

Université Bordeaux II
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Biochimie

Thèse

pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Bordeaux II

présentée par

Boris Garnier

.....

**Développement de vecteurs liposomaux
fonctionnalisés par des protéines dérivées
de l'Annexine 5 et encapsulant des
marqueurs pour l'imagerie**

.....

à soutenir le 4 décembre 2009

composition du jury :

Mme Lesieur Sylviane, *Directeur de recherches, CNRS UMR 8612,*
M. Letourneur Didier, *Directeur de recherches, CNRS U698*
M Moonen Chrit, *Directeur de recherches, CNRS UMR 5231*
M Gonzalez Walter, *cadre de recherche, Guerbet*
M. Brisson Alain, *Professeur Université Bordeaux I*
M. Petry Klaus, *Professeur Université Bordeaux II*

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Co-directeur de thèse
Directeur de thèse

Resumé

Ce sujet se situe dans le cadre de la mise au point de systèmes de délivrance de composés thérapeutiques ou d'imagerie, c'est à dire d'objets qui doivent transporter des composés dans un organisme et posséder une spécificité pour une zone à traiter ou à imager. Les objectifs de mon travail de thèse étaient l'addition d'une spécificité aux liposomes grâce à la liaison ou l'utilisation de protéines dérivées de l'Annexine 5 (Anx5) et l'encapsulation dans l'espace interne des vésicules de composés permettant le suivi de ces vecteurs.

Nous avons tout d'abord mis au point des liposomes pour lesquels l'Anx5 est couplée à l'extrémité d'un lipide-PEG et sert d'élément d'adressage vers des cellules en apoptose. La liaison Anx5 / lipide-PEG a été caractérisée par SDS-PAGE de façon à contrôler la densité de ligand en surface des vésicules. L'influence de la densité de ligand sur l'efficacité de liaison des vecteurs à des membranes cibles et sur l'agréation des vésicules a été évaluée par QCM-D et DLS. Il apparait qu'une densité de 60 Anx5 / liposome est un optimum vis-à-vis de ces facteurs. Enfin l'encapsulation de fluorophores a permis d'imager l'interaction des liposomes-Anx5 avec des cellules en apoptose.

Pour former des magnétoliposomes nous avons mis au point et caractérisé l'encapsulation de particules d'oxyde de fer dans des liposomes neutres et anioniques. La procédure d'encapsulation passive ainsi que l'influence de la charge membranaire négative et la stabilité des magnétoliposomes ont été évaluées. Le nombre de particules d'oxyde de fer par vésicule a été déterminé par dosage et la morphologie des liposomes a été examinée par cryomicroscopie électronique à transmission. Un maximum d'environ 50 particules par liposome a été encapsulé dans des vésicules de 100nm de diamètre. La présence de lipides anioniques limite l'efficacité d'encapsulation et favorise la déstabilisation des magnétoliposomes.

Enfin, la liaison d'anticorps en surface des liposomes grâce à l'Anx5ZZ a été caractérisée et optimisée de façon à utiliser ces anticorps comme éléments d'adressage pour cibler deux pathologies : l'athérosclérose et l'inflammation. La composition lipidique a été optimisée pour encapsuler de façon stable des fluorophores tout en liant des Anx5. Les expériences de caractérisation de la fonctionnalisation par DLS et FRET nous ont conduits à choisir une séquence pour l'association des anticorps qui consiste à associer les anticorps aux Anx5ZZ dans un premier temps à lier ce complexe en surface des liposomes. Deux anticorps ont été utilisés pour vérifier les capacités d'adressage des vecteurs vers des cibles biologiques, tout d'abord *ex vivo* sur des modèles de plaques d'athérome puis *ex* et *in vivo* sur des rats présentant des zones d'inflammation.

L'ensemble de ces travaux ont donc consisté à mettre au point des liposomes fonctionnalisés avec des dérivés de l'Anx5 et encapsulant des éléments dans l'espace interne des vésicules. Ces vecteurs ont été utilisés pour imager des cibles biologiques.

Mots-clés Annexine 5 (Anx5), liposome, fonctionnalisation, magnétoliposome, encapsulation

Abstract

Development of liposomal vectors functionalized by Annexin5 derived proteins and encapsulating imaging compounds.

This subject is in the framework of system delivering drug or imaging agent. Such systems must carry compounds in an organism and selectively recognize a target area. The aims of my work were to add a targeting element to liposomes by use of Anx5 derivatives and to encapsulate imaging compound inside the aqueous inner space.

First we designed Anx5-bearing liposomes with the Anx5 protein covalently linked at the distal end of a PEG-lipid and used as targeting element of apoptotic cells. Anx5 conjugation was monitored by SDS-PAGE in order to control Anx5 density on the liposome surface. The influence of ligand density on the efficiency of binding to target membranes and on solution dispersity was assessed by QCM-D and DLS respectively. A density of 60 Anx5 / liposome ensures the best target recognition efficiency and dispersity. Finally fluorescent dyes encapsulation was used to image the interaction between Anx5 bearing liposomes and apoptotic cells.

To prepare magnetoliposomes we have synthesized and characterized the encapsulation of iron oxide nanoparticles inside neutral and anionic liposomes. The passive encapsulation procedure, the influence of the negative charge and the magnetoliposome stability were evaluated. The number of particle / vesicle was assayed and the liposomes morphology was examined using cryoelectron transmission microscopy. An average of 50 particles / liposome was encapsulated inside 100nm vesicles. Anionic lipids limit the encapsulation efficiency and promote liposomes destabilization.

Finally the use of Anx5ZZ to anchor antibodies on the liposome surface was characterized and optimized to use antibodies as homing device to target two diseases: atherosclerosis and inflammation. The lipid composition was optimized to entrap fluorescent dyes in a stable manner while Anx5 are bound on the membrane. To functionalize the vector, DLS and FRET experiment led us to choose a sequence consisting in first associating antibodies to Anx5ZZ and then in binding this complex to the liposome surface. Two antibodies were used to address liposome towards biological targets, *ex vivo* on atherosclerosis models and, *in vivo* on rats bearing inflammation areas.

Keywords : Annexin 5 (Anx5), liposome, fonctionnalization, magnetoliposome, encapsulation.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout d'abord Alain Brisson qui a été mon directeur de thèse pendant ces trois ans et m'a permis de réaliser ce travail.

Je tient à remercier les membres de son équipe et plus particulièrement Céline Gounou , Sisareuth Tan et Anthony Bouter qui ont contribués directement à un certain nombre d'expériences.

Je remercie Klaus Petry et les membres de son équipe avec qui nous avons réalisé des expériences in vivo.

Je remercie Sébastien Lecommandoux, Christophe Schatz et Nicolas Guidolin chez et avec qui j'ai accompli les mesures de diffusion de la lumière.

Je remercie Stéphane Mornet et Guerbet de m'avoir fourni des particules de maghémite.

Je remercie Gisèle Clofent-Sanchez pour les expériences sur la plaque d'athérome.

Je remercie les membres du jury d'avoir acceptés d'évaluer ce manuscrit.

Table des matières

Abréviations	9
Objectifs	10
I Situation du sujet	11
1 Les lipides	13
1.1 Les parties hydrophobes	14
1.1.1 Stéroïde.....	14
1.1.2 Acides gras	14
1.2 Les têtes polaires	15
1.2.1 Le cholestérol	15
1.2.2 Les glycérolipides	15
1.3 Les agrégats lipidiques en milieu aqueux dilué	16
1.3.1 Structure et organisation des agrégats lipidiques	17
1.3.2 Propriétés membranaires conférées par les caractéristiques des lipides	19
1.3.2.1 Propriétés de surface	19
1.3.2.2 Phases membranaires	20
2 Préparation des liposomes	24
2.1 Hydratation des lipides	25
2.2 Traitements mécaniques et physiques	28
2.3 Encapsulation de composés à l'intérieur des liposomes	29
3 Les liposomes comme système de transport de composés thérapeutiques chez les êtres vivants.	33
3.1 Comportement des liposomes dans les fluides biologiques	33
3.2. Le système immunitaire	35
3.3 Comportement des liposomes in vivo	39
3.4 Stealth liposomes.....	40
4 Adressage des liposomes grâce à l'addition de ligands.	45
4.1 Couplage du ligand aux lipides	46
4.2 Association du ligand aux liposomes	48
4.3 Les ligands utilisés	50
4.3.1 Les ligands autres que les anticorps	50
4.3.2 Les anticorps et leurs dérivés	51
5 Libération contrôlée des composés encapsulés	53
6 Formulation des liposomes.....	54
7 L'Annexine 5.....	55

II Méthodes et procédures expérimentales61

1	Electrophorèse en gel de polyacrylamide.....	62
2	Le QCM-D (Quartz Cristal Microbalance with Dissipation monitoring)	66
2.1	Principe de fonctionnement.....	66
2.2	Détermination de la valeur de masse adsorbée	68
2.3	Evaluation de la flexibilité des objets adsorbés	68
3	Spectroscopie de fluorescence.....	69
3.1	L'émission de fluorescence par les fluorophores	69
3.2	Le FRET.....	72
3.3	Quenching (extinction) de fluorescence.....	73
4	Chromatographie d'exclusion stérique.....	74
5	Microscopies	76
5.1	Microscopie optique.....	76
5.2	Microscopie électronique à transmission	77
6	Diffusion de la lumière.....	79
7	Procédures expérimentales	80
7.1	Matériel	80
7.2	Tampons utilisés.....	81
7.3	Préparation des liposomes.....	81
7.4	Production des Annexines.....	82
7.5	Préparation des Anx5-SH et Anx5ZZ-SH.....	83
7.6	Couplage covalent des Anx5-SH aux liposomes.	83
7.7	Couplage covalent des Anx5-SH à des PEG-Maleimides.....	84
7.8	Couplage covalent des Anx5-SH à des fluoresceine-maleimide.....	84
7.9	Gels d'acrylamide	84
7.10	Caractérisation du couplage covalent des Anx5-SH à des liposomes ou à des PEG-maleimides	85
7.11	Liaison Ca^{2+} -dépendante des Anx5 à des liposomes.....	85
7.12	Caractérisation de la liaison Ca^{2+} -dépendante des Anx5 à des liposomes	85
7.13	Diffusion dynamique de la lumière	85
7.14	QCM-D.....	86
7.15	Encapsulation de composés fluorescents	86
7.16	Fluorescence.....	86
7.17	Ciblage de cellules <i>in vitro</i>	87
7.18	Microscopie confocale	87
7.19	Enrobage (coating) des nanoparticules de maghémite par le citrate	88
7.20	Formulation des magnétoliposomes	88

7.21 Dosage du fer	89
7.22 Microscopie électronique à transmission	90
7.23 Action de la Phospholipase D	90
7.24 Chromatographie sur couche mince	91
7.25 Ciblage de thrombus <i>ex vivo</i> par des magnétoliposomes	91
7.26 Ciblage de zones inflammées de cerveau de rats	91
III Résultats	93
1 Fonctionnalisation de liposomes par l'Anx5 pour cibler des membranes exposant de la PS97	
1.1 Couplage covalent de l'Anx5 aux liposomes	99
1.1.1 Mise en évidence de la liaison covalente	99
1.1.2 Optimisation du couplage covalent	102
1.1.3 Caractérisation de la liaison aux DOGP β_4 AlaMal	106
1.1.4 Caractérisation de la liaison aux DSPE-PEG-Mal	107
1.2 Dispersité des solutions de liposomes	109
1.3 Liaison de liposomes fonctionnalisés par l'Anx5 à des membranes modèles	111
1.3.1 Suivi de la liaison des liposomes–Anx5 par QCM-D	111
1.3.2 Influence de la densité de ligand sur l'efficacité de liaison aux membranes-cibles	113
1.3.3 Influence de la densité de PEG sur l'efficacité de liaison aux membranes-cibles	114
1.3.4 Détermination de la quantité maximale de ligand pouvant se lier à la membrane cible	115
1.4 Influence de la liaison d'Anx5-SH et du sérum sur la stabilité membranaire.....	117
1.5 Liaison des liposomes–Anx5 à des cellules en apoptose	120
2 Formation de liposomes encapsulant des particules de maghémite	122
2.1 Synthèse de magnétoliposomes électriquement neutres	125
2.1.1 Recouvrement de la surface des particules de fer avec du citrate	125
2.1.1.1 Préparation des suspensions de particules d'oxyde de fer	125
2.1.1.2 Analyse des suspensions de particules d'oxyde de fer couvertes par du citrate.....	127
2.1.2 Formation et caractérisation des magnétoliposomes.....	128
2.1.2.1 L'encapsulation passive	128
2.1.2.2 Influence de la concentration de la suspensions mère de particules sur la quantité encapsulée.....	129
2.1.2.3 Evaluation de la procédure d'encapsulation passive	133
2.1.3 Stabilité des suspensions de magnétoliposomes au cours du temps	136
2.2 Formulation de magnétoliposomes présentant une charge de surface	138
2.2.1. Mise au point et caractérisation des Anx5-PEG.....	142
2.2.1.1 Synthèse des Anx5-PEG.....	143

2.2.1.2 Caractérisation de la liaison des Anx5-PEG à des liposomes PC : PS.....	144
2.2.2. Influence de la charge négative des membranes sur la formation de magnétoliposomes	147
2.2.2.1 Influence de la charge négative des membranes sur l'efficacité d'encapsulation	147
2.2.2.2 Influence de la charge négative des membranes sur la stabilité des magnétoliposomes	149
2.2.3 Utilisation de la phospholipase D pour obtenir des liposomes anioniques à partir de vésicules neutres.....	152
2.2.3.1 Modification des lipides par la PLD	152
2.2.3.2 Capacité de liaison des Anx5-PEG par les liposomes obtenus après modification par la PLD.....	154
2.2.3.3 Stabilité des liposomes obtenus après modification par la PLD	155
3 Formulation de liposomes fonctionnalisés par des anticorps.....	156
3.1 Choix d'une composition lipidique permettant une encapsulation stable de composés	158
3.2 Caractérisation de la liaison Anx5ZZ-anticorps.....	163
3.2.1 Détermination du nombre d'anticorps liés par liposome	164
3.2.2 Analyse de la capacité d'un anticorps à lier plusieurs Anx5ZZ.....	166
3.3 Mise au point de la liaison des anticorps à des liposomes	168
3.3.1 Détermination d'une stratégie de liaison.....	168
3.3.2 Évaluation de l'efficacité de liaison du complexe Anx5ZZ-anticorps.....	171
3.2.2.1 Le FRET et les molécules fluorescentes utilisées.....	172
3.2.2.2 Comparaison des efficacités de liaison des Anx5ZZ et des Anx5ZZ-anticorps	174
3.4 Utilisation des complexes liposomes-anticorps pour la reconnaissance de cibles biologiques	178
3.4.1 Ciblage de la plaque d'athérome	178
3.4.1.1 L'athérosclérose	178
3.4.1.2 Le thrombus et les molécules ciblées.....	180
3.4.1.3 Ciblage de thrombus <i>ex vivo</i> par des magnétoliposomes.....	180
3.4.2 Ciblage de l'inflammation.....	183
3.4.2.1 L'inflammation et les molécules ciblées.....	183
3.4.2.2 Ciblage de zones inflammées du cerveau <i>ex vivo</i>	184
3.4.2.3 Ciblage de zones inflammées du cerveau <i>in vivo</i>	186
Conclusions et perspectives	189
Bibliographie.....	192

Abréviations

DOPC : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine ; Chol : cholestérol; DPPE-PEG2000 : 1,2-dipalmytoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[methoxy(poly(ethylene glycol))-2000] ; DSPE-PEG2000-Mal : 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[maleimide-(poly(ethylene glycol))2000] ; DOPS : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-L-serine] ; DOPA : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphate ; DOPE-Rhodamine ou PE-Rh : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(lissamine rhodamine B sulfonyl) ; DOGP β_4 AlaMal : 1,2-dioleoyl-glyceropolyéthylèneglycol maleimide ; NaCl : chlorure de sodium ; CaCl₂ : dichlorure de calcium ; Ca²⁺ : calcium ; NaN₃ : sodium azide , HEPES : *N*-[2-hydroxyethyl]piperazine-*N'*-[2-ethanesulfonic acid] ; DTT : Dithiothreitol ; DMF : Dimethylformamide ; APS : ammonium persulfate ; TEMED : N,N,N',N' Tetramethylethylenediamine ; SDS : sodium dodecyl sulfate ; β -OG : *n*-octyl- β ,D-glucopyranoside ; HCl : acide chlorhydrique ; NaOH : soude ; PEG-Mal : PEG Maleimides ; Mal :maleimide ; PSA : prostate serum antigen ; CAM : cellular adhésion molécule ; MLV :vésicules multilamellaires ; LUV : vésicules unilamellaires de grande taille ; SUV : vésicules unilamellaires de petite taille ; Anx5 : Annexine A5 ; Anx5ZZ : Annexine A5 ZZ ; QCM-D : Quartz Cristal Microbalance with Dissipation monitoring ; λ_{em} : longueur d'onde d'émission ; λ_{ex} : longueur d'onde d'excitation ; PLD : phospholipase D ; IRM : imagerie par résonance magnétique ; MET : microscopie électronique à transmission ; CCM : chromatographie sur couche mince.

Objectifs

L'objectif de mon travail de thèse a été le développement de nanovecteurs liposomaux fonctionnalisés par des protéines et encapsulant divers composés pour l'imagerie. Ce sujet se situe dans le cadre de la mise au point de systèmes de délivrance de composés thérapeutiques ou d'imagerie. Dans ce domaine, les liposomes sont utilisés car ils sont biocompatibles et que ces vésicules délimitent un intérieur aqueux qui peut être utilisé comme réservoir de composés hydrophiles. Cet intérieur a été utilisé pour encapsuler des médicaments mais aussi des éléments permettant d'obtenir un signal en imagerie. Pour permettre la vectorisation, une solution consiste à associer un élément d'adressage aux vésicules. Cet élément présente une affinité pour une cible de telle façon qu'il permet l'accumulation des liposomes au niveau d'une zone à traiter ou imager. Mon travail s'inscrit dans ce contexte et a consisté à encapsuler des fluorophores et des particules d'oxyde de fer pour obtenir un signal en imagerie (fluorescence, IRM microscopie électronique) et à utiliser des protéines Annexine A5 (Anx5) et des protéines dérivées de l'Anx5 comme élément d'adressage ou comme intermédiaire pour lier d'autres ligands que sont les anticorps.

Le premier chapitre, "Situation du sujet", a pour objectif d'introduire les lipides utilisés, la formation des vésicules et les facteurs qui ont conduit à l'optimisation de la formulation des liposomes pour les applications de transport de composés *in vivo*. Le deuxième chapitre, "Méthodes et procédures expérimentales", présente les techniques utilisées et la mise en œuvre pratique des différentes expériences. Le troisième chapitre, "Résultats", expose la réalisation de trois types d'objet. Tout d'abord, la formation de liposomes utilisant l'Anx5 comme ligand et encapsulant des fluorophores pour imager des cellules en apoptose. Ensuite la mise au point de liposomes neutres ou anioniques encapsulant des particules d'oxyde de fer. Enfin la conception de vésicules fonctionnalisées par des anticorps et utilisant la protéine de fusion Anx5ZZ pour lier ces ligands en surface des liposomes.

.

I Situation du sujet

Le cadre du travail est l'utilisation de liposomes comme vecteurs pour le transport de principes actifs vers une cible de l'organisme. Par définition les liposomes sont des colloïdes sphériques constitués d'une ou plusieurs bicouches lipidiques formées par auto-assemblage de lipides et délimitant un intérieur aqueux. Le transport de composés tire parti du volume interne des vésicules qui est utilisé comme réservoir de principes actifs et de l'intérieur de la membrane pour l'encapsulation de composés hydrophobes. Les éléments internalisés peuvent ainsi être transportés par les liposomes dans la circulation sanguine d'un organisme vivant pour atteindre une cible déterminée, reconnue par les vecteurs. Ces impératifs de transport *in vivo* et de sélectivité pour une cible ont nécessité un certain nombre de choix pour mettre au point une (des) formulation(s) adaptée(s) à l'utilisation des liposomes pour le transport de principes actifs. L'obtention de temps de vie élevés pour ces vecteurs *in vivo* implique des contraintes sur la formulation des liposomes, c'est-à-dire sur la composition lipidique et la morphologie des vésicules. Le choix des lipides à utiliser est effectué parmi un ensemble de molécules aux propriétés connues alors que la morphologie (ainsi que l'encapsulation) est définie par la méthode de préparation. La sélectivité pour une cible de l'organisme est obtenue par association de ligands aux vésicules, ce qui passe par le choix d'un élément d'adressage et d'une méthode d'association de ce ligand aux liposomes.

L'objectif de la "situation du sujet" est d'expliquer quelles sont les propriétés des lipides et des liposomes qui doivent être sélectionnés et / ou mis en œuvre pour optimiser l'utilisation des vecteurs liposomaux dans un organisme vivant. Pour cela la première partie décrit les lipides utilisés et leurs propriétés, notamment leur capacité à former des membranes et leur influence sur les caractéristiques physico-chimiques de ces bicouches. La deuxième partie présente les méthodes de préparation des liposomes, qui permettent un contrôle de la morphologie des vésicules et l'encapsulation des composés à transporter. La troisième partie introduit le comportement des liposomes dans un organisme vivant, les facteurs responsables de leur élimination *in vivo*, et les formulations lipidiques envisagées pour améliorer leur durée de vie. La quatrième partie concerne l'addition de ligands aux liposomes furtifs, la liaison à une cible *in vivo* étant conditionnée par un temps de circulation dans l'organisme suffisant. La cinquième partie traite brièvement de la libération contrôlée des composés encapsulés. La sixième partie cherche à expliquer le pourquoi des formulations liposomales utilisées, c'est-à-dire des compositions lipidiques et des morphologies des vésicules, en conclusion des données exposées dans les parties précédentes. Enfin dans la septième et dernière partie sont présentés les Annexine A5 et leurs dérivés qui sont utilisés dans cette thèse comme ligand ou comme intermédiaire pour associer des anticorps en surface de liposomes.

1 Les lipides

Les lipides d'origine biologique sont des substances solubles dans les solvants organiques, comme le chloroforme ou le méthanol, mais très peu voir non solubles dans l'eau [1]. Les lipides les plus importants et les plus abondants des membranes biologiques présentent un caractère amphiphile avec une partie polaire, hydrophile, c'est-à-dire soluble dans les solvants polaires comme l'eau et insoluble dans les solvants apolaires, et une partie apolaire, hydrophobe, insoluble dans les solvants polaires et soluble dans les solvants apolaires. Un certain nombre de lipides sont totalement hydrophobes mais dans le cadre de ce travail sur les liposomes, seuls des amphiphiles sont utilisés et essentiellement des phospholipides et du cholestérol.

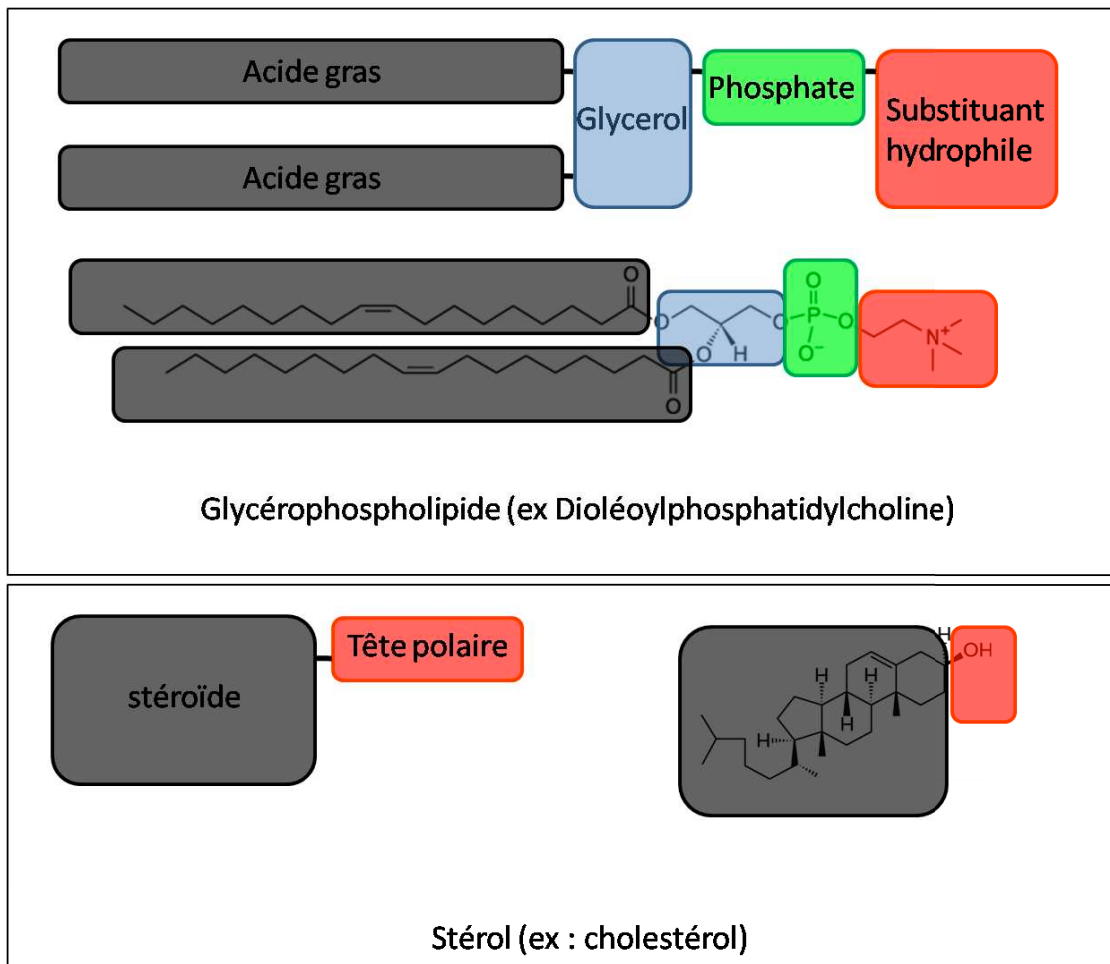


Figure I-1 : Organisation de deux types de lipide amphiphile : A) phospholipide B) cholestérol

Dans un lipide la combinaison de différentes têtes polaires avec des chaînes d'acides gras peut produire une variété très importante de molécules aux caractéristiques diverses. La synthèse

chimique permettra alors d'obtenir de façon contrôlée des molécules aux propriétés choisies en associant des têtes polaires et des queues hydrophobes connues.

1.1 Les parties hydrophobes

Deux types d'éléments apolaires sont présent chez les lipides utilisés dans ces travaux : des chaines hydrocarbonées et un noyau stéroïde, celui du cholestérol.

1.1.1 Stéroïde

Les stéroïdes sont des molécules possédant une charpente polycyclique plane, rigide, constituée de trois cycles à six atomes de carbone et un cycle à cinq. Cette structure est à l'origine de l'effet des stérols, stéroïdes couplés à une tête hydrophile, sur des propriétés telles que la stabilité, la perméabilité ou la fluidité membranaire. C'est pour son influence sur de tels paramètres que le cholestérol, quasi seul stérol utilisé dans ces travaux, sera ajouté à des membranes constituées de lipides possédant des acides gras comme parties hydrophobes.

1.1.2 Acides gras

Les acides gras sont des acides carboxyliques avec de longues chaînes hydrocarbonées. Les chaines les plus fréquemment rencontrées ont un nombre pair de carbones allant de 12 à 22. Malgré leur grande flexibilité la conformation la plus probable est celle où la chaîne est totalement étendue excepté dans le cas où il y a une insaturation, c'est-à-dire une double liaison entre deux atomes de carbone [2]. Les différentes chaînes acyles sont classées et nommées en fonction de leur nombre de carbones et de leurs insaturations, caractéristiques dont découlent les propriétés définissant notamment la stabilité ou la fluidité de la membrane.

Nom	Structure	nombre de carbones
Lauroyl	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COO-}$	12
Myristoyl (M)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COO-}$	14
Palmitoyl (P)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COO-}$	16
Stéaroyl (S)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COO-}$	18
Oléoil (O)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH=CH}(\text{CH}_2)_7\text{COO-}$	18

Tableau I-1 Organisation et structure de quelques chaînes acyles.

Les parties apolaires des lipides utilisés sont donc soit polycycliques, planes et rigides, pour le cholestérol, soit des chaînes d'acides gras étendues et flexibles. Dans les deux cas leurs propriétés sont liées à leur influence sur des paramètres tels que la stabilité, la fluidité et la perméabilité membranaire. Ces caractéristiques de la membrane pourront alors être modulées par combinaison de parties apolaires différentes. Les autres propriétés membranaires seront dues aux têtes polaires sur lesquelles sont greffés les résidus hydrophobes.

1.2 Les têtes polaires

1.2.1 Le cholestérol

La seule partie polaire du cholestérol est un groupement OH lié sur un des cycles du stéroïde conduisant à la formation d'un stéroïde-alcool. Du fait de la petite taille de la tête polaire relativement à la partie apolaire, la molécule de cholestérol est la plus hydrophobe des lipides utilisés.

1.2.2 Les glycérolipides

Pour les glycérolipides, un glycérol est lié à des chaînes d'acides gras d'une part et à un substituant hydrophile qui déterminera la nature du lipide d'autre part.

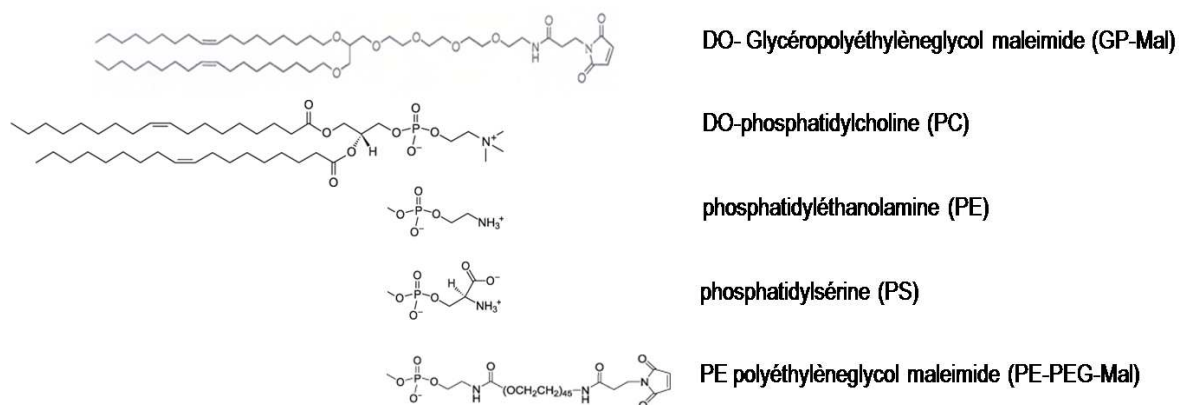


Figure I-2 : Têtes polaires de différents glycérolipides ; les formules présentées sont celles trouvées à pH 7 (DO dioléoyl).

Deux chaînes hydrocarbonées sont greffées en position 1 et 2 du glycérol via des liaisons ester le plus souvent, et quelquefois par des liaisons éther (DO-GlyceroPEG-Mal (DOGP)). La position 3 est substituée par un groupe hydrophile. Excepté le DOGP, tous les glycérolipides utilisés appartiennent à la classe des glycérophospholipides. La position 3 est

alors estérifiée par l'acide phosphorique et c'est la nature du composé fixé sur cet acide phosphorique qui définit la nature du phosphoglycéride, ses propriétés de charges, taille ou la possibilité de greffer chimiquement un substituant additionnel.

De par leur absence de charge et leur propension à former des structures lamellaires, les lipides les plus employés pour la formation de liposomes sont les phosphatidylcholine (PC). Les phosphatidylsérines (PS) sont utilisées pour leur charge négative et les phosphatidyléthanolamines (PE) pour leur tête polaire qui leur confèrent une géométrie particulière et présente un groupement amine qui peut être utilisé pour réaliser des couplages chimiques.

Tous ces lipides possèdent au moins une charge négative à pH7, celle portée par le groupement phosphate. La PC est un zwitterionique : la molécule est électriquement neutre car la charge positive de l'amine quaternaire compense la charge négative du phosphate. La PS a une charge globale négative car la sérine présente une charge positive et une négative. Cette charge conduit à une hydratation plus importante responsable d'une augmentation de la taille de la tête polaire. La PE est amphotère et caractérisée par la petite taille de sa partie hydrophile. Au delà de pH 8 l'amine n'est plus chargée. La charge globale de la tête polaire est alors négative et la taille augmente du fait d'une hydratation plus importante. Le groupement amine est souvent utilisé pour greffer chimiquement des éléments additionnels comme du polyéthylène glycol (PEG) ou des molécules fluorescentes. La charge de la molécule résultante est alors négative dans le cas du lipide-PEG.

1.3 Les agrégats lipidiques en milieu aqueux dilué

Deux paramètres conduisent à l'autoassociation des lipides selon une organisation déterminée : le caractère amphiphile et la géométrie des molécules. Les lipides possèdent une partie polaire et une partie apolaire spatialement distinctes. Or les composés polaires sont solubles dans les solvants polaires et les composés apolaires dans les solvants apolaires. Dans l'eau le rejet des parties hydrophobes du solvant aqueux induit l'auto association des lipides : les molécules s'orientent de façon à ce que la partie polaire soit en contact avec le milieu polaire et protège les parties hydrophobes qui s'associent pour former un intérieur apolaire. C'est donc l'immiscibilité d'une des parties de la molécule dans le solvant qui est la cause de l'agrégation des lipides mais différents types d'organisation peuvent être constitués selon la géométrie des molécules associées. En solution diluée ces différents assemblages sont dispersés sous forme de colloïdes. Ce sont les organisations lipidiques qui se réalisent en

milieu dilué, dont certaines ont trouvés une application dans le domaine de la vectorisation de composés thérapeutiques, qui seront présentées plus loin.

1.3.1 Structure et organisation des agrégats lipidiques

La structure des organisations lipidiques peut être expliquée de façon simple en considérant que c'est la géométrie des molécules qui est responsable de la formation des différents types d'agrégats. Cette géométrie est représentée par un paramètre appelé paramètre d'empilement, P , $P=v/a.l$ avec v volume des caïnes hydrophobes, a surface de la tête polaire et l longueur des chaînes hydrocarbonées [3-5].

Pour $P < 1$, la tête polaire est de taille importante par rapport à la partie hydrophobe ($v < a.l$) et le lipide s'inscrit alors dans un cône inversé. Ce type de lipide forme des micelles ou phases hexagonales I notée H_I . Cette catégorie d'amphiphile comprend par exemple les lysolipides, les détergents ou les lipides tels que les lipides-PEG.

Pour $P > 1$, la tête polaire est de petite taille par rapport à la partie hydrophobe ($v > a.l$), le lipide s'inscrit dans un cône. Ce type de lipide forme des micelles inverses ou phases hexagonales II notée H_{II} . C'est en particulier le cas des phosphatidyléthanolamines.

Pour $P \approx 1$, $v \approx a.l$, le lipide s'inscrit dans un cylindre et forme des phases dites lamellaires. Ces lipides forment les bicouches lipidiques, structures constitutives des liposomes. Il s'agit notamment des phosphatidylcholines et phosphatidylsérines.

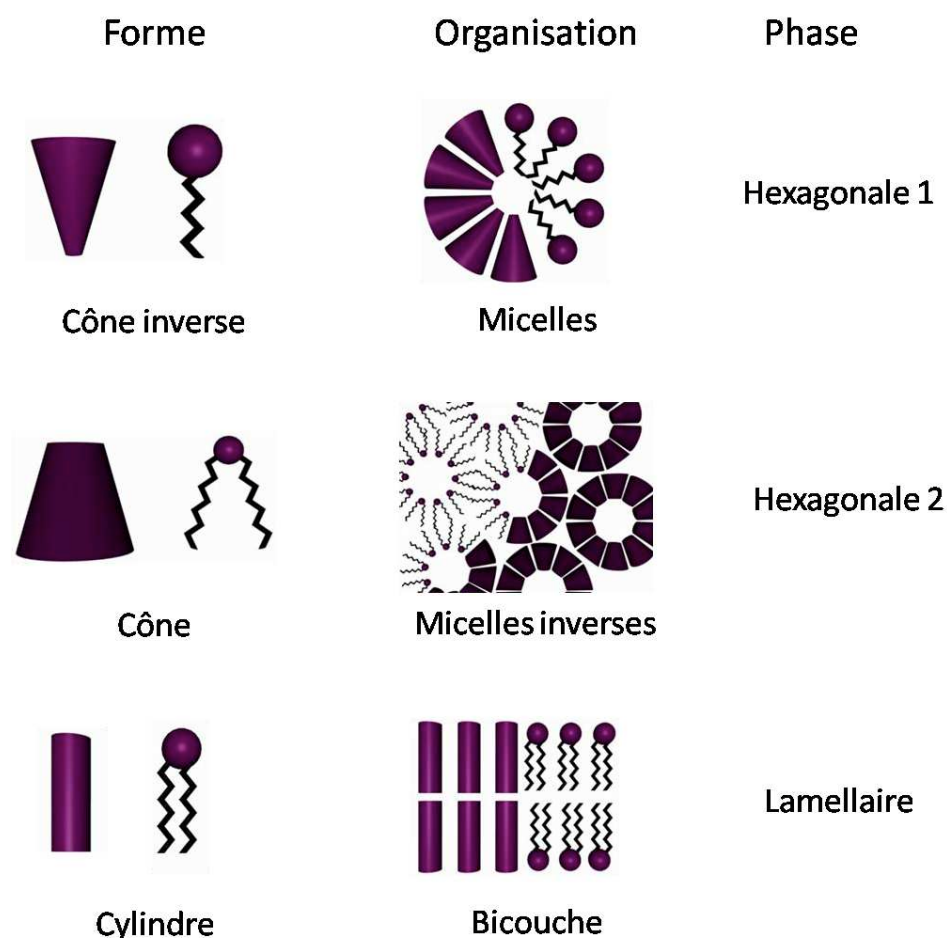


Figure I-3 : Modèle géométrique de la formation des agrégats lipidiques.

Il est remarquable que la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylcholine aient des structures chimiques relativement proches mais des géométries, et donc des modes d'organisation, très différentes. Ces différences s'expliquent par le fait que la phosphatidylcholine est très hydratée formant ainsi une tête polaire plus volumineuse que la phosphatidyléthanolamine qui n'est que faiblement hydratée.

L'approche géométrique de l'organisation des lipides permet d'expliquer que l'association de lipides de types H_I et H_{II} conduit à la formation de membranes lipidiques. Il y aura compensation de forme entre les deux types de structure de telle façon que le mélange adopte une organisation lamellaire. Ainsi des phosphatidyléthanolamines peuvent être assemblées avec des lysolipides ou des lipides-PEG pour obtenir des bicouches lipidiques [6].

En fonction de la géométrie des lipides, différents types d'agrégats peuvent donc être formés : les lipides de type cône inverse forment des micelles, ceux de forme conique des micelles inverses et ceux de forme cylindrique des membranes. En solution aqueuse diluée, les systèmes membranaires forment des colloïdes constitués d'une ou plusieurs membranes

délimitant un intérieur aqueux. Grâce à différents procédés mécaniques ou chimiques il est possible de contrôler la taille, le nombre de membranes ou d'encapsuler des composés à l'intérieur de ces vésicules. Le choix des lipides est alors important non seulement pour obtenir des phases lamellaires mais aussi pour contrôler les propriétés de surface et les caractéristiques de rigidité ou de perméabilité de la bicouche constituant les colloïdes obtenus.

1.3.2 Propriétés membranaires conférées par les caractéristiques des lipides

1.3.2.1 Propriétés de surface

Les propriétés de surface sont liées aux têtes polaires des lipides de la membrane du fait de leur exposition au solvant. Les lipides sont choisis en fonction de leur charge ou de la présence d'une molécule présente naturellement ou greffée (carbohydate, PEG, ligand...) pour limiter ou favoriser l'interaction des vésicules entre elles ou avec des éléments présents dans le milieu.

L'addition de lipides chargés, tels que la phosphatidylsérine(PS), permet d'obtenir des vésicules qui, possédant toutes la même charge, vont se repousser et seront donc stabilisées vis-à-vis d'éventuels phénomènes de fusion [6]. Dans le cadre de l'utilisation des liposomes pour une injection à des êtres vivants, les dispersions de vésicules doivent être stables in vivo. Pour cela, des PE liées à une molécule de PEG sur la tête polaire sont ajoutées à la composition lipidique ce qui permet d'obtenir une couche de PEG en surface des membranes et, ainsi, d'augmenter la durée de vie dans un organisme et la répulsion des liposomes entre eux.

A l'inverse de la recherche de stabilisation, qui nécessite de diminuer les interactions avec les éléments du milieu externe, l'interaction avec certains composants de la solution peut être recherchée. La présence d'une charge peut alors favoriser le contact avec soit des éléments de charge opposée soit des éléments de même charge via un élément intermédiaire jouant le rôle de pont. Les liposomes contenant des phosphatidylsérines peuvent aussi agréger en présence d'ions calcium divalents Ca^{2+} , ou fixer des protéines par interaction électrostatique à la surface de ces liposomes comme par exemple l'Annexine5, une protéine qui se lie aux PS via le Ca^{2+} .

L'interaction avec un élément précis du milieu peut être recherchée ce qui va nécessiter une reconnaissance spécifique. Les liposomes contiendront alors une certaine proportion de lipides présentant des groupements chimiques pour réaliser des liaisons covalentes ou de

lipides associés à un ligand présentant une affinité pour une cible connue. Souvent, c'est un lipide présentant une fonction chimique vers l'extérieur qui servira à lier à la surface des vésicules un ligand spécifique d'une cible choisie.

Le choix des têtes polaires des lipides permet donc de moduler les propriétés de surface des liposomes et, de cette façon, de contrôler les interactions des vésicules avec leur environnement extérieur. Ce choix a aussi une influence sur les phases membranaires, c'est à dire l'état rigide ou fluide de la membrane, même si cet état est surtout déterminé par la conformation des résidus hydrophobes des lipides.

1.3.2.2 Phases membranaires

Les membranes lipidiques présentent principalement deux états, en fonction de la température: les phases gels β et β' pour $T < T_m$ et la phase fluide α pour $T > T_m$ avec T_m température de transition de phase [2, 7].

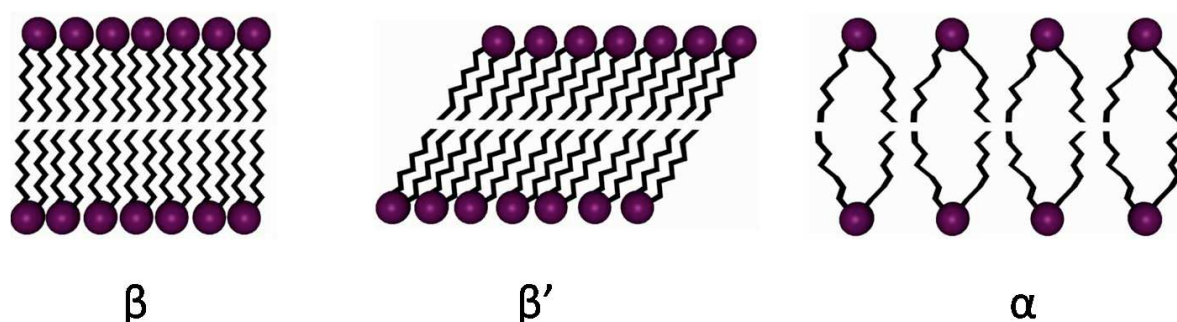


Figure I-4 : Conformation schématique des chaînes hydrophobes dans les phases gel β et β' et phase fluide α .

En phase gel les lipides sont en contact étroit, les chaînes alkyle parallèles les unes aux autres et étirées au maximum (état solide des chaînes). Les lipides sont alors très peu mobiles, et la surface occupée par chaque tête polaire est minimale. Deux types d'arrangements peuvent être distingués : la conformation β , dans laquelle les chaînes sont orientées perpendiculairement au plan de la bicouche et la conformation β' dans laquelle elles sont inclinées par rapport à la perpendiculaire à ce plan. Le type de conformation β ou β' est déterminé par la nature de la tête polaire.

Le passage en phase fluide est obtenu par augmentation de température. L'agitation thermique entraîne une mobilité accrue autour des liaisons carbone-carbone des chaînes hydrophobes et conduit à une structure plus désordonnée (état liquide des chaînes). Les contacts entre lipides

sont alors moins étroits et la surface occupée par chaque tête polaire ainsi que la mobilité des molécules augmentent. La membrane est alors plus fluide [8].

Pour $T \approx T_m$ les deux phases, gel et fluide, coexistent dans la membrane. Dans le cas de membrane constituée d'un seul type de lipide la transition est brutale et a lieu dans un intervalle de température très restreint (quelques degrés).

La valeur de T_m dépend de nombreux paramètres, principalement de la longueur de la chaîne hydrophobe, de son degré d'insaturation et de la nature de la tête polaire. De façon générale, tout ce qui s'oppose à l'augmentation de mobilité des lipides qui a lieu lors du passage en phase fluide va avoir tendance à augmenter la T_m , nécessitant de fournir davantage d'énergie (agitation thermique) pour permettre cette expansion. Ainsi, plus les chaînes alkyle sont longues, plus les interactions hydrophobes sont importantes et plus la T_m est élevée. La présence d'une insaturation crée un coude dans la chaîne hydrophobe ce qui limite les interactions avec les chaînes voisines et donc diminue la T_m . La nature de la tête polaire détermine la configuration β ou β' car l'inclinaison des chaînes (β') diminue les interactions hydrophobes et donc la T_m .

phospholipide	T_m (°C)
DMPC	23,6
DPPC	41,3
DSPC	54,5
DOPC	-18,3
DOPS	-11

Tableau I-2 : Température de transition de phase (T_m , en °C) de quelques lipides.

Comme la nature des chaînes hydrophobes et de la tête polaire déterminent la température de transition de phase d'un lipide, la constitution de mélange de lipides variés conduit à des associations de T_m différents. Les transitions de phase de ces membranes vont s'étendre sur de grands domaines de température compris entre les températures de transition des lipides du mélange. Pour certaines associations la présence des transitions peut même être totalement abolie. Lorsque l'objectif est de réaliser un mélange de lipides afin de perturber la T_m ou de modifier la fluidité membranaire, les lipides utilisés sont généralement associés à du cholestérol.

Le cholestérol présente la propriété de fluidifier les phases gels et de rigidifier les phases fluides. Dans la bicouche lipidique, le groupement OH est situé au niveau des têtes polaires des lipides et le noyau tétracyclique est en interaction avec les chaînes hydrophobes.

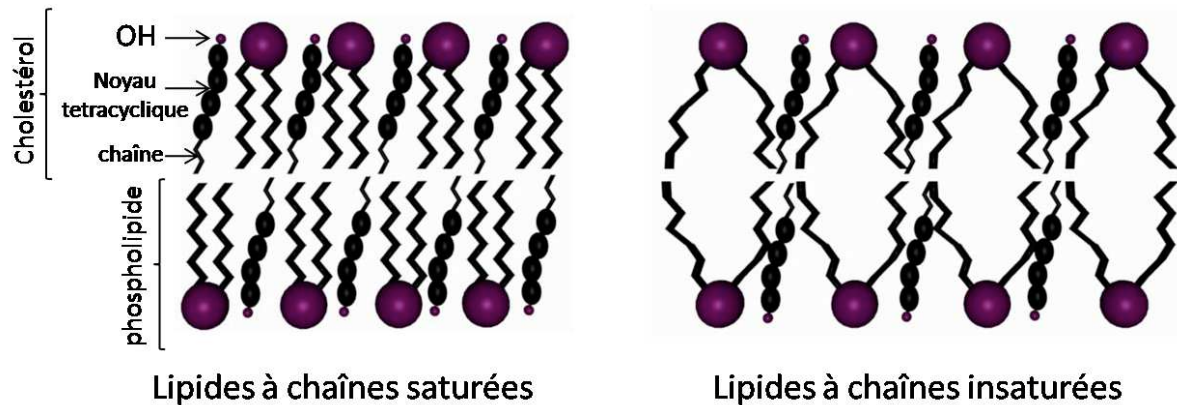


Figure I-5 : Organisation du cholestérol dans les membranes (adapté de Shechter, E. (1990) Biochimie et biophysique des membranes. Masson, Paris).

En phase gel cette interaction empêche la formation d'une structure étirée avec les chaînes en contact étroit ; il y a augmentation du désordre et donc fluidification des phases gels. Pour des températures élevées (au dessus de la T_m) l'interaction du cholestérol avec les lipides avoisinants limite leurs mouvements ce qui diminue la fluidité membranaire. Les quantités croissantes de cholestérol dans la membrane diminuent ainsi l'intensité des transitions de phases et vont même jusqu'à les abolir pour des quantités supérieures à 30% des lipides totaux [2]. Le cholestérol tamponne donc les variations de fluidité en fonction de la température : fluidification des phases gels et rigidification des phases fluides. Les membranes sont alors en phase liquide-ordonnée pour une très large gamme de température [9]. L'addition de cholestérol permet donc une certaine maîtrise de la rigidité membranaire, un paramètre qu'il peut être important de contrôler, en particulier dans le cas des applications de liposomes comme système de transport *in vivo*. En effet l'état de rigidité de la bicouche lipidique a une influence sur la morphologie des vésicules, sur la perméabilité des membranes mais aussi sur la durée de vie des liposomes dans un organisme vivant.

Les liposomes ont des morphologies différentes selon la phase de leur(s) membrane(s). En phase fluide les vésicules forment des sphères, ce qui implique que les bicouches lipidiques présentent une certaine courbure. En phase gel les membranes sont dans un état très rigide et ne peuvent pas être courbées. Les liposomes forment alors des polyèdres, c'est-à-dire des sphères constituées de nombreuses faces avec des discontinuités à la limite de deux faces [10].

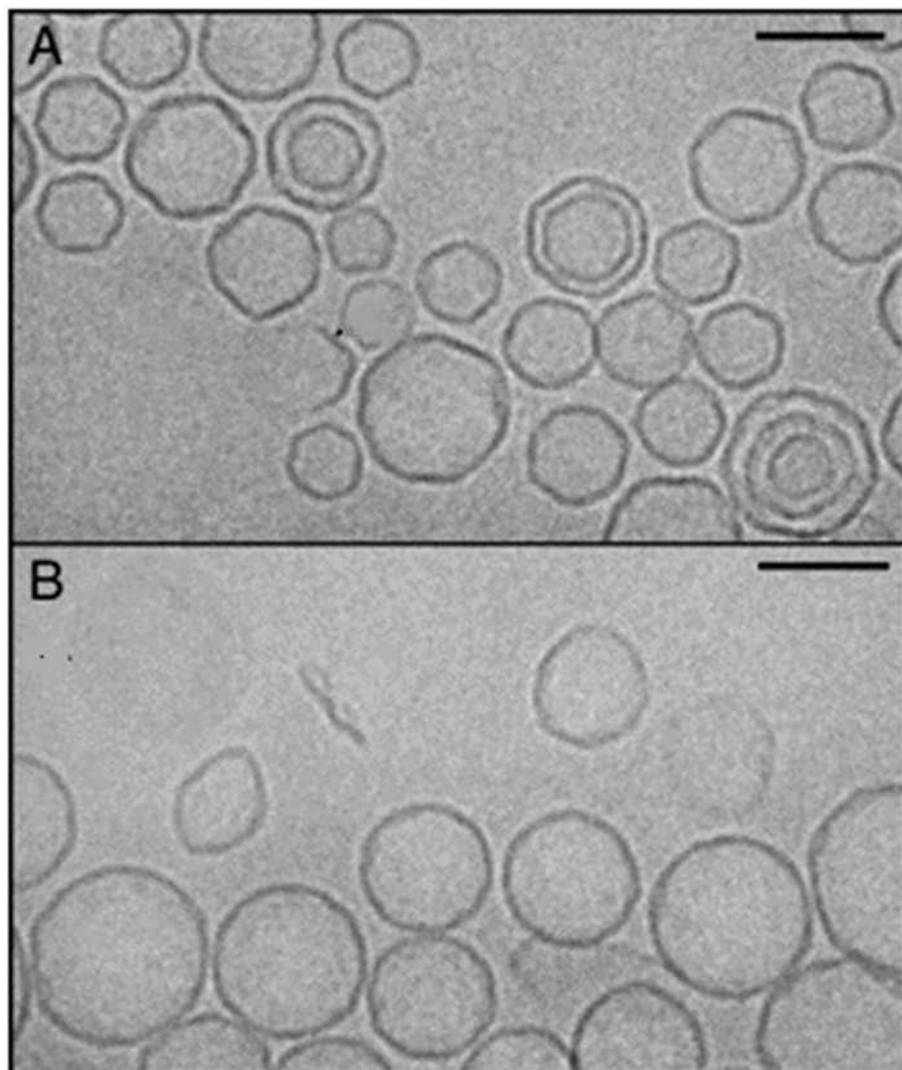


Figure I-7 : Liposomes composés de DPPC en cryomicroscopie électronique A) en phase gel B) en phase fluide barres d'échelles 100nm (Ickenstein et al. 2006 *Biochimica et Biophysica Acta*).

Le caractère fluide ou rigide de la bicouche a aussi une influence sur la perméabilité membranaire. Ce paramètre sera particulièrement important dans le cadre d'une utilisation des liposomes comme système de transport. Les vésicules doivent alors retenir de façon stable un composé d'intérêt encapsulé dans leur intérieur aqueux. L'observation des variations de perméabilité en fonction de la température indique une augmentation de la perméabilité avec l'augmentation de la température avec un maximum pour $T=T_m$. Cette perméabilité maximale au cours de la transition de phase s'explique par la coexistence des phases gel et fluide dans la membrane et la présence de défauts dans la bicouche au niveau des limites entre ces deux phases. La perméabilité peut donc être ajustée en modulant la fluidité membranaire.

La rigidité membranaire a aussi une influence sur le comportement des liposomes lors d'une utilisation *in vivo*. La plupart des applications nécessite des injections intraveineuses, plaçant les vésicules au contact des éléments du sang. Dans cet environnement, la rétention de composés encapsulés, le temps de circulation ou même l'intégrité des vésicules est menacé, en particulier à cause des protéines plasmatiques. L'interaction des liposomes avec ces protéines pourra se faire via des interactions électrostatiques ou hydrophobes qui conduiront à une adsorption en surface ou à une pénétration des protéines dans la membrane. Cette pénétration se fera d'autant plus facilement que la membrane est fluide ou qu'elle présente des irrégularités. En phase gel la membrane a une structure de polyèdre, une sphère à facette constituée de domaines de membranes planes. Les limites entre ces différents domaines créent des discontinuités qui rendent la membrane plus facile à pénétrer et donc augmentent les interactions hydrophobes avec des protéines [6]. Il est alors nécessaire de rendre la membrane plus régulière notamment via l'utilisation de cholestérol qui va fluidifier les phases gel. A l'inverse il sera nécessaire de rigidifier les phases fluides pour rendre la membrane moins pénétrable en utilisant du cholestérol par exemple. La membrane ne doit donc être ni trop rigide ni trop fluide ce qui implique une bonne maîtrise de la phase membranaire en vue d'une application *in vivo* des liposomes [11].

Le choix des lipides permet d'obtenir un type d'agrégat en particulier et de contrôler les propriétés physicochimiques. Mais si la nature des lipides détermine les propriétés de la membrane, le type de morphologie est défini par la méthode de préparation des liposomes.

2 Préparation des liposomes

Le mode de préparation permet non seulement de définir la taille ou le nombre de membranes des vésicules mais aussi d'encapsuler des composés à l'intérieur des liposomes [8]. De façon générale les critères de taille et de nombre de membranes sont utilisés pour classer les différents types de vésicules. Les MLV (Multi Lamellar Vesicle, vésicule multilamellaire) sont des vésicules constituées de plusieurs membranes, concentriques, qui apparaissent emboîtées les unes dans les autres ; les LUV (Large Unilamellar Vesicle, vésicule unilamellaire de grande taille) des vésicules constituées d'une seule membrane de grande taille (>60-100nm) et les SUV (Small Unilamellar Vesicle, vésicule unilamellaire de petite taille ou Sonicated Unilamellar vesicle, vésicules unilamellaires soniquées) sont des vésicules

de petite taille (30-60nm), unilamellaires qui sont obtenues par sonication en général. Les GUV (Giant Unilamellar Vesicle, vésicules géantes unilamellaires) sont des unilamellaires de très grande taille (de 1 à 100 μm). La plupart de ces structures ne se forment pas spontanément en solution aqueuse et nécessitent la mise en œuvre d'un certain nombre de procédés. Deux grandes étapes peuvent être distinguées lors de la synthèse des liposomes : une phase d'hydratation des lipides et une phase de calibration de la morphologie des vésicules.

2.1 Hydratation des lipides

Les lipides ne sont pas solubles en milieu aqueux et donc l'hydratation directe des lipides sous forme de poudre ne se fait pas de façon idéale. D'une part il se forme des structures encapsulant des lipides non hydratés et d'autre part certains composés tels que le cholestérol, qui va former des microcristaux lors de tels traitements, ne se mélangent pas correctement avec les autres lipides. Deux solutions peuvent être envisagées : dispersion des agrégats lipidiques dans un excès de détergent ou solubilisation des lipides dans un solvant organique suivi d'une étape d'hydratation.

La dissolution des mélanges de lipides dans un excès de détergent va permettre de casser ces agrégats et de disperser les lipides dans des micelles. Il se forme alors des micelles mixtes lipides-détergent en équilibre avec des monomères de détergent.

Dans un deuxième temps le détergent est éliminé, par exemple par dialyse, de façon continue et contrôlée, ce qui conduit à la formation de bicouches mixte lipide-détergent puis de membranes sans détergent. Cette méthode est la synthèse de liposomes par élimination de détergent [12-14].

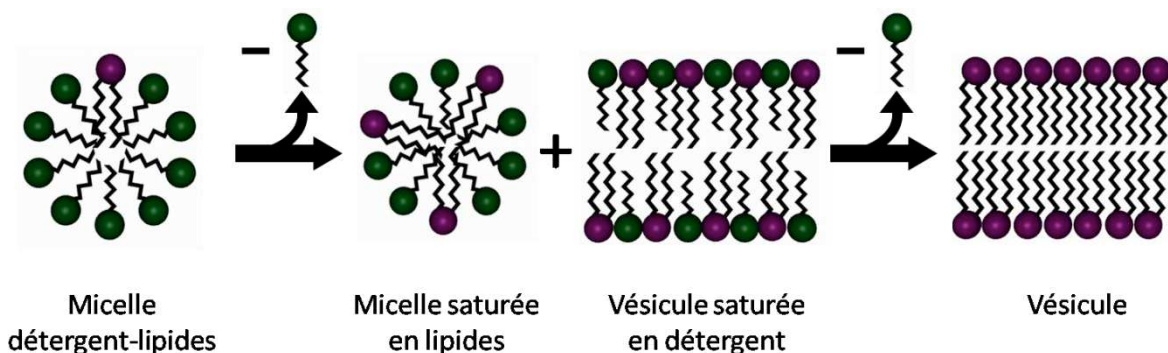


Figure I-8 : Formation de membrane lipidique par élimination de détergent.

Les vésicules ainsi obtenues sont majoritairement unilamellaires et leur taille varie en fonction des conditions de la dialyse : vitesse de dialyse, ratio lipide-détergent... Cette méthode peut aussi être utilisée sur des liposomes déjà formés dont on veut changer les caractéristiques.

Une autre solution pour s'affranchir du problème de l'immiscibilité dans l'eau est de dissoudre les lipides dans des solvants organiques tels que chloroforme ou l'éther. Les solutions-mère de chacun des lipides ainsi obtenues pourront alors être mélangées dans des quantités calculées pour obtenir des associations de lipides aux proportions contrôlées. Le passage en milieu aqueux se fait principalement de deux manières : soit par la méthode dite de réhydratation de film lipidique, soit par la méthode d'inversion de phase.

Dans la méthode de réhydratation de film lipidique [15, 16], les différents lipides sont mélangés dans un ballon et le solvant organique est complètement évaporé. Les lipides forment alors un film sec sur les parois du récipient. Ce film est resuspendu par réhydratation avec un solvant aqueux et simple agitation à une température supérieure à la température de transition de phase. Les liposomes formés sont des MLV qui présentent des tailles et des nombres de membranes très hétérogènes et possèdent un volume aqueux interne relativement faible par rapport à la quantité de lipides

Dans la méthode de réversion de phase, les lipides sont dissous dans un solvant organique insoluble dans l'eau qui est en général de l'éther, l'éther pouvant être soit mélangé avec du chloroforme soit ajouté après l'évaporation du chloroforme [17-19].

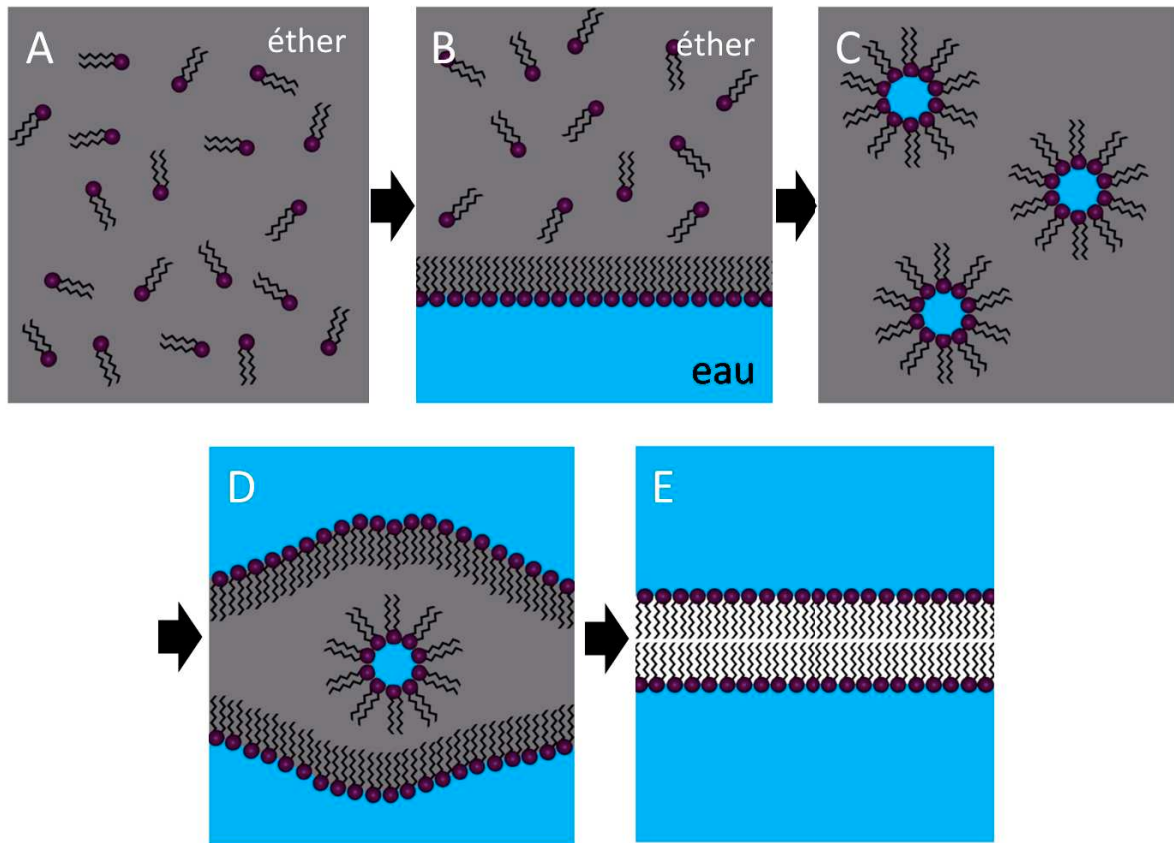


Figure I-9 : Formation de membranes lipidiques par réversion de phase : A) dissolution des lipides en solvant apolaire (ex éther) B) ajout d'une solution aqueuse C) sonication D) et E) évaporation du solvant jusqu'à la formation de membrane.

Une solution aqueuse est ajoutée (en général un volume de phase aqueuse pour trois volumes de phase organique) et l'ensemble est soniqué de façon à former une émulsion. Il se forme alors des gouttes d'eau dans lesquelles les lipides s'orientent avec leur tête hydrophile en contact avec l'eau et leur queue hydrophobe en contact avec l'éther. L'éther est ensuite progressivement évaporé sous vide ce qui conduit à la formation de liposomes. Les vésicules obtenues sont principalement unilamellaires et de grande taille malgré une certaine hétérogénéité des populations de liposomes vis-à-vis de ces paramètres.

Il apparaît donc que quelle que soit la méthode utilisée pour hydrater les lipides (dialyse de détergent, réhydratation de film lipidique, inversion de phase) les liposomes présentent une morphologie qui est peu contrôlée et peut être inadaptée à certaines applications. La taille et le nombre de membranes peuvent alors être modifiés grâce à des traitements mécaniques ou physiques, les principaux étant les cycles de congélation-décongélation, l'extrusion et la sonication [20].

2.2 Traitements mécaniques et physiques

Le premier type de traitement consiste à refroidir la solution jusqu'à congélation et à la réchauffer pour qu'elle redevienne liquide [21, 22]. Sous l'effet de la congélation les membranes vont se casser puis se reformer lors de l'augmentation de température. Il en résulte des distributions de taille plus homogènes, mais non contrôlées. La maîtrise du diamètre est alors obtenue par extrusion ou sonication.

L'extrusion permet une réduction de la taille des liposomes et du nombre de lamelles des MLV. Les vésicules sont passées de façon répétée, à une température supérieure à T_m , à travers des pores de dimension définie ce qui conduit à la transformation mécanique par cassure et reformation des grandes vésicules en vésicules plus petites [23-26]. Pour des tailles d'environ 100 nm les liposomes sont majoritairement unilamellaires. L'extrusion est en général réalisée dans un extrudeur, un appareil constitué de deux seringues situées face à face, séparées par un système contenant une membrane aux pores calibrés. La solution est passée de façon répétée d'une seringue dans l'autre en passant à travers la membrane. Cette méthode est employée pour former des vésicules jusqu'à 100nm. Pour obtenir des diamètres inférieurs les vésicules sont en général soniquées.

La sonication consiste à soumettre une solution de liposomes à des ultrasons, c'est-à-dire à leur fournir une importante quantité d'énergie directement ou indirectement. Dans le premier cas, la pointe du sonicateur est plongée dans la solution, dans le second cas le tube contenant l'échantillon est placé dans un bain à sonication. Cette méthode du bain à sonication ne produit en général pas suffisamment d'énergie pour former des solutions homogènes de petite taille. La pointe à sonication apporte beaucoup plus d'énergie. Ce traitement provoque la rupture des vésicules et la formation de vésicules unilamellaires de petite taille de l'ordre de 20-60 nm de diamètre [27]. Ces dimensions sont les plus faibles qu'il est possible d'obtenir pour des liposomes. Il en résulte une courbure importante de la membrane et un volume interne faible.

