc probablement à des LUVs fluorescentes. Etant en-dessous de la limite de résolution du microscope, on comprend qu'il est difficile d'affirmer que chaque spot fluorescent correspond à une LUV unique. Il peut s'agir de deux ou plusieurs LUVs très proches les unes des autres, à une distance inférieure à la limite de résolution.

Ces observations nous permettent donc de suspecter fortement la formation des LUVs fluorescentes par extrusion, puisque les spots fluorescents observés par microscopie ne sont pas assez gros et surtout trop mobiles pour correspondre à des agrégats de bio-conjugués en solution. La présence d'un fond fluorescent continu suggère également que les bio-conjugués en solution n'ont pas tous intégrés des liposomes.

III.2. Formation de SUVs par sonication.

La technique d'extrusion à travers des membranes en polycarbonate de 50 nm a permis de former des SUVs d'un diamètre compris entre 80 et 100 nm (cf. partie III.1.).

Concernant la formation de SUVs, la technique de sonication est celle qui est le plus reportée dans la littérature, puisqu'elle permet d'obtenir des vésicules de plus petites tailles. Cette méthode conduit généralement à deux populations de liposomes : une présentant des diamètres très importants et une autre de SUVs. L'utilisation de la centrifugation permet ensuite de séparer les liposomes^{39,23} : les SUVs restent en suspension dans le surnageant alors que les vésicules de plus gros diamètres sédimentent.

Deux types d'appareillage sont principalement utilisés: les bains à ultrasons (pendant 2 à 3 heures) ou les sondes à ultrasons, plus puissantes (pendant 5 à 45 minutes)^{40,23}. Des diamètres de liposomes d'une vingtaine de nanomètres peuvent être obtenus.

En ce qui nous concerne, nous avons utilisé le Bioruptor®Plus (UCD-300) de Diagenode (Figure V.1.) généralement utilisé pour cisailer la chromatine et l'ADN et délivrant une puissance de 320 W soit trois fois supérieure à celle délivrée par un bain à ultrasons classique. Cet appareil ne permet pas de réaliser une sonication en continue sur des temps longs. De plus, il est également recommandé de travailler à 4°C afin de permettre un refroidissement de l'aimant.

Nous avons donc réalisé la sonication de nos échantillons en soumettant les suspensions de lipides à six cycles « ON / OFF » de 60 secondes chacun à 320 W et à 4°C, entrecoupés de passages dans un bain à 60°C, au-dessus de la température de transition des lipides, dans le but d'augmenter la fluidité des lipides couplés aux bio-conjugués LPC et la mobilité des bio-conjugués eux-mêmes.

Cette technique de formation nous a permis d'obtenir des SUVs dont les tailles les plus faibles avoisinaient les 60 nm, ce que nous n'avions pas réussi à atteindre par extrusion (porosité 50nm). De plus, le fait de ne pas extruder évite la perte éventuelle de lipides et de bio-conjugués LPC par adsorption sur les membranes d'extrusion. On peut supposer que la grande majorité des lipides et bio-conjugués engagés sont intégrés dans des liposomes fluorescents.

Tableau III.5. Paramètres expérimentaux et diamètres des SUVs EggPC/BrainPS fluorescentes obtenues par sonication. EggPC/BrainPS - 10 mg.mL⁻¹ (80/20 - %massique + 0,1% molaire de conjugué).

Bio-conjugués	Mn chaîne polymère (g.mol ⁻¹)	Nombre moyen Chromo/Chaîne	Nombre de cycles de sonication	Température de sonication	Diamètre (nm)
33K-9H	33 200	9	6 × 6	4°C	70
			12 × 6		64

Le Tableau III.5. présente les différents paramètres expérimentaux utilisés pour la formation de SUVs EggPC/PS fluorescentes par sonication ainsi que les diamètres des liposomes obtenus par DLS.

Grâce à cette technique de formation, des SUVs fluorescentes présentant des diamètres de 70 et 60 nm ont pu être obtenues. Le fort cisaillement des liposomes induit par la sonication permet de diminuer la taille des vésicules et ainsi d'obtenir des SUVs dont le diamètre est inférieur à celui des SUVs obtenues par extrusion.

D'autre part, le fait d'augmenter le nombre de cycles de sonication de 36 à 72 ne permet de diminuer que légèrement le diamètre des vésicules formées.

De nouveaux essais de formation de SUVs par sonication ont par la suite été réalisés en suivant le même protocole et en variant la composition en lipides (Tableau III.6).

Tableau III.6. Récapitulatif des caractéristiques des liposomes de différentes compositions formés par sonication (séries de 6 cycles entrecoupées de période d'incubation des liposomes dans un bain à 60°C pendant 15 à 20 min – diamètres mesurés par DLS après dilution $\times 6$ dans du PBS 1X de la solution de liposomes).

Type de Système	Composition (% massique - lipides)* (% molaire – conjugué) ⁱ	Mode de formation	Diamètre (nm)
SUV	EggPC/PS/conj. 80/20/0,1	Sonication 12 \times 6 cycles	43
SUV	EggPC/conj. 100/0,1	Sonication 12 \times 6 cycles	42
SUV	DOPC/C8/conj. 80/20/0,1	Sonication 12 \times 6 cycles	61
SUV	DOPC/DOPE/conj. 75/25/0,1	Sonication 12 \times 6 cycles	74
SUV	DOPC/Cholest/conj. 75/25/0,1	Sonication 12 \times 6 cycles	61
LUV	DOPC/C8/DOPE/Cholest/conj. 50/20/25/25/0,1	Sonication 12 \times 6 cycles	154

* Le bio-conjugué LPC utilisé est le conjugué 33K-9H

Des SUVs présentant des diamètres de l'ordre de 40 nm dans le cas de mélanges PC/PS ou PC seul ont été formées, soit deux fois plus petites que celles obtenues par extrusion. De plus, les différents tests réalisés ont permis de mettre en évidence le fait qu'il est difficile de former des liposomes dont les tailles sont conformes avec les tailles des SUVs lorsque beaucoup de lipides sont introduits dans la formulation.

Ceci est particulièrement visible dans le cas des liposomes de 154 nm. En effet, les liposomes obtenus à partir d'un mélange de DOPC, C8-céramide, DOPE et cholestérol

ⁱ Soit 4% massique en bio-conjugué

présentent des diamètres de 154 nm alors que dans les mêmes conditions de formation, des SUVs de 40 à 75 nm sont obtenues. Afin d'expliquer ce phénomène, deux explications peuvent être fournies :

- La présence dans la formulation de DOPE, qui est connu pour être un lipide conduisant préférentiellement à des structures lipidiques planes ou hexagonales inverses (H_{II})^{41,42,43}. Ce lipide ne permet donc pas de favoriser la formation de liposomes (cf chapitre 5 III.4.2.2. pour explication plus détaillée)
- On peut aussi imaginer que la présence à la fois de DOPE, de C8-céramide, voire de cholestérol favorise la fusion entre liposomes conduisant à des vésicules de diamètres augmentés, puisqu'en effet ces lipides sont connus pour présenter des propriétés fusogènes^{44,45}.

Néanmoins, la formation de SUVs DOPC/DOPE de 74 nm laisse penser que la première hypothèse émise ne semble pas valable. La seconde explication reste donc la plus plausible.

III.3. Formation de GUVs par électroformation.

L'électroformation est une technique qui permet de former des GUVs en soumettant un film de lipides à un champ électrique (cf. II.2.). La première étape consiste donc à former un film de lipide et de bio-conjugué à la surface d'électrodes métalliques (dans notre cas il s'agit de lame en verre recouverte d'ITO – Indium Tin Oxyde). Les GUVs sont donc formées par bourgeonnement à partir des films lipidiques déposés à la surface des électrodes (Figure III.4.).

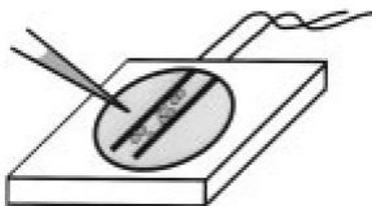


Figure III.4. Représentation schématique du système utilisé pour la formation de GUVs par électroformation³¹.

Ces électrodes, présentes dans une chambre hermétique, sont immergées dans un tampon aqueux et connectées à un générateur de tension. Les GUVs bourgeonnent à partir des films de lipides se trouvant sur les électrodes (cf. Partie Expérimentale).

Des premiers tests d'électroformation de GUVs à base d'EggPC ou de DOPC et contenant 1% molaire de bio-conjugué LPC ont été réalisés en collaboration avec Cyril Favard (cf. Partie Expérimentale), puis la microscopie optique a été utilisée afin de mettre en évidence la formation de vésicules incorporant le bio-conjugué lipidique fluorescent.

Pour réaliser des observations de microscopie confocale entre lame et lamelle, une petite chambre de visualisation a été fabriquée (cf. Partie Expérimentale) afin d'éviter une diffusion rapide des GUVs dans le volume. Cette méthode particulière de préparation des échantillons a déjà fait ses preuves en ce qui concerne la visualisation de GUVs fluorescentes ou non, obtenues avec de petits lipides commerciaux.

Plusieurs essais de visualisation en microscopie entre lame et lamelle ont été réalisés avec des GUVs préparées en présence des bio-conjugués LPC. Cependant, dans tous les cas, aucune vésicule, même non fluorescente, n'a été observée, aussi bien en microscopie confocale qu'en microscopie à champ large. Quelques agrégats fluorescents et un tapis de bio-conjugué fluorescent adsorbé à la surface de la lame de verre ont été observés. De plus, un test de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) a montré que le film de bio-conjugué adsorbé à la surface de la lame n'était pas dynamique puisque la zone photoblanchit n'a pas retrouvée sa fluorescence, même après plusieurs minutes, suggérant que les bio-conjugués LPC sont adsorbés à la surface de la lame de verre et ne peuvent pas diffuser.

Des GUVs étant observées dans les mêmes conditions avec des lipides conventionnels, cela suggère que les difficultés rencontrées sont liées à la présence et à la structure du bio-conjugué.

Deux hypothèses ont donc été avancées afin d'expliquer les problèmes rencontrés:

- Les GUVs ne sont pas formées ou ne sont pas stables en présence de bio-conjugué. Ceci pourrait par exemple être expliqué par une très forte adsorption des lipides en présence du bio-conjugués sur les lames de verre composant la chambre d'électroformation.
- Des GUVs sont formées par électroformation mais leur visualisation entre lame et lamelle n'est pas possible.

Afin de tester ces hypothèses, de nouveaux essais ont été réalisés en utilisant la microscopie en champ sombre (encore appelée microscopie à fond noir)^{46,47}. Cette technique permet en effet d'augmenter le contraste pour des échantillons, comme ceux de liposomes, pour lesquels la différence d'indice de réfraction avec le milieu aqueux environnant est faible. Lorsqu'aucun objet n'est dans le champ de l'objectif, le fond est totalement noir, alors que lorsqu'un objet croise les rayons lumineux, ceux-ci sont diffusés et sont captés par l'objectif, ce qui permet de voir nettement l'objet formé par contraste entre le fond noir et les rayons diffusés par l'échantillon, augmentant ainsi le contraste de l'image formée.

En ce qui concerne la préparation de l'échantillon pour la microscopie, une goutte de solution de GUVs est déposée après électroformation à la surface d'une lame en verre, contrairement à la microscopie confocale (chambre entre lame et lamelle).

Dans un premier temps, des GUV ont été formées uniquement à partir de DOPC (Figure III.5.).

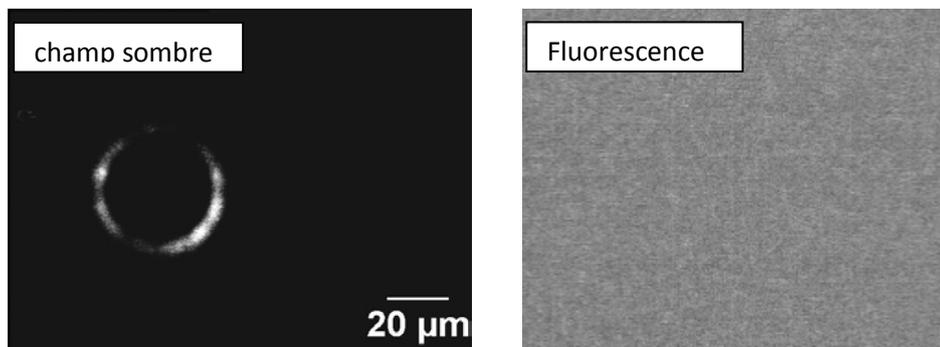


Figure III.5. Cliché de microscopie en champ sombre (à gauche) et en fluorescence (à droite) des GUVs de DOPC (non fluorescentes) formées par la méthode d'électroformation.
(Fluorescence : Filtre TX2 : Excitation BP 560/40 – Emission BP 645/75)

L'information importante des observations réalisées en champ sombre et en fluorescence est qu'il a été confirmé que des GUVs sont effectivement formées en utilisant le protocole habituel. L'erreur expérimentale peut donc être écartée.

De nombreuses vésicules très monodisperses en termes de taille (30 à 40 μm) ont pu être clairement visualisées en champ sombre. Ces GUVs présentaient une mobilité assez importante, ce qui n'a toutefois pas empêché de réaliser des clichés très intéressants. De plus, comme le montre la figure III.6., les GUVs formées ne présentent pas de fluorescence dans la zone d'émission des bio-conjugués (rouge lointain).

La microscopie optique telle que la microscopie en champ sombre permet de visualiser les GUVs sous forme d'anneaux et non sous forme de disques pleins (cf. annexe 3 pour les explications).

Après avoir vérifié la formation de GUV de DOPC par la méthode d'électroformation, des tests ont été réalisés avec un mélange de DOPC et de bio-conjugué 8K-2H (0,1% molaire par rapport aux lipides totaux) (Figure III.6.). Le bio-conjugué 8K-2H a été choisi afin de perturber au minimum la formation des GUVs puisqu'il possède une chaîne polymère courte et très peu de chromophores.

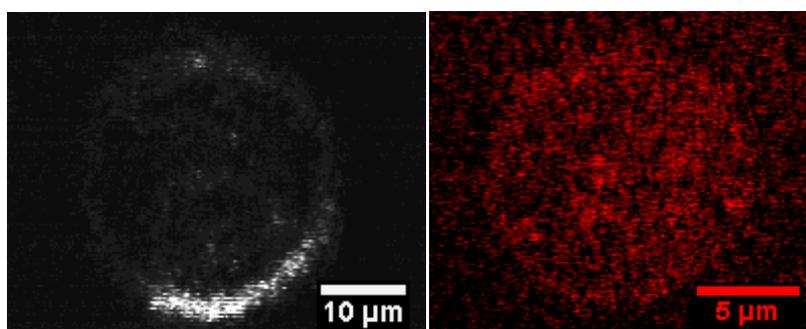


Figure III.6. Clichés de microscopie en champs sombre (à gauche) et en fluorescence (à droite) des GUVs DOPC fluorescentes obtenues à partir d'un mélange initial DOPC/8K-2H.
(Fluorescence : Filtre TX2 : Excitation BP 560/40 – Emission BP 645/75)

Contrairement aux observations entre lame et lamelle par microscopie confocale, la microscopie en champ sombre (dépôt simple sur une lame) a permis d'observer un grand nombre de GUVs. De plus, les observations en fluorescence correspondantes ont confirmés le marquage des vésicules par les bio-conjugués. Les GUVs obtenues présentent un diamètre un peu moins élevé que les vésicules obtenues précédemment, généralement compris entre 15 et 30 μm .

Les images obtenues ne sont pas très nettes. La qualité des images, notamment de fluorescence, n'a pu être améliorée, et ce, même après dilution du milieu qui avait pour but d'améliorer le contraste entre les GUVs fluorescentes et le bio-conjugué en solution. En effet, l'objectif était d'éliminer par dilution le maximum de bio-conjugué libre afin d'augmenter le contraste entre les GUVs fluorescentes et le milieu.

Ces tests ont permis de mettre en évidence à la fois :

- La possibilité de formation des GUVs en présence des bio-conjugués LPC : Des GUVs fluorescentes assez homogènes en taille ont été obtenues.
- L'importance de la préparation de l'échantillon pour la visualisation par microscopie : L'injection des GUVs fluorescentes entre lame et lamelle peut entraîner une déstabilisation des GUVs après adsorption des chromophores présents sur les polymères à la surface des lames et lamelles en verre. Avec la pression induite par l'injection de la solution, il est possible que cela crée une sorte de cisaillement des GUVs adsorbées. Cependant, le dépôt d'une goutte de solution sur une lame leur permet de conserver leur intégrité.

La technique de l'électroformation s'est avérée être une technique rapide, simple et efficace permettant de former des GUVs assez homogènes en termes de tailles et de formes, visualisées très facilement par la technique de microscopie en champ sombre. De plus, les tests réalisés ont permis de mettre en évidence le fait que la présence des bio-conjugués LPC en mélange avec les lipides ne gêne pas la formation des liposomes, puisque des GUVs fluorescentes ont été obtenues.

Les GUVs constituent donc bien un système de choix permettant de visualiser par microscopie de fluorescence l'interaction entre les bicouches lipidiques et les bio-conjugués LPC.

III.4. Conclusion.

Un des objectifs des tests réalisés avec des systèmes lipidiques modèles était de vérifier la possibilité de formation de liposomes fluorescents à partir de mélanges de lipides et de bio-conjugués LPC.

Après optimisation, la formation par extrusion de liposomes de types LUVs et SUVs s'est avérée possible notamment en augmentant la température d'extrusion au-dessus de la température de transition de phase des lipides dipalmitoyle qui sont localisés en extrémité des bio-conjugués LPC, ce qui a pour effet d'augmenter la fluidité des lipides, mais

également d'augmenter la mobilité et la flexibilité des bio-conjugués et ainsi de faciliter leur passage à travers les membranes d'extrusion.

Des SUVs ont également été formées en utilisant cette fois-ci une méthode de sonication. Cette technique nous a permis de former des liposomes de plus petits diamètres que ceux obtenus par la méthode d'extrusion : dans le cas de la sonication, des SUVs présentant des diamètres de l'ordre de 40 nm ont été obtenues alors que dans le cas de l'extrusion à travers des membranes de 50 nm, les diamètres des SUVs sont compris entre 80 et 95 nm.

En ce qui concerne les GUVs, la méthode d'électroformation a été utilisée. Cette technique nous a permis de former des liposomes fluorescents de diamètres compris entre 15 et 30 μm que nous avons ensuite réussi à visualiser par microscopie en champ sombre couplée à une source d'excitation de fluorescence. Cette visualisation a nécessité une optimisation de la préparation des échantillons (dépôt d'une goutte sur une lame de verre) de telle sorte que les GUVs ne soient pas déstabilisées et détruites lors de l'injection dans la chambre formée entre lame et lamelle utilisée pour la visualisation de GUVs non fluorescentes.

IV. Incorporation des bio-conjugués au sein de liposomes préformés.

Dans la partie III., il a été mis en évidence la possibilité de former des liposomes (SUVs, LUVs et GUVs) fluorescents en utilisant différentes méthodes : extrusion, sonication et électroformation.

Le second objectif des tests avec des systèmes lipidiques modèles a ensuite été de confirmer la capacité des bio-conjugués LPC à s'insérer dans des bicouches lipidiques préformées. Afin de répondre à cette question, une approche différente de celle utilisée précédemment a été employée, dans laquelle une solution aqueuse de bio-conjugués a été cette fois-ci mise en présence de liposomes déjà formés.

Idéalement, il conviendrait de pouvoir non seulement vérifier l'incorporation des bio-conjugués au sein des double-couches de lipides mais également de la quantifier. C'est pourquoi, deux différentes méthodes ont été mises en place :

- Un suivi par spectroscopie de fluorescence de l'incorporation dans des LUVs
- Un suivi par microscopie de fluorescence de l'incorporation dans des GUVs

IV.1. Suivi par spectroscopie de Fluorescence de l'incorporation des bio-conjugués dans des LUVs.

La première méthode basée sur l'utilisation de la spectroscopie de fluorescence est inspirée de celle de cosédimentation avec des LUVs déjà utilisée pour quantifier des interactions lipide/protéines⁴⁸. Après incubation avec une solution de protéines, les LUVs (et les protéines en interaction avec elles) sont isolées par ultracentrifugation. Les culots et surnageants sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide afin de

déterminer le pourcentage de protéines liées aux liposomes (culot) par rapport à celles libres qui restent en solution (surnageant).

Dans notre cas, des LUVs EggPC/BrainPS (80/20 - %massique) ont été incubées en présence de bio-conjugués LPC pendant deux heures afin de favoriser leur incorporation. Cette composition particulière a été choisie puisque ces deux lipides constituent des composants essentiels des membranes plasmiques cellulaires.

Après ultracentrifugation (60 000 rpm – 140 000 G), la quantité de bio-conjugués dans le culot et dans le surnageant a été déterminée en utilisant un spectroscope de fluorescence à lecteur de plaques (*SpectraMax Gemini XS – Molecular Devices*). (Figure IV.1.)

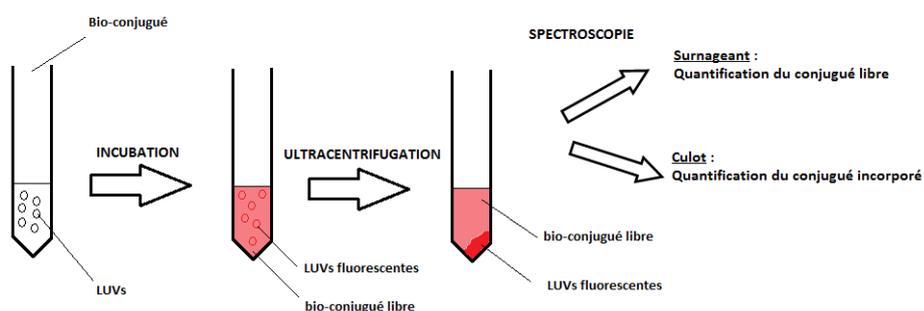


Figure IV.1. Schéma de principe de la technique de quantification du bio-conjugué incorporé dans les liposomes par spectroscopie de fluorescence.

Néanmoins, des tests réalisés sur des échantillons témoins en absence de liposomes ont mis en évidence que, contrairement aux protéines, une partie des bio-conjugués LPC seuls en solution culottent lors de l'ultracentrifugation (Figure IV.2.). Il devenait donc impossible de quantifier précisément les bio-conjugués insérés dans les bicouches lipidiques et les bio-conjugués libres.

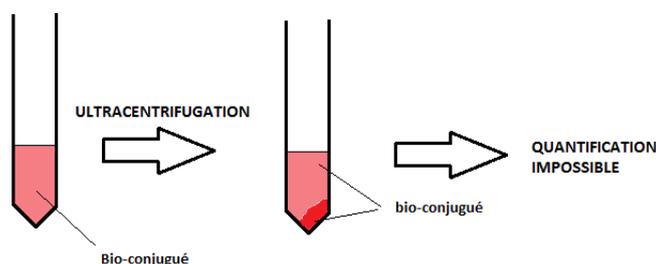


Figure IV.2. Représentation schématique des résultats obtenus lors des tests d'ultracentrifugation des bio-conjugués seuls (environ 30% du bio-conjugué introduit culotte après ultracentrifugation).

Même après optimisation du temps et de la vitesse d'ultracentrifugation, il n'a pas été possible de définir des conditions pour lesquelles les LUVs étaient isolées efficacement et le bio-conjugué LPC ne culottait pas. Cette méthode n'a donc pas été retenue pour la suite de cette étude.

IV.2. Suivi par microscopie optique de l'incorporation des bio-conjugués au sein de GUVs.

Afin de confirmer la capacité des bio-conjugués LPC à incorporer des bicouches de lipides, nous avons également envisagé l'utilisation de la microscopie de fluorescence. En effet, en faisant une étude avant et après incubation, cette technique pourrait mettre en évidence la transformation de vésicules pré-formées non fluorescentes, en absence de bio-conjugué, en vésicules fluorescentes après insertion du bio-conjugué.

Cette étude a donc été réalisée en utilisant les GUVs pré-formées de DOPC. Le diamètre des GUVs, bien plus important que celui des LUVs, leur offre en effet l'avantage comparatif d'être visualisable de manière résolue par les techniques de microscopie optique (cf. Partie III.3.).

Des GUVs non fluorescente ont donc été formées par électroformation puis incubées en présence de 0,5% molaireⁱⁱ (par rapport au DOPC initialement introduit) de bio-conjugué 8K-2H pendant deux heures. Ces liposomes ont ensuite été visualisés par microscopie en champ sombre et de fluorescence (Figure IV.3.).

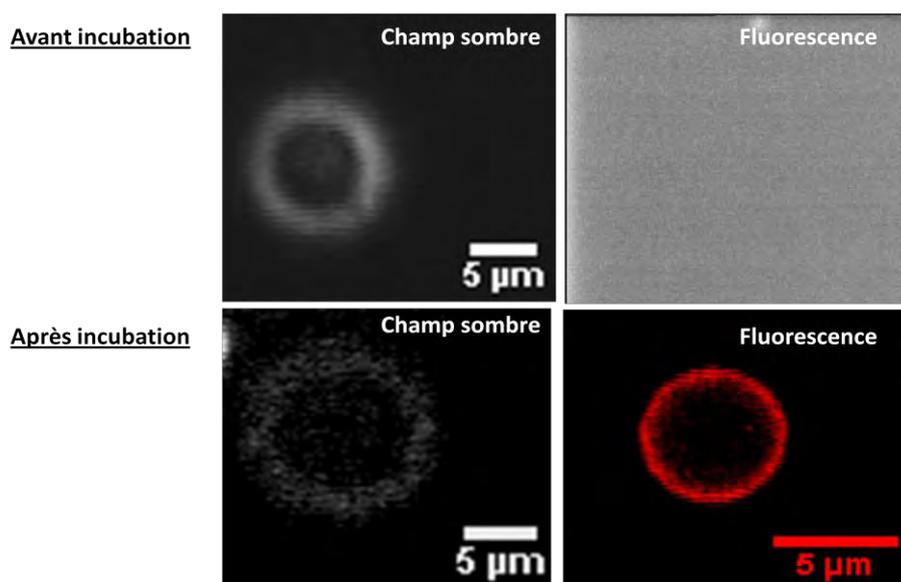


Figure IV.3. Clichés de microscopie en champ sombre et en fluorescence obtenus sur des GUVs avant et après 2h d'incubation à 37°C en présence du bio-conjugué 8K-2H (0,5% molaire).
(Fluorescence : Filtre TX2 : Excitation BP 560/40 – Emission BP 645/75)

Avant incubation, la formation des GUVs de DOPC a été vérifiée en champ sombre. Ces dernières ne sont pas fluorescentes. Au contraire, des GUVs fluorescentes et stables sont obtenues après incubation en présence des bio-conjugués LPC. Ces GUVs fluorescentes présentent un diamètre généralement compris entre 10 et 15 μm.

Les clichés mettent donc en évidence une incorporation du bio-conjugué 8K-2H dans les liposomes. Néanmoins, au regard de la limite de résolution du microscope (200 à 250

ⁱⁱ Soit 20% massique / comparaison molécule – macromolécule : unité la plus adéquate est la mole

nm) et de l'ordre de grandeur d'une bicouche lipidique (5 à 7 nm), il est impossible d'affirmer avec certitude que les bio-conjugués LPC sont incorporés dans les bicouches via le lipide en position terminale, ou que ces derniers sont simplement adsorbés à la surface des liposomes par interaction électrostatique entre la charge positive portée par l'amine du DOPC et les charges négatives des bio-conjugués.

IV.3. Conclusions.

Un des objectifs ayant motivé la réalisation de tests sur systèmes lipidiques modèles était d'évaluer la capacité des bio-conjugués LPC à incorporer des bicouches de lipides préformées.

Une première technique basée sur un suivi par spectrométrie de fluorescence a été mise en place afin de quantifier l'incorporation dans des LUVs. Cette technique, tirant profit des propriétés de fluorescence des conjugués, présentait une étape d'ultracentrifugation nécessaire afin de séparer le bio-conjugué libre et du bio-conjugué incorporé dans les liposomes. Néanmoins, il a été mis en évidence que même le bio-conjugué libre sédimente pendant l'ultracentrifugation, rendant impossible toutes conclusions définitives quant à l'incorporation des conjugués dans les bicouches lipidiques.

Une seconde technique basée sur la microscopie optique a ensuite été utilisée. A défaut de permettre sa quantification, cette technique a permis de confirmer l'incorporation des bio-conjugués LPC dans des liposomes préformés. Contrairement à la situation avant incubation où les liposomes sont non fluorescents, des liposomes fluorescents sont observés après incubation en présence de bio-conjugués LPC.

Même si l'incorporation des bio-conjugués est clairement mise en évidence, il est cependant à noter que ces tests ne nous permettent pas d'affirmer avec certitude que les conjugués sont intégrés de manière orientée par leur extrémité de chaîne lipidique dans la bicouche.

V. Partie expérimentale.

V.1. Matériel.

EggPC – L- α -phosphatidylcholine (Avanti polar Lipids, >99%), Brain PS – L- α -phosphatidylserine (Avanti polar Lipids, >99%), DOPC – 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (Avanti polar Lipids, >99%), DOPE – 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (Avanti polar Lipids, >99%), C8-céramide – N-octanoyl-D-*erythro*-sphingosine (Avanti polar Lipids, >99%), Cholesterol (Avanti Polar Lipids, >98%). Tous les lipides ont été reçus sous forme de poudre et utilisés sans purification particulière.

V.2. Instruments.

V.2.1. Diffusion dynamique de la lumière (DLS).

Les diamètres des liposomes formés (SUVs et LUVs) ont été mesurés, à température ambiante, par diffusion quasi-élastique de la lumière en utilisant un appareil de type Particle Size Analyzer (Cordouan Technologies, DL 135) appartenant au laboratoire de Chimie de l'ENS de Lyon. Les mesures de tailles ont été réalisées via une diode laser de 658nm. Les résultats obtenus ont été traités par le logiciel NanoQ permettant le pilotage de l'appareil.

V.2.2. Microscopie optique.

V.2.2.1. Microscopie confocale de fluorescence.

Les observations ont été réalisées grâce au Plateau Technique d'Imagerie et de Microscopie BioSciences Gerland – Lyon Sud (UMS 3444).

Les liposomes fluorescents ont été visualisés en utilisant un microscope confocal de type Microscope inversé LEICA DMI4000 avec chambre d'incubation (contrôle température et CO₂), équipé d'une tête confocale de type "spinning disk" (Yokogawa CSU22), d'une caméra EMCCD (Photometrics Quantem 512) et d'un système de FRAP 3D. Ce système est équipé de raies laser : 405, 491, 561 et 635nm (interface, laser et galvo par la société ERROL). Le système est piloté par le logiciel Metamorph (Molecular Devices). Les liposomes ont été visualisés en utilisant un objectif à immersion à eau 63× et en utilisant les paramètres suivants : Excitation 491 nm – Emission 675/67 nm.

Afin de réaliser les observations des liposomes par cette technique de microscopie, une chambre est réalisée entre lame et lamelle : des bandelettes de parafilm espacées 1 à 2 cm sont déposées sur une lame en verre, puis une lamelle en verre est déposée sur les bandelettes de parafilm. Le système est ensuite chauffé afin de faire fondre le parafilm et d'obtenir une chambre hermétique.

V.2.2.2. Microscopie en champ sombre et de fluorescence.

Les GUVs fluorescentes ont été visualisées en collaboration avec Christophe Place et Elodie Châtre (LJC – ENS Lyon), en utilisant un microscope inversé (Leica DM IRBE, Deerfield, IL), en champ sombre et en épifluorescence (X-Cite Series 120PC Q) équipé d'une caméra EB-CCD (C4880 Hamamatsu, Ichinocho, Japan). Des objectifs à huile 40× (champ sombre) et 100× (épifluorescence) ont été utilisés pour les visualisations. Pour la visualisation en fluorescence des GUVs le filtre TX2 Filter de Olympus a été utilisé.

Les observations ont été réalisées en déposant une goutte de la solution de liposomes sur une lame en verre directement.

V.3. Formation de liposomes.

V.3.1. Formation de liposomes fluorescents par extrusion (protocole optimisé).

La formation de liposomes fluorescents (EggPC/BrainPS – 80/20 % ratio massique + 0,1% molaire de bio-conjugué) par la technique d'extrusion comporte différentes étapes. Tout d'abord, un film sec de lipides a été formé par séchage toute une nuit à l'évaporateur rotatif Speedvac (Eppendorf concentrator 5301) d'une solution composée :

- 160µL d'une solution de EggPC 10 mg.mL⁻¹
- 40 µL d'une solution de BrainPS 10 mg.mL⁻¹
- 194,8 µL d'une solution de bio-conjugué à 1,32.10⁻⁵ M

Le film sec obtenu a été hydraté, en utilisant un tampon PBS (200 µL), pendant 2 heures à 45°C. Cette étape d'hydratation du film de lipide a été interrompue toutes les 15 minutes afin de vortexer la solution. Les vésicules multilamellaires formées après hydratation sont soumises à 12 cycles de congélation (N₂ liquide) / décongélation (eau à 37°C). La solution de liposomes a ensuite été extrudée 21 fois à travers une membrane en polycarbonate de 100 nm dans le cas des LUVs et de 50 nm dans le cas des SUVs (Nucleopore Track-Etch membrane – WHATMAN – polycarbonate MB 19 mm) en utilisant une miniextrudeuse Avanti Polar Lipids (Figure III.2.).

Un protocole similaire a été utilisé pour la formation de tous les liposomes formés par extrusion et présentés dans le tableau III.3.

V.3.2. Formation de SUVs par sonication.

Les premières étapes de formation de SUVs par cette technique (formation d'un film de lipides sec et hydratation du film de lipides) sont identiques à celles décrites précédemment dans le cas de l'extrusion. Après avoir réhydraté le film de lipides, les solutions de liposomes sont soniquées (Bioruptor®Plus (UCD-300) – Diagenode) (Figure V.1.).



Figure V.1. Bioruptor de Diagenode utilisé pour la formation de SUVs.
(Source : diagenode.com)

En tout, 12 séquences de 6 cycles de sonication (60 secondes de sonication ON / 60 secondes de sonication OFF) sont réalisées à 4°C sur les échantillons. Entre chaque séquence de 6 cycles, les solutions de liposomes sont conservées pendant 15 à 20 minutes dans un bain d'eau à 60°C.

V.3.3. Formation de GUVs fluorescentes par électroformation.

Les GUVs fluorescentes ont été préparées en collaboration avec Cyril Favard, en utilisant une solution de DOPC et de bio-conjugué (0,1% molaire). Tout d'abord, une solution de lipide DOPC (1 mg.mL^{-1}) et de bio-conjugué 8K-2H ($9,16.10^{-3} \text{ mg.mL}^{-1}$) ont été préparées dans un mélange chloroforme/éthanol (9 : 1 – v/v). Ensuite, 50 μL de chaque solution sont prélevés et mélangés de telle sorte à obtenir une solution finale contenant $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de DOPC et 0,1% molaire de bio-conjugué. Après homogénéisation de la solution, 10 μL de celle-ci sont déposés sur les lamelles d'électroformation dont les faces conductrices sont recouvertes d'ITO (Indium Tin Oxyde) (Figure III.5.). Les lames en verre sont ensuite séchées sous le vide d'une pompe à palette pendant 2 heures afin d'éliminer les traces de solvants organiques.

Les lames en verre sont ensuite accolées l'une à l'autre grâce à une pâte à hématocrite (VITREX) de telle sorte à former une chambre hermétique, les faces recouvertes des films de lipides étant dirigées vers l'intérieur de la chambre. Une solution de glucose à 280 mM est ensuite injectée dans la chambre, puis les lames en verre sont connectées à un générateur de tension.

Pour l'électroformation des GUVs, une tension sinusoïdale de 150 mV (pic à pic) et de fréquence 8 Hz a été appliquée. Le voltage est ensuite augmenté progressivement de 100 mV toutes les 5 minutes jusqu'à une tension de 1 050 mV. Le système a ensuite été conservé dans ces conditions toute une nuit.

Une tension carrée de 1 300 mV a enfin été appliquée pendant 30 minutes dans le but de détacher les liposomes formés de la surface des lames en verre, puis les GUVs ont été récupérées à la micropipette.

V.3.4. Incubation de GUVs en présence de bio-conjugué.

Dans un premier temps, des GUVs non fluorescentes de DOPC ont été formées en suivant le même protocole que celui décrit pour la formation de GUVs fluorescentes. Dans un second temps, 24 μL d'une solution de bio-conjugué 8K-2H à $1,32.10^{-5} \text{ M}$ sont ajoutés à la solution de GUVs formées (0,5% molaire par rapport au DOPC). Les GUVs sont ensuite incubées en présence des bio-conjugués pendant 2 heures à 37°C et sous agitation douce (balancelle).

V.4. Méthodes analytiques.

Détermination des diamètres par DLS.

Afin de réaliser les mesures de diamètres des liposomes formés, la solution de liposomes obtenue telle qu'elle après formation est diluée six fois dans un tampon phosphate (PBS 1X – Phosphate Buffer Saline – (PAA)). Une goutte de la solution diluée est ensuite déposée sur la vitre de l'appareil pour la mesure. Les diamètres des liposomes sont mesurés en mode continu jusqu'à stabilisation des valeurs obtenues (au minimum cinq minutes d'acquisition par échantillon).

VI. Conclusions du chapitre 4.

Après avoir décrit dans les deux chapitres précédents la synthèse et la caractérisation des bio-conjugués Lipide-Polymère-Chromophores (LPC), nous avons étudié dans ce chapitre leur capacité d'incorporation au sein de systèmes lipidiques modèles tels que les SUVs, LUVs et les GUVs, c'est-à-dire différentes tailles de liposomes qui présentent de multiples intérêts que ce soit pour la vectorisation de principes actifs (LUVs et SUVs) ou pour l'étude des dynamiques membranaires (GUVs).

La taille importante des GUVs ($> 5\mu\text{M}$) leur permet d'être visualisables (de manière résolue) en microscopie optique, ce qui en fait un système de choix pour étudier l'interaction entre les sondes lipidiques fluorescentes et les membranes lipidiques. Dans le cas des SUVs et des LUVs, présentant des tailles inférieures à la limite de résolution des microscopes optiques (200 – 250 nm), il est plus difficile de mettre en évidence de manière directe l'incorporation des bio-conjugués au sein des bicouches lipidiques.

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence la possibilité de formation de différents liposomes fluorescents à partir de mélanges de lipides et de bio-conjugués LPC.

Des SUVs (de 90 nm de diamètre environ) et des LUVs (de 120 nm de diamètre) ont été formées par une méthode d'extrusion après optimisation de plusieurs paramètres expérimentaux, notamment la température d'extrusion qui semble être le paramètre le plus important.

Des SUVs ont par ailleurs été obtenues par la méthode de sonication (diamètres de l'ordre de 40 nm), plus petites que celles habituellement obtenues dans le cas de l'extrusion au travers de membranes de pores de 50 nm (90 nm de diamètre).

Enfin, la méthode d'électroformation nous a permis de former des GUVs fluorescentes (de 15 à 30 μm de diamètre) qui ont pu être clairement observées par microscopie en champ sombre et microscopie de fluorescence. La visualisation a cependant nécessité une optimisation de la préparation des échantillons de microscopie afin d'éviter une déstabilisation des GUVs formés.

Dans tous les cas, le pourcentage de bio-conjugué Lipide-Polymère-Chromophores utilisé compris entre 0,1 et 0,5% par rapport à la totalité des lipides introduits dans la formulation.

Dans un second temps nous avons prouvé, via la technique de microscopie de fluorescence, la capacité des bio-conjugués LPC à incorporer des liposomes (GUVs) préformés. La limite de résolution de la microscopie optique ne permet cependant pas de conclure avec certitude sur une insertion orientée, via les chaînes alkyles du phospholipide de la sonde LPC, dans la bicouche du liposome.

Il serait intéressant de poursuivre les études d'interaction de ces bio-conjugués LPC avec des liposomes, en faisant varier la structure des bio-conjugués. Cette étude permettrait de vérifier l'influence de la structure des bio-conjugués (densité en chromophore (D_c), présence ou non du lipide en extrémité de chaîne et nature du lipide) sur l'interaction bio-conjugué LPC/liposomes.

Une seconde perspective intéressante serait d'étudier le type d'interaction qui existe entre les bio-conjugués LPC et les bicouches lipidiques, à savoir si les bio-conjugués sont insérés au sein de la double-couche lipidiques ou adsorbés à la surface, par exemple en passant à l'étude de modèles lipidiques plan comme les monocouches de Langmuir.

Dans l'optique d'encore optimiser les protocoles de formation des liposomes et d'approfondir la caractérisation des bio-conjugués LPC, il serait intéressant d'analyser les bio-conjugués par analyse calorimétrique (DSC) pour déterminer leur température de transition.

Nous pourrions également compléter l'analyse des liposomes obtenues (et notamment des SUVs). Par exemple, la microscopie électronique à transmission (TEM) permettrait de vérifier la formation de liposomes unilamellaires, et il serait également intéressant d'utiliser d'autres techniques analytiques pour confirmer les tailles obtenues par DLS).

Après avoir mis en évidence les interactions possibles entre les bio-conjugués LPC et les bicouches lipidiques, la capacité des bio-conjugués à être internalisés au sein de cellules vivantes a été évaluée (cf. chapitre 5). Les liposomes fluorescents synthétisés ont également été utilisés comme vecteurs pour l'internalisation des bio-conjugués LPC au sein de cellules vivantes.

Bibliographie du chapitre 4.

1. Pavinatto, F. J. *et al.* Cholesterol mediates chitosan activity on phospholipid monolayers and Langmuir-Blodgett films. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **25**, 10051–61 (2009).
2. Elizondo, E. *et al.* *Liposomes and other vesicular systems: structural characteristics, methods of preparation, and use in nanomedicine. Progress in molecular biology and translational science* **104**, 1–52 (2011).
3. Karp, G. *Cell and Molecular Biology*. 776 (2008).
4. Callen, J.-C. *Biologie Cellulaire - Des molécules aux organismes*. 475 (Paris, 1999).
5. Menger, F. M. & Keiper, J. S. Chemistry and physics of giant vesicles as biomembrane models. *Current opinion in Chemical Biology* **2**, 726–732 (1998).
6. Rosilio, V., Albrecht, G., Okumura, Y., Sunamoto, J. & Baszkin, A. Surface Properties and Miscibility of Monolayers of Dimyristoylphosphatidylcholine and Poly (Ethylene oxide) Lipids at the Water / Air Interface. *Langmuir* **12**, 2544–2550 (1996).
7. Rosilio, V., Boissonnade, M., Zhang, J., Jiang, L. & Baszkin, A. Penetration of Glucose Oxidase into Organized Phospholipid Monolayers Spread at the Solution / Air. *Langmuir* **13**, 4669–4675 (1997).
8. Zhang, J., Rosilio, V., Goldmann, M., Boissonnade, M. & Baszkin, A. Adsorption of Glucose Oxidase into Lipid Monolayers . Effect of Lipid Chain Lengths on the Stability and Structure of Mixed Enzyme / Phospholipid Films. *Langmuir* **16**, 1226–1232 (2000).
9. Alexandre, S., Dérue, V., Valleton, J.-M., Sommer, F. & Duc, T.-M. High resolution imaging of lipid/protein Langmuir–Blodgett films by atomic force microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **23**, 183–189 (2002).
10. Cremer, P. S., Groves, J. T., Kung, L. A. & Boxer, S. G. Writing and Erasing Barriers to Lateral Mobility into Fluid Phospholipid Bilayers. *Langmuir* **15**, 3893–3896 (1999).
11. Cremer, P. S. & Boxer, S. G. Formation and Spreading of Lipid Bilayers on Planar Glass Supports. *J. Phys. Chem. B* **103**, 2554–2559 (1999).
12. Sackmann, E. Supported membranes: scientific and practical applications. *Science (New York, N.Y.)* **271**, 43–48 (1996).
13. Hamai, C., Yang, T., Kataoka, S., Cremer, P. S. & Musser, S. M. Effect of average phospholipid curvature on supported bilayer formation on glass by vesicle fusion. *Biophysical journal* **90**, 1241–8 (2006).
14. Mornet, S., Lambert, O., Duguet, E. & Brisson, A. The formation of supported lipid bilayers on silica nanoparticles revealed by cryoelectron microscopy. *Nano letters* **5**, 281–5 (2005).
15. Liu, J., Stace-Naughton, A., Jiang, X. & Brinker, C. J. Porous nanoparticle supported lipid bilayers (protocells) as delivery vehicles. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 1354–5 (2009).
16. Walde, P. & Ichikawa, S. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. *Biomolecular engineering* **18**, 143–77 (2001).
17. Metselaar, J. M. *et al.* A novel family of L-amino acid-based biodegradable polymer-lipid conjugates for the development of long-circulating liposomes with effective drug-targeting capacity. *Bioconjugate chemistry* **14**, 1156–64 (2003).
18. Pleyer, U., Grammer, J., Kosmidis, P. & Ruckert, D. G. Analysis of interactions between the corneal epithelium and liposomes: qualitative and quantitative fluorescence studies of a corneal epithelial cell line. *Survey of ophthalmology* **39 Suppl 1**, S3–16 (1995).
19. Lasic, D. D. The mechanism of vesicle formation. *The Biochemical journal* **256**, 1–11 (1988).
20. Gruner, S. M., Lenk, R. P., Janoff, A. S. & Ostro, M. J. Novel multilayered lipid vesicles: comparison of physical characteristics of multilamellar liposomes and stable plurilamellar vesicles. *Biochemistry* **24**, 2833–42 (1985).
21. Rongen, H. a, Bult, a & van Bennekom, W. P. Liposomes and immunoassays. *Journal of immunological methods* **204**, 105–33 (1997).
22. Boni, L. T. *et al.* Interleukin-2-induced small unilamellar vesicle coalescence. *Biochimica et biophysica acta* **1514**, 127–38 (2001).
23. Sancho, M. R., Boullanger, P. & Létoublon, R. Incorporation of D-glucosamine alkyl glucopyranosides into the bilayer of small unilamellar vesicles of egg phosphatidyl choline. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1**, 373–381 (1993).
24. Hamilton, R. L., Goerke, J., Guo, L. S., Williams, M. C. & Havel, R. J. Unilamellar liposomes made with the French pressure cell: a simple preparative and semiquantitative technique. *Journal of lipid research* **21**, 981–92 (1980).
25. Ferreira, H., Lucio, M., De Castro, P. G., Lima, J. L. F. C. & Reis, S. Partition and location of nimesulide in EPC liposomes: a spectroscopic and fluorescence study. *Anal Bioanal Chem* **377**, 293–298 (2003).

26. Yamazaki, A., Winnik, F. M., Cornelius, R. M. & Brash, J. L. Modification of liposomes with N-substituted polyacrylamides : identification of proteins adsorbed from plasma. *Biochemica et Biophysica Acta* **1421**, 103–115 (1999).
27. Ueno, M. & Sriwongsitanont, S. Effect of PEG lipid on fusion and fission of phospholipid vesicles in the process of freeze-thawing. *Polymer* **46**, 1257–1267 (2005).
28. Moscho, A., Orwar, O. W. E., Chiu, D. T., Modi, B. P. & Zare, R. N. Rapid preparation of giant unilamellar vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 11443–11447 (1996).
29. Karlsson, M. *et al.* Electroinjection of colloid particles and biopolymers into single unilamellar liposomes and cells for bioanalytical applications. *Analytical chemistry* **72**, 5857–62 (2000).
30. Portet, T. *et al.* Visualization of membrane loss during the shrinkage of giant vesicles under electropulsation. *Biophysical journal* **96**, 4109–21 (2009).
31. Menger, F. M. & Angelova, M. I. Giant Vesicles: Imitating the Cytological Processes of Cell Membranes. *Accounts of Chemical Research* **31**, 789–797 (1998).
32. Hunter, D. G. & Frisken, B. J. Effect of extrusion pressure and lipid properties on the size and polydispersity of lipid vesicles. *Biophysical journal* **74**, 2996–3002 (1998).
33. Mui, B., Chow, L. & Hope, M. J. Extrusion technique to generate liposomes of defined size. *Methods in enzymology* **367**, 3–14 (2003).
34. Sriwongsitanont, S. & Ueno, M. Physicochemical properties of PEG-grafted liposomes. *Chemical & pharmaceutical bulletin* **50**, 1238–44 (2002).
35. Edwards, K., Johnsson, M., Karlsson, G. & Silvander, M. Effect of Polyethyleneglycol-Phospholipids on Aggregate Structure in Preparations of Small Unilamellar Liposomes. *Biophysical Journal* **73**, 258–266 (1997).
36. Leonenko, Z. V., Finot, E., Ma, H., Dahms, T. E. S. & Cramb, D. T. Investigation of temperature-induced phase transitions in DOPC and DPPC phospholipid bilayers using temperature-controlled scanning force microscopy. *Biophysical journal* **86**, 3783–93 (2004).
37. Girard-Egrot, A. Lipides membranaires. at <<http://www.scribd.com/doc/46509240/17/Liposomes>>
38. Castile, J. D. & Taylor, K. M. Factors affecting the size distribution of liposomes produced by freeze-thaw extrusion. *International journal of pharmaceutics* **188**, 87–95 (1999).
39. Matthay, K. K., Heath, T. D., Papahadjopoulos, D. & Vesicles, A. S. U. Specific Enhancement of Drug Delivery to AKR Lymphoma by Antibody-targeted Small Unilamellar Vesicles. *Cancer Research* **44**, 1880–1886 (1984).
40. Colomer-Pallas, A., Petit-Glatron, M.-F. & Chambert, R. Bacillus subtilis α -amylase: interactions of a partially folded conformer with small unilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1660**, 16–23 (2004).
41. Bailey, a L. & Cullis, P. R. Membrane fusion with cationic liposomes: effects of target membrane lipid composition. *Biochemistry* **36**, 1628–34 (1997).
42. Klein, J. Thèse, Université de Strasbourg. (2009).
43. Israelachvili, J. N. *Intermolecular and Surface Forces: Revised Third Edition*. 704 (2011).
44. Malaekhe-Nikouei, B., Jaafari, M. R., Tabassi, S. a S. & Samiei, A. The enhancement of immunosuppressive effects of cyclosporine A on human T-cells using fusogenic liposomes. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **67**, 238–244 (2008).
45. Veldman, R. J., Zerp, S., van Blitterswijk, W. J. & Verheij, M. N-hexanoyl-sphingomyelin potentiates in vitro doxorubicin cytotoxicity by enhancing its cellular influx. *British journal of cancer* **90**, 917–25 (2004).
46. Olympus Darkfield Illumination. at <<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/darkfield.html>>
47. Omoto, C. K. Using Darkfield Microscopy To Enhance Contrast: An Easy and Inexpensive Method. at <<http://public.wsu.edu/~omoto/papers/darkfield.html>>
48. Hamard-Peron, E. *et al.* Targeting of murine leukemia virus gag to the plasma membrane is mediated by PI(4,5)P2/PS and a polybasic region in the matrix. *Journal of virology* **84**, 503–15 (2010).

CHAPITRE 5

EVALUATION DES BIO-CONJUGUES LIPIDE-POLYMERES FLUORESCENTS EN MILIEU BIOLOGIQUE

Les expériences présentées dans ce chapitre ont majoritairement été réalisées par moi-même, en bénéficiant de l'aide et des conseils de Delphine Muriaux (ENS de Lyon puis CPBS – Montpellier), Elise Hamard-Perron (ENS de Lyon) et Guillaume Fargier (ESN de Lyon) pour la conception et la réalisation des tests d'internalisation, et des conseils de Delphine Muriaux et Cyril Favard (CPBS – Montpellier) pour la visualisation par microscopie de fluorescence et l'interprétation des images obtenues.

Sommaire

I. Introduction.	167
II. Evaluation de la cytotoxicité des bio-conjugués en milieu cellulaire.	167
II.1. Evaluation qualitative sur cellules HeLa par microscopie optique.	168
II.1.1. Principe du test – Bilan des résultats obtenus.	169
II.1.2. Influence de la concentration et de la structure des bio-conjugués.	171
II.2. Evaluation quantitative sur Lymphocyte T par cytométrie en flux.	172
II.2.1. Principe du test – Bilan des résultats obtenus.	172
II.2.2. Influence de la concentration et de la structure des bio-conjugués.	173
II.3. Conclusions.	174
III. Internalisation des bio-conjugués au sein de cellules vivantes.	174
III.1. Etude de l'internalisation du bio-conjugué 33K-9H au sein de cellules HeLa par microscopie confocale.	175
III.1.1. Premières observations des bio-conjugués dans les cellules.	176
III.1.2. Cinétique d'internalisation.	177
III.1.3. Effet de la concentration en bio-conjugué.	179
III.1.4. Etude de la voie d'internalisation.	180
III.1.5. Essais préliminaires d'imagerie à deux photons des cellules HeLa incubées en présence de bio-conjugué LPC.	184
III.2. Internalisation du bio-conjugué 33K-9H dans différents types cellulaires.	185
III.3. Etude de l'influence de la structure des bio-conjugués sur l'internalisation cellulaire.	186
III.3.1. Influence de la masse molaire du polymère et de la densité en chromophores.	187
III.3.2. Influence du post-traitement et de la densité de charges.	189
III.3.3. Influence de la nature du chromophore.	191
III.3.4. Influence de la présence du lipide en extrémité de chaîne et de la présence d'un bras espaceur.	194
III.4. Incubation des cellules en présence de liposomes fluorescents.	198
III.4.1. Incubation en présence de liposomes références EggPC/PS.	199
III.4.2. Influence de la taille et de la composition des liposomes sur l'internalisation des bio-conjugués.	201
III.5. Conclusions.	208
IV. Partie expérimentale.	209
IV.1. Matériels.	209
IV.2. Culture cellulaire.	209
IV.3. Instruments.	210
IV.3.1. Cytométrie en flux (FACS).	210
IV.3.2. Microscopie Optique.	210
IV.4. Méthodes Analytiques.	211
IV.4.1. Tests de cytotoxicité.	211
IV.4.2. Tests d'internalisation.	212
V. Conclusions du Chapitre 5.	214

I. Introduction.

Dans le chapitre 3, nous avons montré qu'il était possible de synthétiser des bio-conjugués Lipide-Polymère Chromophores (LPC) de façon très contrôlée en utilisant la technique de polymérisation radicalaire contrôlée de type RAFT. Les propriétés spectroscopiques de ces bio-conjugués LPC ont ensuite été caractérisées (cf. chapitre 3), puis leur capacité à s'insérer dans des bicouches lipidiques a été évaluée à travers l'utilisation de systèmes modèles (cf. chapitre 4). Les tests réalisés ont permis de mettre en évidence la possibilité de formation de SUVs et LUVs fluorescentes, d'une part, et de confirmer l'insertion des bio-conjugués LPC dans des GUVs pré-formées, d'autre part.

L'objectif des tests dont les résultats sont présentés dans ce chapitre 5, est d'évaluer le comportement des bio-conjugués LPC en milieu cellulaire. Une étude de la cytotoxicité, mais aussi de l'internalisation et de la localisation des bio-conjugués dans des cellules vivantes a été réalisée, en utilisant notamment la microscopie optique de fluorescence, qui s'est avérée être un outil de choix dans ce contexte.

Parmi tous les bio-conjugués LPC synthétisés (cf. Tableau V.1. du chapitre 3), ceux utilisés lors de cette étude sur cellules vivantes sont :

- Les bio-conjugués hydrolysés : 33K-9H, 20K-11H, 20K-4H, 8K-4H, 34K-9H et 17K-4H
- Un bio-conjugué cappé par l'Aminoéthylmorpholine : 33K-9AEM

Dans ce chapitre, je traiterai donc, dans un premier temps, les différents tests concernant l'évaluation de la cytotoxicité des bio-conjugués LPC, réalisés par deux méthodes indépendantes (microscopie optique et cytométrie en flux) sur des lignées cellulaires de type Hela et Lymphocyte T. Dans cette partie, une étude de l'influence de la structure et de la concentration des bio-conjugués LPC sur la cytotoxicité sera également présentée.

Dans un second temps, une étude de l'internalisation et de la localisation des bio-conjugués LPC au sein de différents types cellulaires sera présentée. Cette partie sera divisée en différentes sous-parties :

- Internalisation et localisation des bio-conjugués LPC au sein de cellules modèles de type Hela, à travers les résultats obtenus avec le bio-conjugué 33K-9H
- Internalisation de différents bio-conjugués LPC au sein de différents types cellulaires
- Influence du mode d'apport des bio-conjugués aux cellules vivantes sur l'internalisation et la localisation, via l'utilisation de liposomes fluorescents.

II. Evaluation de la cytotoxicité des bio-conjugués en milieu cellulaire.

L'objectif des tests de cytotoxicité est de vérifier que les bio-conjugués LPC n'entraînent pas de mortalité cellulaire excessive dans la gamme de concentration usuelle des sondes fluorescentes.

Le terme de cytotoxicité est un terme générique qui peut englober différents aspects (mort cellulaire, dysfonctionnement cellulaire...). Cette notion de cytotoxicité décrit la capacité que possède une substance d'altérer les cellules¹. Ces substances peuvent soit induire directement la mort des cellules, soit altérer leur fonctionnement ce qui a pour conséquence de faire entrer les cellules en apoptose qui correspond à une mort programmée de la cellule^{2,3}.

Lorsque différents produits chimiques sont testés, les données de mortalité cellulaires sont recueillies et traitées. La concentration efficace CE₅₀ est alors déterminée pour chaque substance, ce qui correspond à la concentration en produit testé qui entraîne une réponse (toxique) pour 50% des cellules⁴. Elle permet ainsi de comparer la cytotoxicité de différents produits chimiques.

Il existe différentes méthodes permettant d'évaluer la cytotoxicité de substances. Dans tous les cas, les cellules vivantes sont préalablement incubées en présence de doses croissantes des substances à évaluer pendant plusieurs heures voire plusieurs jours. Les cellules sont ensuite récupérées et la cytotoxicité est évaluée par quantification du nombre de cellules viables, et ce, grâce à différentes techniques. Par exemple :

- Microscopie Optique : Méthode qualitative permettant de visualiser l'aspect des cellules en contact avec les substances à analyser
- Cytométrie en Flux^{5,6} : Méthode quantitative permettant de chiffrer le pourcentage de cellules vivantes et de cellules mortes d'un échantillon
- Comptage sur cellule de Malassez⁷ : Méthode quantitative permettant de déterminer le pourcentage de cellules viables d'un échantillon après coloration des cellules mortes et comptage via une plaque quadrillée.

Chacune de ces méthodes permet de déterminer l'influence que peut avoir une substance sur le comportement et la morphologie des cellules.

Dans notre cas, nous avons utilisé deux de ces méthodes pour l'évaluation de la cytotoxicité des bio-conjugués LPC. En effet, dans un premier temps, celle-ci a été évaluée de manière qualitative par microscopie optique (sur cellules Hela) puis, dans un second temps, par la technique de cytométrie en flux (sur lymphocyte T).

II.1. Evaluation qualitative sur cellules Hela par microscopie optique.

Des premiers tests pour évaluer la cytotoxicité des bio-conjugués LPC ont été réalisés sur des cellules Hela de référence. Les cellules Hela constituent en effet une lignée cellulaire cancéreuse très utilisée en biologie, ce sont également des cellules dites adhérentes ce qui permet de les immobiliser sur les supports et de faciliter les observations par microscopie.

L'objectif de ce test était d'observer par microscopie tout changement, notamment de morphologie, que la présence des bio-conjugués engendre sur les cellules vivantes. En effet, lors des observations, différents critères ont été pris en compte :

- Changement de morphologie : Lorsque les cellules meurent ou sont en mauvais état, elles ont tendance à s'arrondir et à présenter un noyau très gros et granuleux.
- Perte des propriétés d'adhérence : Témoigne de la mort cellulaire
- Arrêt de la réplication cellulaire

L'évaluation qualitative de la cytotoxicité des bio-conjugués LPC a été réalisée en comparant les cellules incubées en présence des bio-conjugués et les cellules témoins, c'est-à-dire non incubées en présence de bio-conjugués.

II.1.1. Principe du test – Bilan des résultats obtenus.

Lors de ces tests deux types de bio-conjugués ont été testés (Tableau II.1) : 33K-9H et 33K-9AEM. Ces deux conjugués présentent un nombre moyen de chromophores couplés par chaîne polymère identique et ont été synthétisés à partir de la même chaîne polymère. Cette étude de la cytotoxicité nous permettra donc de déterminer, en plus de la cytotoxicité intrinsèque des bio-conjugués, l'influence du post-traitement réalisé (hydrolyse ou capping par l'AEM).

Une gamme de concentration en bio-conjugué très large a été utilisée, s'étendant de 0,1 μM (concentration très faible en sonde fluorescente) jusqu'à 20 μM . Cette large gamme de concentration a été utilisée afin d'éventuellement mettre en évidence une concentration limite à partir de laquelle les bio-conjugués LPC induisent une toxicité, sachant que la concentration de 20 μM est une concentration très élevée pour ce genre de sonde fluorescentes (la concentration usuelle d'utilisation se situe plutôt autour du micro-molaire)⁸ (Tableau II.1.).

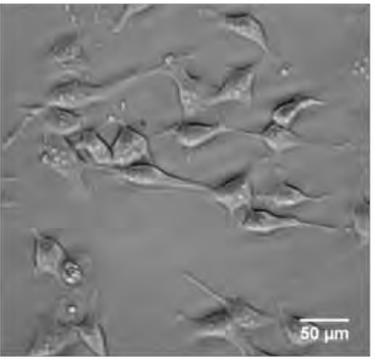
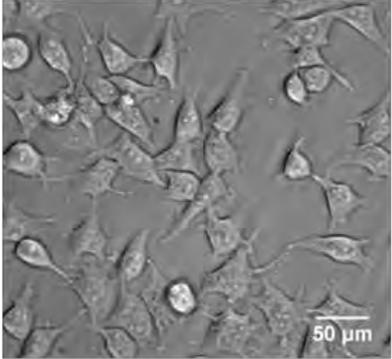
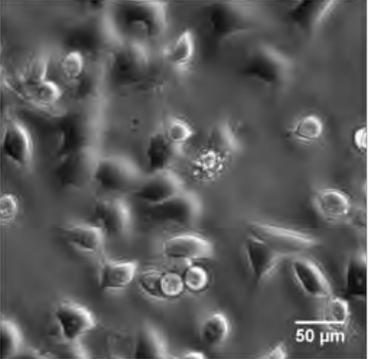
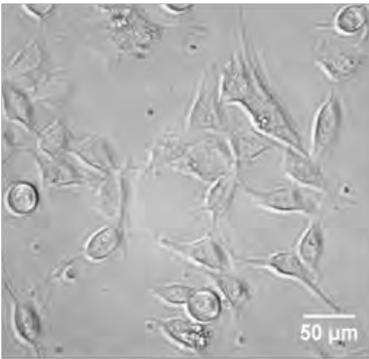
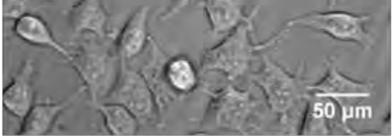
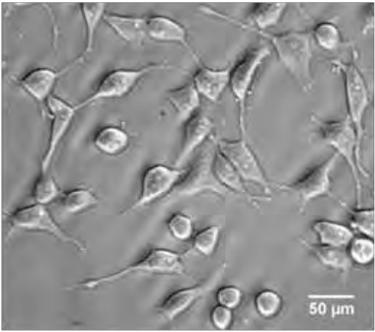
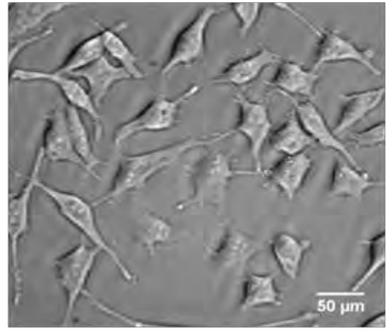
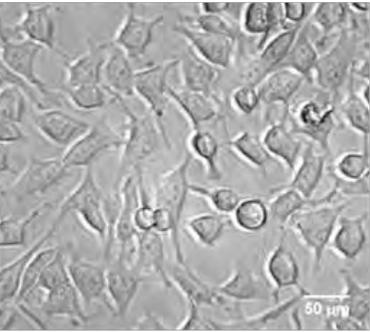
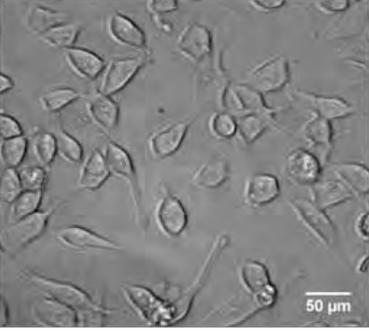
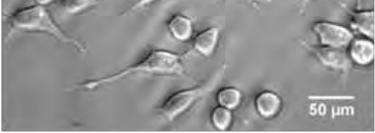
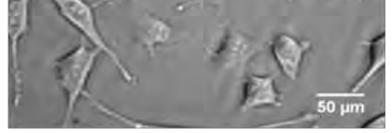
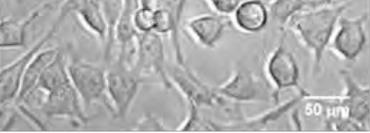
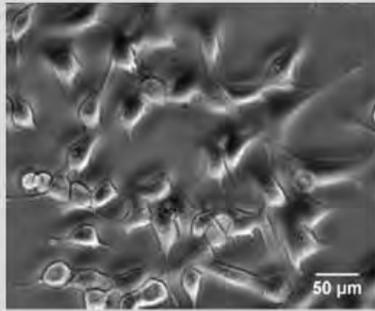
	Cytotoxicité	0,1 μM	1 μM	10 μM	20 μM
33K-9H	Non cytotoxique pour Concentration < 10 μM				
	Agrégats formés après 40 heures et à 20 μM				
33K-9AEM	Non cytotoxique pour Concentration < 10 μM				
	Agrégats formés après 17 heures et à 10 et 20 μM				
Témoins					

Tableau II.1. Récapitulatif des résultats obtenus pour les tests de cytotoxicité des bio-conjugués 33K-9H et 33K-9AEM sur cellules Hela, après 45h d'incubation à 37°C et sous 5% de CO₂

II.1.2. Influence de la concentration et de la structure des bio-conjugués.

II.1.2.1. Influence de la concentration en bio-conjugués.

Quatre concentrations différentes ont été testées : 20, 10, 1 et 0,1 μM . D'après les observations qui ont été faites, lorsque la concentration en bio-conjugué est inférieure à 10 μM (1 ou 0,1 μM), aucun changement de forme des cellules n'est observé. En effet, les cellules conservent leur morphologie initiale avec quelques prolongements suggérant qu'à cette concentration les bio-conjugués ne sont pas toxiques pour les cellules.

Cependant, il semblerait que l'utilisation des bio-conjugués à des concentrations supérieures ou égales à 10 μM engendre légèrement plus de mort cellulaires. Un nombre plus important de cellules rondes, décrochées, est observé dans le cas où les bio-conjugués sont incubés avec les cellules à une concentration de 20 μM . Dans le puits témoin, correspondant aux cellules sans conjugués, aucune cellule ronde n'est observée, on voit seulement des cellules en division (Tableau II.1.).

Les visualisations réalisées par microscopie ont également permis de mettre en évidence la formation d'agrégats de conjugués présentant des tailles de plusieurs micromètres au sein du milieu de culture lorsque la concentration de conjugué utilisée est supérieure à 10 μM .

II.1.2.2. Influence de la structure des bio-conjugués.

Lors de cette étude, deux types de conjugués ont été utilisés : un conjugué hydrolysé et donc portant des charges négatives le long de la chaîne polymère et un conjugué cappé par l'AEM dont la chaîne polymère est électriquement neutre.

Notamment à cause de leur structure chimique, il est possible que ces deux bio-conjugués se comportent de manière différente à la fois dans l'eau, dans le milieu de culture où sont présentes de nombreuses molécules chargées, et avec les cellules.

Les différentes observations réalisées suggèrent que la nature chimique des bio-conjugués n'a pas réellement d'influence sur la mortalité des cellules, si on se place à des concentrations usuelles pour les sondes fluorescentes, de l'ordre du micro-molaire.

En revanche, il a été mis en évidence la formation d'agrégats de bio-conjugués lorsque la concentration en bio-conjugués est supérieure à 10 μM (beaucoup plus nombreux et plus gros dans le cas du bio-conjugué 33K-9AEM que dans le cas du conjugué hydrolysé 33K-9H), ce qui peut être expliqué par le fait que le bio-conjugué 33K-9AEM est moins hydrophile que le bio-conjugué 33K-9H chargé négativement.

II.2. Evaluation quantitative sur Lymphocyte T par cytométrie en flux.

Après avoir réalisé une étude qualitative de la cytotoxicité des bio-conjugués LPC, une seconde étude quantitative par cytométrie en flux ou FACS⁵ (Fluorescence-Activated Cell Sorting) a été mise en place dans le but de chiffrer la viabilité cellulaire après incubation des cellules en présence des bio-conjugués.

La cytométrie en flux est une technique analytique très utilisée en biologie^{9,10}, et qui permet, entre autre, de quantifier le nombre de cellules mortes d'un échantillon en tirant profit du caractère granuleux que prennent ces dernières. Les cellules de l'échantillon sont aspirées dans un capillaire très fin de telle sorte qu'elles soient les unes à la suite des autres et passent devant un photodétecteur qui va discriminer les cellules granuleuses des autres.

Les tests réalisés ont consisté à incuber des cellules non adhérentes de type Jurkat (Lymphocyte T) en présence de différentes concentrations en bio-conjugués pendant plus de 30 heures. La gamme de concentration utilisée lors de ce test est très large et est composée des concentrations suivantes : 20 ; 10 ; 1 ; 0,5 ; 0,2 et 0,1 μ M en conjugué.

Contrairement à la microscopie où l'utilisation de cellules adhérentes est préférable, la cytométrie en flux nécessite l'utilisation de cellules non adhérentes, ce qui permet de s'affranchir de l'étape de trypsination (décrochage des cellules du support pour analyse)¹¹. Outre le fait qu'il s'agisse d'une étape supplémentaire à réaliser, cette étape de trypsination peut parfois endommager les cellules pouvant fausser les résultats des tests.

II.2.1. Principe du test – Bilan des résultats obtenus.

Les tests réalisés ont consisté à incuber les cellules Jurkat en présence de différentes concentrations en bio-conjugués. Après 7 et 31 heures d'incubation, les cellules ont été analysées par FACS afin de déterminer la proportion de cellules vivantes (cf. Partie Expérimentale).

Les bio-conjugués dont la cytotoxicité a été évaluée lors de ces tests sont tous des conjugués hydrolysés, donc porteurs de charges négatives le long de la chaîne polymère, mais ont été synthétisés à partir de polymères de masses molaires moyennes différentes et présentent également différentes densités de chromophores sur la chaîne polymère (Tableau II.2.).

Les tests ont permis d'étudier :

- L'influence de la densité de chromophores par chaîne polymère, en comparant les résultats pour les bio-conjugués 20K-4H et 20K-11H
- L'influence de la taille de la chaîne polymère, en comparant les résultats obtenus pour les conjugués 33K-9H et 20K-4H, ces conjugués ayant une densité de chromophores similaire.

Tableau II.2. Liste et propriétés physico-chimiques des bio-conjugués utilisés pour les tests de cytotoxicité par FACS.

	M_n chaîne polymère (g.mol ⁻¹)	n_c	n_{COO-}	D_c (%)	$N_{unités}$	D_{COO-} (%)
33K-9H 28 000 g.mol ⁻¹	33 200	9	78	4	24	36
20K-4H 17 300 g.mol ⁻¹	20 300	4	49	3	33	37
20K-11H 19 700 g.mol ⁻¹	20 300	11	42	8	12	32

n_c = Nombre moyen de chromophores par chaîne polymère

n_{COO-} = Nombre moyen de charges négatives par chaîne polymère

D_c = Densité en chromophores des bio-conjugués LPC ($D_c = [n_c / DP_n] \times 100$) avec DP_n = degré de polymérisation moyen des chaînes polymères

D_{COO-} = Densité en charges des bio-conjugués LPC ($D_{COO-} = [n_{COO-} / DP_n] \times 100$)

$N_{unités}$ = Nombre moyen d'unités monomères entre deux chromophores

Après avoir collecté tous les résultats, ces derniers ont été regroupés et représentés sous la forme d'un histogramme (Figure II.1.) afin de mieux faire ressortir la tendance observée lors des tests de cytotoxicité.

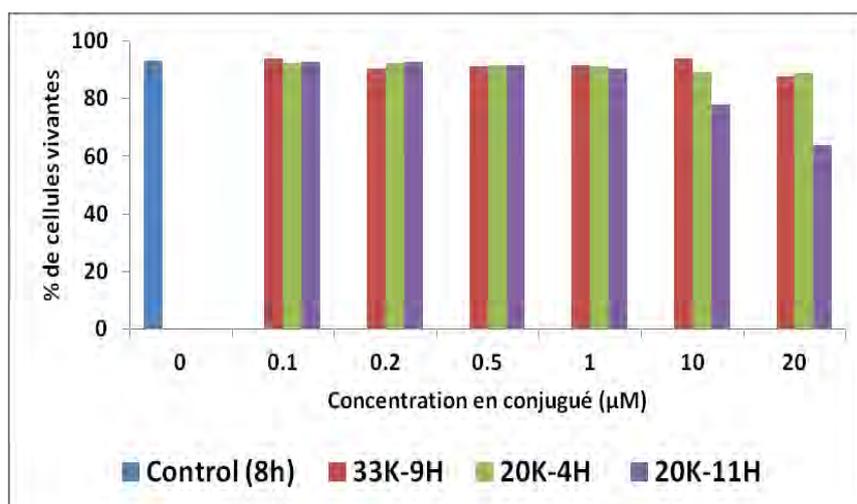


Figure II.1. Histogrammes représentant le pourcentage de cellules vivantes en fonction de la concentration en bio-conjugué après 7h d'incubation.

II.2.2. Influence de la concentration et de la structure des bio-conjugués.

Les résultats (Figure II.1.) permettent de mettre en évidence que les bio-conjugués ne présentent pas de cytotoxicité à des concentrations inférieures à 1 µM, quelque soit leur structure. La viabilité des cellules est dans ce cas là identique au témoin (environ 90%).

Les résultats obtenus pour les bio-conjugués 20K-4H et 33K-9H semblent indiquer que la taille du polymère n'affecte pas la biocompatibilité des bio-conjugués. En revanche, on peut voir une légère toxicité du bio-conjugué 20K-11H lorsque la concentration en bio-

conjugué est égale à 10 et 20 μM . Cette toxicité pourrait justement être causée par la présence de nombreux chromophores sur une petite chaîne polymère, ce qui modifie forcément la balance hydrophile/lipophile du conjugué. Le bio-conjugué, devenu plus hydrophobe, se localiserait préférentiellement au niveau de zones plus hydrophobes des cellules. Il pourrait par exemple s'insérer au sein d'organites cellulaires perturbant leur fonctionnement et donc le fonctionnement de la cellule.

II.3. Conclusions.

Différents tests de cytotoxicité ont été réalisés dans le but de savoir si les bio-conjugués fluorescents synthétisés pouvaient être utilisés en milieu biologique sans induire de mort cellulaire. Les deux tests réalisés nous ont apporté différentes informations, mais la plus importante est que les bio-conjugués LPC ne sont pas toxiques pour les cellules aux concentrations usuelles ($\leq 1 \mu\text{M}$).

Le premier test a été réalisé, sur cellules de type Hela. Lorsque la concentration en bio-conjugué est inférieure à 10 μM (1 et 0,1 μM), aucune toxicité n'est visible. Aucun changement de morphologie des cellules Hela n'est observé.

Lorsque les bio-conjugués sont utilisés à très forte concentration, c'est-à-dire à des concentrations supérieures ou égales à 10 μM , une mortalité cellulaire plus importante est observée. De plus, des agrégats sont visualisés dans le milieu, surtout pour le bio-conjugué cappé à l'AEM mais aussi pour le bio-conjugué hydrolysé (agrégats moins nombreux, de taille moins importante et formés à concentration plus importante).

Un second test de cytotoxicité a été réalisé sur des cellules de type Jurkat (Lymphocytes T) par cytométrie en flux (FACS). Lors de ce test, différents conjugués ont été utilisés, ce qui nous a permis de vérifier l'influence à la fois de la longueur de la chaîne polymère et de la densité de chromophores sur la cytotoxicité.

Les résultats obtenus confirment une absence de cytotoxicité des bio-conjugués puisque dans chaque cas le pourcentage de cellules vivantes après incubation était très proche de celui du témoin en absence de bio-conjugués. Les résultats semblent également montrer que la présence du bio-conjugué ne perturbe pas le cycle de réplication des cellules.

III. Internalisation des bio-conjugués au sein de cellules vivantes.

Après avoir mis en évidence l'absence de cytotoxicité des bio-conjugués LPC à des concentrations usuelles ($< 10 \mu\text{M}$), leur capacité à s'internaliser dans les cellules vivantes a été étudiée par microscopie optique confocale de fluorescence.

La microscopie confocale est une méthode de microscopie qui présente de nombreux avantages par rapport aux méthodes de microscopie optique à champ large classique.

Dans le principe de la microscopie à champ large, où la totalité de l'échantillon est illuminée par une lumière blanche, pour que l'image soit nette il faut que l'échantillon soit placé dans le plan focal du système optique. Or dans le cas des échantillons épais, tels que les cellules vivantes, les plans autres que le plan focal, également illuminés, émettent beaucoup de fluorescence parasite qui est récupérée au niveau du détecteur, ce qui rend l'image obtenue floue.