Les méthodes de synthèse des liposomes consistent donc à hydrater les lipides avec une solution aqueuse pour former des systèmes membranaires et à calibrer leur morphologie grâce à des traitements physiques ou mécaniques. Il en résulte des vésicules constituées de membranes délimitant un intérieur d'un extérieur aqueux et donc une compartimentation du milieu utilisé pour la réhydratation. Un composé d'intérêt présent dans la solution aqueuse peut donc être inséré de façon simple, lors de la synthèse, à l'intérieur des liposomes. Cette

propriété d'encapsulation a conduit à l'utilisation des liposomes comme système de transport de composés thérapeutiques ou pour l'imagerie.

2.3 Encapsulation de composés à l'intérieur des liposomes

Divers types de composés thérapeutiques peuvent être associés aux liposomes et ceci de manière différente selon qu'ils sont hydrophiles, hydrophobes, susceptibles d'être liés de manière covalente ou électrostatique à la membrane ou encore que ce soit des bases faibles.

Les composés hydrophiles peuvent être encapsulés de façon passive lors de la synthèse dans l'intérieur aqueux de la vésicule [28-32]. Il suffit d'ajouter le composé d'intérêt à la solution aqueuse avec laquelle les lipides sont réhydratés. Comme les liposomes vont compartimenter le milieu, la concentration du composé dans l'intérieur aqueux est celle de la solution. L'élément à encapsuler peut aussi être ajouté aux vésicules avant traitement mécanique. Les ruptures et reformations de membranes conduisent alors à l'homogénéisation du milieu interne avec le milieu externe. Une fois que les liposomes ont la morphologie souhaitée, les vésicules chargées sont séparées des composés non encapsulés, par filtration sur gel [33], dialyse, filtration ou sur colonne échangeuse d'ion... La fraction de composés encapsulés est celle contenue dans le volume interne des vésicules.

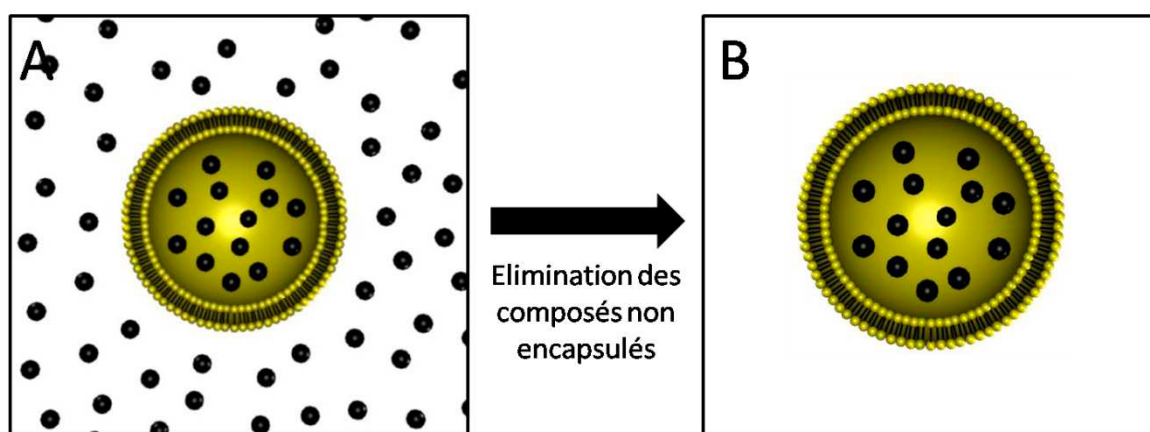


Figure I-10 : Encapsulation passive des composés A) synthèse des liposomes qui vont compartimenter la solution B) élimination des composés non encapsulés.

Ainsi l'efficacité d'encapsulation, c'est-à-dire la quantité de substances encapsulées par rapport à la quantité initiale présente dans la solution, est en général faible mais peut être améliorée en augmentant la concentration en liposomes. Du point de vue de l'efficacité d'encapsulation l'inversion de phase fait exception et peut atteindre des rendements proches de 100% [8, 34]. Mais si la morphologie des vésicules est inadaptée aux applications

souhaitées, les traitements mécaniques utilisés pour la calibration vont conduire à une équilibration des concentrations internes et externes des liposomes et donc à une quantité encapsulée faible. Ces méthodes de charge de composés par compartimentation présentent l'avantage de ne rajouter qu'une étape de séparation des éléments non encapsulés aux étapes de synthèse mises en œuvre pour la formation des liposomes. La méthode d'encapsulation passive présente l'avantage de la simplicité, du contrôle de la concentration, qui est celle du tampon, mais conduit, à part pour la réversion de phase, à des pertes importantes des composés non encapsulés.

Dans le cas particulier des bases faibles, l'efficacité d'encapsulation peut atteindre 100% c'est-à-dire que la totalité du composé présent dans la solution peut être insérée dans les vésicules. La charge est réalisée dans des liposomes déjà formés à l'intérieur desquels le pH est acide (pH≈4-5) alors que le pH du milieu est plus basique (pH≈7-8) [35]. Au pH de la solution la base est en équilibre $BH^+ \leftrightarrow B$. La forme neutre peut traverser la membrane, se charge positivement (se protone) dans l'intérieur acide du liposome et est maintenue à l'intérieur de la vésicule. De grandes quantités de composés peuvent ainsi être encapsulées mais ne sont pas retenues efficacement lorsque le gradient de pH s'estompe. Pour remédier à ce problème il est possible de faire précipiter la base chargée en ajoutant un anion dans la vésicule. Dans certains cas le composé précipité va même cristalliser à l'intérieur du liposome [36-40]. Le principe de la charge de bases faibles grâce à un gradient de pH peut s'appliquer à des acides faibles mais n'est pas utilisé car les acides faibles ne forment pas de précipités avec des cations. Cette méthode d'encapsulation de bases faibles grâce à un gradient de pH est dite active par opposition à l'encapsulation par compartimentation du milieu qui est dite passive. L'exemple le plus caractéristique est la doxorubicine.

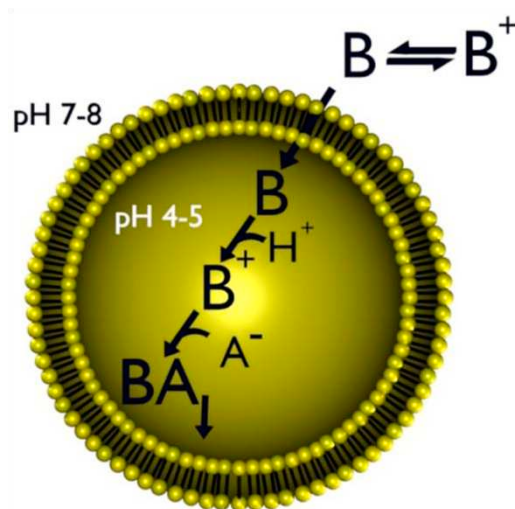


Figure I-11 : Encapsulation de bases faibles via un gradient de pH.

Ces deux procédures utilisent l'intérieur aqueux des liposomes pour constituer un réservoir de composés d'intérêt. Il existe un cas particulier d'utilisation de l'espace interne du liposome qui fait appel à une méthode de synthèse singulière. Il s'agit de l'encapsulation de particules d'oxyde de fer pour obtenir des liposomes magnétiques donnant un signal en IRM. Ces particules, qui peuvent aussi être chargées de façon passive, sont encapsulées par une méthode de dialyse de détergent et échange de lipides. Des agrégats de particules de fer sont recouverts d'une bicouche d'acide laurique, un acide gras. Des liposomes constitués de lipides à courtes chaînes hydrophobes sont ajoutés et le mélange est mis à dialyser. Au fur et à mesure de l'élimination de l'acide laurique des lipides vont s'échanger des liposomes vers les particules jusqu'à former une membrane à leur surface [41-44].

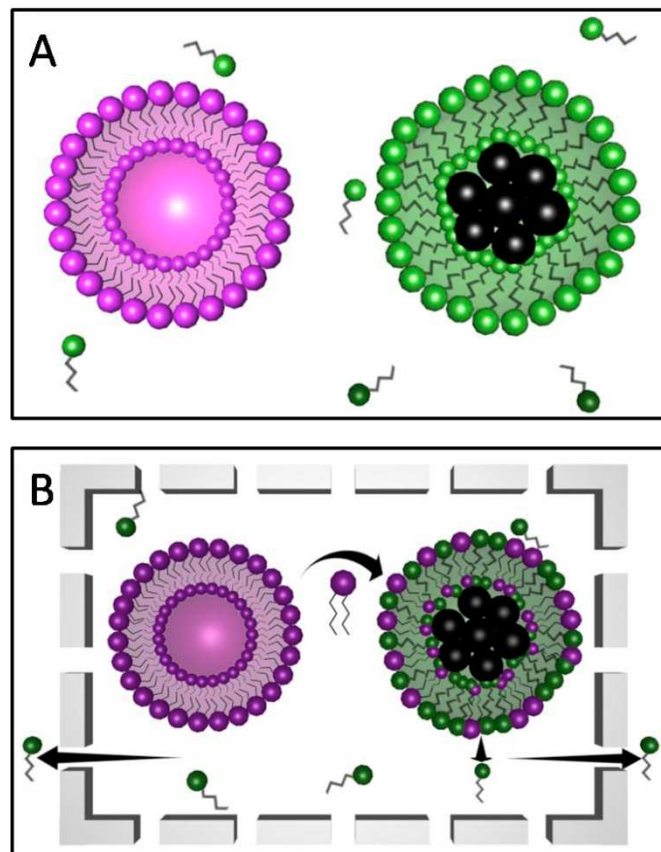


Figure I-12 : Synthèse de magnétoliposomes par dialyse de détergent et transfert de lipides A) mélange de nanoparticules de fer couvertes d'une bicouche d'acide laurique (vert) avec des liposomes (violet) B) dialyse de l'acide laurique et transfert de lipides à la surfaces des particules.

Les objets obtenus sont considérés comme des liposomes encapsulant des particules même si leur morphologie n'est pas celle d'une sphère mais celle des agrégats d'oxyde de fer et qu'il

s'agit plus précisément de particules d'oxyde de fer enrobées de bicouches de phospholipides.

Pour la plupart des substances solubles en milieu aqueux, l'espace interne des liposomes est utilisé comme réservoir où sont accumulés les composés d'intérêt. D'autres composés sont plutôt associés à la surface de la membrane : ils interagissent de façon électrostatique ou sont liés covalentement à des lipides ou d'autres types d'ancres hydrophobes.

Pour les substances insolubles en milieu aqueux, l'incorporation n'est possible que dans l'espace interne, hydrophobe, de la bicouche. Ces composés sont associés soit par liaison chimique soit par interactions hydrophobes avec les chaînes alkyle des lipides [45-47]. Dans ce cas ces substances sont dissoutes et mélangées aux lipides en solvant organique et s'associent aux parties apolaires constituant l'intérieur de la membrane lors de la réhydratation. Les inconvénients majeurs de l'encapsulation de ces composés concernent les quantités encapsulées et la stabilité de cette insertion. En effet le volume disponible pour de telles substances est limité au volume interne de la membrane et est donc restreint. De plus les composés amphiphiles présentent un coefficient de partage entre les lipides et l'eau et certains ne seront pas retenus lors d'une dilution, par exemple lors d'une injection dans la circulation sanguine chez un être vivant.

La comparaison des différentes méthodes indique qu'à l'exception des cas particuliers des bases faibles et des interactions électrostatiques où les composés sont insérés ou associés à des vésicules déjà formées, l'encapsulation est très liée à l'étape de formation des liposomes. Pour des applications comme système de transport de composés thérapeutiques ou d'imagerie in vivo les liposomes doivent avoir une morphologie bien définie et subissent des étapes de traitements mécaniques, extrusion ou sonication qui induisent une équilibration des concentrations internes et externe des composés hydrophiles. La quantité de substances encapsulées est alors d'autant plus importante que la concentration en lipides est élevée car la somme des volumes internes (pour les composés hydrophiles) ou des espaces hydrophobes des bicouches (pour les composés apolaires) est alors plus importante.

La synthèse des liposomes permet donc d'obtenir des objets de morphologie variable et contrôlée, et de leur associer des composés pour les utiliser comme réservoir. Ces avantages, ajoutés au fait que les lipides sont pour la plupart biocompatibles, a conduit à les utiliser comme système de transport de composés thérapeutiques ou d'imagerie chez les êtres vivants. Mais le milieu biologique est un environnement qui a évolué en mettant en place des systèmes de défense contre l'intrusion d'éléments étrangers. Il en résulte un certain nombre de

contraintes quant à la formulation des vésicules, en particulier vis-à-vis de la taille ou de la composition chimique, pour l'utilisation des liposomes dans ce milieu hostile.

3 Les liposomes comme système de transport de composés thérapeutiques chez les êtres vivants.

Le problème des effets secondaires associés à certains médicaments a conduit à proposer l'utilisation de systèmes de transport de composés thérapeutiques. En effet, lors de son ingestion, un médicament se dilue dans tout l'organisme pour agir sur la zone à traiter mais peut parfois avoir des effets délétères non désirés en d'autres endroits. Une solution peut être d'associer ce composé à un système de transport pour éviter sa dilution et permettre l'acheminement du médicament à travers l'organisme jusqu'au site à traiter [48]. Le système de transport doit donc garder le composé encapsulé de façon stable, pour soit le protéger du milieu extérieur soit protéger le milieu biologique des effets nocifs du médicament [49]. Il doit aussi posséder une affinité pour une zone de l'organisme et rester le plus longtemps possible dans la circulation sanguine (dans le cas d'une injection autre que localisée) pour pouvoir atteindre sa cible. Enfin, une fois arrivé au niveau de la zone à traiter, il doit délivrer le médicament [50]. La possibilité d'encapsuler des composés, de contrôler la morphologie et les propriétés physicochimiques des vésicules ainsi que le caractère biocompatible des lipides ont conduit à utiliser les liposomes comme système de transport de médicaments dans les organismes vivants [51-54]. Dans ce milieu biologique, les caractéristiques des liposomes utilisés sont dictées par la nécessité de passer outre les différentes barrières de l'organisme. In vivo les liposomes sont dilués dans les fluides biologiques, dans lesquels un certain nombre de facteurs vont menacer l'intégrité des vésicules et la stabilité de l'encapsulation. Ces paramètres peuvent être évalués *in vitro*. D'autres facteurs, mis en place pour lutter contre les éléments étrangers, vont conduire à l'élimination des vésicules de la circulation ou de l'organisme et sont surtout évalués *in vivo*.

3.1 Comportement des liposomes dans les fluides biologiques

La mise en contact des liposomes avec les fluides biologiques a des conséquences sur la stabilité de l'encapsulation et sur la composition en lipides des vésicules. Les effets de ces fluides sur la stabilité des liposomes sont donc évalués en sérum c'est à dire dans un milieu

sans cellules. En effet, les interactions avec les cellules autres que les échanges de lipides (qui ont une influence sur le maintien d'une composition lipidique contrôlée [55]) sont l'adsorption, l'internalisation ou la fusion qui vont conduire à une élimination des liposomes de la circulation et non pas à une altération de leur intégrité. Les atteintes à l'intégrité des vésicules sont mises en évidence en général en suivant les pertes de composés encapsulés, dans un milieu contenant du sérum.

La déstabilisation des liposomes est essentiellement due à des interactions avec des protéines ou à des échanges de lipides. L'interaction avec les protéines peut être de nature électrostatique ou hydrophobe et conduire à l'adhésion des protéines à la surface des liposomes ou à leur pénétration à l'intérieur de la bicouche [56, 57]. Ces insertions ainsi que les échanges de lipides sont les phénomènes les plus délétères pour les liposomes. Les échanges de lipides ont lieu avec d'autres éléments possédant des monocouches ou des bicouches lipidiques c'est-à-dire les HDL (High density lipoprotein) ou les cellules. Ils peuvent être causés par la partition des molécules entre les membranes et le solvant, avoir lieu lors de collisions ou être dûs à une activité enzymatique. En effet, des protéines de transfert de phospholipides peuvent reconnaître les liposomes du fait de leur similarité avec les monocouches des lipoprotéines, HDL ou LDL (Low density lipoprotein), et être responsables de ce transfert.

Il apparaît que l'état physique de la membrane a une influence sur la stabilité. Plus la membrane est rigide et moins les pertes sont sévères. Les défauts dans la structure ou les limites entre deux phases membranaires permettent une pénétration plus facile des protéines. La stabilité est améliorée en utilisant des lipides à longues chaînes saturées, pour avoir un contact étroit entre lipides, en présence de cholestérol pour éviter la formation de phases gels constituées de domaines de membranes planes avec des discontinuités aux limites de ces domaines. Les échanges de lipides et les pénétrations des protéines dans les bicouches sont donc limités lorsque la membrane est en phase liquide-ordonnée. L'utilisation de lipides neutres permet en plus de limiter les interactions électrostatiques. Malgré cela les interactions avec les protéines ne peuvent être complètement évitées en particulier celles avec les opsonines. Cette classe particulière de protéines a peu d'influence *in vitro* mais est impliquée dans l'élimination des liposomes *in vivo*.

3.2. Le système immunitaire

L'élimination *in vivo* est parfois estimée *in vitro* en plaçant les liposomes avec des éléments du système immunitaire (macrophage, système du complément...) mais en général c'est la répartition des vésicules dans l'organisme à différents temps après injection qui est déterminée pour évaluer le comportement *in vivo*. L'administration de liposomes à un être vivant se fait soit directement au niveau d'un organe cible, dans le cas d'une injection localisée, soit dans la circulation sanguine. Le passage intraveineux a pour objectif la distribution des vésicules dans tout l'organisme en vue d'une accumulation au niveau d'une zone d'intérêt. Dans ces deux cas et plus particulièrement pour le passage intraveineux, les vésicules doivent avoir la durée de vie la plus longue possible pour avoir le temps d'atteindre leur cible. Or leur survie se trouve limitée par le système immunitaire de l'organisme, un système de défense complexe mis en place pour faire face à l'intrusion d'éléments étrangers. Les défenses de l'organisme sont principalement constituées de mécanismes impliquant soit des systèmes cellulaires et certaines classes de protéines soit des barrières physiques jouant le rôle de filtres. Les principaux systèmes cellulaires sont les cellules phagocytaires et les lymphocytes T et B. Les protéines impliquées sont surtout les anticorps et les protéines du complément.

Les lymphocytes et les anticorps sont impliqués dans la mise en œuvre de la réponse immunitaire spécifique d'un pathogène (un élément étranger à l'organisme) précis. Les lymphocytes T (LT) sont activés par des cellules phagocytaires qui présentent des antigènes, c'est à dire des molécules ou fragment de molécules spécifiques du pathogène. Les LT8 vont alors évoluer en LT cytolytiques (capables de lyser une cellule) et une grande partie des LT4 en LTH (Helper) qui vont activer les lymphocytes B (LB). Ces derniers vont se spécialiser en plasmocytes, des cellules qui vont produire et sécréter des anticorps spécifiques de l'antigène du pathogène.

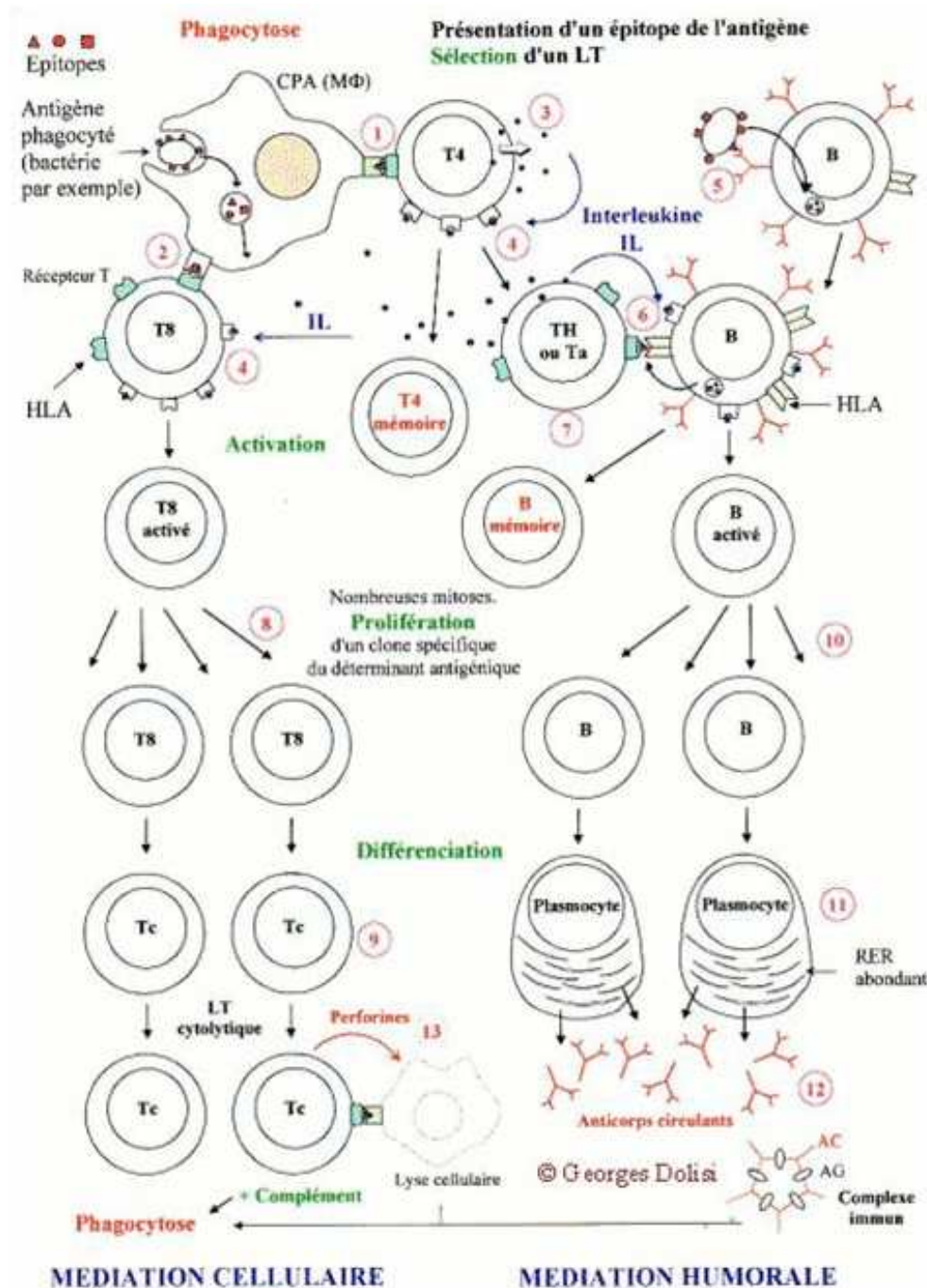


Figure I-13 : Réponse immunitaire impliquant les lymphocytes (http://www.medicopedia.net/Schemas/Reaction_immunitaire.gif).

Les anticorps sont des protéines en forme de Y constitués de deux chaînes lourdes (50kDa) et de deux chaînes légères (25kDa). Chaque chaîne légère est liée à une chaîne lourde par un pont disulfure et les chaînes lourdes sont liées entre elles par un pont disulfure également.

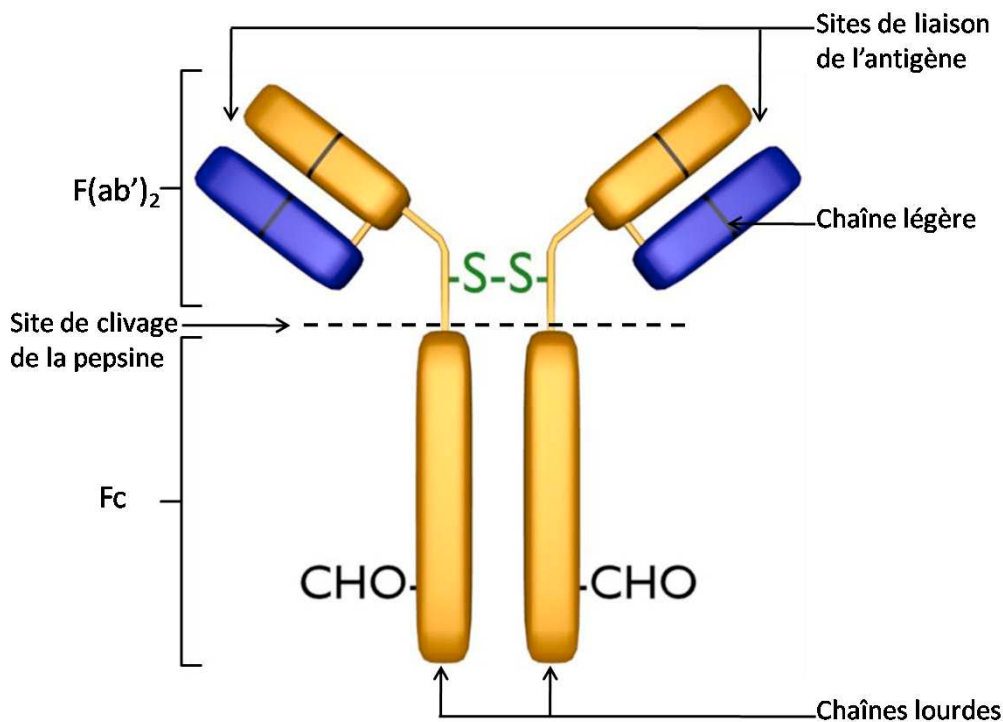


Figure I-14 : Représentation schématique d'une immunoglobuline (G).

Le site de reconnaissance de l'antigène est constitué de l'association d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère. L'interaction avec la cible est très spécifique et de haute affinité.

L'action d'une enzyme, la pepsine, donne deux types de fragments après coupure. Un fragment, le F(ab')₂ qui conserve la capacité à lier l'antigène et un autre, le Fc ou fragment cristallisable, nommé ainsi car il peut être cristallisé.

La fixation de l'anticorps sur sa cible peut conduire à la précipitation ou l'agglutination de l'élément pathogène, à l'activation de cascades de réactions impliquant le système du complément ou encore à une prise en charge du pathogène par les cellules phagocytaires.

Les cellules phagocytaires (du grec phagein, manger et kytos, cellule) sont des cellules impliquées dans l'ingestion et la dégradation des éléments pathogènes ainsi que dans la présentation des antigènes aux lymphocytes [58]. Les cellules phagocytaires comprennent les granulocytes et les macrophages. Ces derniers peuvent être circulants ou fixés. Les cellules phagocytaires circulantes sont trouvées dans le système sanguin et dans le liquide interstitiel qui baigne les cellules. Les macrophages fixés sont localisés dans le système lymphatique (thymus, rate, moelle, ganglions lymphatiques...) et dans le foie où ils sont nommés cellules de Kupffer. L'ensemble de ces cellules est couramment appelé RES (reticuloendothelial system) ou MPS (monocytic phagocytosis system). Les cellules phagocytaires se lient aux éléments pathogènes, les internalisent et éventuellement les digèrent mais n'agissent pas de

façon spécifique d'un pathogène. La reconnaissance des éléments à éliminer se fait par l'intermédiaire de substances reconnues par les macrophages appelées opsonines (du grec opsonein, -prépare pour manger).

Par définition les opsonines sont des molécules solubles qui, quand elles sont liées à des particules, amplifient la prise en charge par les cellules phagocytaires. Cette classe de molécule comprend des protéines impliquées dans les réactions immunitaires telles que les anticorps (reconnus par les macrophages au niveau du Fc), les protéines du complément et des protéines qui ne sont pas impliquées dans la défense de l'organisme mais dont l'interaction avec les liposomes conduira à la prise en charge par les phagocytes.

Le système du complément est un ensemble de protéines qui peuvent permettre une reconnaissance directe d'éléments étrangers et conduire à leur ingestion par les cellules phagocytaires [59-63]. Ils peuvent aussi être activés par liaison avec les anticorps et, quelque soit le mode de fixation sur le pathogène, peuvent conduire à une lyse de cellules pathogènes ou à une activation du système immunitaire. Les protéines n'appartenant pas au système immunitaire mais pouvant jouer le rôle d'opsonines sont notamment des apolipoprotéines, protéines associées au HDL, de la fetuin, une glycoprotéine, ou encore du facteur de von Willebrand, une protéine d'adhésion. [64]. Les macrophages reconnaissent aussi des lipides, les phosphatidylsérines, qui sont donc aussi des opsonines.

Le complément ainsi que les cellules phagocytaires sont aussi acteurs de l'inflammation, un autre type de réaction immunitaire. Après un stimulus inflammatoire (dans une zone autre que la circulation), une infection microbienne par exemple, la présence de toxines est détectée. Il en résulte une activation de protéines telles que celles du complément, une sécrétion de facteurs de stimulation et une dilatation des vaisseaux sanguins. Cette vasodilatation s'accompagne de la migration de cellules immunitaires, lymphocytes et macrophages, qui vont passer de la circulation sanguine vers la zone à traiter. Pour cela les cellules de la paroi des vaisseaux sanguins expriment des molécules d'adhésion telles que les I-CAM sur lesquelles se fixent les cellules immunitaires avant de traverser la paroi des vaisseaux.

Toutes ces réactions de défense de l'organisme impliquent donc des interactions coordonnées entre différents acteurs de l'immunité, phagocytes, lymphocytes, anticorps, système du complément... pour aboutir à des réactions peu spécifiques ou bien très ciblées. Ils mettent en jeu des systèmes protéiques et cellulaires pour réaliser des mécanismes actifs d'élimination.

Un autre mode de lutte contre les intrusions dans l'organisme met en jeu des mécanismes passifs. Les éléments ayant réussi à entrer dans l'organisme sont confrontés à des systèmes de filtration. Les objets de grande taille ($> 7\text{-}10\mu\text{m}$) sont retenus au niveau des fins capillaires de

l'organisme alors que ceux de petite taille ($< 70\text{nm}$) vont être éliminés de la circulation au niveau des reins ou du foie.

L'organisme possède donc un ensemble de systèmes, actif ou passif, spécifique ou non spécifique d'un type de pathogène, pour se défendre de l'intrusion d'élément étranger. Le système immunitaire contribue donc, et de façon très importante, à l'élimination de liposomes administrés à un organisme vivant. En effet pour apporter des liposomes au niveau d'une zone déterminée le moyen le plus simple est une injection intraveineuse qui sera suivie d'une accumulation au niveau de la zone cible après circulation dans le flux sanguin. Après injection, les vésicules se trouvent alors au contact des éléments du sang, protéines plasmatiques et éléments du système immunitaire.

3.3 Comportement des liposomes in vivo

L'entrée des liposomes dans le milieu sanguin s'accompagne d'une altération de la stabilité des vésicules ainsi que d'une prise en charge par le système immunitaire, des effets qui peuvent être en partie limités grâce à une composition lipidique appropriée. Lors de cette entrée il y a deux réactions prédominantes : interaction avec les lipoprotéines du sang et avec les opsonines. Le premier type de réaction implique un échange de lipides et une désintégration possible des liposomes alors que le second type implique adsorption, intercalation ou fixation électrostatique de molécules marqueurs (anticorps, fixés de façon spécifique ou aspécifique, protéines du complément...) qui, après interaction avec un récepteur situé sur un macrophage, conduit à une élimination des liposomes du flux sanguin [65]. Les macrophages sont essentiellement les cellules de Kupfer ce qui explique que la majorité des liposomes terminent leur course dans le foie. De plus les filtres de l'organisme vont éliminer les liposomes trop petits ($< 70\text{nm}$) ou retenir ceux qui sont trop grands ($> 7\text{ }\mu\text{m}$).

Des formulations de liposomes ont donc été mises au point pour augmenter la durée de vie en tenant compte des impératifs de *l'in vivo* [66]. L'interaction avec les protéines du plasma dépend de l'état physique de la membrane ainsi que de la charge de surface. Pour augmenter la durée de vie des liposomes la membrane doit être en phase liquide-ordonnée, c'est-à-dire la plus rigide possible sans être en phase gel, et ne pas présenter de charges en surface. Les lipides utilisés sont alors des lipides neutres avec de longues chaînes d'acides gras saturés associés avec du cholestérol [67]. De plus les liposomes circulent d'autant plus longtemps qu'ils sont petits. La taille doit donc être la plus faible possible mais supérieure à 70nm pour

éviter d'être éliminé par filtration. Une composition lipidique et une taille appropriées permettent d'obtenir un temps de circulation de une heure ou plus pour des liposomes petits, neutres et rigides. Ce temps est donc nettement supérieur aux quelques minutes observé pour des liposomes fluides et chargés négativement. Néanmoins tous ces impératifs sur la rigidité, la taille et même la charge peuvent être dépassés grâce à l'utilisation de lipides dont la tête polaire est liée à un polymère, le polyéthylèneglycol ou PEG [68]. Les temps de demi-vie des liposomes ainsi obtenus, appelés Stealth® liposome (liposome furtif) ou Sterically stabilized liposome (liposomes stabilisés de façon stérique), peuvent aller jusqu'à une dizaine d'heures.

3.4 Stealth liposomes

L'augmentation importante de la durée de vie des liposomes in vivo obtenue par l'addition de lipides-PEG est due à la formation d'une barrière stérique qui permet de limiter les interactions de la membrane des vésicules avec les éléments du sang et du système immunitaire [69]. Les premières tentatives de couverture de la surface ont été réalisées avec des glycolipides, tels que les gangliosides G_{M1} , ou des lipides inositol [70]. Ces formulations permettent d'obtenir des temps de demi-vie allant jusqu'à dix heures mais conservent les impératifs de taille, rigidité membranaire et absence de charges de surface. L'utilisation de lipides dont la tête polaire est modifiée par greffage de PEG permet d'augmenter le temps de survie dans la circulation et ceci même si la membrane est en phase fluide ou n'est pas électriquement neutre [71-76]. Le PEG est un polymère qui est greffé de façon simple sur des PE. Le lipide modifié qui en résulte a une tête polaire volumineuse, ce qui influence la quantité de lipides PEG qui peut être insérée dans la membrane. La quantité de ce lipide associé à la membrane conditionne quant à elle la conformation du polymère. Utilisé dans des proportions appropriées il permet une protection de la membrane et une augmentation du temps de circulation dans le flux sanguin qui peut être mise à profit pour cibler certaines zones de l'organisme.

Le PEG est un polymère constitué par la répétition d'unités éthylène oxyde $-(CH_2-CH_2-O)_n-$. Il est inerte chimiquement et soluble dans l'eau. Il est en général associé aux liposomes grâce à un greffage covalent à des lipides qui l'ancrent à la membrane. Une façon simple de réaliser ce couplage est de lier le PEG au NH_2 terminal d'une PE [73, 77]. Une extrémité de la molécule de PEG est alors terminée par un acide carboxylique, activée par du NHS. Lors du couplage il y a élimination du NHS et formation d'une liaison $-CO-NH-$.

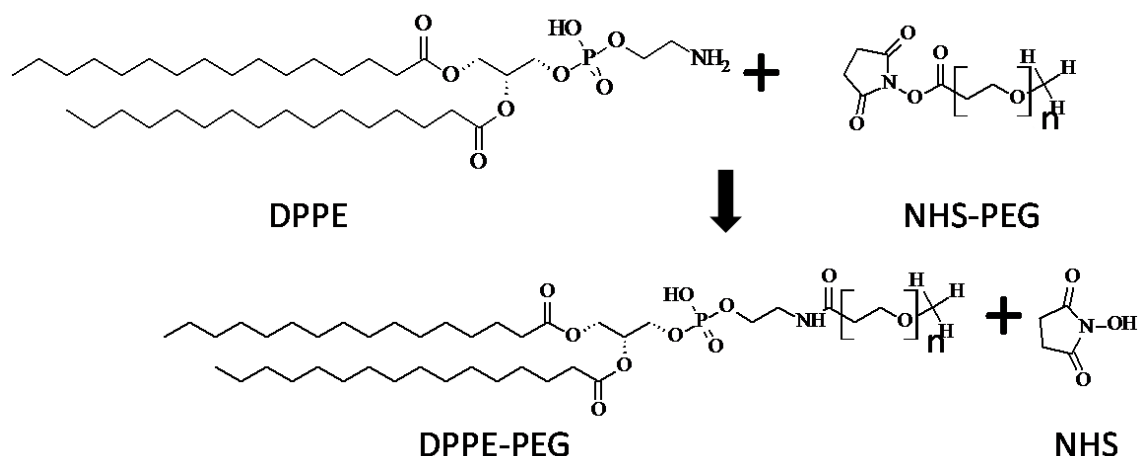


Figure I-15 : Synthèse de lipide PEG par greffage d'un PEG sur l'amine d'une PE (n correspond au nombre de répétition de l'unité oxyde d'éthylène).

Les PEG les plus utilisés ont des masses de 750 g/mole, 2000 g/mole ou 5000 g/mole ce qui correspond à un nombre d'unité éthylène oxyde $n = 16, 45$ et 113 respectivement. Le lipide résultant a une tête polaire volumineuse et la géométrie qui en résulte est celle d'un cône inverse. Ces lipides PEG se comportent donc comme des détergents. Ils présentent une CMC, de l'ordre du μM [78, 79] au delà de laquelle ils forment des micelles. Plus la chaîne de PEG, hydrophile, est grande (ou plus les chaînes hydrophobes sont courtes) et plus la CMC est élevée. Cette tendance à se comporter comme un détergent a des conséquences sur la quantité de lipides PEG qui peut être associée à la membrane.

Lorsque des mélanges de lipides sont réalisés avec des quantités croissantes de lipides-PEG, différents types de structures sont formés. A faible quantité il y a formation de liposomes avec les lipides PEG insérés dans les membranes. Au-dessus d'une certaine concentration il y a coexistence de liposome-PEG et de micelles et enfin au delà d'une deuxième concentration seuil il n'y a plus que des micelles de lipides PEG dans lesquelles sont dissouts les lipides [80-89].

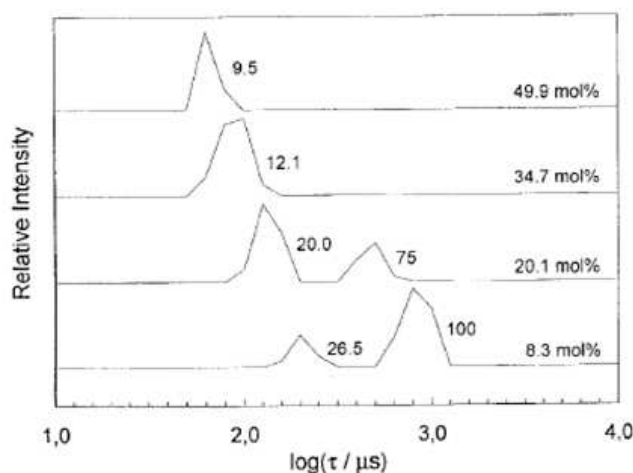


Figure I-16 : Pics de diffusion dynamique de la lumière : temps de corrélation obtenus pour des vésicules DPPC / DPPE PEG 5000. Le pourcentage de lipides-PEG est indiqué sur la droite et le rayon hydrodynamique est indiqué à coté de chaque pic (en nm) [80].

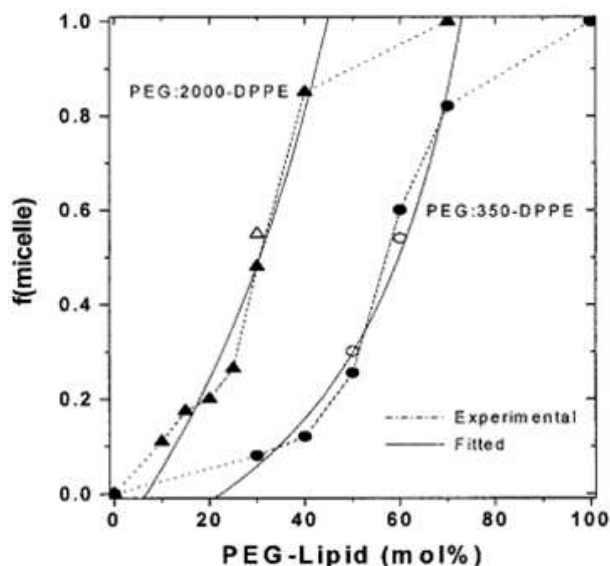


Figure I-17 : Fraction de lipides PEG sous forme de micelles en fonction de la proportion de lipides PEG pour des mélanges DPPC / PE-PEG350 (cercles pleins) ou DPPC / PEG 2000 (triangles pleins). [85].

La proportion de lipides PEG au-delà de laquelle il y a micellisation est fonction de la taille des PEG et des chaînes hydrophobes. Pour du DPPE-PEG (chaîne hydrophobe à 16 carbones) ces valeurs sont d'environ 20%, 6% et 3% pour des PEG 750, 2000 et 5000 respectivement. Lors de la formulation des liposomes, les proportions utilisées sont donc inférieures à ces valeurs-seuil.

La quantité de lipides-PEG présents dans la membrane a quant à elle une influence sur la conformation des chaînes de PEG. Il existe deux types de conformation : champignon (mushroom) et brosse (brush) [82, 90-94].

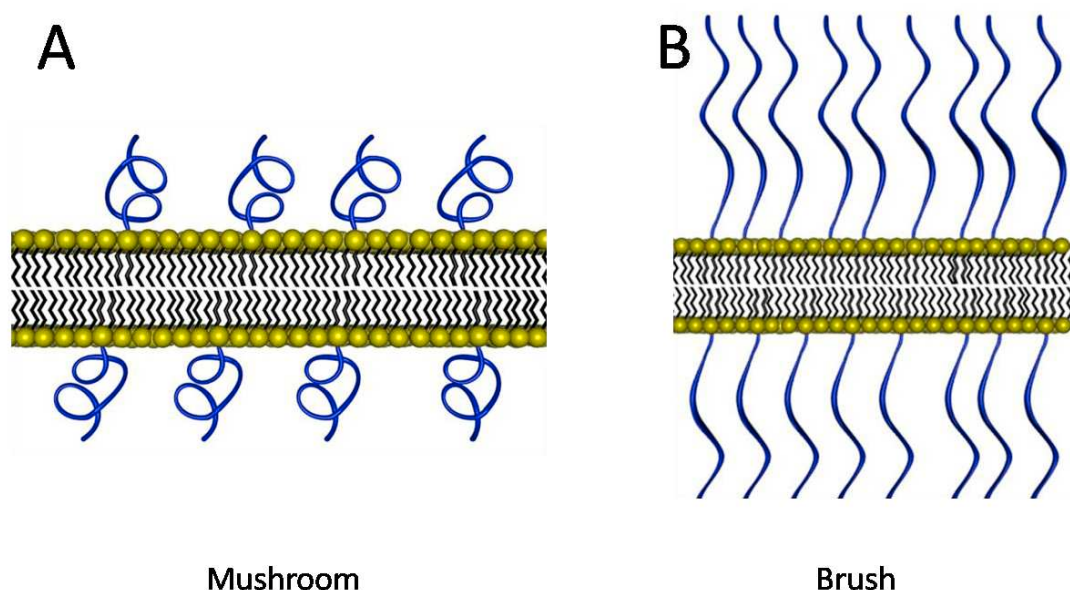


Figure I-18 : Représentation schématique des conformations “mushroom” et “brush” des PEG.

A faible densité de lipides-PEG, les molécules de polymère qui sont très flexibles ne sont pas gênées par les molécules voisines et adoptent une conformation libre et aléatoire. La forme générale ressemble alors à un champignon. Pour des densités de PEG plus élevées, les chaînes de polymère vont interagir entre elles et, du fait de cette gêne stérique, adopter une conformation étendue dite brosse. Cette transition est fonction de la densité de lipides PEG et de la taille du polymère (figure 19).

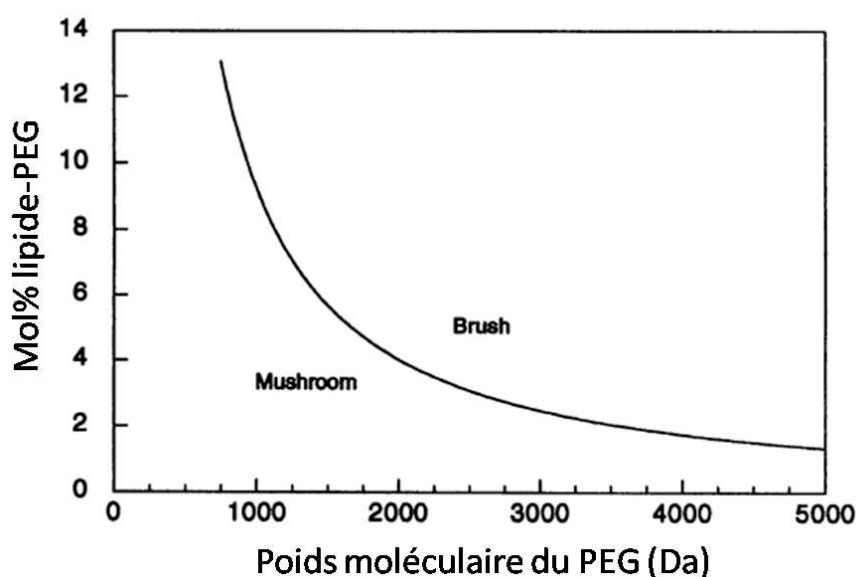


Figure I-19 : Conformation du PEG en fonction de la taille du polymère et de la quantité de lipides PEG présents dans la membrane (Kenworthy et al. 1995, biophysical journal).

La concentration en lipides-PEG a donc une influence sur la conformation du polymère et sur son insertion dans la membrane. A faible concentration les lipides PEG sont associés aux liposomes et le polymère est en conformation champignon. L'augmentation de la concentration conduit au passage des PEG en conformation brosse puis à une répartition des lipides-PEG entre la membrane des liposomes et des micelles de lipides-PEG. Les hautes concentrations en lipides-PEG conduisent à une dissolution des liposomes dans les micelles. Les lipides-PEG sont donc utilisés dans des proportions telles qu'il n'y ait pas formation de micelles. Le polymère forme alors une couche en surface de la membrane qui va protéger les vecteurs d'une élimination rapide du flux sanguin.

L'augmentation de la durée de vie des liposomes est en général expliquée par une diminution des interactions avec les éléments du milieu environnant, en particulier ceux du milieu sanguin [95, 96]. La couche de PEG limite l'accessibilité et donc l'association des protéines du sang, et notamment des opsonines, avec la membrane des vésicules. Le polymère en surface permet aussi une répulsion stérique des liposomes avec les récepteurs membranaires situés à la surface des macrophages. Malgré cette protection stérique, des protéines du sang peuvent s'associer à la membrane et, après un certain temps, les vecteurs sont éliminés de la circulation. Des demi-vies de 2 à 24 heures ont été observées chez la souris et chez le rat [95, 97-99]. Ces durées de circulations élevées sont une condition nécessaire pour permettre l'accumulation au niveau de la zone de ciblage des liposomes.

Les petites tailles et un temps de circulation élevé sont des caractéristiques qui suffisent pour conférer aux liposomes une affinité pour les zones présentant un endothélium lâche. A certains endroits, les cellules de la paroi des vaisseaux sanguins sont moins jointives ce qui permet le passage de gros objets par diffusion à travers les pores ainsi formés dans l'épithélium [100-103]. C'est donc l'augmentation du temps de circulation qui permet une accumulation progressive par diffusion aléatoire des vésicules au cours des différents passages au niveau des zones présentant un épithélium lâche. Ce ciblage passif est nommé EPR (enhanced permeability and retention effect, effet de perméabilité et rétention augmentée) car les particules peuvent traverser l'épithélium mais aussi s'accumuler dans le compartiment situé de l'autre côté du vaisseau. Ce phénomène s'observe dans les zones d'infection, d'inflammation mais surtout dans les tumeurs solides [104]. Dans ce cas l'épithélium est perméabilisé pour maintenir un approvisionnement important en nutriment et permettre ainsi une croissance rapide de la tumeur. La taille de ces pores est comprise entre 380 et 780nm [105, 106] ce qui implique une contrainte sur la taille des objets qui pourront s'accumuler au niveau de ces cibles [107].

Les lipides-PEG sont donc suffisants pour permettre un ciblage dit passif, comme dans le cas de l'EPR pour cibler des zones de tumeur, d'inflammation ou des organes d'excrétion, mais dans les autres cas le ciblage doit être actif c'est-à-dire qu'il nécessite l'addition d'un élément d'adressage.

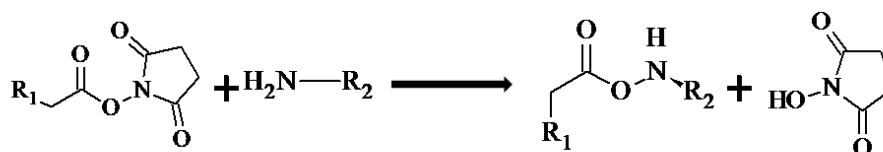
4 Adressage des liposomes grâce à l'addition de ligands.

Le vecteur de composés thérapeutiques idéal doit non seulement transporter le médicament mais aussi l'amener de façon sélective jusqu'aux cellules à traiter. Des procédures ont donc été développées afin de conférer aux liposomes une spécificité pour certaines zones de l'organisme. Elles consistent, dans le cas du ciblage dit actif, à associer à la surface des membranes un composé ou ligand, spécifique d'un type de cellules [108]. Dans la quasi-totalité des cas le ligand est lié de façon covalente sur la tête polaire d'un lipide qui est soit constitutif du liposome soit inséré ultérieurement dans la membrane. Si cette molécule associée aux vésicules peut être le ligand naturel d'un récepteur cellulaire, l'élément d'adressage est le plus souvent un anticorps sélectionné, dirigé contre une cible choisie.

4.1 Couplage du ligand aux lipides

Le ciblage nécessite une association forte de l'élément d'adressage au liposome qui est obtenu par greffage du ligand sur un lipide. Dans un premier temps la sélectivité pour une cible était obtenue par adsorption d'anticorps à la surface des liposomes de façon non spécifique, via des interactions hydrophobes ou électrostatiques [109]. Ces procédures étant peu reproductibles et difficiles à appliquer à de petites molécules, des techniques de conjugaison ont été développées. Une ancre hydrophobe est en général ajoutée au ligand pour permettre son association au liposome. Il s'agit la plupart du temps d'un lipide constitutif de la membrane. La liaison entre un lipide et un ligand nécessite alors l'introduction sur les lipides et / ou sur les ligands de groupements chimiques ou de fonctions permettant une liaison covalente ou d'affinité [110].

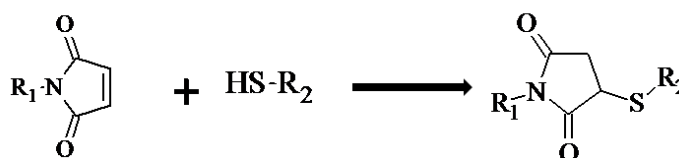
Les méthodes de conjugaison sont basées sur trois réactions principales qui sont efficaces et sélectives : réaction entre un acide carboxylique activé et une amine qui donne une liaison amide, réaction entre un pyridyldithiol et un thiol pour former un pont dissulfure et réaction entre un maleimide et un thiol pour réaliser une liaison thioéther [111-115].



Réaction d'un acide carboxylique activé par un NHS, avec une amine



Réaction d'un pyridyldithiol avec un thiol



Réaction d'un maleimide avec un thiol

Figure I-20 : Principales réactions chimiques utilisées pour réaliser le couplage ligand-lipide. R₁ et R₂ peuvent être un lipide ou un ligand.

D'autres groupements chimiques sont parfois utilisés tels que des hydrazides qui se lient sur des sucres oxydés, présents notamment sur le Fc des anticorps.

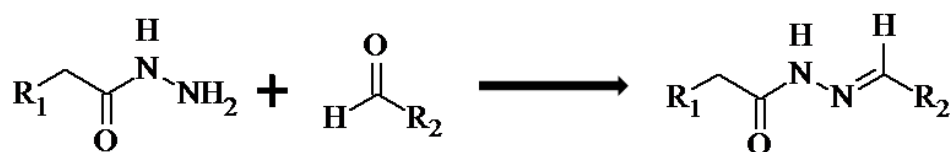


Figure I-21 : Réaction d'une hydrazide avec un aldéhyde (en général un sucre oxydé) [111].

Des interactions non covalentes mais de très haute affinité peuvent aussi être choisies pour associer un ligand à un lipide. C'est le cas notamment des interactions entre la streptavidine et la biotine ou entre la protéine A et un anticorps [116].

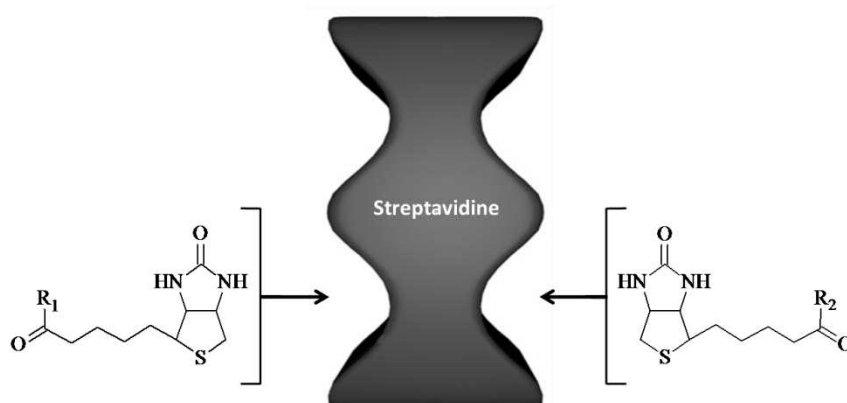


Figure I-22 : Réaction biotine streptavidine. La streptavidine sert d'intermédiaire pour associer deux éléments liés à de la biotine. R_1 et R_2 peuvent être un lipide ou un ligand.

Lorsqu'une des fonctions nécessaire pour le couplage n'est pas présente, elle est ajoutée grâce à des linkers bifonctionnels c'est-à-dire possédant deux fonctions chimiques séparées par un espaceur. Pour des ligands protéiques, et en particulier des anticorps, les linkers sont liés à des amines ou parfois à des thiols.

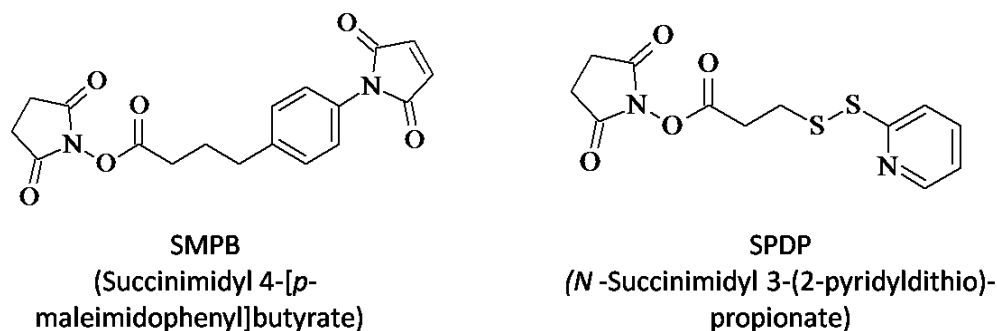


Figure I-23 : Exemples de réactifs bifonctionnels.

Dans le cas des lipides, la PE est le plus souvent utilisée car elle présente une amine sur laquelle peut être lié un acide carboxylique activé. Lorsqu'il faut utiliser un linker, l'espaceur est en général un PEG de grande taille. En effet la couche de PEG ajoutée en surface du liposome pour permettre une prolongation de la durée de vie dans l'organisme peut masquer un ligand lié au niveau de la membrane [117, 118]. Pour éviter cette gêne stérique les fonctions permettant d'attacher les éléments de ciblage sont situées à l'extrémité d'un PEG de façon à exposer les ligands au-delà de la couche de polymère. L'addition de PEG fonctionnalisé sur un lipide est réalisée en général en solvant et le lipide résultant est ainsi conditionné prêt à l'emploi.

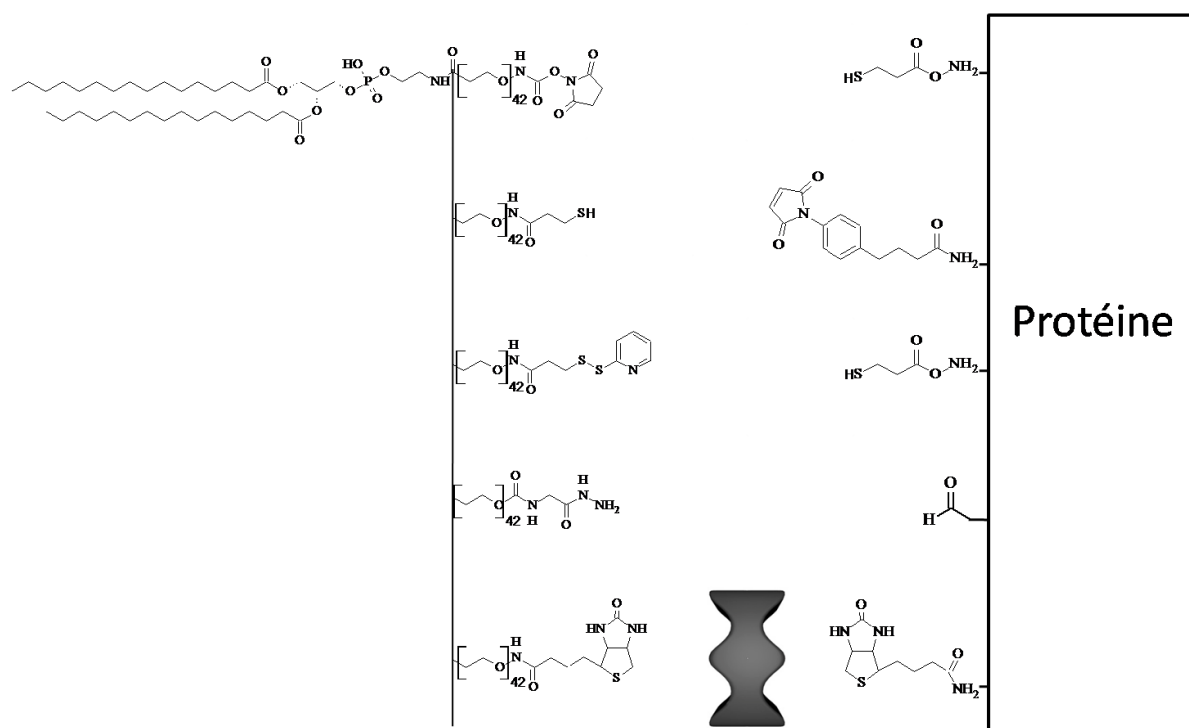


Figure I-24 : Schéma de quelques réactions utilisées pour lier une protéine sur un lipide : de haut en bas : réaction maleimide-thiol ; thiol-maleimide ; hydrazine-aldéhyde ; biotine-streptavidine-biotine.

Les différentes procédures de couplage permettent donc une liaison covalente ou de très forte affinité entre un ligand et un lipide modifié. Ce dernier permet d'ancrer l'élément d'adressage dans la membrane et ainsi d'associer le ligand au liposome. De même qu'il existe plusieurs manières de lier un ligand à un lipide, il existe différentes façons d'associer les ligands aux vésicules selon les séquences d'insertion du lipide dans les vésicules et de couplage du ligand avec son lipide.

4.2 Association du ligand aux liposomes

Trois modes d'association ligand –liposome peuvent être distingués : liaison du ligand sur les vésicules, liaison du ligand sur un lipide puis insertion dans des vésicules préformées ou mélange des lipides-ligand aux lipides en solvant organique et synthèse des liposomes. La procédure la plus utilisée consiste à lier le ligand à des vésicules préalablement synthétisées. Elles possèdent dans leur membrane un lipide qui expose à la surface de la membrane un groupement permettant la liaison. L'élément d'adressage est donc couplé à un lipide initialement présent dans la membrane des vésicules. Une alternative à cette procédure est de lier le ligand à un lipide qui sera ensuite associé aux vésicules. Cette technique dite de post-insertion consiste à lier l'élément de ciblage à des micelles de lipides-PEG. Ces micelles fonctionnalisées sont ensuite incubées avec des liposomes préformés. Les lipides-PEG-ligand sont alors échangés des micelles vers la membrane des liposomes dans laquelle ils s'insèrent [119-122].

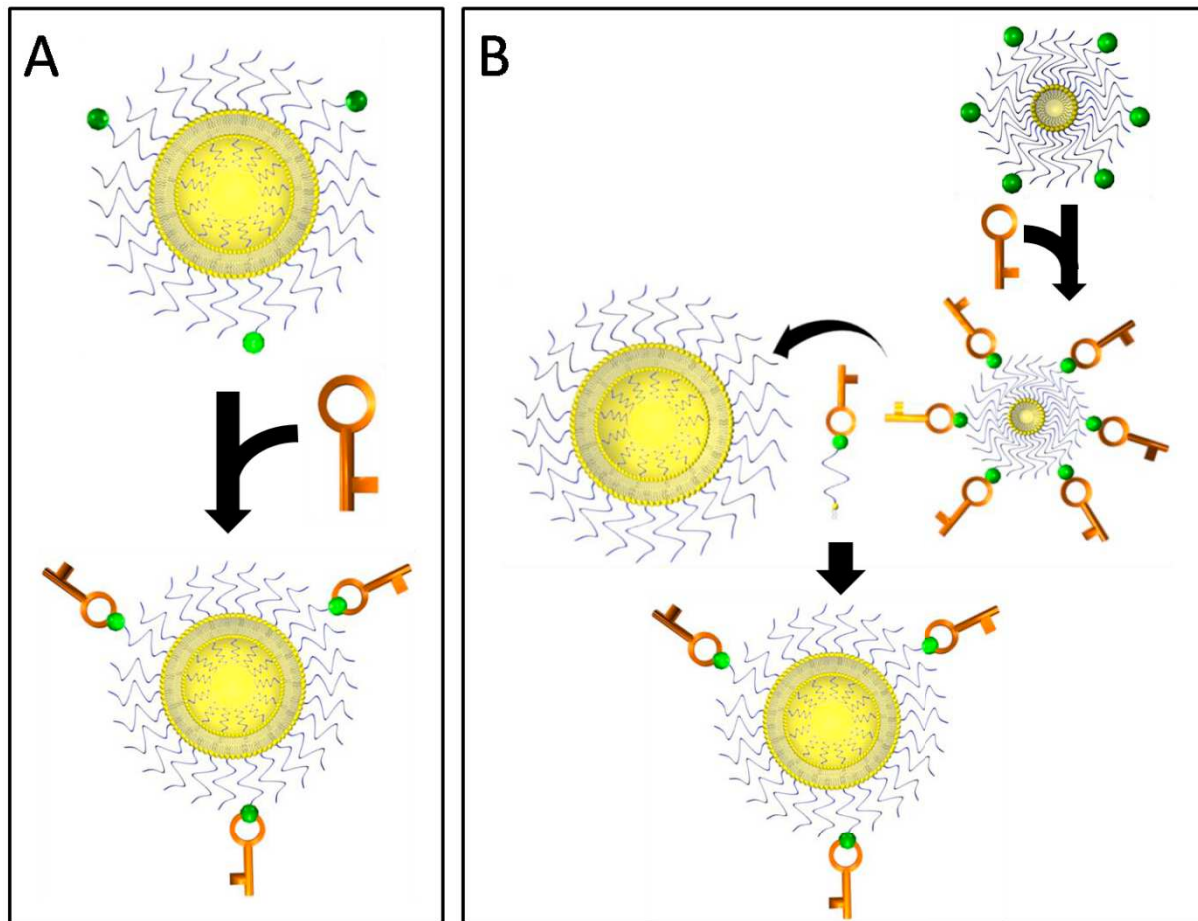


Figure I-25 : Association d'un élément d'adressage sur un liposome A) greffage sur un lipide constitutif d'un liposome préformé B) post insertion : couplage du ligand sur des micelles de lipides-PEG et transfert de ces lipides fonctionnalisés sur des liposomes.

Pour de petites molécules qui sont solubles et conservent la propriété de reconnaissance de leur cible en solvant organique, le couplage sur un lipide peut être réalisé dans un tel milieu. Les lipides fonctionnalisés peuvent ensuite être dissous en solvant organique avec les autres lipides pour réaliser la synthèse des liposomes. [123].

Dans le cadre de l'association de l'élément de ciblage aux vecteurs le cas des protéines membranaire peut être mentionné. Il s'agit le plus souvent de protéines virales et les liposomes incorporant de telles protéines sont appelés virosomes. Ces éléments de ciblage sont associés aux vésicules au cours de leur formation.

Il existe donc différentes procédures de couplage pour associer un ligand aux liposomes. Le choix d'une méthode de liaison est influencé par la nature du ligand sélectionné et est fonction de contraintes relatives à la quantité et à la nature des fonctions chimiques disponibles.

4.3 Les ligands utilisés

Les ligands sont initialement choisis pour leur capacité à se lier à des récepteurs ou des antigènes accessibles depuis la circulation, et exprimés soit uniquement au niveau des cellules à cibler soit surexprimés au niveau des cellules-cibles. Ces récepteurs doivent être présents en quantité importante et éventuellement permettre l'internalisation des vecteurs. Les ligands les plus utilisés sont les anticorps et les éléments de ciblage peuvent alors être distingués selon qu'ils sont des anticorps et dérivés d'anticorps ou des molécules non-anticorps.

4.3.1 Les ligands autres que les anticorps

Les ligands non-anticorps sont en général plus petits que les anticorps et plus faciles à manipuler. Il s'agit surtout de ligands connus de certains récepteurs comme le folate ou la transferrine qui se lient à leur propre récepteur, de peptides tel que le RGD [124] qui se lie aux intégrines, de sucres comme les selectines qui interagissent avec des molécules d'adhésion [125], ou d'oligonucléotides tels que les aptamères. Exceptés les aptamères, ces ligands (folate, transferrine RGD, selectine) ciblent des récepteurs surexprimés par les cellules dans certaines conditions telles que l'inflammation (selectine), l'activation plaquettaire (RGD) mais surtout les cas de tumeur (folate; transferrine, RGD). L'utilisation de ces ligands est limitée par le fait que les récepteurs ciblés sont surexprimés dans les conditions pathologiques mais sont aussi présents sur des cellules saines.