En ce qui concerne la microscopie confocale, l'illumination de l'échantillon se fait à l'aide d'un laser qui est centré sur l'échantillon à l'aide de la lentille objectif. Cela permet de limiter l'illumination de l'échantillon et donc de limiter l'émission de fluorescence parasite. Néanmoins, les plans directement adjacents au plan focal du système optique émettent toujours de la fluorescence. Cette fluorescence parasite est éliminée grâce au positionnement d'un « pinhole » situé juste devant le détecteur, permettant de collecter uniquement la fluorescence issue du plan focal du système. L'image récupérée est donc nette et correspond à une coupe bien précise de l'échantillon^{12,13}.

La possibilité d'imager une coupe bien précise d'échantillons transparents comme les cellules vivantes est à la base d'un autre grand avantage de la microscopie confocale. En modifiant la position du plan focal du système optique, il est possible de réaliser une série d'images en vue d'une reconstitution tridimensionnelle de la cellule observée¹³. En plaçant le plan focal du système à l'intérieur de la cellule il est donc possible de savoir si les bio-conjugués LPC sont internalisés dans la cellule et de pouvoir les localiser.

Cette technique constitue donc un outil de choix pour étudier l'internalisation et la localisation des bio-conjugués fluorescents au sein des cellules vivantes.

Cette partie sera divisée en quatre sous-parties. Tout d'abord je présenterai une étude de l'internalisation et de la localisation d'un des bio-conjugués LPC (33K-9H) i) au sein des cellules Hela dans un premier temps ii) dans d'autres types cellulaires dans un second temps. Ensuite, je présenterai l'étude réalisée sur l'influence de la structure des bio-conjugués. Enfin, la dernière partie concernera l'incubation des cellules vivantes en présence de liposomes fluorescents.

III.1. Etude de l'internalisation du bio-conjugué 33K-9H au sein de cellules Hela par microscopie confocale.

L'objectif de ces tests était, non seulement d'évaluer la capacité des bio-conjugués LPC à s'internaliser dans les cellules vivantes, mais également d'étudier plus précisément leur cinétique d'internalisation et leur localisation au sein de la cellule, en utilisant un système modèle très fréquemment utilisé par les biologistes que sont les cellules Hela.

III.1.1. Premières observations des bio-conjugués dans les cellules.

Les cellules Hela ont été incubées en présence de bio-conjugués 33K-9H à une concentration de 1 μM puis observées en fluorescence par microscopie confocale (Figure III.1.).

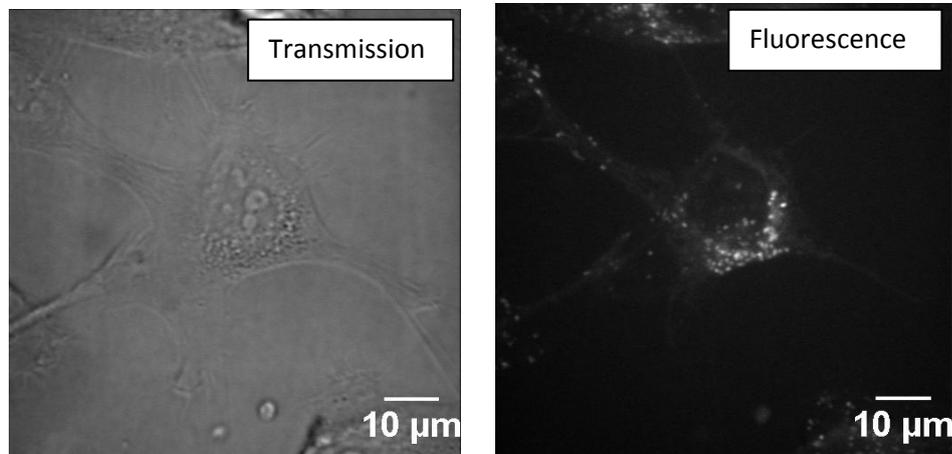


Figure III.1. Clichés de microscopie ($\times 63$) d'une même cellule Hela après incubation 1h30 à 37°C et sous 5% de CO_2 en présence de bio-conjugué 33K-9H à 1 μM (Ex = 491 nm / filtre émission = 675/67 nm).

Les observations réalisées ont permis de mettre en évidence que les bio-conjugués LPC sont rapidement internalisés dans les cellules Hela, et que toutes les cellules étaient marquées par le bio-conjugué.

Les images obtenues (Figure III.1.) montrent que les bio-conjugués LPC internalisés dans les cellules, sont très fluorescents et facilement visualisables en microscopie. Un marquage diffus du cytoplasme des cellules et sous forme de spots fluorescents situé préférentiellement autour du noyau est observé. De plus, les observations réalisées en microscopie semblent confirmer les résultats obtenus lors des tests de cytotoxicité, à savoir que les bio-conjugués ne sont pas cytotoxiques à des concentrations de l'ordre du micromolaire.

Le marquage asymétrique des cellules sous forme de spots fluorescents situés préférentiellement d'un côté du noyau laisse penser que les bio-conjugués LPC sont internalisés au sein des cellules Hela par endocytose.

Après dépôt à la surface des cellules les molécules sont internalisées dans des vésicules d'endocytose. Ensuite, ces vésicules vont fusionner avec les endosomes de triage. Le contenu des endosomes ainsi formés peut ensuite être transféré soit aux endosomes de recyclage (transport des éléments à la membrane plasmique), soit aux endosomes tardifs qui vont se concentrer autour du noyau des cellules et dont le contenu sera détruit soit après fusion avec les lysosomes, soit par acidification des endosomes eux-mêmes (Figure III.2.).

Ces endosomes tardifs se déplacent dans la cellule grâce aux microtubules, qui sont des fibres du cytosquelette, comme un train sur des rails. Ces microtubules forment un réseau au sein de la cellule dont le point de jonction est le centrosome situé tout près du noyau^{14,15,16}.

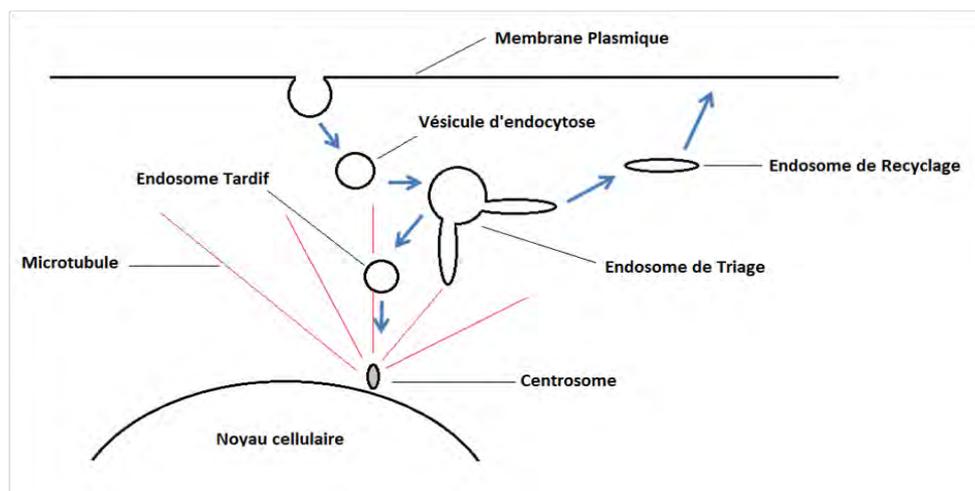


Figure III.2. Représentation schématique des principales étapes de l'endocytose.

La séquestration des bio-conjugués dans les endosomes après endocytose pourrait expliquer le marquage sous forme de spots fluorescents. De plus, le fait que ces spots semblent se concentrer d'un côté du noyau pourrait être expliqué par la concentration des endosomes au niveau des centrosomes des cellules.

Néanmoins, une petite partie des conjugués pourraient également être internalisée dans les cellules par diffusion passive à travers la membrane plasmique ce qui expliquerait le marquage diffus observé dans tous les cas.

III.1.2. Cinétique d'internalisation.

Les précédentes observations ont permis de mettre en évidence l'internalisation des bio-conjugués LPC au sein des cellules Hela. Après une heure d'incubation, les cellules sont très fluorescentes et présentent une grande quantité de bio-conjugué.

De nouveaux tests ont donc été réalisés afin d'étudier la cinétique d'internalisation des bio-conjugués au sein des cellules Hela. Pour cela, les bio-conjugués ont été déposés dans le milieu de culture des cellules maintenues à 37°C directement sous le microscope. Des clichés ont ensuite été réalisés après seulement dix minutes d'incubation puis toutes les cinq minutes (Figure III.3.).

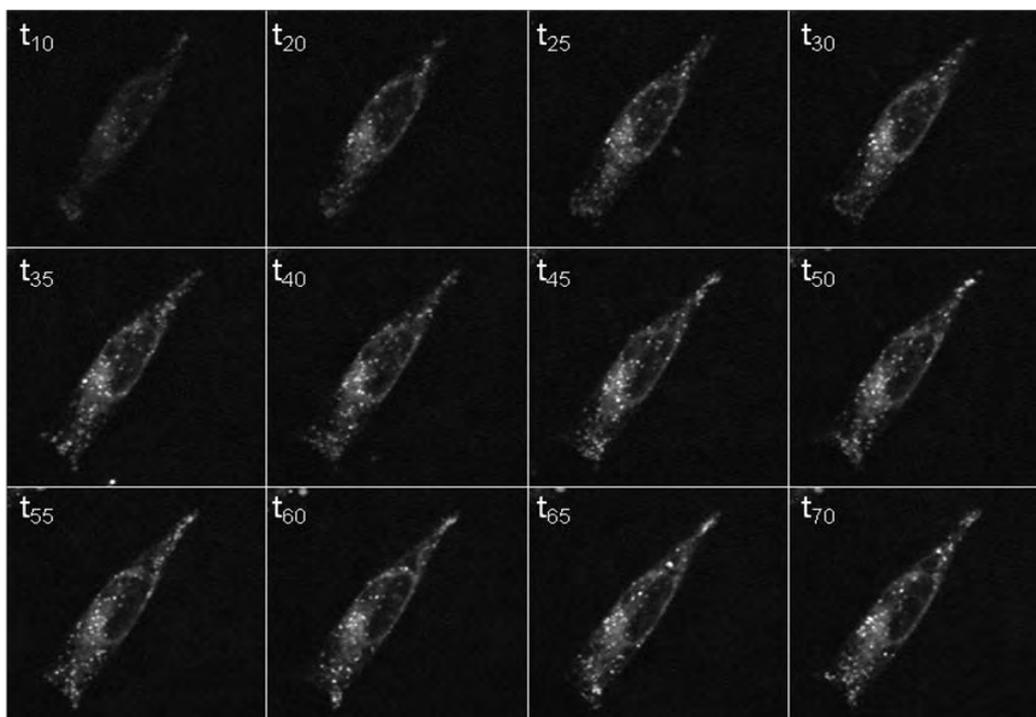


Figure III.3. Suivi de l'internalisation du conjugué 33K-9H à 1 μ M par microscopie de fluorescence au sein d'une cellule Hela (Ex = 491 nm / filtre émission = 675/67 nm).
(Début d'acquisition 10 minutes après dépôt du conjugué – acquisition des images toutes les 5 minutes.)

Les images de la figure III.3. permettent de mettre en évidence une internalisation rapide des bio-conjugués puisque dix minutes après le dépôt, les cellules sont visualisables en fluorescence. Au bout de 20 minutes, la concentration de bio-conjugué au sein de la cellule est très importante. De plus, il semblerait qu'après 35 à 40 minutes la quantité de bio-conjugué dans la cellule n'évolue plus, même si ces observations ne permettent pas de quantifier précisément le bio-conjugué internalisé dans la cellule.

Les résultats obtenus suggèrent donc une cinétique d'internalisation qui présente deux phases : une phase d'internalisation rapide, qui dure environ quarante cinq minutes avant d'atteindre un plateau pendant lequel la quantité de bio-conjugué ne semble plus évoluée.

De plus, des tests de lavage du milieu extracellulaire ont été réalisés avec pour objectif de vérifier :

- Si l'internalisation des bio-conjugués répondait à un équilibre entre les concentrations en bio-conjugué présent dans le milieu extracellulaire et le bio-conjugué internalisé.
- Si en éliminant le bio-conjugué du milieu extérieur, non internalisé, il était possible de faire sortir le bio-conjugué internalisé dans les cellules en déplaçant cet équilibre.

Après avoir incubé les cellules en présence de bio-conjugué pendant une heure à 37°C et sous 5% de CO₂, le milieu extracellulaire a donc été remplacé par du milieu de culture cellulaire neuf.

Ces tests ont montré que les cellules restaient très fluorescentes après lavage. Le bio-conjugué internalisé ne semble donc pas pouvoir être éliminé, mais reste séquestré au sein des cellules.

III.1.3. Effet de la concentration en bio-conjugué.

Il a été mis en évidence lors des tests d'internalisation des conjugués que les cellules présentaient un marquage sous forme de spots très intense et concentrés surtout autour du noyau des cellules, ainsi qu'un marquage sous forme diffus dans le cytoplasme.

Or il est possible que la localisation observée pour les conjugués soit due à un effet de concentration. En effet, les concentrations utilisées lors des tests pourraient entraîner une sur-internalisation saturant les cellules. Le marquage des cellules ainsi obtenu (spots fluorescents très intenses) pourrait masquer un marquage différent, plus faible, comme un marquage membranaire.

C'est pourquoi une étude sur la concentration des bio-conjugués a été réalisée, avec pour objectif :

- De connaître la gamme de concentration permettant une visualisation optimale des cellules
- De vérifier l'influence de la concentration sur la cinétique d'internalisation et la localisation des bio-conjugués LPC au sein des cellules.

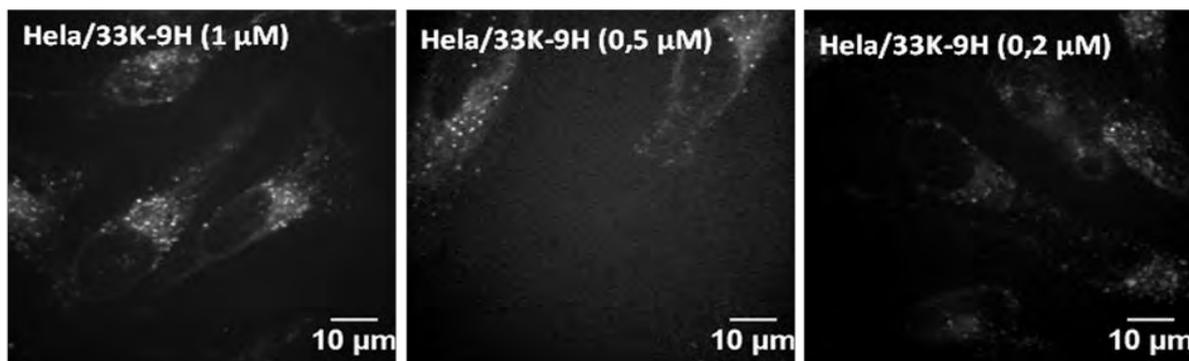


Figure III.4. Clichés de microscopie ($\times 63$) de cellules HeLa après incubation 2h à 37°C et sous 5% de CO_2 en présence de bio-conjugué 33K-9H à 1 ; 0,5 et 0,2 μM
(Ex = 491 nm / filtre émission = 675/67 nm)

Dans tous les cas un marquage cellulaire est observé (Figure III.4.), même lorsque la concentration en conjugué est de 0,2 μM . En revanche, aucune différence notable n'est observée en ce qui concerne la localisation des bio-conjugués dans les cellules. En effet, dans les quatre cas, un marquage sous forme de spots fluorescents, plus ou moins intense en fonction de la concentration en bio-conjugué, est observé ainsi qu'un marquage sous forme diffus du cytoplasme des cellules.

Les résultats semblent donc montrer que les cellules peuvent être parfaitement visualisées lorsque la concentration en bio-conjugué est de 0,2 μM , mais que la concentration optimale semble être 0,5 μM (marquage plus net et meilleur contraste). De plus, les images réalisées ne semblent également pas montrer une influence de la concentration sur la localisation des bio-conjugués dans la cellule.

Ces résultats semblent confirmer une internalisation majoritaire des bio-conjugués par endocytose.

III.1.4. Etude de la voie d'internalisation.

Dans le but de vérifier l'hypothèse selon laquelle les bio-conjugués LPC sont principalement internalisés dans les cellules vivantes par endocytose, des études du mode d'internalisation ont été réalisées.

Ces tests avaient pour objectif de vérifier, par microscopie optique confocale de fluorescence, la colocalisation des bio-conjugués LPC avec des marqueurs vésiculaires et endosomaux fluorescents. Pour cela, deux méthodes peuvent être employées :

- Un marquage des sous-compartiments cellulaires (vésicules ou endosomes) à l'aide d'un marqueur exogène
- Un marquage des sous-compartiments cellulaires par transfection de plasmides codant pour des protéines fluorescentes exprimées spécifiquement dans un type de sous-compartiment¹⁷.

Lors de notre étude, la seconde méthode de marquage a été utilisée afin de vérifier l'hypothèse de l'internalisation par endocytose.

III.1.4.1. Introduction – Présentation des plasmides utilisés.

Un test de colocalisation a donc été réalisé dans le but de confirmer une internalisation des bio-conjugués LPC par la voie de l'endocytose. Ce test a été réalisé par transfection de plasmides codant pour différentes protéines marquées à la GFP (Green Fluorescent Protein) et étant spécifiques des différents types d'endosomes.

Trois types de marquage ont été utilisés lors de ces tests :

- Marquage des endosomes tardifs en utilisant TiVamp-GFP^{18,19} :

La protéine TiVamp-GFP a été utilisée pour étudier la colocalisation des bio-conjugués et des endosomes tardifs. TiVamp, pour Tetanus Neurotoxin Insensitive Vesicles-Associated Membrane Protein, est une protéine présente au sein des endosomes tardifs et connues pour jouer un rôle très important dans la fusion entre ces endosomes avec les lysosomes. Comme expliqué ci-dessus, ces derniers sont impliqués dans la destruction des molécules internalisés par endocytose.

- Marquage des endosomes de recyclage par la Cellubrevin-GFP (Cb-GFP)^{20,21} :

La cellubrevine est une protéine intervenant dans le recyclage de récepteurs impliqués dans l'endocytose de certaines molécules. Après endocytose récepteur-dépendante, les récepteurs sont dissociés de leur ligand et dirigés vers les endosomes de recyclage qui leur permettent de retourner à la membrane plasmique de la cellule pour pouvoir à nouveau jouer leur rôle dans le processus d'endocytose.

- Marquage des endosomes tardifs et des lysosomes par Rab7-GFP²² :

La protéine Rab7 est une protéine qui joue un rôle très important dans le trafic des endosomes tardifs ainsi que dans la formation des lysosomes. C'est pourquoi l'utilisation de cette protéine, marquée par une molécule fluorescente de type GFP, permettra de déterminer si des bio-conjugués internalisés sont séquestrés au sein des endosomes tardifs ou des lysosomes.

La présence de la GFP couplée aux protéines endosomales permettra de discriminer le marquage induit par les protéines fluorescentes et le marquage induit par les bio-conjugués, puisque la GFP présente un pic d'émission de fluorescence étroit centré sur 505/510 nm (cf. annexe 4). Ceci a été vérifié avant de réaliser les différentes observations microscopiques, par visualisation de cellules témoins transfectées avec les protéines fluorescentes et non incubées en présence de bio-conjugués (Figure III.5.). La visualisation des cellules dans le filtre rouge utilisé pour les bio-conjugués (675/67) ne montre aucune fluorescence confirmant que ces protéines marquées à la GFP constituent le bon outil pour la réalisation des tests de colocalisation.

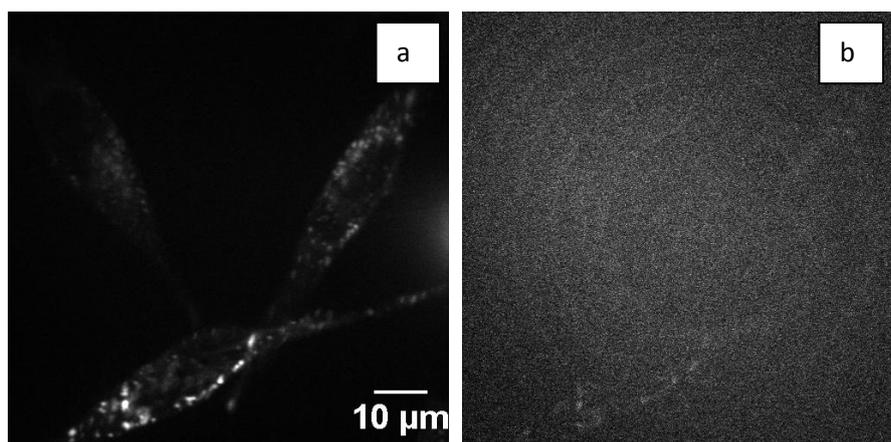


Figure III.5. Clichés de microscopie confocale (x63) des cellules HeLa transfectées avec TiVamp-GFP

a. TiVamp-GFP (Exc = 491 nm – Filtre émission = 525/50 nm)

b. TiVamp-GFP (Exc = 491 nm – Filtre émission = 675/67 nm)

III.1.4.2. Résultats de la colocalisation.

Les cellules de type Hela ont été transfectées avec les trois plasmides pendant vingt-quatre heures afin que toutes les cellules aient le temps d'exprimer les protéines fluorescentes.

Les cellules marquées ont ensuite été incubées pendant deux heures à 37°C et sous 5% de CO₂ en présence du bio-conjugué 33K-9H à la concentration de 0,5 µM avant que des observations par microscopie confocale de fluorescence ne soient réalisées.

Lors des observations par microscopie confocale, il a été mis en évidence une mortalité cellulaire très élevée. En effet, les cellules mortes, restées néanmoins adhérentes, présentaient une fluorescence très importante. En revanche, les cellules saines étaient quant à elles non fluorescentes (Tableau III.1.). Cette mortalité cellulaire pourrait éventuellement être expliquée par une surexpression des protéines fluorescentes au sein des cellules. Cette surexpression protéique pourrait être le résultat d'un temps après la transfection trop long (24 heures) ou d'une quantité d'ADN transfectée trop importante.

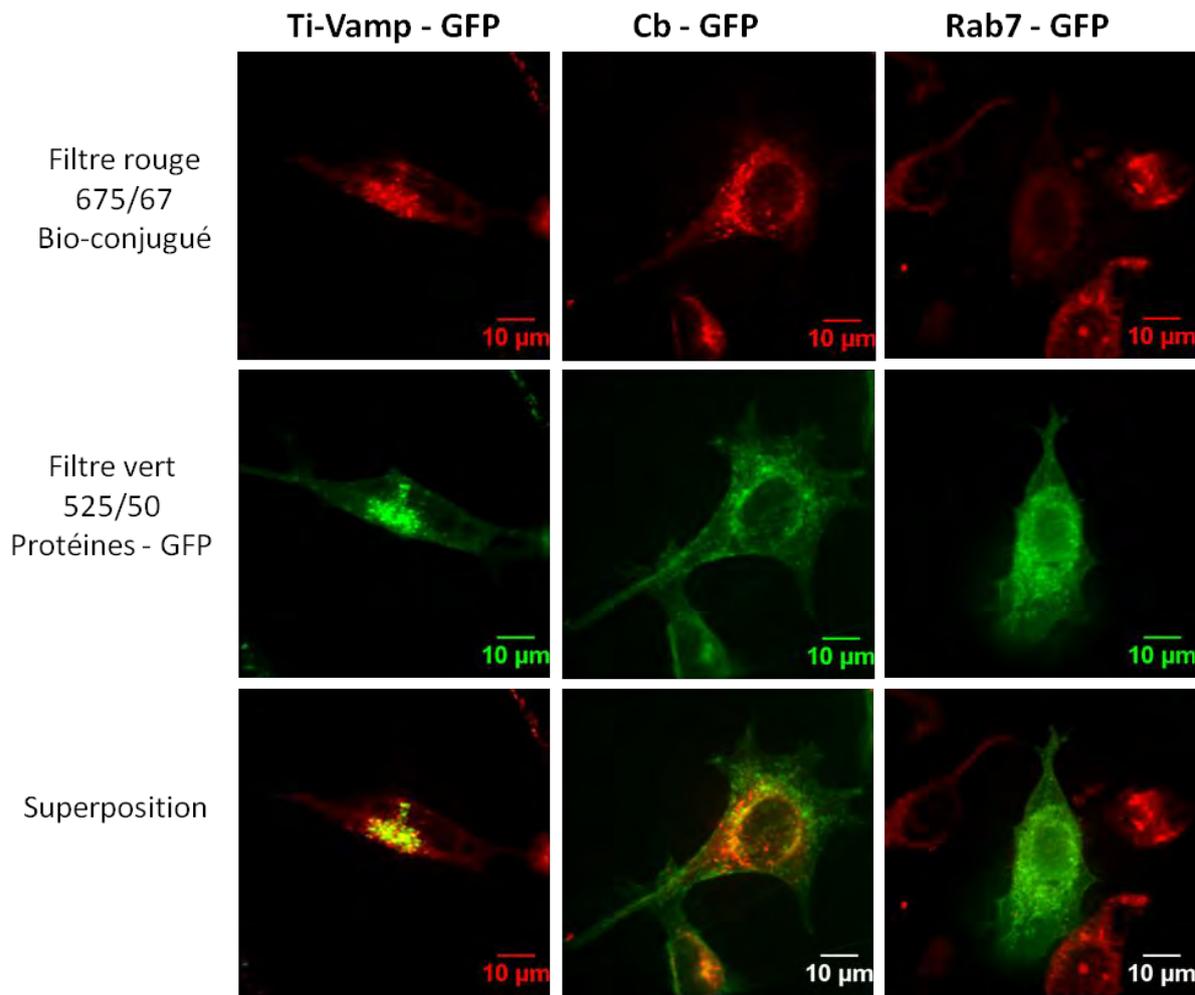
De plus, nous avons observé, d'une manière générale, une mortalité cellulaire plus importante dans le cas où les cellules ont été transfectées avec Rab7-GFP et Cb-GFP. Or, les conditions de transfection étaient les mêmes pour les trois plasmides (durée de transfection et quantité d'ADN transfectée), ce qui suggère que la transfection de Rab7-GFP et Cb-GFP entraîne légèrement plus de mort que celle de TiVamp-GFP.

Tableau III.1. Estimation qualitative de la mortalité cellulaire et de la colocalisation observées après transfection des plasmidesⁱ.

	% cellules viables	% cellules viables fluo	% cellules mortes fluo	% cellules viables non fluo	Niveau d'expression protéine	Colocalisation
Témoins	++++	-	-	-	-	/
TiVamp-GFP	+++	+	+++	++	++	++
Cb-GFP	++	+	+++	+	++	-
Rab7-GFP	++	+	+++	+	++	+

Néanmoins, certaines cellules marquées en fluorescence et saines ont tout de même permis d'étudier la colocalisation des bio-conjugués avec les différents marqueurs endosomaux : mise en évidence d'une colocalisation partielle des bio-conjugués dans les cellules avec les endosomes tardifs. En effet, les marquages observés dans le cas des bio-conjugués et de TiVamp-GFP notamment sont très similaires (Figure III.6.).

ⁱ Etude statistique (estimation qualitative) sur différentes cellules observées dans différents champs de microscopie.



NB : Contrairement à l'image de superposition de Ti-Vamp-GFP, les images de Cb-GFP et Rab7-GFP ont été traitées de façon à faire apparaître les deux marquages (rouge et vert) afin de bien visualiser l'absence de colocalisation

Figure III.6. Clichés de microscopie confocale de fluorescence ($\times 63$) des cellules HeLa exprimant les différents plasmides et incubées en présence du bio-conjugué 33K-9H (0,5 μM) pendant 2 heures à 37°C et sous 5% de CO_2 . Visualisation des bio-conjugués (Exc = 491 nm – Em = 675/67 nm), visualisation des protéines-GFP (Ex = 491 nm – Em = 525/50 nm). Le marquage jaune correspond à la superposition du rouge et du vert, témoignant d'une colocalisationⁱⁱ.

Des marquages différents ont été observés en fonction des protéines utilisées :

- Dans le cas de TiVamp-GFP, un marquage sous forme de spots fluorescents très nets et peu de marquage diffus est observé, alors dans le cas du bio-conjugué, le marquage se fait à la fois sous forme de spots mais également de manière diffuse.
- Les images obtenues dans le cas de Rab7-GFP sont très proches de celles obtenues pour TiVamp-GFP c'est-à-dire un marquage diffus du cytoplasme couplé à un marquage sous forme de spots fluorescents autour du noyau des cellules.
- Enfin, les résultats obtenus avec Cb-GFP semblent confirmer une faible colocalisation des bio-conjugués LPC avec les endosomes de recyclage. En effet, dans le cas de Cb-GFP,

ⁱⁱ Images représentatives des différentes images obtenues et traitées

un marquage diffus est majoritairement observé couplé à quelques spots fluorescents situés autour du noyau et au niveau de la membrane plasmique. Ce marquage des membranes plasmiques peut être expliqué par le fait qu'il s'agisse d'endosomes de recyclage qui sont donc destinés à réintégrer la membrane des cellules. En revanche, un second marquage plutôt surprenant est observé, puisqu'il semblerait que Cb-GFP marque certains filaments de la cellule²⁰. Ces filaments pourraient éventuellement correspondre aux microtubules permettant le transport des endosomes dans la cellule. Or Cb-GFP marque les endosomes de recyclage qui ne migrent pas en direction du noyau cellulaire, contrairement aux endosomes tardifs, mais qui sont recyclés au niveau de la membrane plasmique.

L'ensemble de ces résultats semblent donc suggérer une colocalisation des bio-conjugués avec les endosomes tardifs.

III.1.5. Essais préliminaires d'imagerie à deux photons des cellules Hela incubées en présence de bio-conjugué LPC.

III.1.5.1. Principe et avantage de l'imagerie à deux photons.

Contrairement à l'imagerie de fluorescence classique où les chromophores sont excités par un seul photon, la microscopie à deux photons est basée sur l'absorption quasi simultanée de deux photons par les molécules fluorescentes. Le résultat final reste le même, à savoir l'émission d'un photon de fluorescence (Figure III.7.)^{23,24,25}.

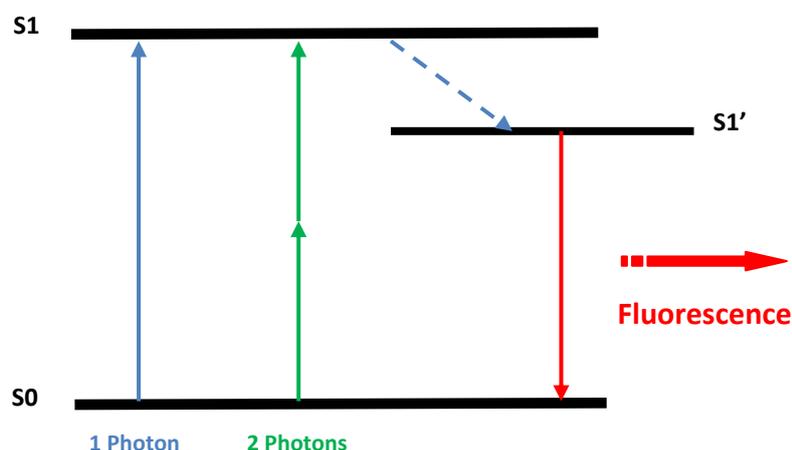


Figure III.7. Représentation schématique des niveaux d'énergie d'une molécule fluorescente. La flèche bleue correspond à l'absorption à 1 photon, les flèches vertes à l'absorption à 2 photons, la flèche en pointillés représente le passage à un niveau d'énergie intermédiaire qui précède l'émission d'un photon de fluorescence (flèche rouge).

La microscopie à deux photons présente divers avantages par rapport à la microscopie mono-photon classique^{24,25} :

- Un grand pouvoir de pénétration dans les tissus via l'utilisation de photons de haute longueur d'onde (Infra-Rouge)
- Une diminution de l'absorption des tissus vivants, maximale pour des longueurs d'onde de l'ordre de 450 à 500 nm (notamment l'hémoglobine et la mélanine)
- Une augmentation de la résolution des images obtenues par rapport à la microscopie monophotonique à champ large
- Une diminution non négligeable de la phototoxicité

Il s'agit donc d'une technique d'imagerie en pleine expansion, et potentiellement très intéressante pour l'étude de tissus et d'organismes vivants.

III.1.5.2. Imagerie à deux photons de cellules Hela incubées en présence de bio-conjugué 33K-9H.

Des essais préliminaires d'imagerie des cellules par microscopie à deux photons ont été réalisés en utilisant le bio-conjugué 33K-9H, en collaboration avec Christophe Vanbelle (CeCIL, SFR Lyon-EST). L'objectif de ces essais était de vérifier la capacité des bio-conjugués à émettre de la fluorescence après avoir été excités par deux photons.

NB : Le chromophore JM086 seul présente un maximum d'absorption à 2 photons supérieur à 1 000 nm.

Les cellules Hela ont donc été incubées pendant plus d'une heure en présence du bio-conjugué 33K-9H à 37°C et sous 5% de CO₂, puis observées en microscopie. Les images ne sont pas montrées dans ce manuscrit car elles nécessitent encore d'être interprétées plus en détails (cf. annexe 5).

III.2. Internalisation du bio-conjugué 33K-9H dans différents types cellulaires.

Il a été montré précédemment que les bio-conjugués LPC sont internalisés rapidement au sein de cellules type Hela.

De nouveaux tests d'internalisation ont été réalisés, en utilisant cette fois-ci d'autres types cellulaires afin de vérifier si l'internalisation des conjugués dans les cellules pouvait varier en fonction de la forme et de la lignée cellulaire.

Différentes lignées cellulaires ont été testées lors de cette étude :

- Les cellules de type Jurkat (Lymphocyte T) : contrairement aux cellules Hela, ce sont des cellules non adhérentes, rondes et tendues dont la membrane présente un rayon de courbure très élevé, c'est-à-dire que la membrane est très courbée. Il n'est donc pas évident que les bio-conjugués soient internalisés aussi facilement que dans le cas des cellules Hela.

- Les cellules de type neuroblastomes (SH-SY5Y) : comme les cellules Hela ce sont des cellules adhérentes. Ces cellules neuronales peuvent présenter un fonctionnement différent des cellules Hela, notamment au niveau de l'endocytose. Une étude a été réalisée sur des cellules SH-SY5Y différenciées et non différenciées puisque, suite à la différenciation, les cellules peuvent présenter une activité endocytotique différente.

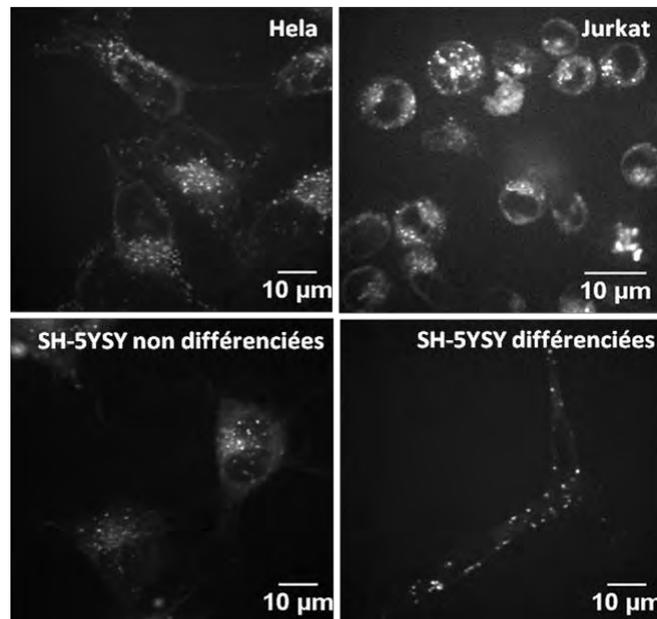


Figure III.8. Clichés de microscopie confocale de fluorescence des différents types cellulaires incubés en présence de 33K-9H à 1 μ M (0,5 μ M dans le cas des SH différenciées) pendant 30 min à 1 heure (37°C, 5% de CO₂) (Exc = 491 nm – filtre émission = 675/67).

Tous les types cellulaires testés présentent le même type de marquage (Figure III.8.) :

- Un marquage diffus du cytoplasme des cellules
- Un marquage très intense sous forme de spots fluorescents se situant préférentiellement autour du noyau.

Les cinétiques d'internalisation des bio-conjugués LPC dans tous ces types cellulaires se sont avérées rapides, très proches de celles observées dans le cas des cellules Hela. Il semblerait donc que l'internalisation des bio-conjugués LPC au sein des cellules ne dépende pas de la lignée cellulaire et qu'elle se fasse par endocytose préférentiellement.

Les différents tests présentés par la suite ont donc été réalisés sur cellules de type Hela, par commodité et sachant que les phénomènes d'internalisation et de localisation pourraient être transposés aux autres types cellulaires.

III.3. Etude de l'influence de la structure des bio-conjugués sur l'internalisation cellulaire.

Les différents tests d'internalisation du bio-conjugué 33K-9H ont permis de mettre en évidence une internalisation rapide (inférieure à dix minutes) se faisant préférentiellement par endocytose, ainsi qu'un marquage diffus dans le cytoplasme et la présence de spots fluorescents localisés autour du noyau cellulaire, et ce, quelque soit la lignée utilisée.

L'objectif des tests présentés dans cette partie était d'étudier l'influence de la structure des bio-conjugués LPC sur l'internalisation d'une part, et la localisation d'autre part, en utilisant des cellules Hela.

III.3.1. Influence de la masse molaire du polymère et de la densité en chromophores.

L'influence de la longueur de la chaîne polymère a été étudiée puisque ce paramètre peut avoir une importance non négligeable sur la disponibilité du lipide en extrémité de chaîne pour l'interaction avec les membranes plasmiques des cellules. En effet, une chaîne polymère présentant une longueur importante peut, après repliement, masquer le lipide et empêcher son interaction avec les double-couches lipidiques membranaires. De plus, en modulant la longueur de la chaîne polymère, il est possible de jouer sur la balance « hydrophile/hydrophobe » des bio-conjugués. Un conjugué qui présente une chaîne polymère de longueur importante sera plus hydrophile qu'un conjugué présentant une chaîne polymère courte, sachant que la chaîne polymère apporte de l'hydrophilie aux conjugués et que le lipide et les chromophores ont plutôt tendance à rendre les bio-conjugués hydrophobes.

Des tests d'internalisation ont donc été réalisés en utilisant quatre bio-conjugués hydrolysés (33K-9H, 20K-4H, 20K-11H et 8K-4H), synthétisés à partir de chaînes polymères de masses molaires différentes (Tableau III.2.).

Tableau III.2. Propriétés physico-chimiques des bio-conjugués utilisés pour étudier l'influence de la masse molaire du polymère et de la densité en chromophores sur l'internalisation au sein des cellules Hela.

	M_n chaîne polymère (g.mol ⁻¹)	n_c	n_{COO^-}	D_c (%)	$N_{unités}$	D_{COO^-} (%)
33K-9H 28 000 g.mol ⁻¹	33 200	9	78	4	24	36
20K-4H 17 300 g.mol ⁻¹	20 300	4	49	3	33	37
20K-11H 19 700 g.mol ⁻¹	20 300	11	42	8	12	32
8K-4H 7 800 g.mol ⁻¹	7 900	4	15	9	12	37

- n_c = Nombre moyen de chromophores par chaîne polymère
 n_{COO^-} = Nombre moyen de charges négatives par chaîne polymère
 D_c = Densité en chromophores des bio-conjugués LPC ($D_c = [n_c / DP_n] \times 100$)
 D_{COO^-} = Densité en charges des bio-conjugués LPC ($D_{COO^-} = [n_{COO^-} / DP_n] \times 100$)
 $N_{unités}$ = Nombre moyen d'unités monomères entre deux chromophores

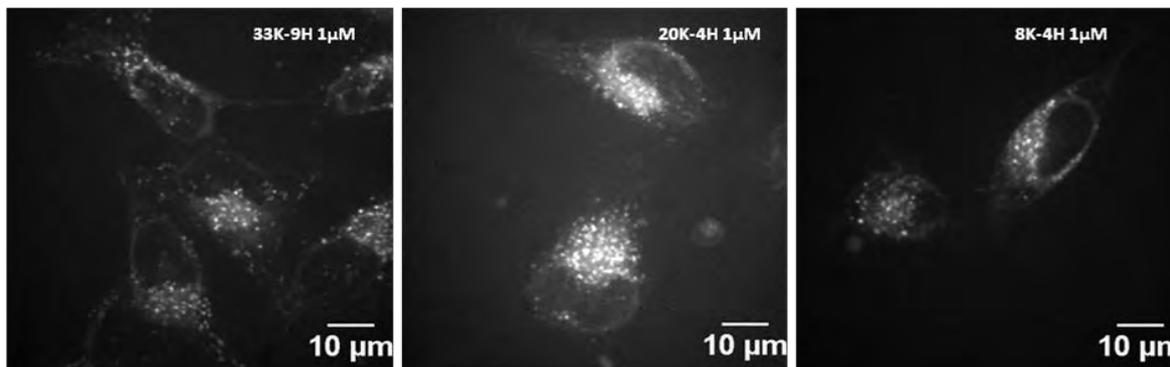


Figure III.9. Clichés de microscopie confocale de fluorescence ($\times 63$) réalisés sur cellules HeLa incubées pendant 1h30 à 37°C et sous 5% de CO₂ en présence de bio-conjugués 33K-9H, 20K-4H, 8K-4H à la concentration de 1µM (Ex = 491 nm / filtre émission = 675/67 nm)

Quelque soit le bio-conjugué, il ne semble pas y avoir d'influence directe de la longueur de la chaîne polymère des conjugués sur l'internalisation et la localisation des conjugués (Figure III.9.). En effet, on retrouve un marquage identique à celui habituellement observé.

Les résultats obtenus dans les trois cas laissent penser que :

- La longueur de la chaîne polymère a peu d'influence sur l'internalisation et la localisation des bio-conjugués dans les cellules
- Une longueur de chaîne de 8 000 g.mol⁻¹ est peut-être encore trop importante pour observer un effet.

Afin de confirmer cela, il pourrait être intéressant de synthétiser de nouveaux bio-conjugués présentant une chaîne polymère très courte (de l'ordre de 2 000 g.mol⁻¹).

De même, l'influence de la densité en chromophores sur l'internalisation et la localisation des bio-conjugués a été évaluée car elle peut jouer un rôle très important sur la balance « hydrophile/hydrophobe » des bio-conjugués, ainsi que sur la conformation que ces derniers adoptent en solution.

Selon la nature du bio-conjugué, celui aura plus tendance :

- Soit à rester en solution dans un milieu aqueux (cas d'un bio-conjugué hydrophile) plutôt qu'à aller interagir avec les membranes cellulaires de nature plutôt hydrophobe.
- Soit à interagir plus facilement avec les bicouches lipidiques, très hydrophobes au centre (cas d'un bio-conjugué hydrophobe). En effet, généralement les marqueurs utilisés pour le marquage des membranes cellulaires sont des molécules hydrophobes²⁶ (peuvent également entraîner le marquage d'organites internes de la cellule comme le réticulum endoplasmique).

Des tests d'internalisation ont donc été réalisés en utilisant des bio-conjugués (20K-4H et 20K-11H) présentant un nombre moyen de chromophores couplés par chaîne

polymère différent mais synthétisés à partir de chaînes polymères de masses molaires identiques (Tableau III.2.).

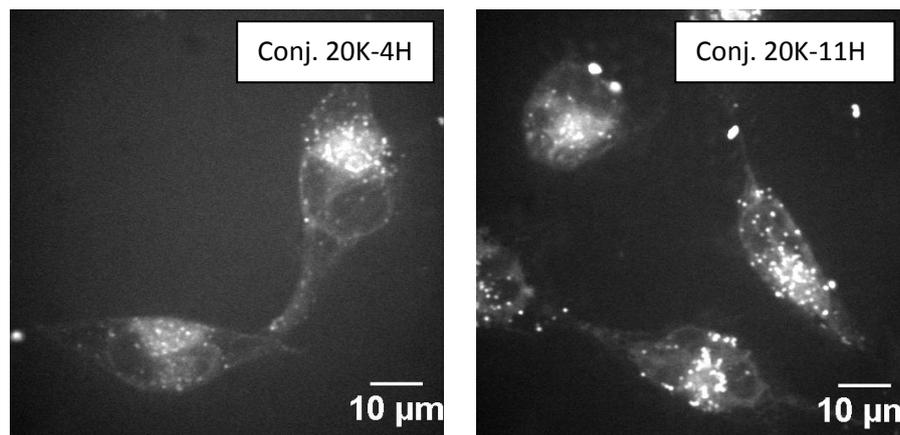


Figure III.10. Clichés de microscopie confocale en fluorescence de cellules HeLa incubées 2h, à 37°C et sous 5% de CO₂ en présence de bio-conjugués 20K-4H et 20K-11H à 1 µM
(Exc = 491 nm – Filtre émission = 675/67 nm)

Un marquage des cellules sous forme de spots fluorescents très intense situés très proche du noyau ainsi qu'un marquage diffus du cytoplasme est observé (Figure III.10.). On notera également la présence d'agrégats fluorescents de bio-conjugués dans le cas du 20K-11H en suspension dans le milieu (peut être expliquée par la densité élevée de chromophores qui rend le bio-conjugué plus hydrophobe).

Aucune différence n'a été observée en ce qui concerne la cinétique d'internalisation et la localisation des bio-conjugués dans les cellules.

Les observations réalisées lors de cette étude ne permettent pas d'affirmer que la densité en chromophores des bio-conjugués ait une réelle influence sur l'internalisation et la localisation des conjugués. En revanche ce paramètre semble jouer un rôle important dans le comportement des bio-conjugués en milieu aqueux, puisque des agrégats sont formés en solution, même à faible concentration, dans le cas où la densité en chromophores des bio-conjugués est très élevée.

III.3.2. Influence du post-traitement et de la densité de charges.

Dans un second temps, l'influence de deux autres paramètres a été étudiée : le post-traitement des bio-conjugués et la densité de charge. Ces deux paramètres sont étroitement liés puisque la présence de charge sur les bio-conjugués LPC résulte d'un post-traitement par hydrolyse.

Les deux post-traitements (hydrolyse et capping par l'AEM) permettent d'obtenir des bio-conjugués LPC différents en terme de charge globale notamment. En effet, en ce qui concerne les bio-conjugués hydrolysés, les fonctions réactives résiduelles sont transformées en fonction carboxylates qui, à pH physiologique, sont chargées négativement. En revanche,

les bio-conjugués cappés avec l'AEM, sont globalement neutres (si on ne tient pas compte de la charge apportée par la partie polaire du lipide).

La présence ou non des charges sur les bio-conjugués pourrait donc entraîner des comportements différents de ces derniers en milieu cellulaire :

- La présence de charge le long de la chaîne polymère influe sur la conformation des bio-conjugués en solution par répulsion électrostatique « intra-chaîne »
- Un phénomène de répulsion électrostatique pourrait également être observé entre les bio-conjugués hydrolysés et les membranes cellulaires également chargées négativement

En fonction de la présence ou non de charges sur les bio-conjugués (et donc de la conformation), différentes interactions pourraient être observées entre ces derniers et les cellules (endocytose ou diffusion passive à travers les membranes). De même, la présence de charges pourrait empêcher toute interaction entre les cellules et les bio-conjugués.

Deux bio-conjugués (33K-9H et 33K-9AEM) ont donc été testés (Tableau III.3.). Ces bio-conjugués présentent une taille de chaîne polymère et un nombre moyen de chromophores par chaîne polymère similaires. La seule différence entre ces deux bio-conjugués réside dans le post-traitement qui leur a été appliqué.

Tableau III.3. Propriétés physico-chimiques des bio-conjugués utilisés pour étudier l'influence du post-traitement et de la densité en charge des bio-conjugués sur l'internalisation au sein des cellules Hela.

	M_n chaîne polymère (g.mol ⁻¹)	n_c	n_{COO^-}	D_c (%)	$N_{unités}$	D_{COO^-} (%)
33K-9H 28 000 g.mol ⁻¹	33 200	9	78	4	24	36
33K-9AEM 36 660 g.mol ⁻¹	33 200	9	0	4	24	0

n_c = Nombre moyen de chromophores par chaîne polymère

n_{COO^-} = Nombre moyen de charges négatives par chaîne polymère

D_c = Densité en chromophores des bio-conjugués LPC ($D_c = [n_c / DP_n] \times 100$)

D_{COO^-} = Densité en charges des bio-conjugués LPC ($D_{COO^-} = [n_{COO^-} / DP_n] \times 100$)

$N_{unités}$ = Nombre moyen d'unités monomères entre deux chromophores

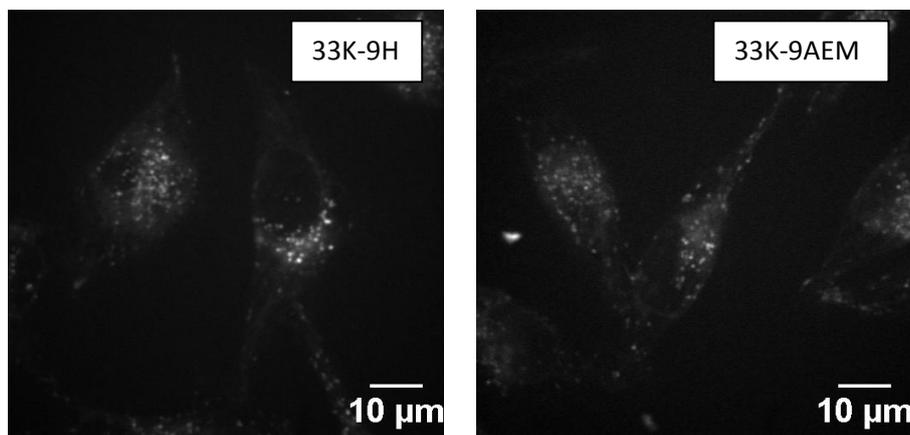


Figure III.11. Clichés de microscopie confocale ($\times 63$) réalisés sur des cellules *HeLa* incubées 1h30 (37°C et sous 5% de CO_2) en présence de bio-conjugué 33K-9H et 33K-9AEM à $1\ \mu\text{M}$ ($\text{Ex} = 491\ \text{nm}$ / filtre émission = $675/67\ \text{nm}$).

Les images obtenues montrent un marquage identique dans les deux cas (Figure III.11.). Aucune différence n'est réellement observée en ce qui concerne la dynamique d'internalisation des bio-conjugués dans les cellules, en revanche, le bio-conjugué 33K-9H semblait être plus brillant lors des observations.

Ces résultats suggèrent que le post-traitement réalisé a peu d'influence directe sur l'internalisation et la localisation des bio-conjugués dans les cellules. Il est également possible d'imaginer que les charges présentes sur le bio-conjugué 33K-9H aient été écartées par la présence dans le milieu de culture cellulaire de nombreuses molécules chargées telles que des ions ou même que des protéines aient pu complexer le bio-conjugué 33K-9H. Dans ce cas là, l'influence de la présence de charges sur l'interaction entre les bio-conjugués et les cellules vivantes n'aurait pas pu être vérifiée.

III.3.3. Influence de la nature du chromophore.

Il a été mis en évidence que la structure des bio-conjugués LPC ne semble pas influencer de manière significative l'internalisation et la localisation de ces derniers au sein des cellules.

En revanche, il s'est avéré intéressant de vérifier l'influence de la nature des chromophores couplés sur ces mêmes paramètres. En effet, la nature des chromophores a une influence directe sur l'hydrophobie des bio-conjugués synthétisés et donc sur leurs possibles interactions avec les membranes cellulaires.

Ainsi, trois bio-conjugués LPC portant des chromophores différents ont été comparés (Tableau III.4.). Les chromophores utilisés sont de natures très différentes :

- Le JM086 : chromophore non chargé, très hydrophobe²⁷
- Le F647H : chromophore commercial de la gamme FluoProbe, présentant 3 charges négatives et soluble en milieu aqueux (Annexe 6 : spectres absorption/émission)

- Le Lucifer Yellow Cadaverine (LY) : chromophore commercial présentant 2 charges négatives et soluble également en milieu aqueux (Annexe 6 : spectres absorption/émission)

Ces trois bio-conjugués ont donc été utilisés pour des tests d'internalisation au sein de cellules Hela (Figure III.12.).

Tableau III.4. Propriétés physico-chimiques des bio-conjugués utilisés pour étudier l'influence de la nature des chromophores sur l'internalisation au sein des cellules Hela.

	M_n chaîne polymère (g.mol ⁻¹)	n_c	n_{COO^-}	D_c (%)	$N_{unités}$	D_{COO^-} (%)
20K-4H (JM086) 17 300 g.mol ⁻¹	20 300	4	49	3	33	37
647H-4H* 18 100 g.mol ⁻¹	20 300	3	59	2,5	44	44
33K-9H(LY)** 26 000 g.mol ⁻¹	33 200	9	96	4	24	44

n_c = Nombre moyen de chromophores par chaîne polymère

n_{COO^-} = Nombre moyen de charges négatives par chaîne polymère (charges apportées par la chaîne polymère + charges du chromophore)

D_c = Densité en chromophores des bio-conjugués LPC ($D_c = [n_c / DP_n] \times 100$)

D_{COO^-} = Densité en charges des bio-conjugués LPC ($D_{COO^-} = [n_{COO^-} / DP_n] \times 100$)

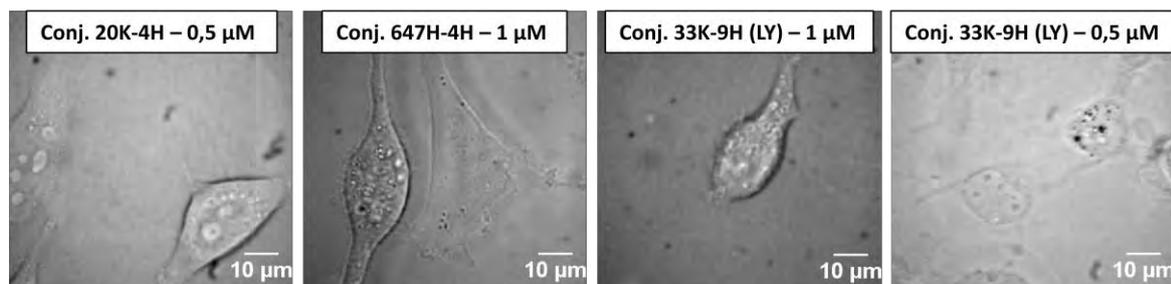
$N_{unités}$ = Nombre moyen d'unités monomères entre deux chromophores

* = Bio-conjugué synthétisé par William Lacour (Stage M2)

** = Bio-conjugué synthétisé par Arij Harzallah (Stage M2)

Dans le cas des bio-conjugués LPC synthétisés à partir des chromophores JM086 et F647H, le marquage des cellules est généralement similaire, sous forme de spots fluorescents et de marquage diffus du cytoplasme (Figure III.12).

Transmission



Fluorescence

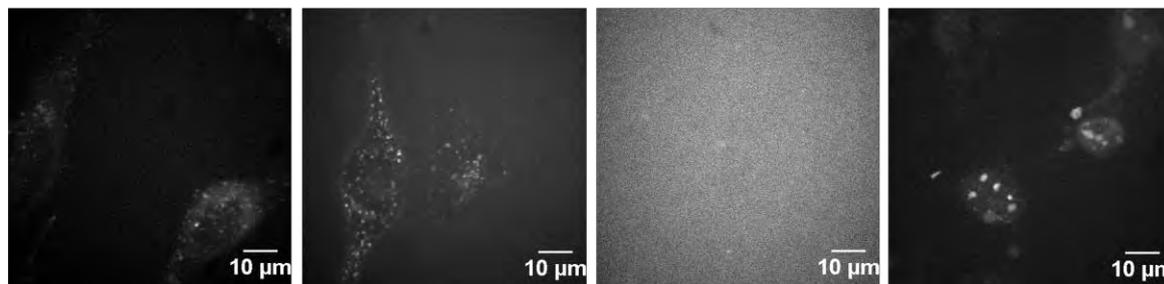


Figure III.12. Clichés de microscopie confocale ($\times 63$) réalisés sur des cellules *HeLa* incubées 2h (37°C et sous 5% de CO_2) en présence bio-conjugués 20K-4H ($0,5\ \mu\text{M}$), 647H-4H ($1\ \mu\text{M}$) et 33K-9H(LY) (1 et $0,5\ \mu\text{M}$).

20K-4H : $Ex = 491\ \text{nm}$ / filtre émission = 675/67 nm

647H-4H : $Ex = 635\ \text{nm}$ / filtre émission = 725/150 nm

33K-9H(LY) : $Ex = 491\ \text{nm}$ / filtre émission = 525/50 nm

En revanche, dans le cas des bio-conjugués qui portent le chromophore LY, deux types de marquages ont été observés. En effet, dans un premier temps, un marquage des sous-compartiments du noyau de certaines cellules a été observé : le bio-conjugué 33K-9H (LY) a permis le marquage des nucléoles des cellules. Les nucléoles sont des sous-compartiments nucléaires impliqués notamment dans la transcription des ARN ribosomiques^{28,29}. Il s'agit d'un marquage surprenant dans la mesure où habituellement les noyaux des cellules ne sont pas marqués et que seulement quelques cellules présentent ce genre de marquage. Un second test d'internalisation de ce bio-conjugué a été réalisé dans le but de confirmer ces résultats. Cependant, lors de ce second test, aucun marquage des cellules n'a été observé. Il serait intéressant de réaliser un troisième test d'internalisation dans le but de pouvoir conclure sur le comportement du bio-conjugué 33K-9H (LY).

Ces résultats semblent suggérer que la nature du chromophore joue un rôle dans le processus d'internalisation des bio-conjugués. Cependant, les résultats obtenus sont surprenants puisque dans le cas du chromophore F647H les cellules sont marquées alors que dans le cas du chromophore LY elles ne le sont pas. Il s'agit pourtant de deux chromophores chargés négativement, hydrosolubles et couplés sur des bio-conjugués dont la densité en charges est similaire (un comportement similaire était attendu).

III.3.4. Influence de la présence du lipide en extrémité de chaîne et de la présence d'un bras espaceur.

L'influence de la présence du lipide en extrémité de chaîne polymère a également été étudiée. Pour cela, un nouveau bio-conjugué a été synthétisé (34K-9H ref), similaire au bio-conjugué 33K-9H mais ne portant pas de lipide en extrémité de chaîne (Tableau III.5.).

Tableau III.5. Propriétés physico-chimiques des bio-conjugués utilisés pour étudier l'influence de la présence du lipide en extrémité de chaîne polymère sur l'internalisation au sein des cellules Hela.

	M_n chaîne polymère (g.mol ⁻¹)	Présence du lipide	n_c	n_{COO-}	D_c (%)	$N_{unités}$	D_{COO-} (%)
33K-9H 28 000 g.mol ⁻¹	33 200	Oui	9	78	4	24	36
34K-9H ref* 28 600 g.mol ⁻¹	34 200	Non	9	81	4	25	36

n_c = Nombre moyen de chromophores par chaîne polymère

n_{COO-} = Nombre moyen de charges négatives par chaîne polymère

D_c = Densité en chromophores des bio-conjugués LPC ($D_c = [n_c / DP_n] \times 100$)

D_{COO-} = Densité en charges des bio-conjugués LPC ($D_{COO-} = [n_{COO-} / DP_n] \times 100$)

$N_{unités}$ = Nombre moyen d'unités monomères entre deux chromophores

* = Bio-conjugué synthétisé par William Lacour (Stage M2)

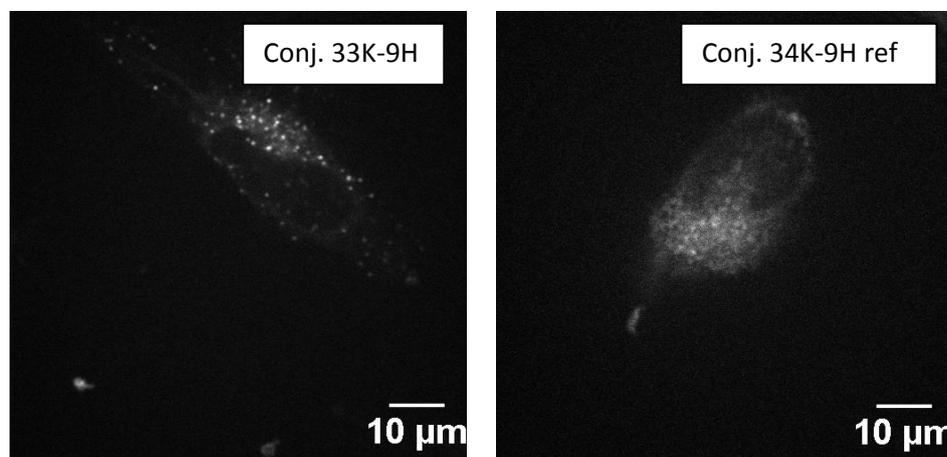


Figure III.13. Clichés de microscopie confocale (x63) réalisés sur des cellules Hela incubées 2h (37°C et sous 5% de CO₂) en présence bio-conjugués 33K-9H et 34K-9H ref à 0,5 μM (Ex = 491 nm / filtre émission = 675/67 nm).

Toutes les cellules étaient marquées, comme dans le cas du bio-conjugué 33K-9H. Les images obtenues (Figure III.13.) ne montrent aucune différence entre le marquage induit par le bio-conjugué 33K-9H et le bio-conjugué 34K-9H ref.

Ces résultats suggèrent que la présence du lipide en extrémité de chaîne polymère n'a pas d'influence sur l'internalisation et la localisation des bio-conjugués LPC à base du chromophore JM086. Ceci pourrait être expliqué par le fait que le lipide soit inaccessible

pour les membranes cellulaires suite au repliement de la longue chaîne polymère des bio-conjugués (33 200 g.mol⁻¹). Encore une fois, il serait intéressant de synthétiser de nouveaux bio-conjugués LPC à partir de chaînes polymères plus courtes (de l'ordre de 2 000 g.mol⁻¹) ce qui pourrait permettre de rendre le lipide plus accessible.

En revanche, des tests d'internalisation réalisés avec deux autres bio-conjugués qui portent le chromophore commercial F647H (Tableau III.6.) ont permis d'obtenir des résultats différents.

Tableau III.6. Liste et propriétés physico-chimique des nouveaux bio-conjugués synthétisés par William Lacour et évalués en milieu biologique sur cellules vivantes.

	M_n chaîne polymère (g.mol ⁻¹)	Présence du lipide sur la chaîne	n_c	n_{COO^-}	D_c (%)	$N_{unités}$	D_{COO^-} (%)
647H-4H 18 100 g.mol ⁻¹	20 300	Oui	4	61	3	44	46
647H-4H ref 18 400 g.mol ⁻¹	19 400	Non	4	59	3	32	46

n_c = Nombre moyen de chromophores par chaîne polymère

n_{COO^-} = Nombre moyen de charges négatives par chaîne polymère (charges apportées par la chaîne polymère + charges du chromophore)

D_c = Densité en chromophores des bio-conjugués ($D_c = [n_c / DP_n] \times 100$)

D_{COO^-} = Densité en charges des bio-conjugués ($D_{COO^-} = [n_{COO^-} / DP_n] \times 100$)

$N_{unités}$ = Nombre moyen d'unités monomères entre deux chromophores

Les deux bio-conjugués (Tableau III.6.) ont été utilisés pour des tests d'internalisation également dans le but de vérifier une influence de la présence du lipide situé en extrémité de la chaîne polymère sur l'internalisation et la localisation des bio-conjugués.

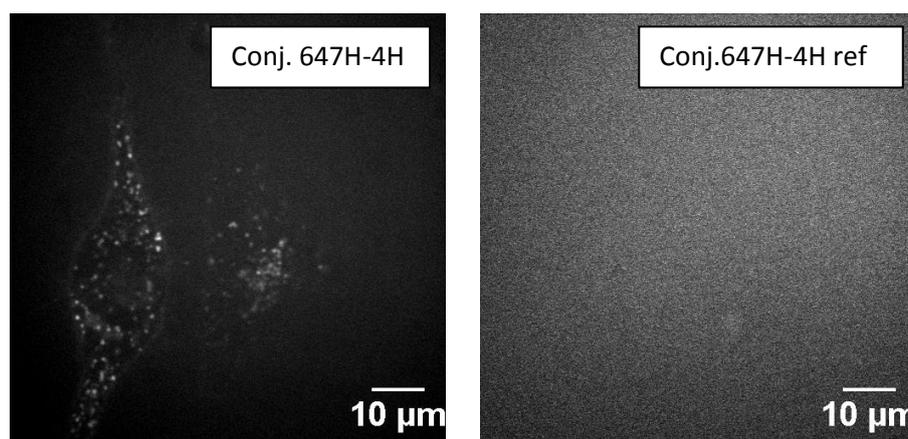


Figure III.14. Clichés de microscopie confocale (x3) réalisés sur des cellules HeLa incubées 2h à 37°C et sous 5% de CO₂ en présence de bio-conjugués 647H-4H et 647H-4H ref à 1 µM (Ex = 635 nm / filtre émission = 725/150 nm).

Les images obtenues par William Lacour (Figure III.14.) permettent de mettre en évidence que dans le cas du bio-conjugué 647H-4H ref sans lipide, aucune internalisation

n'est observée alors que dans le cas du bio-conjugué 647H-4H avec lipide, les cellules Hela présentent un marquage similaire à celui observé dans le cas des bio-conjugués LPC-JM086. En ce qui concerne les bio-conjugués LPC-F647H, la présence du lipide en extrémité de chaîne polymère semble donc indispensable à leur internalisation dans les cellules vivantes.

Ces résultats pourraient être expliqués par une modification de l'hydrophobie des bio-conjugués. En l'absence de lipide, les bio-conjugués obtenus après couplage du chromophore sont très hydrophiles et ont peut-être plus tendance à rester en solution dans le milieu extracellulaire qu'à aller interagir avec les membranes cellulaires. En revanche, la présence du lipide en extrémité de chaîne polymère apportant de l'hydrophobie aux bio-conjugués leur permet d'interagir plus facilement avec les membranes cellulaires. Dans le cas des bio-conjugués LPC-JM086, l'absence du lipide en extrémité de chaîne est compensée par la nature hydrophobe du chromophore utilisé.

Enfin, l'influence de la présence d'un bras espaceur sur le lipide a également été étudiée. Un nouveau bio-conjugué (17K-4H) portant le même lipide et en moyenne quatre chromophores par chaîne polymère a été synthétisé (Tableau III.7.). Cependant, le lipide couplé sur ce nouveau bio-conjugué ne présente pas de bras espaceur entre le groupe phosphate de la tête polaire et la fonction amine permettant le couplage au polymère (Figure III.15.). Le but était de vérifier si le fait que la chaîne polymère soit directement couplée sur la tête polaire, très proche du groupement phosphate, pouvait avoir une influence sur l'interaction entre les bio-conjugués et les cellules.

Tableau III.7. Propriétés physico-chimiques des bio-conjugués utilisés pour étudier l'influence du bras espaceur du lipide situé en extrémité de chaîne polymère sur l'internalisation au sein des cellules Hela.

	M_n chaîne polymère (g.mol ⁻¹)	Bras espaceur	n_c	n_{COO^-}	D_c (%)	$N_{unités}$	D_{COO^-} (%)
20K-4H 17 300 g.mol ⁻¹	20 300	Oui	4	49	3	33	37
17K-4H* 13 600 g.mol ⁻¹	16 600	Non	4	40	4	27	37

n_c = Nombre moyen de chromophores par chaîne polymère

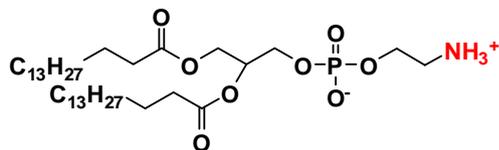
n_{COO^-} = Nombre moyen de charges négatives par chaîne polymère

D_c = Densité en chromophores des bio-conjugués LPC ($D_c = [n_c / DP_n] \times 100$)

D_{COO^-} = Densité en charges des bio-conjugués LPC ($D_{COO^-} = [n_{COO^-} / DP_n] \times 100$)

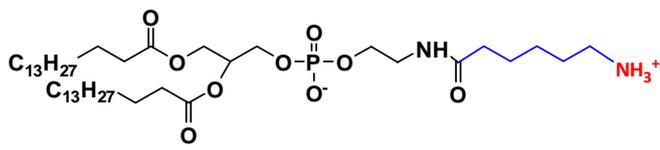
$N_{unités}$ = Nombre moyen d'unités monomères entre deux chromophores

* = Bio-conjugué synthétisé par William Lacour (Stage M2) / Portant un lipide sans bras espaceur



1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-Phosphoethanolamine

DPPE



1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-Phosphoethanolamine-N-(Hexanoylamine)

DPPEHA

Figure III.15. Structure des deux lipides utilisés, avec (à droite) et sans (à gauche) bras espaceur au niveau de la tête polaire.

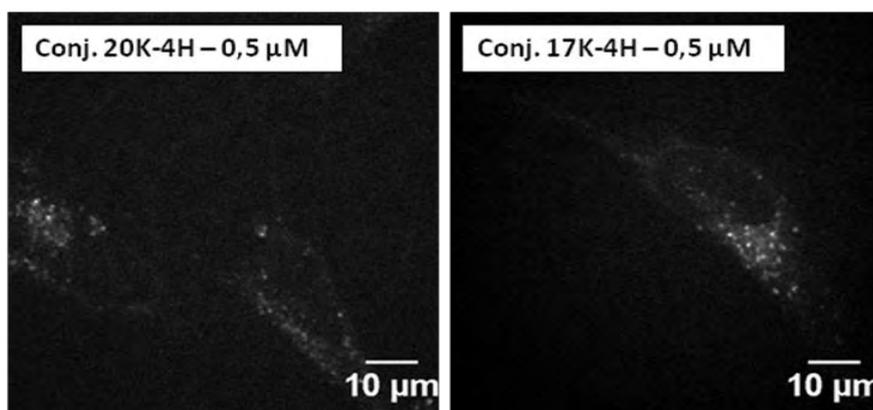


Figure III.16. Clichés de microscopie confocale ($\times 63$) réalisés sur des cellules *Hela* incubées 2h (37°C et sous 5% de CO_2) en présence bio-conjugués 20K-4H et 17K-4H à $0,5\mu\text{M}$ (Exc = 491 nm – Em = 675/67).

Aucune différence n'a été observée lors des tests d'internalisation de ces deux bio-conjugués (Figure III.16.). En effet, les cinétiques d'internalisation ainsi que les localisations dans les cellules sont identiques. La présence (ou l'absence) du bras espaceur sur le lipide ne semble pas avoir d'influence sur ces deux paramètres, dans le cas des bio-conjugués qui portent le chromophore JM086. Néanmoins, il serait également intéressant de vérifier l'influence de ce bras espaceur sur des bio-conjugués dont l'internalisation semble dépendre de la présence du lipide (bio-conjugués 647H-4H).

L'influence de différents paramètres structuraux sur l'internalisation et la localisation des bio-conjugués dans les cellules a donc été vérifiée. Parmi les différents paramètres testés, les plus importants semblent être la nature du chromophore et la présence du lipide en extrémité de chaîne polymère.

Les résultats obtenus ont mis en évidence qu'il semblerait y avoir une influence non négligeable de la nature du chromophore sur ces deux paramètres. En effet, il a été montré que des bio-conjugués synthétisés à partir d'un chromophore commercial chargé négativement et soluble dans l'eau (LY) ne peuvent pas être internalisés au sein des cellules *Hela*. Néanmoins, des résultats différents ont été obtenus pour des bio-conjugués qui portent un chromophore similaire (F647H) ce qui reste encore difficile à expliquer. La nature hydrophile du chromophore rendant le bio-conjugué très soluble dans l'eau semble rendre difficile les interactions cellule/bio-conjugué. Le bio-conjugué a potentiellement plus tendance à rester en suspension dans le milieu qu'à interagir avec les membranes cellulaires.

Le second paramètre qui semble jouer un rôle important dans l'interaction cellule/bio-conjugué est la présence du lipide. En effet, dans le cas du bio-conjugué 647H-4H il a été montré que lorsque le lipide est absent aucune internalisation n'est observée. Cette influence s'est avérée beaucoup moins importante dans le cas des bio-conjugués qui portent un chromophore hydrophobe (JM086). Le lipide semble donc apporter au bio-conjugué 647H-4H l'hydrophobie nécessaire à l'interaction avec les cellules vivantes, hydrophobie qui est apportée par le chromophore très hydrophobe dans le cas des bio-conjugués JM086.

III.4. Incubation des cellules en présence de liposomes fluorescents.

Les tests d'incubation de différents types cellulaires (Hela, Lymphocyte T, cellules neuronales) en présence des bio-conjugués LPC ont conduit à des résultats similaires, à savoir une internalisation rapide ainsi qu'un marquage sous forme de spots fluorescents localisés autour du noyau des cellules et sous forme de marquage diffus du cytoplasme. De plus, les tests de colocalisation réalisés suggèrent une internalisation des bio-conjugués par endocytose, donc il était intéressant de vérifier si, en changeant le mode d'apport des bio-conjugués, il est possible de modifier le mode d'internalisation et leur localisation dans les cellules.

Le mode d'apport des bio-conjugués aux cellules a donc été modifié en utilisant des liposomes fluorescents contenant les bio-conjugués LPC (cf. chapitre 4). En effet, la nature et la différence de taille entre les liposomes et les bio-conjugués seuls en solution pourraient avoir un rôle sur le mode d'internalisation dans les cellules.

Plusieurs équipes de recherche ont montré que les liposomes avaient la capacité d'interagir avec les membranes cellulaires, et ce, selon différents modes³⁰ :

- La fusion entre la membrane cellulaire et la membrane des liposomes
- L'endocytose des liposomes
- L'adsorption à la surface des cellules

Pagano et Huang³¹ ont mis en évidence le phénomène de fusion entre des liposomes, à base de dioleil lécithine (DOPC) marqués au carbone 14 et contenant un marqueur [³H] Inuline dans la phase aqueuse interne des liposomes, et des cellules V79. Les auteurs ont mis en évidence qu'à 37°C, 90% des lipides marqués associés aux cellules provenaient de la fusion entre des liposomes et les membranes des cellules, alors qu'à 2°C le processus de fusion n'avait pas lieu.

De nombreuses équipes ont utilisé les liposomes comme vecteur de principes actifs afin de tirer profit de leur capacité à fusionner avec les membranes cellulaires. Par exemple, Malaekheh-Nikouei *et al.*³⁰ ont utilisé les liposomes pour la délivrance de cyclosporine A, utilisée pour prévenir les rejets de greffes d'organes et dans le cas de traitement maladies auto-immunes. Les auteurs de cet article ont montré qu'en fonction de la composition des liposomes la délivrance de la cyclosporine A était plus ou moins efficace, et que celle-ci était optimale dans le cas où les liposomes étaient formés à partir de lipides dits « fusogènes » (DOPE) c'est-à-dire favorisant la fusion entre les liposomes et les membranes cellulaires.

La stratégie employée dans cette étude a donc consisté, dans un premier temps, à synthétiser des liposomes par différentes méthodes (extrusion, sonication – cf. chapitre 4) dans lesquels les bio-conjugués ont été pré-insérés. Dans un second temps, les liposomes ont été déposés sur les cellules Hela avant que des observations en microscopie confocale de fluorescence ne soient réalisées.

Dans cette partie, je traiterai dans un premier temps les premiers essais réalisés à partir de liposomes modèles (EggPC/BrainPS) avant d'étudier dans un second temps l'influence de la taille des liposomes sur l'internalisation et la localisation des bio-conjugués LPC. L'influence de la composition des liposomes a également été étudiée dans le but de trouver éventuellement une composition en lipides permettant de favoriser la fusion entre les liposomes et les membranes cellulaires.

III.4.1. Incubation en présence de liposomes références EggPC/PS.

L'internalisation des bio-conjugués via l'utilisation de LUVs EggPC/PS, formées par la technique d'extrusion, a été étudiée. Ce système a constitué notre système référence, à partir duquel nous avons démarré les tests, puisque c'est le système sur lequel nous avons le plus de recul suite aux différents tests de formation et d'optimisation des protocoles (cf. chapitre 4) et également car ils constituent des éléments importants des membranes plasmiques des cellules³².

Après avoir formé les LUVs EggPC/BrainPS/33K-9H (80-20% massique en lipides + 0,1% molaire en bio-conjugué) par extrusion à travers des membranes de 100 nm (cf. chapitre 4), les diamètres des vésicules ont été mesurés par diffusion dynamique de la lumière (DLS) : les LUVs fluorescentes formées présentaient un diamètre de 97 nm.

Les cellules Hela ont ensuite été incubées pendant trente minutes en présence des liposomes fluorescents. Le milieu de culture utilisé lors de ces tests ne contenait pas de sérum de veau fœtal afin d'éviter la déstabilisation des liposomes par les nombreuses protéines présentes dans le sérum. Des observations ont ensuite été réalisées par microscopie confocale (Figure III.17.).