Dans le cas de cibles pour lesquelles aucun ligand n'est connu et en particulier pour les cibles spécifiques d'une zone pathologique, il est possible de créer les éléments de ciblage appropriés. Il s'agit, pour de petites molécules autres que les anticorps, des aptamères et de peptides. Les aptamères sont des oligonucléotides synthétiques qui peuvent potentiellement reconnaître toutes les cibles existantes [126-128]. Ils sont obtenus par la combinaison au hasard de nucléotides suivie d'une sélection basée sur leur capacité à reconnaître une cible déterminée. Dans le cas de peptides une technique de phage display permet aussi de créer des ligands pour des cibles d'intérêt. Des séquences peptidiques sont générées de façon aléatoire et exprimées à la surface d'un phage. La sélection de peptides d'intérêt s'effectue ensuite sur un type cellulaire ou un tissu cible [129-134]. Tous ces peptides, aptamères ou ligands de récepteurs sont de petites molécules qui ne présentent en général qu'un seul site de couplage placé en une position choisie pour la liaison sur un lipide. Cette caractéristique permet une conjugaison simple et une orientation correcte de l'élément d'adressage

4.3.2 Les anticorps et leurs dérivés

Les ligands les plus utilisés sont les anticorps et leurs dérivés, des fragments d'anticorps, utilisés pour s'affranchir de problèmes de couplage ou d'élimination par le système immunitaire [52, 135-139]. Les anticorps sont utilisés comme élément de ciblage car ils présentent de hautes affinités et spécificités pour tout type d'antigène, ils sont biocompatibles et possèdent une structure commune permettant d'utiliser des procédures de couplages chimiques semblables [140-142]. Ces procédures de couplage sont celles appliquées aux protéines, c'est à dire des molécules présentant un ou plusieurs groupements utilisés couramment en chimie organique tels que des amines, des thiols ou encore des acides carboxyliques. Le couplage le plus simple implique l'utilisation des amines disponibles. Elles sont souvent liées à un linker de façon à présenter un autre type de groupement chimique ou d'affinité. Les amines étant distribuées de façon aléatoire dans la protéine, la conjugaison peut avoir lieu à proximité ou dans le site de reconnaissance de l'antigène. Les conséquences de cette répartition peuvent être une mauvaise orientation de la molécule et / ou la perte de la reconnaissance de la cible. Pour obtenir une orientation correcte il est possible de lier les lipides sur les sucres de l'anticorps situés sur le Fc ou de lier les liposomes à la protéine A qui peut interagir ensuite par affinité avec le Fc. La présence de plusieurs amines par protéines peut aussi conduire, dans le cas de certains linkers, à la liaison des anticorps entre eux et / ou à la liaison de plusieurs liposomes par chaque anticorps ce qui entraîne le pontage et

l'agrégation des vésicules. Les problèmes d'agrégation peuvent être limités en plaçant les lipides portant un groupement pour le couplage en excès par rapport au ligand. Enfin le Fc est reconnu par les macrophages avec pour conséquence une élimination des liposomes de l'organisme. Pour limiter ces problèmes d'orientation de couplage ou de reconnaissance par les macrophages des fragments d'anticorps ont été utilisés.

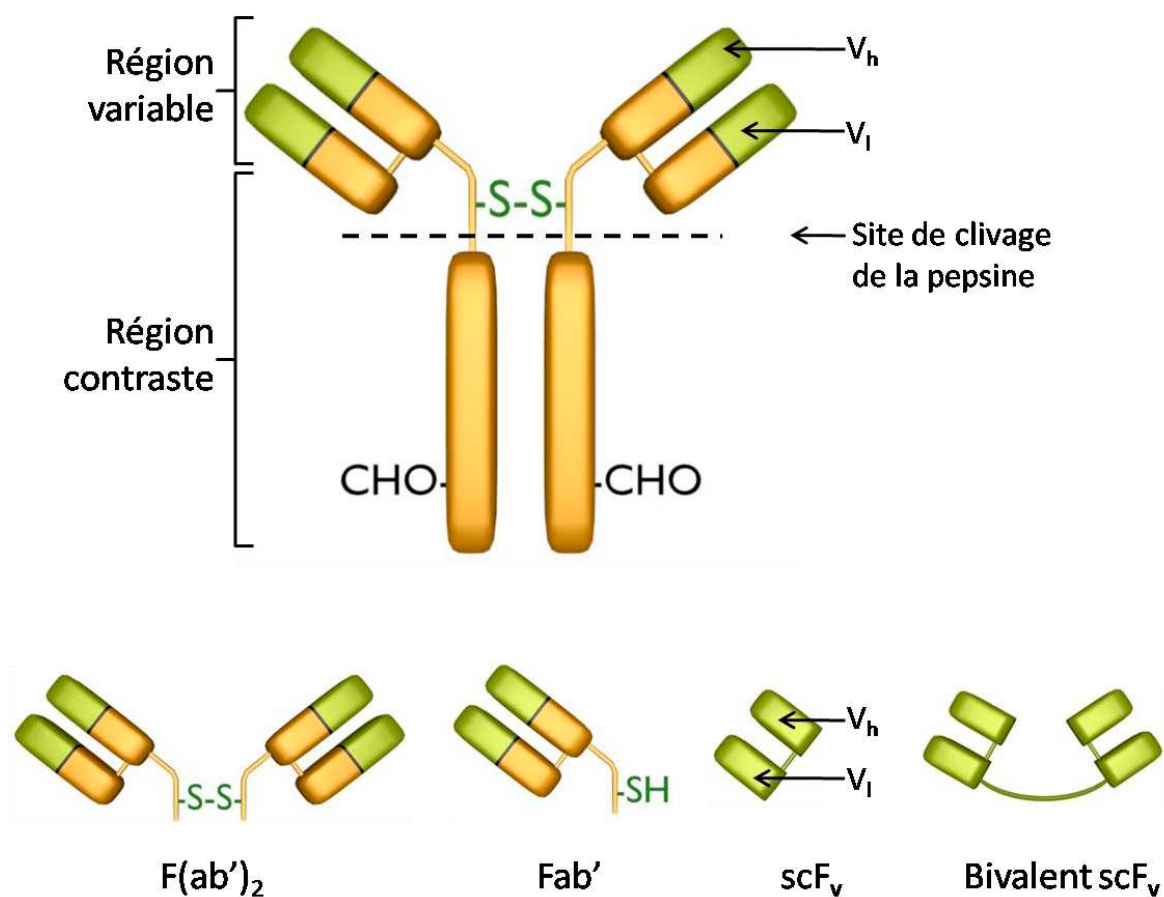


Figure I-26: Anticorps et fragment d'anticorps utilisés comme éléments d'adressages[52].

L'action d'une enzyme, la papaïne, permet d'obtenir un Fab'_2 qui après coupure du pont disulfure donne un Fab' exposant un thiol unique disponible pour le couplage.

Comme pour les aptamères il est possible d'obtenir des dérivés d'anticorps, les scF_v , dirigés contre des cibles pour lesquelles il n'en existe pas. Ces scF_v sont obtenus par phage display. Les zones impliquées dans la liaison de l'antigène sont modifiées de façon aléatoire et les scF_v sont exprimés en surface des phages. Ils sont ensuite sélectionnés en fonction de leur capacité à se lier à un tissu-cible et donc éventuellement à des récepteurs encore inconnus. Il est donc possible d'obtenir des fragments d'anticorps pour des cibles qui ne sont pas encore identifiées. A partir des scF_v un anticorps complet peut éventuellement être reconstitué via des procédures complexes.

La conception de liposomes possédant une affinité pour certains types cellulaires est donc possible par association de ligands en surface des vésicules. Un certain nombre de molécules spécifiques d'un type cellulaire ou d'une pathologie a été déterminé et des procédures de couplage covalent ou de liaison par affinité ont été mises au point pour les associer aux liposomes. Les vésicules ciblées ainsi obtenues peuvent se lier aux cellules cibles et même être internalisées si le récepteur ciblé le permet.

5 Libération contrôlée des composés encapsulés

Des systèmes de libération contrôlés ont été développés. En réponse à un stimulus spécifique de certaines pathologies ou appliqué de l'extérieur au niveau de la zone à traiter, les vésicules vont délivrer le composé encapsulé [143, 144].

Les deux types de stimuli les plus utilisés pour induire la libération de composés encapsulés sont les diminutions de pH et les variations de température. Les diminutions de pH sont observées dans des zones de tumeurs, d'infarctus ou d'inflammation dans lesquelles le pH est d'environ 6 mais surtout dans les endosomes et lysosomes, c'est à dire dans les compartiments à l'intérieur desquelles les liposomes sont internalisés dans la cellule et où le pH descend jusqu'à 4. Les vésicules sont constituées de PE et d'un lipide sensible au pH. Du fait de leur forme de cône les PE ne forment pas de membranes. Pour obtenir des membranes, un lipide de type cône inverse est ajouté aux PE et la complémentarité de forme permet l'organisation en bicouche lipidique. Lors de la diminution du pH le lipide pH-sensible change de géométrie et les vésicules se déstabilisent par fusion avec d'autres membranes. Les lipides pH sensibles peuvent posséder un groupement acide carboxylique qui se protone à faible pH ou une liaison chimique qui s'hydrolyse à des pH même faiblement acides. Des peptides sensibles au pH ou des polymères peuvent aussi être utilisés.[145-149].

Les liposomes thermosensibles libèrent leur contenu en réponse à une augmentation de température. Les élévations de température sont une des caractéristiques des zones d'inflammation mais elles peuvent être obtenues en chauffant une zone grâce à des stimuli externes tels que des ultrasons. La thermosensibilité repose sur l'utilisation de lipides avec une transition de phase bien marquée ou de polymères en mélange avec d'autres lipides [150-156]. Dans le premier cas la libération est obtenue en amenant la vésicule à la température de transition de phase T_m . A T_m la membrane devient perméable du fait de la coexistence des

phases gel et fluides et des irrégularités à la limite entre ces phases. La DPPC est le lipide le plus utilisé car sa T_m est de 41°C soit très proche des 37°C physiologiques. Les polymères choisis sont solubles en dessous d'une température seuil et précipitent au dessus. Lors de leur précipitation ils déstabilisent la membrane ce qui permet la libération du composé encapsulé. [144. Le plus utilisé est le poly(N-isopropylacrylamide) (NIPAM) {Kono, 2002 #360}.

Ces méthodes de libération nécessitent soit des conditions de milieu particulières soit de localiser au préalable la zone à traiter pour y appliquer un stimulus déclenchant la libération. Ces modes de délivrance ne sont donc qu'une étape vers le vecteur modèle capable de fusionner avec la cellule cible après s'y être lié mais permettent des traitements bien plus efficaces qu'une libération par diffusion passive. Elles ne permettent d'éviter la dilution du composé dans le milieu extérieur que si les liposomes sont internalisés, ce qui dépend du récepteur ciblé. Les ligands permettant l'internalisation sont donc sélectionnés en priorité lors de la formulation des liposomes.

6 Formulation des liposomes

Les diversités de morphologies et de compositions membranaires permettent la synthèse d'une grande variété de liposomes parmi lesquels le choix d'une formulation sera fonction de l'application envisagée. Dans le cas de l'utilisation comme système de transport ou d'imagerie dans les organismes vivants ce sont les contraintes liées à la furtivité des vésicules, à l'association avec un élément d'adressage et à la libération des composés qui vont déterminer les caractéristiques des liposomes utilisés.

L'impératif de furtivité des vecteurs vis-à-vis des systèmes de défense de l'organisme implique des contraintes sur la taille des objets, sur la charge et la rigidité membranaire et sur l'utilisation de lipides-PEG. La taille doit être la plus petite possible mais au dessus de 70 nm pour ne pas être éliminés par filtration. Un diamètre au alentour de 100nm semble être un optimum ce qui implique une étape de calibration des vésicules par extrusion (passages répétés à travers une membrane de pores calibrés). Les interactions avec les éléments de l'organisme, qui conduisent à une perte de composés encapsulés, à des échanges de lipides ou à une élimination de la circulation sont limitées par l'absence de charges de surface, une membrane en phase liquide-ordonnée et surtout l'utilisation de lipides-PEG. Les lipides sont le plus souvent des PC, qui sont des lipides neutres, en mélange avec 30 à 50 % de cholestérol pour avoir une membrane qui soit rigide sans être en phase gel. Les lipides PEG les plus

utilisés ont une masse de 2000 g/mole, et leur proportion est d'environ 5% pour éviter la formation de micelles. La présence d'une couche de PEG en surface permet d'avoir une certaine charge de surface mais l'utilisation de PS, qui sont reconnus par les macrophages est à proscrire.

L'association de ligand permettant d'obtenir une affinité pour une zone choisie est le plus souvent réalisée par liaison de l'élément d'adressage sur un lipide constitutif des liposomes. Ce couplage se fait par réaction chimique ou par affinité. Les groupements chimiques les plus utilisés sont des maleimides, des thiols, des amines ou des acides carboxyliques activés alors que la liaison par affinité implique le couple biotine-streptavidine. La fonction de liaison est en général située à l'extrémité d'un PEG afin que le ligand ne soit pas masqué par la couche de PEG ajoutée pour assurer la furtivité des vésicules. Les lipides utilisés sont donc des lipides-PEG-groupement chimique ou lipides-PEG-biotine ajoutés dans des proportions ne dépassant pas 5% des lipides totaux.

Les liposomes permettant une libération contrôlée des composés encapsulés sont surtout constitués de DPPC pour les vecteurs thermosensibles ou de PE en mélange avec des lipides naturels, lipides modifiés ou polymères sensibles aux variations de pH pour les liposomes pH-sensibles.

7 L'Annexine 5

Une approche originale de ce travail repose sur l'utilisation d'une protéine, l'Annexine 5 (Anx5) comme élément de ciblage et un de ses dérivés, l'Anx5-ZZ, comme intermédiaire pour lier des anticorps en surface des liposomes et donc comme alternative à la liaison de l'anticorps sur un lipide. L'utilisation de ces protéines repose sur la propriété des Annexines à se lier sur les membranes chargées négativement en présence de calcium.

L'Anx5 est une protéine dont la structure et les propriétés de liaisons et d'autoassemblage sur des membranes anioniques ont été bien caractérisées dans le cadre des travaux sur la cristallisation de protéine et l'étude de processus régulés par le calcium. La capacité à se fixer sur des membranes chargées négativement, en particulier, a été exploitée pour des applications pratiques dans lesquelles des dérivés des Anx5 sont utilisés comme outil thérapeutique ou d'imagerie *in vivo*.

L'Anx5 est un membre de la superfamille des annexines qui ont en commun la propriété de se fixer sur les membranes chargées négativement en présence de calcium[157]. L'Anx5 en est le membre le plus petit et correspond à la structure minimale nécessaire aux Annexines pour réaliser la liaison aux membranes. C'est une protéine d'environ 35600 g/mole qui présente la forme d'un pavé légèrement incurvé de $5 \times 3 \times 3 \text{ nm}^3$, la face convexe étant celle qui interagit avec la bicouche. Elle est constituée de quatre domaines homologues en séquence et en structure formés chacun de cinq hélices α . Chaque domaine possède un site de liaison au calcium[158-163].

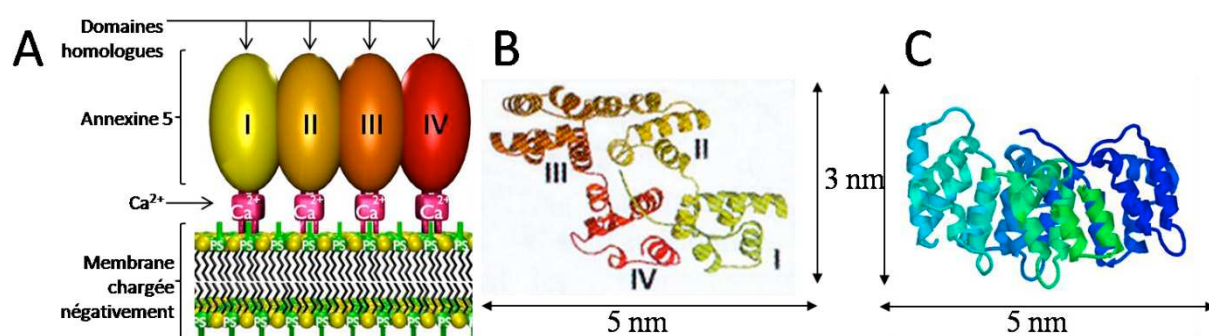


Figure I-27 : A) représentation schématique de l'Annexine 5 liée à la membrane via le calcium B) et C) structure de l'Annexine 5.

C'est le calcium qui permet la fixation de l'Anx5 aux lipides chargés négativement. La présence de quatre sites de fixation du calcium sur la protéine permet une liaison électrostatique aux membranes anioniques de très haute affinité (10^{-12} M)[164]. Cette association quasi-covalente présente la particularité d'être réversible : quand la concentration en calcium devient trop faible l'Anx5 se dissocie de la bicouche.

En plus de la propriété de liaison aux lipides anioniques, l'Anx5 possède la capacité de s'associer à d'autres Anx5. En solution les Annexines sont bien individualisées mais elles peuvent, une fois fixées à la membrane, former des autoassemblages supramoléculaires de trimères grâce à des interactions latérales. Il a été montré que, sur des membranes modèles, l'augmentation de la quantité d'Anx5 fixée conduisait à une association de ces trimères pour former des cristaux 2D, c'est-à-dire des motifs moléculaires répétés de façon périodique dans le plan de la membrane. Deux types de cristaux peuvent être formés : les cristaux P3, obtenus à haute concentration en protéines, et les cristaux P6, formés à des concentrations plus faibles [165-167].

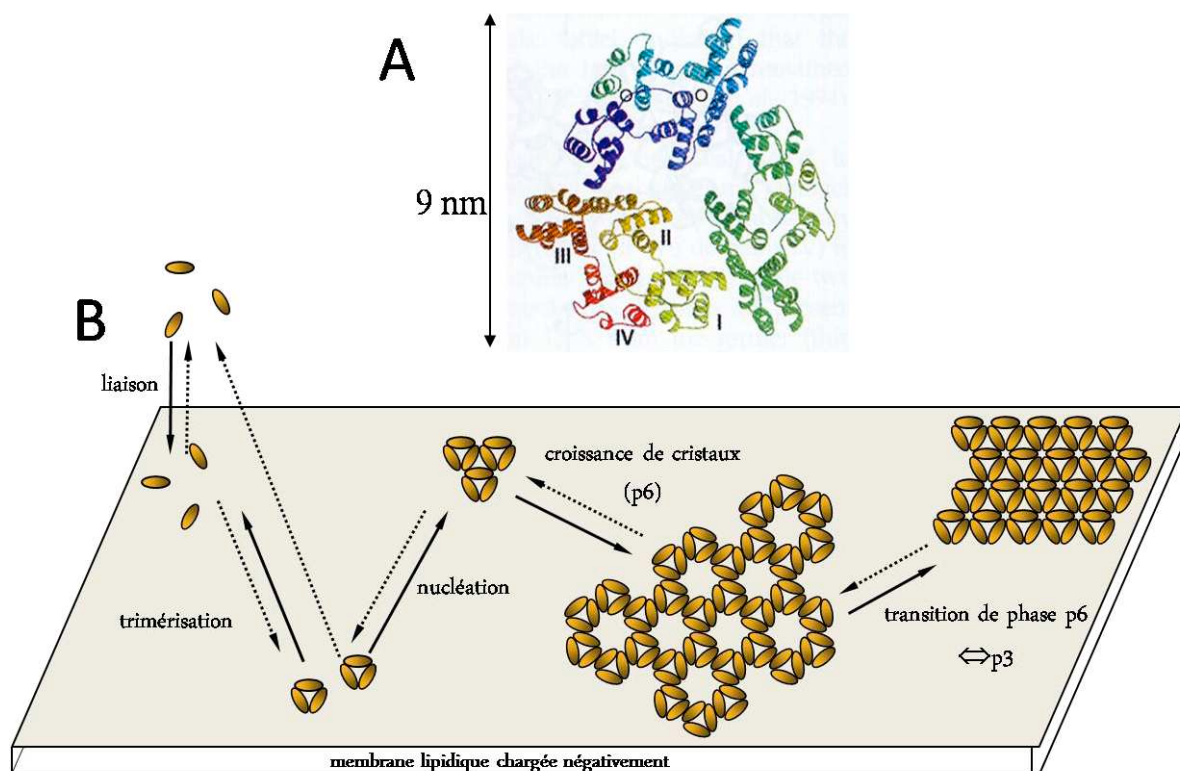


Figure I-30 : A) structure d'un trimère d'Annexine 5 B) organisation structurale des molécules d'Annexine 5 à la surface d'une membrane lipidique chargée négativement. L'association des molécules est due à l'augmentation de la concentration (adapté de Richter et al.[167]).

La très grande affinité de l'Anx5 pour les membranes exposant des lipides anioniques a conduit à son utilisation pour des applications biotechnologiques pour l'imagerie ou le traitement de certaines pathologies in vivo impliquant l'exposition de PS. Dans des conditions normales, les membranes des cellules présentent une asymétrie de la composition lipidique des feuillet internes et externes de la bicouche. Les PS, c'est-à-dire les lipides négatifs, sont localisés dans le feuillet interne de la membrane [168]. L'exposition des PS à la surface de la cellule est liée soit à la mort cellulaire soit à l'activation des plaquettes sanguines[169, 170]. Dans le premier cas la cellule ne peut plus maintenir les processus métaboliques permettant l'asymétrie. Elle présente alors les PS qui sont reconnues par les macrophages comme la marque d'un élément à éliminer. La mort cellulaire et en particulier l'apoptose, la mort cellulaire programmée, sont impliquées dans certains cancers dans des cas de crises cardiaques ou d'hypoxies cellulaires. Dans le deuxième cas l'exposition des PS par les plaquettes activées correspond à un signal permettant la mise en œuvre d'une cascade d'évènements impliqués dans la coagulation sanguine. La formation de caillot sanguin, constitué de plaquettes activées et conséquence des phénomènes de coagulation, est

notamment un marqueur de la plaque d'athérome. Les Anx5 les plus utilisées pour cibler ces zones pathologiques sont des dérivés liés à un marqueur pour l'imagerie, fluorophore, quantum dot, technetium et son chélate... ou un élément permettant un traitement thérapeutique[171-179]. L'association est réalisée soit par couplage chimique soit par synthèse d'une protéine de fusion.

Différents modes de liaison d'un élément d'imagerie ou de thérapie ont été envisagés et la stratégie la plus utilisée est le couplage covalent, en général sur les amines de la protéine. Pour obtenir un signal fluorescent, les Anx5 sont en général modifiées par liaison d'un fluorophore. La fluorescéine-isothiocyanate a notamment été utilisée [171, 172], le groupement isothiocyanate permettant une liaison aux amines de la protéine ou à son unique thiol. Une alternative aux fluorophore, qui consiste à les remplacer par un quantum dot, a été proposée [180]. Dans ce cas, les amines sont liées à un réactif bifonctionnel de façon à présenter des biotines qui servent à lier des quantum dots dont la surface présente des streptavidines. D'autres éléments d'imagerie ont été couplés sur les amines de la protéine, notamment du technetium pour la radiographie (SPECT) ou des particules d'oxyde de fer pour l'IRM [174, 175, 181]. Pour le technetium, un chélate (HYNIC) exposant une fonction succinimidyl (un acide carboxylique activé par un NHS) est associée à la protéine via la formation de liaisons amide. Pour la liaison de particules d'oxyde de fer, les particules et les Anx5 sont modifiées avec du SPDP de façon à former un pont disulfure entre les deux partenaires. Pour toutes ces stratégies, qui s'appuient sur une liaison aux NH_2 de la protéine, la fixation n'est pas spécifique d'une amine en particulier et ne peut être contrôlée précisément. Le produit final est alors un mélange hétérogène de protéines marquées différemment. Pour contrôler l'association marqueur-protéine, des Anx5 mutantes ou de fusion ont été préparées. Pour la formation des mutants, l'unique cystéine de la protéine a été supprimée et une cystéine a été ajoutée en N-terminal de telle façon que l'Anx5 présente un thiol unique en position accessible. Ce point de liaison a été utilisé pour fixer une enzyme, l'urokinase, via un pont disulfure et utiliser l'Anx5-urokinase pour des applications thérapeutiques [178]. Une autre façon d'associer la protéine à un élément d'imagerie a été la liaison des Anx5 mutantes à des lipides constitutifs de liposomes ou de micelles protégeant des particules d'oxyde de fer [182]. Enfin un autre mode de liaison de molécule-marqueur a été la mise au point de protéine de fusion entre l'Anx5 et la GFP, la protéine fluorescente étant ajoutée à l'extrémité N-terminale de l'Anx5 [183]. Il apparaît donc que la liaison d'un élément thérapeutique ou d'imagerie se fait essentiellement par liaison covalente sur des amines de telle façon que la position du marqueur n'est pas bien contrôlée et que, pour éviter

des problèmes d'interférence avec la liaison calcium-dépendante aux membranes anioniques, des mutants ou des protéines de fusion ont été mis au point.

Les utilisations des Anx5 modifiées concernent essentiellement le diagnostic, l'imagerie et, de façon plus anecdotique, la thérapie. Les Anx5 fluorescentes ont été utilisées en cytométrie de flux pour mettre en évidence l'activation de plaquettes, ou détecter des cellules en apoptose [171, 172]. *In vitro*, les protéines fluorescentes sont en général utilisées pour repérer les cellules en apoptose [180, 182, 183]. L'emploi de ces marqueurs *in vivo* est limité par le fait qu'il est nécessaire de prélever les organes marqués pour visualiser le signal fluorescent [184]. Les Anx5 liées à du technétium ou à des particules d'oxyde de fer ont donc été développées pour imager les zones d'apoptose ou présentant des plaquettes activées de façon non invasive par SPECT ou IRM [174, 175, 181]. Ces outils ont notamment servi pour diagnostiquer des infarctus [177, 185]. Les applications thérapeutiques concernent essentiellement l'Anx5-urokinase qui permet l'adressage de l'urokinase au niveau des thrombus, où se trouvent des plaquettes activées exposant des PS, pour traiter ces zones grâce à l'activité antithrombotique de la protéine liée à l'Anx5 [178].

L'Anx5 est donc une protéine dont la structure a été optimisée au cours de son évolution pour réaliser une fixation réversible de très haute affinité sur les bicouches lipidiques chargées négativement en présence de calcium, mais aussi pour s'associer avec les autres annexines fixées sur la bicouche. Les applications biotechnologiques des Anx5 tirent profit de ses propriétés d'association avec les membranes contenant des lipides anioniques. Elles sont utilisées comme élément de ciblage des plaquettes ou des cellules apoptotiques mais aussi comme intermédiaire pour l'ancrage et la présentation de peptides ou d'anticorps.

Une Anx5 chimérique en particulier, résultant de la fusion entre l'Anx5 et le tag ZZ de la protéine A, permet de lier d'un côté des membranes anioniques et de l'autre des anticorps. La protéine A est une protéine bactérienne capable de lier le fragment cristallisable Fc des anticorps. La zone permettant l'interaction avec le Fc a été déterminée, isolée, et dupliquée pour permettre une liaison de plus haute affinité aux anticorps [186, 187]. Ce tag ZZ a été fusionné par génie génétique à l'Anx5 pour combiner les propriétés de liaison des lipides anioniques et des anticorps. L'Anx5ZZ sert donc comme intermédiaire pour l'association d'anticorps à la surface de membranes chargées négativement.

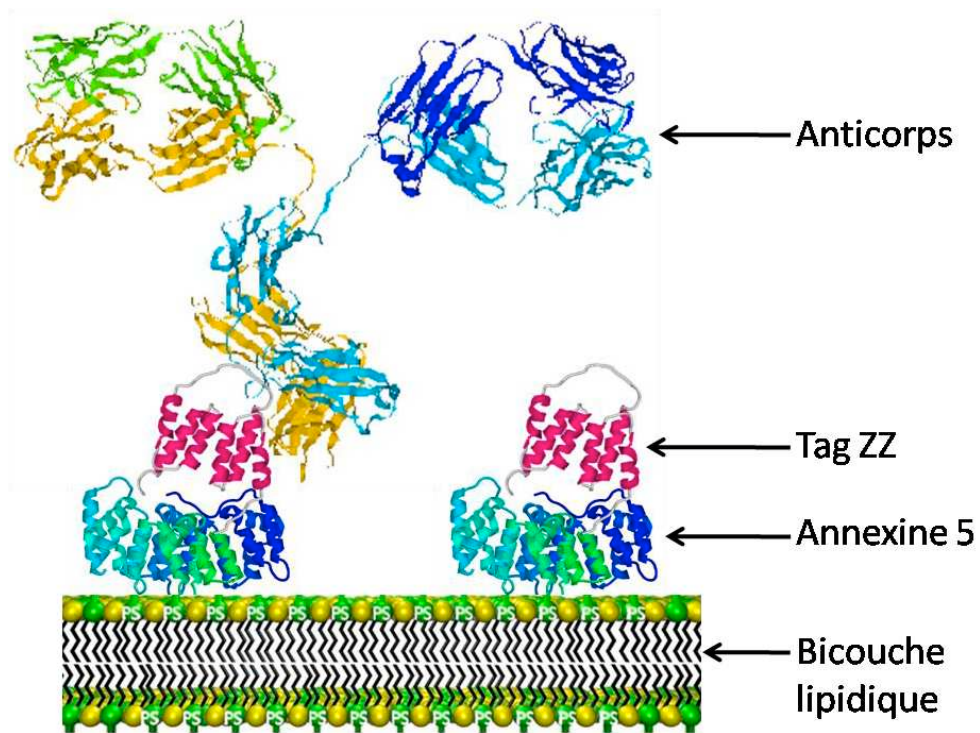


Figure I-31 : Annexine5zz et Annexine5zz-Anticorps. Le tag zz lie le Fc de l'anticorps.

II Méthodes et procédures **expérimentales**

1 Electrophorèse en gel de polyacrylamide.

Cette technique a pour objectif la séparation des différentes protéines contenues dans un échantillon. Les constituants du mélange sont mis à migrer sous l'effet d'un champ électrique dans une matrice, un gel d'acrylamide [188]. La séparation est liée aux différences de vitesse de déplacement qui ont pour conséquence des différences dans les distances parcourues par les protéines dans le gel. La mise en œuvre pratique nécessite un contrôle de la porosité du gel, une maîtrise des courants électriques qui le traversent et, en général, l'addition d'un détergent chargé aux protéines. La porosité permet de déterminer la gamme des tailles qui sont résolues et de favoriser, dans une première partie du gel, la concentration des protéines afin de leur assurer un point de départ identique. La maîtrise des courants électriques est le facteur principal qui conduit à la concentration des protéines. L'ajout d'un détergent chargé, en général un détergent anionique, le SDS, permet de séparer les protéines en fonction d'un seul critère : la taille.

La matrice de séparation est un gel obtenu par polymérisation d'acrylamide qui forme un réseau dont la porosité est contrôlée par la concentration en acrylamide. L'acrylamide est une molécule qui peut polymériser et former des chaînes linéaires indépendantes les unes des autres. Pour les associer entre elles et former un réseau, un agent réticulant, le bisacrylamide, est ajouté. Il permet la formation de pont entre les chaînes lors de la polymérisation de l'acrylamide avec cet agent. Cette réaction de polymérisation est due à la présence de radicaux libres qui sont en général formés grâce à l'ajout d'un initiateur et d'un accélérateur de réaction. Ces catalyseurs sont l'ammonium persulfate (PSA), utilisé comme initiateur, et le TEMED qui sert d'accélérateur. La formation d'un gel nécessite donc de mélanger de l'acrylamide, du bisacrylamide, un agent réticulant, et des initiateurs de réaction que sont l'APS et le TEMED. Il se forme alors un maillage qui est plus ou moins lâche selon la concentration en acrylamide.

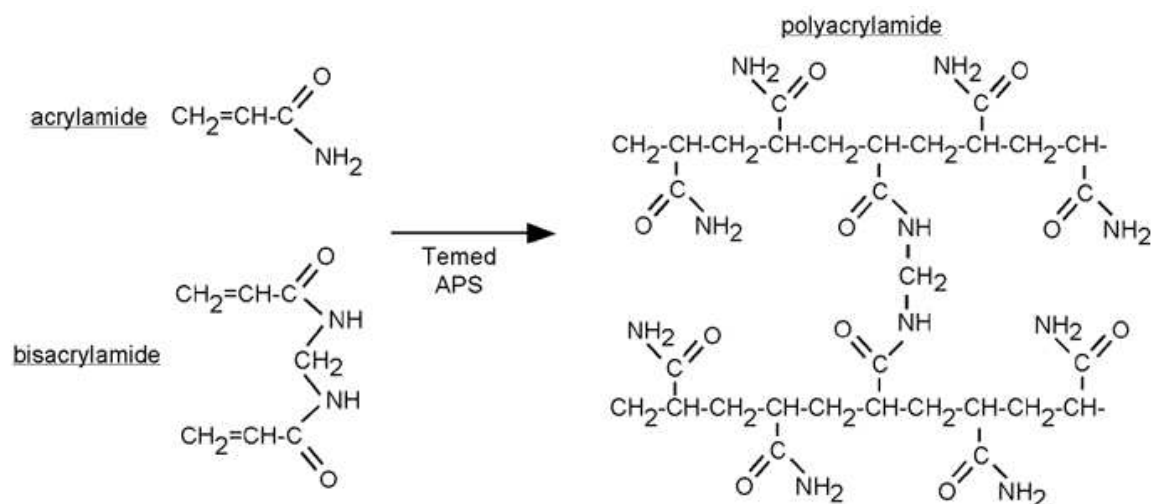


Figure II-1 : Polymérisation de l'acrylamide et pontage des chaînes par le bisacrylamide.

La concentration en acrylamide permet alors de contrôler la porosité du gel et grâce à cela la gamme des tailles qui sont séparées.

D'ordinaire les gels utilisés sont dit discontinus car ils possèdent deux zones : une de concentration des protéines(ou stacking) et une de séparation(ou résolving). Une bonne séparation nécessite que toutes les protéines qui vont migrer partent du même point ce qui n'est pas le cas lors du dépôt d'échantillons volumineux. Pour ceci une zone de concentration, qui présente un maillage lâche et au niveau de laquelle sont déposés les échantillons, est ajoutée avant la zone de séparation. Dans cette zone, les protéines ne se séparent pas mais migrent ensemble en s'entassant dans un volume plus petit que le dépôt. Cette accumulation des protéines repose sur des différences de concentration et de pH entre les zones de stacking et de résolving et sur l'utilisation d'électrolytes aux propriétés électriques différentes et variables en fonction du pH. Le stacking a une concentration faible en acrylamide et un pH de 6.8 alors que le résolving a un maillage plus dense et un pH de 9. Les électrolytes sont les ions chlorure contenus dans le gel et les ions glycine, un acide aminé, contenus dans le tampon dans lequel baignent les électrodes (la cathode, située en général au bas du gel et l'anode, située en haut du gel) et qui fait contact avec le gel.

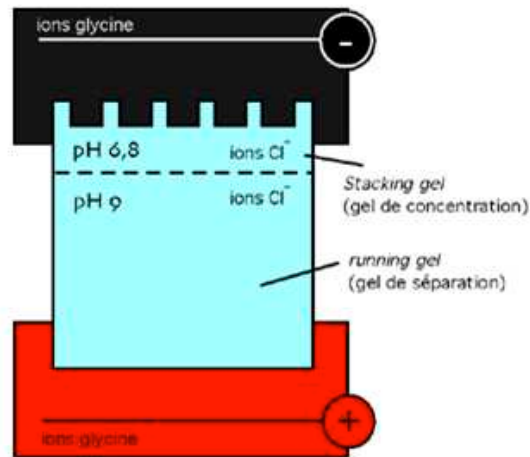


Figure II-2 : Gel d'acrylamide : différences de pH et de composition en électrolytes.

La concentration des protéines au niveau du stacking est due à une modification des courants électriques, par variation de la charge d'un des électrolytes en réponse aux changements de pH. Par définition un courant électrique est dû à un mouvement de charges. En solution ce sont les électrolytes majoritaires (c'est-à-dire les ions dissous majoritaires) qui sont responsables du courant du fait de leur mouvement lorsqu'est appliquée une différence de potentiel. Quand la tension est appliquée de part et d'autre du gel, les ions chlorure migrent vers le bas de la matrice et les ions glycine du tampon entrent par le haut. A pH 6.8 la glycine est proche de son point de charge nulle et se déplace lentement. Comme les ions chlorure migrent rapidement il se crée une zone de vide ionique dans lequel aucun électrolyte n'est présent. Dans cette zone les protéines ne se déplacent quasiment pas car elles ne sont plus entraînées par un courant électrique. C'est le front d'ions glycine qui va permettre la reprise de leur migration au fur et à mesure de sa progression. Comme les mailles du gel sont très lâches le déplacement des protéines n'est pas gêné par la matrice et elles s'accumulent au niveau du front de glycine lors de son avancée. Quand elles atteignent le gel de séparation, elles sont entassées dans le vide électrique et occupent un volume plus compact qu'au départ. L'augmentation du pH induit une charge importante des glycines. Elles deviennent alors plus rapides, vont combler le vide ionique et établir un courant "continu". Les protéines se déplacent alors dans ce courant électrique mais sont retenues dans leur mouvement par les mailles du gel.

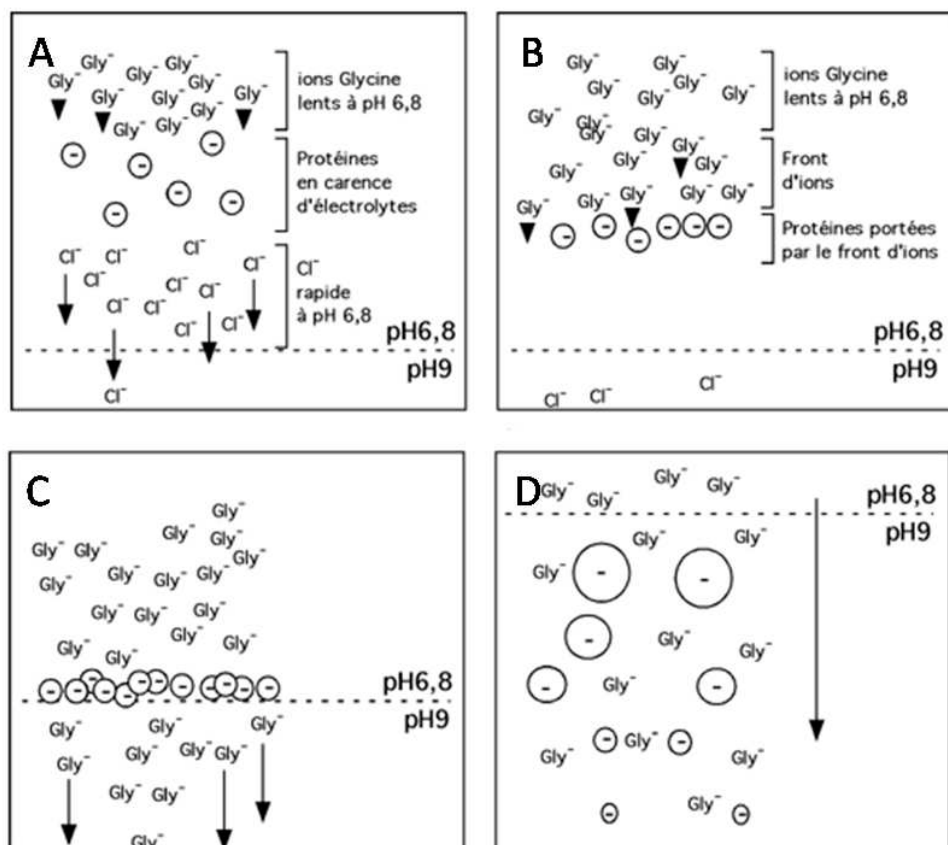


Figure II-3 : Principe du stacking A) migration rapide des Cl^- qui laissent un vide ionique ; B) les protéines avancent très lentement dans le vide ionique et sont poussées par le front d'ions glycine ; C) à la séparation stacking-résolving les ions glycine deviennent plus mobiles et dépassent les protéines concentrées en une bande ; D) séparation des différentes protéines dans un champ électrique uniforme.

Lors de leur migration dans le résolving les protéines évoluent à l'intérieur d'un réseau d'acrylamide serré qui va constituer un tamis et sont séparées en fonction de leur taille, de leur forme et leur charge. Les petites protéines migrent rapidement et donc plus loin que les grosses qui sont plus retenues. De même les protéines globulaires c'est-à-dire de forme sphérique sont moins ralenties que les protéines fibrillaires, en forme de bâton, qui doivent s'orienter correctement pour passer à travers les mailles. La charge détermine le sens de migration (vers l'anode ou la cathode), avec pour conséquence que toutes les protéines ne peuvent pas rentrer dans le gel. La densité de charge influe quant à elle sur la vitesse de déplacement.

L'intrication de trois facteurs, taille forme et charge, influençant la migration peut rendre difficile l'analyse des résultats. C'est pourquoi, afin de pouvoir séparer toutes les constituants d'un échantillon en fonction du seul critère de la taille, les protéines sont placées en détergent

et éventuellement en présence d'un agent réducteur de ponts disulfures. Le détergent utilisé est le SDS (dodecylsulfate de sodium), un détergent anionique. Il sert à dénaturer les protéines et à leur conférer une charge négative. Il interagit avec les chaînes latérales non chargées des acides aminés, avec un ratio d'une molécule de SDS pour deux acides aminés, et induit le dépliement des protéines et l'acquisition d'une charge négative proportionnelle à leur longueur. Lorsque des ponts disulfure sont impliqués dans la structuration des protéines, du β -mercaptoethanol est ajouté pour couper ces liaisons. Les protéines ont alors toutes la même forme de bâtonnet et sont toutes chargées négativement. Elles sont alors séparées en fonction d'un seul paramètre : la taille. Ce type de gel est dit dénaturant car il implique une dénaturation des protéines.

L'électrophorèse en gel d'acrylamide est donc une technique qui permet de séparer des protéines par migration dans un tamis constitué d'acrylamide réticulé, sous l'effet d'un champ électrique. Les protéines peuvent être mises à migrer dans leur état natif et sont séparées en fonction de leur charge, leur forme et leur taille ou bien être dénaturées par le SDS et le β -mercaptoethanol et être séparées en fonction de leur taille uniquement.

2 Le QCM-D (Quartz Cristal Microbalance with Dissipation monitoring)

Le QCM-D est une technique qui permet de déterminer les variations de masse et de flexibilité d'éléments adsorbés sur une surface au cours du temps. L'obtention de ces paramètres est basée sur la mesure des variations de vibration d'un cristal de quartz, changements qui ont lieu en réponse à la fixation d'objets à sa surface. La masse déposée est déduite des variations de fréquence de vibration et la flexibilité des objets de la vitesse d'amortissement des oscillations [189].

2.1 Principe de fonctionnement

Le signal de QCM-D correspond à la mesure répétée à intervalles de temps réguliers de la fréquence (f) et de la dissipation (D) des vibrations oscillantes amorties d'un cristal de quartz. Ces valeurs sont déterminées en caractérisant l'évolution des oscillations libres du cristal de quartz en réponse à une excitation électrique. Le cycle induction des vibrations / suivi du signal de l'évolution libre repose sur l'utilisation du caractère piézo-électrique du quartz : il se déforme suite à une stimulation électrique et produit de l'électricité en réponse à une

déformation. Ce cristal de quartz est donc placé entre deux électrodes d'or qui émettent ou mesurent des courants électriques. Une impulsion électrique est initialement appliquée pour provoquer la déformation du quartz. Lors de l'arrêt de la stimulation, le cristal retourne à son état initial en oscillant autour de sa position d'équilibre. Ce cisaillement génère un courant électrique oscillant, qui s'amortit en quelques millisecondes et qui est mesuré au niveau des électrodes. Le signal est de la forme $A(t') = \alpha \exp(-\pi f D t')$ avec f la fréquence des oscillations, D la dissipation (l'inverse du nombre d'oscillation avant arrêt final) et t' le paramètre temps pour le phénomène d'oscillation.

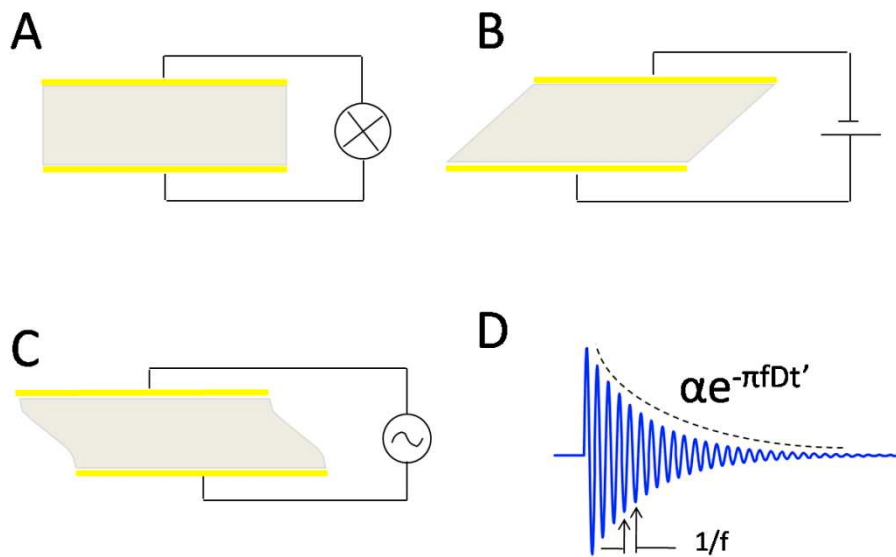


Figure II-4 : A) cristal de quartz entre deux électrodes en or B) déformation du cristal de quartz en réponse à une stimulation électrique C) oscillation du cristal après l'arrêt de la stimulation. Ces déformations génèrent un courant qui est mesuré au niveau des électrodes. D) signal électrique mesuré lors des oscillations amorties du cristal.

En QCM-D La résolution temporelle, c'est-à-dire la durée minimale entre l'acquisition de deux valeurs, est d'une seconde. Ceci signifie que toutes les secondes un cycle excitation électrique / oscillation libre amortie / détermination des paramètres f et D est recommencé. La somme des points obtenus constituent les courbes d'évolution de f et D au cours du temps.

En pratique ce sont les variations des paramètres f et D , Δf et ΔD , qui sont représentées. Les valeurs de f ou de D déterminées à chaque temps t sont chacune comparées à une valeur de référence, la première mesurée qui constitue le zéro. Le signal QCM-D est donc une évolution, par rapport à une valeur initiale de référence, de la fréquence ou de la dissipation au cours du temps. A partir de ces signaux il est possible soit de déterminer une valeur de

masse adsorbée en surface du cristal grâce à Δf soit d'obtenir des indications sur la plus ou moins grande flexibilité des objets liés au cristal à partir de la valeur de D.

2.2 Détermination de la valeur de masse adsorbée

L'adsorption de masse en surface du cristal de quartz est à l'origine d'une modification du signal de fréquence de laquelle est déduite une variation de masse. Quand un objet se fixe en surface du cristal il induit une modification de la fréquence des oscillations du cristal.

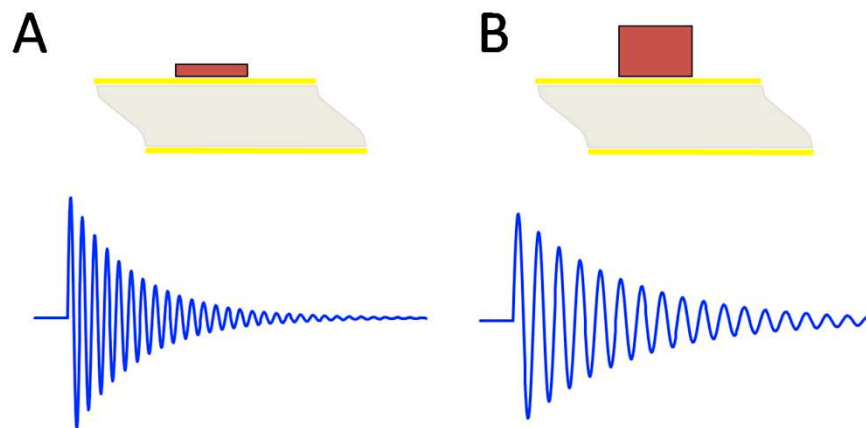


Figure II-5 : variation de la fréquence des oscillations en fonction de la masse des objets adsorbés A) masse faible, fréquence des oscillations élevée B) masse élevée fréquence des oscillations plus faible

Cette variation est proportionnelle à la masse adsorbée (m) qui peut être déduite à partir de la formule : $\Delta m = -C\Delta f$ avec $C = 17,7 \text{ ng.cm}^{-2}.\text{Hz}^{-1}$ [190].

La sensibilité est d'environ 0,2 Hz ce qui correspond à une résolution massique de quelques ng par cm^{-2} .

2.3 Evaluation de la flexibilité des objets adsorbés

L'évaluation de la flexibilité est liée au paramètre D qui est une mesure de l'amortissement des oscillations du cristal de quartz. D est l'inverse du facteur Q qui représente le nombre d'oscillations du cristal jusqu'à l'arrêt final. Plus le système s'amortit rapidement, plus le nombre d'oscillations avant arrêt est faible et plus D est élevé. L'amortissement est influencé par le caractère viscoélastique, c'est-à-dire flexible, des objets fixés à la surface du cristal de quartz. Plus les objets sont flexibles, plus les oscillations s'amortissent rapidement et plus la valeur de D est élevée.

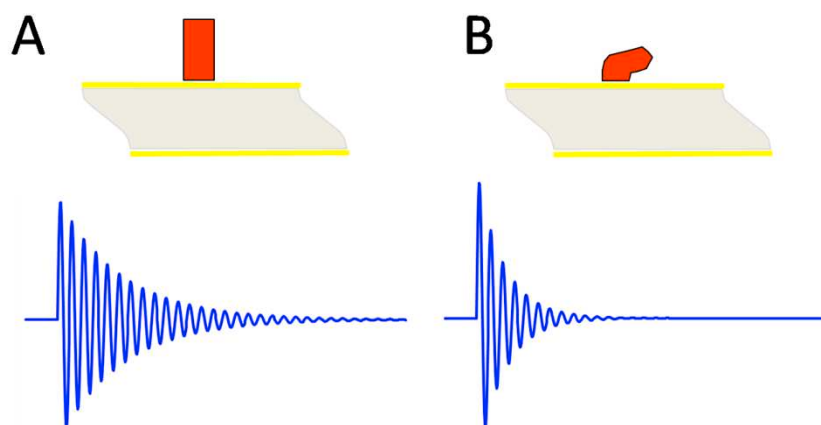


Figure II-6 : variation de l'amortissement des oscillations en fonction de la flexibilité des objets adsorbés A) objet rigide, amortissement des oscillations lent, dissipation faible B) objet flexible, amortissement des oscillations rapide, dissipation élevée

Le paramètre D renseigne donc sur le caractère plus ou moins flexible des éléments adsorbés en surface.

En pratique le QCM-D est donc une technique utilisée pour suivre des cinétiques d'adsorption d'objets sur un cristal de quartz, évaluer leur flexibilité et quantifier la masse totale déposée.

3 Spectroscopie de fluorescence

La fluorescence est une émission lumineuse en réponse à une excitation. Elle est émise par certaines molécules appelées fluorophores ou fluorochromes. Leur capacité à émettre de la lumière et la possibilité d'influencer le signal d'un fluorophore par interaction avec d'autres éléments du milieu, en particulier avec d'autres fluorochromes, a conduit à les utiliser comme sondes pour suivre ou imager des processus moléculaires.

3.1 L'émission de fluorescence par les fluorophores

Un fluorophore est une molécule qui possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de la restituer rapidement sous forme de lumière (lumière d'émission), ce qui constitue le phénomène de fluorescence. Cette énergie lumineuse est portée par des photons de longueur d'ondes λ et chaque fluorophore est caractérisé par les λ permettant leur excitation (λ_{exc}) et celles qu'ils émettent (λ_{em}). De façon générale lors de l'absorption d'un photon un chromophore passe d'un état électronique fondamental S_0 à un

état excité S_1 . Le phénomène de fluorescence correspond à un retour rapide à l'état initial S_0 en émettant un photon (pour une désexcitation lente il s'agit de phosphorescence). Les deux niveaux électroniques S_0 et S_1 comportent chacun plusieurs niveaux d'énergies notés $S_{0,0}$, $S_{0,1}$, $S_{0,2}$,... $S_{0,n}$ pour l'état fondamental et $S_{1,0}$, $S_{1,1}$, $S_{1,2}$,... $S_{1,n}$ pour l'état excité. Les fluorophores doivent être au niveau $S_{0,0}$ pour pouvoir absorber un photon mais les électrons excités peuvent accéder aux différents niveaux d'énergie de l'état S_1 . Comme à chaque λ est associée une énergie et qu'il y a différents niveaux d'énergies accessibles, des photons de λ différentes peuvent permettre le passage de l'état fondamental à l'état excité ou plus précisément aux différents niveaux d'énergie de l'état excité. L'ensemble des longueurs d'ondes qui permettent la transition de S_0 vers S_1 constituent le spectre d'excitation.

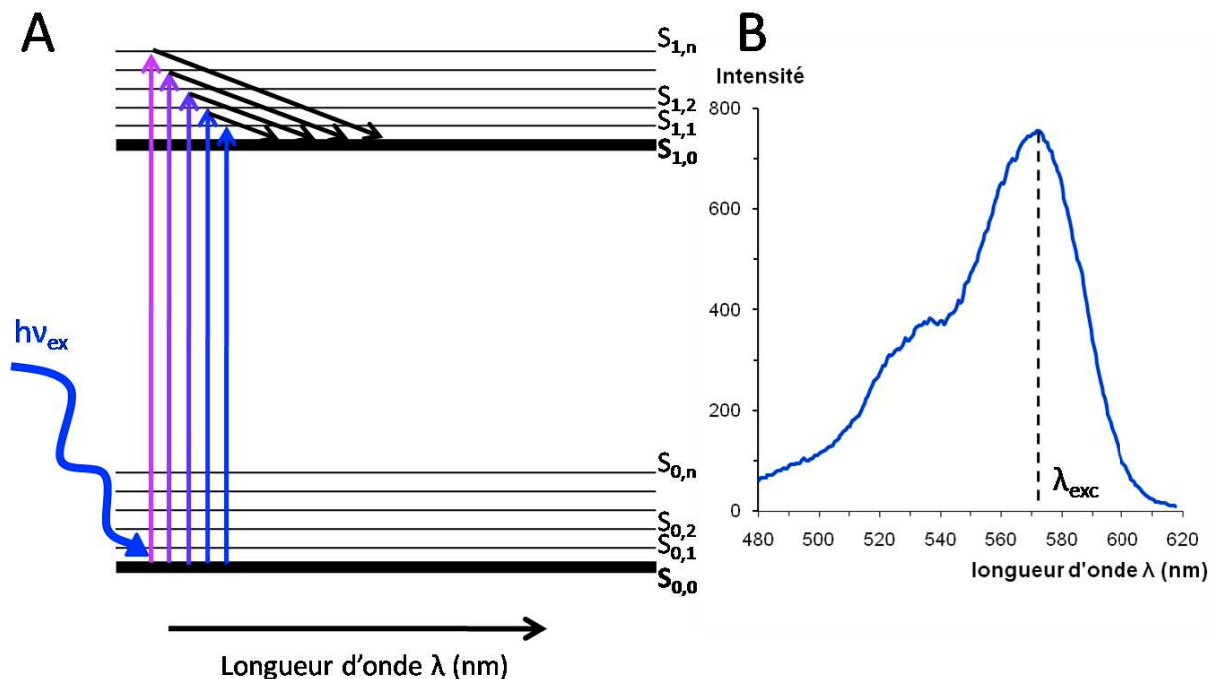


Figure II-7 : A) Passage de fluorophores de l'état fondamental $S_{0,0}$ aux différents niveaux de l'état excité $S_{1,0}$... $S_{1,n}$; B) Spectre d'excitation : ensemble des longueur d'ondes permettant l'excitation du fluorophore. La longueur d'onde permettant l'excitation la plus efficace est notée λ_{exc} .

Toutes les λ d'excitation ne permettent pas d'exciter une population de fluorophores avec la même efficacité et la longueur d'onde λ_{exc} qui permet la meilleure stimulation est déterminée pour être utilisée comme source lumineuse lors des expérimentations.

Une fois dans l'état excité les fluorophores présents aux différents niveaux d'énergie $S_{1,1}$, $S_{1,2}$,... $S_{1,n}$ retournent au niveau $S_{1,0}$ par pertes d'énergie à l'intérieur de chaque molécule. Ce phénomène a lieu très rapidement et tous les fluorochromes sont au même niveau énergétique avant la réémission d'un photon. Lors du retour à l'état fondamental les molécules ont accès

aux différents niveaux d'énergie de l'état S_0 et la longueur d'onde du photon réémis dépend du niveau d'énergie de S_0 atteint. L'ensemble des λ qui peuvent être émises lors des transitions énergétiques composent le spectre d'émission. Le retour de $S_{0,n}$ à $S_{0,0}$ se fait dans un deuxième temps par pertes internes d'énergie

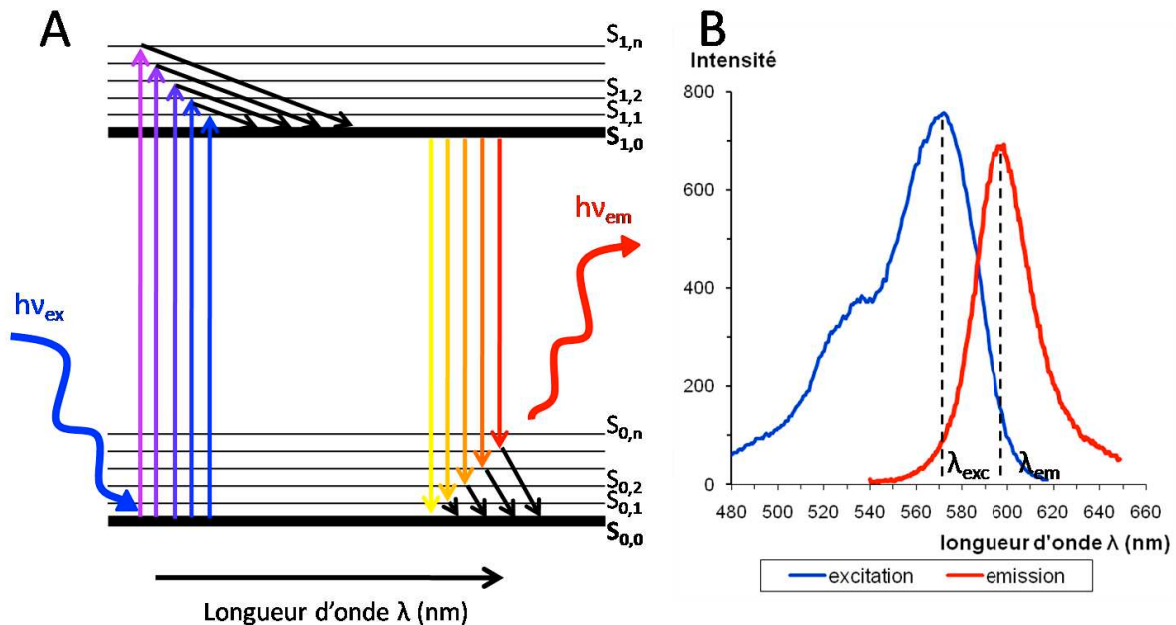


Figure II-8 : A) Passage de fluorophores de l'état fondamental $S_{0,0}$ aux différents niveaux de l'état excité $S_{1,0} \dots S_{1,n}$ et retour à l'état fondamental en émettant un photon. Cette réémission constitue la fluorescence ; B) Spectre d'excitation (bleu): ensemble des longueurs d'ondes permettant l'excitation du fluorophore. La longueur d'onde permettant l'excitation la plus efficace est notée λ_{exc} . Spectre d'émission (rouge): ensemble des longueurs d'ondes émises par le fluorophore. La longueur d'onde de la lumière émise la plus intense est notée λ_{em} .

Lors de ce retour à l'état fondamental certaines λ sont émises préférentiellement par la solution de fluorophores ce qui explique le pic d'intensité associé à certaines longueurs d'ondes. La λ d'émission pour laquelle l'intensité est maximale est désignée λ_{em} .

Les pertes lors du retour des fluorophores au niveau de plus basse énergie des états fondamental et excité explique que l'énergie émise soit plus faible que l'énergie absorbée et donc que le spectre d'émission soit décalé vers les grandes longueurs d'onde par rapport au spectre d'excitation.

La fluorescence est donc un phénomène qui conduit à l'émission d'un signal lumineux par un fluorophore en réponse à une excitation. Ce fluorophore est caractérisé par un spectre d'excitation qui correspond à l'ensemble des λ qui permettent l'émission de fluorescence et un spectre d'émission qui représente l'ensemble des λ émises en réponse à une stimulation.

La fluorescence est un phénomène sensible aux conditions de son environnement et peut être fortement influencée par l'interaction avec d'autres fluorophores. Ces interactions peuvent notamment avoir deux types de conséquences : transfert d'énergie entre deux fluorochromes ou FRET, et extinction de la fluorescence, ou quenching

3.2 Le FRET.

Le FRET (Förster Resonance Energy Transfer, transfert d'énergie par résonance) est une technique qui permet d'obtenir un signal fluorescent d'un fluorophore accepteur A en excitant un fluorophore donneur D. Il s'agit d'un transfert d'énergie de façon non radiative (une énergie autre que lumineuse) entre deux molécules fluorescentes qui ne sont pas en contact direct. Le fluorophore donneur retourne à l'état fondamental en transférant son énergie à un fluorochrome accepteur. Ce transfert résulte d'une interaction entre les dipôles électriques portés par le donneur et l'accepteur. L'énergie mise en jeu au cours du transfert n'est pas de nature lumineuse mais les spectres d'excitation et d'émission des fluorophores qui correspondent à des énergies absorbées ou réémise permettent d'expliquer les modalités du phénomène. Pour que le transfert ait lieu il faut que le spectre d'émission de D recouvre le spectre d'absorption de A c'est-à-dire que l'énergie émise corresponde à l'énergie nécessaire à l'excitation de A.

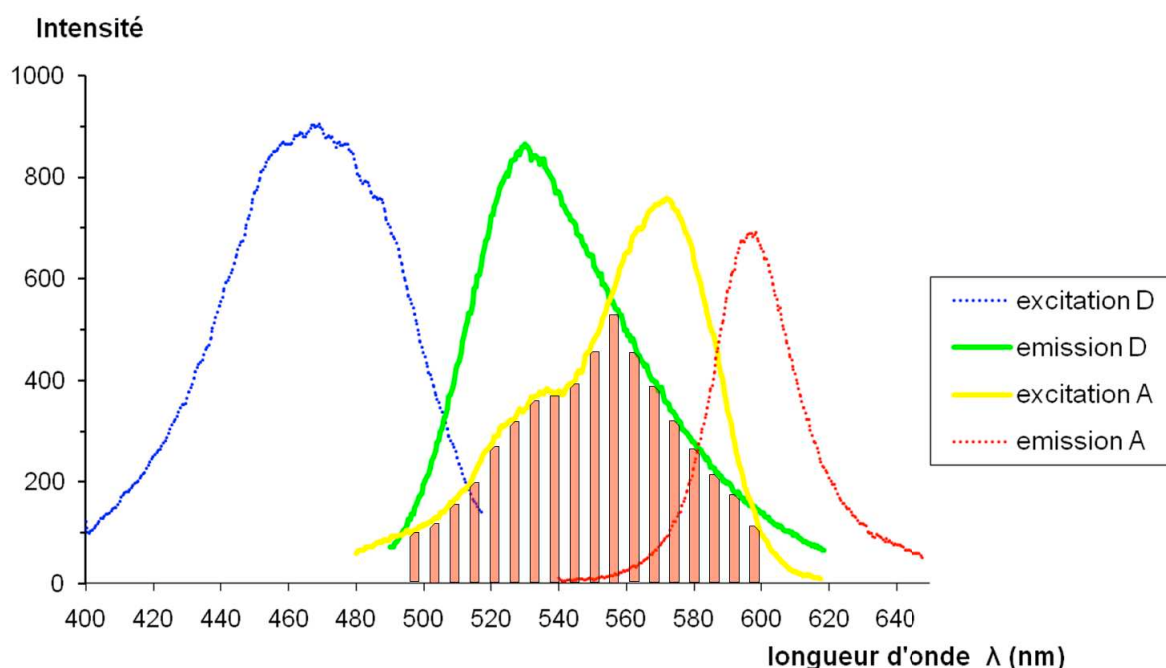


Figure II-9 : Recouvrement du spectre d'émission d'un fluorophore donneur et du spectre d'excitation d'un fluorophore accepteur, condition pour l'établissement d'un transfert d'énergie. La zone de recouvrement est hachurée en rouge. Dans ce travail D est la fluorescéine et A la rhodamine.

L'autre impératif est la proximité des fluorophores : l'efficacité de transfert diminue avec l'augmentation de distance entre les fluorochromes et n'a plus lieu pour des distances de plus de 10 nm. Le FRET est donc fréquemment utilisé pour établir des proximités entre deux molécules fluorescentes.

La technique de FRET consiste donc à exciter un fluorophore donneur pour obtenir un signal lumineux d'un fluorophore accepteur et ainsi mettre en évidence la proximité de deux molécules fluorescentes. Dans certains cas l'extinction de fluorescence du donneur ne s'accompagne pas de l'apparition de fluorescence chez l'accepteur. Il n'y a pas transfert mais dissipation de l'énergie et il s'agit de quenching.

3.3 Quenching (extinction) de fluorescence

Le terme de quenching est relatif aux processus qui conduisent à une diminution de l'intensité de fluorescence d'une molécule. L'extinction de fluorescence est due à une dissipation de l'excès d'énergie du fluorophore excité par collisions ou transferts d'énergies avec d'autres molécules. Les quenchers ou atténuateurs peuvent être des molécules comme l'ion iodure, l'acrylamide ou un autre fluorophore. Dans certain cas un fluorophore peut éteindre sa propre

fluorescence lorsque sa concentration devient élevée ; il s'agit d'autoquenching. Le quenching peut être utilisé pour mettre en évidence des proximités entre molécules ou des phénomènes liés à des variations de concentration.

4 Chromatographie d'exclusion stérique

La technique de chromatographie d'exclusion stérique permet la séparation d'objets (molécules, nanoparticules, liposomes...) constitutifs d'un échantillon, en fonction de leur taille. Comme dans toutes les techniques de chromatographie les constituants du mélange sont séparés en fonction des vitesses auxquelles ils sont entraînés par un courant de phase mobile le long d'une phase stationnaire. La phase mobile est la même solution que celle dans laquelle sont suspendues les espèces à séparer. La phase stationnaire est constituée de billes poreuses de polymères, contenues dans une colonne verticale et baignant dans la phase mobile. Ces billes sont synthétisées pour être constituées de pores de différentes tailles qui sont soit des dépressions à leur surface soit des canaux à l'intérieur des particules.

La séparation en fonction de la taille repose sur la probabilité d'entrée des éléments dans les pores. L'échantillon à séparer est déposé en haut de la colonne et la solution est poussée par un flux de tampon à travers la phase stationnaire. Les constituants de l'échantillon de petites tailles peuvent entrer dans tous les pores et sont plus retenus au niveau des billes que les constituants de tailles plus élevées qui n'entrent pas dans tous les trous et sont moins ralentis. Les très gros éléments ne peuvent pas entrer dans les pores et migrent dans l'espace situé entre les billes.

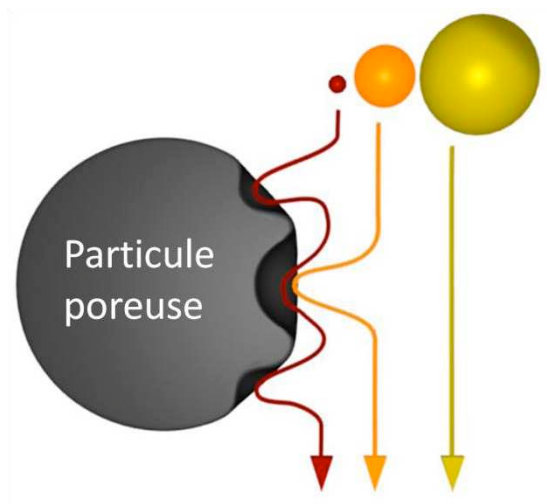


Figure II-10 : Principe de séparation des objets en fonction de leur taille : les petits objets peuvent passer dans tous les pores des billes, les objets de tailles intermédiaires ne passent que dans quelques pores et ceux de grosses tailles restent dans l'espace situé entre les billes.

Les gros objets qui ne sont pas retardés par un passage dans les billes sortent de la colonne en premier. En récupérant les volumes de phase mobile qui sortent de la colonne de façon fractionnée il est possible de séparer les constituants d'un échantillon en fonction de leur taille.

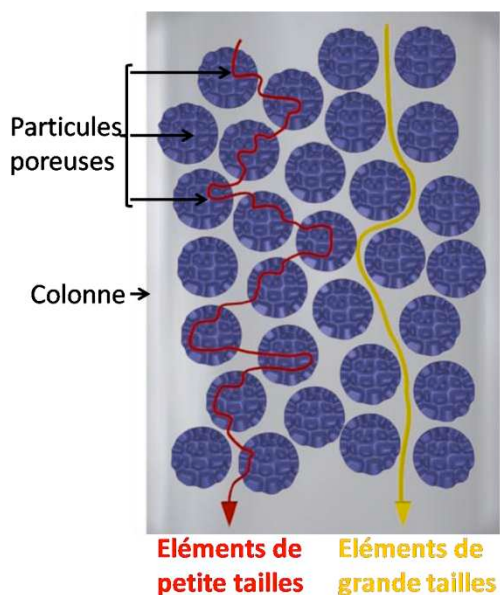


Figure II-11 : Principe de séparation : les éléments de petites taille sont ralentis par leurs passages dans les billes et migrent moins vite que les éléments de grandes tailles qui ne sont pas retardés.

Il est à préciser que tous les objets plus petits que la plus petite taille de pores ont tous la même probabilité d'entrer dans la bille et migrent donc tous à la même vitesse. Ceux de tailles supérieures à la plus grande taille de pore se déplacent aussi en même temps et sont les

premiers à sortir après qu'un volume équivalent à celui de la colonne soit sorti. La taille des pores détermine donc la gamme des tailles qui sont séparées et les particules constituant la phase fixe doivent donc être choisies de façon appropriée en fonction des tailles des objets à séparer.

La chromatographie d'exclusion stérique est donc une technique de filtration qui permet de fractionner un échantillon pour séparer ses différents constituants en fonction de leur taille.

5 Microscopies

Les techniques de microscopies optiques ou électroniques permettent la visualisation d'objets de tailles micrométriques ou nanométriques constitutifs d'un échantillon. Elles se distinguent par la source, lumineuse ou électronique, permettant d'obtenir une image d'un objet, leur résolution et les méthodes utilisées pour préparer les échantillons et imager un élément en particulier.

5.1 Microscopie optique

La microscopie optique repose sur la déviation des rayons lumineux pour obtenir, dans le cas des applications à la biologie, une image agrandie de cellules, de sections d'organes ou de l'un de leur constituant marqué par un fluorophore. De façon générale une image perçue est constituée par l'ensemble des rayons lumineux réfléchis par un objet et arrivant au niveau de l'œil. La microscopie optique consiste à éclairer un échantillon avec une source lumineuse et à modifier le trajet des rayons émis pour former une image perçue plus grande. Cette déviation des rayons émis est réalisée par des lentilles optiques qui définissent le grossissement qu'il est possible d'obtenir. Au mieux un objet peut être grandi 1000x la principale limitation étant la limite de résolution. La résolution d'un microscope désigne sa capacité à séparer des détails très voisins. Cette résolution est limitée par la diffraction : lorsque des ondes lumineuses rencontrent un milieu qui n'est pas parfaitement transparent, comme une lentille, il y a redistribution de l'énergie. La trajectoire d'un rayon lumineux n'est plus une droite mais ressemble en quelque sorte à un cône. Il en résulte que l'image d'un point est une tâche. Lorsque deux points sont proches il y a recouvrement des tâches et impossibilité de distinguer ces points séparément : les images apparaissent floues. En microscopie la distance d en dessous de laquelle deux points voisins ne sont plus distingués

est $d \approx \lambda/2$ avec λ longueur d'onde de la source de lumière. En lumière visible la longueur d'onde la plus petite est 400nm, la résolution minimale est donc 200nm.

La microscopie optique est généralement utilisée en biologie pour observer des échantillons jusqu'au niveau de la cellule. En pratique les échantillons ne doivent pas être trop épais et la visualisation des éléments cellulaires trop petits, comme les organites ou les molécules d'intérêt, nécessitent un marquage grâce à des colorants ou des sondes fluorescentes. Pour observer des objets volumineux comme des organes ou des tissus il est nécessaire de les fixer avec du glutaraldéhyde ou du paraformaldéhyde puis de réaliser des coupes fines (de quelques dizaines de μm d'épaisseurs). De plus, pour obtenir une image qui ne soit pas bruitée par les éléments situés en dessus ou au dessous du plan d'observation il est possible d'utiliser un microscope confocal, un microscope optique qui permet de réaliser des images de très faible profondeur de champ (épaisseur).

L'observation d'objets peu contrastés ou trop petits nécessite une étape de marquage. Pour les organites il est possible d'utiliser des colorants. Pour suivre des petits éléments tels que des protéines il est possible de les marquer avec une sonde fluorescente. Le microscope est alors équipé de filtres permettant l'émission d'une source lumineuse permettant l'excitation des fluorophores à une longueur d'onde précise et de visualiser le signal émis.

La microscopie optique est donc une technique qui permet la visualisation d'échantillons de taille micrométrique ou le suivi d'éléments plus petits s'ils sont marqués par des sondes fluorescentes. Pour obtenir une image bien résolue pour des objets de taille nanométrique un autre type de microscopie doit être utilisé : la microscopie électronique.

5.2 Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique utilise un faisceau d'électrons pour obtenir une image d'objets ayant des tailles nano à micrométriques. L'utilisation d'un faisceau d'électrons est due à la nécessité de diminuer la longueur d'onde des radiations interagissant avec l'échantillon. En effet la limite de résolution est $d \approx \lambda/2$ et en microscopie optique où la source est la lumière visible il est impossible de descendre en dessous de 200nm. L'utilisation d'un faisceau d'électrons qui possède une longueur d'onde de 0,005nm permet de diminuer fortement la résolution qui, dans la pratique, est de l'ordre de l'angström, limitée par les lentilles électromagnétiques chargées de former et de dévier le faisceau. En effet l'obtention d'une image agrandie nécessite dans un premier temps la focalisation et l'accélération des électrons émis par la source puis après interaction avec l'objet à imager une modification du trajet des

électrons pour obtenir une image agrandie. Comme indiqué précédemment ces déviations sont réalisées grâce à des lentilles électromagnétiques.

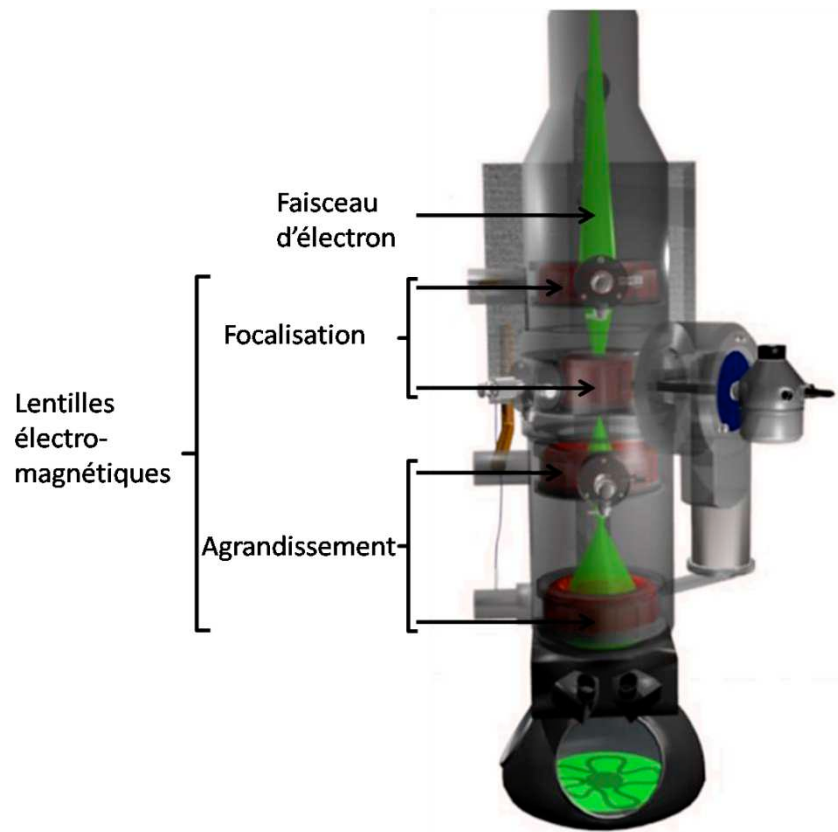


Figure II-12 : Représentation schématique du microscope électronique.

Le contraste est obtenu parce que les éléments denses de l'échantillon diffusent les électrons. L'image formée est donc une représentation en noir et blanc avec des contrastes de gris et correspond en quelque sorte à l'ombre des objets. Les agents de contraste utilisés sont donc opaques aux électrons. Il s'agit par exemple de solutions d'acétate d'uranyle ou de nanoparticules de fer ou d'or présentant une spécificité pour un élément à distinguer.

L'utilisation d'un faisceau d'électron nécessitant un vide poussé il n'est pas possible d'observer des échantillons hydratés par un solvant à l'état liquide. L'analyse d'échantillon biologique nécessite donc une déshydratation ou une congélation.

La technique dite de coloration négative consiste à déposer les objets à observer sur une grille recouverte d'un film de carbone et à absorber l'excès d'eau avec un papier buvard. Une solution de colorant tel que l'acétate d'uranyle est ajoutée et absorbée de la même façon. L'agent de contraste se dépose tout autour de l'échantillon qui apparaît plus clair que le fond d'où le nom de coloration négative.

Une méthode pour l'observation d'échantillons biologiques tels que des cellules consiste à effectuer une déshydratation suivie d'une étape de coupe (pour ne pas avoir un objet trop épais qui empêcherait le passage des électrons). La déshydratation est réalisée en plaçant les cellules dans des bains successifs d'éthanol de plus en plus concentrés puis dans une résine. Une fois que la résine a durci, l'échantillon est coupé en fines tranches de 75nm qui sont déposées sur une grille.

Ces deux méthodes peuvent présenter des biais du fait de l'élimination des solvants liquides. Pour avoir un état proche de l'état hydraté les échantillons peuvent être congelés. Pour cela la solution à observer est déposée sur une grille dont le carbone est percé de trous et l'excès est absorbé de façon à ne laisser qu'un mince film de solution retenu par capillarité sur la grille. L'ensemble est ensuite plongé dans l'éthane liquide le plus rapidement possible pour éviter la formation de cristaux de glace et transféré au microscope.

La microscopie électronique est donc une technique utilisée pour visualiser des objets de taille nanométriques à micrométriques.

6 Diffusion de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière est une technique qui permet de déterminer les tailles et distributions de tailles de différentes populations de particules en suspension. Pour cela un échantillon est traversé par un faisceau lumineux monochromatique. Les particules en suspension vont alors diffuser, c'est-à-dire dévier cette lumière dans toutes les directions de l'espace. Cette lumière diffusée est enregistrée par un détecteur situé en dehors du trajet de la source. Le mouvement des particules en solution, dû à l'agitation thermique, conduit à des variations de distances entre les éléments diffusants qui induisent des fluctuations de l'intensité de la lumière diffusée. L'analyse des variations d'intensités en fonction du temps permet de remonter au coefficient de diffusion D qui est lié au rayon des particules, quand elles sont supposées sphériques et ceci grâce à la relation de Stokes-Einstein qui est : $D = (k_b T) / (6\pi\eta R_h)$ avec k_b constante de Boltzman, T la température, η la viscosité et R_h le rayon hydrodynamique.

La diffusion dynamique permet de savoir si plusieurs populations de tailles différentes sont présentes en solution mais les tailles indiquées ne sont directement utilisables que si l'échantillon est monodisperse. Sinon une connaissance approfondie de la théorie est nécessaire pour déduire les différentes tailles de façon juste.

7 Procédures expérimentales

7.1 Matériel

Les lipides suivants viennent de chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC, MM=786,15) ; Cholestérol (Chol, MM=386,65); 1,2-dipalmytoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[methoxy(poly(ethylene glycol))-2000] (DPPE-PEG2000, MM=2749,39) ; 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[maleimide-(poly(ethylene glycol))2000] (DSPE-PEG2000-Mal, MM=2941,6) ; 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-L-serine] (DOPS, MM=810,03) ; 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphate (DOPA, MM=722,95) ; 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (DOPE-Rhodamine ou PE-Rh, MM= 1319,75) .

Les 1,2-dioleoyl-glyceropolyéthylèneglycol maleimide (DOGP β_4 AlaMal, MM=918,72) ont été fournis par B. Frisch (UMR 7175 Strasbourg).

Les produits suivant viennent de chez Sigma-Aldrich : chloroforme, méthanol, ethanol, chlorure de sodium (NaCl), Dichlorure de calcium (CaCl₂), sodium azide (NaN₃), *N*-[2-hydroxyethyl]piperazine-*N'*-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES), Dithiothreitol (DTT), acide citrique anhydre (sans sodium), acide citrique trisodique, hexaferrocyanure de potassium trihydrate, (tri)chlorure de fer hexahydrate (FeCl₃·6H₂O), Diméthylformamide (DMF), diéthylether, molybdate d'ammonium, sodium phosphate (Na₂PO₄), Ammonium persulfate (APS), N,N,N',N'Tetraméthylethylenediamine (TEMED), le TRIZMA base (Tris), sodium dodecyl sulfate (SDS), Triton X100, *n*-octyl- β ,D-glucopyranoside (β -OG), acide chlorhydrique (HCl), soude (NaOH), les plaques de chromatographie sur couche mince, l'iode.

Les autres produits et leur origine sont listés ci-dessous :

Solutions d'Acrylamide/ bis acrylamide 40% et bleu de coomassie (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) ; Fluorescéine-maleimide (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) ; PEG5000-Maleimides (Laysan, Arab, AL, US) ;STI 571 (imatinib mesilate) (Novartis, Basel, Suisse).

Anticorps anti-PSA (PSA : prostate serum antigène) (Epsilon biotech, Hasselt Belgique) et anti I-CAM (CAM : Cellular adhésion molécule)(AbCam, Paris, France). (MM anticorps $\approx$ 150.000Da).

L'eau a été purifiée avec un système RiOs (Millipore, St Quentin en Yveline, France).

7.2 Tampons utilisés

Un tampon HEPES composé de 10 mM HEPES, 150 mM NaCl et 2 mM NaN₃ (tampon A) a été préparé en eau ultrapure et est utilisé dans la plupart des expériences, sauf indiqué. Le pH est de 7,4 pour la plupart des expériences, sauf indiqué.

Pour les réactions de couplage impliquant des thiols et des maléimides, le pH des solutions de protéines et de liposomes est de 6,3.

Le tampon A est supplémenté de CaCl₂ 2mM dans les expériences où il y a liaison de l'Anx5 ou d'une des protéines dérivés à des membranes anioniques.

Le tampon A est supplémenté avec 2mM EGTA pour les expériences où il faut soit reverser soit empêcher la liaison des Anx5.

Le tampon A est supplémenté avec 10mM d'acide citrique trisodique pour l'élution des magnétoliposomes sur colonne d'exclusion de taille.

Un tampon phosphate composé de 10mM Na₂PO₄, 110 mM NaCl et 2mM CaCl₂ pH 7,4 a été utilisé pour les études de liaison de liposomes sur des coupes de cerveau.

7.3 Préparation des liposomes

Les liposomes ont été préparés par hydratation de film lipidique suivie d'une extrusion. Les lipides sous forme de poudre sont initialement dissous en chloroforme puis mélangés selon les proportions souhaitées. Le solvant est ensuite évaporé sous vide dans un évaporateur rotatif pendant 20 min. Le film lipidique formé sur les parois est ensuite réhydraté avec du tampon. Ceci conduit à la formation de vésicules multilamellaires (MLVs) qui sont homogénéisées par trois cycles de congélation / chauffage / vortex. Les vésicules unilamellaires de grande taille (LUV) ont été formées par extrusion par passage de la solution de MLV une vingtaine de fois au travers d'un filtre de polycarbonate de pore de 0.1µm avec un extruder Liposofast (Avestin, Sodexim, France). Les vésicules unilamellaires de petite taille (SUV) ont été obtenues par sonication de la solution de MLV avec un sonicateur à pointe (Misonix, Farmingdale, NY), en mode pulsé, amplitude 20%, pendant 30 min avec l'échantillon étant maintenu dans de la glace.

Pour toutes les solutions utilisées, les lipides sont quantifiés par dosage phosphate avant utilisation selon la méthode de Rouser [191].

7.4 Production des Annexines

L'Annexine 5 native (Anx5 MM=35600), l'Anx5 mutante (Anx5-SH, MM=35600) [192], et les protéines de fusion (Anx5zz MM=50070 et Anx5ZZ-SH, MM=50070)[193], ont été produites par C. Gounou assistante ingénieur dans l'équipe LIMNBT. La séquence codante d'Anx5 de rat a été excisée du vecteur d'expression pKK233-2-Anx5 par digestion avec NcoI et clonée dans le vecteur d'expression pGELAF+ entre deux sites de restriction NcoI, pour former le vecteur d'expression pGEF-A5. Un double mutant (C314S ; T163C) a été construit dans lequel l'unique cystéine-SH présente dans la forme native de l'Anx5 de rat a été supprimée (C314S) alors qu'une cystéine a été introduite en position 163 (T163C). Le vecteur d'expression ainsi obtenu est nommé pGEF-A5B. La séquence codant pour le double mutant de l'Anx5 (C314S ; T163C) a été amplifiée par PCR, excisée par digestion par NcoI/BamHI et clonée dans le vecteur d'expression pET11b (GE-Healthcare), pour former le vecteur d'expression pET11b-Anx5-SH.

Pour former les protéines de fusion Anx5ZZ ou Anx5ZZ-SH le tag ZZ a été fusionné avec l'Anx5 ou l'Anx5-SH les vecteurs d'expressions obtenus sont nommés pGEF-A5-ZZ pour l'Anx5ZZ et pGEF-A5B-ZZ pour l'Anx5ZZ-SH.

Des cellules *Escherichia Coli* BL21 (DE3) ont été transformées par choc thermique avec le plasmide correspondant à la protéines qui doit être produite.

Les cellules ont été déposées en boîte de Petri sur du milieu LB contenant 100µg/mL d'ampicilline et incubés sur la nuit à 37°C. Une seule colonie a été récupérée et cultivée dans un milieu LB-ampicilin sur la nuit à 37°C. Un aliquote a été dilué dans 400ml de milieu LB-ampicilline pour obtenir une DO₆₀₀ de 0,1. L'ensemble a été incubé à 30°C jusqu'à ce que la DO₆₀₀ atteigne 0,7. L'expression des protéines a ensuite été induite par addition de 0,4mM IPTG et la culture a été poursuivie pendant 16H à 30°C.

Les cellules ont été récupérées par centrifugation (10 min, 4500rpm, 4°C). Le culot est resuspendu dans un volume approprié de 10mM Tris, 1 mM EGTA, 0,01% NaN₃, pH 7,5 pour obtenir une DO₆₀₀ calculée de 60. La suspension cellulaire a été soniqué à 4°C avec un sonicateur Branson250 opérant en mode pulsé ce qui correspond à cinq étapes de sonication à 13W pendant 1min avec des intervalles de 15s. Les fragments de membranes et les débris de grosses tailles ont été éliminés par centrifugation à 12000g pendant 2H à 4°C. Le surnageant, indiqué dans la suite l'extrait soluble, a été récupéré et stocké avant utilisation à 4°C.

Pour la purification l'extrait soluble a été filtré à travers des filtres de pores de 0,22µm et déposé par fraction de 4mL sur une colonne Superdex200 (GE-Healthcare) prééquilibrée et

éluée avec un tampon contenant 20 mM Tris, pH8, et 0,02%NaN₃ (Tampon A). Les fractions contenant les Anx5 ont été réunies et purifiées par chromatographie d'échange d'anion avec une colonne MonoQ HR5/5 (GE-Healthcare) prééquilibrée avec le tampon A. L'élution a été réalisée avec un gradient linéaire de NaCl en tampon A. L'Anx5 et L'Anx5ZZ éluent à approximativement à 200 mM NaCl, L'Anx5-SH et l'Anx5ZZ-SH à 230 mM NaCl. Le rendement est d'environ 25mg de protéines pure pour 400ml de culture.

Bien que les protéines Anx5-SH aient une tendance naturelle à s'oxyder et à former des dimères Anx5-S-S-Anx5 le rendement en dimère est très variable. Une méthode de production optimisées à été développée et consiste à mélanger de l'Anx5-SH avec de la dithiopyridine (DTDP) (Sigma-Aldrich) à un rapport molaire Anx5-SH/DTDP de 2/1 suivi d'une incubation sur la nuit à température ambiante. Les dimères Anx5-S-S-Anx5 ou Anx5ZZ-S-S-Anx5ZZ sont purifiés sur colonne monoQ élués avec un gradient de NaCl en tampon A et éluent à 300 mM NaCl. Ils sont stockés à 4°C avant utilisation.

7.5 Préparation des Anx5-SH et Anx5ZZ-SH

Pour produire des Anx5-SH ou des Anx5ZZ-SH, les dimères Anx5-S-S-Anx5 ou Anx5ZZ-S-S-Anx5ZZ (quantité maximale 2,5mg soit 70nmoles) sont réduits par incubation avec 10mM DTT (concentration finale) en HEPES pH 6,3 pendant 30 min. Les Anx5 réduites ont été purifiées sur une colonne de dessalage HiTrap (GE-Healthcare, Brabant, Belgique) équilibrée avec du tampon A pH 6,3.

7.6 Couplage covalent des Anx5-SH aux liposomes.

L'Anx5-SH est mélangée en quantité désirée avec des liposomes contenant des lipides maleimides en tampon A pH 6,3. Le mélange est incubé au moins 4 heures à température ambiante. La quantité de maleimides (Mal) disponibles pour le couplage covalent a été calculée en considérant que les lipides-Mal sont répartis de façon égale entre les deux feuillets de la bicouche et que seuls ceux du feuillet externe sont accessibles. Les quantités sont précisées dans chaque expériences.

7.7 Couplage covalent des Anx5-SH à des PEG-Maleimides

L'Anx5-PEG a été synthétisée par couplage covalent d'Anx5-SH avec des PEG5000–Maleimides. Les PEG5000-Maleimides sont stockés en DMF. Après prélèvement de la quantité désirée (3 fois la quantité d'Anx5-SH en mole), le DMF est évaporé sous azote, le tube plongé dans un bain d'eau bouillante. Les Anx5-SH en tampon A pH 6,3 sont ensuite ajoutées et le mélange est incubé au moins 4 heures à température ambiante pour réaction.

7.8 Couplage covalent des Anx5-SH à des fluoresceine-maleimide

L'Anx5ZZ fluoresceine a été synthétisée par liaison d'Anx5ZZ-SH avec des fluoresceine–Maleimides. La fluoresceine maleimide en poudre est dissoute dans du tampon A pH 6,3. L'Anx5ZZ-SH en tampon A pH 6,3 est placée en présence d'un excès de fluorescéine maléimide (excès de 7x). Après 4 heures d'incubation, l'excès de fluorophore est éliminé par filtration sur colonne de dessalage HiTrap (GE-Healthcare, Brabant, Belgique).

7.9 Gels d'acrylamide

Les gels d'acrylamide 10% en condition dénaturante (SDS-PAGE) sont constitués, pour le gel de séparation (cf II-1), d'eau, de Tris 1,5M pH 8,8 et de SDS 10% auxquels sont ajoutés de l'acrylamide/ bis acrylamide 40% de l'APS et du TEMED. Les volumes sont dans l'ordre : 47,9% / 25% / 1% / 25% / 1% et 0,1% du volume final. Les gel de concentration sont constitués d'eau, de Tris 1M pH 6,8 de SDS 10% d'acrylamide/ bis acrylamide 40% d'APS et de TEMED. Les volumes sont dans l'ordre : 75,3% / 12,5% / 1% / 10% / 1% et 0,2% du volume final.

Les gels en condition non dénaturantes sont les mêmes mais le SDS est remplacé par de l'eau. Pour les gels en conditions non dénaturantes où la liaison de l'Anx5 aux liposomes doit être préservée, les solutions de stacking et running comprennent en plus 2mM CaCl₂.

Le tampon de migration est constitué de glycine, de Tris et de SDS si les gels sont en conditions dénaturantes (14,4g de glycine / 3g de Tris / 1g de SDS pour 1L de solution). En conditions non dénaturantes ce tampon ne comprend pas de SDS. Pour les gels en conditions non dénaturantes où la liaison de l'Anx5 aux liposomes doit être préservée, le tampon de migration comprend en plus 2mM CaCl₂.

Après migration les gels sont colorés par incubation en bleu de coomassie pendant 1 heure suivi de décoloration en eau.

7.10 Caractérisation du couplage covalent des Anx5-SH à des liposomes ou à des PEG-maleimides

La quantification des Anx5 liées à un lipide Mal a été réalisée par SDS-PAGE avec un gel 10% comme indiqué en 7.9.

La totalité du milieu réactionnel a été déposé sur gel sans qu'il y ait séparation des éléments libre de ceux liés.

7.11 Liaison Ca^{2+} -dépendante des Anx5 à des liposomes

Pour la liaison des Anx5, des Anx5-PEG et / ou des Anx5ZZ ou Anx5ZZ-fluorescéines aux liposomes anioniques, les protéines sont incubées avec les liposomes en présence de 2mM CaCl_2 pendant 30 min. Pour des liposomes de 100nmètres il faut 4 μg d'Anx5 (ou 5,6 μg d'Anx5ZZ) pour 9 μg de lipides (ou 1,12 mole d'Anx5 pour 110 moles de lipides) pour avoir couverture totale de la surface des vésicules par les protéines.

7.12 Caractérisation de la liaison Ca^{2+} -dépendante des Anx5 à des liposomes

Les échantillons sont analysés en gel PAGE non dénaturant (sans SDS), en présence de Ca^{2+} 2mM dans le gel et dans le tampon de migration.

Pour les caractérisations par FRET les conditions sont précisées dans le paragraphe fluorescence.

7.13 Diffusion dynamique de la lumière

Les mesures de diffusion dynamique de la lumière ont été réalisées avec un goniomètre laser ALV, équipé avec un laser HeNe 22mW polarisé linéairement opérant à une longueur d'onde

de 632,8nm et un corrélateur digital multiple τ ALV-5000/EPP avec un temps d'échantillonnage initial de 125ns. Les solutions ont été maintenues à 25°C dans toutes les expériences. Le temps d'acquisition est de 300s. Chaque échantillon contient 200µg de lipides (250 nmoles) dans un volume de 900µl (soit 0,278 M). Les particules d'oxyde de fer sont à une concentration de $1,74 \times 10^{17}$ particules par litre dans 900 µl. Les mesures ont été réalisées à trois angles : 50°, 90°, 120°.

7.14 QCM-D

Les mesures QCM-D ont été réalisées avec un système Q-SENSE D300 ou avec un système Q-SENSE E4 (Q-SENSE, Gothenburg, Sweden). Avec le système Q-SENSE D300 un volume d'échantillon est apporté au niveau de la chambre où se trouve le cristal et le flux est arrêté pendant l'étape d'adsorption. Avec le système Q-SENSE E4 les échantillons sont apportés dans la chambre de mesure de façon continue à l'aide d'une pompe péristaltique qui permet le maintien d'un flux de 0,5 ml/min. Avant utilisation les cristaux de QCM-D ont été nettoyés par passage 30 min dans une solution de SDS 2% rincés avec de l'eau ultrapure et séchés sous azote puis exposition 15 min à l'UV-ozone.

Pour chaque expérience les SUV DOPC / DOPS (4 /1 en masse) sont à une concentration de 100µg / ml (126 µM) et les liposomes-Anx5 sont à une concentration de 130 µg_{phospholipides} / ml (220µM en lipides totaux) dans 1,5 ml.

7.15 Encapsulation de composés fluorescents

Le fluorochrome est encapsulé de façon passive. Le film lipidique est hydraté avec une solution contenant le fluorophore, les vésicules sont extrudées et les fluorochromes en excès sont éliminés par gel filtration sur une colonne d'exclusion de taille colonne 0,7x6cm (Øxh) séphacryl S400 (Amersham Bioscience, Buckinghamshire,UK). Les quantités de lipides récupérées sont déterminées par dosage phosphate [191].

7.16 Fluorescence

Toutes les mesures ont été réalisées sur un Perkin Ellmer LS55 (Burkinghamshire, UK) aux longueurs d'ondes d'émission et d'excitation de chaque fluorophore : pour le NBD

$\lambda_{\text{ex}}=460\text{nm}$ $\lambda_{\text{em}}=525\text{nm}$ pour la rhodamine $\lambda_{\text{ex}}=530\text{nm}$ et $\lambda_{\text{em}}=590\text{nm}$. L'ouverture des fentes est précisée pour chaque condition.

Les expériences concernant l'auto-quenching de la rhodamine, des solutions de concentrations croissantes de sulforhodamine B ont été préparées et l'intensité de fluorescence à $\lambda=590\text{nm}$ a été mesurée. L'ouverture des fentes est 2,5 pour l'excitation et l'émission.

Pour les expériences dans lesquelles le fluorophore est contenu dans l'intérieur aqueux des vésicules, 50 μg (63,6nmole) de lipides de sont placés en solution (volume final de 400 μl) et placé dans le spectrophotomètre. Pour libérer le fluorophore encapsulé, 100 μl de triton X100 (solution à 0,5% en volume).est ajouté. L'ouverture des fentes est 2,5 pour l'excitation et l'émission.

Pour les expériences de FRET, 30 μg (38nmole) de liposomes DOPC / DOPS / DOPE-rhodamine (69 /30 / 1 % en mole) sont incubés avec 1,125 μg (0,024nmole) d'Anx5-fluorescéine dans un volume total de 400 μl . L'ouverture des fentes est de 2,5 pour l'excitation et de 6,5 pour l'émission. La longueur d'onde d'excitation est $\lambda_{\text{ex}}=490\text{nm}$ et les intensités de fluorescence mesurées correspondent aux longueurs d'onde d'émission λ_{em} comprises entre 500 et 650 nm.

7.17 Ciblage de cellules *in vitro*

Des cellules leucémiques Bcr/Abl⁺ K562 ont été cultivées dans un milieu RPMI 1640 (Gibco, Cergy Pontoise, France) supplémenté avec 30% de sérum de veau fœtal et un mélange d'antibiotiques (100 unité.mL⁻¹ de pénicilline, 0,1 mg.mL⁻¹ de streptomycines (Gibco)). Les cellules ont été cultivées à 37°C en atmosphère humide avec 5% CO₂. A J₀ les cellules ont été resuspendues à 3.10⁵ cellules / mL-1. 24 heures plus tard (J₁) 2 μM de STI-571 ont été ajoutés pour induire l'apoptose. 24 heures plus tard (J₂) 30 $\mu\text{g}_{\text{phospholipid}}$ de liposomes à une concentration de 300 $\mu\text{g}_{\text{phospholipid}}$ / ml ont été ajoutés et incubés pendant une heure à 37°C avant séparation des vésicules non liés par centrifugation 5min à 200g à 25°C.

7.18 Microscopie confocale

L'acquisition des images avec un microscope confocal Zeiss LSM510 laser scanning équipé avec un laser HeNe et une lentille objectif Plan-Apochromat 63.0x1.4. Les cellules immergées dans 0,5 ml de milieu de culture ont été excitées avec le laser, à 543nm (intensité à 60% de sa

valeur maximale) et l'émission observée à travers un filtre pour les longueurs d'onde de 560 nm.

7.19 Enrobage (coating) des nanoparticules de maghémite par le citrate

Les nanoparticules de maghémites nous ont été fournies par Guerbet (Aulnay-sous-bois, France) et S.Mornet (ICMCB). De l'acide citrique pH1-2. Le mélange acide citrique-particules d'oxyde de fer est réalisé selon la séquence acide citrique puis particules d'oxyde de fer. La proportion du mélange est : 400mg d'acide citrique (2,08 mmoles) en poudre pour une solution de particules contenant 2,4 mmoles de fer. L'acide citrique en excès est enlevé par sédimentation des particules par centrifugation à 4500rcf pendant 3 min et prélèvement du surnageant. Le culot de particules est resuspendu par ajout d'un volume de soude 0,2M, variable selon la concentration finale souhaitée. Ces opérations sont répétées entre 3 et 10 fois en fonction des concentrations finales désirées, jusqu'à ce que les particules ne sédimentent plus lors de la centrifugation. Le pH est alors ajusté à 6,3 par ajout de soude 5M. La solution obtenue est ensuite filtrée sur un filtre de 100nm (Millex, Dutcher, France). La concentration en particules est déterminée par dosage à l'hexaferrocyanure de potassium (comme décrit plus bas).

7.20 Formulation des magnétoliposomes

Les liposomes sont préparés par hydratation de film lipidique et extrusion. Les lipides sous forme de poudre sont initialement dissous en chloroforme puis mélangés selon les proportions souhaitées. Le solvant est ensuite évaporé sous vide dans un évaporateur rotatif pendant 20 min. Le film lipidique est hydraté par une solution de particules de maghémite stabilisées par du citrate, préparées comme indiqué précédemment (7.19). Les vésicules sont calibrées par extrusion par passage de la solution de MLV (10mg lipides / ml soit 12,6 mM) une vingtaine de fois au travers d'un filtre de polycarbonate de pores 0,2µm puis 0,1µm de diamètre avec un extruder Liposofast (Avestin, Sodexim, France). Les particules de fer non encapsulées sont séparées des vésicules par gel filtration sur une colonne colonne 1cm x 30cm (Øxh) séphacryl S1000 (Amersham Bioscience, Buckinghamshire,UK). Le tampon utilisé pour l'élution des liposomes est un tampon A pH 7,4 supplémenté avec 10mM de citrate trisodique. Les fractions collectées contenant des vésicules sont réunies, un volume de NaCl est ajouté de

façon à être à une concentration finale de 1M NaCl et l'ensemble est incubé sur la nuit. L'échantillon est ensuite centrifugé 10 min à 1000g et le surnageant est séparé du culot de particules de fer précipitées. Les magnétoliposomes sont ensuite concentrés sur une colonne magnétique MACS Column (LS column, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach), excepté dans le cas de la caractérisation des échantillons après colonne d'exclusion de taille,. Le volume récupéré est d'1ml environ. Ceci permet, en plus de les concentrer, d'éliminer l'excès de NaCl en éluant la colonne avec un volume de tampon A pH 7,4 (5ml).

Les lipides sont dosés par dosage phosphate selon la procédure mise au point par Rouser [191] et la quantité de particules d'oxyde de fer est déterminée par dosage à l'hexaferrocyanure de potassium (décrit en 7.21).

Pour indication, les concentrations en lipides après colonne d'exclusion de taille (et ajout de NaCl) sont d'environ 0,3 mg_{phospholipides}/ml ($\approx 0,4$ mM) dans 9ml environ pour des liposomes neutres et quelle que soit la concentration de la solution mère de particules utilisée. Après colonne magnétique, la concentration en lipides est d'environ 1 mg_{phospholipides}/ml ($\approx 1,3$ mM) dans 1ml environ pour des magnétoliposomes neutres préparés avec une solution mère de particules de $1,74 \cdot 10^{20}$ particules / litre.

7.21 Dosage du fer

La quantité de nanoparticules de maghémite a été déterminée par dosage du fer à partir de l'hexaferrocyanure de potassium. Pour cela une gamme étalon est réalisée à partir d'une solution de chlorure de fer ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) de concentration 0,01 M. Les quantités utilisées sont comprises entre 0 et 320 nmoles, et les volumes sont complétés avec de l'eau pour obtenir un volume final de 50 μ l.

Pour le dosage de particules de maghémite encapsulées dans des liposomes, les solutions de vésicules sont évaporées à 90° puis dissoutes par ajout de 33 μ l de β OG à 1M et le volume est complété à 50 μ l avec 17 μ l d'eau. Un volume de 550 μ L d'HCl à 5,5 M est ensuite ajouté pour dissoudre les particules d'oxyde de fer. La coloration est réalisée en ajoutant 500 μ l de ferrocyanure préparé extemporanément à partir de 1,5 g d'hexaferrocyanure (II) de potassium trihydrate dissous dans 15 mL d'eau. Le volume final dans chaque tube est donc de 1100 μ L.

La densité optique (DO) est mesurée à la longueur d'onde de 720 nm, et la concentration de l'échantillon est déduite de la droite d'étalonnage. La quantité de fer en mole a été convertie en quantité de particules en se référant à la fiche technique fournie par le fabricant, Guerbet, qui indique que 2,4 mole de fer correspondent à $1,9 \times 10^{20}$ particules. Les particules

fournies par S. Mornet ont été utilisées dans des expériences pour lesquelles la quantité de fer n'a pas été dosée.

7.22 Microscopie électronique à transmission

Les échantillons de particules pour la coloration négative sont à une concentration de $1,74 \times 10^{17}$ particules par litre. Les échantillons de coloration négative sont déposés sur des grilles de cuivre (Teambar, Agar, Standsted, UK) recouvertes au préalable d'un film de carbone. Pour l'observation des cellules et tissus, les échantillons sont fixés 2 heures en glutaraldéhyde 2% (Agar), paraformaldéhyde 4% (Agar), tampon cacodylate pH7,4 (Agar) post fixé 1h à 4°C en tetroxyde d'osmium 1% (Agar) pour ponter les lipides. Les échantillons sont ensuite déshydratés dans des bains successifs d'éthanol de plus en plus concentrés (jusqu'à 100%) puis enrobés dans une résine epon-araldite (Agar, Standsted, UK). Après polymérisation, des coupes fines de 75nm d'épaisseur sont réalisées avec un ultramicrotome Leica. Les coupes sont prélevées sur une grille de cuivre (Teambar, Agar, Standsted, UK) et colorées avec 1% acétate d'uranyle pendant 5 min. Les échantillons sont observés sur un TECNAI CM120 (FEI) à 120 kV. Les échantillons pour la cyomicroscopie électronique à transmission sont à une concentration d'environ $1 \text{ mg}_{\text{phospholipid}} / \text{ml}$ (1,3mM). Ils sont déposés sur une grille de cuivre recouverte d'un film de carbone perforé (Lacey-formar, Tedpella, Eloise, Roissy, France), congelés dans de l'éthane liquide à l'aide d'une guillotine (Leica) et observés à basse température sur un TECNAI F20 (FEI) à 200kV. Les images sont enregistrées avec une caméra USC1000-SSCCD (Gatan).

7.23 Action de la Phospholipase D

La phospholipase D (PLD) utilisée est celle de streptomyces. Sp type VII. 1mg de lipides (PC) ($\approx 1,3 \mu\text{moles}$) est traité avec 3 unités de PLD. Le pH est de 7,4 tamponné par de l'HEPES 10 mM. Le mélange est incubé sur la nuit. Les échantillons sont soit utilisés en l'état pour les caractérisations sur gel d'acrylamide soit utilisés pour la chromatographie sur couche mince.

7.24 Chromatographie sur couche mince

Les échantillons de liposomes traités à la PLD en tampon sont évaporés et resuspendus en chloroforme puis la quantité de lipides est dosée. Dans chaque cas 50 µg de lipides sont déposés sur une plaque de chromatographie sur couche mince (CCM) qui est placée dans du tampon de migration (chloroforme / méthanol / eau ; 63 / 35 / 2 ; v / v / v), dans une enceinte fermée. Les lipides sont révélés en déposant la plaque dans une cuve contenant des cristaux d'iode.

7.25 Ciblage de thrombus *ex vivo* par des magnétoliposomes

L'adressage des liposomes fonctionnalisés au niveau de la plaque d'athérome a été réalisé par des expériences *ex vivo*. Les liposomes sont constitués de PC : PS (7 : 3 rapport molaire) et encapsulent des particules d'oxyde de fer. Ces vésicules sont fonctionnalisées par l'anticorps anti- α IIb β 3 (qui nous a été fourni par G. Clofent-Sanchez (RMSB, Bordeaux)), lié aux liposomes grâce à l'Anx5ZZ de façon à avoir 90 anticorps par liposome. Le reste de la surface est couverte par des Anx5-PEG. Une portion d'artère iliaque a été prélevée sur des lapins soumis à un régime hypercholestérolémiant. Ces opérations ont été menées par S. SANCHEZ, animalier du RMSB (Bordeaux) sous la direction G. Clofent-Sanchez. Les magnétoliposomes fonctionnalisés (200 µl à 1 mg / ml ; 1,26 mM) ont été incubés avec la portion d'artère puis lavés par passages successifs en tampon A + CaCl₂ 2 mM afin d'éliminer les vecteurs non liés. L'échantillon est ensuite fixé en résine selon la procédure décrite en 7.21.

7.26 Ciblage de zones inflammées de cerveau de rats

La préparation des animaux et les coupes de cerveau ont été réalisées par A. Vekris du laboratoire de K. Petry (INSERM EA 2966). L'inflammation a été provoquée chez des rats au niveau du cerveau par choc thermique en apposant un coton gelé sur le crâne de l'animal. Pour les essais *ex vivo* le cerveau est fixé en paraformaldéhyde en perfusant le rat avec une solution tamponnée de paraformaldéhyde qui va remplacer le sang dans le système circulatoire. Le cerveau est ensuite prélevé, découpé et les tranches récupérées sont incubées

avec des solutions de liposomes (0,1mg /ml ; 0,126mM dans 500µl) fonctionnalisés par des Anx5ZZ-Anticorps anti I-CAM (90 anticorps / liposome). Après lavage par passages successifs dans des solutions tamponnées (tampon phosphate +CaCl₂ 2mM) pour éliminer les vésicules non liées, les coupes de cerveau ont été placées entre lame et lamelles et visualisées par microscopie de fluorescence.

Pour les expériences *in vivo*, 300µl de liposomes fonctionnalisés par des Anx5ZZ-Anticorps anti I-CAM (90 anticorps / liposome ; concentration en liposomes de 1mg_{lipides}/ml ; (1,26mM)) ont été injectés au niveau de la queue de rats pour lesquels, soumis au choc thermique indiqué précédemment. Les animaux ont été sacrifiés deux heures après l'injection. De la même façon que pour les expériences *ex vivo*, le cerveau est fixé en paraformaldéhyde en perfusant le rat avec une solution tamponnée de paraformaldéhyde. Le cerveau est ensuite prélevé et découpé en tranches qui sont placées entre lame et lamelles et visualisées en microscopie de fluorescence.

III Résultats

L'objectif de mon travail de thèse a été la formulation de liposomes pour une utilisation comme outil de délivrance de principes actifs chez les êtres vivants. Les principes actifs considérés ici comprennent les produits d'imagerie (pour la fluorescence ou l'IRM) et les médicaments. La mise au point de tels objets implique l'attribution d'une spécificité pour une pathologie ou une zone de l'organisme et leur association avec le composé d'intérêt à vectoriser. Le principe actif a été essentiellement inséré dans l'espace interne aqueux des vésicules. Les composés encapsulés ont été des fluorophores, pour donner un signal en microscopie de fluorescence et modéliser le comportement des médicaments et des particules de maghémite (d'oxyde de fer) pour obtenir un signal en IRM et en microscopie électronique.

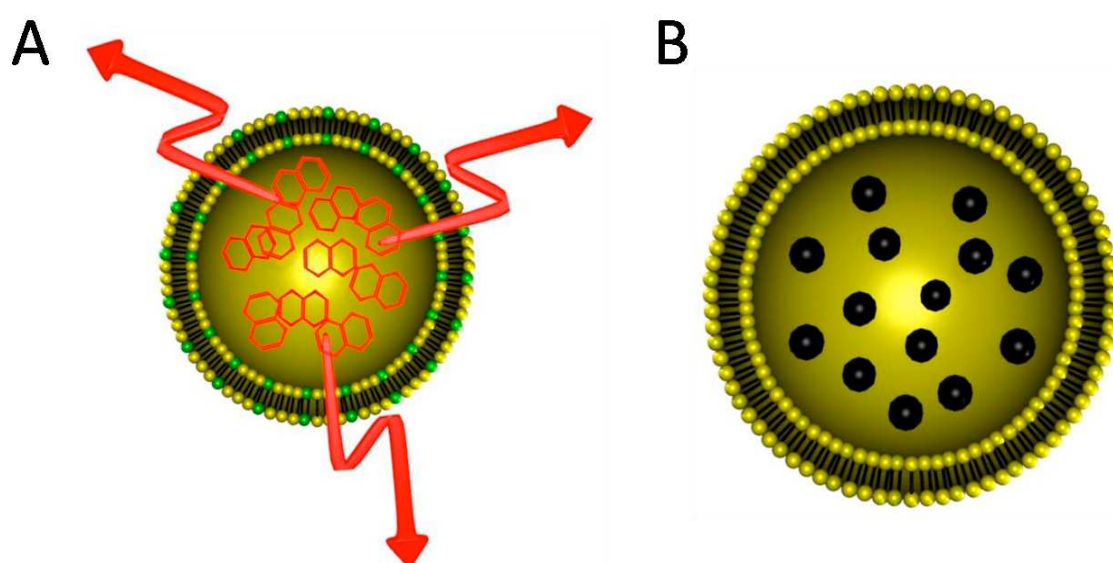


Figure III-1 : Représentation schématique de liposomes encapsulant dans le volume interne : A) des fluorophores B) des particules de maghémite

L'attribution d'une spécificité pour une cible repose sur l'utilisation d'éléments de ciblage qui ont été soit des Annexine 5 (Anx5) liés covalamment aux liposomes soit des anticorps liés en surface des vésicules grâce à des Anx5zz. Cette fonctionnalisation met donc en jeu, dans les deux cas, des Anx5, des protéines qui peuvent lier les membranes lipidiques présentant des phosphatidylsérines (PS), en présence de calcium, avec une très haute affinité. Nous avons tiré parti de cette spécificité en utilisant tout d'abord l'Anx5 comme ligand, pour conférer aux liposomes une capacité de liaison aux membranes exposant des PS. Pour cela, un mutant de l'Anx5 exposant un thiol, l'Anx5-SH, a été couplé à des maleimides situés à l'extrémité de lipides-PEG constitutifs des liposomes. Le vecteur ainsi constitué présente alors l'Anx5 de telle façon qu'elle puisse reconnaître les membranes exposant des PS. La protéine peut alors

jouer le rôle de ligand pour adresser le liposome au niveau des membranes-cibles qu'elle reconnaît (figure II 2; A).

La très haute affinité de l'Anx5 a été utilisée pour lier des anticorps en surface de liposomes dont les membranes contiennent des PS. Pour cela nous avons utilisés une Anx5 fusionnée avec le tagZZ, un élément de la protéine A qui a la propriété de lier des anticorps. L'Anx5ZZ joue le rôle d'intermédiaire de couplage avec une partie, le tagZZ, qui lie les anticorps et l'autre, l'Anx5, qui permet la fixation de ces anticorps en surface des liposomes anioniques (figure 2, B) .

Dans les deux cas, utilisation comme élément d'adressage et comme intermédiaire de couplage, nous avons donc tirés parti de l'affinité et de la spécificité de l'Anx5 pour les membranes exposant des PS. Dans un cas la membrane exposant des PS est la cible des liposomes et dans l'autre c'est la bicouche des vecteurs à fonctionnaliser (figure 2). Dans les deux cas, ces Anx5 sont impliquées dans la fonctionnalisation des liposomes, en temps que ligand ou via la liaison d'anticorps.

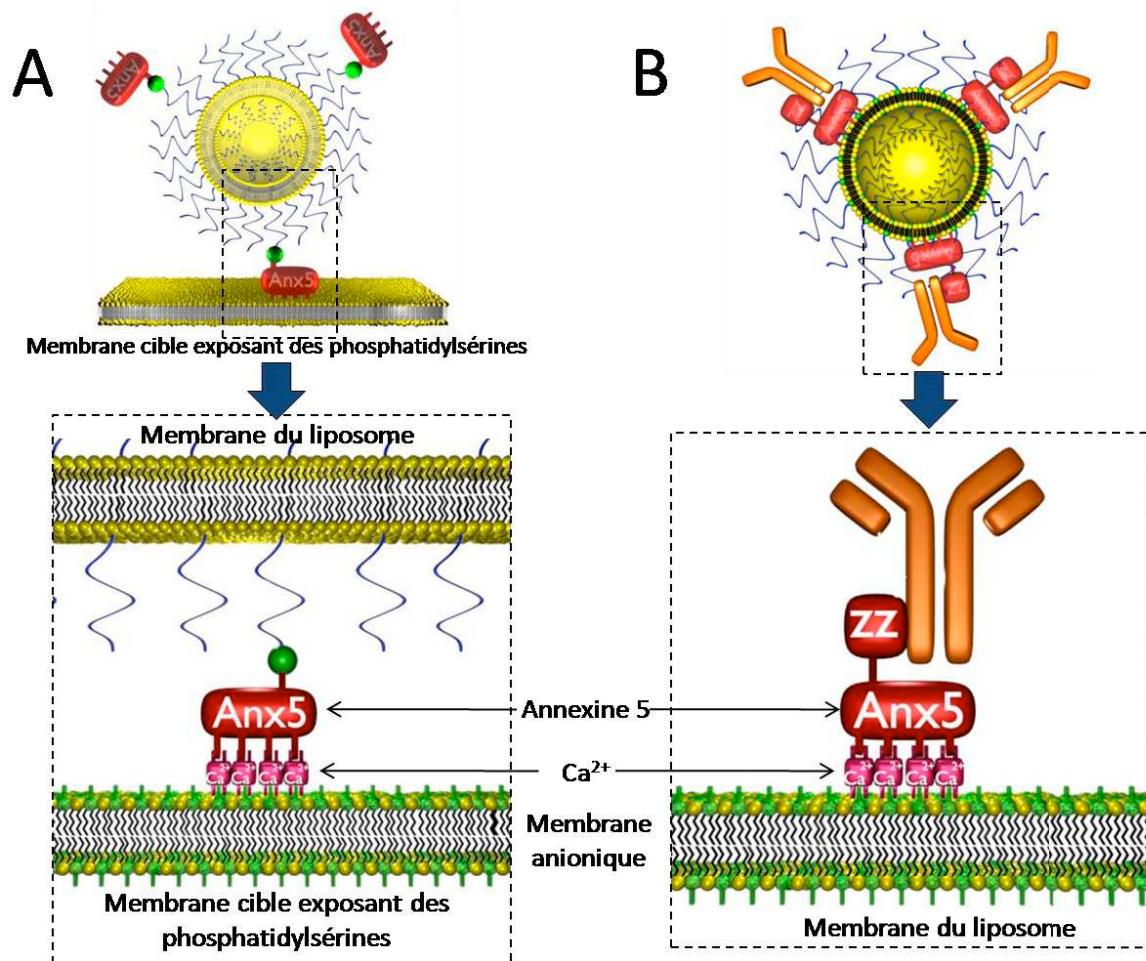


Figure III-2 : Utilisation d'Anx5 pour le ciblage de liposome A) Anx5 comme élément d'adressage vers les membranes anioniques B) Anx5zz comme intermédiaire pour la liaison d'anticorps sur les vésicules

Ce travail est organisé en trois grandes parties : 1) fonctionnalisation de liposomes par l'Anx5, qui est utilisée comme élément de ciblage pour l'adressage de liposomes encapsulant un composé fluorescent ; 2) encapsulation de nanoparticules de maghémite dans des vésicules non chargés puis dans des liposomes anioniques et 3) fonctionnalisation de liposomes chargés négativement en utilisant l'Anx5zz comme intermédiaire pour lier des anticorps à la surface de la membrane.

1 Fonctionnalisation de liposomes par l'Anx5 pour cibler des membranes exposant de la PS

L'objectif est de réaliser des liposomes pour cibler les zones d'un organisme vivant au niveau desquelles il y a exposition de PS. Pour cela des Anx5 exposant un thiol ont été greffées sur des liposomes, formulés pour être furtif in vivo et encapsulant un fluorophore, afin d'imager les cellules exposant des PS.

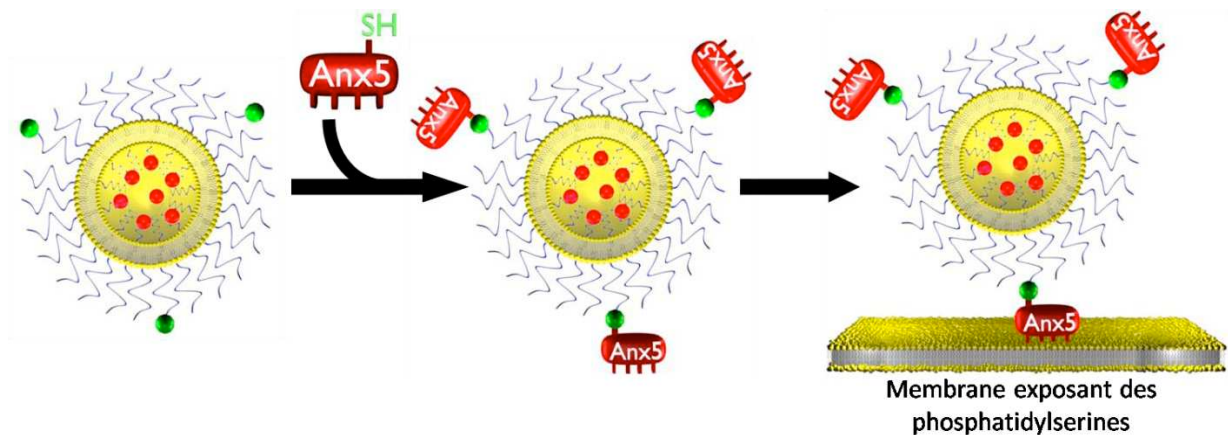


Figure III-3 : Fonctionnalisation de liposomes encapsulant un fluorophore pour cibler et imager les membranes exposant des phosphatidylsérines.

Les Anx5 utilisées sont des mutants créés pour présenter un thiol de façon accessible. La cystéine présente à l'intérieur de la protéine native a été remplacée par une sérine alors qu'une cystéine a été introduite en remplacement de la thréonine en position 163 [192]. L'unique cystéine de l'Anx5 obtenue est ainsi située à une position dans laquelle le thiol est très accessible pour un couplage chimique et située sur la face exposée au solvant de façon à ce que le greffage ne perturbe pas la reconnaissance des PS. La protéine peut ainsi être couplée efficacement et de manière orientée sur le liposome.

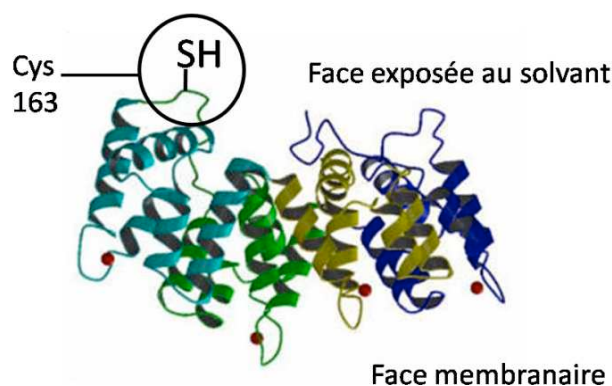


Figure III-4 : Position du thiol dans l'Anx5 (C314S ; T163C)[192]

D'un point de vue de la formulation des vésicules, la morphologie et la composition membranaire sont celles de vésicules optimisées pour une utilisation *in vivo* et donc une furtivité vis-à-vis du système immunitaire [71] : la taille est calibrée à 100nm et la membrane est composée de PC, de cholestérol (25% en mole), de lipides-PEG (5% en mole maximum). Pour réaliser le greffage de l'Anx5-SH, des lipides portant une fonction chimique sur la tête polaire sont ajoutés à la composition membranaire. Le groupement chimique est un maléimide, fonction qui réagit covalentement avec un thiol pour donner une liaison thioéther.

Pour que les vésicules fonctionnalisées servent d'outil d'imagerie, un fluorophore leur a été associé. Ce marqueur a été encapsulé dans l'intérieur aqueux. Cet intérieur constitue alors un réservoir qui peut être utilisé pour d'autres applications telles que le transport de médicaments. Le fluorophore peut être considéré comme un composé modèle permettant d'évaluer les capacités d'encapsulation et de transport des vecteurs. Les liposomes ainsi constitués sont donc potentiellement utilisables pour du diagnostic ou du transport de composés thérapeutiques vers les membranes des cellules exposant des PS.

Cette exposition est une caractéristique des zones d'apoptose qui sont associées à des pathologies telles que l'athérosclérose, l'ischémie ou certains cancers [169, 175] et de l'activation des plaquettes[170]. Comme l'Anx5 possède une très haute affinité pour les membranes anioniques en présence de Ca^{2+} , l'utilisation de cette protéine comme élément d'adressage doit permettre un adressage efficace des vésicules vers ces zones particulières.

La première partie de ce manuscrit a pour objectif la liaison d'Anx5-SH sur des liposomes, la caractérisation de ce couplage et de ses effets sur la dispersité des dispersions et l'intégrité des membranes. Elle comportera aussi la corrélation entre le degré de fonctionnalisation et l'efficacité de ciblage et l'évaluation de la capacité des vésicules encapsulant un fluorophore à reconnaître et imager de façon spécifique des cellules en apoptose.

Le couplage covalent a été réalisé avec deux types de lipides portant une fonction maléimide. Après optimisation, un des lipides maléimide a été sélectionné. Une quantification précise de la liaison covalente a alors pu être effectuée par gel de polyacrylamide (PAGE). L'effet de la fonctionnalisation sur la taille et la dispersité des solutions de liposomes a été déterminé par diffusion dynamique de la lumière (DLS). La capacité d'adressage des vésicules par l'Anx5 a dans un premier temps été vérifiée sur des membranes modèles par QCM-D puis l'efficacité de liaison à ces membranes modèles a été estimée de façon systématique en fonction de la densité de ligand par liposome. Le suivi des fuites de fluorophores a permis d'évaluer l'effet de la fonctionnalisation sur l'intégrité membranaire ainsi que la stabilité d'encapsulation de composés fluorescents dans les vecteurs. Enfin la capacité des liposomes fonctionnalisés à adresser des éléments encapsulés au niveau de cellules présentant des PS a été évaluée *in vitro* sur des cellules en apoptose.

1.1 Couplage covalent de l'Anx5 aux liposomes

Le couplage covalent de l'Anx5 à des liposomes possédant des lipides maléimides a été caractérisé de façon à contrôler la densité de ligand en surface des vésicules. Cette détermination a été réalisée par SDS-PAGE, une technique qui permet la séparation des protéines d'un échantillon. Initialement deux types de lipides maléimides ont été utilisés. Les étapes pour la mise au point du couplage qui sont présentées ont consistées : i) à mettre en évidence la liaison covalente ii) à identifier un contaminant limitant l'efficacité de liaison puis iii) à quantifier les protéines liées par chacun des lipides afin de sélectionner celui qui permette d'effectuer la liaison covalente avec le rendement le plus élevé.

1.1.1 Mise en évidence de la liaison covalente

Les deux lipides maléimides utilisés pour le couplage covalent de l'Anx5-SH ont été le DOGP β_4 AlaMal (donné par B.Frisch) et le DSPE-PEG-Mal(Avanti polar lipid).

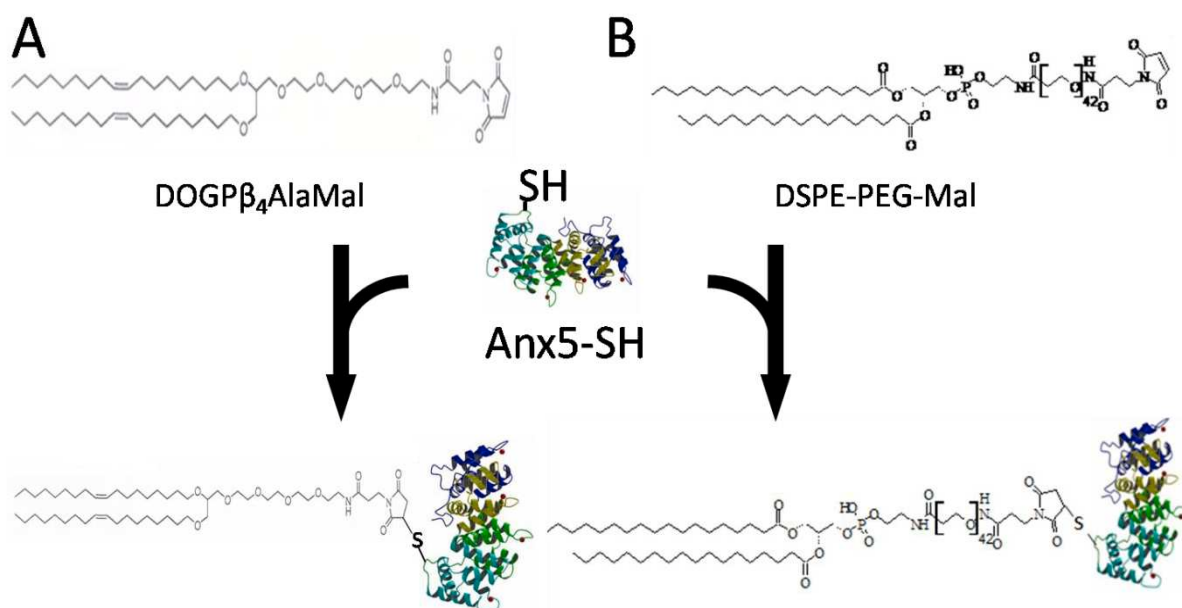


Figure III-5 : Lipides maléimides utilisés pour la liaison de l'Anx5-SH A) DOGP β_4 AlaMal B) DSPE-PEG-Mal

Le DOGP β_4 AlaMal est un lipide non chargé, ne possédant pas de phosphate et présentant une tête polaire de petite taille constituée d'une courte chaîne de PEG formée de 4 unités oxyde d'éthylène et terminée par la fonction maléimide. Le DSPE-PEG-Mal possède quant à lui un phosphate et une charge au niveau de ce phosphate. C'est un lipide PEG2000 dont l'extrémité de la chaîne de PEG (formée de 42 unités oxyde d'éthylène) est terminée par le maléimide. Ces lipides sont constitutifs des membranes des liposomes et l'Anx5-SH est ajoutée à la solution de vésicules pour se lier avec les maléimides.

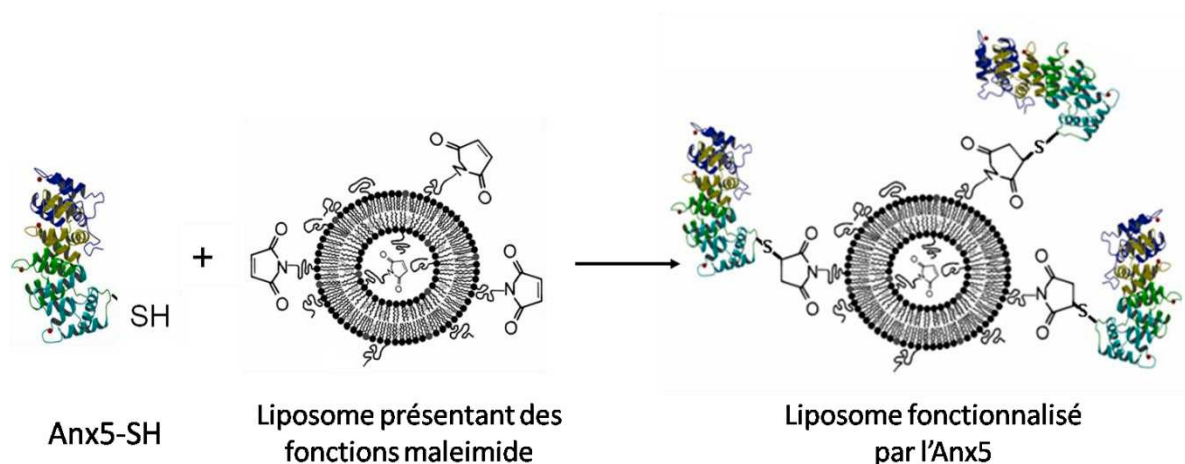


Figure III-6 : Schéma du couplage covalent de l'Anx5-SH à des liposomes présentant des fonctions maléimides.

Après incubation ce mélange est placé en SDS, c'est-à-dire en conditions dénaturantes pour être analysé par SDS-PAGE. Le SDS étant un détergent il dissout les vésicules lipidiques et dénature les protéines qui sont séparées sur gel en fonction de leur taille. Un des premiers gels mettant en évidence le couplage a été obtenu pour le DSPE-PEG-Mal. Les liposomes sont constitués de DOPC/Cholesterol/DSPE-PEG-Mal (74/25/1 % en mole) et l'Anx5-SH est en quantité telle qu'il y a un rapport molaire Anx5-SH : maléimides exposés à l'extérieur de la vésicule de 1 : 1.

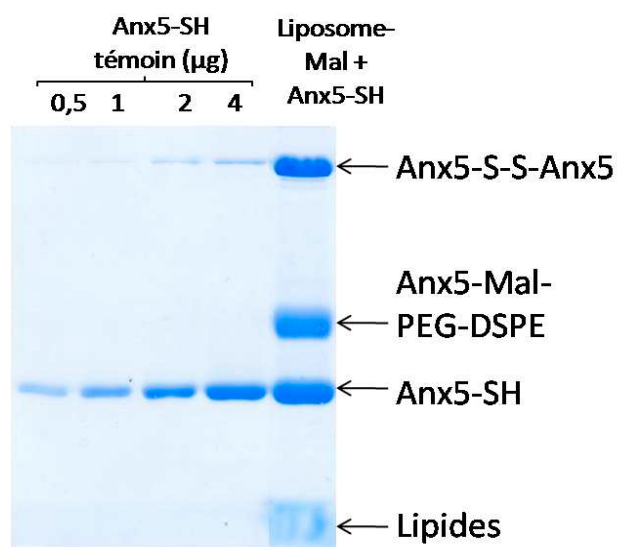


Figure III-7 : Analyse du couplage covalent de l'Anx5-SH à des liposomes contenant des DSPE-PEG-Mal, par SDS-PAGE. Les quatre premiers puits correspondent à l'Anx5-SH seule en quantité croissante fournissant une gamme de référence des quantités d'Anx5 ; le dernier puits correspond au mélange liposome maléimide : Anx5-SH. La quantité de liposomes déposée est de 70 µgDOPC (119 nmole de lipide) et la quantité d'Anx5-SH est de 17,5µg. Les liposomes sont constitués de DOPC/Cholesterol/DSPE-PEG-Mal (74/25/1 % en mole) et l'Anx5-SH est en quantité telle qu'il y a un rapport stœchiométrique molaire Anx5-SH : maléimides exposés à l'extérieur de la vésicule de 1 : 1.

L'Anx5-SH témoin indique que cette protéine est présente sous deux formes : une forme très majoritaire, représentée par une bande épaisse et intensément colorée, qui correspond à la l'Anx5-SH monomérique et une forme très minoritaire représentée par une bande fine et peu colorée, qui correspond à un dimère d'Anx5-SH liées entre elles par un pont disulfure. Lorsque le mélange liposome-maléimide Anx5-SH est déposé sur le gel il apparait quatre bandes. La bande large du bas représente les lipides constitutifs des vésicules. Comme il ne s'agit pas de protéines le marquage des lipides est souvent décoloré lors des lavages du gel et

n'est alors plus visible. Les bandes de l'Anx5-SH et du dimère apparaissent aussi et une bande légèrement retardée par rapport à l'Anx5-SH est observée. Elle indique la présence d'Anx5 qui est liée à un lipide-PEG-Mal et qui, étant plus lourde, migre moins loin que l'Anx5-SH. La taille et l'intensité des bandes indiquent que moins d'un tiers des protéines sont liées et qu'il se forme une quantité importante de dimère, qui est alors en proportion beaucoup plus importante que les proportions constatées avec le témoin.