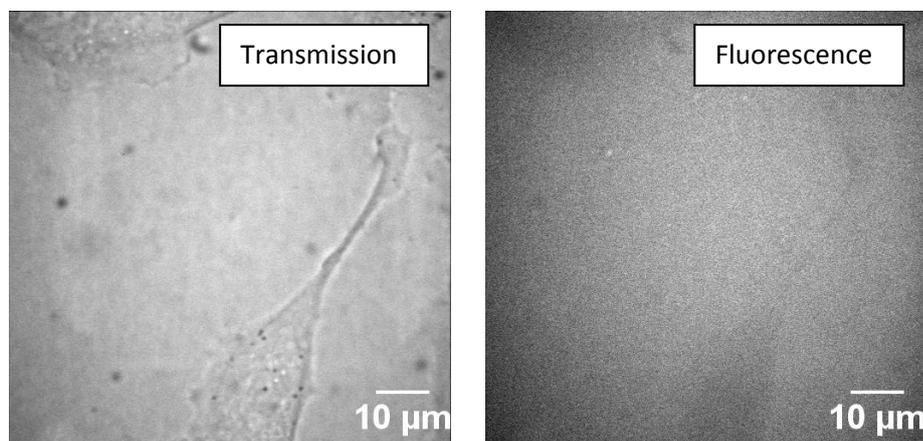


Figure III.17. Clichés de microscopie confocale ($\times 63$) de cellules HeLa incubées en présence de LUVs fluorescentes (97 nm) pendant 30 min (37°C et sous 5% de CO_2).
(Ex = 491 nm / filtre émission = 675/67 nm)

Les images (Figure III.17.) montrent donc une absence d'internalisation des bio-conjugués au sein des cellules puisque ces dernières ne sont pas marquées.

Le cliché de la figure III.17. représentant les cellules en fluorescence, permet de voir le fantôme des cellules qui contraste avec le milieu, non lavé, très bruité qui apparaît en gris clair et contenant des liposomes fluorescents en suspension. Ce type de liposomes ne semble pas pouvoir interagir avec les cellules, et le contraste entre les cellules et le milieu peut être expliqué par le fait que les liposomes restent dans le milieu qui est donc très fluorescent. Cette absence d'interaction entre les cellules et les liposomes pourrait être expliquée de différentes façons :

- Les LUVs utilisées ici sont connues pour être les systèmes vésiculaires modèles les plus stables. Il est donc possible que cette grande stabilité les empêche de pouvoir fusionner avec les membranes des cellules.
- Outre la fusion, l'endocytose des liposomes est le second mode d'interaction principal des liposomes avec les cellules. L'absence de marquage des cellules observé suggère que ce processus également ne se produit pas. Il est possible d'imaginer que cela soit causé par un temps d'incubation trop faible ne permettant pas aux liposomes de sédimer à la surface des cellules. Or d'autres tests, dans lesquels les cellules ont été incubées en présence des liposomes pendant des temps plus longs, ont montré que ce paramètre ne pouvait pas expliquer cette absence de marquage.
- Enfin, la composition des LUVs peut aussi expliquer les résultats observés. En effet les liposomes contiennent de la PS, un lipide chargé négativement, ce qui pourrait empêcher les interactions entre les LUVS et les membranes des cellules par répulsion électrostatique.

Une autre information qui peut être tirée des clichés concerne les liposomes. D'après les observations qui sont faites, il est possible de penser que les liposomes aient conservé leur intégrité et qu'ils sont toujours en suspension dans le milieu. En effet, lorsque les liposomes sont déstabilisés, il y a de fortes chances que les bio-conjugués soient relargués

dans le milieu après destruction des LUVs. Or, les différents tests d'internalisation réalisés ont mis en évidence que les bio-conjugués sont internalisés très rapidement dans les cellules lorsqu'ils sont présents dans le milieu extracellulaire. Le fait que les cellules ne soient pas marquées suggère donc que les bio-conjugués sont toujours incorporés dans des LUVs.

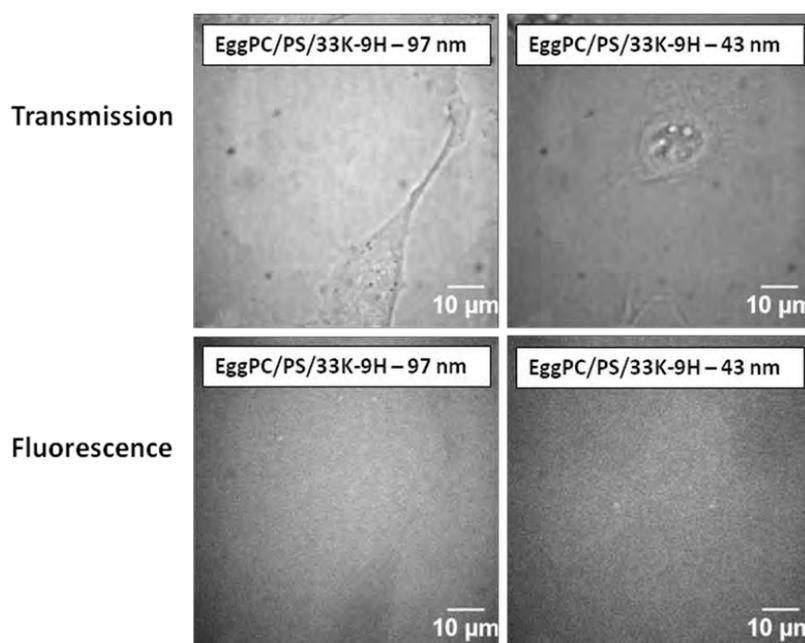
III.4.2. Influence de la taille et de la composition des liposomes sur l'internalisation des bio-conjugués.

III.4.2.1. Influence de la taille.

La taille des liposomes est un critère qui peut avoir une importance non négligeable sur la délivrance des bio-conjugués à l'intérieur des cellules vivantes. En effet, généralement dans les tests de fusion liposomes/cellules vivantes, les systèmes lipidiques utilisés sont les SUVs, présentant un rayon de courbure plus important que les LUVs et étant beaucoup moins stables^{33,34}. Il est donc possible que cette trop grande stabilité des LUVs limite leur capacité à fusionner avec les membranes plasmiques des cellules.

Donc de nouveaux tests ont été réalisés afin de vérifier si l'utilisation de SUVs de type EggPC/BrainPS/conjugué permettait d'internaliser les bio-conjugués au sein des cellules vivantes.

Des SUVs fluorescentes de 43 nm de diamètre ont été formées par sonication (cf. chapitre 4) et déposées sur les cellules Hela de telle façon que la concentration en bio-conjugué 33K-9H soit 1 μ M. Les cellules ont ensuite été visualisées par microscopie de fluorescence (Figure III.18.).



Dans ce cas, la diminution du diamètre des liposomes ne permet pas de favoriser l'internalisation des bio-conjugués au sein des cellules (Figure III.18.). Des résultats similaires sont obtenus quand les cellules sont incubées en présence de LUVs et de SUVs fluorescentes, c'est-à-dire aucun marquage cellulaire et un bruit de fond important pouvant témoigner de la présence des liposomes dans le milieu extracellulaire.

Les tests réalisés ont donc permis de mettre en évidence que pour les systèmes modèles références (EggPC/BrainPS) la taille des liposomes ne semble pas avoir d'influence sur l'internalisation des bio-conjugués.

III.4.2.2. Influence de la composition.

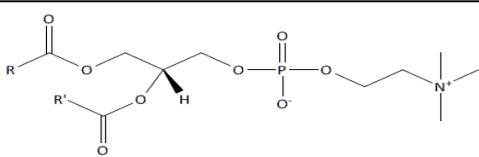
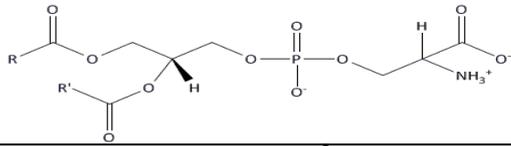
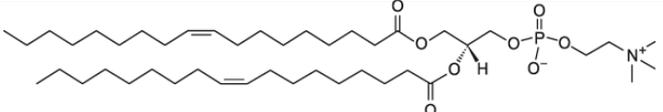
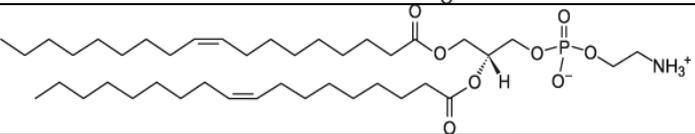
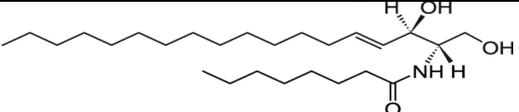
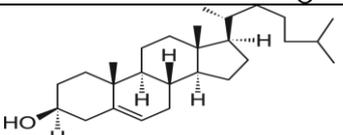
Les premiers tests réalisés en utilisant le système référence EggPC/BrainPS n'ont pas permis d'internaliser les bio-conjugués au sein des cellules Hela. En effet, même après avoir diminué la taille des liposomes (97 → 43 nm) afin de favoriser le processus de fusion liposomes/membrane cellulaire, aucune internalisation des bio-conjugués n'a été observée.

Après avoir étudié l'influence de la taille des liposomes, il a été décidé de faire varier la composition en lipides de ces derniers. En effet, il existe des lipides possédant des propriétés fusogènes, c'est-à-dire favorisant les phénomènes de fusion entre membranes. Les propriétés fusogènes de ces lipides sont liées aux particularités de leurs têtes polaires ou de leurs chaînes grasses :

- Les lipides à tête polaire chargée positivement entrent plus facilement en interaction avec les membranes cellulaires globalement chargées négativement³⁵.
- Les lipides possédant des chaînes grasses insaturées apportent de la fluidité aux liposomes formés car ils empêchent les chaînes grasses saturées de s'organiser et de conduire à des double-couches rigides. Cette fluidité permet aux liposomes de plus facilement se déformer pour ensuite s'ouvrir et fusionner avec les membranes cellulaires.
- Les lipides possédant une chaîne grasse courte induisent du désordre dans les bicouches lipidiques et créent du volume libre propice à la fusion de bicouches lipidiques³⁶.

Des liposomes fluorescents de compositions variées ont été formés (Tableau III.9.) afin de vérifier l'influence de la nature des chaînes grasses et de la tête polaire sur l'internalisation et la localisation des bio-conjugués au sein des cellules Hela.

Tableau III.8. Structure des lipides utilisés lors de ces tests d'internalisation par incubation de cellules en présence de liposomes fluorescents.

Lipide	Structure	Charge
EggPC*		zwitterionique
BrainPS*		Négative
DOPC		zwitterionique
DOPE		Zwitterionique
C8-céramide		Neutre
Cholestérol		Neutre

* Egg PC et Brain PS : mélanges de lipides de type PC et PS respectivement constitués de chaînes alkyles variables.

Tableau III.9. Composition et diamètres (DLS) des liposomes fluorescents utilisés pour les tests d'internalisation des bio-conjugués au sein de cellules Hela.

Type de Système	Composition (% massique - lipides) (% molaire – conjugué 33K-9H)	Diamètre* (nm)	Internalisation
SUV	EggPC/PS/conj. 80/20/0,1	43	-
SUV	EggPC/conj. 100/0,1	42	+
SUV	DOPC/conj. 100/0,1	67	++
SUV	DOPC/C8/conj. 80/20/0,1	93	+++
SUV	DOPC/DOPE/conj. 75/25/0,1	74	++++

SUV	DOPC/Cholest/conj. 75/25/0,1	61	+++++
LUV	DOPC/C8/DOPE/Cholest/conj. 50/20/25/25/0,1	154	+++++

* Tous les liposomes sont formés dans les mêmes conditions de sonication

Le Tableau III.9. permet de mettre en évidence que les plus petits liposomes obtenus sont ceux formés à partir de lipides naturelles (EggPC et BrainPS). En revanche, lorsque des lipides à propriétés fusogènes sont inclus dans la formulation, des tailles de liposomes plus importantes sont obtenues. Ceci pourrait être éventuellement expliqué par le fait que les liposomes formés à partir de lipides fusogènes présentent des membranes plus fluides et moins stables, favorisant les phénomènes de fusion entre liposomes et ainsi favorisant la formation de vésicules de diamètres plus importants que les diamètres initiaux.

De plus, les liposomes formés à partir de plusieurs types de lipides différents, dont des lipides fusogènes, conduisent à des vésicules de diamètre très important (154 nm) alors qu'ils sont formés dans les mêmes conditions de sonication (Tableau III.9.). Ceci pourrait éventuellement être expliqué par la différence de nature des lipides : l'auto-assemblage des lipides est régi par leur structure et dépend à la fois de l'aire de la tête polaire et de la section des chaînes alkyles (Equation 1)³⁷.

$$Pa = \frac{V}{a \times l} \quad (1)$$

Avec : V = volume occupé par les chaînes alkyles

a = Aire de la tête polaire

l = Longueur des chaînes alkyles

- Lorsque le paramètre Pa est compris entre $\frac{1}{2}$ et 1 et que l'aire de la tête polaire est supérieure à la section des chaînes alkyles, les lipides ont tendance à s'organiser sous forme de liposomes (bicouches flexibles)
- Lorsque le paramètre Pa est égal à 1 c'est-à-dire quand l'aire de la tête polaire et la section des chaînes alkyles sont égales, les lipides forment plutôt des bicouches planes.

Les natures différentes des lipides conduisent donc à des comportements différents de ces derniers en solution. La présence de DOPE, par exemple, dans la formulation pourrait expliquer la formation de liposomes de 154 nm car il s'agit d'un lipide présentant un Pa de 1, ayant plutôt tendance à former des bicouches planes^{37,38}. On peut donc imaginer que ce lipide ait tendance à forcer la double-couche formée à tendre vers un système plan plutôt que vésiculaire, en empêchant par exemple le compactage des chaînes alkyles. Néanmoins, on peut voir que les liposomes formés à partir de DOPE et DOPC présentent des diamètres de 74 nm, ce qui est correspond plus ou moins aux diamètres attendus. Donc l'hypothèse

selon laquelle la présence de DOPE forcerait la bicouche à s'aplanir ne semble pas être valable.

En ce qui concerne l'internalisation des bio-conjugués dans les cellules, le tableau III.9. permet de voir que celle-ci dépend de la composition des lipides (dans tous les cas, lorsque les bio-conjugués sont internalisés, la localisation habituelle est observée : spots fluorescents autour du noyau et marquage diffus du cytoplasme).

a) Nature de la tête polaire.

Le premier paramètre à avoir été étudié est la nature de la tête polaire des lipides qui constituent les liposomes.

Les différents tests réalisés à partir des liposomes formés (Tableau III.9.) ont permis d'étudier l'influence de deux types de têtes polaires :

- Tête polaire chargée négativement (BrainPS)
- Tête polaire zwitterionique (EggPC)

L'influence de la présence de la PS a été vérifiée en comparant les résultats obtenus avec les liposomes références (EggPC/BrainPS/conjugué) et les liposomes EggPC/conjugué. Dans le cas où les cellules ont été incubées en présence de liposomes EggPC seul, sans PS, un léger marquage de toutes les cellules est observé alors que lorsque les liposomes EggPC/BrainPS sont déposées sur les cellules, aucun marquage n'est observé, on observe dans ce cas là le fantôme des cellules (cf. annexe 7-1).

Ces résultats semblent suggérer que la PS, chargée négativement, nuit aux interactions liposomes/membranes cellulaires. Ceci peut être par le fait que les membranes plasmiques sont elles aussi globalement chargées négativement ce qui entraîne un phénomène de répulsion électrostatique entre les liposomes et les cellules.

b) Type de chaînes grasses et influence du cholestérol.

- L'influence de la présence d'insaturations au niveau des chaînes grasses a été étudiée en comparant les résultats obtenus lors de l'utilisation de liposomes EggPC seul et de liposomes DOPC seul.

Les images obtenues (cf. annexe 7-2) ont mis en évidence un marquage de toutes les cellules, plus marqué dans le cas des liposomes DOPC. Ce résultat semble confirmer le fait que l'utilisation de lipides à chaînes grasses insaturées, augmentant la fluidité des membranes par la présence de défauts de structure causés par les insaturations, permet de favoriser les interactions liposome/membrane cellulaire.

De même, des SUVs fluorescentes contenant deux lipides à chaînes grasses insaturées (DOPC et DOPE) ont été formées et incubées en présence des cellules. Dans ce cas également toutes les cellules sont marquées.

Le marquage observé est identique à celui observé habituellement. La combinaison des deux lipides à chaînes grasses insaturées semble favoriser un marquage plus prononcé des cellules (cf. annexe 7-3) : le marquage est plus brillant que dans les cas précédents et le contraste est meilleur. En plus de la présence des chaînes grasses insaturées, ce marquage plus intense des cellules pourrait être expliqué par la structure du DOPE qui, comme expliqué plus haut, favorise plutôt la formation de bicouches planes ou de phase hexagonales inverses (H_{II})³⁸ (donc déstabilise les liposomes facilitant la fusion).

- Ensuite, l'influence de la présence d'un lipide possédant une chaîne grasse courte (C8) a été étudiée. Pour cela, un autre type de liposomes à base de DOPC a été formé : DOPC/C8-céramide/conjugué 33K-9H.

Les résultats obtenus (cf. annexe 7-4) ont permis de mettre en évidence une influence positive de la présence du lipide à chaîne courte (C8-céramide) sur l'internalisation des bio-conjugués dans les cellules. En effet, toutes les cellules sont fluorescentes, et le marquage est plus marqué dans le cas où les cellules ont été incubées en présence des liposomes DOPC/C8-céramide que dans le cas où elles ont été incubées en présence de liposomes DOPC seul.

D'après les résultats obtenus, la comparaison des intensités de marquage des cellules induites par les différents liposomes permet d'établir un classement d'efficacité des lipides fusogènes : DOPE > C8-céramide > DOPC.

- Enfin, l'influence du cholestérol a également été étudiée. Des liposomes DOPC/Cholestérol/conjugué (25/75 %massique + 0,1% molaire en bio-conjugué) ont été formés et déposés sur les cellules (Figure III.19.).

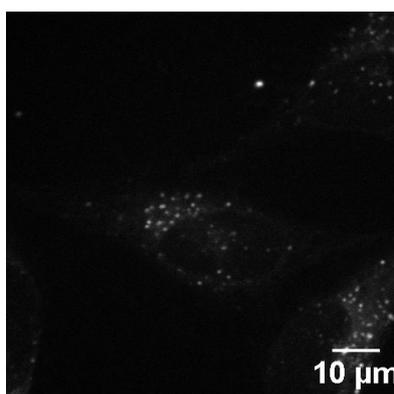


Figure III.19. Clichés de microscopie confocale de fluorescence ($\times 63$) des cellules HeLa incubées 2h à 37°C, sous 5% de CO_2 en présence de SUVs DOPC/cholestérol/33K-9H (61 nm) (Ex = 491 nm / filtre émission = 675/67 nm)

Les résultats ont permis de mettre en évidence que le marquage des cellules HeLa est très bon, meilleur que dans le cas où le DOPE a été utilisé. Cet effet peut être expliqué par le fait que le cholestérol est connu pour réguler la rigidité des membranes plasmiques^{39,40}. En effet, en s'intercalant entre les lipides membranaires, le cholestérol influe sur la fluidité des membranes : lorsque celles-ci sont trop rigides le cholestérol

augmente la fluidité membranaire en empêchant les interactions hydrophobes entre les chaînes grasses, mais il maintient une certaine cohésion des membranes lipidiques lors d'une élévation de température (supérieure à la température de transition des lipides). On peut donc penser que le cholestérol ait pu favoriser la fusion entre les liposomes et les membranes cellulaires.

Finalement, nous avons mis en évidence le fait qu'un marquage optimal est obtenu lorsque les trois lipides présentant des propriétés fusogènes sont utilisés dans la formulation des liposomes. En effet, le marquage des cellules induit par l'incubation de ces dernières en présence de liposomes DOPC/DOPE/C8-céramide/Cholestérol/conjugué permet d'obtenir un marquage très intense et très net des cellules, sous forme de spots fluorescents autour du noyau et de marquage diffus du cytoplasme (Figure III.20.).

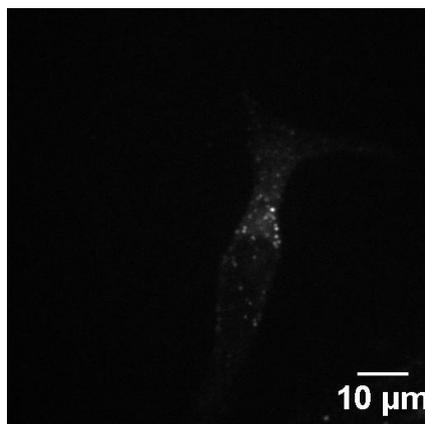


Figure III.20. Clichés de microscopie confocale de fluorescence ($\times 63$) des cellules HeLa incubées 2h à 37°C et sous 5% de CO₂ en présence de LUVs DOPC/DOPE/C8-céramide/Cholestérol/conjugué 33K-9H (154 nm).
(Ex = 491 nm / filtre émission = 675/67 nm)

Tous les tests d'incubation des cellules vivantes en présence de liposomes fluorescents réalisés ont permis de mettre en évidence que le marquage des cellules observé est identique à celui visualisé dans le cas où les bio-conjugués sont déposés seuls sur les cellules. Les résultats suggèrent donc que les liposomes fluorescents sont internalisés au sein des cellules vivantes de type HeLa par voie endocytotique⁴¹. On peut également imaginer que l'utilisation de lipides fusogènes a entraîné une diminution de la stabilité des liposomes en solution, conduisant à une libération des bio-conjugués qui ont ensuite été internalisés très rapidement dans les cellules.

Néanmoins, il a également été mis en évidence que la composition des liposomes est un facteur important de cette internalisation puisque :

- La présence de lipides chargés négativement (PS) dans les liposomes ne permet pas de marquer les cellules
- La présence de lipides à chaînes grasses insaturées, à chaînes courtes et la présence de cholestérol dans les liposomes favorisent le marquage des cellules vivantes.

III.5. Conclusions.

L'internalisation et la localisation du bio-conjugué 33K-9H a été étudiée sur des cellules de type Hela, Lymphocyte T et neuronale. Ces différentes études ont montré dans chaque cas que le bio-conjugué LPC est internalisé rapidement (< 10 minutes) et marque le cytoplasme des cellules de manière diffuse. De nombreux spots très fluorescents sont également observés très proches du noyau cellulaire.

Ce type de marquage des cellules vivantes observé pour tous les types cellulaires, et ce, quelque soit la structure du bio-conjugué, nous a amené à émettre l'hypothèse d'une internalisation par endocytose. C'est pourquoi des tests de colocalisation ont été réalisés. Ces tests ont mis en évidence une colocalisation partielle des bio-conjugués LPC avec les endosomes tardifs, suggérant une internalisation préférentielle des bio-conjugués par voie endocytotique.

Il serait intéressant de continuer les tests d'internalisation à partir de nouveaux bio-conjugués LPC de structures différentes de ceux testés jusqu'à présent. En effet, une modification de la structure des bio-conjugués, notamment une diminution de la taille des chaînes polymère ($2\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), permettrait éventuellement de modifier la localisation des bio-conjugués dans les cellules en rendant le lipide situé en extrémité de chaîne plus accessible pour les membranes cellulaires.

Des essais préliminaires d'imagerie à deux photons de cellules Hela incubées en présence de bio-conjugués LPC ont également été réalisés. Ces tests ont montré que les bio-conjugués synthétisés (à partir du chromophore JM086) sont capables d'émettre de la fluorescence lorsqu'ils sont excités par deux photons.

Ces premiers essais sont très encourageants et il serait très intéressant de continuer cette étude, notamment à travers l'utilisation de bio-conjugués de structures différentes afin de vérifier une éventuelle influence de la structure des conjugués sur l'absorption à deux photons.

Dans un second temps, un mode alternatif d'apport des bio-conjugués aux cellules a été étudié : les liposomes fluorescents. Le but était de vérifier si, en modulant la façon dont les bio-conjugués sont apportés aux cellules, il était possible de modifier leur internalisation et (ou) leur localisation.

Après avoir formé des liposomes fluorescents de compositions variées, dans lesquels les bio-conjugués LPC étaient pré-insérés, il a été mis en évidence un marquage des cellules identique à celui observé habituellement suggérant que les liposomes sont également endocytés par les cellules ou éventuellement un relargage des bio-conjugués dans le milieu extracellulaire suivi d'une internalisation rapide des bio-conjugués seuls.

L'introduction de lipides chargés positivement (de type DOTAP) dans la composition des liposomes pourrait également permettre de favoriser la fusion entre les liposomes et les membranes cellulaires. En effet, la présence de charges positives à la surface des liposomes permet de favoriser un contact direct entre les liposomes et les membranes cellulaires

(chargées négativement). Les charges positives à la surface des liposomes sont ainsi neutralisées et la présence de DOPE dans la formulation, qui a tendance à déstabiliser les liposomes, permet de favoriser la fusion⁴².

Des essais préliminaires de microinjection ont également été réalisés et présentent des résultats encourageants (cf. annexe 8).

IV. Partie expérimentale.

IV.1. Matériels.

- Plaque 24 puits : Corning 3524 Costar 24 Well Clear TC-Treated Microplates Individually Wrapped and Sterile
- Plaque 8 puits : μ -Slide 8 well, ibidiTreat, tissue culture treated, sterile
- Plasmides (TiVamp-GFP, Cb-GFP et Rab7-GFP) : fournis par l'équipe de Delphine Muriaux

IV.2. Culture cellulaire.

La culture des cellules utilisées a été réalisée en collaboration avec Karine Monier (LJC – ENS de Lyon).

- a) Les cellules Hela (ATCC : CCL-2) sont des cellules adhérentes cultivées dans un milieu de culture de type DMEM-alpha (PAA – E15832) en présence d'acides aminés non essentiels (PAA – M11-003), de pénicilline/streptomycine (PAA – P11-010) et de 10% de sérum de veau fœtal inactivé (PAA – A15-101). Les cellules ont été maintenues à 37°C et sous 5% de CO₂ dans un incubateur.
- b) Les cellules Jurkat sont des cellules de type Lymphocyte-T, non adhérentes, cultivées dans un milieu de culture de type RPMI 1640 (Gibco) en présence de L-Glutamine, de pyruvate, de β -mercaptoéthanol, de pénicilline/streptomycine et de sérum de veau fœtal le tout provenant de Gibco. Les cellules ont été maintenues à 37°C et sous 5% de CO₂ dans un incubateur.
- c) Les cellules SH-SY5Y (ATCC : CRL 2266) sont des cellules neuronales, adhérentes, cultivées dans un milieu de culture de type DMEM-alpha (PAA – E15832) en présence de milieu F12 (PAA – E15-890) et d'acides aminés non essentiels (PAA – M11-003), de pénicilline/streptomycine (PAA – P11-010) et de 10% de sérum de veau fœtal inactivé (PAA – A15-101). Les cellules ont été maintenues à 37°C et sous 5% de CO₂ dans un incubateur.

IV.3. Instruments.

IV.3.1. Cytométrie en flux (FACS).

Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux, en collaboration avec Delphine Muriaux (Laboratoire de Virologie – ENS Lyon), en utilisant un appareil de type BD FACS Canto II piloté par le logiciel BD FACS Diva. Au moins 10 000 cellules ont été analysées pour chaque condition.

IV.3.2. Microscopie Optique.

- Microscope 1 : Les cellules ont été observées en transmission en utilisant un microscope inversé (Leica DM IRBE, Deerfield, IL), équipé d'une caméra EB-CCD (C4880 Hamamatsu, Ichinocho, Japan) et piloté par le logiciel HIPIC (Hamamatsu). Un objectif à huile 40× a été utilisé pour les visualisations.
- Microscope 2 : Microscope inversé LEICA DMI4000 avec chambre d'incubation (contrôle température et CO₂), équipé d'une tête confocale de type "spinning disk" (Yokogawa CSU22), d'une caméra EMCCD (Photometrics Quantem 512) et d'un système de FRAP 3D. Ce système est équipé de raies laser : 405, 491, 561 et 635nm (interface, laser et galvo par la société ERROL). Le système est piloté par le logiciel Metamorph (Molecular Devices). Les cellules ont été visualisées en utilisant un objectif 63× à immersion à eau.
- Microscope 3 : Microscope inversé NIKON Eclipse TS100 équipé d'une source d'excitation NIKON Intensilight C-HGFI.

L'acquisition des images a été réalisée dans un milieu de culture (CM-E Medium) sans rouge de phénol dans le but de limiter l'autofluorescence. Durant les acquisitions, les cellules ont été conservées en atmosphère régulée (température et CO₂). Dans tous les cas, plusieurs images de cellules présentent dans différents champs de microscopie ont été enregistrées et traitées en utilisant le logiciel Image J. Les images présentées dans ce chapitre correspondent aux images les plus représentatives.

IV.4. Méthodes Analytiques.

IV.4.1. Tests de cytotoxicité.

IV.4.1.1. Evaluation de la cytotoxicité des bio-conjugués par microscopie optique.

Les cellules Hela ont été plaquées dans les puits d'une plaque 24 puits à une concentration de $4,17 \times 10^4$ cellules par millilitre. Les cellules ont ensuite été incubées en présence de 200 μL de solutions de différentes concentrations en bio-conjugués 33K-9H et 33K-9AEM (20, 10, 1 et 0,1 μM) pendant 48 heures, à 37°C et sous 5% de CO_2 . Chaque condition a été réalisée en duplicate. La plaque 24 puits contenait des puits témoins dans lesquels les cellules n'ont pas été incubées en présence de bio-conjugués.

Un suivi de la morphologie des cellules est réalisé régulièrement (après 17, 24 et 40h d'incubation – microscope 3), puis des clichés ont été enregistrés au bout de 45 heures en utilisant le microscope 1.

IV.4.1.2. Evaluation de la cytotoxicité des bio-conjugués par cytométrie en flux (FACS).

Dans chaque puits d'une plaque 24 puits, 50 000 cellules de type Jurkat ont été plaquées, en solution dans le milieu de culture RPMI. Les cellules ont ensuite été incubées en présence de 500 μL de solutions de différentes concentrations en bio-conjugués (20, 10, 1, 0,5, 0,2, et 0,1 μM).

Au bout de 7 heures et 31 heures d'incubation, 250 μL de solution ont été prélevés dans chaque puits (environ 25 000 cellules). Les cellules sont ensuite centrifugées et reprises dans un mélange PBS + 5% de sérum de veau fœtal.

Le pourcentage de mortalité cellulaire a été déterminé par granulométrie grâce au rapport FSC/SSC (Intensité de lumière diffusé dans l'axe du laser/Intensité de lumière diffusée à 90° du laser) permettant la discrimination entre les cellules vivantes et mortes.

Les résultats obtenus lors de ces tests se présentent, pour chaque bio-conjugué et pour chacune des concentrations testées, sous la forme de diagrammes de dispersions (Figure II.1.). Ces diagrammes renseignent à la fois sur la taille des cellules passant devant le détecteur, mais également sur la granulométrie des cellules détectées, qui constitue le principal témoin de la mort cellulaire^{9,5}.

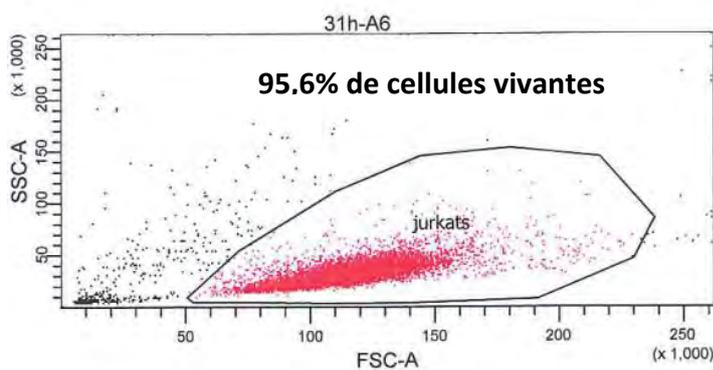


Figure II.1. Diagramme de dispersion obtenu après analyse par FACS des cellules Jurkat incubées pendant 31 heures à 37°C et sous 5% de CO₂ en présence du bio-conjugué 33K-9H à 0,1 µM.

IV.4.2. Tests d'internalisation.

Tous les tests d'internalisation et de cinétique ont été réalisés en collaboration avec Delphine Muriaux (Laboratoire de Virologie – ENS Lyon) et grâce au Plateau Technique d'Imagerie et de Microscopie BioSciences Gerland – Lyon Sud (UMS 3444).

IV.4.2.1. Tests d'internalisation des bio-conjugués au sein de différents types cellulaires.

Les cellules (Hela, SH-SY5Y) ont été plaquées dans les puits d'une lame 8 puits à la concentration de $4,17 \times 10^4$ cellules par millilitre (12 500 cellules par puits). En parallèle, des solutions mères de bio-conjugués à 20 µM (dans le milieu de culture MEM-alpha **sans rouge de phénol** afin d'éviter l'émission de fluorescence parasite) ont été préparées. Les cellules ont ensuite été incubées 1h30 à 2 heures en présence de différentes quantités de bio-conjugués ajouté dans le milieu de culture.

Dans le cas des cellules non adhérentes de type Jurkat, les cellules toujours en suspension ont été mélangées avec différentes quantités de bio-conjugués (solutions mères à 20 µM préparées dans le milieu de culture RPMI **sans rouge de phénol**). Les mélanges de cellules et de bio-conjugué ont ensuite été déposés dans les puits d'une lame 8 puits au fond desquels un tapis de fibronectine a été déposé. Les cellules déposées sur la fibronectine ont ensuite été laissées au moins 30 minutes à 37°C et sous 5% de CO₂ pour permettre leur accrochage au support.

Les cellules, conservées à 37°C et sous 5% de CO₂, ont été visualisées par microscopie confocale de fluorescence en utilisant le microscope 2. Les bio-conjugués ont été excités en utilisant le laser 491 nm et la fluorescence a été récupérée en utilisant le filtre 675/67 nm.

IV.4.2.2. Etude de la cinétique d'internalisation.

L'étude de la cinétique d'internalisation des bio-conjugués a été réalisée sur cellule HeLa en utilisant le bio-conjugué 33K-9H à la concentration de 1 μ M. Le protocole et les conditions utilisés étaient identiques à ceux décrite partie IV.4.2.1. La seule différence était que le dépôt du bio-conjugué a été réalisé alors que les cellules étaient déjà dans la chambre d'incubation du microscope. Les images ont pu être réalisées très tôt après le dépôt du bio-conjugué.

IV.4.2.3. Test de colocalisation des bio-conjugués avec différents types d'endosomes.

a) Transfection.

Les cellules HeLa (8,33 $\times 10^4$ cellules par millilitre – 25 000 cellules par puits) ont été plaquées dans les puits d'une lame 8 puits et transfectées avec 3 plasmides différents (TiVamp-GFP, Cb-GFP et Rab7-GFP) en utilisant le protocole fournit par le fournisseur de l'agent de transfection (JetPEI – Polyplus) : pour chaque condition, 0,5 μ g de plasmide en solution dans 25 μ L de NaCl 150 mM ont été mélangés à 1 μ L de JetPEI dilué dans 25 μ L de NaCl 150 mM. Le mélange a ensuite été déposé sur les cellules.

La vérification de l'efficacité de la transfection a été réalisée avant dépôt des bio-conjugués en utilisant le microscope 3.

b) Internalisation des bio-conjugués.

Après 24 heures de transfection, le milieu de culture a été lavé et les cellules ont été incubées en présence de bio-conjugués pendant 2 heures (en suivant le protocole décrit partie IV.4.2.1.). Les cellules ont ensuite été visualisées par microscopie confocale de fluorescence (microscope 2). Les bio-conjugués ont été excités en utilisant le laser 491 nm et la fluorescence a été récupérée en utilisant le filtre 675/67 nm. Les plasmides ont été excité en utilisant le laser 491 nm et la fluorescence a été récupérée en utilisant le filtre 525/50 nm.

IV.4.2.4. Incubation des cellules en présence de liposomes fluorescents.

Les cellules HeLa (4,17 $\times 10^4$ cellules par millilitre - 12 500 cellules par puits) ont été plaquées dans les puits d'une lame de 8 puits (IBIDI). En parallèle, des liposomes fluorescents ont été formés en utilisant la technique de sonication (cf. chapitre 4). Les solutions de liposomes ont ensuite été diluées, en utilisant un milieu de culture sans sérum de veau fœtal, et déposés sur les cellules HeLa de telle sorte que chaque puits contienne 1 μ M de bio-conjugué.

Les cellules ont ensuite été incubées en présence des liposomes pendant 1 à 2 heures, à 37°C et sous 5% de CO₂. Des images ont ensuite été réalisées par microscopie confocale de fluorescence (microscope 2). Les bio-conjugués ont été excités en utilisant le laser 491 nm et la fluorescence a été récupérée en utilisant le filtre 675/67 nm.

V. Conclusions du Chapitre 5.

L'objectif de ce projet étant de synthétiser des bio-conjugués Lipide-Polymère-Chromophores (LPC) permettant le marquage de membranes cellulaires, une première étape a permis de vérifier qu'il était possible d'insérer ces bio-conjugués LPC au sein de bicouches modèles (SUVs, LUVs, GUVs) ; et la seconde étape a consisté à évaluer le comportement des bio-conjugués en milieu cellulaire. Cette évaluation a consisté, dans un premier temps, à étudier la cytotoxicité des bio-conjugués LPC en présence de différents types cellulaires, puis, dans un deuxième temps, à étudier l'internalisation et la localisation de ces bio-conjugués au sein de cellules vivantes.

En ce qui concerne la cytotoxicité, deux tests différents ont été réalisés sur cellules Hela et Lymphocyte T, permettant une évaluation qualitative (par microscopie de fluorescence) et une évaluation quantitative (par cytométrie en flux) de la cytotoxicité des bio-conjugués LPC. Les résultats obtenus à partir des deux techniques semblent cohérents et montrent une absence de cytotoxicité des bio-conjugués pour des concentrations usuelles inférieures ou égales à 1 µM.

Ensuite, la capacité d'internalisation des bio-conjugués au sein de cellules vivantes de différentes lignées (Hela, Lymphocyte T et neuronale) a été évaluée. Les différents tests réalisés ont montré que les bio-conjugués LPC sont internalisés rapidement (en moins de 10 minutes), et ce, quel que soit le type de cellules utilisé. Dans tous les cas, un marquage très reproductible des cellules est observé, sous forme de spots fluorescents situés près du noyau et d'un marquage diffus du cytoplasme, suggérant une internalisation des bio-conjugués par endocytose.

Des tests de colocalisation ont été réalisés et ont mis en évidence une colocalisation partielle des bio-conjugués LPC avec des endosomes tardifs, suggérant que la voie majoritaire d'entrée des bio-conjugués LPC dans les cellules est l'endocytose.

De plus, des essais préliminaires d'imagerie à deux photons des cellules incubées en présence de bio-conjugués LPC ont été réalisés. D'après les premiers résultats, il semblerait que les bio-conjugués LPC synthétisés à partir du chromophore JM086 permettent une visualisation par microscopie de fluorescence à deux photons. Ces résultats, très encourageants, sont à confirmer.