1.1.2 Optimisation du couplage covalent

Comme le couplage de l'Anx5-SH semble limité, notamment par la formation de dimère, nous avons eu recours aux informations apportées par d'autre type de gel pour optimiser cette liaison. Les gels d'acrylamides réalisés en conditions non dénaturantes apportent une information supplémentaire quant aux Anx5-SH non liées. Alors qu'en gel dénaturant les liposomes sont dissous et les protéines dénaturées, en gel non dénaturant les liposomes sont intacts et les protéines à l'état natif. Dans ces conditions les liposomes sont trop volumineux pour entrer dans les mailles du gel et, étant à l'état natif, retiennent les Anx5 liées covalamment à leur surface. Seuls les Anx5-SH non liées et les dimères Anx5-S-S-Anx5 sont observés. De plus la séparation des protéines ne se fait pas uniquement en fonction de la masse mais en fonction de la masse, de la charge et de la taille et ainsi des différences subtiles entre deux isoformes peuvent influencer la migration d'une même protéine. Différentes Anx5 et le mélange liposome-Maléimide Anx5-SH ont été mis à migrer en gels dénaturant et non dénaturant.

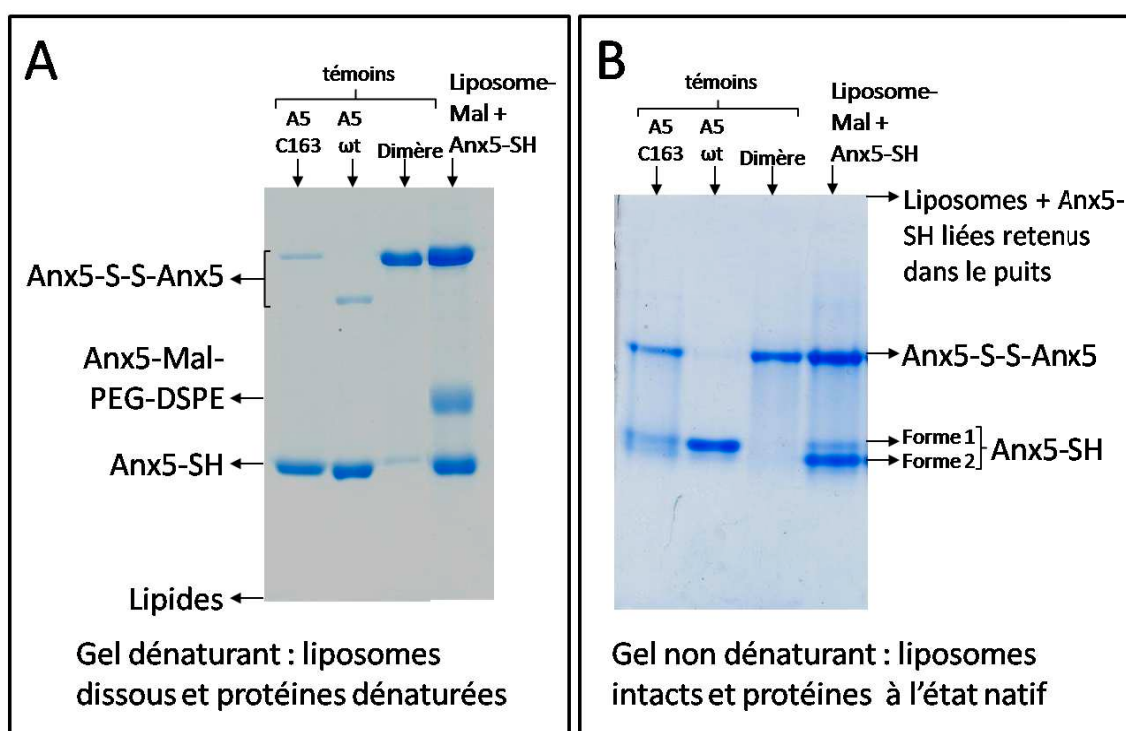


Figure III-8 : Comparaison des profils de migration des Anx5 en gels dénaturant(A) et non dénaturant(B). A) gel dénaturant : dispersion des liposomes et migration des protéines en fonction de leur masse ; B) gel non dénaturant : rétention des liposomes et des Anx5-SH liées en haut du gel et migration des Anx5-SH non liées aux liposomes en fonction de leur masse, charge et forme. 3µg de protéines sont déposés pour les protéines témoins. 60 µg de lipides et 15µg de protéines sont déposées pour les associations liposomes-Anx5-SH.

La comparaison entre les profils des Anx5 sauvages (wt) (c'est-à-dire non mutées) et mutantes (Anx5-SH) sur les deux types de gels renseigne sur la formation de dimère et sur la présence de deux formes pour l'Anx5 monomère. Le gel dénaturant indique que l'Anx5 wt et l'Anx5-SH forment toutes les deux du dimère qui ne migre pas au même endroit. Ces dimères sont a priori présents en solution. Sur gel non dénaturant l'Anx5-SH forme une quantité importante de dimère alors que l'Anx5 wt, dont le thiol est enfoui à l'intérieur, n'en forme pas. La très bonne accessibilité du thiol de l'Anx5-SH, associée à la proximité des protéines lors de l'étape de concentration des protéines lors de la migration, est probablement responsable de cette dimérisation. Les dimères présents en quantité importante sur le gel non dénaturant ne sont donc a priori pas présents en solution mais se forment sur gel si le thiol est accessible. En ce qui concerne la forme monomère, le gel dénaturant indique la présence d'une seule forme alors que sur gel non dénaturant il y a deux formes distinctes, que nous appellerons forme 1 pour celle qui migre le moins loin et forme 2 pour celle qui migre le plus loin. L'influence

conjointe des facteurs masse, charge et forme sur la migration rend difficile l'interprétation de cette différence. Néanmoins il apparaît que la forme 1 est très majoritaire pour l'Anx5 ω t, que la forme 2 est présente en proportion très faible et qu'il en est de même pour le peu d'Anx5-SH qui n'a pas formé de dimère. Le gel non dénaturant permet donc de distinguer les deux formes monomériques des Anx5.

Lors du dépôt du mélange liposome-maléimide Anx5-SH sur gel non dénaturant, seules les protéines non liées sont analysées, les autres restant associées aux liposomes, retenus dans la zone de concentration. Il apparaît sur ce gel que l'Anx5-SH non liée aux vésicules est encore présente en proportion importante sous forme de monomère. La forme monomère majoritaire est la forme dite forme 2 qui est normalement très minoritaire. Lors de son mélange avec les liposomes maléimides, il y a donc une ou plusieurs modifications au niveau de l'Anx5-SH qui conduisent au déplacement des monomères de la forme 1 vers la forme 2.

Le gel dénaturant pour lequel les liposomes sont dissous et pour lequel toutes les protéines migrent indique qu'une petite partie des Anx5-SH a liée des lipides maléimides. Le reste des protéines est soit sous forme de monomères soit sous forme de dimères. La proportion de ce dimère est beaucoup plus importante que celle observée pour les témoins et se forme donc lors du mélange des Anx5-SH avec les liposome-Maléimides. Le gel dénaturant renseigne donc sur la liaison des Anx5-SH à des lipides maléimides et sur la formation de dimère

Les gels dénaturant et non dénaturant indiquent donc que lors du mélange de l'Anx5-SH avec des liposomes-maléimide seule une petite proportion de protéines se lie sur des lipides maléimides. La majorité des protéines n'est pas liées au maléimide et est présentes sous forme de dimère et sous une forme de monomère qui est normalement minoritaire. La liaison aux maléimides est donc limitée par deux réactions parasites : formation de dimère et déplacement de la forme monomère vers une isoforme normalement minoritaire.

Le problème de réaction parasite a alors été investigué de façon systématique en utilisant comme évidence de ces réactions le déplacement du monomère de la forme 1 vers la forme 2 en gel non dénaturant. Il est apparu que ces réactions secondaires étaient dues à un élément parasite qui se liait notamment sur le thiol des Anx5-SH et qui était présent dans la solution dans laquelle étaient suspendues les vésicules, quelle que soit leur composition lipidique. Il a alors semblé qu'il pouvait s'agir d'un résidu de solvant. En effet, dans la technique de réhydratation de film lipidique utilisée pour synthétiser les vésicules, les lipides en poudre sont dissous en chloroforme, puis le chloroforme est évaporé. Ensuite le film lipidique formé est solubilisé en diéthyléther qui est à son tour évaporé pour éliminer les résidus de chloroforme et enfin le film lipidique obtenu est solubilisé en solution aqueuse. Pour tester

l'hypothèse d'un résidu de solvant, des lipides en poudre ont été resuspendus, soit directement en tampon, soit en chloroforme uniquement, soit en chloroforme puis en diéthyléther. Les liposomes obtenus sont ensuite mélangés avec de l'Anx5-SH et l'effet sur la protéine est évalué en gel non dénaturant.

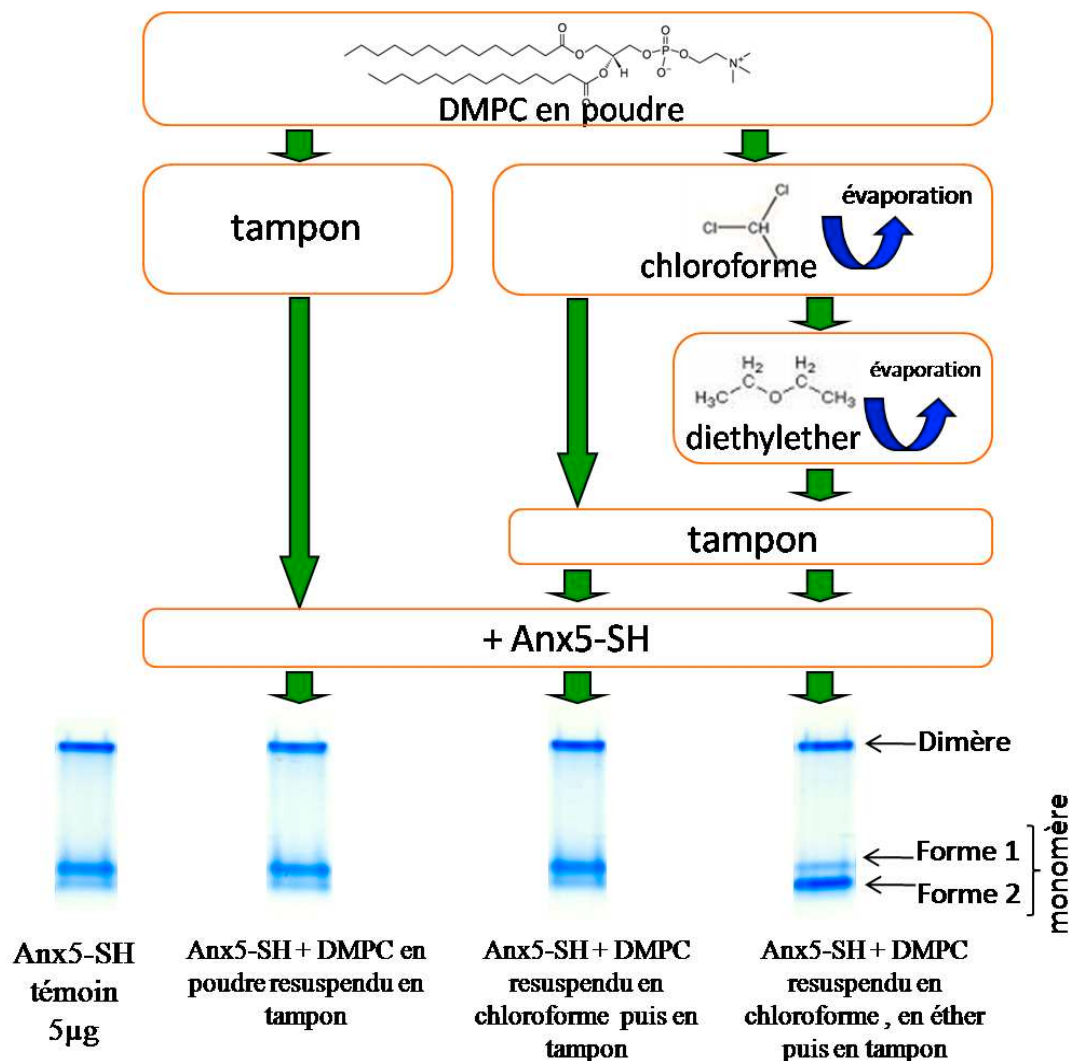


Figure III-9 : Evaluation de l'effet d'éventuels résidus de solvant sur l'Anx5-SH.

Il apparaît que seule la procédure impliquant une resuspension en diéthyléther conduit à un déplacement de la forme 1 du monomère, majoritaire chez l'Anx5-SH témoin, vers la forme 2. Lors de la procédure de synthèse, l'évaporation du diéthyléther n'est pas totale et ses résidus conduisent à des réactions secondaires qui sont formation de dimère et réaction avec le thiol de certaines des protéines. La suppression de l'éther lors de la formation des vésicules permet d'éviter les réactions parasites qui limitent la disponibilité des Anx5-SH pour le couplage avec les maléimides des liposomes.

La comparaison croisée des gels dénaturant et non dénaturant a donc permis de mettre en évidence que la réaction Anx5-SH maléimide était limitée par des réactions parasites, formation de dimère Anx5-S-S-Anx5 et liaison du thiol avec un élément parasite. Ce composé est le diéthyléther qui n'est pas totalement évaporé. Cette observation a une implication mineure pour la procédure de formation des vésicules par réhydratation de film lipidique car l'étape avec le diéthyléther est facultative. Toutefois cette réaction parasite pourrait s'avérer importante dans le cas où les liposomes sont formés par inversion de phase où les résidus d'éther vont limiter les rendements des réactions chimiques impliquant des thiols. Pour la réhydratation de film lipidique la suppression de l'éther permet d'avoir des Anx5-SH qui sont disponibles et donc d'augmenter les rendements de couplage.

1.1.3 Caractérisation de la liaison aux DOGP β_4 AlaMal

La quantification des Anx5-SH liées covalamment à un lipide maléimide a été réalisée tout d'abord pour les liposomes contenant des DOGP et ensuite pour ceux contenant des DSPE-PEG-Mal. Cette détermination a été effectuée par gel d'acrylamide en conditions dénaturantes. Comme indiqué précédemment, les Anx5-SH sont liées à des liposomes préformés contenant des lipides-maléimides. Les liposomes DOGP sont constitués de DOPC / Cholestérol / DOGP β_4 AlaMal : 70/25/5 % en moles et la quantité d'Anx5-SH ajoutée est telle que les fonctions maléimides exposées au solvant et accessibles pour le couplage (ceux des lipides du feuillet externe) soient en excès. La totalité de l'échantillon est déposée, ce qui permet de comparer les quantités liées et non liées.

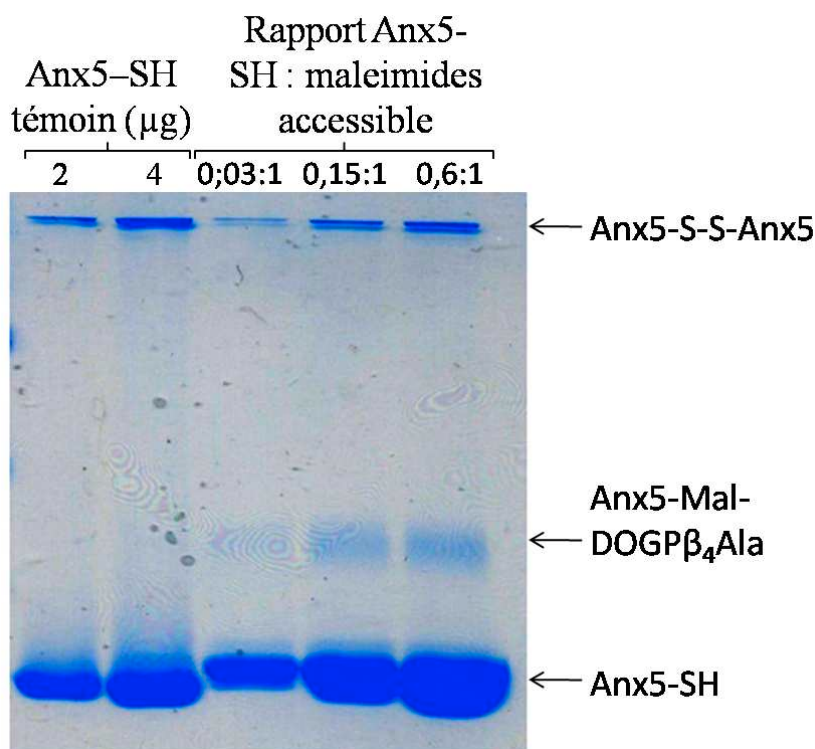


Figure III-10 : Analyse du couplage covalent de l'Anx5-SH à des liposomes contenant des DOGPβ₄AlaMal, par SDS-PAGE. Les deux premiers puits correspondent à l'Anx5-SH seule en quantité croissante ; les trois puits suivants correspondent à des mélanges liposome DOGPβ₄AlaMal (DOPC / Cholestérol / DOGPβ₄AlaMal, 70/25/5 % en moles) avec l'Anx5-SH en quantité croissante. La quantité de liposomes déposée dans chaque puits est fixe (20 μgDOPC / 34 nmole de lipide). La quantité d'Anx5-SH est exprimée en fonction du rapport molaire Anx5-SH : maléimides du feuillet externe.

Il apparait que la bande correspondant à l'Anx5-Mal-DOGPβ₄Ala est petite et très diffuse. La quantité d'Anx5 liée est donc très faible. Il est possible que ce rendement très limité soit dû au fait que le maléimide est un groupement hydrophobe qui a tendance à se placer dans l'intérieur apolaire de la membrane et n'est donc plus accessible pour les Anx5-SH.

1.1.4 Caractérisation de la liaison aux DSPE-PEG-Mal

La réaction de couplage a ensuite été réalisée avec des liposomes contenant des lipides DSPE-PEG-Mal. La composition en lipide de ces vésicules est DOPC/Cholestérol/DSPE-PEG-Mal 74/25/1 % en mole ou DOPC/Cholestérol/DPPE-PEG /DSPE-PEG-Mal 74/25/4/1 % en mole. L'utilisation de lipides-PEG (MW du PEG=2000) a pour objectif d'assurer la furtivité des

covalente aux liposomes-maléimides ce qui correspond, pour 1% de DSPE-PEG-Mal, à un peu moins de 500 Anx5 par liposome. Les gels sont les mêmes avec ou sans le DPPE-PEG ce qui indique qu'une couche de PEG en surface ne perturbe pas le couplage. Pour des concentrations en protéines de l'ordre du μM , une durée d'incubation du mélange liposomes protéines de quatre heures est suffisante pour que la réaction soit achevée avec le rendement maximal de 80%. Le fait que 20% environ des Anx5-SH ne soient pas couplées est attribué à l'hydrolyse spontanée des maléimides [195]. En comparaison, d'autres études ont fait état de rendements de couplage variables et de la nécessité d'avoir un excès de groupements réactifs portés par les lipides pour obtenir des quantités de ligands liés satisfaisantes [111, 196-198]. Les hauts rendements de couplage de l'Anx5-SH à les lipides-maléimides doivent être dus à l'utilisation d'une Anx5 mutée qui possède un thiol unique dans une position très accessible et à l'efficacité de la réaction thiol-maléimide. L'efficacité de la réaction de couplage permet de contrôler simplement la quantité d'Anx5 liée aux vésicules et donc d'analyser en détails les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des liposomes fonctionnalisés par l'Anx5. Parmi ces propriétés, a été évalué en particulier l'effet de la densité de ligands sur la taille et l'agrégation des vésicules et sur l'efficacité de reconnaissance de la cible c'est-à-dire des membranes anioniques.

1.2 Dispersité des solutions de liposomes

La taille des liposomes fonctionnalisés par l'Anx5 a été étudiée car ce paramètre est déterminant pour obtenir des vecteurs stables *in vivo*. La taille des vésicules affecte leur durée de vie dans la circulation sanguine [6] ainsi que le volume disponible pour encapsuler des éléments dans l'intérieur aqueux. Les vésicules de grande taille peuvent transporter des quantités importantes de composés mais sont retenues par les barrières physiques de l'organisme qui jouent le rôle de filtres. A l'inverse, des liposomes de petite taille encapsulent moins de composés mais peuvent présenter des temps de circulation faibles car, en dessous de 70nm, les liposomes sont éliminés par filtration, principalement au niveau des cellules du foie. Les tailles optimales permettant d'accommoder les contraintes de temps de circulation élevé et de volume maximal disponible pour encapsuler des composés sont de l'ordre de 100 nm [107, 199].

La taille des vésicules a donc été calibrée à 100nm par extrusion et l'influence de la densité d'Anx5-SH à la surface des liposomes sur la taille des vecteurs et la dispersité des solutions a

été analysée par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Des liposomes de composition DOPC / Cholestérol / DSPE-PEG-Mal, 70/25/5 % en moles ont donc été extrudées pour produire des vésicules de 100nm de diamètre et ont été liés à des quantités variables d'Anx5-SH. Les liposomes non fonctionnalisés ont un rayon de 60 ± 4 nm. Les liposomes pour lesquels la densité de protéines est inférieure à 250 Anx5 / liposome présentent une seule population avec un rayon de 60 ± 2 nm. Les échantillons avec des densités supérieures à 250 Anx5 / liposome ont tendance à précipiter. Les précipités sont polydisperses avec des tailles allant d'une soixantaine de nanomètres à plusieurs micromètres.

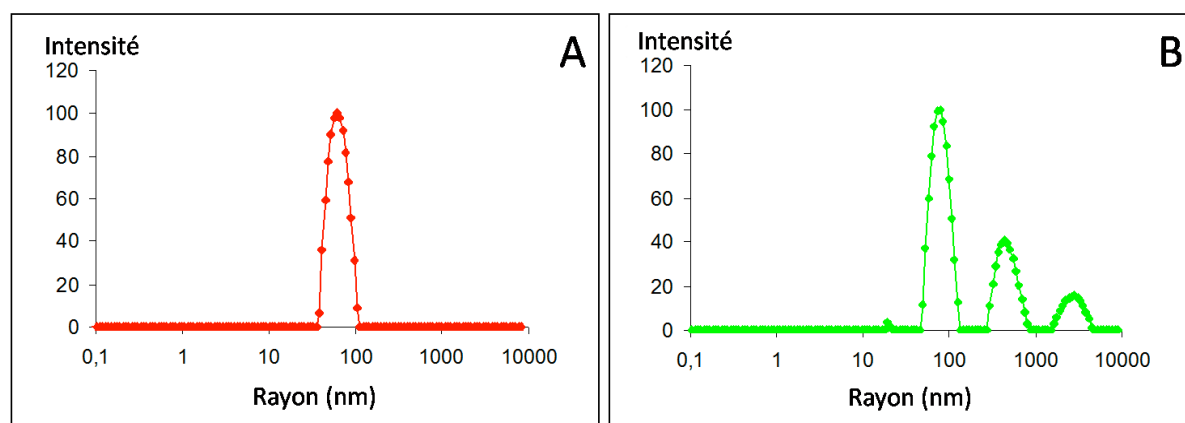


Figure III-12 : Distribution de taille des solutions de liposomes fonctionnalisés par l'Anx5, par DLS à 90°. Densité d'Anx5 par liposomes : A) 250, B) 2000. Chaque échantillon contient 200µg de lipides (250 nmoles) dans un volume de 900µl (soit 0,278 M).

Le diamètre de 120nm et non 100nm observé pour les vésicules témoin peut s'expliquer par le fait que la DLS tient compte de l'eau d'hydratation et que le PEG, présent en surface des membranes, est un polymère fortement hydraté. Pour des densités d'Anx5 liées inférieures à 250 Anx5 / liposome, la fonctionnalisation n'a qu'une influence mineure sur la taille des vésicules et la solution reste monodisperse c'est-à-dire que les vésicules sont bien individualisées. Pour des densités supérieures à 250 Anx5 / liposome les vésicules agrègent et précipitent. La cause de l'agrégation n'est pas très claire mais pourrait être due à une interaction aspécifique de l'Anx5-SH liée à un lipide avec les membranes d'autres liposomes conduisant à un pontage des vésicules.

Il apparait donc que pour obtenir des vésicules bien dispersées et présentant une taille compatible avec une utilisation *in vivo*, il est nécessaire de limiter la densité d'Anx5 en surface des vésicules, cette densité devant être inférieure à 250 Anx5 / liposome.

1.3 Liaison de liposomes fonctionnalisés par l'Anx5 à des membranes modèles

Afin de vérifier que des liposomes fonctionnalisés par l'Anx5 ont la capacité de se lier à des membranes lipidiques exposant des PS et de déterminer la densité de ligand conférant l'efficacité de fixation optimale, nous avons étudié de façon systématique l'interaction de liposomes-Anx5 avec des membranes modèles supportées, par QCM-D. Les membranes supportées contiennent la même proportion de PS (20% en mole) que les membranes de cellules apoptotiques. Ce système de membrane supportée a été utilisé pour d'autres études et est considéré comme un bon modèle pour étudier la liaison d'Anx5 sur ses membranes cibles [165, 167].

1.3.1 Suivi de la liaison des liposomes-Anx5 par QCM-D

Le signal QCM-D de liaison de l'Anx5 sur des membranes a donc été utilisé comme référence par rapport au signal de liaison des liposomes fonctionnalisés. L'expérience est menée en tampon HEPES supplémenté de 2mM Ca^{2+} sauf à la fin où du tampon plus EGTA (Ethylène glycol tetraacetic acid) est ajouté. Cette expérience comporte trois étapes, comme indiqué sur la figure 13 : 1) formation d'une bicouche lipidique supportée sur le support de quartz couvert de silice utilisé en QCM-D par adsorption et rupture de SUV composées de DOPC/DOPS (4:1 masse : masse)(flèche 1) 2) injection d'Anx5 ou de liposome-Anx5 (DOPC/Cholestérol/DSPE-PEG-Mal 74/25/1 % en mole) et liaison Ca^{2+} -dépendante (flèche 2 et 3) désorption induite par l'EGTA (flèche 3).

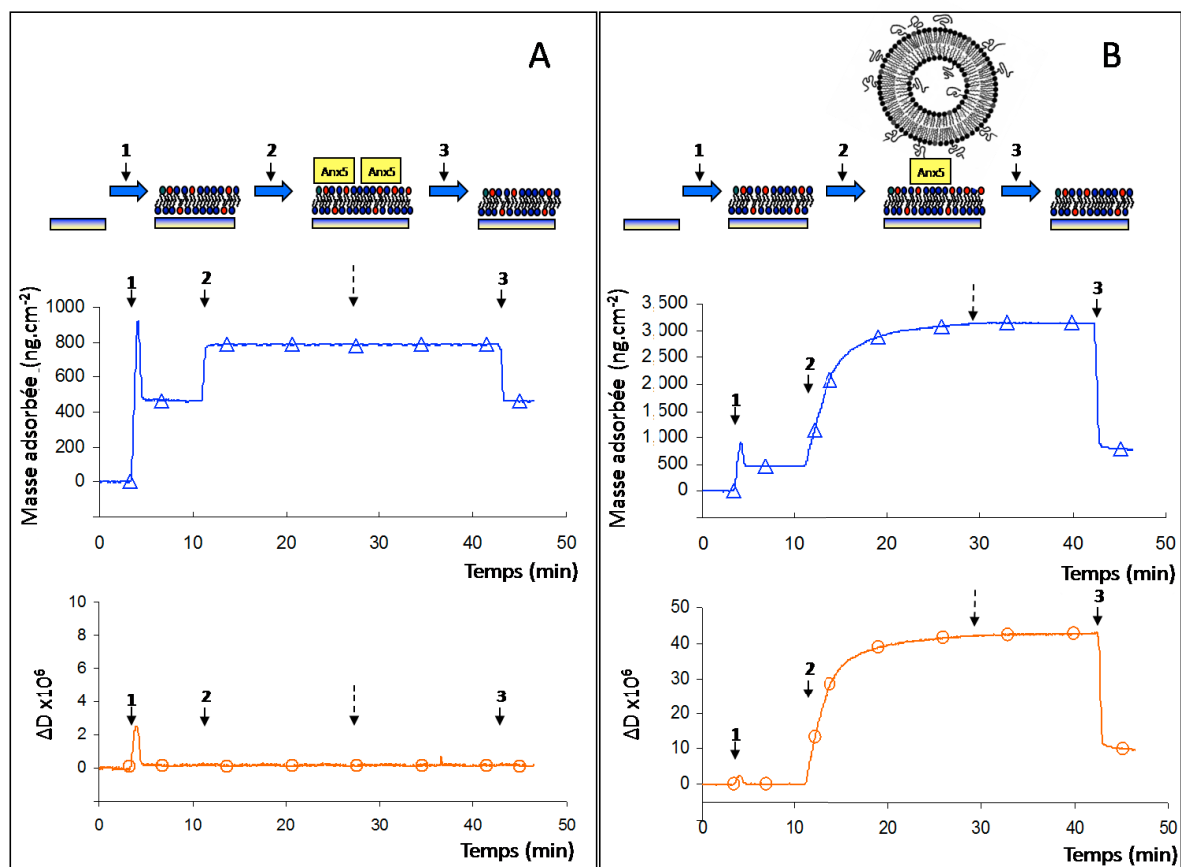


Figure III-13 : Fixation d'Anx5 et de liposomes fonctionnalisés par l'Anx5 sur une membrane lipidique supportée, par QCM-D. Les courbes présentent les variations de masses adsorbées (courbe du haut, triangles vides) et de dissipation (ΔD , courbes du bas, cercles vides) au cours du temps, lors des injections successives de SUV DOPC/DOPS (4:1 en masse) (fleche 1), Anx5 (fleche 2, A) ou liposomes fonctionnalisés par l'Anx5 (flèche 2, B) et tampon contenant de l'EGTA (flèche 3). Les lavages de la chambre de QCM-D avec un tampon contenant du Ca²⁺ sont indiqués par une flèche en pointillé. Pour chaque expérience les SUV DOPC / DOPS (4 /1 en masse) sont à une concentration de 100 μ g / ml (126 μ M), les Anx5 sont à 30 μ g / ml (0,8 μ M) et les liposomes-Anx5 sont à une concentration de 0,130 μ g / ml (220 μ M) dans 1,5 ml.

Les valeurs de masse et dissipation obtenues sont de 460 ng.cm² et $\approx 0 \times 10^6$ respectivement pour la bicouche supportée et de 275 ng.cm² et $< 0,1 \times 10^6$ pour une monocouche d'Anx5 à saturation, en accord avec les valeurs attendues[167].

L'injection de liposomes fonctionnalisés par l'Anx5 sur une bicouche exposant des PS est suivie par une augmentation importante des valeurs de masses et de dissipation comme indiqué dans la figure 13 pour des liposomes liés à 8 Anx5 / liposome. Les valeurs de masses

adsorbées (2600 ng.cm^2) et de dissipation (43×10^6) sont caractéristiques de l'adsorption d'objets flexibles de masse élevée, comme attendu pour des liposomes liés par l'intermédiaire d'un PEG. Le fait que les vésicules restent liées lors des lavages avec un tampon contenant du Ca^{2+} indique que les liposomes sont liés de façon stable sur leur cible. Le rinçage en EGTA, qui permet de chélater le Ca^{2+} , conduit au relargage des vésicules. Des expériences de contrôle ont montré que des liposomes non fonctionnalisés ne se lient pas aux membranes présentant des PS en présence de Ca^{2+} et que les liposomes-Anx5 ne se lient pas aux bicouches contenant des PS en absence de Ca^{2+} (données non présentées).

L'ensemble de ces résultats, masse et flexibilité importante des objets adsorbés, liaison dépendante du calcium et de la présence d'Anx5 liée aux vésicules, indiquent que l'Anx5, une fois liée, est capable d'adresser les liposomes vers les membranes contenant des PS.

1.3.2 Influence de la densité de ligand sur l'efficacité de liaison aux membranes-cibles

L'influence de la densité d'Anx5 liées en surface des vésicules sur l'efficacité de liaison des liposomes à une membrane exposant des PS a ensuite été évaluée. Pour ceci des expériences de liaison sur des membranes supportées identiques à celles présentées figure 13 ont été réalisées pour différentes quantités d'Anx5 liées et les valeurs de masses obtenues au plateau ont été enregistrées (Figure 14).

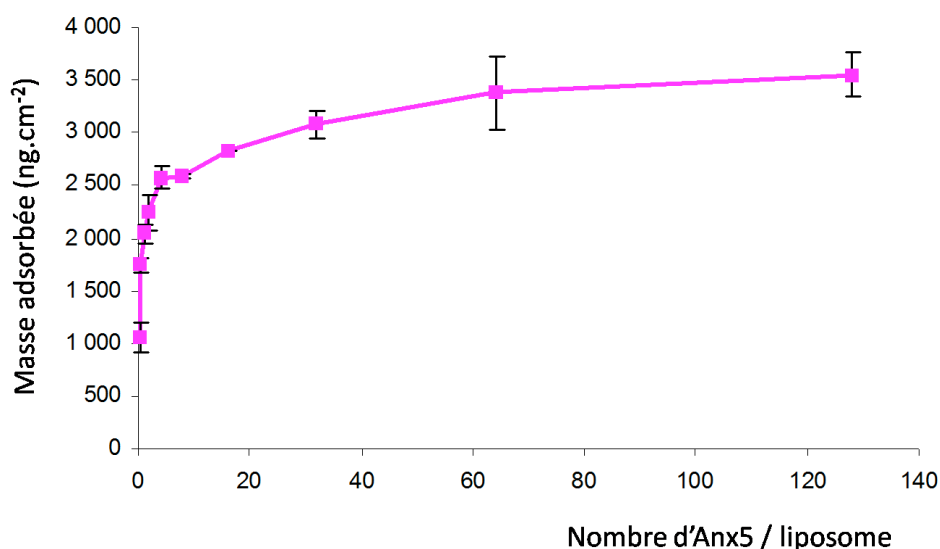


Figure III-14 : Influence de la densité d'Anx5 sur la liaison des liposomes-Anx5 à une membrane DOPC/DOPS. Les valeurs de masses adsorbées correspondent aux valeurs mesurées au niveau du plateau lors des expériences de QCM-D de liaison de liposomes-Anx5 comme présenté en figure III-13.

L'efficacité de fixation des liposomes-Anx5 augmente avec l'augmentation de la densité d'Anx5 et atteint un maximum d'environ 3250 ng.cm² pour une densité d'environ 60 Anx5 / liposome. La fixation de vésicules fonctionnalisées est observée pour des densités moyennes de 0,25 Anx5 / liposome, la masse adsorbée pour une valeur moyenne de 1 Anx5 / liposome étant de 2045 ng.cm². Ceci indique que la liaison d'une seule Anx5 / liposome est suffisante pour permettre l'adressage de liposomes vers une membrane contenant des PS.

1.3.3 Influence de la densité de PEG sur l'efficacité de liaison aux membranes-cibles

L'influence de la densité de PEG en surface des liposomes sur l'efficacité de reconnaissance de la cible a ensuite été évaluée. Des liposomes composés de DOPC/Cholestérol/DPPE-PEG/DSPE-PEG-Mal 74-x/25/x/1 % en mole avec x=0,2 ou 4 ont été fonctionnalisés de façon à obtenir des densités de 1, 8 ou 125 Anx5 / liposome et les valeurs de masses adsorbées ont été mesurées en QCM-D.

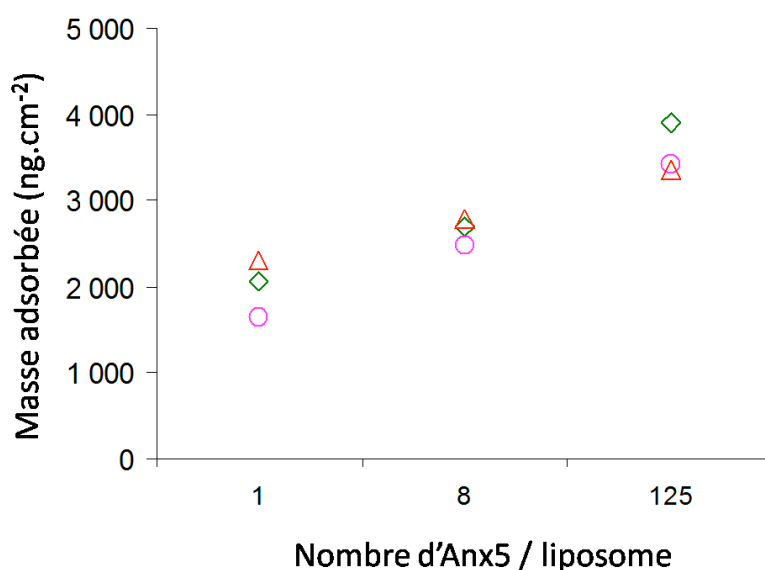


Figure III-15 : Influence de la densité de PEG sur la liaison des liposomes-Anx5 à une membrane DOPC/DOPS en QCM-D. Les valeurs de masses adsorbées correspondent aux valeurs mesurées au niveau du plateau lors des expériences de liaison. Carrés vides : 0% DPPE-PEG ; cercles vides : 2% DPPE-PEG ; triangles vides : 4% DPPE-PEG.

La densité de PEG n'a donc qu'une influence négligeable sur la quantité de liposomes liés et sur la reconnaissance des PS par l'Anx5.

L'efficacité de liaison à la cible dépend donc de la densité de ligand en surface des liposomes et n'est pas affectée par la couche de PEG en surface. Augmenter la densité d'Anx5 permet d'améliorer l'efficacité de reconnaissance des membranes présentant des PS mais aussi la vitesse de cette fixation (non présenté). Ce résultat est en accord avec d'autres études menées *in vitro* [197, 198, 200-202] et *in vivo* [194]. La valeur de 60 Anx5 / liposome obtenue pour le plateau est de l'ordre de 30 à 60 ligands / liposome déterminés dans les autres études [194, 197, 198, 200-202]. De plus et comme attendu pour un ligand lié à l'extrémité d'un PEG, l'efficacité de reconnaissance de la cible n'est pas affectée par la couche de PEG ajoutée pour permettre l'augmentation de la durée de vie dans la circulation sanguine.

1.3.4 Détermination de la quantité maximale de ligand pouvant se lier à la membrane cible

Les Anx5 étant liées à des lipides mobiles dans la membrane, nous avons voulu savoir si plusieurs Anx5 pouvaient, après diffusion latérale des lipides auxquels elles sont liées, atteindre la membrane cible et s'y lier. En effet, comme les membranes lipidiques sont fluides, les lipides possèdent une mobilité latérale dans le plan de la bicouche. Il est alors possible pour les lipides liés aux Anx5 de se déplacer dans la membrane et d'amener des ligands au niveau de la cible. Pour répondre à cette question, des liposomes possédant différentes densités d'Anx5 ont été liés sur une membrane exposant des PS en QCM-D. Des SUV DOPC/DOPS (4/1 en masse) ont alors été ajoutés pour voir s'il restait des Anx5 disponibles c'est-à-dire non liées à la membrane supportée.

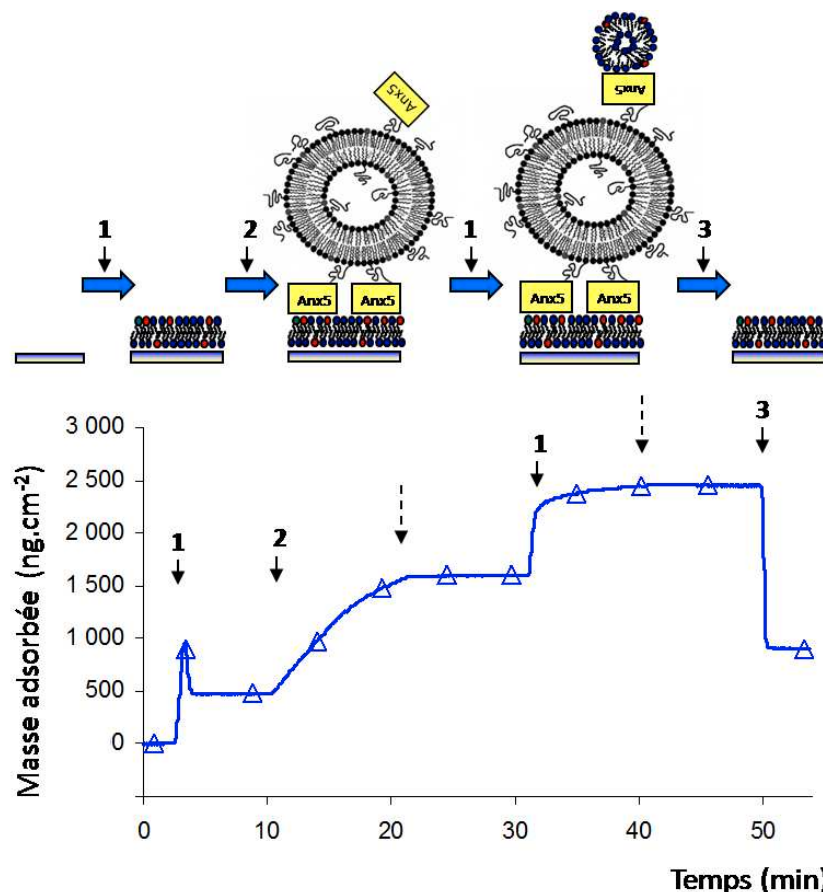


Figure III-16 : Fixation de SUV DOPC/DOPS à des liposomes fonctionnalisés par 250 Anx5 liés sur une membrane lipidique supportée contenant des PS, par QCM-D. la courbe présente la variation de masse adsorbée (triangles vides) au cours du temps, lors des injections successives de SUV DOPC/DOPS (4:1 en masse) (fleche1), liposomes fonctionnalisés par l'Anx5 (flèche 2) et tampon contenant de l'EGTA. Les lavages de la chambre de QCM-D avec un tampon contenant du Ca²⁺ sont indiqués par une flèche en pointillés. Les SUV DOPC / DOPS (4 /1 en masse) sont à une concentration de 100µg / ml (126 µM) et les liposomes-Anx5 sont à une concentration de 0,130 µg / ml (220µM) dans 1,5 ml

Un signal de liaison de SUV n'est observé que pour des densités d'Anx5 supérieures à 125 Anx5 / liposome. Jusqu'à 125 Anx5 sur un même liposome peuvent donc être impliqués dans l'ancrage d'une vésicule à sa cible. Si une seule Anx5 / liposome est suffisante pour lier une vésicule sur une membrane exposant des PS, jusqu'à 125 Anx5 / liposome peuvent tout de même être associées à la cible. La reconnaissance initiale est alors certainement réalisée par un seul ligand et, après sa liaison, la mobilité latérale des lipides va permettre d'approcher et de lier les autres Anx5 à la membrane cible. Si la densité de ligand est supérieure à 125 Anx5

/ liposome certaines Anx5 n'ont plus accès à la membrane supportée et sont alors disponibles pour interagir avec les SUV ajoutées en solution.

La combinaison des résultats de diffusion de la lumière et de QCM-D permet d'optimiser la densité d'Anx5 / liposome. Les mesures de diffusion de la lumière indiquent que moins de 250 Anx5 doivent être liées par liposome pour éviter l'agrégation des vésicules. Les expériences de QCM-D indiquent qu'une densité de 60 Anx5/ liposome permet une efficacité de liaison à la cible maximale. En conséquence, pour le reste du travail avec les liposomes-Anx5 la composition sera DOPC / Cholestérol / DSPE-PEG-Mal / DPPE-PEG (70,25 / 25 / 0,25 / 4 rapport molaire) liée à une densité de 60 Anx5 / liposome.

La stabilité d'encapsulation de composés dans l'intérieur aqueux des vésicules a ensuite été évaluée en mesurant les fuites de composés fluorescents internalisés. L'objectif est de savoir si la fonctionnalisation par l'Anx5 perturbe la stabilité membranaire et si ces vésicules fonctionnalisées peuvent être utilisées pour transporter des composés encapsulés dans un milieu contenant du sérum, c'est-à-dire dans un milieu biologique.

1.4 Influence de la liaison d'Anx5-SH et du sérum sur la stabilité membranaire

Tout d'abord nous avons déterminé les propriétés d'autoquenching de solutions de sulforhodamine B et mis en évidence que ce quenching a lieu pour des concentrations supérieures à 0,75 mM (figure 18 A). La sulforhodamine B a alors été encapsulée à une concentration de 50mM et les fuites de composés fluorescents ont été suivies en mesurant l'augmentation d'intensité de fluorescence des solutions de liposomes. Le signal maximal qu'il est possible d'obtenir est mesuré après libération de la totalité des marqueurs encapsulés par addition de Triton X100 et à ce signal est attribuée la valeur de 100 %.

Lors du couplage de l'Anx5-SH aux liposomes, qui est réalisé en milieu tamponné, aucune fuite de composés encapsulés n'est mesurée (figure 18 B). La liaison de l'Anx5-SH ne perturbe donc pas la stabilité membranaire.

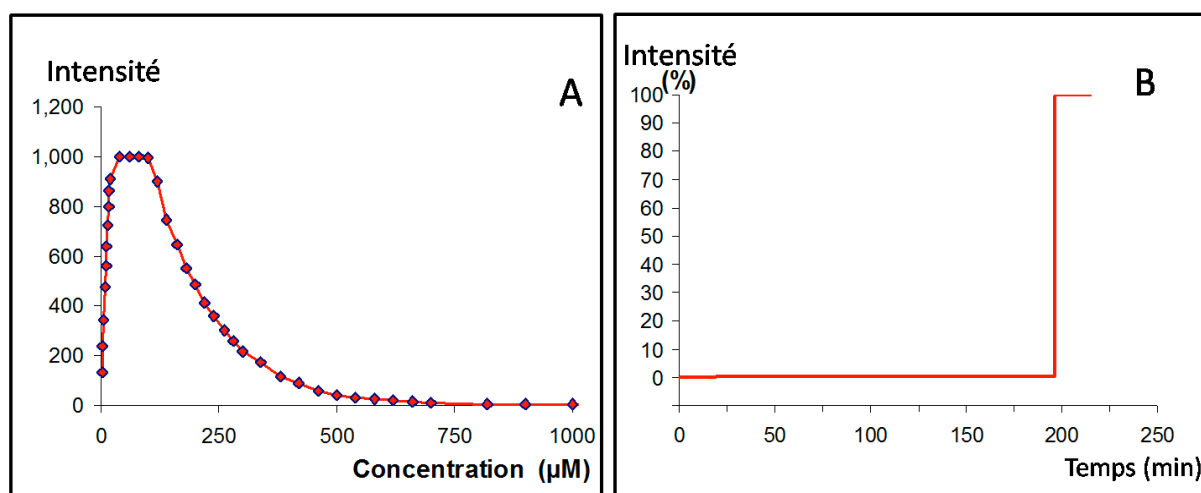


Figure III-17 : Analyse de l'influence de la fonctionnalisation de liposomes sur la stabilité membranaire par spectroscopie de fluorescence. A) auto-quenching de la fluorescence de la sulforhodamine ; B) test de déquenching : les fuites de composés encapsulés sont évaluées en mesurant l'augmentation de l'intensité de fluorescence, en tampon à 23°C. 50 μg de lipides sont placés en solution et le volume final est de 400 μl (soit 212 μM de lipides). La libération totale des sondes fluorescentes est obtenue par addition de 20% de Triton X100 (en volume). Les variations d'intensité correspondant aux fuites sont exprimées en pourcentage du signal de fluorescence maximal obtenu après libération totale

Le suivi des fuites de composés encapsulés peut aussi être utilisé pour évaluer la capacité des liposomes à transporter de façon stable un composé inséré dans l'intérieur aqueux dans un milieu mimant le milieu biologique. L'évaluation in vitro des pertes de composés ayant lieu in vivo repose sur l'incubation des vésicules en sérum. Les liposomes préalablement fonctionnalisés ont donc été placés dans un milieu contenant 10% de sérum (en volume).

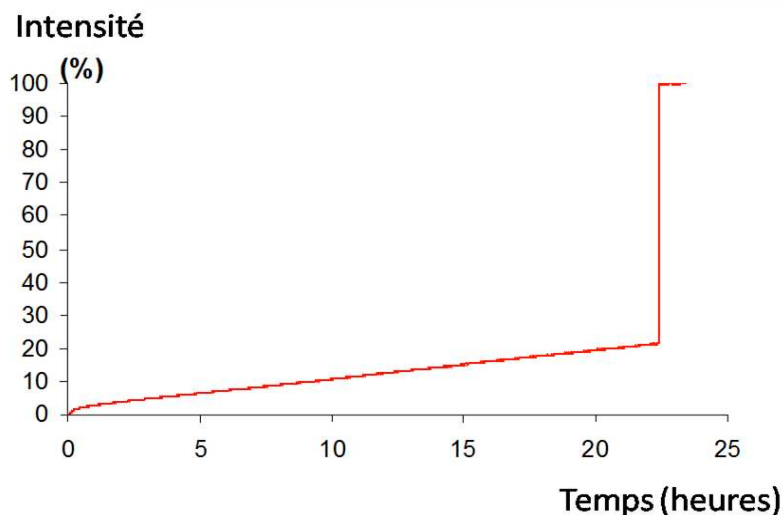


Figure III-18 : Analyse de la stabilité membranaire de liposomes fonctionnalisés dans un milieu contenant 10% de sérum de veau fœtal par spectroscopie de fluorescence. Les fuites de composés encapsulés sont évaluées en mesurant l'augmentation de l'intensité de fluorescence à 37°C. 50µg de lipides sont placés en solution et le volume final est de 400µl (soit 212µM de lipides). La libération des sondes fluorescentes est obtenue par addition de 20% de Triton X100 (en volume). Les variations d'intensité correspondant aux fuites sont exprimées en pourcentage du signal de fluorescence maximal obtenu après libération des composés

Dans un milieu contenant 10% de sérum les pertes de composés encapsulés sont d'environ 1% / heure à 37°C. Les liposomes fonctionnalisés par l'Anx5 présentent donc des fuites faibles mais soutenues dans un milieu biologique alors qu'ils ne fuient pas lorsqu'ils sont en tampon. Ceci peut être expliqué par le fait qu'en sérum les échanges de lipides avec le LDL, favorisés par les phospholipides transférases, et la pénétration de protéines dans la membrane lipidique vont perturber l'intégrité des liposomes [6]. Néanmoins les pertes sont négligeables pour des périodes de 10 heures environ, le temps de demi-vie de liposomes PEGylés dans la circulation sanguine. Ces vésicules sont donc considérées comme transportant de façon stable des composés encapsulés dans un environnement biologique.

Le suivi des fuites de composés encapsulés indique donc que la fonctionnalisation par l'Anx5-SH ne perturbe pas la stabilité membranaire et que les pertes de composés encapsulés en milieu biologique sont négligeables pour des périodes inférieures à 10 heures.

1.5 Liaison des liposomes–Anx5 à des cellules en apoptose

Nous avons donc décidé d'encapsuler la sulforhodamine à une concentration de 12,5 μM , une concentration à laquelle la rhodamine fluoresce, pour suivre la capacité de ciblage des liposomes fonctionnalisés vers des systèmes cellulaires. Les cellules utilisées comme modèle de système cellulaire sont les cellules leucémiques Bcr/Abl⁺ K562 induites en apoptose par l'ajout de 2 μM de STI, un inducteur spécifique de l'apoptose de ces cellules. L'apoptose s'accompagne de l'exposition des PS au niveau du feuillet externe des cellules activées et des fragments qui en dérivent [170]. La fixation des liposomes fluorescents sur les cellules en apoptose a été suivie par microscopie de fluorescence.

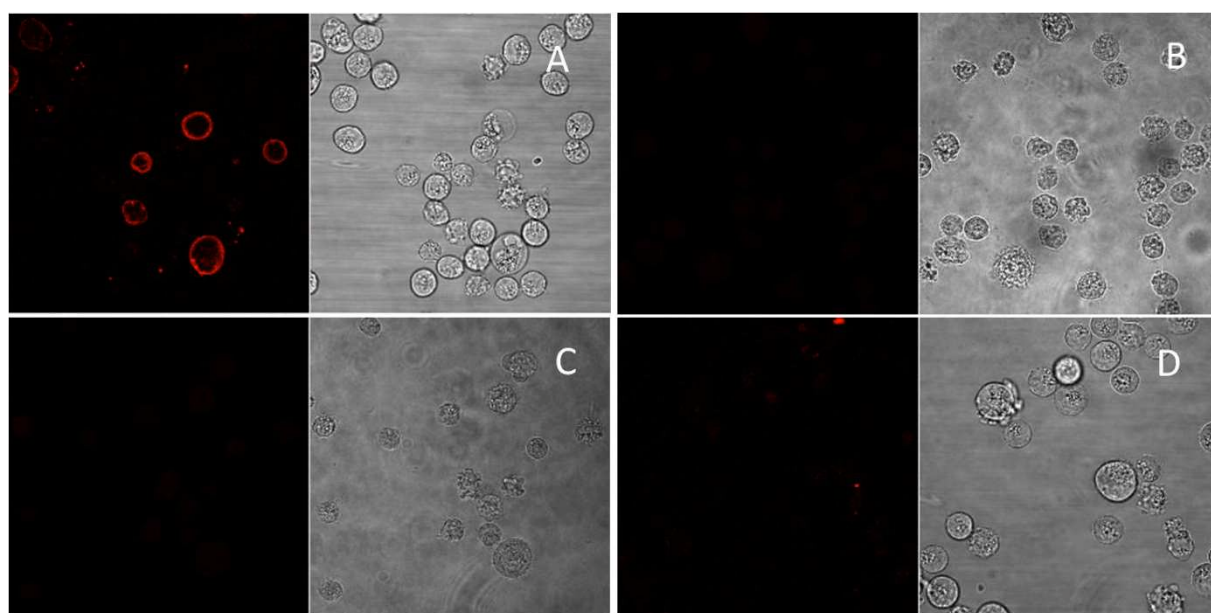


Figure III-19 : Interaction entre liposomes et cellules K562, par microscopie confocale. Les cellules K562, soit traitées avec 2 μM STI (A,C) soit non traitées (B,D), ont été incubées 1heure dans un milieu RPMI contenant du Ca^{2+} 2mM et des liposomes fluorescents (30 $\mu\text{g}_{\text{phospholipid}}$ de liposomes à une concentration de 300 $\mu\text{g}_{\text{phospholipid}} / \text{ml}$) fonctionnalisés (A,D) ou non (B,C). Pour chaque condition, des images de fluorescence (gauche) et de microscopie optique (droite) sont présentées. A) cellules apoptotiques + liposomes fonctionnalisés ; B) cellules non apoptotiques + liposomes non fonctionnalisés ; C) cellules apoptotiques + liposomes non fonctionnalisés ; D) cellules non apoptotiques + liposomes fonctionnalisés. Taille des images 145 μm x 145 μm . La culture cellulaire et les images ont été réalisées par A.Bouter (CBMN)..

Environ 30% des cellules traitées par le STI sont induites en apoptose et présentent un marquage fluorescent homogène à la surface de leur membrane (figure 19 A). Le marquage reste localisé en surface des cellules ce qui indique que les liposomes ne sont pas internalisés. Les expériences de contrôle indiquent qu'il n'y a pas de fixation des liposomes fonctionnalisés sur des cellules non induites en apoptose (figure 19D). Un marquage parasite est visible, certainement dû à des cellules nécrotiques ou à des débris de cellules. Les liposomes fonctionnalisés avec de l'Anx5 sont donc un bon outil pour imager les cellules en apoptose et plus généralement les cellules exposant des PS. Les fluorophores encapsulés dans les vésicules sont amenés au niveau des cellules, ce qui indique que ces liposomes peuvent être utilisés comme système de transport de composés thérapeutiques insérés dans l'intérieur aqueux de la vésicule.

En conclusion, ce travail a consisté à étudier la fonctionnalisation de liposomes par l'Anx5-SH et la capacité du vecteur ainsi obtenu à imager des cellules en apoptose. La liaison covalente de l'Anx5-SH sur les liposomes a été optimisée et caractérisée pour permettre le contrôle de la densité de ligand en surface des vésicules. Comme il apparaît que la densité de ligands influence la dispersité des solutions et l'efficacité de liaison sur la cible, nous avons déterminé une densité d'Anx5 qui permet d'éviter l'agrégation des vésicules et assure la meilleure efficacité de fixation. Nous avons alors mis en évidence que ces liposomes encapsulaient un fluorophore de façon stable et qu'il était possible d'imager spécifiquement des cellules exposant des PS. Ces nanovecteurs liposomaux sont donc potentiellement utilisables pour transporter des médicaments ou des agents pour l'imagerie vers des sites d'apoptose ou de thrombose.

2 Formation de liposomes encapsulant des particules de maghémite

La suite du travail a consisté à mettre au point des liposomes utilisant des anticorps liés via l'Anx5ZZ comme élément de ciblage et encapsulant des particules de maghémite.

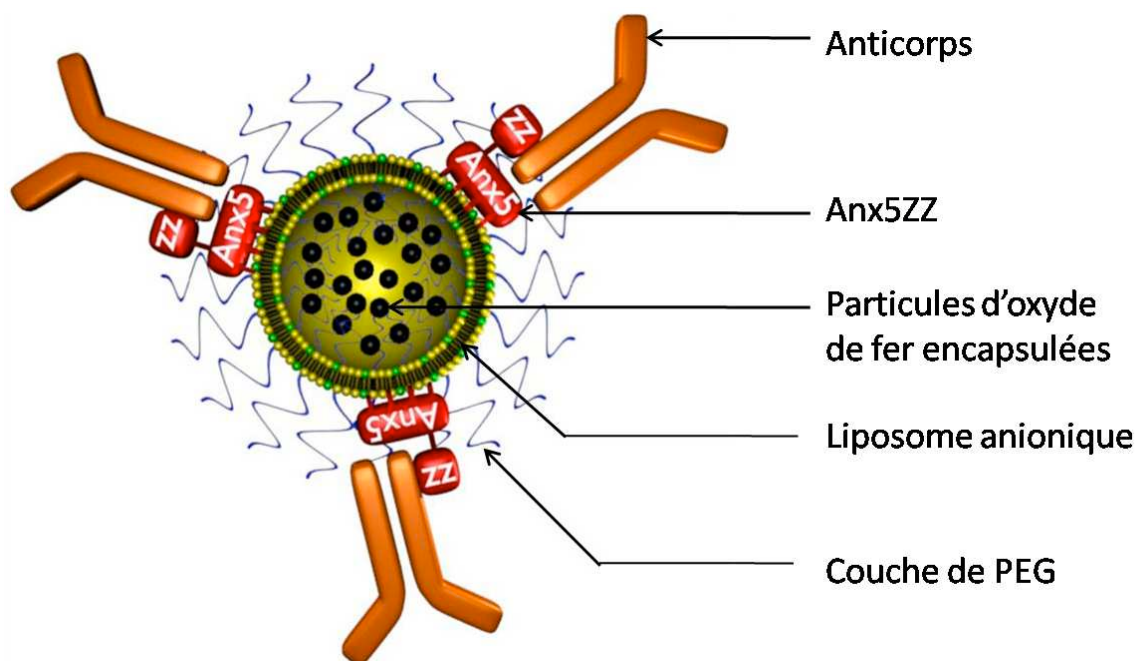


Figure III-20 : Schéma général de l'approche envisagée : formation de liposomes encapsulant des particules d'oxyde de fer, fonctionnalisés par des anticorps liés aux vésicules grâce à l'Anx5ZZ.

L'objectif est la fonctionnalisation des liposomes grâce à des anticorps et l'approche originale réside dans l'utilisation d'une Anx5ZZ pour lier ce ligand en surface des vésicules. Les anticorps ont été choisis car ils peuvent potentiellement présenter une affinité forte pour n'importe quelle cible de l'organisme et sont couramment utilisées pour l'adressage de composés thérapeutiques ou de liposomes [52]. Le fait qu'il s'agisse de la même molécule quelle que soit la cible permet de n'avoir qu'une seule stratégie pour le couplage des éléments d'adressages aux liposomes. Dans notre cas, le couplage utilise l'Anx5ZZ une protéine de fusion qui lie l'anticorps via le tagZZ et la membrane des vésicules via l'Anx5. Le tag ZZ est un élément de la protéine A qui reconnaît le Fc des anticorps. L'Anx5 est une protéine qui se fixe sur des bicouches anioniques en présence de Ca^{2+} . Ce dernier point est important car il implique que les vésicules utilisées doivent présenter une charge de surface négative.

L'encapsulation de particules de maghémite a été envisagée pour obtenir un signal en imagerie, et plus précisément en IRM ou en microscopie électronique. L'intérêt est double : pouvoir suivre le comportement des liposomes, en particulier *in vivo*, et mettre au point des outils d'imagerie. En ce qui concerne l'imagerie, l'association liposomes / particule de maghémite permet de combiner les propriétés d'agents de contrastes des particules et de biocompatibilité des liposomes. En temps qu'agent de contraste, les particules d'oxyde de fer, telles que les SPIO (superparamagnetic iron oxyde) ou USPIO (ultrasmall superparamagnetic iron oxyde), ont la propriété de perturber un champ magnétique ce qui a conduit à les utiliser comme agent de contraste en IRM, pour donner un contraste négatif dans les zones où elles sont accumulées. Comme ce sont des éléments denses, elles diffusent les électrons en microscopie électronique, ce qui donne une image de ces particules bien identifiable et peut permettre de les distinguer au niveau des zones pour lesquelles elles possèdent une spécificité. Les nanoparticules de maghémite peuvent donc être utilisées comme élément de contraste en IRM et en microscopie électronique [44, 203]. Néanmoins, ces particules de maghémite sont instables dans un milieu biologique et une solution pour remédier à ce problème est de les insérer dans l'intérieur aqueux d'un liposome. Cette encapsulation permet de les couvrir d'une enveloppe qui les protège du milieu extérieur, qui est biocompatible, peut être formulée ou modifiée pour obtenir des objets furtifs *in vivo* et peut présenter une spécificité pour une zone de l'organisme. La propriété d'agent de contraste des particules d'oxyde de fer est donc associée à des liposomes qui, en théorie, assurent à l'ensemble particule-vésicule un comportement, *in vivo*, de liposome. Les magnétoliposomes peuvent donc être utilisés pour de l'imagerie ou pour suivre le comportement de liposomes *in vivo*.

Deux méthodes peuvent être distinguées pour la préparation de magnétoliposomes : une qui consiste à recouvrir les particules magnétiques d'une bicouche lipidique et une autre qui consiste à les encapsuler dans l'intérieur aqueux de vésicules de façon passive. Dans la première, les particules d'oxyde de fer sont couvertes d'acide laurique et incubées avec des liposomes préalablement synthétisés. L'ensemble est placé à dialyser et l'élimination de l'acide laurique s'accompagne du transfert des lipides des liposomes vers les particules. Il se forme alors une bicouche lipidique en surface des particules [41, 43]. Dans la seconde méthode, dite d'encapsulation passive, les liposomes sont formés dans un milieu contenant les nanoparticules de maghémite de telle manière que l'espace interne des vésicules, qui correspond au milieu avec lequel ont été hydratés les lipides, va contenir des particules. Les liposomes doivent ensuite être séparés du matériel non encapsulé. Il en résulte que dans un cas les magnétoliposomes sont des particules de fer couvertes d'une bicouche lipidique et que

dans l'autre ce sont des vésicules à l'intérieur desquelles se trouvent des particules d'oxydes de fer en suspension.

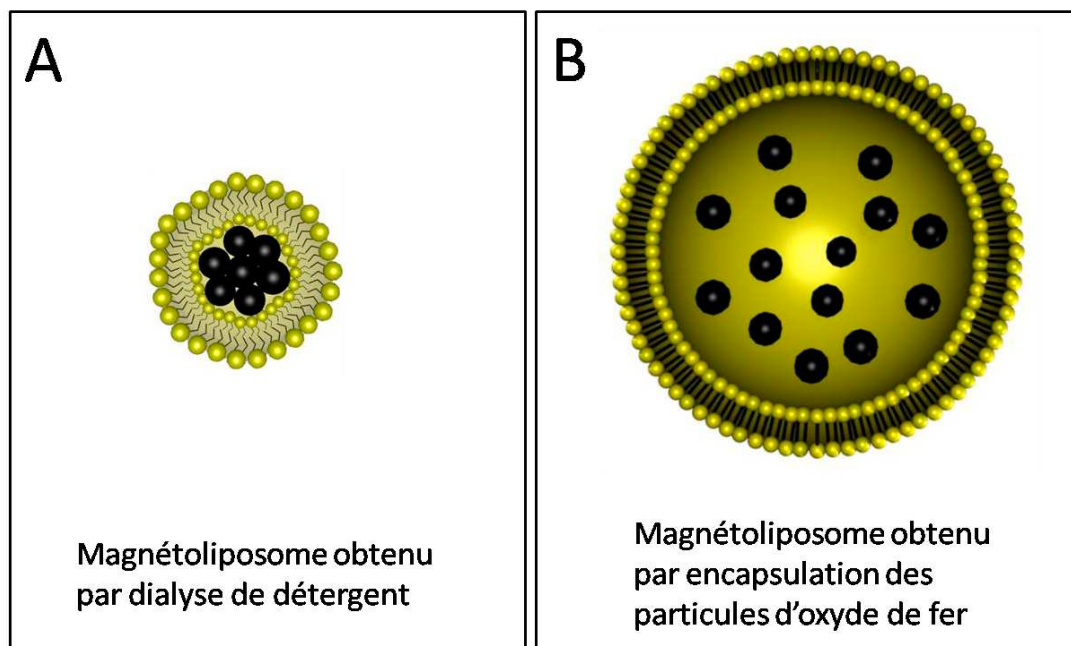


Figure III-21 : Représentation schématique des deux types de magnétoliposomes A) particules d'oxyde de fer couvertes d'une bicouche lipidique ; B) particules d'oxyde de fer encapsulée, en suspension dans l'intérieur aqueux d'un liposome.

Notre objectif étant le suivi de liposomes utilisables pour le transport de composés thérapeutiques, nous avons choisi la méthode d'encapsulation passive. Les vésicules sont alors les mêmes que pour le transport de médicament mais l'intérieur aqueux est utilisé pour charger des particules de maghémite. Il est alors possible de suivre le comportement de ces liposomes *in vivo* c'est-à-dire de les localiser sur des images d'IRM ou de microscopie électronique mais aussi de quantifier leur accumulation par dosage du fer [204].

Le travail a donc consisté à encapsuler des particules de maghémite dans des vésicules par encapsulation passive suivi d'extrusion, pour calibrer la taille des liposomes. La première étape a consisté à insérer ces particules dans des vésicules ne présentant pas de charges de surface et à caractériser cette encapsulation et la deuxième étape a consisté à les encapsuler dans des liposomes chargés négativement qui serviront à la liaison d'anticorps grâce à l'Anx5ZZ.

2.1 Synthèse de magnétoliposomes électriquement neutres

La synthèse de magnétoliposomes électriquement neutres a été réalisée de façon à mettre au point l'encapsulation de particules de maghémite dans des liposomes. La première étape a consisté à stabiliser les particules d'oxyde de fer en leur associant du citrate en surface. L'obtention de solutions bien dispersées a permis la synthèse de liposomes de 100 nm de diamètre encapsulant ces particules. Ces magnétoliposomes ont été imaged par cryomicroscopie électronique et le contenu en fer des vésicules obtenues pour différentes solutions-mères de particules a été mesuré.

2.1.1 Recouvrement de la surface des particules de fer avec du citrate

L'objectif de la couverture de la surface des particules par une couche de citrate est l'obtention de solutions dispersées à un pH compatible avec celui où les liposomes sont stables. Les particules de maghémite sont stables à pH acide et il est alors nécessaire de modifier leur surface pour éviter leur précipitation à des pH neutres ou basiques. En effet, les lipides sont des molécules biologiques qui forment des membranes dont la stabilité physico-chimique est optimale à un pH physiologique c'est-à-dire proche de 7. Pour une utilisation de lipides avec des particules d'oxyde de fer, il est donc impératif que ces dernières soient stables à un pH neutre. Leur surface est donc modifiée par complexation d'acide citrique, de façon à ce qu'elles possèdent des charges négatives à des pH proche de la neutralité. Les particules d'oxyde de fer, qui nous ont été données par J.M. Idee de chez Guerbet, ont donc été couvertes par du citrate grâce à une procédure expliquée par S. Mornet (ICMCB) que nous avons optimisée pour obtenir des suspensions les plus dispersées possibles à pH 7.

2.1.1.1 Préparation des suspensions de particules d'oxyde de fer

La procédure consiste à mélanger les particules avec de l'acide citrique, à enlever l'excès d'acide et à ajuster le pH. La solution de particules d'oxyde de fer est ajoutée à de l'acide citrique en poudre dans des proportions telles qu'il y ait 2,4 moles de fer pour 400 mg d'acide citrique. Après avoir été vortexé, le mélange est mis à centrifuger 4 minutes à 4500g. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu avec une solution de NaOH 0,2M. La solution est vortexée jusqu'à ce que le culot soit totalement redispersé et est remise à centrifuger. L'opération est recommencée jusqu'à ce que les particules de fer ne précipitent

plus lors de la centrifugation. En général il se forme un surnageant noir après l'ajout de la solution de NaOH, qui correspond à des particules bien dispersées. Le pH de la solution est alors ajusté aux alentours de 6,3 par ajout de NaOH 5M. Enfin la solution obtenue est passée sur un filtre de 100nm.

L'enjeu des différentes étapes du processus de complexation est de conserver ces particules dans un état dispersé et d'éviter ou de limiter la formation d'agrégats. Elles reposent sur une saturation des sites de complexation de l'acide citrique, sur la limitation de la quantité de contre-ions positifs dans la solution et sur une bonne redispersion des précipités. Tout d'abord une quantité d'acide citrique est pesée de façon à être en large excès par rapport au nombre de sites disponibles pour la complexation. Après ajout des particules et homogénéisation pour permettre la fixation de l'acide aux particules, cet excès doit être éliminé car il maintient un pH faible. Ces pH faibles en présence d'une grande quantité d'acide citrique (qui tamponne le milieu) implique alors l'ajout d'une quantité trop importante de NaOH, pour ajuster le pH aux alentours de 7, ce qui peut déstabiliser les particules. En effet l'excès de soude conduit à l'apport d'une quantité importante de contre-ion Na^+ qui masquent les charges négatives en surface des particules ce qui diminue leur répulsion et induit leur précipitation. Après mélange de l'acide citrique avec les particules le pH est acide et donc les particules non chargées précipitent. Elles sont alors sédimentées par centrifugation ce qui permet d'éliminer l'excès d'acide contenu dans le surnageant. Comme le culot contient encore de l'acide il est nécessaire de le resuspendre et de recommencer l'opération. Pour cela le milieu ajouté doit être basique, de façon à obtenir une charge de surface et donc une dispersion des particules. Ce milieu ne doit pas être trop basique car les particules, trop chargées, ne précipitent plus lors de la centrifugation. La solution la plus adaptée à ces contraintes semble être une solution de NaOH 0,2M. Les cycles de précipitation / resuspension sont recommencés jusqu'à ce que les particules ne sédimentent plus. Le pH est alors ajusté à 6,3 par ajout de soude concentrée. La NaOH est à forte concentration pour éviter la dilution du milieu et le pH n'est pas ajusté au dessus de 7 pour éviter un excès de contre-ions Na^+ . Enfin, pour éliminer les éventuels agrégats qui pourraient gêner lors de la calibration des liposomes, la solution est filtrée sur une membrane constituée de pores de 100nm.

2.1.1.2 Analyse des suspensions de particules d'oxyde de fer couvertes par du citrate.

Les suspensions de particules ainsi préparées ont été analysées par diffusion dynamique de la lumière (DLS) et par microscopie électronique à transmission (MET) pour déterminer l'état de dispersion des solutions et la taille des particules d'oxyde de fer. Ces solutions contiennent $1,74 \times 10^{17}$ particules par litre.

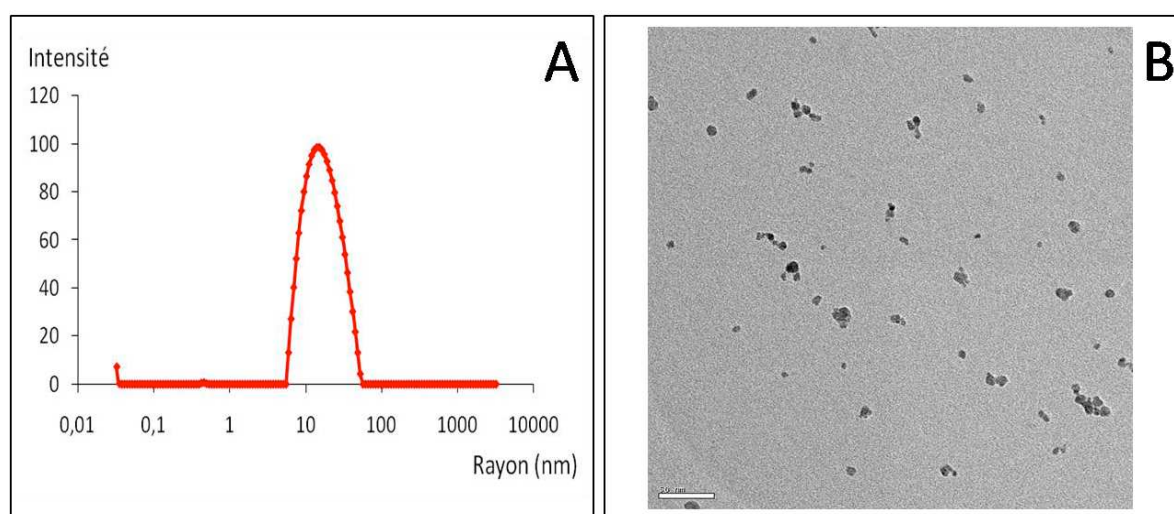


Figure III-22 : Caractérisation des particules de maghémite couvertes de citrate. Les suspensions contiennent $1,74 \times 10^{17}$ particules par litre. A) distribution de tailles par DLS B) visualisation par MET, barre d'échelle 50nm. Image S.Tan

Les mesures de DLS présentent un pic unique, large pour lequel l'intensité maximale correspond à un rayon de 14nm. Ceci indique qu'il y a une seule population d'objet de diamètre moyen de 30 nm environ, de taille variable mais inférieure à 100nm. La microscopie électronique permet de déterminer une taille de particule située entre 4 et 13nm avec une taille de 6-7nm pour la majorité d'entre elles (figure 20).

Ces résultats indiquent une taille de 7nm environ pour les particules et sont complémentaires en ce qui concerne leur dispersion. Les résultats de diffusion de la lumière indiquent une taille moyenne (≈ 30 nm) supérieure à ce qui peut être mesuré sur les images de MET (≈ 7 nm). Comme la diffusion de la lumière prend en compte la couche d'eau d'hydratation cette différence peut être due à l'eau adsorbée en surface. Malgré tout, l'influence d'agrégats doit être envisagée. Les images de microscopies laissent penser qu'ils existent effectivement en solution mais qu'ils sont peu nombreux. Quoi qu'il en soit, les agrégats éventuels sont

essentiellement de faible dimension et peu nombreux. La suspension obtenue est donc constituée d'éléments bien dispersés et de petite taille. Cinq suspensions mères de concentration $3,67 \times 10^{20}$; $1,74 \times 10^{20}$; $8,56 \times 10^{19}$; $4,16 \times 10^{19}$ et $2,04 \times 10^{19}$ particules par litres ont été synthétisées suivant cette procédure. Elles ont été utilisées pour réaliser l'encapsulation de particules d'oxyde de fer dans des liposomes.

2.1.2 Formation et caractérisation des magnétoliposomes

2.1.2.1 L'encapsulation passive

Les magnétoliposomes ont été formés par réhydratation de film lipidique avec la solution de particules de maghémite suivi d'une extrusion pour calibrer la taille des vésicules et encapsuler les particules puis séparation des particules non encapsulées par chromatographie d'exclusion de taille.

La technique de réhydratation de film lipidique a été choisie car elle est plus simple et plus rapide à mettre en œuvre que les méthodes de réversion de phase ou d'élimination de détergent. Lors de l'hydratation du film lipidique il se forme des liposomes dont l'intérieur contient une partie du milieu aqueux et donc des particules d'oxyde de fer. Ces liposomes sont multilamellaires et de grande taille. Pour obtenir des vésicules principalement unilamellaires et dont les dimensions sont compatibles avec une application in vivo, la taille a été calibrée à 100nm de diamètre par extrusion. Les liposomes sont passés de façon répétée à travers des filtres dont les pores sont d'abord de 200nm puis de 100nm. Lors de ces passages les vésicules vont se déformer pour traverser les pores et se casser en formant des liposomes de tailles plus petites et ceci jusqu'à ce qu'ils soient de la dimension des pores. Lors des ruptures il y a, au moins pour les éléments de faible masse moléculaire, équilibration des concentrations en solutés entre l'intérieur et l'extérieur des vésicules. Les liposomes réalisent alors une compartimentation de la solution. L'efficacité d'encapsulation mesurée par la quantité de particules internalisées par rapport à la quantité totale de particules, dépend de la quantité de vésicules et donc de la concentration en lipides.

Cette méthode de compartimentation du milieu, dite d'encapsulation passive, a pour conséquence qu'une majorité des particules sont situées en dehors des liposomes et doivent être séparées des magnétoliposomes. Cette séparation a été réalisée sur colonne d'exclusion stérique car pour des suspensions concentrées en particules de fer les passages sur colonnes magnétiques ou les méthodes de centrifugation sont difficilement applicables. Comme les

particules ne sont pas parfaitement dispersées et que les solutions sont très concentrées, la présence d'agrégats de taille proche de celle des vésicules ajoutées à la saturation de la colonne par les particules de maghémite conduit à la présence de particules résiduelles dans les suspensions de liposomes obtenues après le passage sur colonne. Pour les éliminer un excès de NaCl est ajouté de façon à écranter les charges des particules qui, après une nuit d'incubation, sont sédimentées par centrifugation. Le surnageant contenant les liposomes est alors prélevé.

Comme les solutions de liposomes sont très diluées, et alors impossibles à imager en cryomicroscopie électronique, après le passage sur colonne d'exclusion de taille il a été nécessaire, après avoir déterminé les quantités de particules par liposomes, de les concentrer sur une colonne magnétique. Les vésicules ayant encapsulées des particules de fer (en quantité suffisante) sont retenues grâce à un aimant dans le volume de la colonne. Après retrait de l'aimant les magnétoliposomes sont récupérés dans un volume d'environ 1ml. Les quantités de particules par liposomes sont alors déterminées et les échantillons ainsi concentrés sont imagés par microscopie électronique.

La procédure consiste donc à synthétiser des magnétoliposomes par réhydratation de film lipidique suivi d'extrusion. Les particules d'oxyde de fer sont encapsulées de façon passive au cours de ces étapes et celles qui ne sont pas internalisées dans une vésicule sont éliminées par chromatographie d'exclusion de taille puis sédimentation par centrifugation dans un milieu contenant un excès de NaCl. Un passage sur colonne magnétique peut être nécessaire pour concentrer les solutions. Les concentrations en lipides et en fer sont alors dosées avant et après concentration sur colonne magnétique et la quantité de particules par vésicules est déduite de ces dosages. Les lipides ont été quantifiés par dosage phosphate [191] et le fer par dissolution dans l'acide chlorhydrique et réaction avec de l'hexaferrocyanate de potassium. La quantité de fer en mole a été convertie en quantité de particules en se référant à la fiche techniques fournie par le fabricant, Guerbet, qui indique que 2,4 mole de fer correspond à $1,9 \times 10^{20}$ particules.

2.1.1.2 Influence de la concentration de la suspensions mère de particules sur la quantité encapsulée

Les variations de la quantité de particules encapsulées en fonction de la concentration de la solution mère ont été déterminées pour évaluer la procédure d'encapsulation passive. Dans cette procédure, la concentration en particules dans les vésicules doit être celle de la solution-mère. Nous avons alors mesurés la quantité de particules par vésicules et comparé cette valeur à celle attendue en théorie. Cette valeur théorique a été obtenue en déterminant la quantité de particules de la suspension mère contenue dans un volume équivalent à celui d'un liposome de 100nm. Dans un premier temps ces quantités ont été mesurées pour les échantillons après colonne d'exclusion de taille et avant colonne magnétique.

Nombre de part / litre de la solution mère	Nombre théorique de particules / liposome	Nombre de particules / liposome mesuré	quantité encapsulée / quantité théorique (en %)
3,67E+20	150	49	32
1,74E+20	71	24	34
8,56E+19	34	8	24
4,16E+19	17	5	29
2,04E+19	8	2	25

Figure III-23: Variation de la quantité de particules de maghémite coatées citrate encapsulées dans des liposomes en fonction de la concentration de la solution-mère, pour les solutions obtenues après colonne d'exclusion de taille.

Les résultats de la détermination de la quantité de particules encapsulées par liposome après colonne d'exclusion de taille (figure 23) indiquent que comme attendu, la quantité de particules encapsulées est d'autant plus importante que la solution mère est concentrée. Par contre la quantité internalisée correspond dans tous les cas à environ 30% de ce qu'elle aurait dû être si la concentration à l'intérieur des vésicules était celle de la solution.

Nombre de part / litre de la solution mère	Nombre théorique de particules / liposome	Nombre de particules / liposome mesuré	quantité encapsulée / quantité théorique (en %)
3,67E+20	150	76	50
1,74E+20	71	44	62
8,56E+19	34	29	85
4,16E+19	17	15	88

Figure III-24 : Variation de la quantité de particules de maghémite coatées citrate encapsulées dans des liposomes en fonction de la concentration de la solution-mère, pour les solutions obtenues après colonne d'exclusion stérique et concentration sur colonne magnétique.

Après concentration sur colonne magnétique la quantité de particules par liposome est plus élevée pour les vésicules retenues par l'aimant que ce qu'elle est pour la solution de

magnétoliposomes avant cette étape. La quantité encapsulée se rapproche d'autant plus de la quantité théorique que le nombre de particules par vésicule est faible. Seules quatre conditions sont présentées car pour la quantité encapsulée la plus faible trop peu de vésicules sont retenues par l'aimant pour pouvoir être dosées.

Les solutions concentrées sur colonne ont été visualisées par cryomicroscopie électronique pour vérifier qualitativement la répartition des particules.

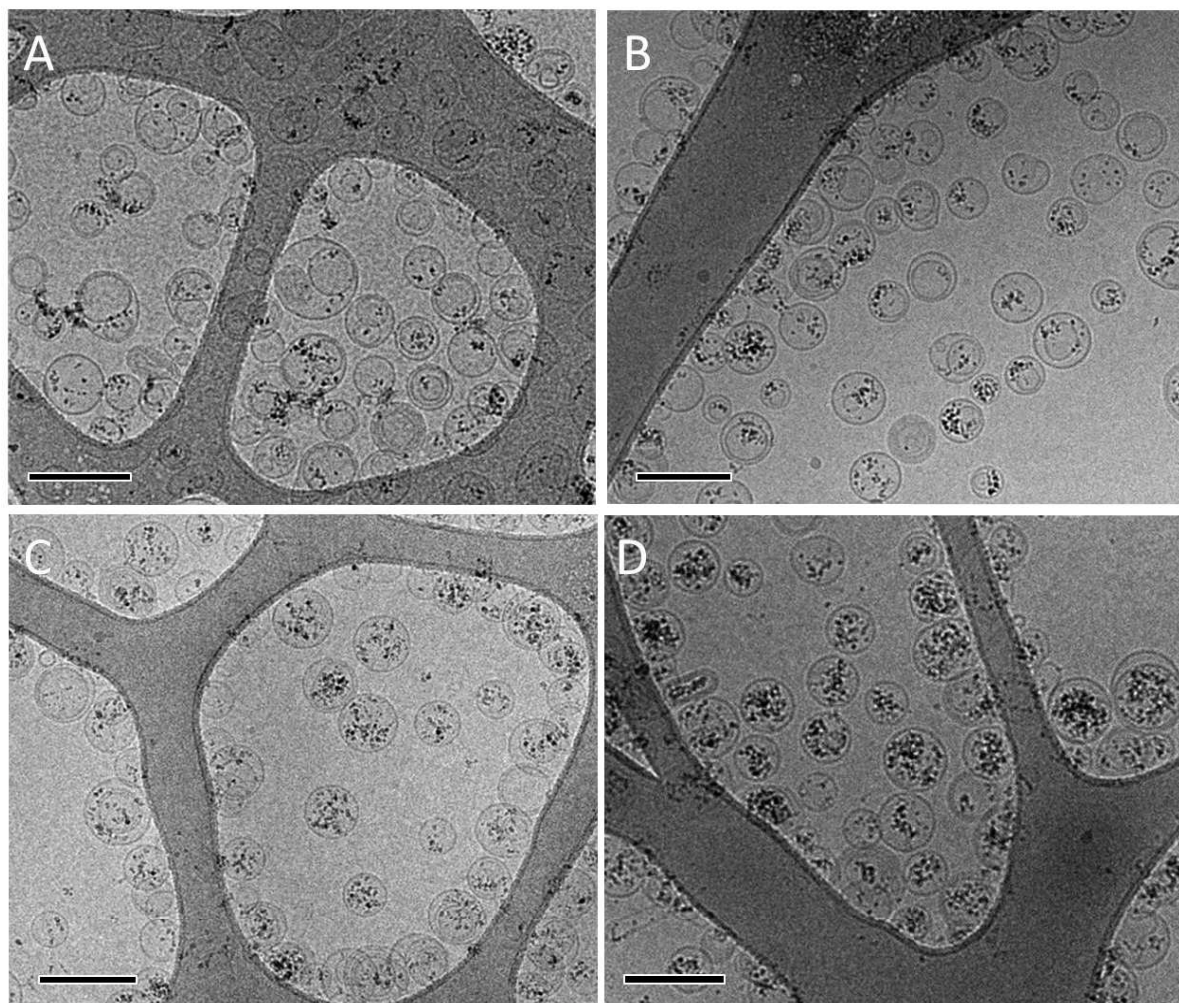


Figure III-25 : Suspensions de magnétoliposomes encapsulant des quantités croissantes de particules d'oxyde de fer de cryoMET. A) 15 particules / liposome ; B) 30 particules / liposome ; C) 45 particules / liposome ; D) 75 particules / liposome. Barre d'échelle 200nm. Les liposomes sont à une concentration d'environ 1 mg_{phospholipid} / ml (1,3mM). Images S.Tan.

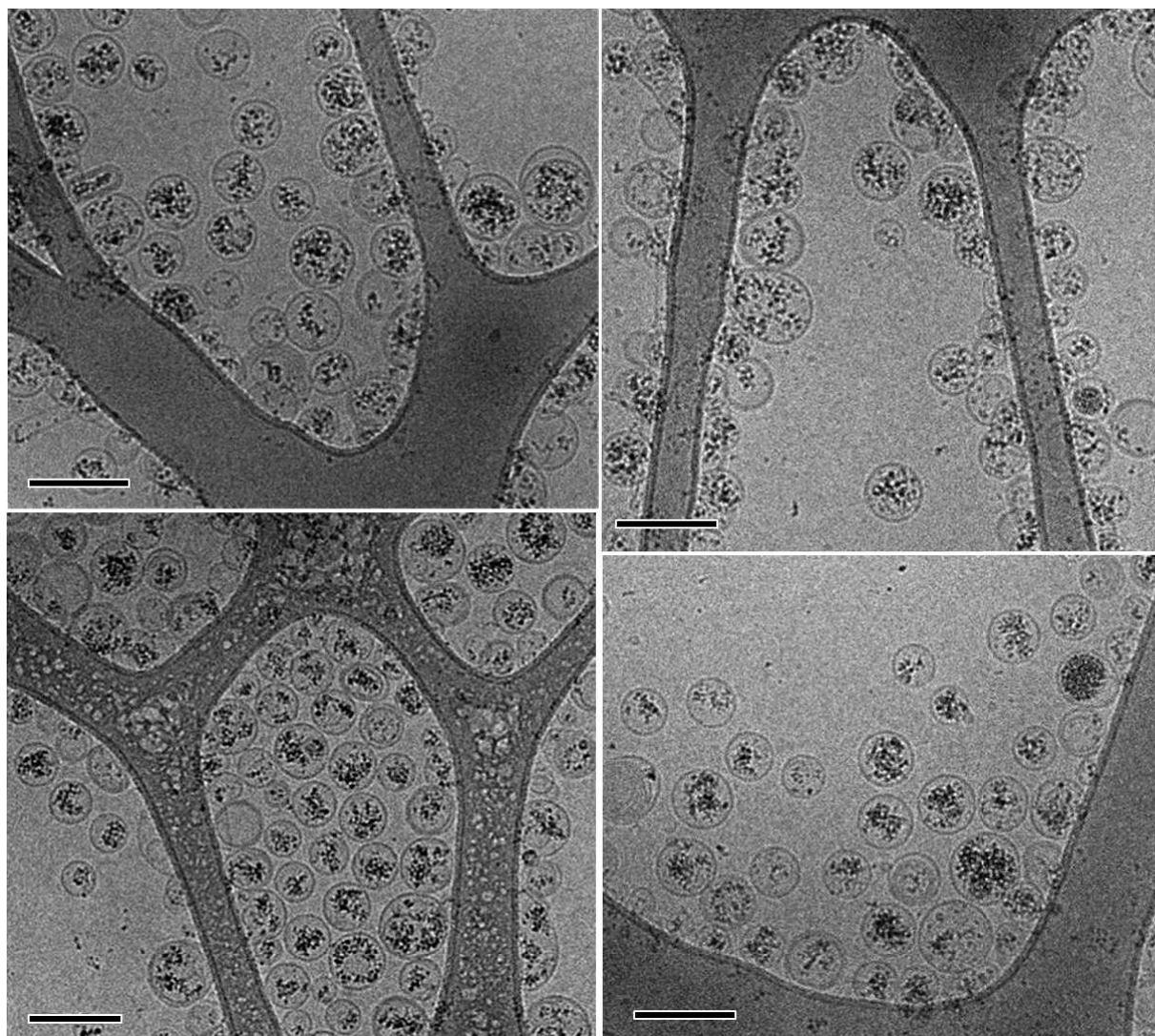


Figure III-26 : Galerie d'images de solutions de magnétoliposomes encapsulant 75 particules / liposome en moyenne de cryoMET. Barre d'échelle 200nm. Les liposomes DOPC / Chol (75/25 en mole) sont à une concentration d'environ 1 mg_{phospholipid} / ml (1,3mM). Image S.Tan.

Les images obtenues pour des quantités de particules encapsulées croissantes montrent que les particules sont d'autant plus chargées que les dosages indiquent un nombre de particules par liposome élevé. Les vésicules sont bien dispersées et présentent des diamètres compris entre 50nm et 200 nm pour une moyenne d'environ 100nm. La quantité de particules par liposome présente une certaine hétérogénéité c'est-à-dire qu'un certain nombre de vésicules est moins chargé que la moyenne mais la majorité est remplie de façon relativement semblable. De plus les particules de fer semblent, à ces grossissements, bien dispersées dans les vésicules.

2.1.2.3 Evaluation de la procédure d'encapsulation passive

L'ensemble des résultats des dosages et de microscopie électronique ont été obtenus afin de vérifier si, dans la pratique, la procédure d'encapsulation passive par réhydratation de film lipidique suivie d'extrusion se déroulait comme prévu par la théorie. Il s'agissait de vérifier qu'elle permettait de former des vésicules de taille calibrée à 100nm, internalisant des particules d'oxyde de fer et que la concentration en particules dans leur intérieur aqueux était celle de la solution mère.

Les images de cryomicroscopie électronique indiquent que les vésicules ont une taille de 100nm et qu'elles sont bien dispersées. En comparaison de ce qui est publié sur le sujet, ce diamètre de 100nm est inhabituel car dans la plupart des travaux sur des liposomes obtenus par encapsulation passives les vésicules sont calibrées à 200nm [204-208]. Cette taille est justifiée par les auteurs, par la nécessité d'avoir une quantité suffisante de particules de fer par liposome [204] notamment pour avoir des particules qu'il soit possible d'aimanter *in vivo*. Dans notre cas l'objectif est de mettre au point une procédure d'encapsulation pour pouvoir suivre ou imager des liposomes destinés au transport de composés thérapeutiques pour lesquels l'optimum de taille assurant la meilleure furtivité *in vivo* se situe aux alentours de 100nm [107, 199]. La taille de 100nm a donc été choisie mais il est à noter que l'obtention de vésicules d'un tel diamètre a été une gageure et n'a été possible qu'après la mise au point d'une procédure permettant une dispersion correcte des particules de maghémite, et ceci afin d'éviter l'obstruction des pores des filtres servant à la calibration par les agrégats de particules.

Les quantifications des particules de fer internalisé et les images de microscopie ont été menées pour évaluer la procédure d'encapsulation c'est-à-dire vérifier que la concentration en particules à l'intérieur des vésicules est celle de la suspension mère et donc que les liposomes sont d'autant plus chargés que la concentration de la suspension mère est importante. Les dosages et les images indiquent que la quantité de particules encapsulées par liposome dépend bien de la solution-mère de particules. Plus elle contient un nombre de particules par unité de volume important et plus les liposomes sont remplis. Comme supposé par la théorie, la synthèse de liposomes très chargés nécessite donc l'utilisation de solutions mères très concentrées. Néanmoins les dosages indiquent que la concentration en particules d'oxyde de fer à l'intérieur des vésicules n'est pas celle de la solution-mère. Cette concentration interne n'est que 30% de ce qu'elle devrait être en théorie. Ceci s'observe quelle que soit la solution utilisée ce qui suppose qu'un mécanisme commun est responsable de cette encapsulation non

idéale. Il est possible qu'au cours de l'extrusion, les ruptures des vésicules lors de la calibration ne créent pas des ouvertures de taille suffisante pour permettre un passage de particules qui soit idéal et donc une équilibration correcte des concentrations entre l'intérieur et l'extérieur des vésicules. En pratique la quantité encapsulée est limitée à 30% de ce qu'elle aurait dû être.

Un autre aspect de l'encapsulation est l'hétérogénéité de remplissage en particules des liposomes qui est montrée par les images de microscopie et confirmée par les dosages réalisés après colonne magnétique. Les images montrent que certaines vésicules sont moins remplies que ne l'est la majorité des liposomes et, à de très rares exceptions, certaines sont même quasiment vides. Les dosages réalisés après colonne magnétique vont aussi dans le sens d'une hétérogénéité de remplissage des vésicules. En effet seules les vésicules suffisamment chargées sont immobilisées par l'aimant au niveau de la colonne et les dosages indiquent que le nombre de particules par liposome est plus élevé pour les vésicules retenues que ce qu'il était dans la suspension initiale. Une certaine quantité de liposomes n'a donc pas été aimantée et ceci car ces derniers étaient trop peu chargés. Pour les solutions de liposomes très remplis, quasiment toutes les vésicules sont retenues et la concentration en particules contenues dans l'intérieur aqueux est quasiment la même avant et après colonne magnétique. Pour les suspensions synthétisées à partir de suspensions mères peu concentrées seules les vésicules les plus chargées sont retenues et dans ce cas les dosages indiquent que la concentration en particules contenues dans l'intérieur aqueux est quasiment celle de la suspension mère. Il apparaît donc, qu'au mieux, la concentration en particules à l'intérieur des vésicules est celle de la suspension mère. L'ensemble de ces données indique que lors de cette procédure d'encapsulation les vésicules sont chargées de façon inhomogène en particules de fer et que pour les plus remplies la concentration en particules dans l'espace interne est celle de la solution mère qui a servi à la synthèse.

Nous nous sommes concentrés sur les vésicules les plus remplies pour déterminer l'efficacité d'encapsulation et imager la répartition des particules d'oxyde de fer. Ces vésicules contiennent en moyenne 50 particules de fer par vésicule, une quantité proche de ce qui a été déduit par calcul pour des vésicules de 200nm par Martina et al. [205] à partir des quantités de fer et de lipides mesurées pour des vésicules de 200nm de diamètre. Dans notre cas c'est l'efficacité d'encapsulation qui a été déduite par calcul. Comme la procédure d'encapsulation passive correspond à une compartimentation du milieu contenant des particules de maghémite, plus il y a de vésicules et plus il y a de particules situées à l'intérieur de liposomes. L'efficacité d'encapsulation, c'est-à-dire la quantité de particules encapsulées

divisée par la quantité totale de particules de l'échantillon dépend donc de la concentration en vésicules. Cette efficacité d'encapsulation est calculée à partir de $EE = (n \times N_A \times C_{pl}) / (105000 \times C_{SM} \times V_{SM})$. Dans cette formule, 105000 est le nombre de lipides constituant un liposome de 100 nm de diamètre (à partir de : surface d'une tête polaire $= 60 \text{ \AA}^2$ et surface d'une vésicule $S = 4\pi r^2$ soit nombre de lipides $= [4\pi \times (50 \times 10^{-9})^2] / [60 \times 10^{-10}]$). Pour les autres termes : n est la quantité de lipides en moles, N_A le nombre d'Avogadro, C_{pl} la quantité de particules par liposome, C_{SM} la concentration de la solution mère exprimée en particules par litre et V_{SM} le volume de cette même solution. Pour $n = 0,00002$ moles, $C_{pl} = 50$ particules par liposome, $C_{SM} = 3,67 \times 10^{20}$ particules par litre et $V_{SM} = 0,00045$ litres $EE \approx 0,035$ soit 3,5%. Cette valeur est de l'ordre de celle obtenue par Martina et al [205].

La répartition des particules d'oxyde de fer dans les liposomes a été visualisée plus en détails à fort grossissement en microscopie électronique.

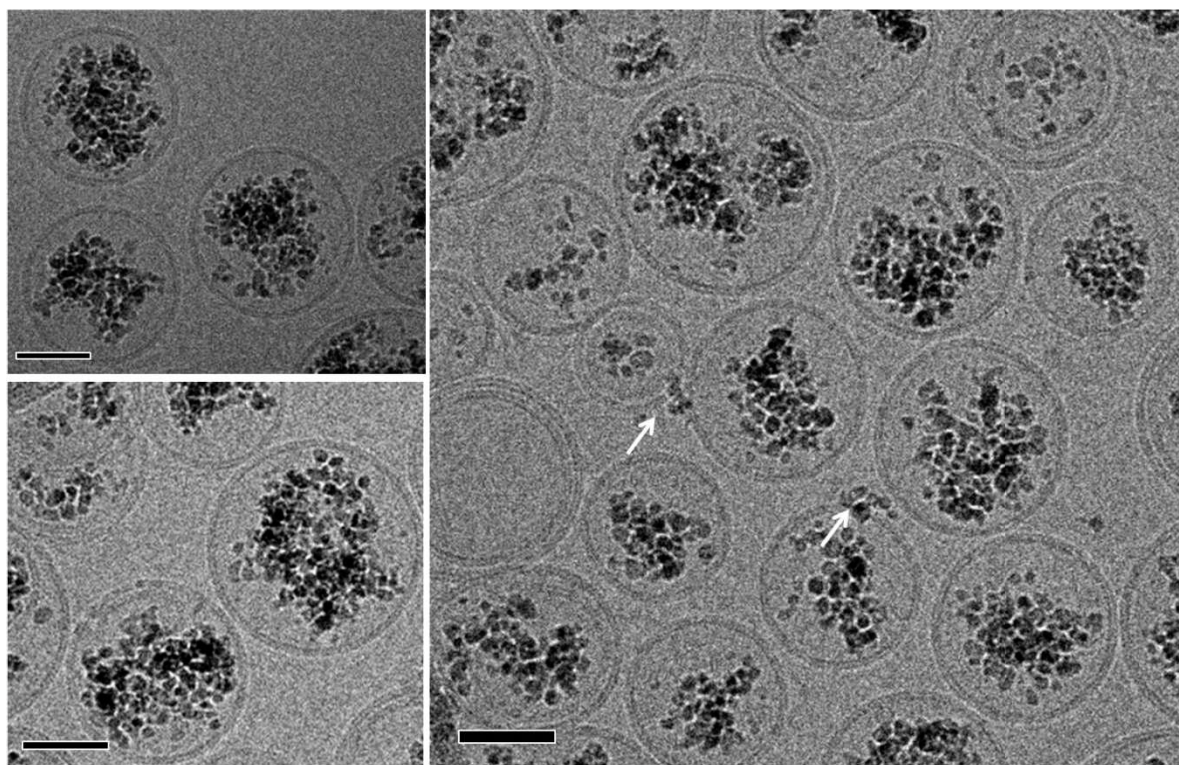


Figure III-27 : Galerie d'image de solutions de magnétoliposomes encapsulant 75 particules / liposome en moyenne de cryoMET. Barre d'échelle 50nm. Les flèches blanches indiquent les particules de fer qui semblent traverser les membranes. Les liposomes DOPC / Chol (75/25 en mole) sont à une concentration d'environ $1 \text{ mg}_{\text{phospholipid}} / \text{ml}$ (1,3mM). Image S.Tan.

Ces images suggèrent que les particules à l'intérieur des vésicules semblent agrégées et que certaines sont en contact avec des membranes (Figure 25 flèches blanches). Il est à noter la

présence d'un liposome totalement vide. Ceci est inattendu car les liposomes ont été retenus par aimantation et une telle vésicule aurait dû être éliminée. Comme des particules semblent traverser la bicouche lipidique il est possible qu'il s'agisse d'une particule chargée qui s'est vidée de son contenu. Ceci pose alors la question de la stabilité des magnétoliposomes.

2.1.3 Stabilité des suspensions de magnétoliposomes au cours du temps

L'état des vésicules un mois après leur formation a donc été visualisé par microscopie.

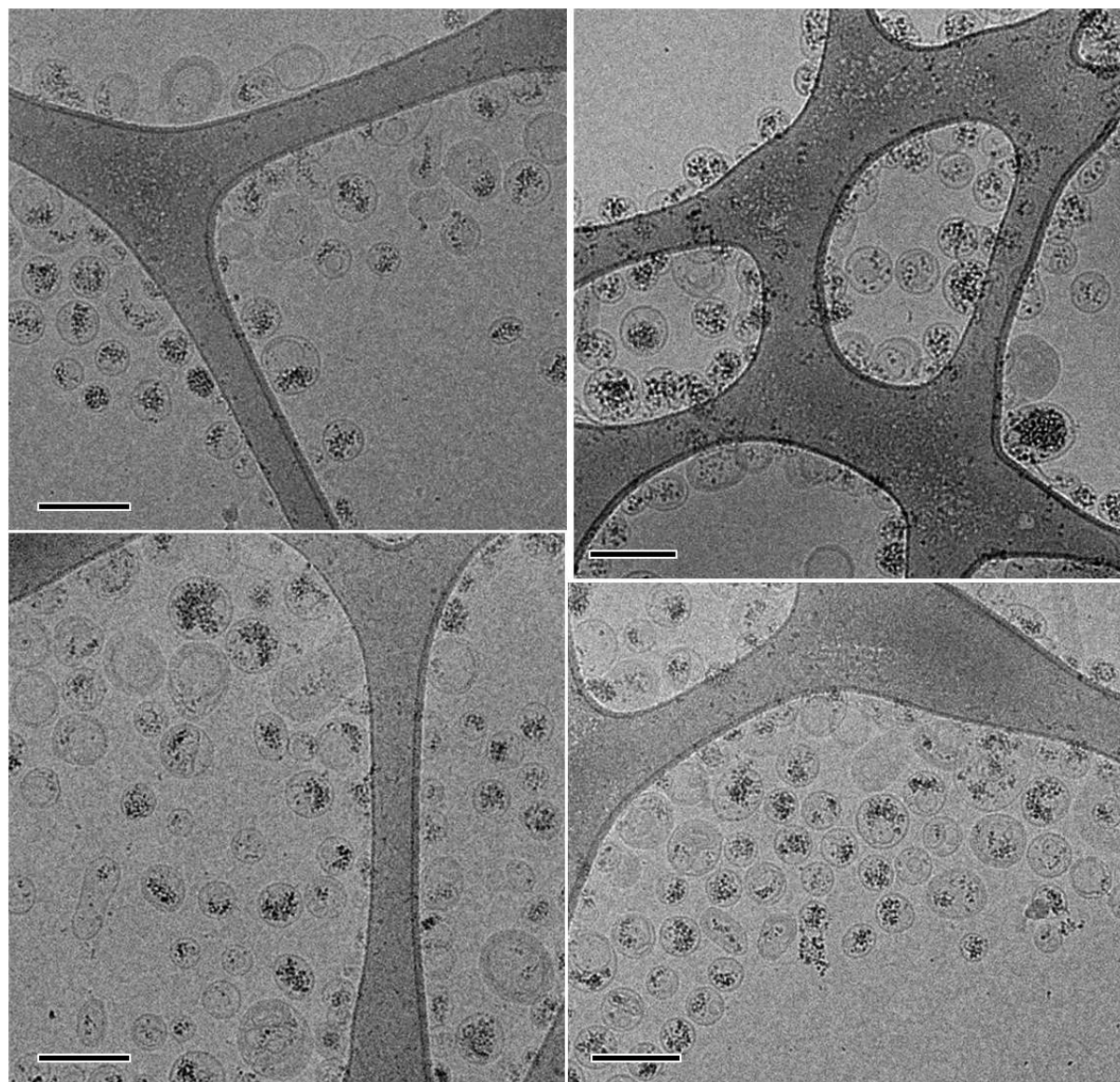


Figure III-28 : Images de cryoMET de magnétoliposomes encapsulant initialement 75 particules / liposome en moyenne, enregistrées un mois après la synthèse. Barre d'échelle 200nm. Les liposomes DOPC / Chol (75/25 en mole) ont à une concentration d'environ 1 mg_{phospholipid} / ml (1,3mM) Image S.Tan.

Les images indiquent que la majorité des vésicules ont le même aspect que celles de l'échantillon examiné juste après synthèse c'est-à-dire que les dimensions et contenus en particules semblent les mêmes. Par contre, il y a un nombre plus important de liposomes vides et de tailles semblables à celle des autres vésicules.

Il apparaît donc que les magnétoliposomes présentent une certaine instabilité au cours du temps vis-à-vis de l'encapsulation, même si ce phénomène ne semble concerner qu'une faible proportion des vésicules. Les images de microscopie obtenues à très fort grossissement semblaient indiquer une certaine capacité des particules de fer à traverser la membrane. Or ce passage de gros objets hydrophiles ne peut s'expliquer que par la formation de trous dans la membrane ou l'acquisition d'une certaine hydrophobicité par les particules. La formation de pores devant être provoquée, notamment par l'addition de détergent [206], l'hypothèse du passage à travers des trous est peu probable. L'acquisition d'un certain caractère hydrophobe via un coating de phospholipides peut alors être supposée. En effet le fer présente une certaine affinité pour les phosphates et certains auteurs ont même proposé un coating de la surface de telles particules avec des PC [209]. Les particules sont susceptibles de se lier au phosphate des phospholipides et ainsi devenir légèrement hydrophobes. Si cette couverture de la surface des particules par des lipides était importante, des particules devraient être trouvées à l'extérieur, en contact avec les membranes, responsables du pontage de plusieurs vésicules ou encore agrégées entre elles. Ceci n'est visible qu'extrêmement rarement. Il est possible alors que la liaison de particules aux lipides soit suffisante pour permettre à certaines particules de traverser la membrane mais que ce coating soit très limité ce qui explique l'état dispersé des particules et liposomes. De plus, l'évolution des vésicules vis-à-vis de la rétention de particules d'oxyde de fer ne semble pas la même pour toutes les vésicules. Certains liposomes sont totalement vides alors que la majorité est totalement pleine. L'état agrégé de particules à l'intérieur des liposomes peut être responsable de leur maintien dans les vésicules car les agglomérats qu'elles forment sont trop volumineux pour pouvoir sortir des liposomes. Les suspensions de magnétoliposomes semblent donc présenter une certaine instabilité au cours du temps qui ne concerne qu'une certaine partie des vésicules et se traduit par la perte des particules d'oxyde de fer encapsulées.

En conclusion, cette partie du travail a été menée pour caractériser la synthèse de magnétoliposomes de 100nm de diamètre par encapsulation passive. Une procédure a tout d'abord été mise au point pour obtenir une suspension de particules d'oxyde de fer coatées citrate qui soient les mieux dispersées possible. Le processus d'encapsulation passive a alors été suivi par dosage du nombre de particules contenues dans les

liposomes et par microscopie électronique. Comme attendu la quantité encapsulée est fonction de la concentration en particules de la solution mère. Elle est de 30% par rapport à ce qui est attendu. La quantité maximale de particules encapsulées est, en moyenne, de 50 particules par liposome. Dans ces conditions les vésicules ont une taille d'environ 100nm et l'espace interne est quasi totalement occupé par les particules. Après un mois, la majorité des liposomes semble ne pas avoir évolué même si certains se sont vidés de leur contenu au cours de cette période de temps. Cette procédure est donc adaptée à la synthèse de magnétoliposomes de 100nm de diamètre encapsulant de façon relativement stable des particules d'oxyde de fer couvertes par du citrate.

2.2 Formulation de magnétoliposomes présentant une charge de surface

La seconde étape dans la formulation de liposomes encapsulant des particules d'oxyde de fer a été la synthèse de magnétoliposomes chargés négativement pour lier des Anx5-PEG en surface des vésicules.

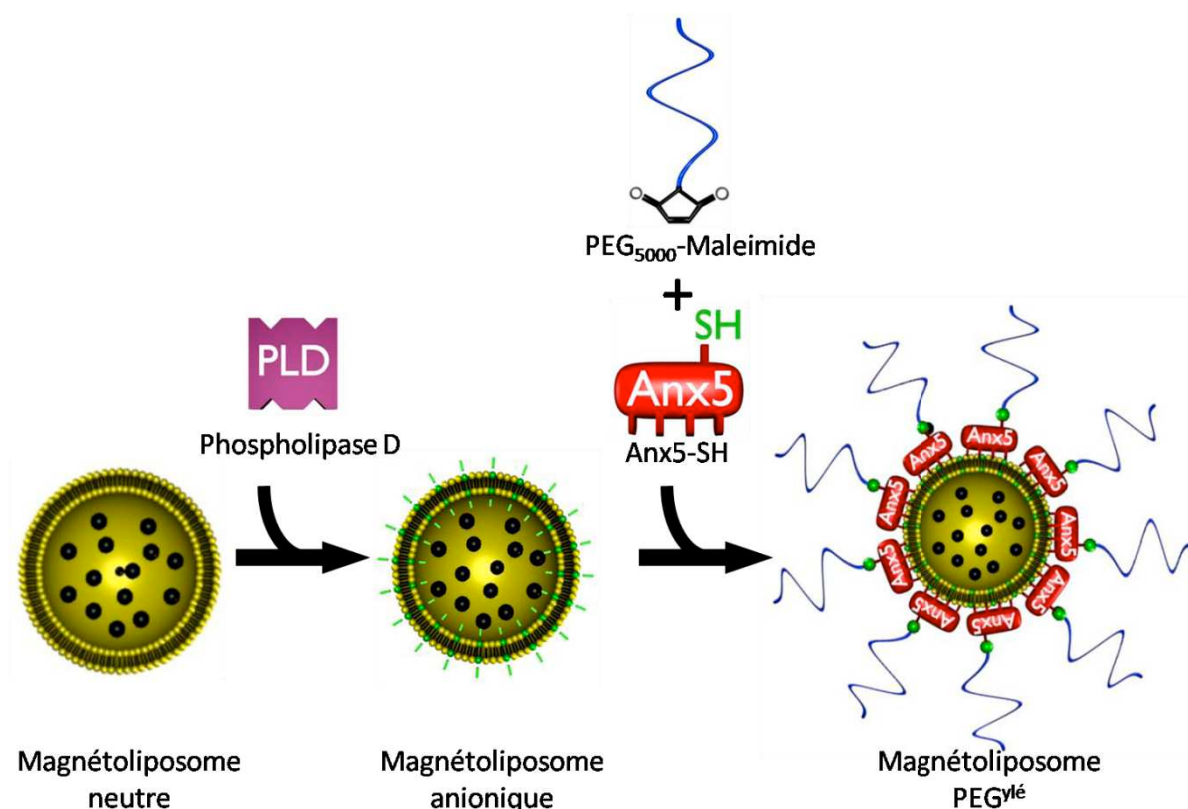


Figure III-29 : Schéma général de la stratégie envisagée : modification de magnétoliposomes neutres par une enzyme, la phospholipase D, pour obtenir la charge de surface négative nécessaire à la liaison d'Anx5-PEG. Les Anx5-PEG sont obtenues par liaison covalente de PEG5000-maleimide sur des Anx5-SH.

L'utilisation des Anx5-PEG a été envisagée pour combiner utilisation des Anx5ZZ-anticorps pour la fonctionnalisation et furtivité *in vivo*. Dans notre travail l'objectif est, à terme, de lier des complexes Anx5ZZ-anticorps pour associer un élément d'adressage aux liposomes. Ceci nécessite une charge de surface négative car les Anx5 sont des protéines qui se lient de façon Ca^{2+} -dépendante aux membranes anioniques. La présence d'une charge de surface négative étant néfaste pour la furtivité du vecteur *in vivo*, la surface non occupée par l'Anx5ZZ-anticorps a été couverte avec des Anx5-PEG. D'habitude la furtivité des liposomes est assurée grâce à des lipides-PEG qui permettent la formation d'une couche protectrice de polymères en surface. Cette barrière permet de prolonger la durée de vie de liposomes neutres mais est peu efficace pour des membranes négatives en particulier lorsque la charge est portée par des PS [99]. En effet l'exposition de PS est caractéristique des cellules mortes ou des débris cellulaires et constitue le signal pour les acteurs du système immunitaire, notamment les macrophages, d'un élément à éliminer. Il est donc nécessaire de masquer ces charges tout en conservant une couche de PEG pour éviter une prise en charge trop rapide des vecteurs par le système immunitaire. Les charges sont écrantées en couvrant la surface des vésicules par des Anx5. Comme les Anx5 ne lient qu'une partie des PS, les vésicules conservent une charge négative mais la couche de protéine peut constituer un bouclier qui limite l'accès et donc la reconnaissance des lipides chargés par les éléments du système immunitaire. Néanmoins la furtivité *in vivo* nécessite l'addition d'une couche de PEG sur les liposomes [71]. Les Anx5 ont donc été liées à du PEG pour associer le polymère aux vésicules sans qu'il soit gêné par les Anx5 en surface, ce qui aurait été le cas avec des lipides-PEG. La furtivité des liposomes est donc assurée par des Anx5-PEG qui masquent les charges négatives et présentent du PEG de façon à former une couche protectrice vis-à-vis d'une élimination par le système immunitaire.

Que ce soit avec des Anx5-PEG ou avec des lipides-PEG, qui portent une charge négative, les solutions envisagées pour assurer la furtivité des liposomes nécessitent ou induisent une charge de surface négative. Dans notre cas nous souhaitons rendre furtif des liposomes encapsulant des particules d'oxyde de fer. Il s'agit de vésicules dont la membrane est chargée et dont l'intérieur contient des particules de maghémite stabilisées par un coating citrate, c'est-à-dire par des répulsions électrostatiques. Comme le feuillet interne de la bicouche est anionique et que la charge des particules d'oxyde de fer est elle aussi négative, les répulsions membrane-particules sont susceptibles d'influencer l'efficacité d'encapsulation de ces particules à l'intérieur des liposomes et donc de diminuer la quantité de particules contenues

dans chaque vésicule. Nous avons donc cherché à vérifier si la présence de lipides négatifs dans la membrane avait une influence sur l'encapsulation des particules d'oxyde de fer mais aussi sur la stabilité des magnétoliposomes. Cette influence a été vérifiée pour des proportions correspondant aux quantités de lipides-PEG utilisés d'habitude (cf situation du sujet) ou de PS nécessaires à la liaison d'Anx5-PEG. Comme il est apparu qu'il y avait une influence, notre stratégie a été de synthétiser des magnétoliposomes non chargés puis de modifier leur surface pour leur ajouter du PEG grâce à des Anx5-PEG.

L'obtention de liposomes négatifs à partir de vésicules neutres a été réalisée par modification enzymatique de la surface des membranes. Une fois les magnétoliposomes non chargés synthétisés il faut modifier la surface des membranes sans porter atteinte à l'intégrité des vésicules c'est-à-dire sans perdre le contenu encapsulé. Les modifications chimiques des têtes polaires des lipides sont inapplicables car elles nécessitent des passages en solvant apolaire ou des conditions de pH incompatibles avec le maintien des structures membranaires. C'est pourquoi la modification de surface a été réalisée par une enzyme, la phospholipase D (PLD), une protéine qui peut agir dans des conditions où l'intégrité des vésicules est préservée.

Les phospholipases D et en particulier celles extraites des levures sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des têtes polaires des phosphatidylcholines (PC) mais aussi leur trans-estérification, ce qui a conduit à les utiliser en biotechnologies. Des activités de phospholipases D ont été mises en évidence dans des organismes simples et complexes, bactéries, levures, plantes et animaux [210]. Pour ces trois derniers, levures, plantes et mammifères, ces enzymes agissent spécifiquement sur la PC. Elles catalysent l'hydrolyse de la tête polaire pour donner de l'acide phosphatidique (PA) et de la choline mais peuvent aussi réaliser la trans-estérification c'est-à-dire qu'en présence d'un alcool approprié (plutôt un alcool primaire) elles réalisent, après élimination de la choline, la liaison de l'alcool sur le phosphate du PA.

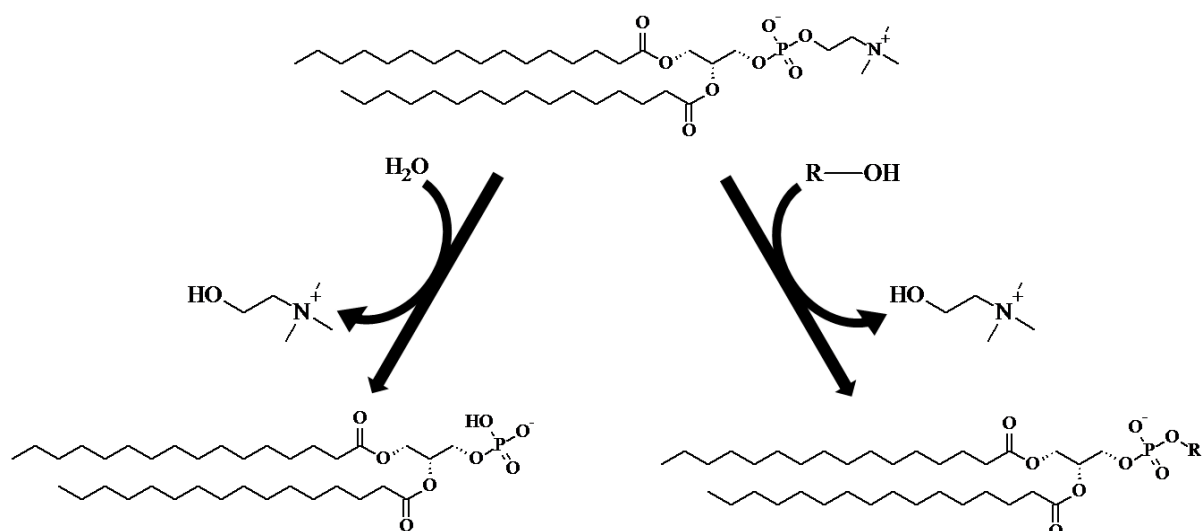


Figure III-30 : Action de la phospholipase D sur la phosphatidylcholine : hydrolyse de la choline pour donner de l'acide phosphatidique ou trans-estérification d'un alcool accepteur.

Du fait de cette activité enzymatique vis-à-vis des lipides et en particulier de la génération de PA, la PLD est impliquée dans des processus de signalisation ou de régulation cellulaire [210] mais c'est essentiellement sa capacité de trans-estérification qui a conduit à son utilisation en biotechnologie [211]. Cette fonction permet la formation de lipides naturels difficiles à produire tels que la phosphatidylsérine ou le phosphatidylglycérol [212, 213] mais aussi de lipides artificiels possédant une tête polaire synthétique [214, 215].

Ces synthèses utilisent principalement des enzymes issues de levures et sont réalisées dans un milieu contenant un solvant polaire et un apolaire [212-215]. L'utilisation d'enzymes de levure est due à leur activité de trans-estérification, à la facilité de leur production, de leur stockage et au fait qu'elles ne sont régulées quasiment que par le Ca^{2+} et non pas par un ensemble de facteurs. L'utilisation d'un mélange de solvants polaire et apolaire est dictée par des objectifs de rendement. Le solvant aqueux est nécessaire pour l'activité de l'enzyme mais un milieu organique est ajouté pour localiser les lipides à l'interface polaire / apolaire et éviter la formation d'agrégats lipidiques de type liposome. En effet dans ces vésicules délimitées par une bicouche lipidique, les lipides du feuillet interne ne sont pas accessibles par une enzyme présente à l'extérieure des vésicules, ce qui limite la quantité de lipides formés.

Dans le cas d'une utilisation pour modifier la surface de liposomes la PLD est très appropriée pour la formation de PA mais l'activité de trans-estérification est limitée par le fait que l'enzyme est régulée par le Ca^{2+} [216]. En effet le changement de tête polaire nécessite le passage par la formation de PA et en présence de Ca^{2+} les liposomes constitués de tels lipides agrègent et même fusionnent si la quantité de PA est importante. Cela conduit à leur

précipitation et, dans le cas où il y a fusion, à la formation de vésicules plus grosses que celles initialement présentes. Il a été décrit qu'en absence de Ca^{2+} les vésicules restent intactes mais que l'enzyme ne réalise plus la trans-estérification et que la formation de PA est limitée à environ 70% des lipides [216].

Comme notre objectif est la modification de la surface de liposomes sans altération de leur intégrité, pour obtenir une charge de surface négative et afin de leur lier des Anx5, l'utilisation de PLD paraît appropriée. En absence de Ca^{2+} il semble possible de conserver intactes, après action de l'enzyme, des vésicules de taille calibrée à 100nm sans pertes des particules de fer encapsulées. De plus la formation de PA permet de modifier la charge de surface des vésicules qui devient négative et peut ainsi permettre la liaison des Anx5. En effet cette protéine se lie via le Ca^{2+} à la charge négative portée par le phosphate des phospholipides négatifs tels que les PS et les PA, lorsque ces derniers représentent 20-30% des lipides de la membrane et que le Ca^{2+} est à une concentration physiologique (2mM). Comme indiqué précédemment, la transformation de PC en PA par action de la PLD sur des liposomes se fait avec un rendement de 70% [216]. Cette quantité de PA est suffisante pour réaliser l'interaction Anx5 / liposome. Nous avons donc modifié la surface de liposomes en utilisant la PLD de telle sorte qu'il soit possible d'y lier des Anx5.

En résumé, l'objectif de cette partie du travail a été de lier des Anx5-PEG à des magnétoliposomes dont la surface a été modifiée par action d'une enzyme. Ce travail s'organise en plusieurs étapes : 1), les Anx5-PEG ont été synthétisées par liaison de PEG-maléimide sur des Anx5-SH et le couplage a été caractérisé par gel d'acrylamide 2) L'effet de la charge de la membrane sur l'efficacité d'encapsulation a été évalué par dosages des phospholipides et du fer 3) L'effet de la phospholipase D sur les vésicules, c'est-à-dire la conversion de PC en PA, a été examiné par chromatographie sur couche mince et la capacité des liposomes modifiés par la PLD à lier les Anx5-PEG a été estimée par gel d'acrylamide en conditions non dénaturantes.

2.2.1. Mise au point et caractérisation des Anx5-PEG

2.2.1.1 Synthèse des Anx5-PEG

Nous avons tout d'abord mis au point les Anx5-PEG qui doivent être utilisées pour fixer le PEG nécessaire à la furtivité *in vivo* sur les liposomes. Les Anx5 utilisées pour le couplage sont des mutants exposant un thiol qui ne gêne pas l'interaction avec les membranes. Ce thiol peut être utilisé pour réaliser des couplages covalents et dans ce cas pour greffer du PEG. Le PEG choisi a une masse de 5000 Da pour avoir une couverture de PEG identique à celle obtenue avec des lipides. En effet, pour des raisons de stabilité, la proportion de lipides-PEG2000 est de 5% et celle des lipides-PEG5000 de 2-3%. Comme la quantité d'Anx5 qui couvre la surface d'un liposome correspond à 2% des lipides du feuillet externe, le PEG5000 a été choisi pour être couplé aux Anx5-SH et obtenir une couverture identique à celle obtenue avec les lipides-PEG. La liaison du PEG sur les Anx5 a tout d'abord été caractérisée et la liaison Ca^{2+} -dépendante des Anx5-PEG ainsi formées sur des liposomes PC : PS a été vérifiée.

Les Anx5-PEG ont donc été synthétisées par couplage covalent de PEG5000-maléimide sur des Anx5-SH et le couplage a été caractérisé par gel d'acrylamide en conditions dénaturantes. Pour cela nous avons utilisé l'Anx5 mutante qui présente un thiol accessible au solvant et situé sur la face opposée à la face liant les membranes. Les Anx5-SH ont été mélangées avec des quantités croissantes de PEG5000-maléimide à pH 6,3 et, après quatre heures d'incubation, déposées sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes.

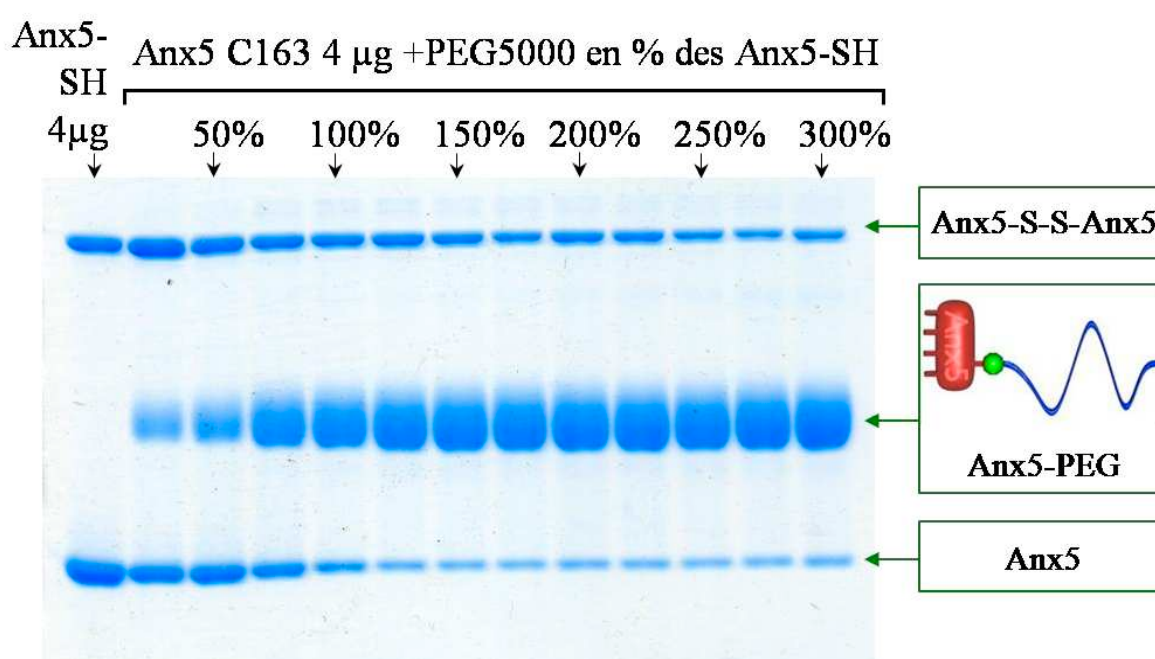


Figure III-31 : Caractérisation du couplage covalent Anx5-SH / PEG5000-maléimide par SDS-PAGE. Le premier puits correspond à l'Anx5-SH seule ; les puits suivants correspondent à des mélanges d'Anx5-SH avec des quantités croissantes de PEG-maléimide. La quantité d'Anx5-SH déposée dans chaque puits est fixe (4µg ou 0,112 nmole) et la quantité de PEG5000-maléimide est exprimée en pourcentage de la quantité (en mole) d'Anx5-SH.

Les gels ont été menés pour mettre en évidence la formation d'un complexe covalent résultant de la liaison entre l'Anx5-SH et le PEG-maleimide. Ils montrent que l'Anx5-SH est présente sous deux formes et que l'addition de PEG5000-maléimide conduit à l'apparition d'une troisième espèce plus lourde que l'Anx5-SH, l'Anx5-PEG. La taille de la bande qui lui est associée augmente jusqu'à ce que la quantité de PEG corresponde à 125% de la quantité d'Anx5-SH. Pour des quantités de PEG plus importantes l'intensité de cette bande n'évolue plus.

La caractérisation de l'association Anx5-SH PEG5000-maléimide a été menée pour définir les conditions de réalisation du couplage. Lorsque les deux partenaires de la réaction sont en quantité équivalente, le couplage est quasi-total. Ceci confirme que la réaction thiol-maléimide est très efficace. Néanmoins, un léger excès de PEG-maléimide est nécessaire pour que toutes les Anx5-SH susceptibles d'être liées réagissent. C'est pourquoi dans la pratique, pour être certain que tout est lié, les PEG-maléimides sont ajoutés en excès de 2 fois la quantité d'Anx5-SH présentes en solution. Les Anx5 qui n'ont pas réagi sont soit sous forme de dimère soit en faible proportion sous forme monomère. Pour les dimères le thiol est inaccessible car engagé dans un pont disulfure. Pour les monomères il s'agit de protéines présentes en faible proportion qui, pour des raisons inexplicables, liées aux étapes de production des protéines, ne sont pas réactives. Quoiqu'il en soit ces Anx5 sans PEG sont en quantité négligeable et ne sont donc pas séparées du reste des Anx5-PEG pour les étapes suivantes. La procédure de couplage optimisée consiste donc à mélanger les Anx5-SH avec des PEG5000-maléimide en quantité deux fois plus importante que les protéines et à incubier le mélange pour que la réaction se fasse.

2.2.1.2 Caractérisation de la liaison des Anx5-PEG à des liposomes PC : PS

Une fois les Anx5-PEG synthétisées, nous avons caractérisé la liaison Ca^{2+} -dépendante de ces protéines aux liposomes par gel d'acrylamide en conditions non dénaturantes. Dans ces

conditions, les liposomes et les Anx5-PEG qui leur sont liées sont retenus en haut du gel. Ainsi les complexes liposomes-Anx5 peuvent être distingués des Anx5 non liées. Il est alors possible de déterminer la quantité liée en faisant la différence entre la quantité de protéines présentes dans l'échantillon et la quantité non liée visible sur le gel. Pour caractériser la liaison Anx5-PEG-vésicule, des liposomes PC:PS (4 :1 rapport molaire) sont mélangés avec des quantités croissantes d'Anx5-PEG, en présence de Ca^{2+} 2mM. Les quantités de protéines correspondent à différents pourcentages de couverture de la surface des vésicules calculés à partir des données théoriques. Ces échantillons ont été incubés une demi-heure et mis à migrer sur gel.

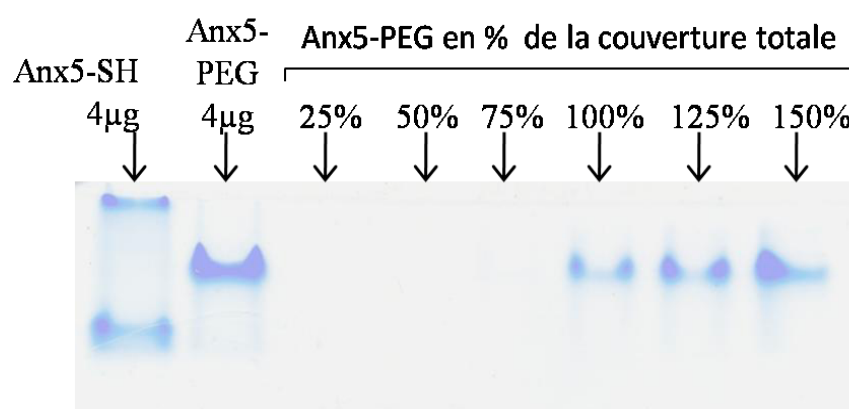


Figure III-32 : Caractérisation de la liaison Ca^{2+} -dépendante des Anx5-PEG sur des liposomes PC : PS (7 : 3 en mole) par PAGE en condition non dénaturantes + CaCl_2 2mM. Le premier puits correspond à l'Anx5-SH seule, le deuxième puits correspond à l'Anx5-PEG, les suivants correspondent à des mélange d'une quantité fixe de liposomes PC : PS (9µg soit 11nmoles) avec des quantités croissantes d'Anx5-PEG. La quantité d'Anx5-PEG déposée est exprimée en pourcentage de la quantité théorique nécessaire pour avoir couverture totale de la surface des liposomes. (Pour la condition 100%, la quantité de protéine est de 4µg soit 0,112nmoles).

Les gels en condition dénaturantes ont été menés pour caractériser la liaison Ca^{2+} -dépendante des Anx5-PEG aux liposomes PC : PS. L'Anx5-SH est présente sous deux formes : une forme

monomérique et une forme dimérique due à l'association de deux Anx5-SH via un pont disulfure. L'Anx5-PEG est présente sous une seule forme ce qui confirme que les Anx5 non liées à un PEG sont en quantité négligeable. Lorsque des Anx5-PEG sont ajoutées en quantité croissante aux liposomes, en présence de Ca^{2+} , la totalité des protéines sont retenues sur les liposomes pour des quantités correspondant à la couverture de 25,50 et 75% de la surface des vésicules. Pour des quantités plus élevées, il y a des Anx5-PEG non liées. Les résultats indiquent donc qu'il y a liaison des Anx5-PEG sur les liposomes et que cette fixation se fait de façon totale pour des quantités sous saturantes

La liaison des Anx5-PEG se fait donc de façon très efficace même si toutes ne sont pas fixées pour une quantité permettant, en théorie, de saturer la surface. Pour des quantités sous saturantes la surface de la membrane est très accessible et la fixation des Anx5-PEG se fait de façon totale, comme attendu de la part des Anx5. En effet cette protéine a un K_d de l'ordre de 10^{-12}M en présence de quelques mM de Ca^{2+} [164] et réalise donc une liaison quasi covalente. Le fait qu'à 100% de couverture il reste des Anx5-PEG non liées peut être expliqué par l'accessibilité limitée de la surface lorsqu'il y a une grande quantité de protéines. En effet les quantités théoriques sont déduites de mesures faites dans des conditions où les Anx5 sont en très large excès [167]. La réaction de fixation est donc fortement déplacée dans le sens de l'association à la membrane et tous les espaces disponibles sont occupés. Lorsque la quantité de protéines présente dans le milieu correspond juste à la quantité théorique nécessaire à la couverture totale de la surface, l'accessibilité de la membrane peut certainement devenir un facteur limitant. En effet une grande quantité de protéines se fixe de façon immédiate, occupe la majorité de l'espace et gêne l'accès des Anx5-PEG qui ne sont pas encore liées. En plus de cela, la présence d'une couche de PEG peut contribuer à la répulsion des Anx5-PEG non liées. Tout cela peut expliquer que les Anx5-PEG se fixent de façon totale pour des quantités inférieures à celle nécessaire pour saturer la surface des vésicules et qu'une certaine partie d'entre elles reste libre pour des quantités saturantes.