Dans un second temps, une étude complète a été réalisée dans le but de vérifier une éventuelle influence de la structure des bio-conjugués sur l'internalisation et la localisation de ces derniers dans les cellules. Les différents résultats suggèrent que la nature des

chromophores, d'une part, et la présence ou non du lipide en extrémité de chaîne polymère, d'autre part sont les deux paramètres jouant un rôle important dans l'internalisation cellulaire (et la localisation) des bio-conjugués LPC.

Enfin, un nouveau mode d'apport des bio-conjugués LPC aux cellules a été étudié via l'utilisation de liposomes de tailles variables (de 40 à 150 nm) comme vecteurs contenant les bio-conjugués. L'objectif de ces tests était d'éventuellement modifier la localisation des bio-conjugués pré-insérés pour atteindre un marquage de la membrane plasmique.

Les tests réalisés n'ont pas permis de modifier la localisation des bio-conjugués dans les cellules, le marquage habituel est observé. Néanmoins, il a été mis en évidence que la composition en lipides des liposomes joue un rôle important sur l'internalisation des bio-conjugués. En effet, la présence de lipides fusogènes favorise l'internalisation des bio-conjugués LPC (via le liposome) dans les cellules.

Les bio-conjugués LPC synthétisés lors de ce projet de thèse présentent la capacité d'être internalisés dans des cellules vivantes, sans l'aide d'un « carrier » (PEI, Histone ou autre), et sans entraîner de mort cellulaire. Même si un marquage spécifique des membranes plasmiques n'a pas été atteint pour le moment, ces bio-conjugués peuvent néanmoins être utilisés comme sondes, par exemple pour suivre le trafic endosomal faisant suite aux processus d'endocytose.

En ce qui concerne les perspectives, il serait intéressant, d'une part de poursuivre les tests d'internalisation sur d'autres types cellulaires comme les cellules musculaires qui présentent une surface membranaire très importante, et d'autre part, de confirmer la localisation des bio-conjugués à l'intérieur des endosomes par des tests complémentaires de colocalisation.

Les tests d'internalisation des bio-conjugués via l'utilisation de liposomes fluorescents pourraient également être poursuivis, en modulant la composition en lipides des vésicules (introduction d'un certain pourcentage de lipides chargés positivement) pour éventuellement favoriser un marquage spécifique des membranes plasmiques.

Il serait également intéressant d'approfondir les études d'imagerie à deux photons réalisées sur cellules vivantes puisque la microscopie à deux photons est une technique d'imagerie en pleine expansion, qui permet d'améliorer la profondeur de pénétration de l'excitation lumineuse dans les tissus et qui permet de diminuer la phototoxicité autour du point focal lors des observations.

Bibliographie du chapitre 5.

1. Mothersill, C. & Austin, B. *In Vitro Methods in Aquatic Ecotoxicology*. Springer-Praxis. 477p. (2003).
2. Wijsman, J. H. *et al.* A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **41**, 7–12 (1993).
3. Kerr, J. F., Winterford, C. M. & Harmon, B. V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* **73**, 2013–26 (1994).
4. Zurlo, J. Les Tests de Toxicité In Vitro. at <http://www.ilo.org/safework_bookshelf/french?content&nd=857170398>
5. Lecureur-Rolland, V. Etude fonctionnelle de la cellule Cytométrie en flux. (2009).at <acmed.univ-rennes1.fr/wkf/stock/RENNES20091110010820fletelliLECUREUR_-_Cytometrie_en_flux_Nov_2009.pdf>
6. Evenson, D. P., Darzynkiewicz, Z. & Melamed, M. R. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **30**, 279–280 (1982).
7. Blanc-Béguin, F. *et al.* Cytotoxicity and GMI bio-sensor detection of maghemite nanoparticles internalized into cells. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **321**, 192–197 (2009).
8. Pagano, R. & Watanabe, R. Use of N-[5-(5, 7-dimethyl boron dipyrromethene difluoride)-sphingomyelin to study membrane traffic along the endocytic pathway. *Chemistry and physics of Lipids* **102**, 55–63 (1999).
9. Schenk, M., Raffellini, S., Guerrero, S., Blanco, G. a. & Alzamora, S. M. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* by UV-C light: Study of cell injury by flow cytometry. *LWT - Food Science and Technology* **44**, 191–198 (2011).
10. Macey, M. G. *Flow Cytometry*. Humana Press. 290p. (2007).
11. Kersting, U. *et al.* Fusion of Cultured Dog Kidney (MDCK) Cells: I. Technique, Fate of Plasma Membranes and of Cell Nuclei. *The Journal of Membrane Biology* **111**, 37–48 (1989).
12. Olympus Introduction to Confocal Microscopy. at <<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/confocal/confocalintro.html>>
13. Sheppard, C. J. R. & Shotton, D. M. *Confocal Laser Scanning Microscopy*. Bios Scientific Publishers. 106p. (1997).
14. Mallet, W. G. & Maxfield, F. R. Endocytose. *Flammarion Médecine-Sciences - Actualités Néphrologiques* 255–269 (2000).
15. Gruenberg, J. & Maxfield, F. R. Membrane transport in the endocytic pathway. *Current opinion in cell biology* **7**, 552–63 (1995).
16. Les systèmes endosomale et lysosomale. (2011).at <<http://www.cours-pharmacie.com/biologie-cellulaire/les-systemes-endosomale-et-lysosomale.html>>
17. Sönnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J. & Zerial, M. Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *The Journal of cell biology* **149**, 901–14 (2000).
18. Danglot, L. *et al.* Role of TI-VAMP and CD82 in EGFR cell-surface dynamics and signaling. *Journal of cell science* **123**, 723–35 (2010).
19. Chaineau, M., Danglot, L. & Galli, T. Multiple roles of the vesicular-SNARE TI-VAMP in post-Golgi and endosomal trafficking. *FEBS letters* **583**, 3817–26 (2009).
20. Galli, T. *et al.* Tetanus toxin-mediated cleavage of cellubrevin impairs exocytosis of transferrin receptor-containing vesicles in CHO cells. *The Journal of cell biology* **125**, 1015–24 (1994).
21. Fader, C. M., Sánchez, D. G., Mestre, M. B. & Colombo, M. I. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochimica et biophysica acta* **1793**, 1901–16 (2009).
22. Spinosa, M. R. *et al.* Functional characterization of Rab7 mutant proteins associated with Charcot-Marie-Tooth type 2B disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**, 1640–8 (2008).
23. Usson, Y. Principe de la microscopie par absorption biphotonique. at <<http://membres-timc.imag.fr/Yves.Usson/COURS/2-PHOTONS.pdf>>
24. Dufour, P., Dufour, S., Castonguay, A., McCarthy, N. & Koninck, Y. D. Microscopie à deux photons pour l'imagerie cellulaire fonctionnelle : avantages et enjeux. *Medecine/Science* **22**, 837–844 (2006).
25. Svoboda, K. & Yasuda, R. Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience. *Neuron* **50**, 823–39 (2006).

26. Parish, C. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunology and cell biology* **77**, 499–508 (1999).
27. Massin, J. *et al.* Near-Infrared Solid-State Emitters Based on Isophorone: Synthesis, Crystal Structure and Spectroscopic Properties. *Chemistry of Materials* **23**, 862–873 (2011).
28. Bártová, E. *et al.* Structure and epigenetics of nucleoli in comparison with non-nucleolar compartments. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **58**, 391–403 (2010).
29. Lo, S. J., Lee, C.-C. & Lai, H.-J. The nucleolus: reviewing oldies to have new understandings. *Cell research* **16**, 530–8 (2006).
30. Malaekheh-Nikouei, B., Jaafari, M. R., Tabassi, S. a S. & Samiei, A. The enhancement of immunosuppressive effects of cyclosporine A on human T-cells using fusogenic liposomes. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **67**, 238–244 (2008).
31. Pagano, R. E. & Huang, L. Interaction of phospholipid vesicles with cultured mammalian cells II . Studies of Mechanism. *The Journal of Cell Biology* **67**, 49–60 (1975).
32. McMullen, T. P. W., Lewis, R. N. a. H. & McElhaney, R. N. Cholesterol–phospholipid interactions, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **8**, 459–468 (2004).
33. Csiszár, A. *et al.* Novel Fusogenic Liposomes for Fluorescent Cell Labeling and Membrane Modification. *Bioconjugate chemistry* **21**, 537–543 (2010).
34. Struck, D. K., Hoekstra, D. & Pagano, R. E. Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry* **20**, 4093–9 (1981).
35. Stebelska, K., Wyrozumska, P. & Sikorski, A. F. PS exposure increases the susceptibility of cells to fusion with DOTAP liposomes. *Chemico-biological interactions* **160**, 165–74 (2006).
36. Veldman, R. J., Zerp, S., van Blitterswijk, W. J. & Verheij, M. N-hexanoyl-sphingomyelin potentiates in vitro doxorubicin cytotoxicity by enhancing its cellular influx. *British journal of cancer* **90**, 917–25 (2004).
37. Israelachvili, J. N. *Intermolecular and Surface Forces: Revised Third Edition*. Academic Press. 704p. (2011).
38. Klein, J. Thèse, Université de Strasbourg. (2009).
39. De Gier, J., Mandersloot, J. G. & Van Deenen, L. L. M. The role of cholesterol in lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* **173**, 143–145 (1969).
40. Maillet, M. *Biologie Cellulaire 10ème édition*. 618 (2006).
41. Wrobel, I. & Collins, D. Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1235**, 296–304 (1995).
42. Bailey, a L. & Cullis, P. R. Membrane fusion with cationic liposomes: effects of target membrane lipid composition. *Biochemistry* **36**, 1628–34 (1997).

Conclusion générale et perspectives.

Lors de ce projet de thèse, de nouveaux bio-conjugués Lipide-Polymère-Chromophores (LPC) d'architecture contrôlée ont été synthétisés. La stratégie de synthèse employée a comporté trois grandes étapes :

- La synthèse d'agents de contrôle de la polymérisation RAFT fonctionnalisés par un lipide (de type dithioester)
- La copolymérisation des monomères NAM et NAS par le procédé RAFT en présence des dithioesters lipidiques
- Le couplage de chromophores émettant dans le rouge lointain sur les copolymères α -fonctionnels Lipide- poly(NAM-co-NAS)

Les bio-conjugués LPC obtenus ont été caractérisés par spectroscopie optique afin d'étudier l'influence de la chaîne polymère sur les propriétés des chromophores. Ils ont ensuite été testés en milieu biologique afin d'évaluer leur capacité à être utilisés comme sondes fluorescentes pour l'imagerie optique de cellules vivantes.

Les principaux résultats de ces différentes parties sont résumés ci-dessous, puis les différentes perspectives relatives au projet seront évoquées.

L'**étude bibliographique** a permis de mettre en évidence l'originalité de la structure envisagée dans ce projet. En effet, très peu de bio-conjugués Lipide-Polymère-Chromophores (LPC) ont été décrits dans la littérature jusqu'à présent et aucun ne présente l'avantage, comme c'est le cas pour notre bio-conjugué, d'être une plateforme hydrosoluble, multifonctionnelle et modulable.

Dans le **chapitre 2**, la synthèse de copolymères hydrophiles et réactifs poly(NAM-co-NAS) portant un lipide en extrémité α de chaîne a été décrite. La synthèse de ces copolymères α -fonctionnels et réactifs a été réalisée en tirant profit de précédents travaux de notre équipe, à savoir d'une part la synthèse de copolymères poly(NAM-co-NAS) par le procédé RAFT¹, et d'autre part, la synthèse de Lipide-poly(NAM) à partir d'un dithioester lipidique².

Dans un premier temps, la synthèse de l'Agent de Transferts de Chaîne (ATC) lipidique a été reproduite (ATC-DPPEHA). Cette synthèse consiste à coupler un lipide aminé sur un précurseur portant une fonction ester activé de type *N*-Hydroxysuccinimide (SEDB). L'étape la plus délicate de cette synthèse est la purification de ce précurseur ; or, il s'agit d'une étape importante puisque la pureté des ATC lipidiques dépend directement de la pureté des ATC précurseurs. De nombreux tests ont été réalisés, ce qui a permis de mettre au point une technique de purification du SEDB par recristallisation, améliorant considérablement la pureté de ce dithioester précurseur (95% contre 67% auparavant).

Dans un second temps, la synthèse d'un nouvel ATC lipidique (ATC-DPPE) a été réalisée, en suivant un mode opératoire identique à celui utilisé pour l'ATC-DPPEHA et en tirant profit des optimisations de purification.

Les deux dithioesters lipidiques, présentant des puretés molaires de 90%, ont ensuite été utilisés pour la copolymérisation des monomères NAM et NAS par le procédé de polymérisation RAFT ($[\text{Monomères}] = 2 \text{ M}$; Amorceur AIBN ; $[\text{ATC}]_0 / [\text{AIBN}]_0 : 5$; $T = 80^\circ\text{C}$; dioxane). Les différents essais ont permis de mettre en évidence des périodes d'inductions très longues (40 minutes dans le cas de l'ATC-DPPEHA et 100 minutes dans le cas de l'ATC-DPPE), certainement dues à la présence des impuretés résiduelles désactivant les radicaux formés. L'efficacité des ATC lipidiques a été confirmée suite à l'analyse des polymères par chromatographie d'exclusion stérique (CES) couplée à un détecteur par diffusion de lumière multi-angles : des masses molaires moyennes en nombre (M_n) très proches des masses molaires théoriques et des indices de polymolécularité (I_p) très proches de 1, attestent d'un très bon contrôle des polymérisations RAFT.

La stratégie choisie a permis de synthétiser une gamme de copolymères α -fonctionnels et réactifs Lipide-poly(NAM-co-NAS) de masses molaires comprises entre 5 900 et 33 200 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Ces structures très originales, fonctionnalisées par un lipide en extrémité de chaîne et pouvant être fonctionnalisées en position latérale, présentent de nombreuses applications potentielles en biologie (sondes fluorescentes, délivrance contrôlée...)

Le **chapitre 3** de ce manuscrit décrit, dans un premier temps, le couplage de chromophores émettant dans le rouge lointain et synthétisés par le laboratoire de Chimie de L'ENS de Lyon, sur les bio-conjugués Lipide-Polymère. Ce couplage, rapide et efficace, conduit à la formation d'une liaison amide stable. L'analyse du milieu réactionnel par CES couplée à un détecteur UV a permis à la fois de suivre la cinétique de couplage, mais également de déterminer *in fine* le rendement de couplage des chromophores (compris entre 60 et 70%) et donc le nombre moyen de chromophores couplés par chaîne polymère. Différents bio-conjugués LPC ont ainsi été obtenus, comportant entre 2 et 38 chromophores par chaîne. Ces bio-conjugués ont ensuite été traités dans le but de désactiver les fonctions réactives résiduelles, soit par hydrolyse (conduisant à un bio-conjugué à squelette négativement chargé), soit par capping par l'Aminoethylmorpholine (AEM) (conduisant à un bio-conjugué à squelette neutre). Il a été mis en évidence que les bio-conjugués LPC sont très solubles dans les solvants aqueux alors que les chromophores, très hydrophobes, ne le sont pas.

Dans un second temps, les bio-conjugués LPC purifiés ont été caractérisés par spectroscopie UV/Visible et par fluorescence. Ces caractérisations ont permis de démontrer que tous les bio-conjugués présentent une brillance améliorée (jusqu'à 13 000 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ dans l'eau et 50 000 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ dans le chloroforme) par rapport au chromophore seul dans le chloroforme (1 400 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Le rendement quantique de fluorescence (Φ) semble être le paramètre le plus sensible vis-à-vis de la structure des bio-conjugués ; en effet, plus la densité en chromophores (D_c) augmente le long de la chaîne et plus le rendement quantique de fluorescence des sondes diminue, ce qui était plus ou moins attendu. En revanche, un résultat plus surprenant a été obtenu : dans le chloroforme, le rendement quantique de fluorescence ne diminue pas lorsque la densité en chromophores des sondes augmente.

L'évaluation de la capacité des bio-conjugués LPC synthétisés à s'insérer dans des membranes lipidiques modèles a ensuite été évaluée (**chapitre 4**).

Dans un premier temps, la possibilité de formation de liposomes fluorescents (SUVs, LUVs, GUVs) a été vérifiée à travers l'utilisation de différentes techniques (extrusion, sonication et électroformation), en mélangeant directement les bio-conjugués LPC avec des lipides usuels. Après de nombreuses optimisations, il a été montré, par microscopie optique et DLS notamment, que des liposomes de différentes tailles ont pu être formés (40 nm pour les SUVs, 120 nm pour les LUVs et 15-30 μm pour les GUVs).

Dans un second temps, la capacité des bio-conjugués LPC à s'insérer au sein de liposomes pré-formés (de type GUVs) a été évaluée. La microscopie en champ sombre et de fluorescence s'est avérée être un outil de choix : après incubation des GUVs en présence de bio-conjugués, des GUVs fluorescentes ont été observées. Néanmoins, cette technique ne permet pas de déterminer avec précision si les bio-conjugués LPC sont incorporées au sein de la bicouche via les chaînes alkyles du lipide ou adsorbés à la surface des liposomes.

Enfin, le **chapitre 5** décrit les résultats obtenus lors des évaluations biologiques des bio-conjugués LPC. Tout d'abord, des tests sur cellules vivantes ont montré une absence de cytotoxicité des bio-conjugués aux concentrations habituellement utilisées en biologie pour les sondes fluorescentes ($\leq 1\mu\text{M}$). Ensuite, les différentes études réalisées ont montré une internalisation rapide des bio-conjugués (< 10 minutes). Un marquage diffus du cytoplasme est observé, couplé à un marquage asymétrique des cellules (sous forme de spots fluorescents localisés principalement d'un seul côté du noyau), et ce, quelle que soit la lignée cellulaire testée (Hela, lymphocyte T, neuronale). Des études complémentaires ont confirmé une internalisation privilégiée des bio-conjugués LPC dans les cellules par voie endocytotique.

D'autres tests d'internalisation des bio-conjugués LPC ont été réalisés, en utilisant comme vecteurs les liposomes fluorescents (de diamètre compris entre 40 et 150 nm). Des informations intéressantes ont pu être obtenues :

- La composition en lipides des liposomes joue un rôle important sur l'interaction liposomes / cellules vivantes. La présence de charges négatives en surface des liposomes semblent empêcher les interactions avec les membranes cellulaires.
- La localisation intracellulaire des bio-conjugués LPC n'est pas modifiée.

En ce qui concerne les différentes perspectives de ce projet, il serait intéressant de synthétiser de nouveaux bio-conjugués LPC à partir de chaînes polymères de petites tailles (autour de $2\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Cette structure permettrait au lipide situé en extrémité de chaîne d'être davantage accessible. Ces bio-conjugués LPC pourraient présenter des comportements différents de ceux déjà synthétisés, à la fois lors de l'incubation en présence de GUVs et lors des tests sur cellules vivantes.

Il serait également intéressant de modifier la structure des bio-conjugués LPC, avec un chromophore en position terminale (extrémité α des chaînes) et plusieurs lipides couplés en position latérale. Cela permettrait de savoir :

- Si la localisation du chromophore en extrémité de chaîne change les propriétés optiques des bio-conjugués par rapport à celles des chromophores couplés en position latérale et à celles du chromophore seul
- Enfin, si le couplage de plusieurs lipides en position latérale le long de la chaîne polymère permettrait de favoriser un marquage membranaire des cellules vivantes.

Il serait également possible d'imaginer coupler, en position latérale, à la fois des chromophores et des lipides.

Une autre perspective intéressante serait de tester les interactions liposomes / bio-conjugués LPC à partir de bio-conjugués comportant des chromophores de nature différente du JM086 (par exemple chargé et hydrophile, alors que le JM086 est non chargé et hydrophobe). Cela permettrait, entre autres, de mieux comprendre les résultats obtenus dans le cas des tests d'internalisation sur cellules vivantes des bio-conjugués LPC qui portent le chromophore Lucifer Yellow (cf. chapitre 5).

Les bio-conjugués LPC synthétisés pourraient également être utilisés pour marquer des particules virales (de tailles très inférieures aux cellules : 100 nm au lieu de plusieurs dizaines de micromètres). Des travaux préliminaires concernant le marquage de particules virale de type HCV (virus de l'hépatite C) ont déjà débutés en collaboration avec Eve-Isabelle Pêcheur (CRCL – Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon) (cf. annexe 9).

Concernant les perspectives à plus long terme, des bio-conjugués LPC portant un lipide de type PIP2 pourraient être synthétisés, en adaptant les modes opératoires de synthèse (par exemple en faisant appel à la chimie « click » pour éviter d'avoir à synthétiser un dérivé PIP2-NH₂ dont la synthèse apparaît très difficile). Ces bio-conjugués pourraient être utilisés pour visualiser différents phénomènes membranaires comme le bourgeonnement du virus HIV-1.

Le couplage d'une chaîne polymère fluorescente comportant plusieurs chromophores au niveau de la partie centrale du PIP2 permettrait d'apporter une solution intéressante aux différents problèmes rencontrés lors de l'utilisation des lipides fluorescents. En effet, la localisation de la chaîne polymère au niveau de la partie centrale permet de conserver l'intégrité de la tête polaire (indispensable pour la reconnaissance avec les protéines virales) et des chaînes grasses, n'altérant pas l'activité du PIP2.

Bibliographie.

1. Favier, A., D'Agosto, F., Charreyre, M.-T. & Pichot, C. Synthesis of N-acryloxysuccinimide copolymers by RAFT polymerization, as reactive building blocks with full control of composition and molecular weights. *Polymer* **45**, 7821–7830 (2004).
2. Bathfield, M. *et al.* Synthesis of Lipid-alpha-End-Functionalized Chains by RAFT Polymerization . Stabilization of Lipid / Polymer Particle Assemblies. *Macromolecules* **41**, 8346–8353 (2008).

Liste des publications en préparation :

1. **Synthesis of multifunctional well-defined lipid-polymer conjugates. Application to the elaboration of bright fluorescent probes for lipid bilayer labeling.** Salim Adjili *et al*, in preparation, To be submitted to *Macromolecules*
2. **Far red emitting fluorescent polymer probes for living cell labeling.** Salim Adjili *et al*, in preparation
3. **Novel fluorescent lipid-polymer probes for membrane labeling: structure/properties relationship.** Salim Adjili *et al*, in preparation
4. **Far red emitting macromolecular lipidic probes: synthesis, spectrophysical characterization and application to the labeling of viral particles.** William Lacour, Salim Adjili *et al.*, in preparation

ANNEXES

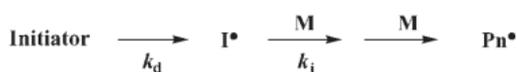
Sommaire

Annexe 1 : La polymérisation radicalaire contrôlée de type RAFT	227
Annexe 2 : Spectres d'absorption et d'émission du chromophore JM086 dans différents solvants..	230
Annexe 3 : Visualisation des GUVs sous forme d'anneaux lors des observations par microscopie en champ sombre.....	231
Annexe 4 : La protéine GFP.	232
ANNEXE 5 : Test d'imagerie bi-photon et acquisition du spectre d'excitation du bio-conjugué 33K-9H <i>in cellulo</i>	233
Annexe 6 : Spectres d'absorption et d'émission des chromophores F647H et LY.....	237
ANNEXE 7 : Influence de la composition des liposomes sur l'internalisation des bio-conjugués.....	238
ANNEXE 8 : Mode alternatif d'internalisation des bio-conjugués LPC – La microinjection.	240
ANNEXE 9 : Marquage des pseudo-particules virales HCVpp.	244
ANNEXE 10 : Test de résistance au photoblanchiment des bio-conjugués LPC.....	248

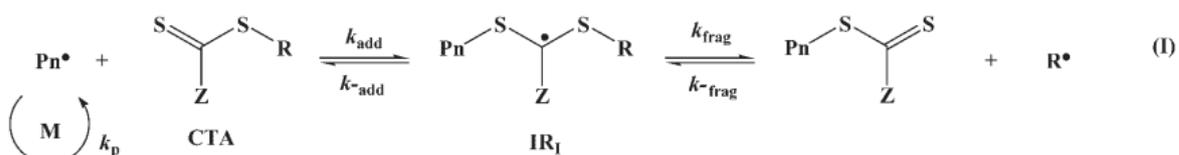
Annexe 1 : La polymérisation radicalaire contrôlée de type RAFT

La technique de polymérisation radicalaire contrôlée de type RAFT a été décrite pour la première fois en 1998 par le groupe de Rizzardo¹. Cette technique repose sur un mécanisme de transfert de chaîne réversible au sein du milieu réactionnel, via l'utilisation d'un agent de transfert de chaîne (noté ATC) de type dithioester selon le schéma général de la figure 1.

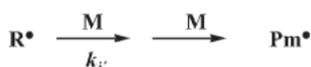
Initiation



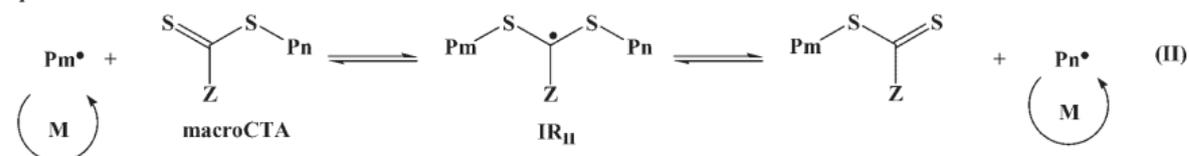
Chain transfer



Re-initiation



Equilibrium between active and dormant chains



Termination



Figure 1. Mécanisme général de la polymérisation RAFT².

La présence d'espèces radicalaires dans le milieu réactionnel entraîne une séquence de réactions d'addition-fragmentation réversibles induite par l'ATC. Un équilibre est ainsi créé entre les espèces actives et les espèces dormantes (qui peuvent redevenir actives) permettant de conserver le caractère vivant de la polymérisation.

Les agents de transfert de chaînes utilisés en polymérisation RAFT doivent être choisis de telle sorte qu'ils permettent de conserver le caractère vivant de la polymérisation, notamment grâce à un haut taux de transfert entre les espèces actives et les espèces dormantes. Ce taux de transfert est directement dépendant de la nature des constituants Z et R qui composent l'ATC^{1,3,4} (Figure 2).

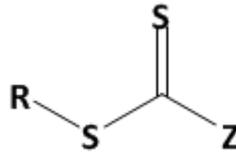


Figure 2. Structure générale des agents de transfert RAFT.

En effet, le constituant Z doit être choisi pour sa capacité à activer (ou au moins à ne pas désactiver) la double liaison C=S tandis que le constituant R doit être un bon groupe partant, donnant naissance à une espèce radicalaire permettant de réamorcer une polymérisation. Un bon contrôle de l'équilibre entre addition et fragmentation de l'ATC, avec un échange rapide entre les espèces actives et dormantes, permet d'assurer à la fois une proportion en espèces dormantes supérieure à la proportion en espèces actives, mais permet également d'assurer un bon contrôle de la polymérisation.

De plus, la présence d'une faible quantité d'espèces actives (radicalaires) permet de minimiser les réactions de terminaison pouvant conduire à un arrêt de la polymérisation, comme c'est le cas lors des polymérisations radicalaires conventionnelles.

Les masses molaires moyennes en nombre M_n des chaînes polymères formées peuvent être prédites à partir des conversions en monomères et des concentrations initiales en monomères et en ATC.

Les masses molaires théoriques des chaînes formées peuvent être calculées suivant l'équation 1.

$$(1) \quad M_n \text{ théo} = \frac{[\text{NAM}]_0 M_{\text{NAM}} \text{Conv}_{\text{NAM}} + [\text{NAS}]_0 M_{\text{NAS}} \text{Conv}_{\text{NAS}}}{[\text{CTA}]_0 + 2f[\text{AIBN}]_0(1 - e^{-k_d t})(1 - f_c/2)} + M_{\text{CTA}}$$

Avec : $[\text{NAM}]_0$ et M_{NAM} ; $[\text{NAS}]_0$ et M_{NAS} = les concentrations molaires initiales et les masses molaires en monomères

Conv_{NAM} et Conv_{NAS} = les conversions en monomères

$[\text{CTA}]_0$ et M_{CTA} = la concentration molaire et la masse molaire de l'ATC

$[\text{AIBN}]$, k_d et f = la concentration molaire, la constante de décomposition et le facteur d'efficacité de l'amorceur

t = durée de polymérisation

f_c = Proportion de réaction de couplage par rapport à toutes les réactions de terminaison

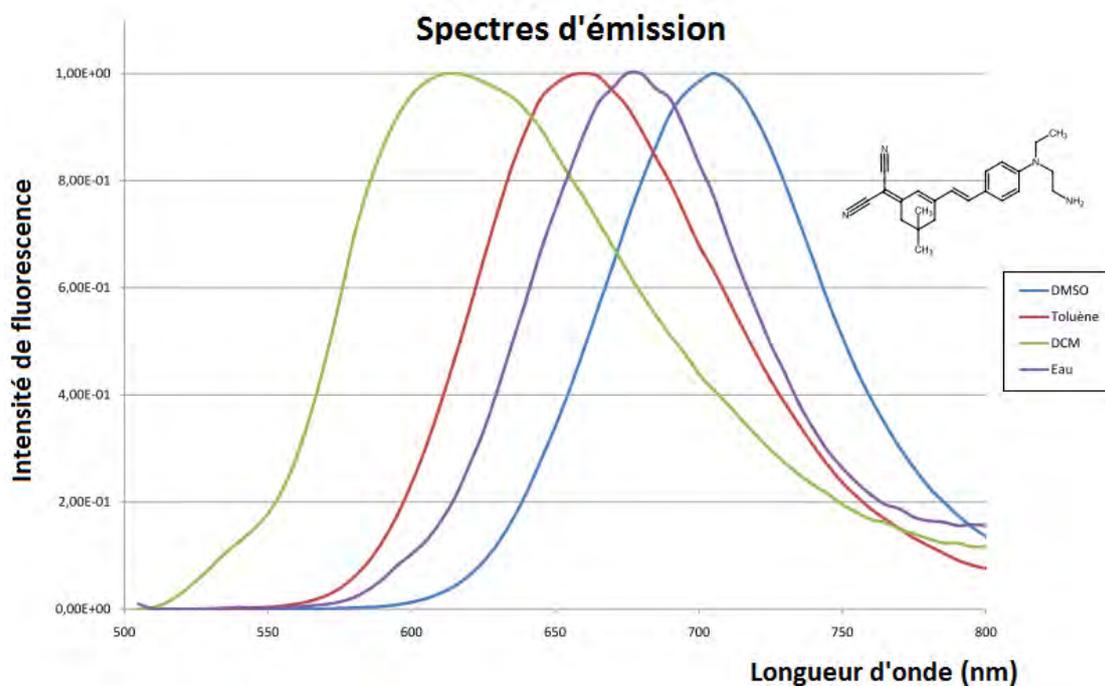
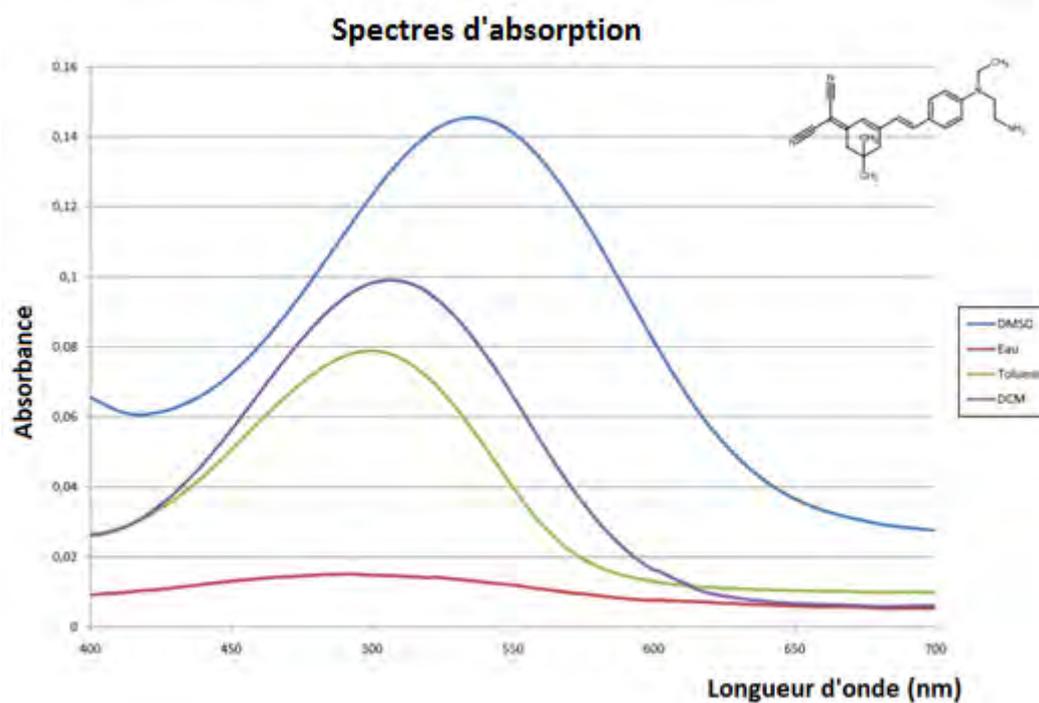
Si le rapport $[CTA]_0 / [AIBN]$ est grand, les masses molaires moyennes peuvent être calculées en négligeant la proportion de chaînes amorcées par l'amorceur (Equation2) :

$$(2) \quad M_{n \text{ calc}} = \frac{[NAM]_0 M_{NAM} \text{Conv}_{NAM} + [NAS]_0 M_{NAS} \text{Conv}_{NAS}}{[CTA]_0} + M_{CTA}$$

Bibliographie.

1. Chiefari, J. *et al.* Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer : The RAFT Process. *Macromolecules* **31**, 5559–5562 (1998).
2. Favier, A. & Charreyre, M.-T. Experimental Requirements for an Efficient Control of Free-Radical Polymerizations via the Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Process. *Macromolecular Rapid Communications* **27**, 653–692 (2006).
3. Favier, A., Charreyre, M.-T., Chaumont, P. & Pichot, C. Study of the RAFT Polymerization of a Water-Soluble Bisubstituted Acrylamide Derivative . 1 . Influence of the Dithioester Structure. *Macromolecules* **35**, 8271–8280 (2002).
4. Moad, G., Rizzardo, E. & Thang, S. H. Living Radical Polymerization by the RAFT Process. *Australian Journal of Chemistry* **58**, 379 (2005).

Annexe 2 : Spectres d'absorption et d'émission du chromophore JM086 dans différents solvants.



Annexe 3 : Visualisation des GUVs sous forme d'anneaux lors des observations par microscopie en champ sombre.

Les GUVs présentent en suspension dans la goutte déposée sur la lame, sédimentent après quelques minutes et se déposent sur la lame en verre (Figure 1). Du fait de leur forme sphérique, les GUVs présentent des profils d'intensité de lumière diffusée différents tout autour de la vésicule :

- Sur les bords de la GUVs, de nombreuses espèces diffusantes (lipides et bio-conjugué) sont présentes sur des plans différents. A chaque distance « x » il y a plusieurs espèces qui diffusent la lumière
- En revanche, sur le haut et le bas de la GUVs, les espèces ne sont présentes que sur un plan. Donc, à chaque distance « x », seulement deux espèces diffusent la lumière.

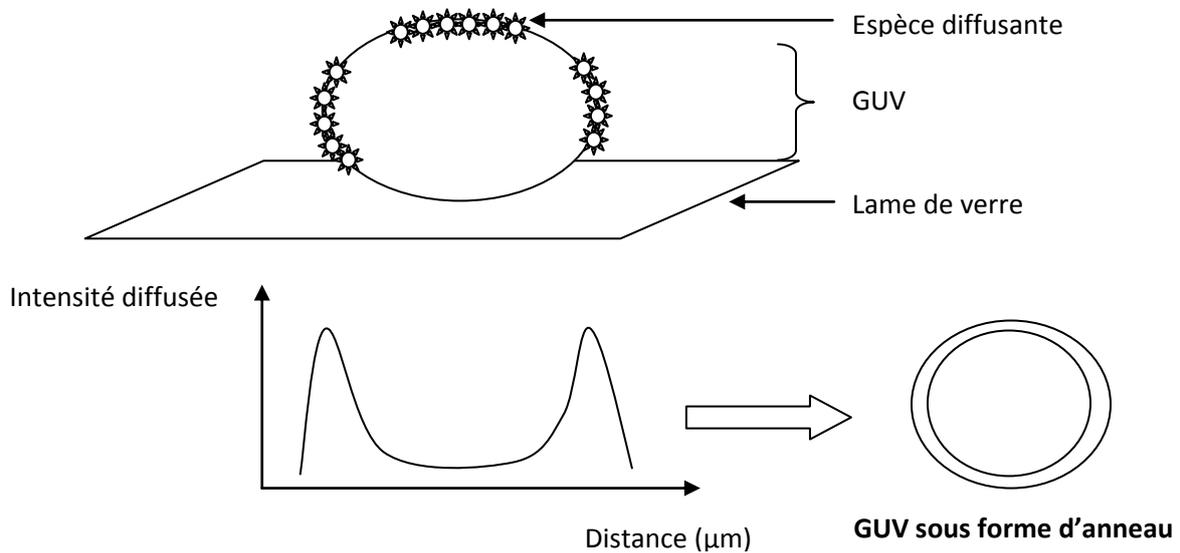


Figure 1. Représentation schématique du profil d'intensité de lumière diffusée lors de l'observation des GUVs en champ sombre.

Ainsi, lorsqu'on observe les GUVs par microscopie en champ sombre et par microscopie de fluorescence, les côtés de la GUV sont très contrastés et la GUV est visualisée sous la forme d'un anneau.

Annexe 4 : La protéine GFP.

La GFP (Green Fluorescent Protéine) est une protéine composée de 238 acides aminés et présentant une masse molaire de $27\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. La protéine comporte une partie optiquement active : le chromophore p-hydroxybenzylimidazolinone¹ (Figure 1).

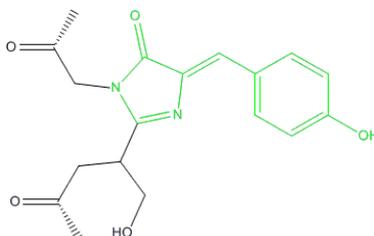


Figure 1. Structure du chromophore de la protéine GFP (en vert la partie responsable de la fluorescence).