Nous avons donc formé des Anx5-PEG et caractérisé leur fixation sur des liposomes. Les Anx5-PEG sont synthétisées de façon simple par liaison covalente de PEG5000-maléimide sur des Anx5-SH. Cette réaction nécessite un léger excès de PEG5000-maléimide et une étape d'incubation. Les Anx5-PEG résultantes se lient en surface de liposomes de façon très efficace, quasi-totale. Ces Anx5-PEG seront utilisées pour assurer la furtivité de liposomes in vivo.

2.2.2. Influence de la charge négative des membranes sur la formation de magnétoliposomes

Notre objectif est la mise au point de magnétoliposomes pour lesquels la furtivité est assurée par des Anx5-PEG et qui doivent donc être chargés négativement pour lier ces protéines. Nous avons donc cherché à caractériser l'effet de la charge membranaire négative sur l'efficacité d'encapsulation et sur la stabilité des vésicules internalisant des particules d'oxyde de fer

2.2.2.1 Influence de la charge négative des membranes sur l'efficacité d'encapsulation

L'effet de la charge négative de la membrane sur l'efficacité d'encapsulation de particules de maghémite coatées citrate a été examiné en faisant varier la proportion de PS. Les suspensions de magnétoliposomes ont été obtenues par encapsulation passive, plus précisément par réhydratation de film lipidique avec une solution de particules d'oxyde de fer (coatées citrate), extrusion pour calibrer la taille des vésicules et séparation liposomes / particules non encapsulées sur colonne d'exclusion stérique puis sédimentation par centrifugation en présence d'un excès de sel.

Cinq compositions lipidiques ont été testées : DOPC : DOPS 100 : 0 ; 95 : 5 ; 70 : 30, 50 : 50 et 35 : 65 (mole : mole). Toutes ont été synthétisées avec la même solution de particules de maghémite. Pour chaque condition les quantités de particules par liposomes ont été déterminées par dosage du fer et des lipides. Comme précédemment, les résultats présentés sont exprimés en pourcentage de la quantité théorique qui aurait dû être si l'encapsulation passive se faisait de façon idéale (en théorie la concentration en particules dans les liposomes devrait être celle de la solution-mère).

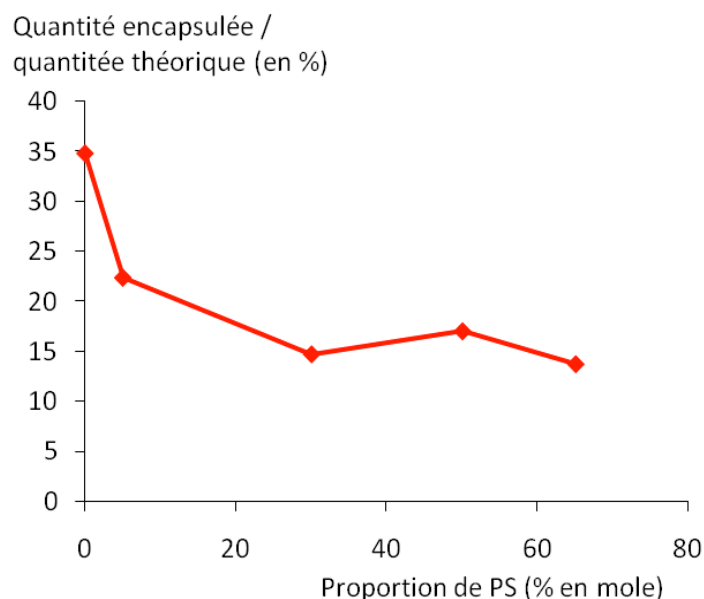


Figure III-33 : Evolution de la quantité de particules d'oxyde de fer encapsulées en fonction de la densité de lipides anioniques (PS).

Les résultats indiquent un effet de la charge négative des membranes sur l'encapsulation des particules coatées citrate. Plus la membrane contient une proportion élevée de PS et moins il y a de particules dans les liposomes. En absence de PS la quantité encapsulée est environ 35% de la concentration théorique, pour 5% de PS elle est de 20% environ et pour 35%, 50% et 65% de PS elle est d'environ 15%.

L'influence de la charge de surface sur l'encapsulation des particules d'oxyde de fer a été menée pour savoir si les formulations utilisées pour fixer des Anx5 ou contenant des lipides anioniques PEGylés se comportaient comme les liposomes neutres caractérisés précédemment. En effet pour avoir des temps de circulation *in vivo* les plus élevés possibles, la surface des liposomes doit être couverte d'une couche de PEG. En général ces PEG sont liés à des lipides mais dans notre cas ils sont couplés à des Anx5. Les lipides PEG sont anioniques et apportés de façon à représenter au maximum 5% des lipides de la membrane et la fixation d'Anx5 nécessite d'avoir une proportion de PS d'environ 20 à 30% minimum des lipides totaux. Quelle que soit la stratégie utilisée, la formulation de liposomes furtifs implique donc que les membranes aient une charge négative et nous avons voulu savoir si cette charge pouvait limiter l'encapsulation de particules d'oxyde de fer, elles-mêmes anioniques. Il apparait que même des proportions faibles de PS, 5% des lipides totaux, affectent cette efficacité. Les quantités de particules internalisées représentent alors, pour 5% et 30% de PS, environ les deux tiers et la moitié de la quantité mesurée pour les liposomes

neutres. L'utilisation de lipides-PEG, qui conduit à l'apport de 5% de lipides anioniques, a donc a priori un effet sur l'efficacité d'encapsulation et la quantité de PS utilisée pour fixer les Anx5-PEG aussi. Cette limitation n'est pas rédhibitoire mais est malgré tout un facteur limitant dans l'optique d'obtenir des vésicules les plus chargées possibles. Les causes de cette diminution d'efficacité d'encapsulation sont a priori les répulsions entre particules d'oxyde de fer et les membranes. En effet les particules de maghémite sont stabilisées par une couverture de citrate qui leur confère une charge négative. Plus la membrane est chargée et plus les répulsions électrostatiques particules-membrane sont importantes et limitent la quantité de particules encapsulées.

2.2.2.2 Influence de la charge négative des membranes sur la stabilité des magnétoliposomes

Le deuxième paramètre examiné pour évaluer l'influence de la charge négative des membranes est la stabilité au cours du temps des magnétoliposomes. L'évolution des liposomes encapsulant des particules de maghémite a été suivie par cryomicroscopie électronique.

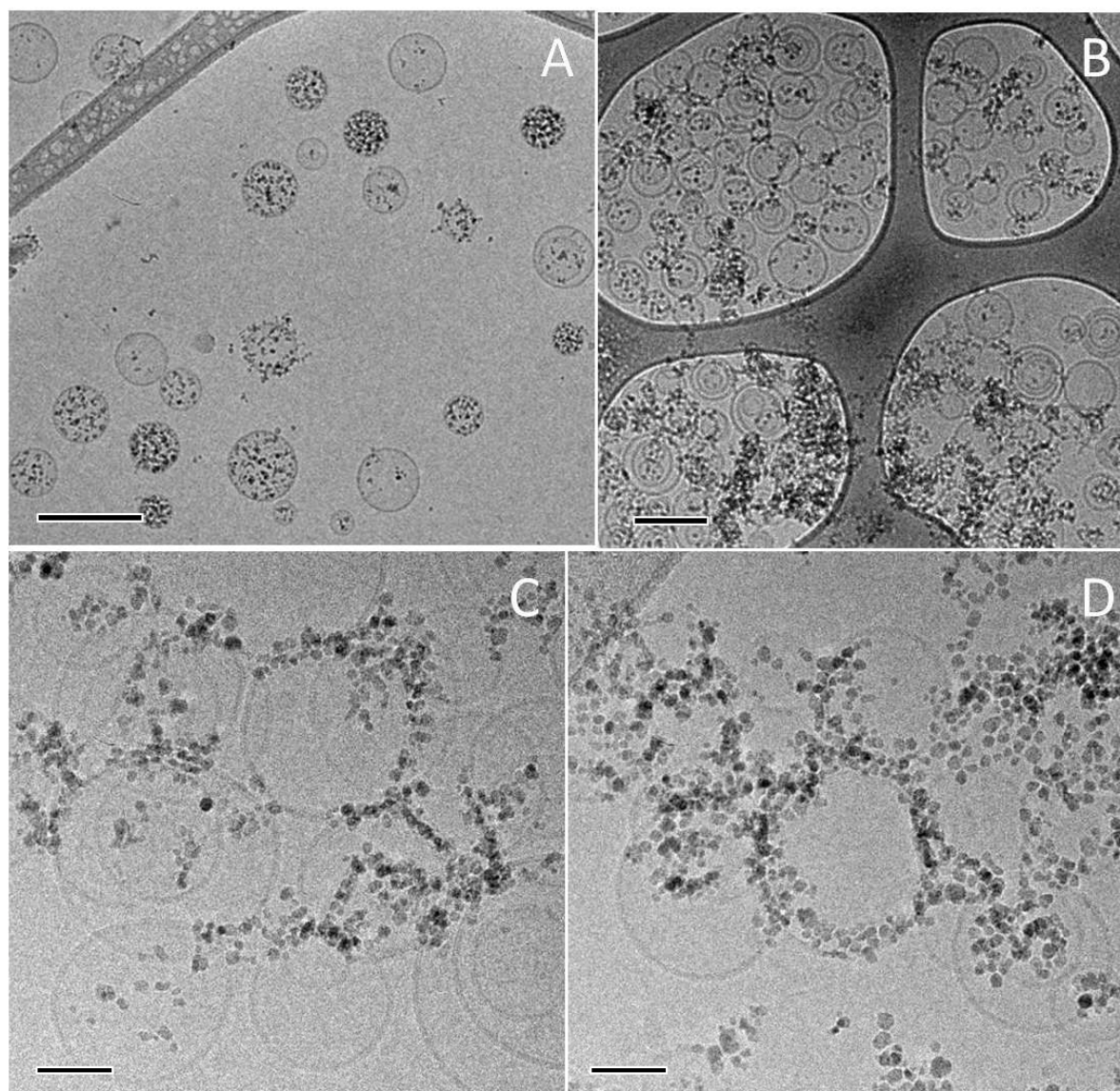


Figure III-34 : Suivi de l'évolution des magnétoliposomes au cours du temps par cryoMET. A) liposomes 100% PC un mois après synthèse, barre d'échelle 200nm ; B) Liposomes PC : PS (95 : 5) (mole : mole) un mois après synthèse ; barre d'échelle 200nm ; C) et D) liposomes PC : PS (95 : 5) (mole : mole) un mois après synthèse ; barre d'échelle 50nm. Les liposomes sont à une concentration d'environ $1 \text{ mg}_{\text{phospholipid}} / \text{ml}$ (1,3mM). Images S.Tan.

Le suivi de l'évolution des liposomes a été mené pour évaluer la stabilité des magnétoliposomes au cours du temps ainsi que l'influence de la charge et visualiser les effets d'une déstabilisation. Un mois après leur synthèse les liposomes constitués uniquement de PC restent bien dispersés et, pour la plupart bien remplis de particules d'oxyde de fer. Certaines vésicules sont vides et les particules sorties à l'extérieur restent dispersées. Pour les liposomes PC : PS 95 : 5 les images indiquent qu'un mois après leur synthèse, les vésicules sont

quasiment toutes vides et forment des agrégats qui mêlent liposomes et particules d'oxyde de fer. Les images à fort grossissement montrent qu'un certain nombre de ces particules est localisé en surface des membranes et semble ponter les vésicules. Les résultats suggèrent donc une déstabilisation des vésicules au cours du temps qui semble très importante si les membranes contiennent des lipides négatifs

Il apparaît donc que la stabilité des liposomes au cours du temps est affectée par la présence de lipides anioniques. Même si les liposomes neutres subissent une perte de particules encapsulées au cours du temps, la majorité d'entre eux reste chargée en particules et dispersée. Les liposomes dont les membranes contiennent 5% de PS sont, eux, fortement déstabilisés après un mois de stockage. Lors de la caractérisation des liposomes neutres nous avons supposé que la sortie des particules de fer était due à une liaison du fer avec le phosphate des phospholipides. Cette liaison va conduire à une couverture plus ou moins importante des nanoparticules par les phospholipides et donc à l'acquisition d'une certaine hydrophobicité qui leur permet de traverser les membranes. Néanmoins cette hydrophobicité de la surface ne semblait pas conduire à l'agrégation des particules et des vésicules. Ces phénomènes sont très importants dans le cas des magnétoliposomes anioniques et peuvent être expliqués eux aussi par la présence de lipides en surface des particules. L'agrégation des particules est due à l'association entre elles des chaînes d'acides gras portées par des particules différentes. Le pontage des vésicules peut être dû à l'insertion des lipides portés par une particule dans les membranes de deux liposomes différents. La couverture des particules de maghémite par des lipides pourrait donc induire la fuite du matériel encapsulé mais aussi l'agrégation des liposomes et des particules entre eux. Les différences de stabilité observées laissent supposer une affinité plus grande du fer pour les lipides anioniques. Le fait que les vésicules soient plus vides et plus agrégées pour les liposomes anioniques que pour les liposomes neutres laisse penser que les particules de fer sont plus hydrophobes et donc liées à plus de lipides dans le cas des membranes chargées négativement. Les particules d'oxyde de fer se lient alors certainement mieux à des lipides anioniques qu'à des lipides neutres ce qui conduit à une déstabilisation plus rapide des solutions de vésicules présentant une charge négative. La présence d'une charge de surface semble donc influencer la stabilité des magnétoliposomes, probablement du fait d'une liaison importante de lipides négatifs en surface des particules d'oxyde de fer.

Afin d'encapsuler le maximum de particules et de limiter les déstabilisations nous avons alors tenté une stratégie qui consiste à synthétiser des liposomes neutres et à les modifier dans un second temps pour former à leur surface des phospholipides négatifs.

2.2.3 Utilisation de la phospholipase D pour obtenir des liposomes anioniques à partir de vésicules neutres

La nécessité de préserver l'intégrité des liposomes lors de la modification des lipides nous a conduits à utiliser une enzyme pour convertir des vésicules neutres en liposomes chargés négativement. En effet, les modifications chimiques nécessitent des conditions dans lesquelles les membranes sont déstabilisées. L'utilisation d'une enzyme, c'est-à-dire une protéine capable de catalyser une réaction chimique, est alors apparue comme une alternative possible. Cette enzyme, la phospholipase D (PLD) catalyse l'hydrolyse de la tête polaire des PC pour former des PA, un lipide anionique. Ce lipide peut, du fait de sa charge négative portée par le phosphate, permettre la liaison d'Anx5 aux membranes qui le contiennent. La PLD a donc été utilisée pour modifier des vésicules afin de pouvoir leur associer des Anx5-PEG. La caractérisation de ces modifications a porté sur trois critères : vérification de la modification des lipides par chromatographie sur couche mince, vérification de la capacité des vésicules à fixer des Anx5-PEG par gel d'acrylamide et évaluation de la stabilité des liposomes modifiés par microscopie électronique. Ces caractérisations ont été menées pour des vésicules témoin et pour des liposomes encapsulant des particules d'oxyde de fer.

2.2.3.1 Modification des lipides par la PLD

L'hydrolyse des PC en PA a été suivie par chromatographie sur couche mince (CCM), après modification des liposomes par l'enzyme et passage des lipides en solvant apolaire. La CCM consiste à faire migrer sur un support de silice des lipides dissous en solvant organique. Ces lipides sont séparés selon différents critères qui sont fonction du solvant utilisé. Dans notre cas le solvant (Chloroforme / méthanol / eau ; 63 / 35 / 2 ; v / v / v) permet de séparer les PC des PA. Pour la modification des lipides, les liposomes, avec ou sans particules de maghémite, sont incubés avec la PLD. Ces liposomes sont modifiés en solvant aqueux mais l'analyse des lipides nécessite qu'ils soient en solvant apolaire. Les vésicules ont donc été déshydratées par évaporation et les lipides ainsi obtenus ont été dissous en chloroforme. Des lipides contrôles, des liposomes non modifiés et des liposomes avec ou sans particules de fer et ayant subi l'action de la PLD ont été analysés par CCM.

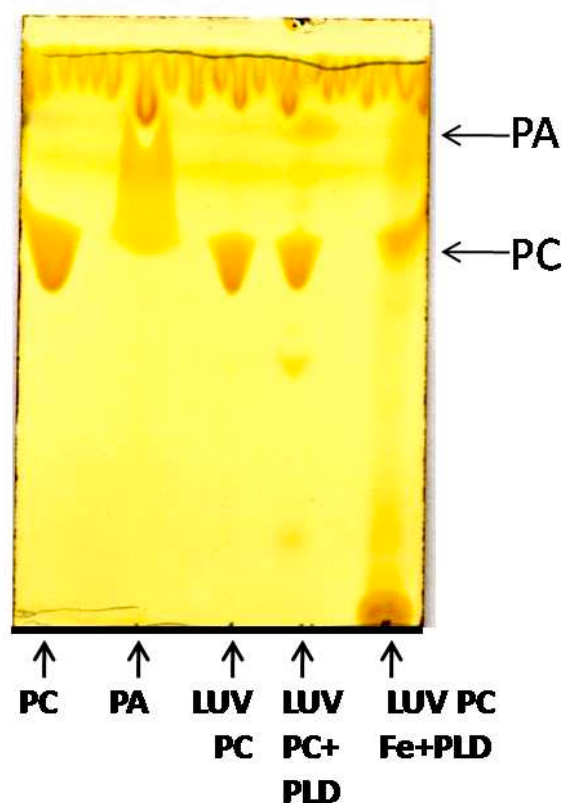


Figure III-35 : Suivi de l'effet de la PLD sur les liposomes : PC : lipides DOPC témoins ; PA : lipides DOPA témoins ; LUV PC : liposomes constitués de DOPC, non traités à la PLD ; LUV PC PLD liposomes constitués de DOPC incubés avec la PLD ; LUV PC Fe + PLD : liposomes constitués de DOPC encapsulant des particules de maghémite et incubés avec la PLD. Dans chaque cas, 50 μ g de lipides sont déposés sur la plaque de CCM.

Les résultats indiquent que la PLD induit la modification de PC en PA. Pour les liposomes sans particules de fer mis en contact avec la PLD il apparaît une bande qui n'est pas visible pour les liposomes non traités à la PLD et qui est située (à peu près) au niveau des PA témoin. Pour les liposomes encapsulant des particules de fer cette bande est très diffuse et est visible avant coloration de la plaque pour révéler les lipides. Elle correspond en fait à des particules de maghémite qui ont migré sur la plaque.

La CCM indique donc que la PLD induit bien la modification des PC et semble confirmer que les lipides peuvent se lier sur les particules d'oxyde de fer. En effet ces particules de maghémite sont très hydrophiles et devraient précipiter en solvant apolaire. Leur solubilité en chloroforme et leur capacité à migrer indique donc qu'elles sont couvertes de lipides, ce qui leur confère une hydrophobicité de surface. En ce qui concerne l'action de la PLD, l'apparition d'une bande associée aux PA indique qu'il y a bien hydrolyse des PC. D'un point

de vue quantitatif cette bande semble peu intense mais ne peut pas être directement analysée. Pour vérifier que la proportion de PA est suffisante pour fixer des Anx5-PEG, la capacité des vésicules modifiées à lier l'Anx5-PEG a été analysée sur gel.

2.2.3.2 Capacité de liaison des Anx5-PEG par les liposomes obtenus après modification par la PLD

La liaison des Anx5-PEG a été mise en évidence par rétention de ces protéines au niveau des liposomes en gel non dénaturant. Si elles sont liées, les Anx5-PEG sont retenues sur les liposomes en haut du gel et ne sont plus visibles au niveau de la zone de migration. Les mêmes solutions que celles analysées en CCM ont été mélangées avec des Anx5-PEG et du Ca^{2+} , incubées et déposées sur gel.

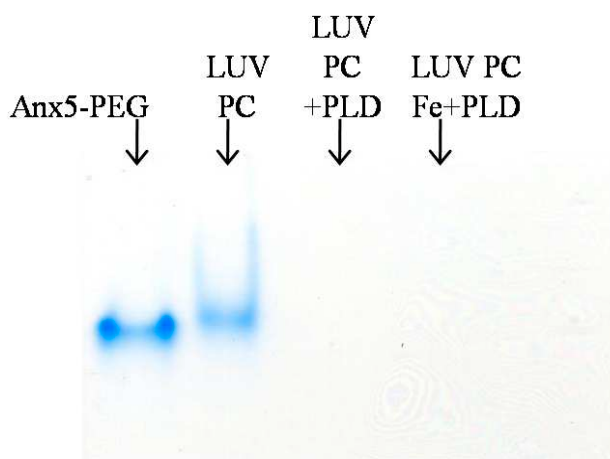


Figure III-36 : Démonstration de la capacité de liposomes DOPC traités à la PLD à lier l'Anx5-PEG par PAGE en condition non dénaturantes $+\text{CaCl}_2$ 2mM: le premier puits correspond à l'Anx5-PEG seule ; le deuxième puits (LUV PC) correspond aux liposomes constitués de DOPC et non traités à la PLD ; le troisième puits (LUV PC PLD) correspond aux liposomes constitués de DOPC et incubés avec la PLD ; le quatrième puits (LUV PC Fe PLD) correspond aux liposomes constitués de PC qui encapsulent des particules de maghémite et ont été incubés avec la PLD. Dans chaque puits a été déposé $4\mu\text{g}$ de protéine (0,112nmol) et $9\mu\text{g}$ (11nmol) de lipides pour ceux où il y a des liposomes.

Le gel d'acrylamide en conditions non dénaturantes indique que l'action de la PLD produit des liposomes capables de lier les Anx5-PEG. Pour les liposomes non modifiés, les Anx5-PEG ne sont pas retenues en haut du gel avec les liposomes alors qu'elles le sont pour ceux traités à la PLD. La modification des lipides observés en CCM correspond donc à une

quantité de lipides anioniques suffisante pour lier des Anx5-PEG en surface des liposomes. Dans chaque puits a été déposé 4µg de protéine et 10 µg de lipides pour ceux où il y a des liposomes.

2.2.3.3 Stabilité des liposomes obtenus après modification par la PLD

La stabilité des liposomes modifiés par la PLD a été suivie par microscopie électronique, pour les liposomes sans et avec particules de maghémite internalisées. Les images obtenues pour les vésicules seules indiquent qu'il n'y a pas de perturbation des liposomes : ils sont bien dispersés et de taille d'environ 100nm. Ceci était attendu car les liposomes constitués d'une forte proportion de PA sont stables en absence de Ca^{2+} . Pour des liposomes encapsulant des particules d'oxyde de fer, les images indiquent que les vésicules sont intactes avant le traitement à la PLD mais sont déstabilisées après (non présenté). Il se forme alors des agrégats de lipides et particules identiques à ceux observés pour les liposomes contenant des PS. Ceci semble confirmer l'influence de la charge des lipides sur la déstabilisation des magnétoliposomes. Il est à préciser que les suspensions de liposomes contenant des particules de maghémite avaient été synthétisées une semaine auparavant, une durée suffisante pour avoir des pertes de composés encapsulés. Comme l'action de la PLD affecte le feuillet externe et que les déstabilisations semblent être dues aux lipides anioniques générés par son action, il est probable que ce soit les particules situées à l'extérieur qui ont initié les réactions de déstabilisation. Par conséquent, en l'état actuel des travaux, il semble que la modification des magnétoliposomes neutres par la PLD ne permette pas un gain de stabilité vis-à-vis de l'encapsulation de particules d'oxyde de fer.

Cette partie du travail avait pour objectif de vérifier la faisabilité de la synthèse de liposomes encapsulant des particules d'oxyde de fer et présentant une charge de surface négative afin de lier des Anx5-PEG. Pour cela, la formation des Anx5-PEG a tout d'abord été caractérisée puis l'influence de la densité d'un lipide anionique, la PS, sur l'efficacité d'encapsulation et sur la stabilité des vésicules a été évaluée. L'action d'une enzyme, la phospholipase D, utilisée pour modifier les membranes des magnétoliposomes neutres a été examinée. Il apparaît que dans tous les cas la présence de lipides anioniques a une influence délétère sur la stabilité. Le fait que les particules de fer internalisées soient solubles en solvant apolaire plaide en faveur de l'idée que cette déstabilisation est due à une liaison des lipides aux particules de fer. Cette liaison permet leur sortie des vésicules, leur agrégation et celle des liposomes. La fixation des lipides

aux particules semble d'autant plus importante que les lipides sont chargés négativement. L'utilisation de magnétoliposomes anioniques est donc limitée par des problèmes de stabilité vraisemblablement dus à des liaisons lipides-particules, et d'un point de vue pratique doit se faire dans la semaine suivant la synthèse.

3 Formulation de liposomes fonctionnalisés par des anticorps

L'objectif est de synthétiser des liposomes ayant comme élément de ciblage des anticorps liés à la surface de la membrane grâce à des Anx5zz. Les anticorps sont des molécules qui peuvent potentiellement présenter une affinité pour un large éventail de cible. Pour cela ils ont été associés aux liposomes afin de permettre l'adressage des vésicules vers un organe ou un type cellulaire particulier.

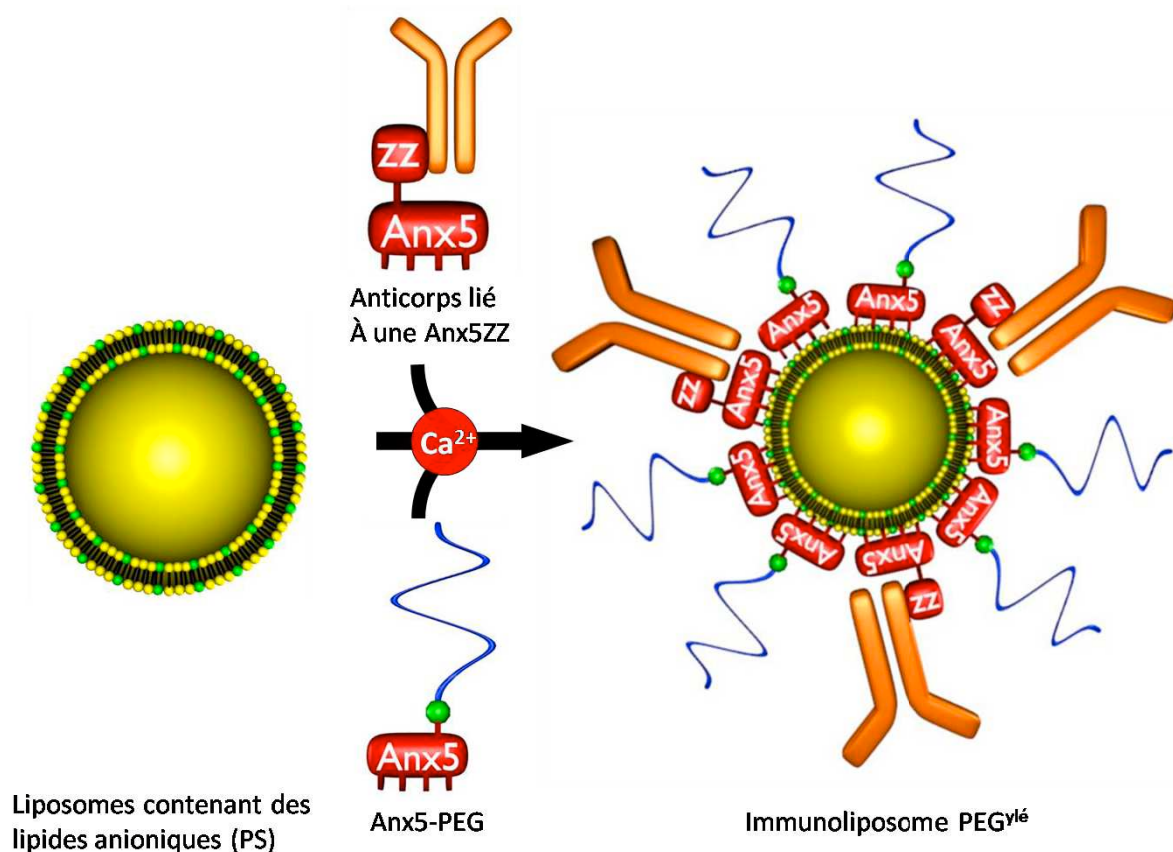


Figure III-37 : Schéma général de la stratégie envisagée : fonctionnalisation des liposomes grâce au complexe Anx5ZZ-anticorps et liaison du PEG grâce à l'Anx5-PEG.

Pour la stratégie la plus couramment utilisée, l'association anticorps-liposome se fait grâce à un lipide sur lequel les anticorps sont liés et qui les ancre à la membrane. La liaison au lipide

est soit un lien covalent soit une interaction d'affinité, type biotine / streptavidine, et s'effectue au niveau de la tête polaire. L'ancrage à la membrane est assuré par la partie apolaire, c'est-à-dire les acides gras, qui interagit avec les autres chaînes lipidiques via des interactions hydrophobes. Ce sont donc des lipides qui assurent d'une part la liaison de l'anticorps et d'autre part l'ancrage à la membrane.

L'approche que nous avons développée utilise l'Anx5ZZ, une protéine de fusion associant le tagZZ et l'Anx5, pour servir d'intermédiaire entre l'anticorps et la bicouche lipidique. Le tagZZ est l'élément de la protéine A qui interagit avec les anticorps. Cette liaison se fait au niveau du Fc ce qui permet d'orienter le ligand et évite de perturber le site de reconnaissance de l'antigène, comme ce peut être le cas pour la plupart des couplages chimiques. L'Anx5 possède quant à elle la propriété de se lier aux membranes anioniques via le Ca^{2+} . La liaison de très haute affinité entre Anx5ZZ et membrane permet une liaison efficace et reproductible des anticorps à la surface des vésicules ainsi qu'un contrôle simple de la densité de ligand. L'Anx5ZZ est donc intéressante car elle combine les propriétés de liaison d'anticorps grâce au tag ZZ et de fixation aux membranes lipidiques grâce à l'Anx5. Elle est donc utilisée comme intermédiaire pour lier les anticorps aux liposomes anioniques.

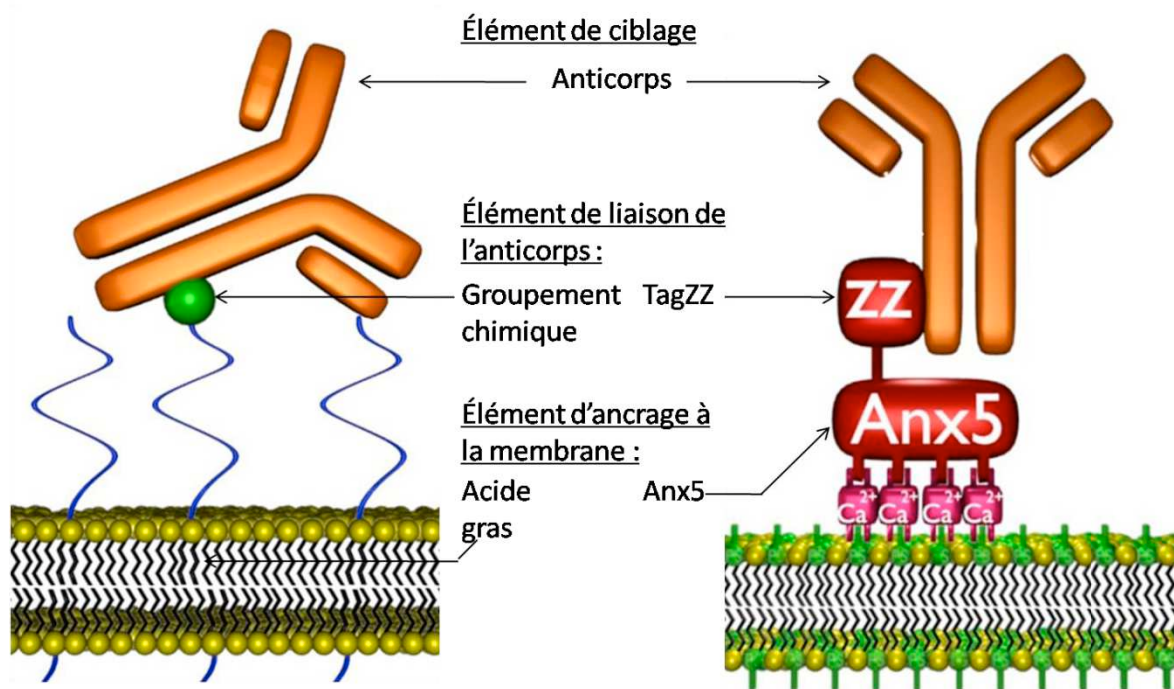


Figure III-38 : Comparaison des stratégies de liaison d'anticorps aux liposomes : liaison sur la tête polaire d'un lipide et notre stratégie, liaison grâce à l'Anx5ZZ.

Comme indiqué au chapitre 3, la surface non couverte par le ligand est importante et doit être protégée par une couche de PEG, ce qui est assuré par des Anx5-PEG. En effet, d'un point de

vue général, les liposomes utilisés in vivo doivent exposer des PEG en surface pour limiter leur prise en charge par le système immunitaire et assurer des temps de demi-vie de plusieurs heures dans la circulation [71, 74]. Habituellement, cette couche de PEG est due à la présence dans la membrane de lipides-PEG mais dans le cas où les vésicules contiennent des PS l'utilisation de lipides-PEG n'est pas suffisante pour limiter la reconnaissance des lipides anioniques et la prise en charge par les macrophages [99]. L'utilisation d'Anx5-PEG a donc été choisie afin de masquer les charges négatives et de créer la couche de PEG indispensable à la furtivité in vivo.

Tout d'abord, une composition lipidique permettant l'encapsulation stable de composés dans l'intérieur des vésicules a été déterminée, par suivi des fuites de composés fluorescents internalisés. Ensuite les modalités d'association des anticorps aux liposomes ont été définies en estimant tout d'abord la stœchiométrie anticorps : Anx5ZZ par gel d'acrylamide. Nous avons ensuite défini, en nous appuyant sur des mesures de diffusion dynamique de la lumière, un ordre d'association anticorps-Anx5ZZ-liaison aux vésicules qui évite les excès d'anticorps ou d'Anx5ZZ et permet de conserver des solutions de vésicules dispersées. L'efficacité de fixation des complexes Anx5ZZ-anticorps aux liposomes a alors été évaluée par spectroscopie de fluorescence. Enfin, la capacité d'adressage des liposomes-anticorps sur des cibles biologiques a été vérifiée ex vivo et in vivo sur des modèles de pathologies telles que plaque d'athérome et inflammation.

3.1 Choix d'une composition lipidique permettant une encapsulation stable de composés

L'objectif étant de formuler des liposomes utilisés pour le transport de composés encapsulés qui lient à leur surface des dérivés d'Anx5, la première étape a été la détermination d'une composition lipidique permettant le maintien de ces marqueurs à l'intérieur des vésicules lors de la fixation d'Anx5-PEG et lors de la mise en conditions mimant l'in vivo, c'est-à-dire en sérum

A terme des Anx5ZZ-anticorps doivent être fixées en plus des Anx5-PEG mais seules des Anx5-PEG ont été liées dans ces expériences. En effet, pour la densité maximale d'anticorps en surface des liposomes qui a été utilisée, la quantité d'Anx5ZZ représente 0,6 % de l'ensemble des Anx5 associées aux vésicules. Cette quantité est quasi négligeable et, pour des

raisons de simplicité, seules des Anx5-PEG ont été liées lors des expériences d'évaluation de la stabilité d'encapsulation.

La stabilité d'encapsulation de composés dans des liposomes de différentes compositions lipidiques a été évaluée par dequenching de fluorescence, ainsi que décrit en 1.4 de la partie résultat. Ce test de déquenching a été utilisé pour évaluer la stabilité membranaire de trois compositions lipidiques, qui sont : DOPC : DOPS (8:2) (mole : mole) DOPC : Cholestérol : DOPS (6:2:2) (mole : mole) et DOPE : DOPS (7:3) (mole : mole) Les fuites ont été suivies lors de la liaison, induite par l'ajout de calcium 2mM, des Anx5-PEG aux vésicules puis lors de la mise en sérum (20% du volume final) de ces liposomes–Anx5-PEG.

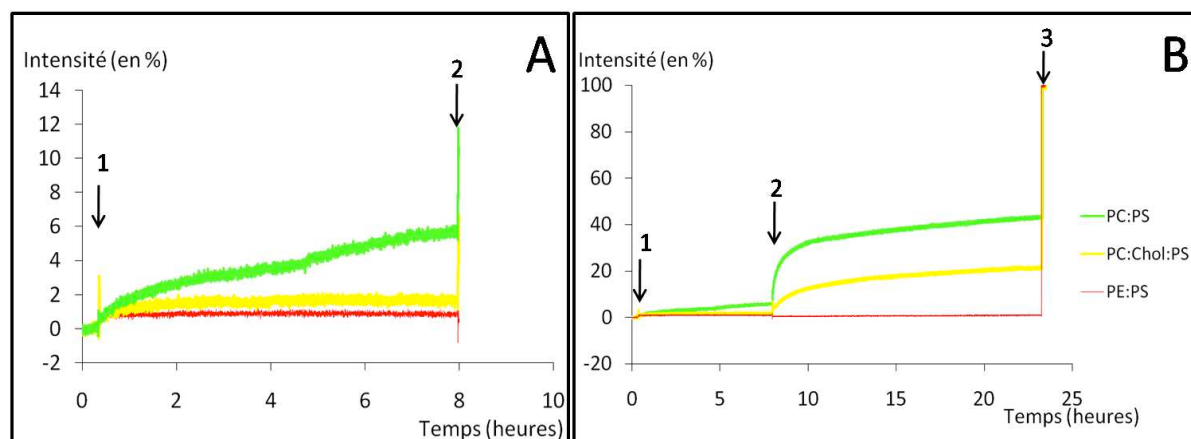


Figure III-39 : Détermination des fuites de composés encapsulés en fonction de la composition lipidique des liposomes. 1) liaison d'Anx5-PEG à des vésicules lors de l'ajout de Ca^{2+} ; 2) ajout de sérum (20% du volume final) ; 3) libération des fluorophores par ajout de Triton X100. Courbe verte : DOPC : DOPS (8:2) (mole : mole) ; courbe jaune : DOPC : Cholestérol : DOPS (6:2:2) (mole : mole : mole) ; courbe rouge : DOPE : DOPS (7:3) (mole : mole). A) effet de la fixation de l'Anx5-PEG (agrandissement des 8 premières heures de B) ; B) effet de la fixation d'Anx5-PEG puis de l'addition de sérum. Les mesures sont réalisées à 25°C. Les résultats sont exprimés en pourcentage du maximum d'intensité obtenu après libération des fluorophores par addition de Triton X100 et sont corrigés vis-à-vis des dilutions dues aux ajouts de sérum et de Triton. Dans chaque cas, 63,6 nmoles de lipides sont placés en solution et le volume final est de 400 μl . La quantité d'Anx5-PEG est de 23 μg (0,65nmoles).

Les deux phases de mesures, liaison des Anx5-PEG puis mise en sérum, ont été menées pour évaluer la stabilité de l'encapsulation lors de la formulation des liposomes-Anx5-PEG puis lors du passage dans un milieu biologique. Pour une formulation PC : PS 8:2 (en mole) la fixation de l'Anx5-PEG sur les membranes induit des fuites de fluorophores. Ces pertes sont

faibles, environ 1% par heure, et continues. L'addition de sérum provoque une libération de marqueurs plus sévère et, deux heures après cet ajout, environ 30% du contenu des vésicules est sorti de l'intérieur des vésicules. Après cette phase de pertes importantes, les fuites sont à nouveau continues et de l'ordre de 1% par heure. Pour des membranes constituées de PC : Cholestérol : PS 6:2:2 (en mole) la liaison d'Anx5-PEG ne provoque pas de pertes de composés encapsulés et les fluorochromes sont donc retenus dans les liposomes lorsque la surface des vésicules est couverte d'Anx5-PEG. L'addition de sérum provoque des pertes telles qu'en 15 heures environ 20% du contenu est perdu. Quand la composition lipidique est PE : PS 7:3 (en mole) ni la liaison d'Anx5-PEG ni l'addition de sérum n'affectent la stabilité membranaire et les marqueurs fluorescents restent encapsulés de façon stable tout au long de l'expérience.

Les résultats indiquent que la composition lipidique des membranes est un paramètre déterminant vis-à-vis des pertes de composés encapsulés qui peuvent avoir lieu lors de la liaison d'Anx5-PEG et de l'addition de sérum. Ils permettent de faire un choix parmi les trois compositions testées et d'émettre une hypothèse quant à la cause des différences de stabilité.

La première formulation testée, PC:PS 4:1 (en mole) est la moins stable car elle est la seule à présenter des fuites quand des Anx5-PEG sont liées et perd une grande partie de son contenu lors de la mise en sérum. Cette composition a initialement été choisie car elle a été utilisée pour caractériser la liaison d'Anx5 à des membranes modèles [165, 167]. La proportion de PS, le lipide avec lequel interagit l'Anx5, y est celle trouvée dans les membranes biologiques. La liaison de l'Anx5-PEG n'a qu'une influence faible sur la perméabilité membranaire mais ces pertes impliquent que des liposomes-Anx5-PEG contenant un composé internalisé ne peuvent pas être stockés de façon stable sur de longues périodes de temps. La mise en sérum, c'est-à-dire le passage à un milieu mimant l'in vivo, conduit à des fuites importantes, environ 30% du contenu les deux premières heures, mais semble avoir une influence transitoire. En effet deux heures après l'addition de sérum les pertes sont les mêmes que ce qu'elles sont lorsque seules les Anx5-PEG sont liées. Néanmoins le passage en milieu biologique affecte la perméabilité membranaire de façon importante et cette composition lipidique semble alors peu adaptée à des applications in vivo.

Une tentative d'explication peut être que l'état physique de la membrane est tel que la bicouche est fortement perturbée par les interactions avec des protéines. En effet, les molécules utilisées sont des DOPC et DOPS, des lipides qui possèdent des chaînes d'acides gras insaturées et forment donc des membranes (très) fluides à la température à laquelle a été menée l'expérience (25°C). Il a été rapporté que l'interaction des liposomes avec les protéines

du sérum était d'autant plus délétère pour les bicouches qu'elles étaient fluides [6, 66]. L'état physique de la membrane peut alors être la cause des perturbations induites par des protéines et donc par l'adsorption d'Anx5-PEG et l'addition de sérum. La diminution de la fluidité membranaire semble donc être une solution pour obtenir des liposomes plus stables.

Pour limiter les fuites à travers la membrane du cholestérol a donc été ajouté à la composition lipidique (en conservant 20% de PS pour fixer les Anx5-PEG de façon optimale) car il a la propriété de rigidifier les phases fluides. Pour cette formulation, le composé internalisé est retenu dans les vésicules lorsque des Anx5-PEG sont fixées à leur surface ce qui indique que ces liposomes-Anx5-PEG peuvent être stockés de façon stable. L'addition de sérum provoque des pertes, qui semblent se stabiliser 12 heures environ après cet ajout. Même si les fuites sont moins importantes que pour les vésicules sans cholestérol, elles limitent l'utilisation in vivo de ces vecteurs pour le transport de composés encapsulés. Néanmoins l'amélioration de la stabilité d'encapsulation observée grâce à l'addition de cholestérol plaide en faveur de l'idée que l'état physique de la membrane est un paramètre important à contrôler pour limiter la perméabilité membranaire lors de l'interaction protéine-membrane.

Dans la dernière formulation les PC et le cholestérol ont été remplacés par des PE qui sont associés à des PS pour lier les Anx5-PEG mais aussi permettre aux PE de former des bicouches lipidiques. Cette composition permet une rétention parfaite des composés encapsulés quels que soient les éléments, Anx5-PEG ou sérum, susceptibles de perturber la perméabilité membranaire. Elle est donc appropriée pour réaliser des liposomes-Anx5-PEG qui peuvent être stockés et qui transportent sans perte des composés encapsulés à travers un environnement biologique. Comme l'amélioration de l'imperméabilité des vésicules était précédemment due à une diminution de la fluidité des membranes, une hypothèse est que cette composition lipidique conduit à la constitution de bicouches très rigides en présence d'Anx5.

La grande stabilité observée est étonnante car d'habitude les PE ne forment pas de membranes, doivent être associés à d'autres lipides pour former des bicouches et sont en général utilisées dans la constitution de membranes qui se désintègrent, et donc libèrent leur contenu, en réponse à une variation du milieu. En effet, ces lipides ne forment des membranes à pH 7 et à température ambiante et physiologique que s'ils sont associés à d'autres molécules. D'un point de vue géométrique ils peuvent être considérés comme des cônes et lorsqu'ils sont utilisés seuls, s'organisent sous forme de micelles inverse. Pour former des bicouches, ils doivent être associés à des lipides ayant une géométrie complémentaire c'est-à-dire de cône inversés, comme notamment les PS ou encore les PE-PEG [80, 217]. En plus de leur complémentarité, ces lipides en cône inverse stabilisent les membranes en assurant la

répulsion des vésicules entre elles. En effet les collisions entre vésicules conduisent à leur fusion et désintégration par organisation des PE en micelle inverse. La formation et le maintien de phases membranaires constituées d'une proportion importante de PE nécessite donc la présence d'un lipide qui ait une forme complémentaire et assure des répulsions entre vésicules.

Pour les PS, la forme et les répulsions sont dues à la présence de la charge, ce qui a des conséquences sur la séquence d'addition du Ca^{2+} et des Anx5-PEG et sur la composition ionique du milieu.

D'un point de vue de la stabilité des liposomes, l'addition de Ca^{2+} , un cation divalent nécessaire à la fixation des Anx5, provoque la déstabilisation des vésicules a priori par pontage suivi de fusion. Comme la présence de PEG en surface des membranes peut assurer la répulsion des liposomes et éviter les contacts entre eux [218] les Anx5-PEG sont ajoutées avant le Ca^{2+} . Cette séquence permet de maintenir l'intégrité des liposomes probablement car la fixation des Anx5 est suffisamment rapide pour qu'il y ait des PEG en surface des liposomes et qu'elle assure ainsi une stabilisation stérique avant qu'il y ait collisions et ruptures des vésicules.

L'influence de la composition ionique du milieu sur la formation de membranes PE : PS nous a été suggéré par les problèmes rencontrés lors de l'encapsulation de gadolinium (Gd^{3+}) chélaté par le DTPA, résolus par l'utilisation d'un autre chélate, le DTPA-BMA. En effet, lors de la réhydratation de film lipidique avec une solution de Gd^{3+} -DTPA il ne se forme pas de liposomes. L'utilisation d'un autre chélate, le DTPA-BMA permet la formation de membranes et donc de vésicules. Or la différence entre ces deux chélates est leur nombre de fonctions carboxylique et la quantité de soude, et donc de Na^+ , nécessaire pour ajuster le pH.

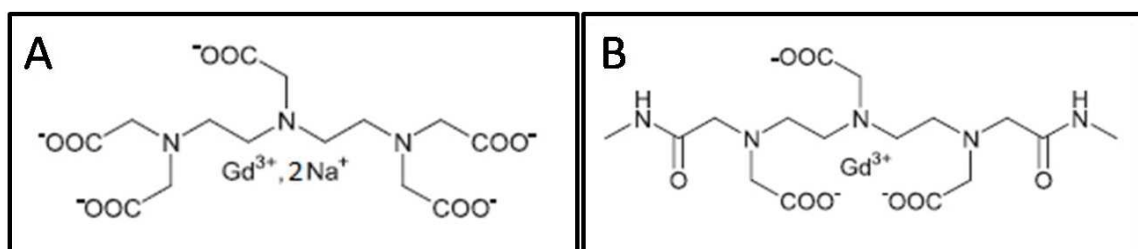


Figure III-40 : structure moléculaires des chélates de Gd^{3+} utilisés A) Gd^{3+} -DTPA ; B) Gd^{3+} -DTPA-BMA.

Le DTPA possède cinq fonctions acides carboxyliques (dont trois interagissent avec le Gd^{3+}) qui sont a priori responsables de l'ajout d'une grande quantité de soude pour ajuster aux

alentours de 7 le pH initialement très acide. Le DTPA-BMA, pour lequel les deux fonctions carboxyliques libres sont substituées, ne nécessite pas des quantités de NaOH aussi importantes. La quantité de contre-ions Na^+ n'est donc pas la même dans les deux solutions de Gd^{3+} et peut être l'explication de la possibilité de former des membranes dans un cas et pas dans l'autre.

L'excès de contre ions positifs peut écranter la charge négative du lipide et à priori, de ce fait, modifier la géométrie des PS. En effet la forme de cône inverse est due à l'eau d'hydratation associée à la charge de la tête polaire et la présence de contre-ion annule cette charge négative. Ceci pourrait conduire à une réduction du volume de la tête polaire par diminution de la quantité d'eau d'hydratation qui y est associée. La forme de PS ne serait alors plus complémentaire de celle des PE et comme il est alors impossible de former des membranes, les PE s'associeraient pour former des micelles inverses. La quantité de contre-ions positif présent dans le milieu semble donc un paramètre important à maîtriser pour l'utilisation d'une composition lipidique PE : PS (7 : 3) (mole : mole).

En résumé, différentes compositions lipidiques ont dû être testées afin d'obtenir des liposomes couverts par des dérivés d'Anx5 qui encapsulent de façon stable des composés dans leur intérieur aqueux. La formulation la plus stable est DOPE:DOPS 7:3, probablement car elle permet d'obtenir les membranes les plus rigides et les moins perturbées par les interactions avec des protéines, Anx5 ou protéines du sérum. Elle permet une rétention parfaite des composés encapsulés lors du stockage des liposomes–Anx5 ainsi que lors de leur mise en contact avec le milieu biologique. Néanmoins deux précautions doivent être prises pour éviter la déstabilisation des membranes : ajouter les Anx5-PEG avant le Ca^{2+} et éviter d'avoir une quantité trop importante de contre-ions positifs. Néanmoins, pour les expériences de caractérisations menées pour mettre au point des liposomes fonctionnalisés par des dérivés d'Anx5, la composition lipidique a été DOPC : DOPS 8 : 2 pour des raisons de simplicité.

3.2 Caractérisation de la liaison Anx5ZZ-anticorps

La suite du travail a tout d'abord consisté à mettre au point la fonctionnalisation des liposomes avec des anticorps liés en surface des vésicules grâce à un intermédiaire Anx5ZZ. L'objectif d'un contrôle le plus précis possible de la densité de ligand a nécessité d'estimer la stoechiométrie de la liaison Anx5ZZ-anticorps, de définir la séquence d'association (liposome Anx5ZZ puis anticorps) ou (anticorps Anx5ZZ puis liposome) et de vérifier l'efficacité de liaison des anticorps sur les vésicules.

3.2.1 Détermination du nombre d'anticorps liés par liposome

La caractérisation de la stœchiométrie de la liaison Anx5ZZ-anticorps c'est-à-dire la détermination du nombre d'anticorps liés par Anx5ZZ et l'évaluation de la possibilité pour un anticorps de lier plusieurs Anx5ZZ ont été mis en évidence respectivement par gel d'acrylamide en conditions non dénaturantes et par DLS.

Il est à préciser que les anticorps utilisés dans ces expériences appartiennent à une sous-classe particulière d'immunoglobulines. Ils ne correspondent pas à une cible d'intérêt et sont utilisés comme ligand modèle. Ils ont été choisis de façon à appartenir à la classe des IgG2 car il a été montré (thèse RBérat) que le tag ZZ possède la même spécificité vis-à-vis des anticorps que la protéine A dont il est issu : il lie de façon plus stable et efficace les immunoglobulines de type IgG2.

La quantité d'anticorps que chaque Anx5ZZ est capable de lier a donc été déterminée par gel d'acrylamide en conditions non dénaturantes, une technique qui peut être utilisée pour caractériser des interactions non covalentes entre protéines. Dans le cas de mélanges Anx5ZZ-anticorps la différence de masse est telle que les deux protéines apparaissent bien séparées, les deux autres paramètres peuvent donc être négligés. Comme les interactions entre protéines sont préservées, l'Anx5ZZ reste associée aux anticorps. Il se forme un complexe de masse très supérieure à celle de l'Anx5ZZ (qui n'est pas distinguable de l'anticorps) et, en plaçant une quantité fixe d'Anx5ZZ et une quantité croissante d'anticorps, il est possible de suivre l'association de ces deux protéines. En effet plus il y a d'anticorps et plus il y a d'Anx5ZZ qui leur sont liées et donc plus le signal correspondant à l'Anx5ZZ seule diminue. Lorsque le nombre d'anticorps est tel que toutes les Anx5ZZ pouvant être liées sont fixées ce signal n'évolue plus. Il est alors possible de déterminer le ratio Anx5ZZ:anticorps à partir duquel l'Anx5ZZ ne peut plus lier d'anticorps et de déduire le nombre maximum d'anticorps par Anx5ZZ.

Différents échantillons contenant une quantité fixe d'Anx5ZZ (2µg) et des quantités croissantes d'un anticorps modèle (anti PSA) de la classe des IgG2 ont donc été préparés et, après une demi-heure d'incubation, ont été mis à migrer sur gel d'acrylamide en conditions non dénaturantes.

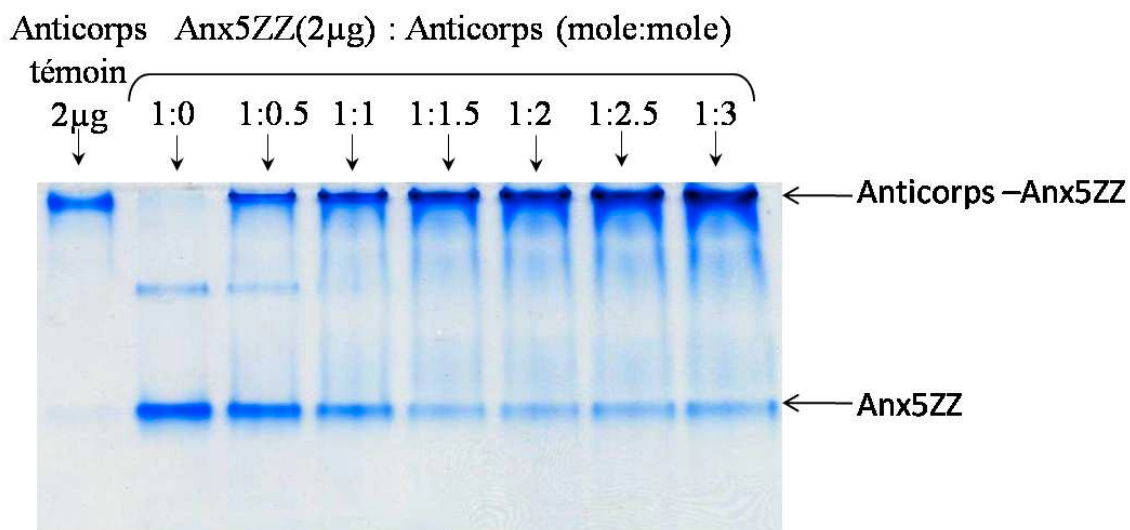


Figure III-41 : Analyse de l'interaction Anx5ZZ-Anticorps par gel PAGE en conditions non dénaturantes. Premier puits : anticorps anti-PSA témoin 2µg ; autres puits : Anx5ZZ (2µg, 0,04nmole) à laquelle sont additionnées des quantités croissantes d'anticorps. La quantité d'anticorps est exprimée en fonction du rapport molaire Anx5ZZ : anticorps.

Les gel d'acrylamide en conditions non dénaturantes ont été menés pour caractériser les interactions Anx5ZZ-anticorps. Tout d'abord les anticorps témoin et les Anx5ZZ témoin (condition ratio Anx5ZZ:anticorps 1:0) confirment que ces deux protéines sont bien différenciées l'une de l'autre. L'anticorps, qui est une grosse molécule (MM 150000 Da environ) reste en haut du gel alors que l'Anx5ZZ, plus petite (50071 Da) migre jusqu'à une autre position. L'Anx5ZZ est présente sous deux formes : une forme monomérique très majoritaire et une forme dimérique, plus lourde et donc moins mobile, qui est très minoritaire. L'addition d'anticorps en quantité croissante aux Anx5ZZ conduit à la formation d'un complexe Anx5ZZ-anticorps qui n'est pas différenciable de l'anticorps seul et à une diminution d'intensité de la bande correspondant aux Anx5ZZ. Cette bande n'évolue plus à partir d'un ratio Anx5ZZ : anticorps 1:1,5, reste constante pour des quantités plus importantes d'anticorps et peut être estimée pour ces conditions à environ 0,5 µg soit un quart des protéines.

La caractérisation de la rétention d'Anx5ZZ par des anticorps, ici des anticorps modèles, permet de caractériser les protéines utilisées, de mettre en évidence la formation d'un complexe Anx5ZZ-anticorps et de déduire le nombre d'anticorps que peut lier une Anx5ZZ.

En ce qui concerne les protéines seules, il est à préciser que les proportions des deux Anx5ZZ indiquées ne reflètent pas forcément la réalité (ce point est expliqué au chapitre 1.1.2 des

résultats). La rétention sur gel des Anx5ZZ par les anticorps permet de mettre en évidence l'interaction entre ces deux protéines et de déterminer le nombre d'anticorps liés par Anx5ZZ. C'est la diminution d'intensité de la bande associée à l'Anx5ZZ qui indique qu'il y a bien formation du complexe Anx5ZZ-anticorps. En effet les anticorps ont une masse telle qu'ils migrent peu et restent dans une zone du gel au niveau de laquelle les différences entre protéines ne sont plus résolues. Les complexes Anx5ZZ-anticorps qui ont une masse plus élevée ne sont alors pas distinguables des anticorps et ceci même si ces associations de protéines correspondent à plusieurs anticorps liés entre eux via une Anx5ZZ. Il faut donc se référer à la diminution de la quantité d'Anx5ZZ libre pour conclure qu'il y a bien formation du complexe Anx5ZZ-anticorps. Il est à noter qu'une certaine proportion d'Anx5ZZ, environ 25%, ne lie pas d'anticorps. Cette présence d'Anx5ZZ "inactives" est inconnue à ce jour. Le ratio à partir duquel les Anx5ZZ sont liées peut donc être exprimé en fonction de la quantité susceptible d'interagir avec les immunoglobulines et ce rapport est 0,75 : 1,5 au lieu de 1 : 1,5. Ceci suggère qu'une Anx5ZZ lie deux anticorps. Ceci n'est pas surprenant car le tag ZZ est constitué de deux sous unités, ou deux tagZ, qui peuvent être associés chacune à un anticorps. Les gels d'acrylamide en conditions non dénaturantes permettent donc de mettre en évidence qu'une Anx5ZZ lie deux anticorps.

3.2.2 Analyse de la capacité d'un anticorps à lier plusieurs Anx5ZZ

Afin de caractériser plus complètement l'interaction Anx5ZZ anticorps et étant donné la nature dimérique de l'anticorps, nous avons voulu savoir si un anticorps pouvait lier plusieurs Anx5ZZ. Pour cela la surface de liposomes a été couverte avec des Anx5ZZ et des anticorps ont été ajoutés en défaut c'est-à-dire avec un ratio Anx5ZZ : anticorps 1 : 1. La capacité des anticorps à agréger les vésicules c'est-à-dire à lier deux Anx5ZZ associées chacune à un liposome différent a été suivie par diffusion de la lumière.

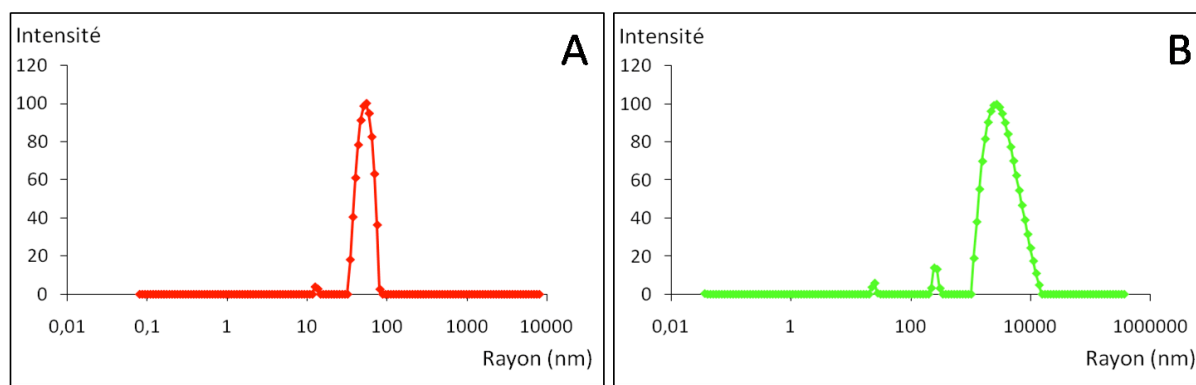


Figure III-42 : Distribution de tailles des solutions de liposomes couverts d'Anx5ZZ, par DLS à 90°. A) liposomes-Anx5ZZ témoin ; B) liposomes-Anx5ZZ + anticorps, rapport molaire Anx5ZZ : anticorps 1 : 1. Chaque échantillon contient 200μg de lipides (250 nmoles) dans un volume de 900μl de tampon HEPES supplémenté de 2mM Ca^{2+} (soit une concentration de 0,278 M de lipides). La quantité d'Anx5ZZ est de 125μg (2nmoles).

Ces expériences de DLS ont été menées pour savoir si un anticorps pouvait lier deux Anx5ZZ situées chacune sur un liposome différent et ainsi provoquer l'agrégation des vésicules. Les solutions de liposomes liés aux Anx5ZZ forment une population de vésicules de rayon d'environ 57 nm soit un diamètre d'environ 114 nm. Après ajout d'anticorps le rayon moyen est d'environ 1,5 μm mais avec des distributions de taille allant d'environ 500 nm à 5-7 μm de rayon. Ces résultats indiquent donc que l'addition d'anticorps conduit à l'agrégation des vésicules.

La capacité des anticorps à agréger des liposomes couverts d'Anx5ZZ indique qu'une immunoglobuline peut lier plusieurs (au moins deux) Anx5ZZ. En effet, les tailles micrométriques observées après addition des anticorps indiquent qu'ils peuvent accrocher les liposomes entre eux. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'il reste, après liaison de l'anticorps à une Anx5ZZ, un ou plusieurs sites disponibles pour l'interaction avec un autre tagZZ. Lorsque cette liaison se fait avec une Anx5ZZ située sur une autre vésicule l'anticorps va jouer le rôle de pont entre ces deux liposomes. L'agrégation observée indique donc qu'un anticorps peut lier au moins deux Anx5ZZ. Par contre il ne nous est pas possible de savoir si un seul anticorps peut lier plusieurs vésicules entre elles ou si ces tailles importantes sont dues aux pontages successifs des vésicules par plusieurs anticorps. En d'autres termes il ne nous est pas possible de savoir si un anticorps peut interagir avec plus de deux Anx5ZZ mais il est certain qu'un anticorps interagit avec plusieurs Anx5ZZ.

Les expériences de rétention d'Anx5ZZ par un anticorps, visualisé par gel d'acrylamide en conditions non dénaturantes, et d'agrégation de liposomes-Anx5ZZ par des anticorps, suivis par diffusion dynamique de la lumière, indiquent donc qu'une Anx5ZZ fixe deux anticorps et qu'un anticorps peut lier plusieurs Anx5ZZ. La liaison de ces deux éléments susceptibles d'interactions multiples les uns avec les autres pose alors le problème du maintien des vésicules dans un état non agrégé.

3.3 Mise au point de la liaison des anticorps à des liposomes

Le problème de l'agrégation des liposomes par les Anx5ZZ-anticorps nous a conduits à définir des conditions de liaison de l'élément d'adressage pour que les vésicules restent dispersées. La mise au point d'une procédure simple et économique permettant d'obtenir des solutions de liposomes dispersées pour lesquelles la densité de ligand est contrôlée nous a poussés à, dans un premier temps, choisir une séquence d'association qui consiste à former un complexe Anx5ZZ-anticorps qui est lié aux vésicules et, dans un deuxième temps, à vérifier l'efficacité de liaison de ce complexe en surface des liposomes.

3.3.1 Détermination d'une stratégie de liaison

Afin de maintenir les liposomes fonctionnalisés dans un état dispersé deux façons d'associer des anticorps aux vésicules via l'Anx5ZZ ont été considérées : soit fixation des Anx5ZZ sur les liposomes puis liaison des anticorps soit réalisation d'un complexe Anx5ZZ-anticorps suivie de son association aux vésicules. La dispersité des solutions a dans les deux cas été évaluée par diffusion dynamique de la lumière.

Pour la séquence d'association Anx5ZZ-liposomes puis fixation de l'anticorps cette dispersité des solutions a été évaluée en faisant varier la quantité d'immunoglobulines mises en contact avec les liposomes-Anx5ZZ. Comme précédemment la surface des vésicules est couverte d'Anx5ZZ mais ici les anticorps sont ajoutés de telle sorte qu'il y ait un ratio Anx5ZZ : anticorps 1 : 1 ou 1 : 5.

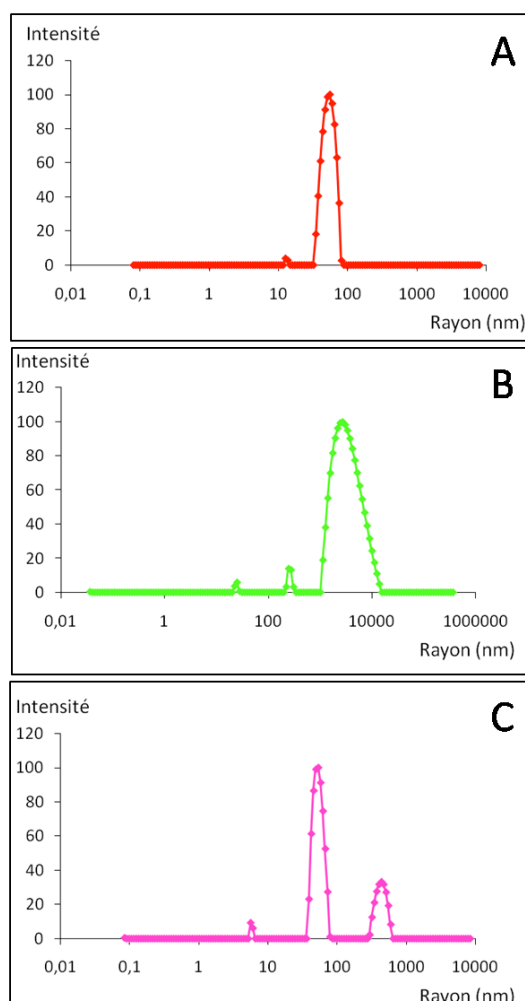


Figure III-43 : Distribution de tailles de solutions de liposomes couverts par d'Anx5ZZ, par DLS à 90°, après ajout d'anticorps à un rapport Anx5ZZ : anticorps A) 1 : 0 ; B) 1 : 1 ; C) 1 : 5. Chaque échantillon contient 200μg de lipides (250 nmoles) dans un volume de 900μl de tampon HEPES supplémenté de 2mM Ca^{2+} (soit une concentration de 0,278 M de lipides). La quantité d'Anx5ZZ est de 125μg (2nmoles).