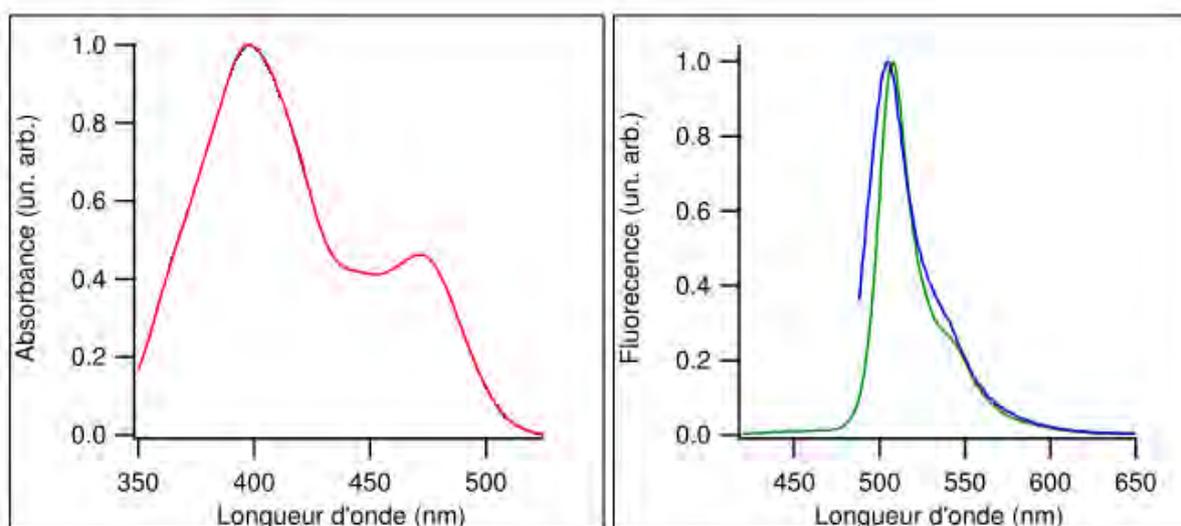


Figure 2. Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de la protéine GFP. A droite, le spectre vert correspond à l'émission de fluorescence successive à une excitation à 400 nm, alors que le spectre bleu correspond à une émission de fluorescence successive à une excitation à 480 nm.

Le spectre d'absorption de la GFP présente un pic centré à 400 nm et un épaulement centré à 480 nm. Lorsque la GFP est excitée à 400 nm elle conduit à une bande d'émission de fluorescence centrée sur 508 nm (vert) alors que lorsqu'elle est excitée à 480 nm elle conduit à une bande d'émission centrée sur 505 nm (bleu).

1. Didier, P. Thèse, Université Louis Pasteur - Strasbourg I. (2004).

ANNEXE 5 : Test d'imagerie bi-photon et acquisition du spectre d'excitation du bio-conjugué 33K-9H *in cellulo*.

(Expérience réalisée avec l'aide de Christophe VANBELLE (CeCIL))

Objectif : Vérifier que les cellules incubées en présence de bio-conjugué peuvent être imagées par microscopie biphotonique. Utiliser la microscopie pour tracer le spectre d'excitation à 2 photons *in cellulo* du bio-conjugué.

Appareillage :

- Microscope confocal inversé ZEISS - LSM 780 (Carl Zeiss, Germany - CeCIL) – (objectif à immersion à huile 63X)

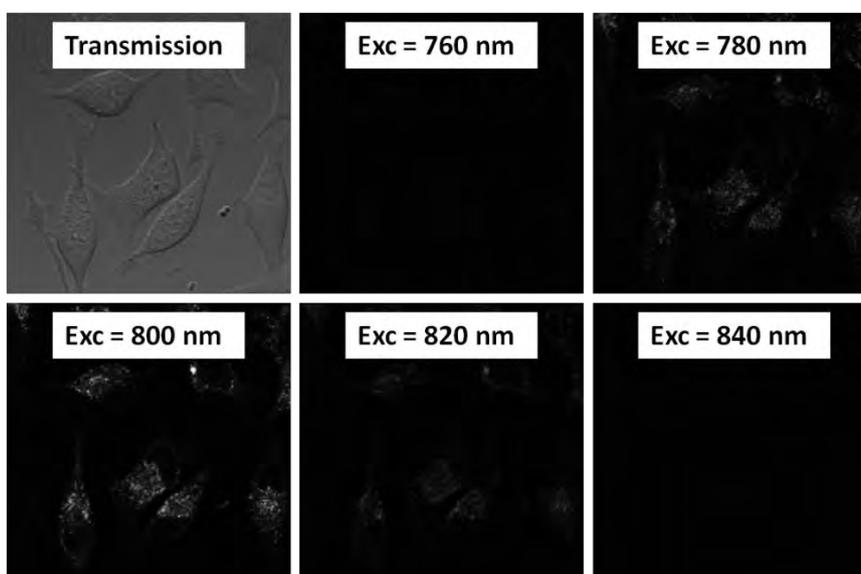
Microscopie à 2 photons :

- Sur cellules HeLa
- Bio-conjugué 33K-9H à 1 μ M dans le milieu de culture MEM α ($\lambda_{\text{abs max}}$: 501 nm / $\lambda_{\text{em max}}$: 690 nm dans l'eau)
- Après incubation des cellules en présence des sondes (15 heures), le milieu est lavé deux fois avec du milieu de culture neuf et les observations sont réalisées.

Résultats :

Lors des deux premières séances de microscopie, il a été mis en évidence que :

- Les cellules peuvent être visualisées par microscopie bi-photonique après incubation 15 heures avec le bio-conjugué
- Le maximum d'excitation à deux photons pour le bio-conjugué 33K-9H se situe entre 780 et 820 nm environ
- Le spectre d'émission *in cellulo* suite à une excitation bi-photon présente un maximum d'émission à 650 nm.



Cependant, Christophe VANBELLE s'est rendu compte que l'intensité en sortie du laser utilisé lors de ces premières observations diminuait très fortement avant et après 800 nm.

D'autres tests ont donc été réalisés, après que le laser ait été recalibré.

A/ 3^{ème} séance de microscopie bi-photon.

Les observations ont pu mettre en évidence différents phénomènes :

- Une intensité de fluorescence maximale est obtenue pour une longueur d'onde d'excitation bi-photon de 700 nm ; or le chromophore JM086 dans le chloroforme présente une longueur d'onde maximale d'excitation à 2 photons autour de 1050 nm (donnée de Y. Bretonnière).
- Il semblerait qu'en augmentant la puissance du laser on parvient à faire apparaître une image de fluorescence, quelle que soit la longueur d'onde d'excitation bi-photon entre 700 et 900 voire 1000 nm.
- Lors d'une excitation à 2 photons, le bio-conjugué photoblanchit très rapidement, ce qui nécessite de diminuer la puissance du laser.

Après avoir discuté avec les chimistes du laboratoire de Chimie de l'ENS de Lyon (Cyrille Monnereau et Yann Bretonnière), il semblerait que nous ayons mis en évidence un phénomène d'émission stimulée. En choisissant une longueur d'onde d'excitation bi-photon proche de sa longueur d'onde d'émission, on stimule son émission de fluorescence.

B/ 4^{ème} séance de microscopie bi-photon.

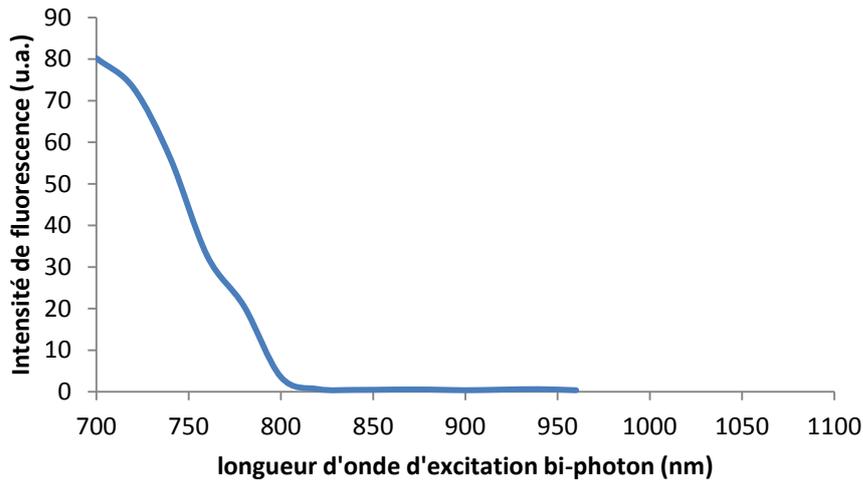
Lors de ce test, nous avons utilisé une sonde moléculaire référence (DBB-NH₂) afin de pouvoir comparer les résultats et voir si les phénomènes observés lors de l'expérience précédente sont particuliers aux bio-conjugués JM086 ou non.

Ce test a permis de confirmer les résultats obtenus précédemment. Nous avons observé que :

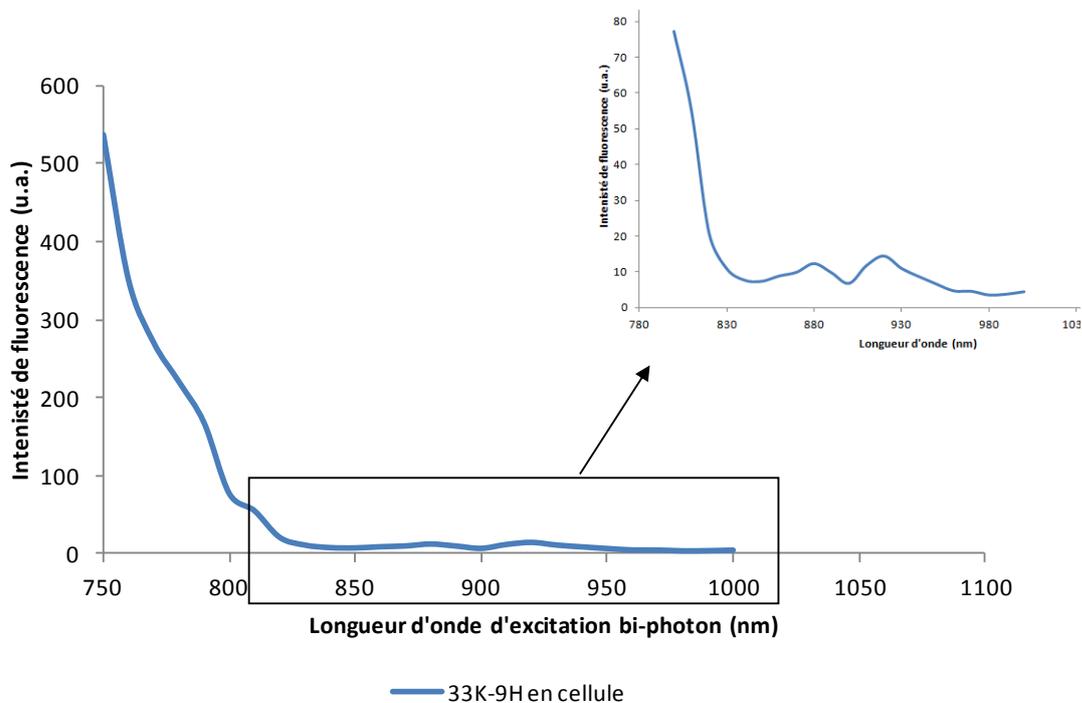
- La sonde moléculaire référence DBB-NH₂ photoblanchit également très vite sous excitation 2 photons
- Le phénomène d'émission stimulée a été confirmé : lorsque la longueur d'onde d'excitation bi-photon est de 690 nm (longueur d'onde d'émission maximale des bio-conjugués dans l'eau) on sature complètement l'image (image extrêmement brillante).
- On peut imager les cellules en fluorescence quelle que soit la longueur d'onde d'excitation bi-photon entre 700 et 1000 nm, en jouant sur la puissance du laser. Ce phénomène a également été observé pour la sonde moléculaire DBB-NH₂.

Finalement, après traitement des images (détermination de l'intensité de fluorescence moyenne sur la totalité du champ d'observation pour tenir compte des mouvements rapides des spots brillants (endosomes) et des cellules), nous avons réussi à obtenir un spectre d'excitation à 2 photons du bio-conjugué 33K-9H *in cellulo*.

Spectre d'excitation bi-photon obtenu après la 3^{ème} séance.



Spectre d'excitation bi-photon obtenu après la 4^{ème} séance.

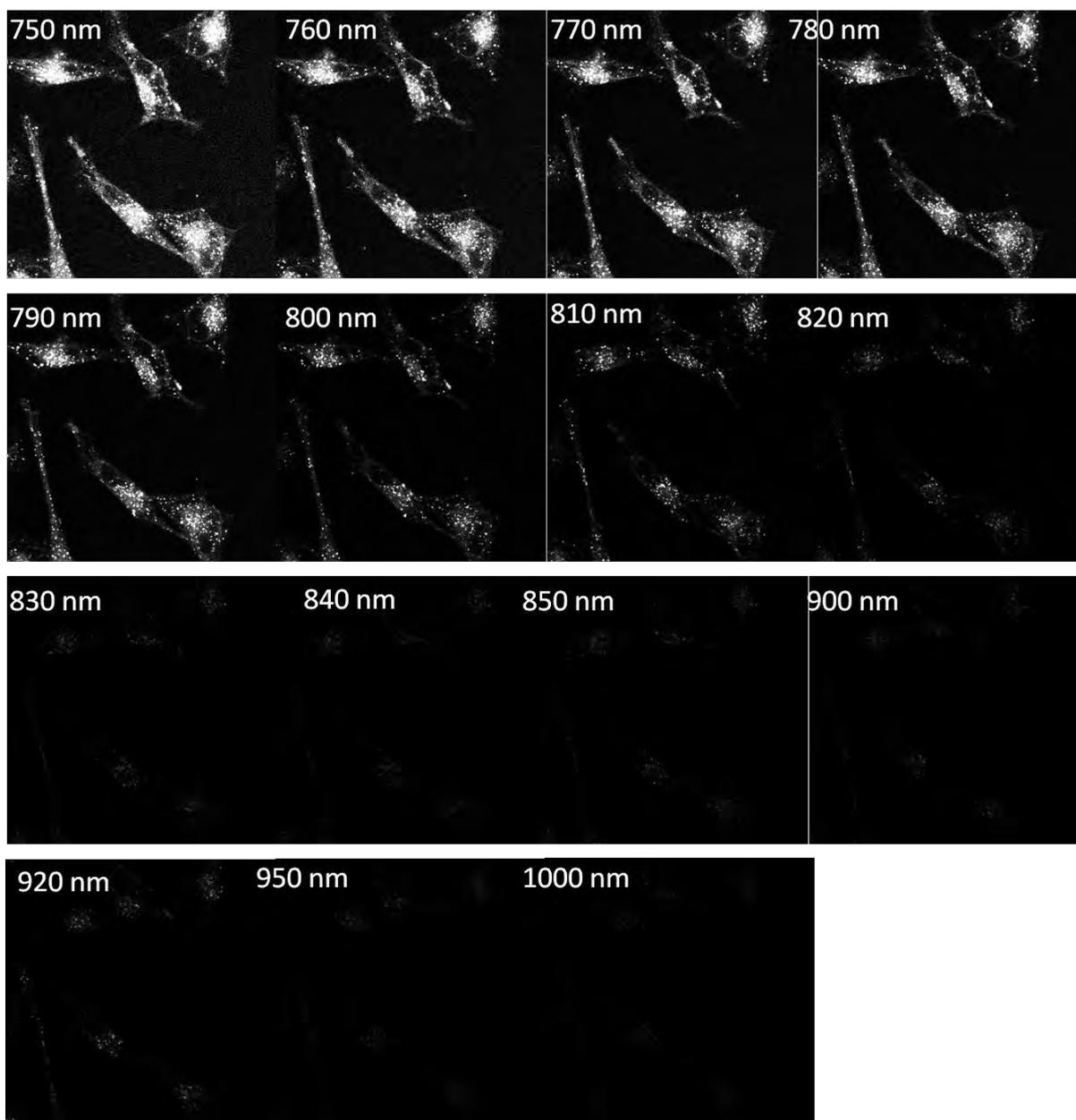


On observe une intensité de fluorescence encore très élevée à 750 nm, causée par le phénomène d'émission stimulée (bien qu'il soit difficile de savoir jusqu'à quelle longueur d'onde s'étend son influence).

On observe ensuite un épaulement à 780 nm, pouvant suggérer un maximum d'excitation à deux photons. On notera trois « pics » à 810, 880 nm et 920 nm.

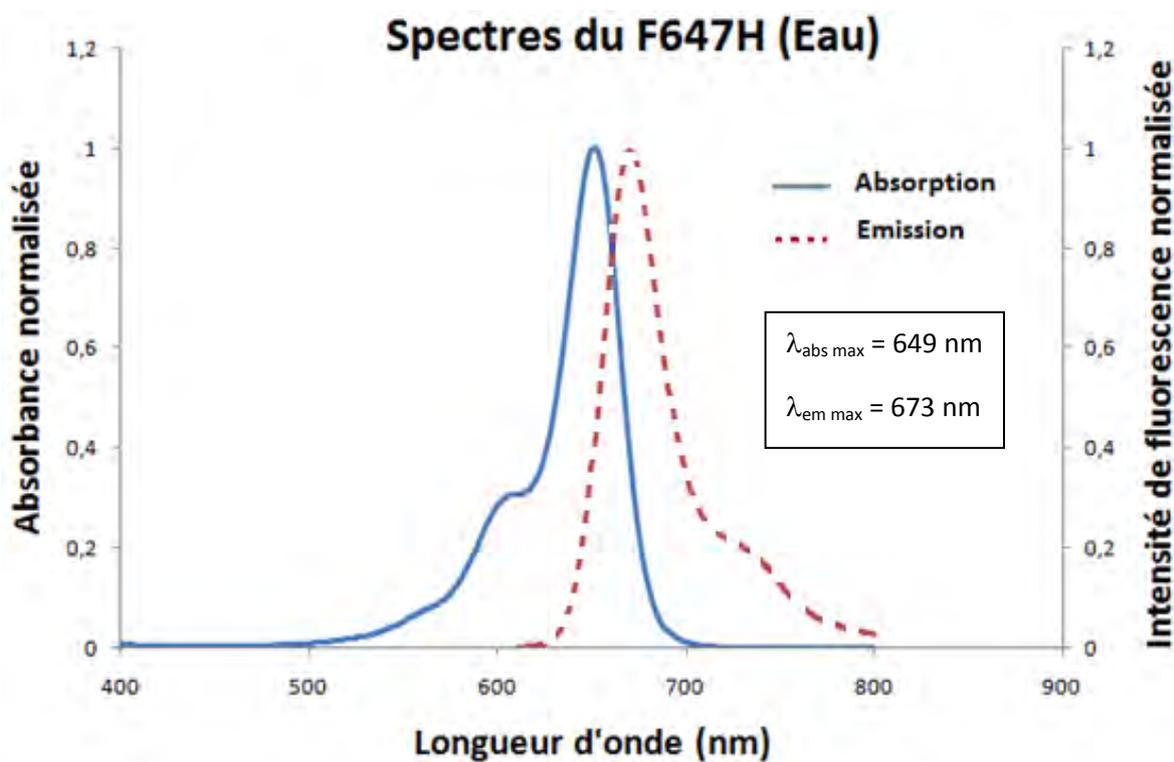
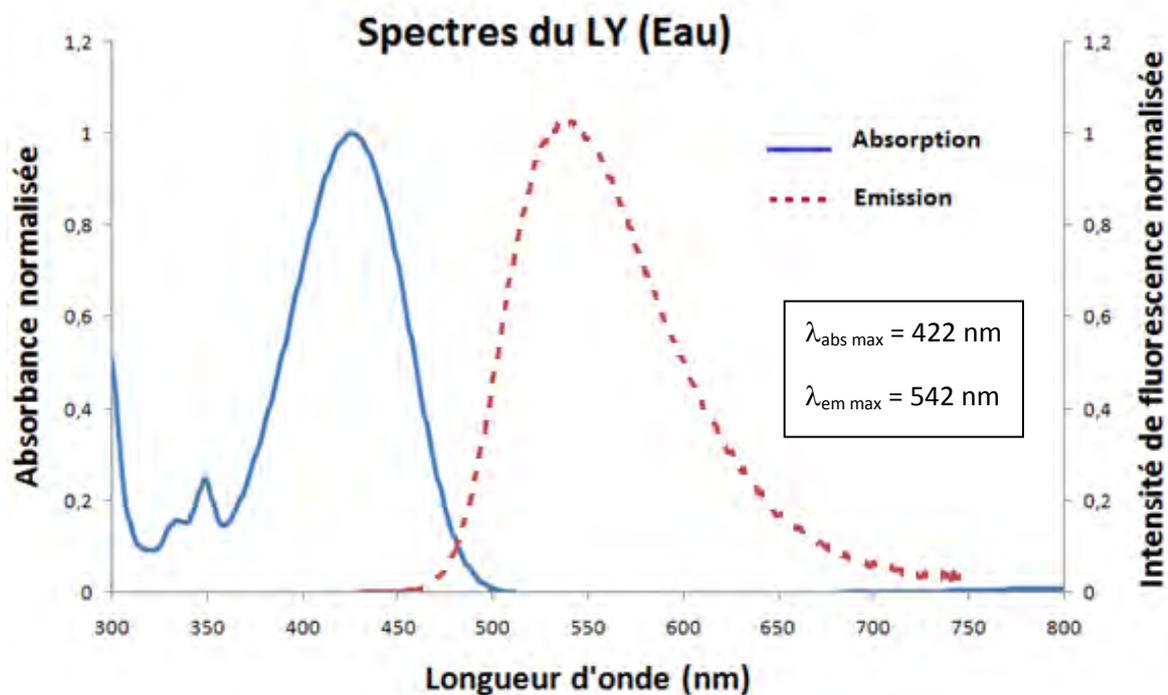
Remarque : Un contrôle a également été réalisé, dans lequel les cellules seules (non incubées en présence de bio-conjugué) ont été excitées à 810 nm dans les mêmes conditions de puissance laser qu'habituellement sans qu'aucune fluorescence ne soit détectée.

Pour conclure, ces différents tests nous ont permis de mettre en évidence que les cellules incubées avec le bio-conjugué polymère JM086 (33K-9H) peuvent être imagées par microscopie à deux photons. Nous avons également mis en évidence la présence d'un phénomène d'émission stimulée lorsque le bio-conjugué est excité à une longueur d'onde proche de sa longueur d'onde maximale d'émission dans l'eau (690 nm). Ce phénomène d'émission stimulée rend l'acquisition et l'interprétation des spectres d'excitation à deux photons difficiles puisque nous ne connaissons pas la plage de longueurs d'ondes impactées par ce phénomène.



Série d'images avec longueurs d'ondes d'excitation maximales bi-photon croissantes (750 à 1000 nm). L'affichage a été réglé de telle sorte à voir l'émission de fluorescence des sondes aux longueurs d'ondes d'excitation les plus élevées (vers 920 nm) ce qui implique une saturation des images correspondant à une longueur d'onde d'excitation de 750 nm.

Annexe 6 : Spectres d'absorption et d'émission des chromophores F647H et LY.



ANNEXE 7 : Influence de la composition des liposomes sur l'internalisation des bio-conjugués.

Annexe 7-1 : Influence de la nature de la tête polaire des lipides sur l'internalisation des bio-conjugués dans les cellules.

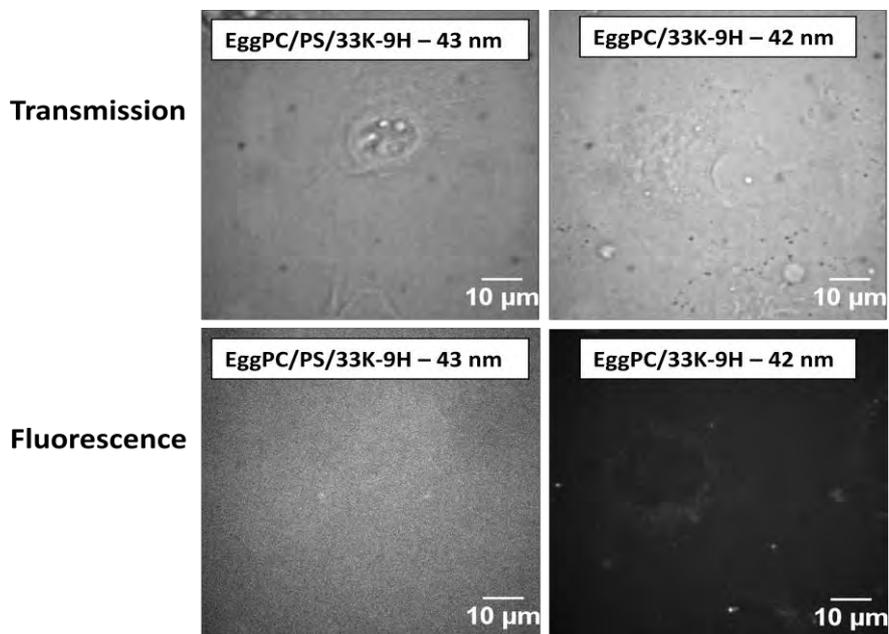


Figure 7-1. Clichés de microscopie confocale (Transmission et Fluorescence) ($\times 63$) des cellules HeLa incubées 2h à 37°C et sous 5% de CO₂ en présence de SUVs EggPC/PS/conjugué 33K-9H (gauche) et de SUVs EggPC/conjugué 33K-9H (droite).
(Ex = 491 nm / filtre émission = 675/67 nm)

Annexe 7-2 : Influence de la présence d'insaturations sur les chaînes alkyles sur l'internalisation des bio-conjugués dans les cellules.

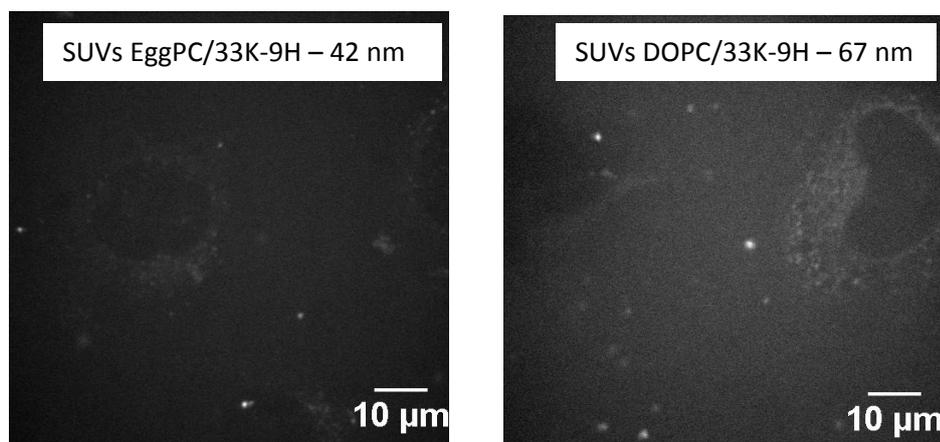
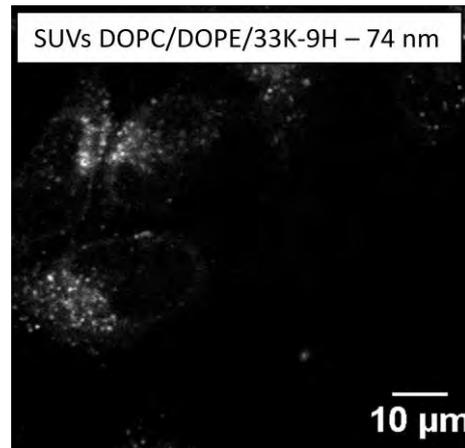


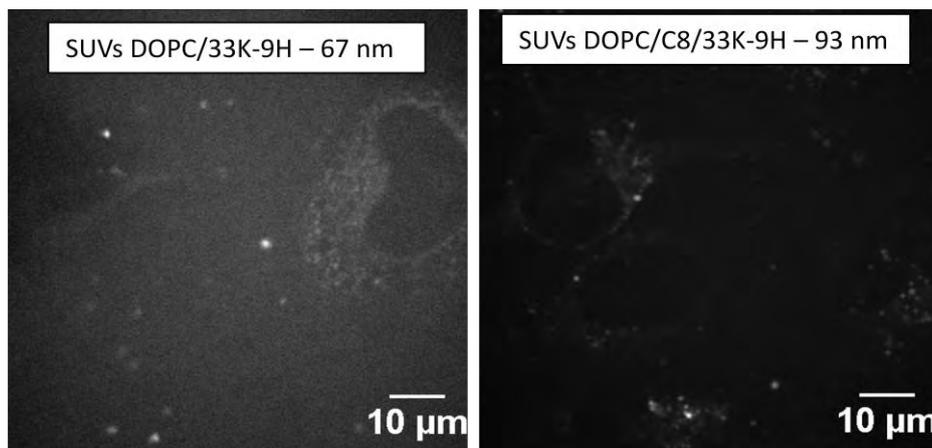
Figure 7-2. Clichés de microscopie confocale de fluorescence ($\times 63$) des cellules HeLa incubées 2h à 37°C et sous 5% de CO₂ en présence de SUVs EggPC/conjugué 33K-9H (gauche) et de SUVs DOPC/conjugué 33K-9H (droite).
(Ex = 491 nm / filtre émission = 675/67 nm)

Annexe 7-3 : Influence de la présence d'insaturations sur les chaînes alkyles et de la présence d'un lipide fusogène sur l'internalisation des bio-conjugués dans les cellules.



*Figure 7-3. Clichés de microscopie confocale de fluorescence ($\times 63$) des cellules HeLa incubées 2h à 37°C et sous 5% de CO₂ en présence de SUVs DOPC/DOPE/33K-9H.
(Ex = 491 nm / filtre émission = 675/67 nm)*

Annexe 7-4 : Influence de la présence d'un lipide à chaîne courte sur l'internalisation des bio-conjugués dans les cellules vivantes.



*Figure 7-4. Clichés de microscopie confocale de fluorescence ($\times 63$) des cellules HeLa incubées 2h à 37°C et sous 5% de CO₂ en présence de SUVs DOPC/conjugué 33K-9H (gauche), de SUVs DOPC/C8/conjugué 33K-9H (droite).
(Ex = 491 nm / filtre émission = 675/67 nm)*

ANNEXE 8 : Mode alternatif d'internalisation des bio-conjugués LPC – La microinjection.

(Expérience réalisée au CeCIL avec l'aide de Chantal THEVENON, Annabelle BOUCHARDON et Christophe VANBELLE)

Objectif : Tester un mode alternatif d'internalisation afin de vérifier si le fait d'injecter les bio-conjugués directement dans les cellules permet d'obtenir un marquage différent de celui obtenu lors d'un simple dépôt du bio-conjugué sur les cellules ou lors d'un dépôt de SUVs contenant le bio-conjugué (cf. p.171 et p.201 et annexe 6), à savoir marquage diffus du cytoplasme et sous forme de spots fluorescents proches du noyau.

Appareillage :

- Microinjecteur Eppendorf Injectman NI2 couplé à une pompe Eppendorf FEMTOjet et monté sur un microscope optique de type Nikon Eclipse TE-2000S (couplé à une source d'excitation de fluorescence X-Cite Series 120PC Q et muni d'une caméra Cool Snap ES).
- Les observations en microscopie confocale ont été réalisées sur un microscope de type LEICA SP5X muni de 2 détecteurs Hamamatsu hybrid GaAsp et de 3 détecteurs PMT, en utilisant des objectifs 10X sec et 63X à immersion à huile.

Microinjection :

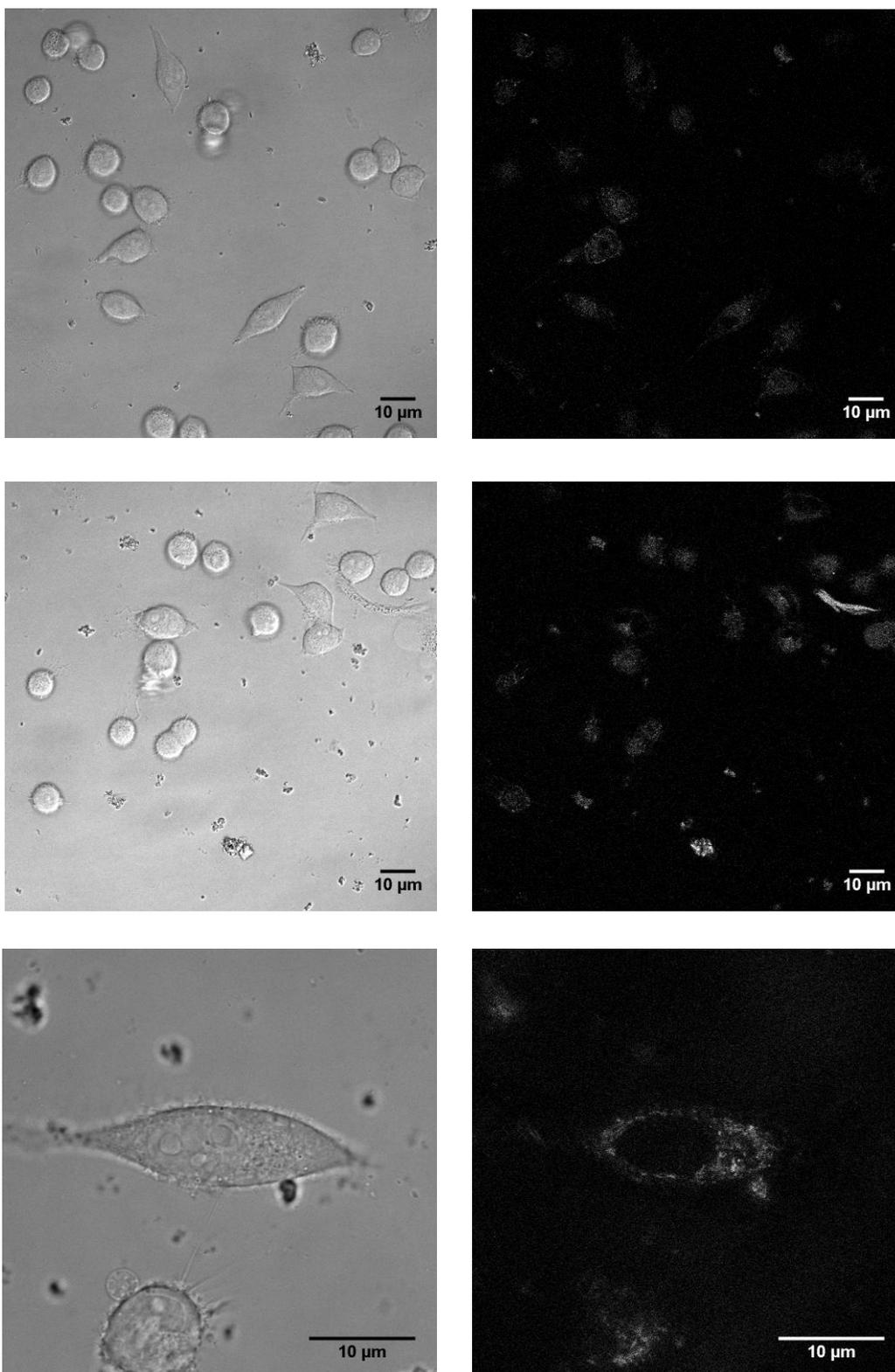
- Cellules HeLa cultivées dans une lame Labteck 4 puits
- Sonde : conjugué 33K-9H à la concentration de 1 μ M (dans le milieu de culture MEM α)
- Microinjection des cellules puis imagerie en microscopie confocale dans la foulée

Remarque : Il a été mis en évidence que les cellules ne doivent pas être trop confluentes au moment de la microinjection ($\leq 50\%$), sans quoi elles se décrochent lorsque le capillaire d'injection pénètre et est retiré de la cellule.

Résultats des observations : (à gauche la transmission – à droite la fluorescence)

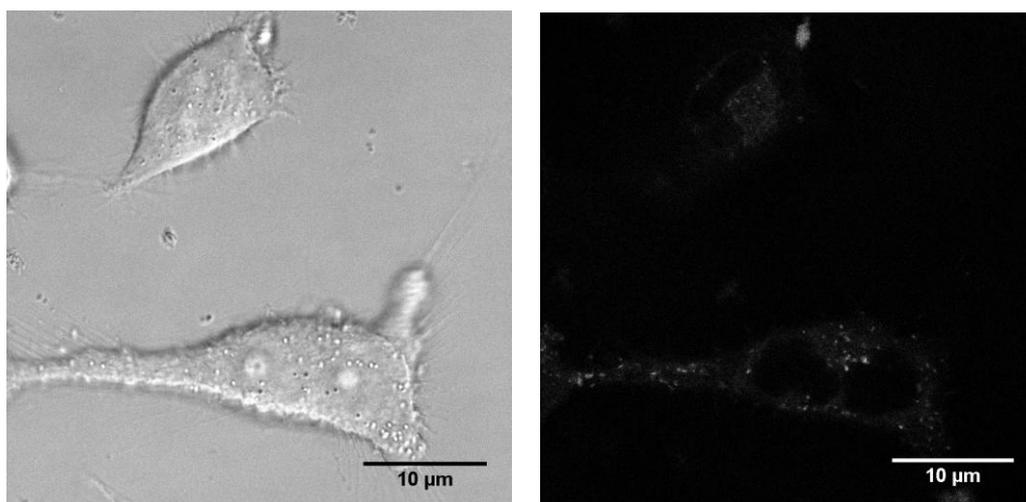
Remarque : Dans cette expérience, les cellules rondes ne sont pas des cellules mortes mais se sont simplement partiellement décrochées de la surface après microinjection. D'après les images de transmission, il n'y a aucune cellule morte sur ces clichés.

Premières observations : 10 à 30 minutes après microinjection.



Les cellules qui ont été microinjectées apparaissent fluorescentes contrairement à celles qui n'ont pas été microinjectées. Le cytoplasme de ces cellules est marqué de façon diffuse et on observe très peu, voire pas du tout de spots fluorescents.

Observations réalisées plus de 45 minutes après microinjection :



On observe l'apparition de nombreux spots fluorescents dans le cytoplasme des cellules qui ont été microinjectées. Contrairement au marquage habituellement observé, ce marquage sous forme de spots fluorescents n'est pas asymétrique par rapport au noyau : les spots se répartissent un peu partout dans le cytoplasme (pas seulement proches du noyau).

Différentes hypothèses pourraient expliquer ce marquage particulier observé pour les cellules microinjectées :

- Les spots fluorescents observés après 45 minutes pourraient être liés à l'internalisation de bio-conjugué libre qui aurait diffusé dans le milieu à partir des parois externes du capillaire de microinjection. Le bio-conjugué libre serait donc internalisé dans les cellules par endocytose. Cependant, cette hypothèse semble peu probable puisque dans le cas d'une internalisation par endocytose, les cellules sont marquées de manière asymétrique par rapport au noyau, ce qui n'est pas le cas ici.
- 45 minutes après la microinjection, le réticulum endoplasmique (RE) des cellules deviendrait marqué. Le RE s'étendant dans l'ensemble du cytoplasme des cellules, ceci expliquerait le fait que les spots fluorescents se répartissent dans tout le cytoplasme.

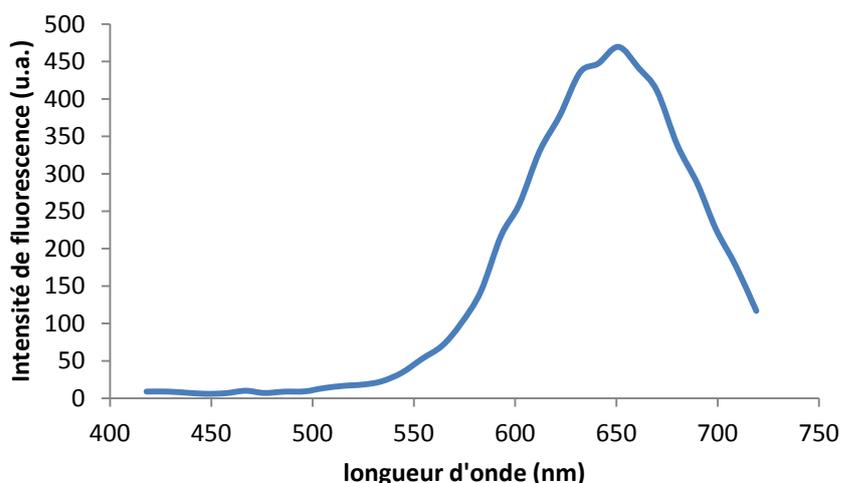
Les spots brillants observés ici ne sont pas immobiles et se déplacent, mais moins vite que les spots brillants (endosomes) habituellement observés lorsque l'on réalise un simple dépôt sur les cellules.

Acquisition d'un spectre d'émission de fluorescence in cellulo :

Réalisés sur cellules HeLa incubées 1 heure en présence de bio-conjugué 33K-9H à la concentration de $1\mu\text{M}$ dans le milieu de culture MEM α .

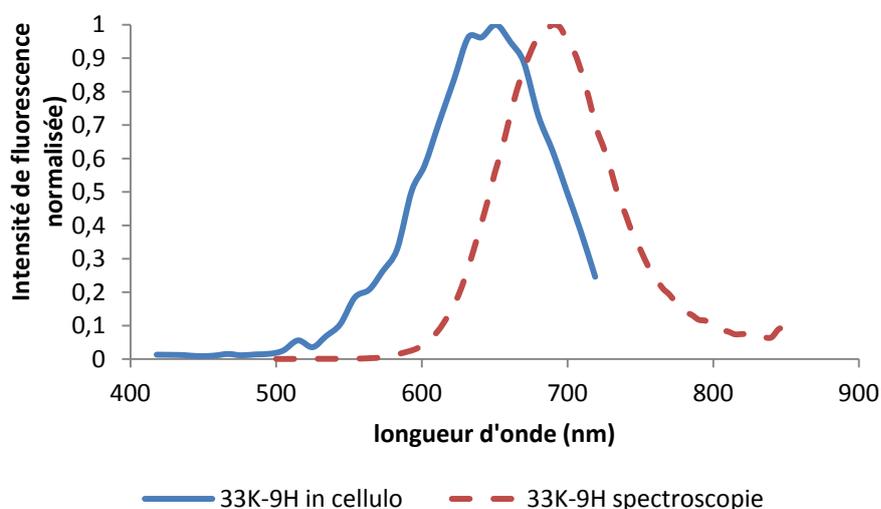
Microscope utilisé : Microscope confocal inversé ZEISS - LSM 710 (Carl Zeiss, Germany - PLATIM) – (objectif à immersion à huile 63X).

Région 1 : zone la plus fluorescente proche du noyau (comportant de multiples spots très brillants)



Le spectre d'émission de fluorescence de la sonde polymère-JM086 (33K-9H) *in cellulo* présente un maximum à 650 nm, ce qui correspond à la longueur d'onde d'émission maximale du chromophore JM086 libre dans le toluène, solvant apolaire (cf. annexe 2).

Région 2 : Un spot fluorescent proche du noyau



Dans les deux cas, la longueur d'onde d'émission maximale de la sonde polymère 33K-9H *in cellulo* est de 650 nm, soit un shift de 40 nm environ par rapport à la longueur d'onde d'émission maximale de la même sonde dans l'eau, 690 nm (en spectroscopie de fluorescence).

Les résultats obtenus suggèrent que les bio-conjugués internalisés dans les cellules (majoritairement à l'intérieur d'endosomes), se trouvent dans un milieu dont la polarité est plus proche de celle du toluène ou du chloroforme que de celle de l'eau. L'intérieur des cellules est un milieu très complexe qui ne peut pas être simplement assimilé à un milieu aqueux.

ANNEXE 9 : Marquage des pseudo-particules virales HCVpp.

(Réalisé en collaboration avec Eve-Isabelle PECHEUR (CRCL) et Christophe PLACE (LJC))

Objectif : Réaliser un marquage fluorescent de pseudo-particules virales HCVpp en utilisant les bio-conjugués LPC.

Appareillage :

- Images réalisées sur un microscope de type Leica DM IRBE (LJC) couplé à une source d'excitation X-Cite Series 120PC Q – objectif à immersion à huile 63X – Filtre TX2 (excitation BP 560/40 – émission BP 645/75)

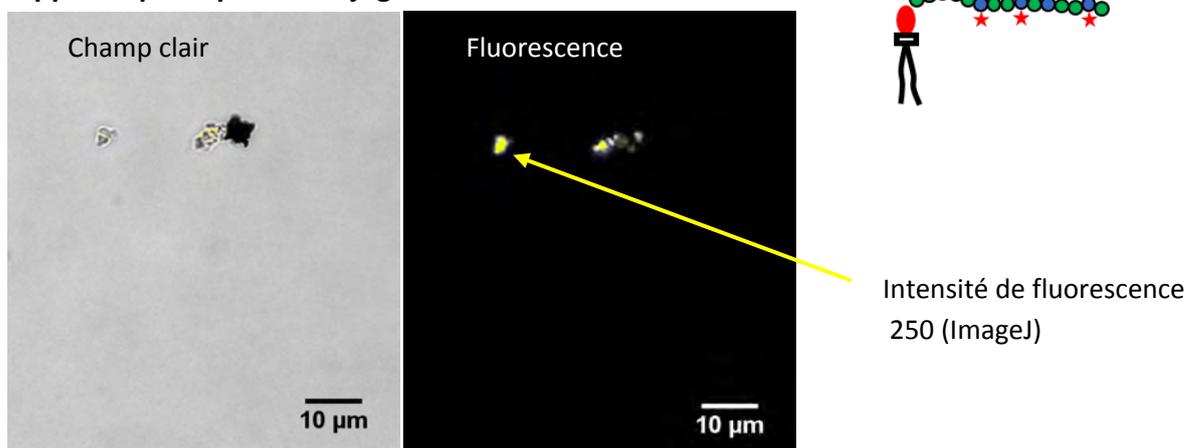
Sondes testées :

- A/ Conj.20K-4H : chromophore JM086 (laboratoire de chimie ENS de Lyon), 4 chromophores par chaîne, hydrolysé (chargé négativement), avec lipide terminal
- B/ Ref.34K-9H : Chromophore JM086, 9 chromophores par chaîne, hydrolysé et sans lipide
- C/ Conj F647H : chromophore commercial, 3 chromophores par chaîne, hydrolysé, avec lipide
- D/ Ref.F647H : chromophore commercial, 4 chromophores par chaîne, hydrolysé, sans lipide
- E/ Sonde DID sans chaînes alkyles émettant dans le rouge lointain (fourni par Eve Isabelle PECHEUR – CRCL Lyon)

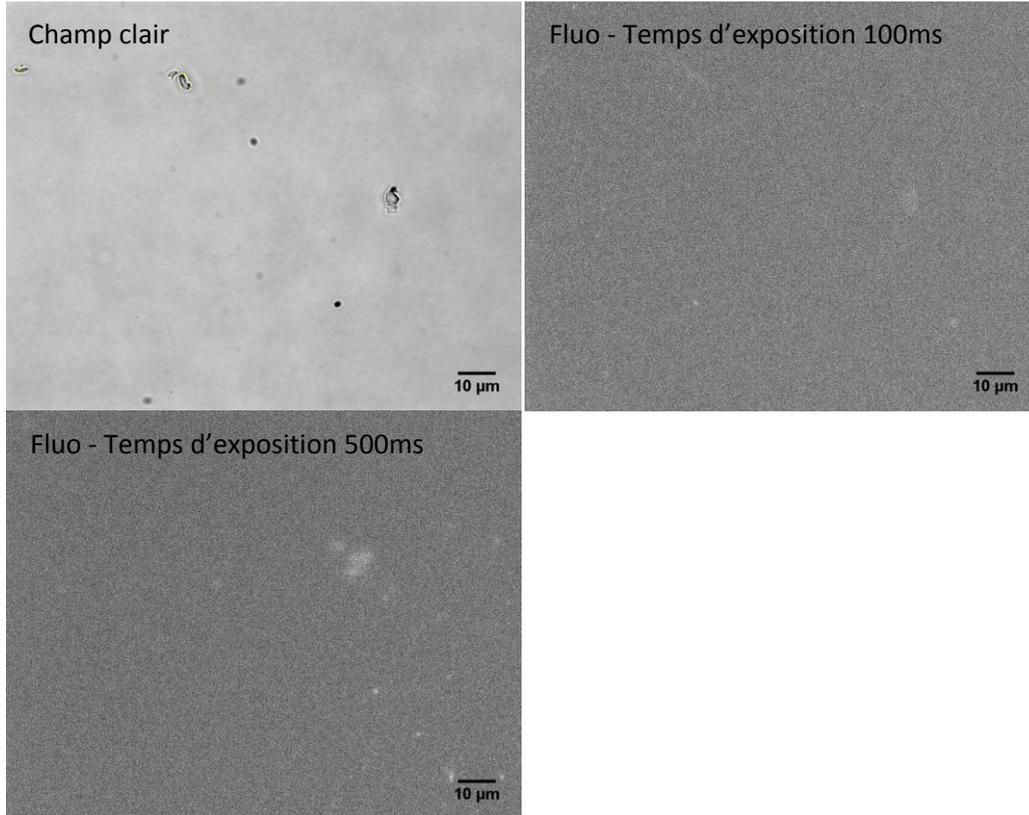
Protocole de marquage des HCVpp (voir cahier de labo)

Résultats des observations :

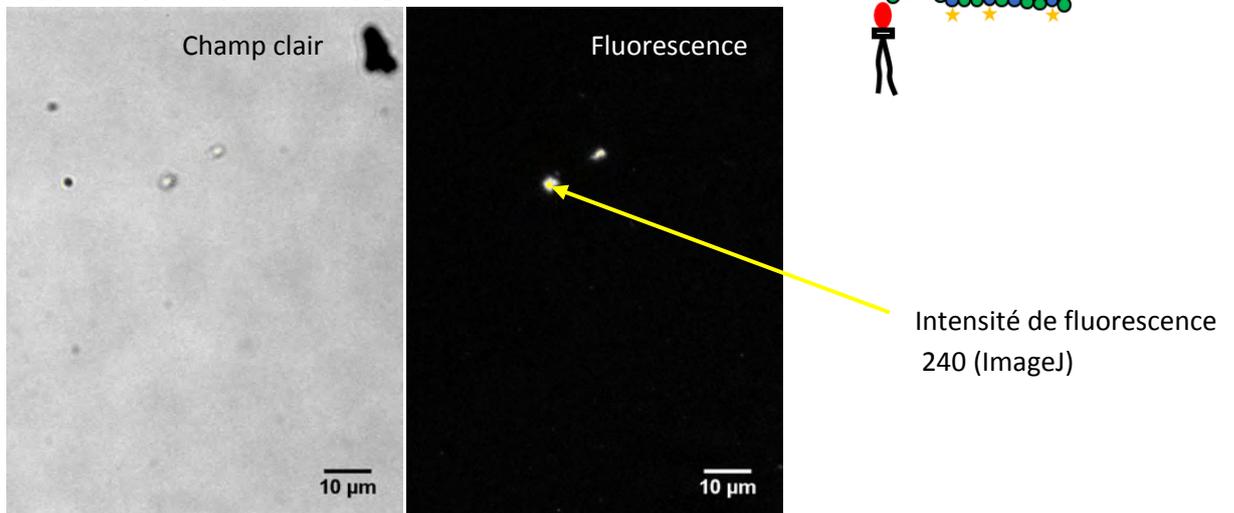
A/ HCVpp marquées par le Conjugué 20K-4H



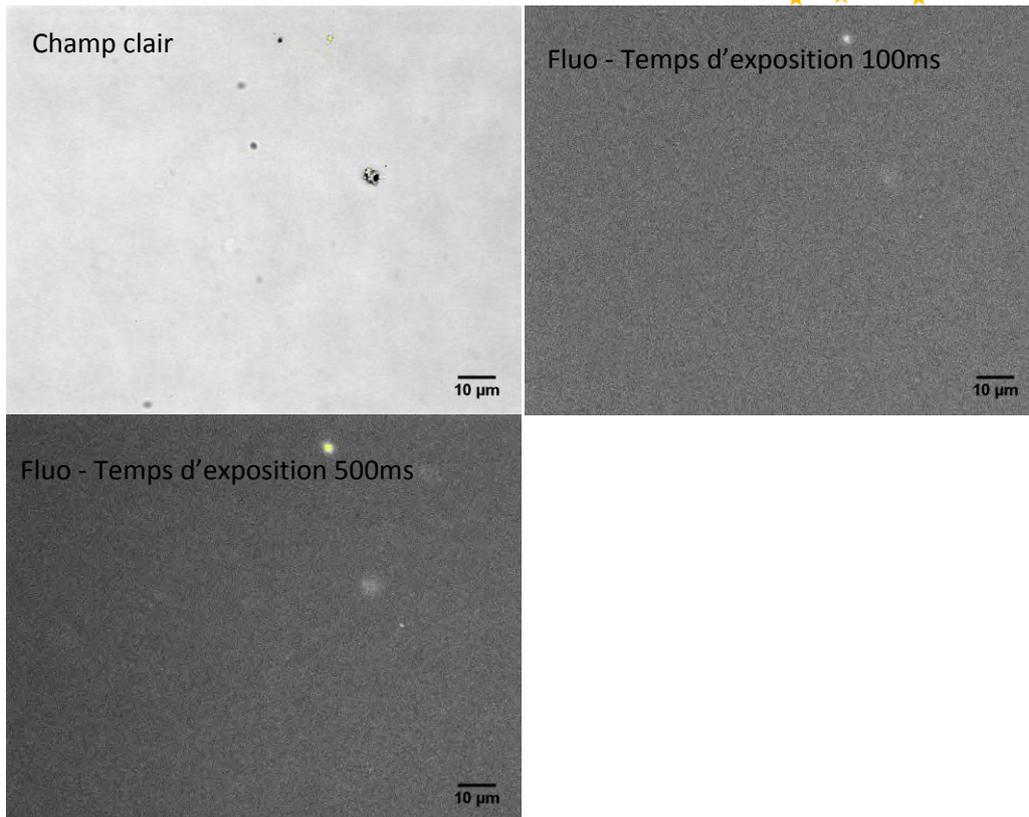
B/ HCVpp marquées par le Conjugué Ref.34K-9H



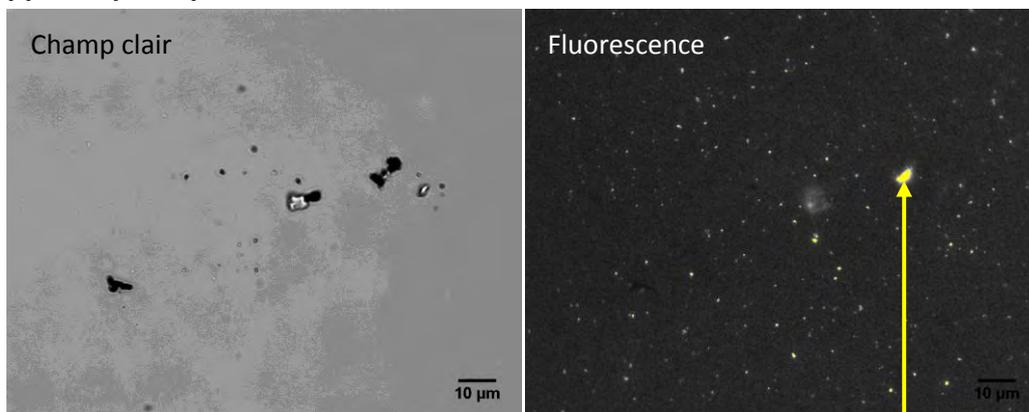
C/ HCVpp marquées par le Conjugué F647H



D/ HCVpp marquées par le Conjugué Ref.F647H

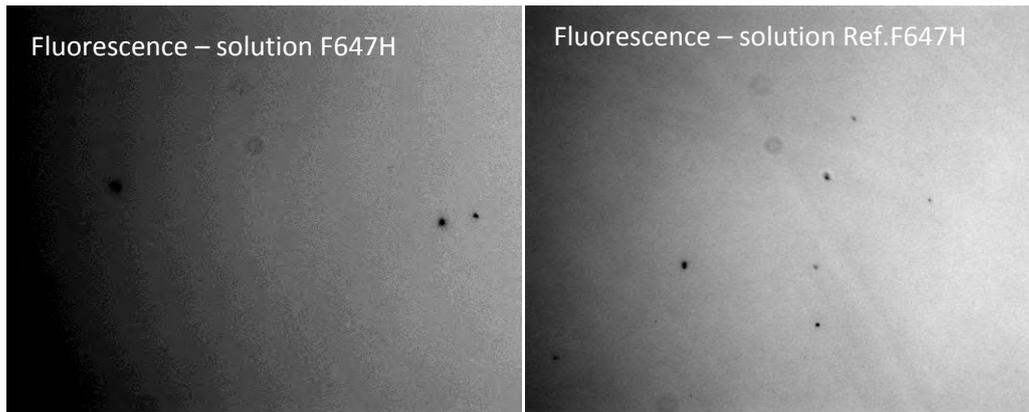


E/ HCVpp marquées par la sonde DiD



Intensité de fluorescence
250 (ImageJ)

Observation des solutions de conjugués seuls (contrôle)



Bilan :

- Lorsque les particules HCVpp sont incubées en présence des bio-conjugués 20K-4H et F647H, un marquage fluorescent (très contrasté) des HCVpp est observé. La fluorescence obtenue à partir des deux sondes est très proche en terme d'intensité (évaluée par ImageJ).
- En revanche, lorsque les bio-conjugués références (sans lipide terminal) sont utilisés, les particules virales ne sont pas marquées, ou un léger marquage (non spécifique) est observé.
- Lors de l'utilisation de la sonde commerciale DiD, les particules virales sont très peu marquées et on observe de nombreux spots fluorescents dans le milieu. La sonde DiD semble se décrocher des particules virales et diffuser dans le milieu.
- Les solutions de conjugué F647H et Ref.F647H seul contiennent très peu (voire pas) d'agrégats de conjugués (si oui, ces agrégats seraient de faible intensité).

Les bio-conjugués Lipide-Polymères fluorescents (marqués par le chromophore JM086 ou F647H) permettent d'obtenir un marquage fluorescent très contrasté des HCVpp (meilleur que la sonde commerciale DiD), alors que les conjugués sans lipide terminal ne les marquent pas.

ANNEXE 10 : Test de résistance au photoblanchiment des bio-conjugués LPC.

(Expérience réalisée avec les conseils de Karine MONIER (LJC))

Objectif : Tester la résistance au photoblanchiment des bio-conjugués LPC *in cellulo* et la comparer à celle d'une sonde fluorescente commerciale moléculaire conduisant au même type de marquage (marquage diffus + spots fluorescents) des cellules vivantes (marquage des endosomes et lysosomes).

Appareillage :

- Microscope de type Zeiss Observer Z1 couplé à une source d'excitation HPX 200C et piloté par le logiciel AxioVision (localisé en pièce de culture cellulaire ,LJC). (Temps d'exposition : 150 ms pour 33K-9H et 220 ms pour DND99 – objectif 63X)

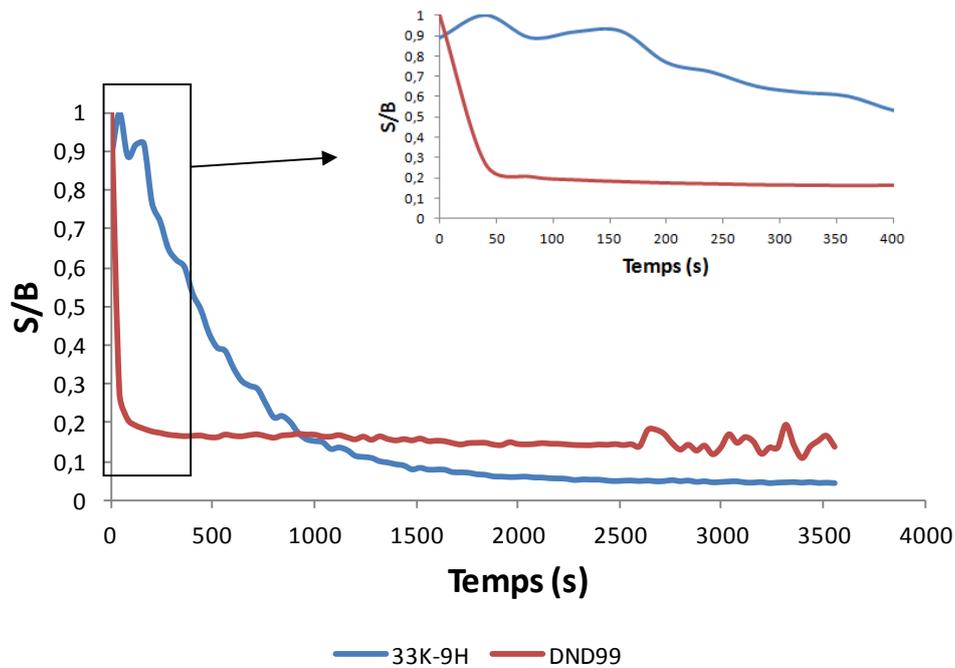
Tests de photoblanchiment :

- Evaluation sur cellules HeLa
- Bio-conjugué 33K-9H à 1 μ M dans le milieu de culture MEM α ($\lambda_{\text{abs max}}$: 501 nm / $\lambda_{\text{em max}}$: 690 nm dans l'eau)
- Sonde commerciale LysoTracker Red – DND99 à 75 nM (concentration recommandée) qui est un marqueur des lysosomes. ($\lambda_{\text{abs max}}$: 577 nm / $\lambda_{\text{em max}}$: 590 nm dans l'eau)
- Après incubation des cellules en présence des sondes (3 heures pour le 33K-9H et 1 heure pour le DND99), le milieu est lavé deux fois avec du PBS 1X. Les cellules sont illuminées en continu (illumination 25% de la puissance maximale de la source – correspondant à une illumination classique pour ce type d'imagerie) et des images sont prises toutes les 40 secondes.

Remarque : A cause du photoblanchiment très rapide de la sonde DND99, la mise au point des images a été réalisée en transmission.

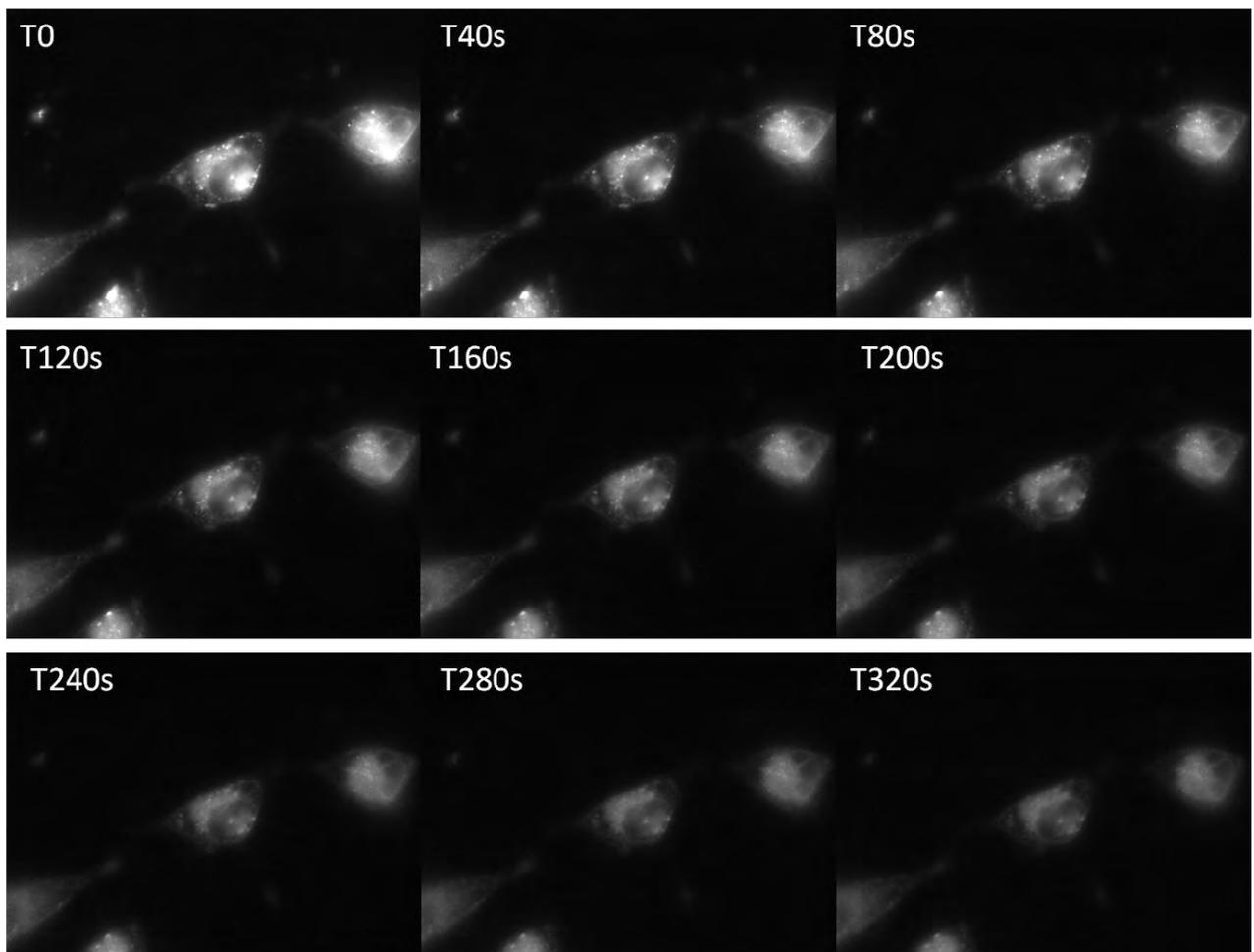
Résultats :

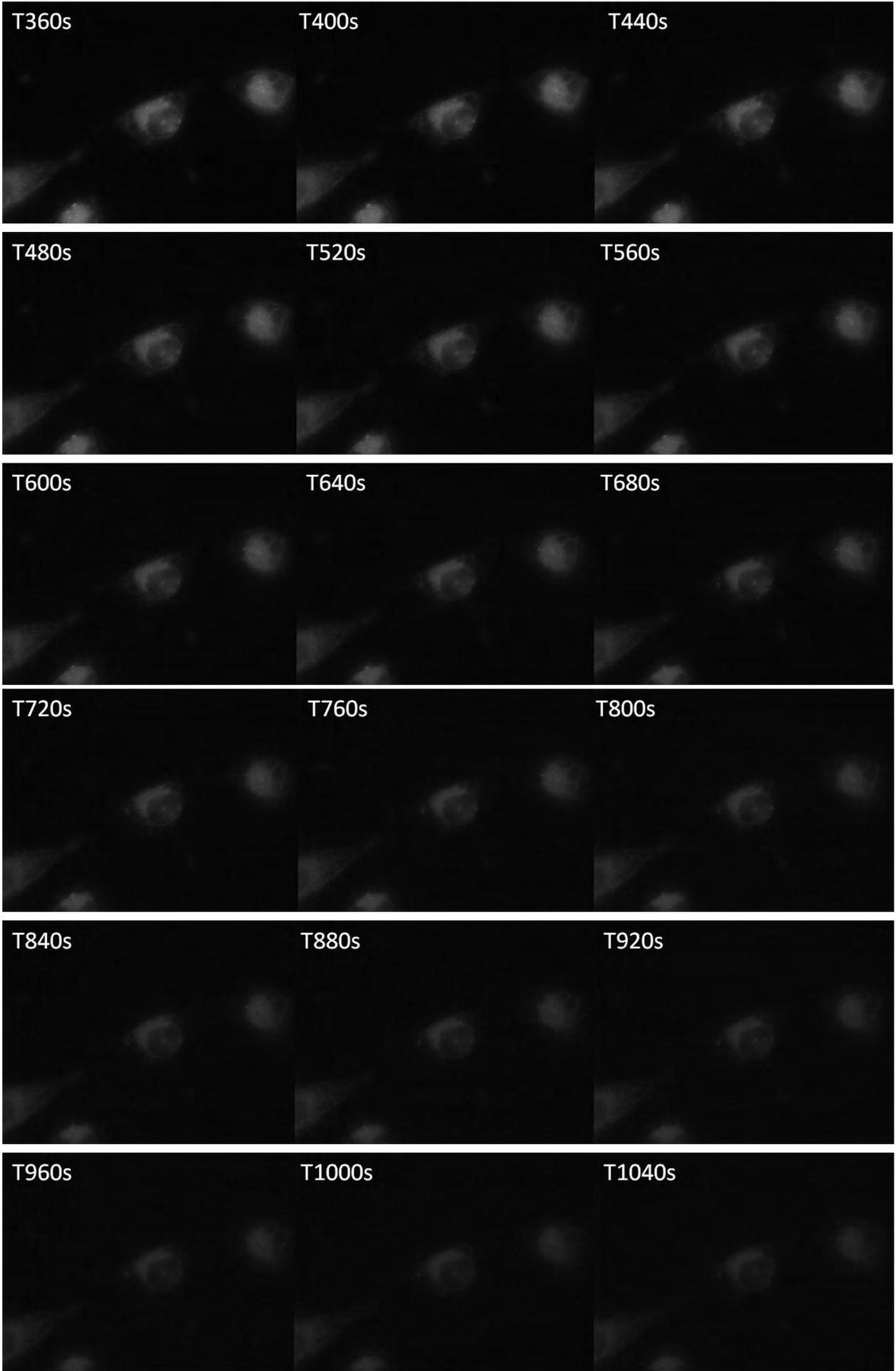
Pour chacune des sondes, deux ROI (Region Of Interest) sont sélectionnées : à l'intérieur d'une cellule (zone très fluorescente proche du noyau) et à l'extérieur de cette cellule (bruit de fond). Le rapport signal/bruit (S/B) et reporté en fonction de la durée d'illumination en secondes.



La sonde moléculaire DND99 photoblanchit très vite : on perd plus de 70% du signal en moins de 40 secondes.

Le bio-conjugué 33K-9H photoblanchit beaucoup moins vite : on perd 70% du signal en 720 secondes (12 minutes). Le bio-conjugué polymère-JM086 est donc 18 fois plus résistant au photoblanchiment que la sonde DND99.





FOLIO ADMINISTRATIF

THESE SOUTENUE DEVANT L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE LYON

NOM : ADJILI

DATE de SOUTENANCE : 6 Décembre 2012

(avec précision du nom de jeune fille, le cas échéant)

Prénoms : Salim

TITRE : Synthèse et caractérisation de sondes lipidiques macromoléculaires fluorescentes émettant dans le rouge lointain pour l'imagerie membranaire.

NATURE : Doctorat

Numéro d'ordre : 2012ISAL0122

Ecole doctorale : Ecole Doctorale Matériaux de Lyon (ED 34)

Spécialité : Matériaux Polymères

RESUME :

Ce projet de thèse consistait à synthétiser de nouveaux bio-conjugués Lipide-Polymère fluorescents émettant dans le rouge lointain, composés d'une chaîne polymère portant à la fois de nombreux chromophores en position latérale et un lipide en extrémité de chaîne. La structure de ces bio-conjugués est basée sur des copolymères poly(*N*-acryloylmorpholine-*co*-*N*-acryloxysuccinimide), hydrophiles, réactifs, modulables et d'architecture contrôlée obtenus par le procédé RAFT. Les copolymères réactifs ont ensuite été utilisés pour le couplage, en position latérale, de chromophores émettant dans le rouge lointain.

La stratégie utilisée pour la synthèse des bio-conjugués se divise en trois étapes : la synthèse d'Agents de Transfert de Chaîne (ATC) fonctionnalisés avec un lipide suivant un protocole déjà décrit suite à des travaux de notre équipe, et dont les étapes de purification ont été améliorées afin d'obtenir des ATC les plus purs possible (90% de pureté molaire) ; l'utilisation de ces ATC fonctionnels pour la synthèse de polymères α fonctionnels, et enfin, le couplage rapide et efficace de chromophores en position latérale. Il a été mis en évidence que les ATC lipidiques permettent un très bon contrôle de la copolymérisation des monomères NAM et NAS. L'utilisation de la composition azéotrope pour ce couple de monomère permet également d'obtenir des chaînes polymère de microstructure très contrôlée et présentant des valeurs de M_n comprises entre 5 900 et 33 200 g.mol⁻¹.

Les propriétés optiques des bio-conjugués ont été déterminées, ce qui a permis de mettre en évidence que ces propriétés, et notamment le rendement quantique de fluorescence, sont très sensibles à la structure des bio-conjugués synthétisés. Tous les bio-conjugués présentent des brillances améliorées (jusqu'à 13 000 M⁻¹.cm⁻¹ dans l'eau et 50 000 M⁻¹.cm⁻¹ dans CHCl₃) par rapport à celle du chromophore.

La capacité des bio-conjugués à interagir avec les bicouches lipidiques a été mise en évidence à travers l'utilisation de systèmes modèles (SUVs, LUVs et GUVs). Enfin, les évaluations biologiques réalisées ont montré à la fois une absence de cytotoxicité des bio-conjugués et une capacité de ces derniers à être internalisés rapidement (< 10 minutes) au sein de différentes lignées de cellules vivantes.

MOTS-CLES :

Bio-conjugué / Lipides fluorescents / Polymérisation radicalaire contrôlée / Procédé RAFT / Agent de transfert de chaîne / Polymères α -fonctionnels / Chromophores / Rendement quantique de fluorescence / Brilliance / Systèmes lipidiques modèles / Liposomes / Internalisation cellulaire

Laboratoire (s) de recherche :

Ingénierie des Matériaux Polymères (UMR CNRS 5223) – IMP@INSA
Laboratoire Joliot Curie (CNRS USR 3010) – ENS de Lyon

Directeur de thèse: Charreyre Marie-Thérèse – Directeur de Recherche CNRS

Président de jury : Fleury Etienne – Professeur des Universités

Composition du jury :

Rosilio Véronique – Professeur, Université Paris SUD 11
Tribet Christophe – Directeur de Recherche CNRS, ENS Paris
Girard-Egrot Agnès – Professeur, UBCL Lyon
Fleury Etienne – Professeur, INSA de Lyon
Charreyre Marie-Thérèse – Directeur de Recherche CNRS, INSA de Lyon
Favier Arnaud – Chargé de Recherche CNRS, INSA de Lyon

Résumé

Ce projet de thèse consistait à synthétiser de nouveaux bio-conjugués Lipide-Polymère fluorescents émettant dans le rouge lointain, composés d'une chaîne polymère portant à la fois de nombreux chromophores en position latérale et un lipide en extrémité de chaîne. La structure de ces bio-conjugués est basée sur des copolymères poly(*N*-acryloylmorpholine-*co*-*N*-acryloxysuccinimide), hydrophiles, réactifs, modulables et d'architecture contrôlée obtenus par le procédé RAFT. Les copolymères réactifs ont ensuite été utilisés pour le couplage, en position latérale, de chromophores émettant dans le rouge lointain.

La stratégie utilisée pour la synthèse des bio-conjugués se divise en trois étapes : la synthèse d'Agents de Transfert de Chaîne (ATC) fonctionnalisés avec un lipide suivant un protocole déjà décrit suite à des travaux de notre équipe, et dont les étapes de purification ont été améliorées afin d'obtenir des ATC les plus purs possible (90% de pureté molaire) ; l'utilisation de ces ATC fonctionnels pour la synthèse de polymères α fonctionnels, et enfin, le couplage covalent, rapide et efficace, de chromophores en position latérale. Il a été mis en évidence que les ATC lipidiques permettent un très bon contrôle de la copolymérisation des monomères NAM et NAS. L'utilisation de la composition azéotrope pour ce couple de monomère permet également d'obtenir des chaînes polymère de microstructure très contrôlée et présentant des valeurs de M_n comprises entre 5 900 et 33 200 g.mol⁻¹.

Les propriétés optiques des bio-conjugués ont été déterminées, ce qui a permis de mettre en évidence que ces propriétés, et notamment le rendement quantique de fluorescence, sont très sensibles à la structure des bio-conjugués synthétisés. Tous les bio-conjugués présentent des brillances améliorées (jusqu'à 13 000 M⁻¹.cm⁻¹ dans l'eau et 50 000 M⁻¹.cm⁻¹ dans CHCl₃) par rapport à celle du chromophore.

La capacité des bio-conjugués à interagir avec les bicouches lipidiques a été mise en évidence à travers l'utilisation de systèmes modèles (SUVs, LUVs et GUVs). Enfin, les évaluations biologiques réalisées ont montré à la fois une absence de cytotoxicité des bio-conjugués et une capacité de ces derniers à être internalisés rapidement (< 10 min) au sein de différentes lignées de cellules vivantes.

Summary

The aim of this study is to synthesize new far-red emitting fluorescent Lipid-Polymer conjugates, consisting of a polymer chain bearing both multiple fluorophores in lateral position and a lipid at one chain-end. These conjugates are based on an hydrophilic, reactive, flexible and controlled poly(*N*-acryloylmorpholine-*co*-*N*-acryloxysuccinimide) copolymer synthesized by the RAFT process. Multiple far-red emitting fluorophores were bound on the reactive copolymer in lateral position.

The strategy used in this study consists of three different steps: Chain Transfer Agents (CTA) functionalized with a lipid were synthesized following a protocol already described in our team, the purity of these CTA was improved (90% molar purity); the use of these CTA for the synthesis of α functional polymers, and finally, the very efficient covalent binding of fluorophores in lateral position. We showed that the lipid-CTA enable a very good control of the NAM/NAS copolymerization. The azeotropic composition enables the synthesis of polymer chains with a controlled composition and with M_n values varying from 5 900 to 33 200 g.mol⁻¹.

The optical properties of the bio-conjugates were determined, and we showed that these properties (the fluorescence quantum yield especially) are structure sensitive. All of them show an improved brightness (13 000 M⁻¹.cm⁻¹ in water and 50 000 M⁻¹.cm⁻¹ in CHCl₃) compared to the brightness of the free fluorophore.

The ability of the bio-conjugates to interact with lipid bilayers was proved using model systems (SUVs, LUVs and GUVs). Finally, biological evaluations showed both an absence of cytotoxicity and an ability of the conjugates to be quickly internalized in living cells (< 10 min).

Mots clés : Bio-conjugué / Lipides fluorescents / Polymérisation radicalaire contrôlée / Procédé RAFT / Agent de Transfert de Chaîne / Polymères α -fonctionnels / Chromophores / Rendement quantique de fluorescence / brillance / Systèmes lipidiques modèles / Liposomes / Internalisation cellulaire.