Les résultats indiquent une influence de la quantité d'anticorps ajoutés sur le profil des objets en solution. En absence d'anticorps il y a une seule population de liposomes de 57nm de rayon. Pour un ratio Anx5ZZ : anticorps 1 : 1 le rayon moyen est d'1,5 μm environ mais avec des distributions de taille allant d'environ 500nm à 5-7 μm de rayon. Pour un ratio Anx5ZZ : anticorps 1 : 5 la population principale correspond à un rayon de 54nm et le deuxième pic d'intensité beaucoup plus faible est associé à des objets de 400nm de rayon environ.

Dans le cas du deuxième mode d'association, à savoir formation d'un complexe Anx5ZZ-anticorps puis fixation de ce complexe aux liposomes dans un deuxième temps, des anticorps

ont été mélangés avec des Anx5ZZ dans des ratios Anx5ZZ : anticorps 1 : 1, 1 : 2 et 1 : 3 puis liés sur les vésicules.

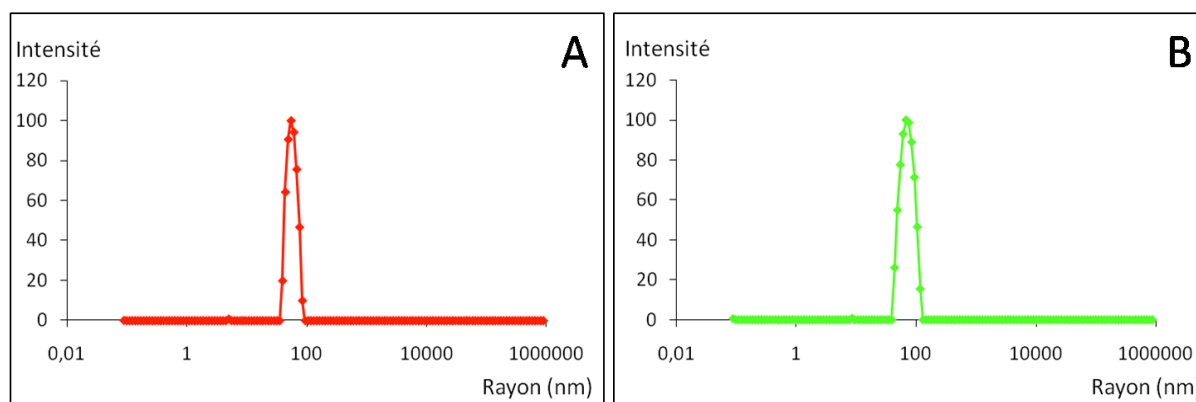


Figure III-44 : Distribution de tailles de solutions de liposomes par DLS, à 90° A) PC : PS (4 : 1) B) PC : PS (4 : 1) après liaison de complexes Anx5ZZ-anticorps, pour un ratio Anx5ZZ : anticorps (1 : 2). Chaque échantillon contient 200µg de lipides (250 nmoles) dans un volume de 900µl de tampon HEPES supplémenté de 2mM Ca^{2+} (soit une concentration de 0,278 M de lipides) La quantité d'Anx5ZZ est de 7,5µg (0,16nmoles) soit environ 90 anticorps par liposome.

Les spectres de diffusion de la lumière montrent que la liaison du complexe Anx5ZZ-anticorps n'a pas d'influence sur le profil des pics représentant les suspensions de liposomes. Pour les vésicules témoins il y a un seul pic très étroit correspondant à des vésicules de rayon de 54nm. Après fixation de complexes Anx5ZZ-anticorps, incubés de façon à avoir un ratio Anx5ZZ : anticorps 1 : 2, les mesures présentent aussi un seul pic indiquant l'existence d'une seule population de vésicules d'un rayon de 67nm. Pour des ratios Anx5ZZ : anticorps 1 : 1 et 1 : 3 les profils sont les mêmes que pour 1 : 2 et les rayons sont sensiblement les mêmes.

L'objectif de cette comparaison des procédures de liaison d'anticorps sur des liposomes via l'Anx5zz est d'obtenir des solutions monodisperses tout en évitant d'avoir à apporter un des composants en excès. Les vésicules doivent être maintenues bien dispersées car la taille est un paramètre important qui influence la durée de vie in vivo. La taille optimale est au alentour de 100 nm [107, 199]. Les liposomes sont donc calibrés pour présenter un diamètre d'environ 100nm et les procédures de fonctionnalisation sont menées de façon à n'avoir qu'une influence mineure sur cette taille. L'objectif est d'éviter l'agréation des vésicules qui conduit à la formation d'objets très volumineux. En général, lorsque l'association d'un ligand sur un liposome conduit à des problèmes de pontage des vésicules, un des partenaires de la liaison, le

ligand ou le groupement associé au liposome sur lequel se lie le ligand, est placé en excès. Feng *et al*, qui ont utilisé le tag ZZ lié à la tête polaire d'un lipide, ont utilisé un excès de tagZZ de telle sorte que le ratio tagZZ : anticorps soit 20 : 1[219]. Dans cette stratégie il reste une grande quantité de tagZZ libre ce qui peut poser problème car ces éléments libres sont susceptibles de lier des anticorps du sérum et d'associer alors aux vésicules une grande quantité d'éléments indésirables. L'autre possibilité est d'ajouter un excès d'anticorps et, dans notre cas, l'obtention de vésicules bien dispersées nécessite d'avoir un ratio Anx5ZZ : anticorps d'au moins 1 : 5. Comme une Anx5ZZ lie deux anticorps ceci correspond à un excès d'anticorps de 2,5X par rapport au nombre de sites disponibles. La conséquence de cet excès est la nécessité d'une étape de séparation des immunoglobulines non liées et surtout la perte de ces composés en excédent. L'excès d'Anx5ZZ semble à éviter pour ne pas lier des anticorps du sérum mais la solution de l'excès d'anticorps pose tout de même problème car elle conduit à des pertes importantes d'un élément très coûteux.

La deuxième procédure, qui consiste à associer dans un premier temps les anticorps aux Anx5ZZ pour former un complexe qui est lié aux vésicules dans un second temps, semble donc plus intéressante. En effet quel que soit le ratio Anx5ZZ : anticorps il n'y a pas d'agrégation des liposomes une fois le complexe fixé sur les membranes. L'anticorps peut donc être associé aux Anx5ZZ sans pertes (comme indiqué par les gels d'acrylamide, tous les anticorps se lient à des Anx5ZZ), puis lié aux vésicules sans les agréger. C'est cette dernière formulation qui a été retenue. Ce choix nécessite de vérifier l'efficacité de fixation de l'assemblage Anx5ZZ-anticorps sur les liposomes.

3.3.2 Évaluation de l'efficacité de liaison du complexe Anx5ZZ-anticorps

L'évaluation de la fixation Ca^{2+} -dépendante du complexe Anx5ZZ-anticorps sur des membranes PC : PS a consisté à comparer la liaison de cet élément d'adressage à celle de l'Anx5ZZ seule par spectroscopie de fluorescence et plus précisément par transfert de fluorescence. Des expériences menées au laboratoire ont montré que l'Anx5ZZ s'associait aux membranes de façon rapide et totale (non présenté). L'objectif est de savoir si l'association des anticorps aux Anx5ZZ avant fixation limite l'efficacité de liaison de ces Anx5ZZ-anticorps en surface de liposomes. Nous avons donc cherché à savoir si le complexe Anx5ZZ-anticorps a un comportement vis-à-vis de la fixation qui est le même que celui de l'Anx5ZZ. L'interaction Anx5ZZ-membrane a été suivie par FRET, une technique qui permet de mettre en évidence la proximité entre deux fluorophores, en marquant d'une part les

Anx5ZZ et d'autre part la membrane des liposomes. La mise en œuvre a consisté à choisir un lipide et des Anx5ZZ couplés à des marqueurs pouvant réaliser du transfert de fluorescence, à mettre en évidence le transfert lors de la liaison de l'Anx5ZZ seule puis à comparer les intensités de ce transfert lors de la fixation d'Anx5ZZ ou d'Anx5ZZ-anticorps.

3.2.2.1 Le FRET et les molécules fluorescentes utilisées

La première étape a consisté à choisir ou synthétiser des molécules marquées qui serviront à visualiser l'interaction Anx5ZZ-membrane. Pour cela l'Anx5ZZ a été liée à une fluorescéine et des lipides rhodamine ont été ajoutés à la composition lipidique des vésicules. L'Anx5ZZ utilisée ici possède un thiol accessible pour les couplages chimiques et, pour être marquée, a été placée en présence d'un large excès de fluorescéine maléimide (excès de 7x). L'excès de fluorophore est éliminé par passage sur colonne de dessalage. Les Anx5ZZ obtenues sont alors marquées par la fluorescéine. Cette réaction est couramment menée au laboratoire et n'a donc pas été caractérisée ici. Les lipides rhodamine proviennent de chez avanti et sont ajoutés à la membrane de telle façon que la composition lipidique des liposomes utilisés soit : DOPC : DOPS : DOPE Rhodamine (79 : 20 : 1) rapport molaire.

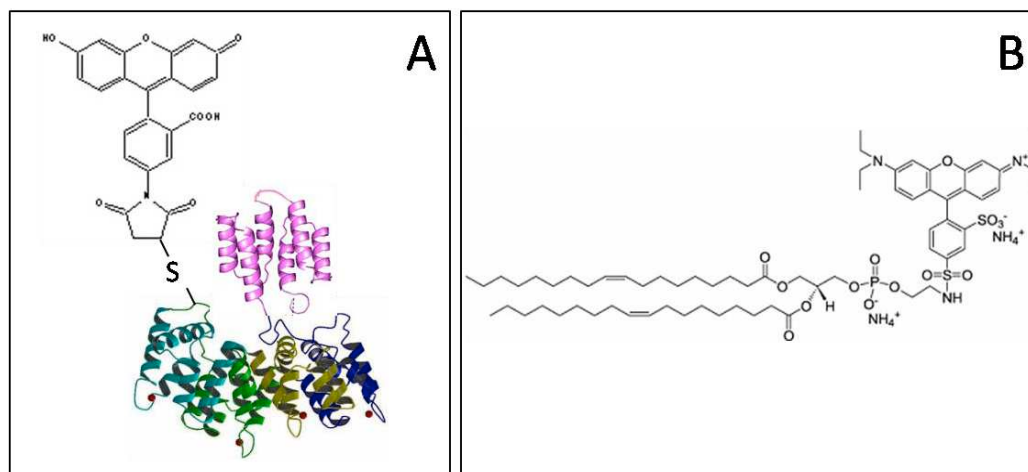


Figure III-45 : Molécules utilisées pour les expériences de transfert de fluorescence : A) Anx5ZZ-fluorescéine B) DOPE-rhodamine.

Comme le transfert d'énergie nécessite le recouvrement des spectres d'excitation et d'émission de deux fluorophores, les caractéristiques spectrales de deux fluorochromes, la fluorescéine et la rhodamine ont été enregistrées. Pour cela les Anx5ZZ-fluorescéine et les

liposomes-rhodamine ont été placés dans deux solutions distinctes et les spectres de leur fluorophore ont été mesurés.

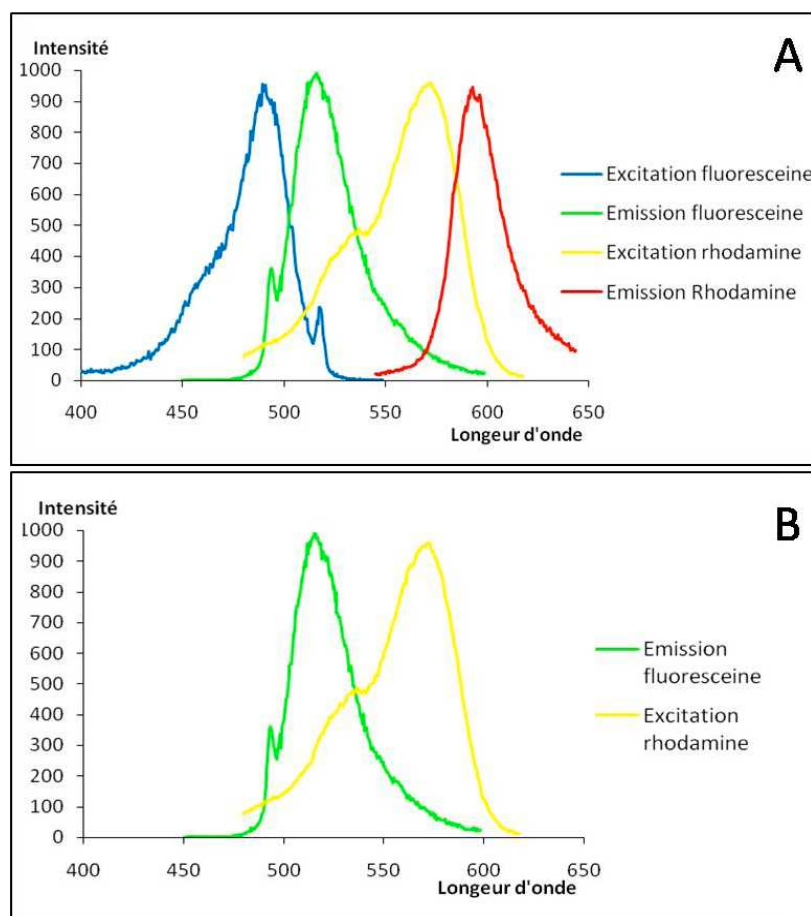


Figure III-46 : Caractéristiques spectrales de la fluoresceine et de la rhodamine A) ensemble des spectres d'excitation et d'émission. Spectre d'excitation de la fluoresceine (bleu) ; spectre d'émission de la fluoresceine pour une longueur d'onde d'excitation $\lambda_{exc}=460\text{nm}$ (vert) ; spectre d'excitation de la rhodamine (jaune) ; spectre d'émission de la rhodamine pour une longueur d'onde d'excitation $\lambda_{exc}=530\text{nm}$ (rouge). B) recouvrement des spectres d'émission de la fluoresceine et d'excitation de la rhodamine. spectre d'émission de la fluoresceine (vert) ; spectre d'excitation de la rhodamine (jaune).

Les enregistrements indiquent que les spectres d'émission de la fluoresceine et d'excitation de la rhodamine se chevauchent et que ces fluorophores peuvent donc être utilisés pour des expériences de FRET. En effet le spectre d'émission correspond à l'ensemble des longueurs d'ondes émises par un fluorophore en réponse à son excitation et le spectre d'excitation à l'ensemble des longueurs d'ondes susceptibles d'exciter un fluorophore. Ces spectres correspondent à de l'énergie lumineuse absorbée ou émise. Le chevauchement des spectres indique alors que l'énergie émise par la fluoresceine peut être, au moins en partie, absorbée

par la rhodamine. Il est donc possible d'avoir quenching c'est-à-dire diminution de la fluorescence émise par la fluorescéine si l'énergie émise est captée par la rhodamine, ce qui se produit si les deux fluorophores sont suffisamment proches (distances inférieures à 10nm).

3.2.2.2 Comparaison des efficacités de liaison des Anx5ZZ et des Anx5ZZ-anticorps

Les mesures de l'interaction des Anx5ZZ-fluorescéine et Anx5ZZ-fluorescéine-anticorps ont été menées en trois étapes. Tout d'abord les spectres d'émission des deux fluorophores en réponse à une excitation à 490nm, la longueur d'onde permettant une excitation maximale de la fluorescéine, ont été enregistrés puis les spectres avant et après liaison des Anx5ZZ ont été mesurés et enfin les spectres après liaison des Anx5ZZ et des Anx5ZZ-anticorps ont été comparés.

Pour l'enregistrement des spectres lors de l'excitation des deux fluorophores à 490nm, la longueur d'onde d'excitation de la fluorescéine, les Anx5ZZ-fluorescéine et les liposomes-rhodamine ont été placés dans des échantillons séparés. Ils ont ensuite été réunis et le spectre d'émission mesuré alors correspond à la condition avant liaison des Anx5-fluorescéine en surface des liposomes PC : PS : PE-rhodamine. Cette liaison est induite par addition de Ca^{2+} dans la solution. Pour la fixation d'Anx5ZZ-fluorescéine –anticorps, les anticorps sont initialement liés aux Anx5ZZ-fluo en les incubant une demi-heure avec un ratio Anx5ZZ-fluo : anticorps 1 :2. Ce complexe est ensuite mélangé avec des liposomes et la liaison est induite par ajout de Ca^{2+} .

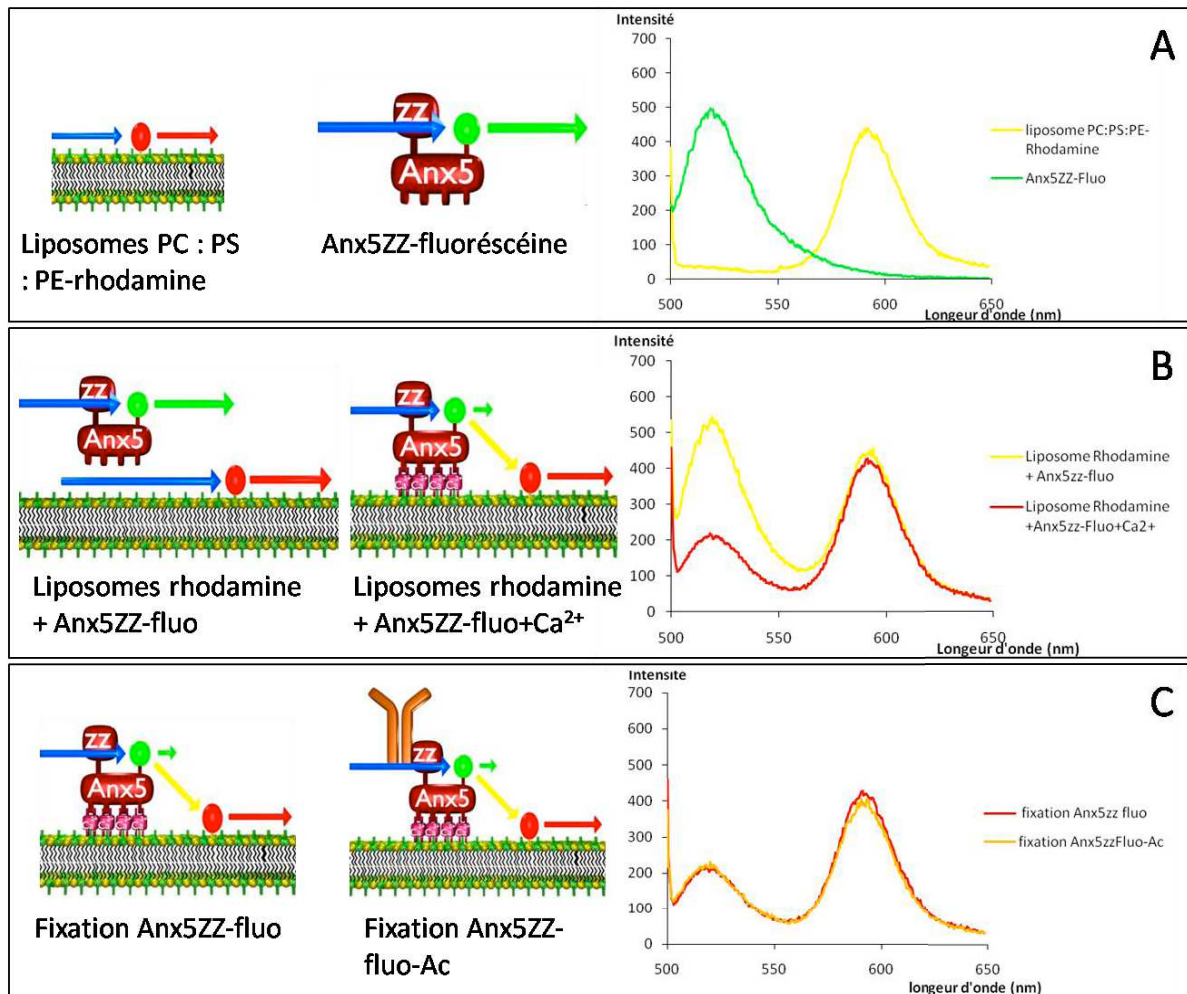


Figure III-47 : Spectres d'émission des fluorescéines et rhodamines en réponse à une excitation à 490nm : A) liposomes-rhodamine (courbe jaune) et Anx5ZZ-fluorescéine (courbe verte) placés dans des échantillons séparés. B) mélange Anx5ZZ-fluorescéine liposomes-rhodamine (courbe jaune) et mélange identique après ajout 2mM de calcium final (courbe rouge) pour induire la liaison des Anx5ZZ-fluo. C) comparaison des fixations de l'Anx5ZZ-fluo (courbe rouge) et des complexes Anx5ZZ-fluo-anticorps (rapport Anx5ZZ-fluo : anticorps 1 : 2) (courbe orange). La quantité de liposomes est de 30µg de lipides par expériences (38nmole). La quantité d'Anx5-fluorescéine est de 1,125 µg (0,024nmole) par expérience, avec ou sans anticorps. Le volume final est de 400µl.

Les mesures effectuées ont été menées pour comparer les liaisons des Anx5ZZ avec ou sans anticorps. Les spectres obtenus pour les molécules fluorescentes séparées indiquent que l'excitation de ces fluorophore à 490 nm provoque l'émission de fluorescence par la fluoresceine mais aussi par la rhodamine. Le spectre obtenu lorsque l'anx5ZZ-fluo et les liposomes-rhodamine sont mélangés en solution est alors constitué de deux pics (figure 45,

B) : un correspondant à la fluorescéine et l'autre à la rhodamine. Lors de la fixation de l'Anx5ZZ-fluo par addition de Ca^{2+} il y a une diminution importante de l'intensité du pic de la fluorescéine alors que celui de la rhodamine reste inchangé ce qui correspond à de l'extinction de fluorescence ou quenching. Enfin, en ce qui concerne la comparaison des fixations des Anx5ZZ-fluorescéine avec ou sans anticorps, les spectres enregistrés pour ces deux conditions sont les mêmes c'est à dire que les amplitudes d'extinction de la fluorescence sont identiques.

Ces résultats indiquent qu'il y a quenching lors de la liaison de l'Anx5ZZ-fluorescéine aux liposomes et ils permettent d'évaluer l'efficacité de fixation des Anx5ZZ-fluo associées à des anticorps. Tout d'abord ils montrent que lorsque la fluorescéine est excitée à sa longueur d'onde d'excitation, c'est à dire celle permettant l'émission du signal le plus intense, il y a aussi excitation de la rhodamine. Cette fluorescence de la rhodamine s'explique par le fait que la longueur d'onde d'excitation de la fluorescéine fait partie de son spectre d'excitation et, même si elle n'est pas la plus efficace pour la stimuler, elle lui permet quand même l'émission de photons. Lorsque les deux fluorophores sont présents en solution le spectre, qui présente deux pics, correspond à la somme des émissions des deux fluorophores. Lorsque du Ca^{2+} est ajouté l'Anx5ZZ-fluorescéine se lie en surface des liposomes ce qui amène la fluorescéine à proximité des rhodamines portées par les lipides de la membrane. Du fait de cette proximité, une certaine quantité d'énergie émise par la fluorescéine peut être captée par la rhodamine. Cette énergie absorbée n'est pas réémise sous forme de fluorescence et la seule conséquence de ce transfert est la diminution du signal émis par la fluorescéine. Il y a donc extinction de fluorescence, ou quenching, lors de la fixation de l'Anx5ZZ. Comme l'amplitude du quenching est fonction notamment de la quantité de fluorophores qui sont amenés à proximité les uns des autres (non présenté) des différences dans l'efficacité de liaisons des Anx5ZZ-fluorescéines aux membranes exposant des rhodamines peuvent être déterminées. Ceci permet de comparer les efficacités de fixation pour les conditions où l'Anx5ZZ est associée, ou non, à des anticorps. Les résultats indiquent que l'efficacité de liaison des Anx5ZZ-fluorescéine-anticorps est la même que pour Anx5ZZ-fluorescéine sans anticorps. Il est établi que l'Anx5ZZ se fixe de façon totale quand elle est en quantité sous saturante (en quantité telle que la totalité de la surface des liposomes n'est pas saturée). Il est donc certain que pour les quantités utilisées (qui représente moins d'1% de la quantité nécessaire pour avoir couverture totale de la surface) toutes les Anx5ZZ-fluo sont fixées. La liaison du complexe Anx5ZZ-anticorps aux membranes, qui est la même que pour l'Anx5ZZ-fluorescéine, se fait donc de

façon totale. Cette liaison complète est avantageuse car elle permet un contrôle simple de la densité d'anticorps en surface des liposomes.

L'intérêt de l'Anx5 comme système d'ancrage du tagZZ (ou du tagZZ-anticorps) aux liposomes réside donc dans l'efficacité et la simplicité de la liaison qui permet une certaine flexibilité quant à la fonctionnalisation. Pour l'association du tag ZZ à des nanoobjets, différents auteurs ont eu recours à des ancrs protéiques. Ces nanoobjets sont souvent des virus ou des éléments bactériens détournés de leur fonction pour être utilisés pour des applications biotechnologiques. L'association du tagZZ-ancre protéique est alors réalisée dans des bactéries [220-224]. Un système d'ancrage permettant de lier le tag ZZ sur des liposomes déjà formés a été proposé mais il utilise un peptide qui s'insère dans les membranes quand le pH est acide [225], c'est-à-dire dans des conditions non physiologiques. L'utilisation de l'Anx5 comme système d'ancrage permet donc une liaison du tagZZ aux membranes qui est plus simple et qui peut être utilisée dans des applications biologiques. Elle permet de plus une certaine flexibilité dans la fonctionnalisation. En effet cette stratégie utilisant l'Anx5ZZ présente les mêmes avantages que la postinsertion, une technique qui consiste à lier un ligand de façon covalente à un lipide formant des micelles et à l'insérer dans un deuxième temps aux vésicules par transfert des micelles vers les liposomes d'intérêt [119]. Elles permettent toutes les deux d'associer un même ligand à des vésicules différentes ou encore de lier des ligands différents à une même population de liposomes. L'utilisation de l'Anx5ZZ permet donc de fonctionnaliser des liposomes de façon efficace, simple et flexible.

En résumé, nous avons menés des expériences relatives à la détermination de la stœchiométrie de la liaison Anx5ZZ-anticorps, aux modalités de maintien de la dispersité des solutions et à l'évaluation de l'efficacité de liaison du complexe Anx5ZZ-anticorps. Les résultats ont permis la mise au point d'une procédure de fonctionnalisation qui offre un contrôle relativement simple de la densité de ligand. Il apparaît tout d'abord que 25% des Anx5ZZ ne fixent pas d'anticorps et les 75% convenables fixent chacune deux anticorps. Pour la fonctionnalisation des liposomes, la liaison d'anticorps se fait dans un premier temps sur les Anx5ZZ et le complexe formé est lié dans un deuxième temps sur les vésicules. Cette façon de faire permet d'éviter l'agrégation des vésicules et ceci sans avoir à utiliser des anticorps ou des Anx5ZZ en excès. La liaison contrôlée des immunoglobulines sur les Anx5ZZ et le fait que tous les complexes Anx5ZZ-anticorps se lient aux liposomes permet, en plus d'éviter une étape de séparation des ligands non fixés, de parfaitement contrôler la densité de ligands liés en surface des liposomes.

3.4 Utilisation des complexes liposomes-anticorps pour la reconnaissance de cibles biologiques

La capacité des liposomes fonctionnalisés par le complexe Anx5ZZ-anticorps à reconnaître une cible biologique a été évaluée en imagerie sur des tissus issus de souris présentant des pathologies telles que l'athérosclérose et l'inflammation. Les anticorps utilisés ont été choisis car ils reconnaissent des molécules spécifiques ou surexprimées au niveau des zones à cibler. La reconnaissance de ces cibles par les liposomes fonctionnalisés a été vérifiée ex vivo par microscopie électronique pour l'adressage vers la plaque d'athérome et ex vivo et in vivo par microscopie de fluorescence pour les zones d'inflammations. Dans chaque cas le phénomène pathologique est brièvement décrit, principalement pour introduire les molécules ciblées puis les résultats obtenus sont présentés. Ces résultats sont préliminaires et sont exposés pour illustrer l'approche mise en œuvre. Ces expériences seront répétées ultérieurement.

3.4.1 Ciblage de la plaque d'athérome

Le premier modèle présenté est celui du ciblage de la plaque d'athérome. L'athérosclérose est un processus pathologique qui conduit à l'épaississement de la paroi (l'intima) des artères. Le dépôt de cholestérol et de LDL dans la paroi artérielle déclenche des phénomènes complexes qui aboutissent à la formation des plaques d'athérome. Ces plaques peuvent progressivement réduire la lumière de l'artère, se rompre et donner lieu à des événements de cicatrisation qui peuvent provoquer l'obturation des vaisseaux. Pour imager les zones athéromateuses à risque, les liposomes ont été dirigés vers les éléments de la cicatrisation et leur liaison à ces cibles a été visualisée par microscopie électronique.

3.4.1.1 L'athérosclérose

L'athérosclérose est un phénomène qui affecte la paroi des artères, résulte de l'accumulation de graisse et peut entraîner des problèmes pathologiques principalement à cause de son instabilité. Cette accumulation commence par une infiltration de lipoprotéines (LDL-cholestérol) dans la paroi des vaisseaux favorisée par une concentration plasmatique élevée. Cette agression induit le recrutement de monocytes qui, infiltrés dans l'intima, vont se transformer en macrophages. Ces derniers vont prendre en charge les LDL et former des

cellules spumeuses. La mort des cellules spumeuses par nécrose ou apoptose est à l'origine de la formation d'un corps lipidique qui peut croître dans la paroi des vaisseaux et faire saillie dans la lumière des artères. Le développement se poursuit par la formation d'une chape fibreuse qui couvre le cœur lipidique. La plaque ainsi constituée est dite mature. Une fois ce stade atteint, il peut y avoir deux types d'évolution : stabilisation ou rupture de la plaque. L'évolution de la plaque dite stable est très lente (plusieurs années) et conduit à une diminution du diamètre des vaisseaux. Ceci peut entraîner des problèmes cliniques mais le risque évolutif principal est lié aux phénomènes de rupture, favorisés par la vulnérabilité de la plaque. Cette fragilité est due soit au fait que le cœur lipidique est important soit au fait que la chape fibreuse est fragilisée et a pour conséquence la rupture de cette chape. L'hémorragie qui en résulte est suivie de phénomènes de cicatrisation avec pour conséquence la formation d'un caillot sanguin (ou thrombus). Ce caillot peut obturer les vaisseaux soit au niveau de la plaque d'athérome soit au niveau de fins capillaires après décrochage et migration. L'obstruction des petits vaisseaux est à l'origine d'infarctus du myocarde ou d'accident vasculaire cérébral. La formation de plaque d'athérome est donc problématique car la formation de thrombi consécutive à la rupture de la plaque peut avoir des conséquences cliniques dramatiques. Il est donc important de diagnostiquer ou de traiter les plaques d'athérome instables.

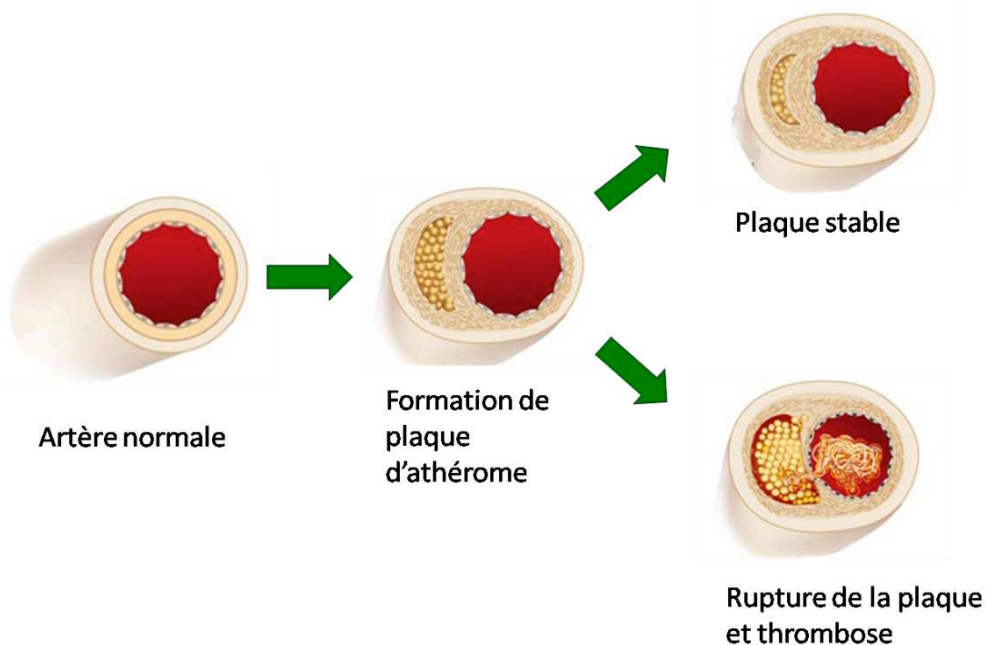


Figure III-48 : Formation et évolution schématique de la plaque d'athérome

3.4.1.2 Le thrombus et les molécules ciblées

Pour cibler les plaques d'athérome qui ont déjà subi rupture et cicatrisation, nous avons utilisé un anticorps dirigé contre les plaquettes, éléments cellulaires constitutives du thrombus. Lors d'une lésion, les plaquettes se lient sur les cellules du sous endothélium qui sont exposées au niveau de la rupture. Cette adhésion induit l'émission de signaux qui conduisent dans un premier temps au recrutement d'autres plaquettes et à l'agrégation des plaquettes entre elles et dans un deuxième temps à la coagulation qui aboutit à la formation d'un réseau de fibrine. La liaison des plaquettes au fibrinogène est suivie de la protéolyse du fibrinogène en fibrine qui s'organise en un réseau 3D formant l'armature du caillot. Le thrombus est donc constitué de plaquettes agrégées et est stabilisé par un filet de fibrine. Pour cibler les zones de thrombus de la plaque d'athérome, nous avons utilisé un anticorps se liant au niveau du caillot sanguin. Cet anticorps est spécifique des récepteurs $\alpha\text{IIb}\beta 3$ exprimés à la surface plaquettaire et sont impliqués dans leur agrégation. Notre stratégie a donc consisté à utiliser cet anticorps pour localiser les liposomes au niveau de la plaque d'athérome.

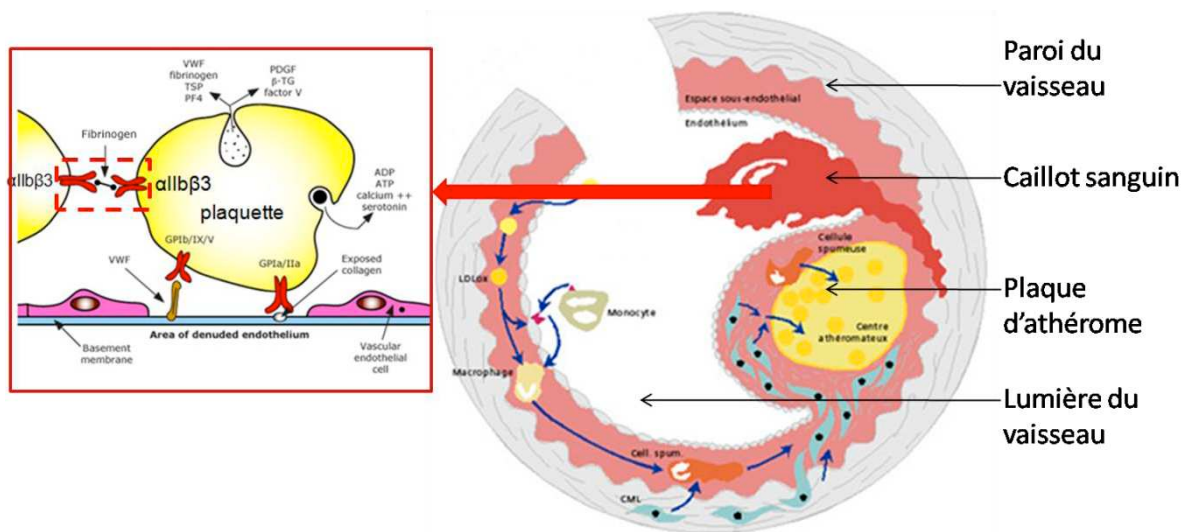


Figure III-49 : Représentation schématique des éléments ciblés pour imager la plaque d'athérome : les récepteurs $\alpha\text{IIb}\beta 3$ exprimés par les plaquettes constituant le caillot sanguin.

3.4.1.3 Ciblage de thrombus *ex vivo* par des magnétoliposomes

L'adressage des liposomes fonctionnalisés au niveau de la plaque d'athérome a été réalisé par des expériences *ex vivo* et visualisé par microscopie électronique. Les liposomes sont

constitués de PC : PS (7 : 3 en mole) et encapsulent des particules d'oxyde de fer, pour visualiser les vecteurs en microscopie électronique. Ces vésicules sont fonctionnalisées par l'anticorps anti- $\alpha\text{IIb}\beta_3$, qui nous a été gracieusement fourni par G. Clofent-Sanchez (RMSB, Bordeaux), lié aux liposomes grâce à l'Anx5ZZ de façon à avoir 90 anticorps par liposome. Le reste de la surface est couverte par des Anx5-PEG. Une portion d'artère iliaque a été prélevée sur des lapins soumis, à un régime hypercholestérolémiant. Ces opérations ont été menées par S. SANCHEZ, animalier du RMSB (Bordeaux) sous la direction G. Clofent-Sanchez. Les magnétoliposomes fonctionnalisés (1mg /ml ; 1,26mM) ont été incubés avec la portion d'artère puis lavés par passages successifs en tampon afin d'éliminer les vecteurs non liés. L'ensemble a ensuite traité pour observation en microscopie électronique à transmission. L'échantillon a été déshydraté par passages successifs dans des solutions de plus en plus concentrées en éthanol et inclus en résine. Une fois cette résine solidifiée les échantillons ont été coupés en tranche de 75nm d'épaisseur et observés en MET. Les inclusions et les observations ont été réalisées par S.Tan, assistant ingénieur au laboratoire.

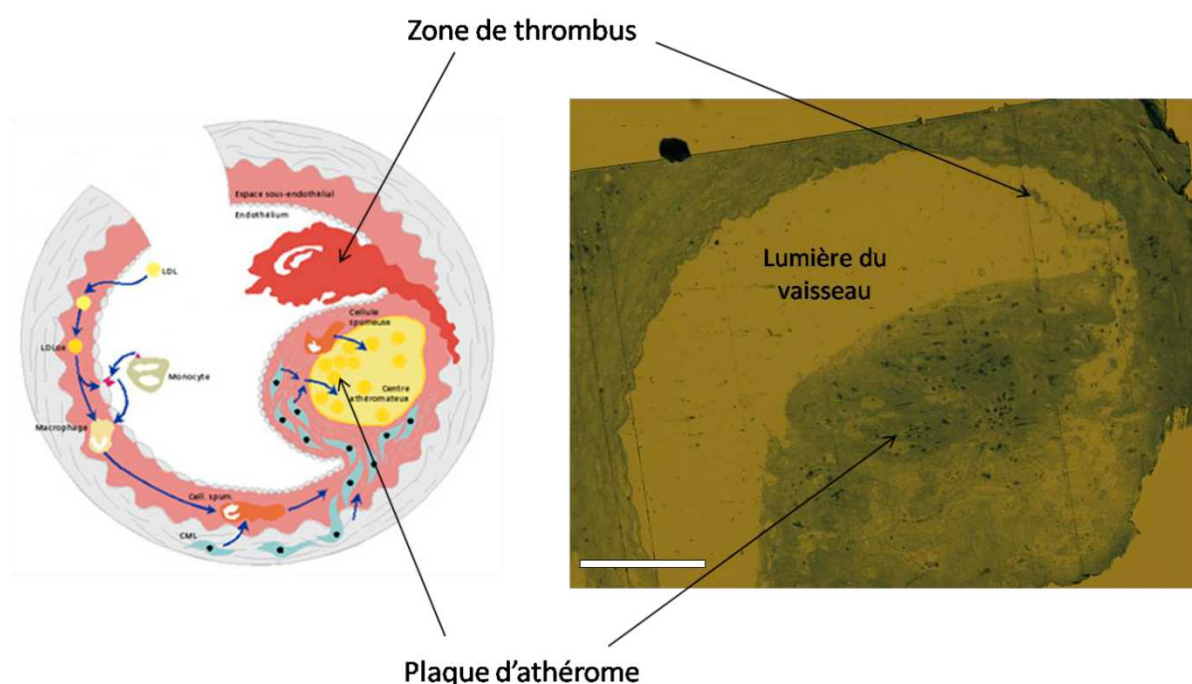


Figure III-50 : Schéma (gauche) et image de microscopie optique (droite) d'une section d'artère athéromateuse de lapin ; barre d'échelle 200 μm . Image S. Tan.

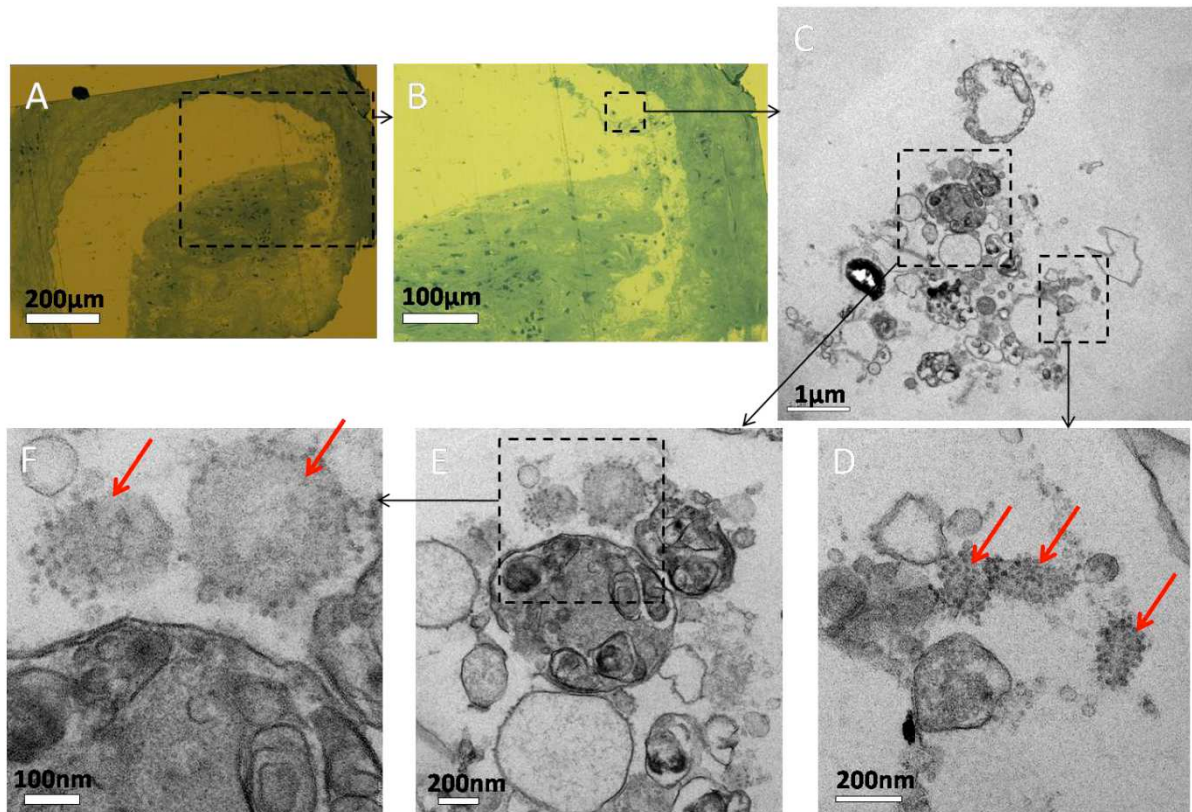


Figure III-51 : Visualisation des magnétoliposomes liés au niveau de plaquettes constitutives d'un thrombus. A) artère athéromateuse par microscopie optique ; B) agrandissement de la zone de A encadrée en pointillé ; C) agrandissement de la zone de B encadrée en pointillé par MET D) agrandissement de la zone de C encadrée en pointillé et indiquée par une flèche E) agrandissement de la zone de C encadrée en pointillé, et indiquée par une flèche ; F) agrandissement de la zone de E encadrée en pointillé. Les magnétoliposomes sont indiqués par les flèches rouges. Images S. Tan.

Les résultats indiquent que des magnétoliposomes sont observés au niveau d'un thrombus associé à une plaque d'athérome. Les images obtenues sont comparables aux représentations schématiques. Elles montrent la présence d'une plaque d'athérome et d'un thrombus qui lui est associé. Les agrandissements de ce caillot permettent de voir les cellules qui le constituent c'est-à-dire les plaquettes. A plus fort grossissement apparaissent des structures granuleuses localisées à proximité, voire en surface des plaquettes. Des échantillons témoins réalisés sur des magnétoliposomes seuls inclus en résine confirment qu'il s'agit de liposomes encapsulant des particules d'oxyde de fer (Figure III-51). Des magnétoliposomes sont donc associés à des plaquettes constituant un thrombus.

Les liposomes utilisant des dérivés d'Anx5 pour la liaison d'anticorps peuvent donc être adressés vers des cibles biologiques et utilisés pour l'imagerie en microscopie électronique.

En effet la présence des particules de fer permet une visualisation directe des vésicules en microscopie. Cette possibilité permet de suivre les vésicules à l'échelle cellulaire et peut être notamment utilisée pour visualiser des phénomènes d'endocytose. Dans notre cas, ce marquage indique que les vésicules sont fixées en surface des plaquettes. Le marquage par les particules de fer permet donc de conclure, à partir de résultats de microscopie électronique, que les liposomes fonctionnalisés peuvent être adressés vers des cibles biologiques.

3.4.2 Ciblage de l'inflammation

Le deuxième modèle biologique est l'inflammation. L'inflammation est une réponse des tissus vivants vascularisés à des agressions qui peuvent être physiques (chaud, froid...) ou chimiques (acides, toxines...). Elle peut être la conséquence d'une infection, d'une nécrose tissulaire ou être provoquée par une réaction immunitaire. Dans notre cas, les liposomes ont donc été dirigés contre des zones d'inflammation induites chez la souris au niveau du cerveau. La capacité de ciblage des liposomes fonctionnalisés a été vérifiée ex vivo et in vivo par microscopie de fluorescence.

3.4.2.1 L'inflammation et les molécules ciblées

La réaction inflammatoire met en jeu une phase de recrutement de cellules immunitaires qui nécessite l'expression de récepteurs que nous avons choisis comme molécules à cibler. En effet, un des objectifs de l'inflammation est le recrutement de cellules du système immunitaire au niveau d'une zone agressée. Pour cela le mécanisme inflammatoire débute par l'émission de médiateurs chimiques qui induisent la mise en route de deux phases : une phase vasculaire et une phase cellulaire, mises en jeu pour apporter une grande quantité d'éléments sanguins et lier les cellules du système immunitaire qui seront dirigées vers la zone enflammée. La phase vasculaire consiste en une dilatation des vaisseaux et une augmentation de leur perméabilité. Cette vasodilatation permet d'augmenter le débit sanguin afin d'éliminer les cellules mortes et les toxines et d'apporter les éléments nécessaires à la guérison, notamment les cellules phagocytaires. L'augmentation de la perméabilité est mise en œuvre pour permettre le passage des ces élément de la circulation vers la zone à traiter, phénomène qui a lieu dans la phase dite cellulaire. En effet, la phase cellulaire correspond au passage des cellules de l'immunité au travers de la paroi des vaisseaux pour rejoindre leur zone d'action. Ces cellules circulantes s'approchent tout d'abord des parois (margination) auxquelles elles adhèrent (adhérence) dans

un second temps. Leur adhésion se fait via des récepteurs surexprimés par les cellules de la paroi des vaisseaux situés au niveau de la zone d'inflammation. Ces molécules d'adhésion sont notamment les I-CAM qui, après une première phase de liaison, permettent une adhérence ferme des cellules immunitaires. Ces cellules vont ensuite traverser la paroi du vaisseau et migrer vers le foyer inflammatoire en suivant les gradients chimiques. L'inflammation est donc une réaction qui a pour objectif le recrutement de cellules immunitaires et qui passe notamment par l'expression de molécules d'adhésion au niveau des cellules de la paroi des vaisseaux. Pour cibler les zones d'inflammation nous avons donc utilisé des anticorps dirigés contre un type de molécule d'adhésion, les I-CAM.

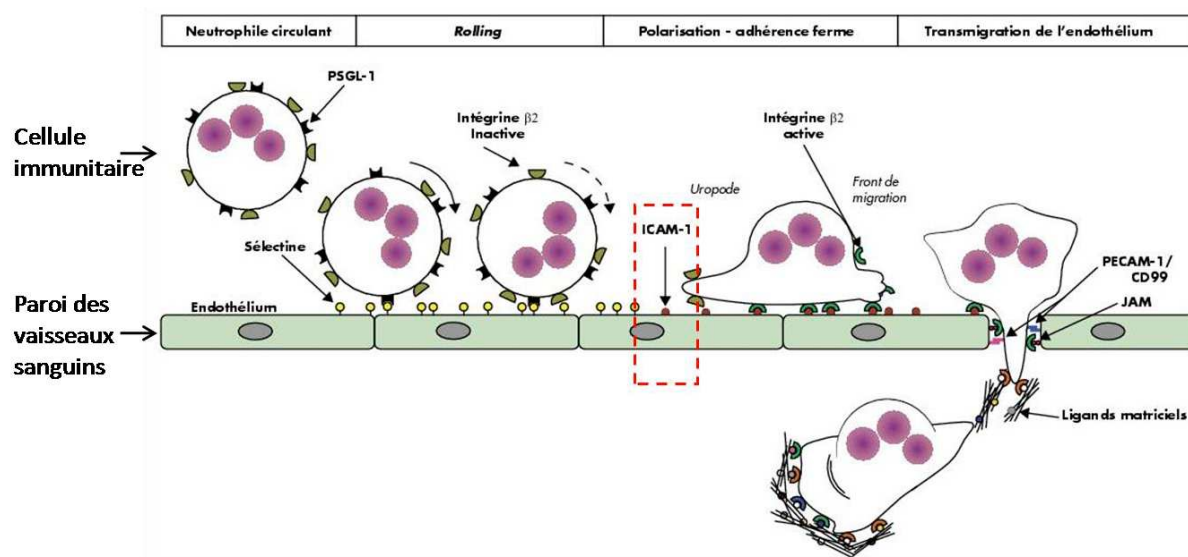


Figure III-52 : Représentation schématique des éléments ciblés pour imager l'inflammation : les molécules d'adhésion I-CAM exprimées par les cellules de la paroi des vaisseaux sanguins.

3.4.2.2 Ciblage de zones inflammées du cerveau *ex vivo*

L'adressage des liposomes fonctionnalisés au niveau de zones d'inflammation induites au niveau du cerveau a été mis en évidence *in vivo* par microscopie de fluorescence. Les membranes des vésicules utilisées sont constituées de PC : PS : PE-rhodamine (69 : 30 : 1 % en mole), et peuvent donc émettre un signal de fluorescence grâce aux rhodamines. En plus de cela, ces vecteurs encapsulent des particules d'oxyde de fer. Ils sont fonctionnalisés par un anticorps anti I-CAM lié aux liposomes grâce à l'Anx5ZZ et de façon à avoir 90 anticorps par liposome. Le reste de la surface est couverte par des Anx5-PEG.

La préparation des animaux et les coupes de cerveaux ont été réalisées par A. Vekris du laboratoire de K. Petry (INSERM EA 2966). L'inflammation a été provoquée chez des rats au niveau du cerveau par choc thermique en apposant un coton gelé sur le crane de l'animal. Ces expériences de ciblage ont tout d'abord été menées ex vivo. Pour ces essais ex vivo le cerveau est fixé en paraformaldéhyde en perfusant le rat avec une solution tamponnée de paraformaldéhyde qui va remplacer le sang dans le système circulatoire. Le cerveau est ensuite prélevé, découpé et les tranches récupérées sont incubées avec des solutions de liposomes fonctionnalisés ($0,1\text{mg}_{\text{lipides}}/\text{ml}$ soit $0,126\text{mM}$, dans $500\mu\text{l}$). Après lavage par passages successifs dans des solutions tamponnées pour éliminer les vésicules non liées, les coupes de cerveau ont été visualisées par microscopie de fluorescence.

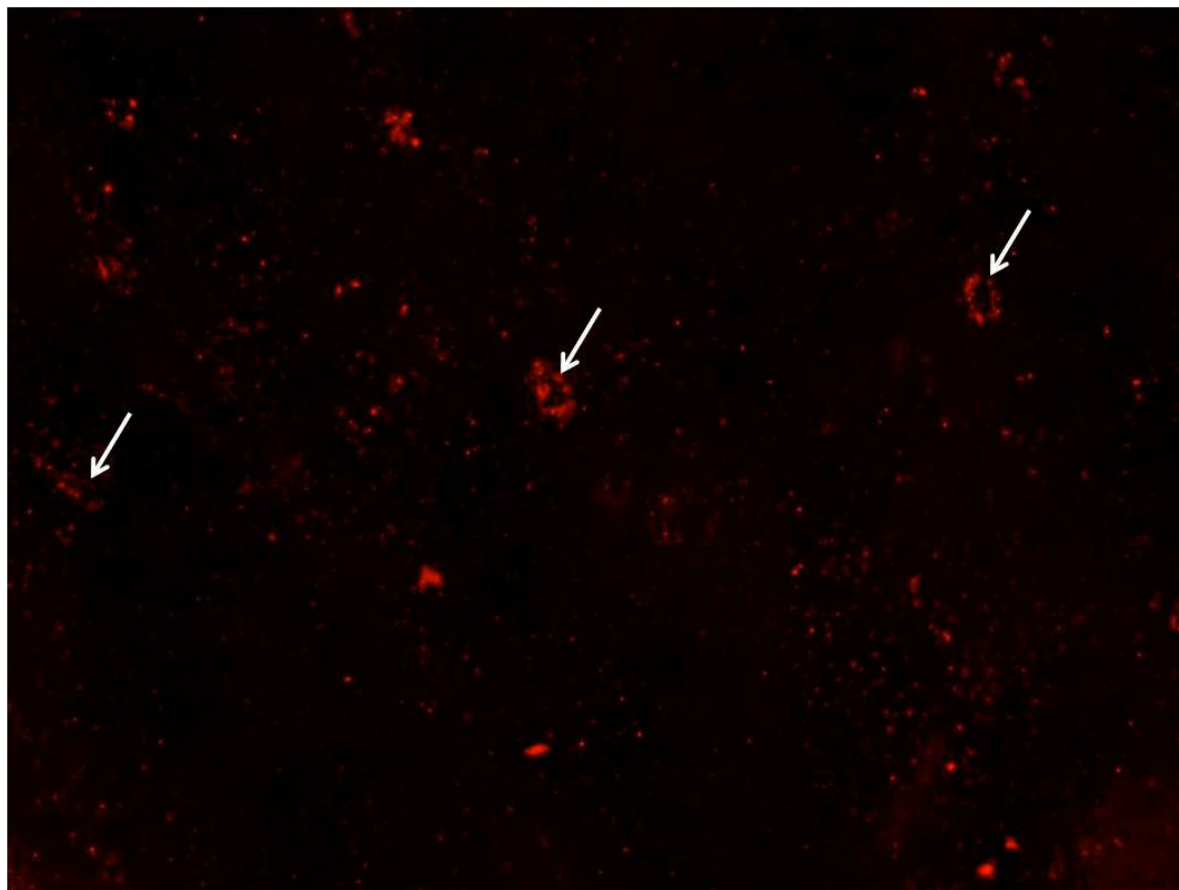


Figure III-53 : Coupe de cerveau induit en inflammation après incubation avec des liposomes fluorescents fonctionnalisés avec un anticorps anti I-CAM. Des vaisseaux marqués sont indiqués par une flèche blanche. Grossissement 60x. Image A.Vekris

Les images de fluorescence (figure III-53) ont été menées pour étudier la liaison éventuelle des liposomes sur les parois des vaisseaux situés dans des zones d'inflammation. Des zones

présentant un marquage circulaire sont observées (flèche blanches figures III-53). Ces zones circulaires correspondent à des vaisseaux observés en coupe et dont la paroi est marquée par des liposomes fluorescents (Les marques fluorescentes éparse ne peuvent être attribuées précisément à de l'autofluorescence des tissus ou à des liposomes). Les coupes contrôles réalisées avec des liposomes fonctionnalisés avec des anticorps Anti-PSA, ne présentant pas de spécificité pour les zones d'inflammation, n'ont pas ce profil de fluorescence (non présenté) ce qui permet de conclure que la liaison d'un anticorps aux liposomes leur confère bien une capacité de reconnaissance de la paroi des vaisseaux enflammés. Les liposomes liés à des anticorps anti I-CAM présentent donc une spécificité pour les zones d'inflammation et plus précisément pour la paroi des vaisseaux situés au niveau de ces zones.

3.4.2.3 Ciblage de zones inflammées du cerveau *in vivo*

La capacité de ciblage de zone d'inflammation a ensuite été étudiée *in vivo* par microscopie de fluorescence. Les mêmes liposomes que précédemment ont été utilisés (composition PS : PE-rhodamine 69 : 30 : 1 % en mole, encapsulant des particules d'oxyde de fer et fonctionnalisés avec des anticorps anti I-CAM, 90 anticorps / liposomes). Ils ont été injectés au niveau de la queue de rats pour lesquels, comme indiqué précédemment, l'inflammation a été provoquée au niveau du cerveau par choc thermique en apposant un coton gelé sur le crâne de l'animal. Ce traitement permet d'avoir une zone d'inflammation localisée et provoque la rupture de la barrière hémato-encéphalique ce qui peut permettre à des liposomes injectés *in vivo* d'accéder au cerveau. Deux heures après injection (300µl de solution injectée, concentration en liposomes de 1mg_{lipides}/ml ; (1,26mM)), le cerveau a été imagé en IRM pour évaluer la possibilité d'obtenir un signal grâce aux particules d'oxyde de fer encapsulées. Les animaux ont ensuite été sacrifiés et de la même façon que pour les expériences *ex vivo*, le cerveau est fixé en paraformaldéhyde en perfusant le rat avec une solution tamponnée de paraformaldéhyde qui remplace le sang dans le système circulatoire. Le cerveau est ensuite prélevé et découpé en tranches qui sont visualisées en microscopie de fluorescence et en microscopie électronique.

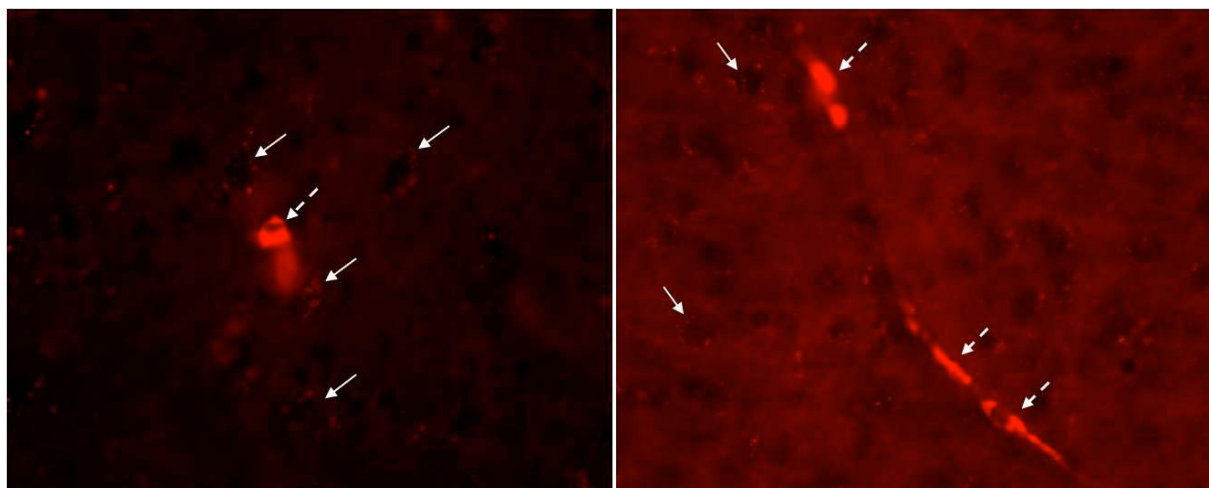


Figure III-54 : Coupes de cerveau induit en inflammation, prélevé sur un rat 2 heures après injection, au niveau de la queue, de liposomes fluorescents fonctionnalisés avec un anticorps anti I-CAM. Des vaisseaux marqués sont repérés par une flèche blanche pleine et les cellules totalement fluorescentes par des flèches blanches pointillés. Grossissement 60x. Image A.Veckris

Les résultats ont été menés pour vérifier si les liposomes fluorescents pouvaient cibler in vivo les zones d'inflammations situées au niveau du cerveau. Comme pour les expériences ex vivo il apparaît des zones circulaires au pourtour fluorescent qui sont des vaisseaux sanguins marqués au niveau de leur paroi et en plus de cela il y a in vivo certaines cellules qui sont totalement fluorescentes. Ce marquage du cytoplasme indique qu'il y a certainement endocytose des vecteurs mais la nature des cellules (cellules endothéliales, macrophages...) reste à déterminer. Les animaux contrôles pour lesquels les liposomes ne présentent pas d'élément d'adressage dirigé contre les zones d'inflammation ne sont, eux, pas marqués par les fluorophores. La fonctionnalisation est donc indispensable pour obtenir un signal fluorescent. Les liposomes fonctionnalisés avec un anticorps spécifique permettent donc d'obtenir un signal fluorescent au niveau des zones vers lesquelles ils ont été ciblés.

Ces expériences indiquent que les liposomes fonctionnalisés peuvent se localiser au niveau d'une zone de l'organisme pour laquelle ils présentent une spécificité. Ils présentent donc, en plus de l'affinité pour la cible (qui a déjà été montré ex vivo), une certaine furtivité in vivo. En effet, l'accès à la cible nécessite une traversée de l'organisme depuis la queue où ils sont injectés jusqu'au cerveau où ils vont pouvoir se lier. Il faut que les liposomes échappent aux défenses de l'organisme et ceci suffisamment longtemps pour effectuer un ou plusieurs passages au niveau de la zone d'intérêt et entrer en contact avec le récepteur ciblé. L'obtention d'un signal au niveau du cerveau indique qu'un certain nombre de vésicules se

sont liées et qu'elles ont donc un temps de vie dans la circulation suffisant pour aller reconnaître leur cible biologique. Les liposomes fonctionnalisés combinent donc furtivité et affinité pour un ligand de l'organisme et peuvent donc être utilisés *in vivo* pour le ciblage de zones d'intérêt thérapeutique.

Les expériences d'IRM et de microscopie électronique n'ont pas permis de détecter la liaison des liposomes. L'absence de signal en IRM et en microscopie électronique peut être expliquée par une sensibilité de signal insuffisante. Pour remédier à cela, une solution peut être d'augmenter la quantité de particules par liposomes. En effet ces expériences ont été réalisées à un stade précoce de la mise au point des magnétoliposomes qui étaient alors peu chargés (environ 30 particules par liposome et non pas 70 comme obtenu après optimisation) et peut donc être augmentée. Cette faible concentration de vecteurs pose aussi problème en microscopie électronique car la probabilité de trouver un liposome est alors très limitée.

En conclusion des expériences de ciblage, il apparaît que les liposomes fonctionnalisés par un complexe Anx5ZZ-anticorps sont utilisables pour des applications chez un organisme vivant. Les expériences *ex vivo* sur la plaque d'athérome et l'inflammation indiquent toutes les deux que ces vecteurs peuvent reconnaître une cible biologique. Celles menées *in vivo* indiquent que ces vésicules circulent suffisamment longtemps pour pouvoir accéder à une cible éloignée de leur lieu d'injection. Tout ceci indique que ces liposomes sont utilisables pour des applications *in vivo* c'est-à-dire pour des injections dans la circulation sanguine suivies d'un déplacement dans le flux sanguin et d'une accumulation au niveau de zones d'intérêt thérapeutique.

En conclusion, ce travail a consisté à formuler des vecteurs liposomaux fonctionnalisés par des complexes Anx5ZZ-anticorps et couvert d'Anx5-PEG pour cibler des zones d'intérêt dans un organisme vivant. Une composition lipidique a tout d'abord été définie pour encapsuler des petites molécules de façon stable lors de la liaison des Anx5 et lors de la mise en sérum. La stœchiométrie de l'interaction Anx5ZZ-anticorps a été évaluée pour contrôler le nombre d'anticorps fixés et vérifier la possibilité d'agrégation des vésicules lors de la fonctionnalisation. Afin d'éviter les problèmes d'agrégation nous avons retenu une stratégie qui consiste à former un complexe Anx5ZZ-anticorps dans un premier temps puis à lier cet élément de ciblage aux liposomes dans un second temps. La liaison totale de ces complexes en surface des liposomes a été démontrée et permet un contrôle simple de la densité de ligand. Nous avons enfin mis en évidence que les liposomes fonctionnalisés par des anticorps via des Anx5ZZ et couverts d'Anx5-PEG

pouvaient se lier à des cibles biologiques impliquées dans des pathologies telles que l'athérosclérose ou l'inflammation et être utilisés in vivo pour cibler l'inflammation. Ces nanovecteurs liposomaux sont donc potentiellement utilisables pour transporter des médicaments ou des agents pour l'imagerie in vivo vers des sites d'athérosclérose ou d'inflammation.

Conclusions et perspectives

Les principales réalisations de ce travail de thèse ont été la fonctionnalisation de liposomes grâce à des protéines dérivées de l'Anx5 et l'encapsulation dans ces vésicules de composés donnant un signal en imagerie.

La fonctionnalisation des liposomes c'est-à-dire l'addition d'un élément d'adressage aux vésicules a été réalisée grâce à des dérivés d'Anx5 de façon à conférer aux vecteurs une spécificité pour une cible biologique. Les dérivés d'Anx5 ont été utilisés soit comme ligands dans le cas de l'Anx5-SH soit comme intermédiaires pour la liaison d'anticorps dans le cas de l'Anx5ZZ.

L'Anx5-SH a été liée covalentement de manière à utiliser l'affinité de cette protéine pour les membranes anioniques et adresser les liposomes vers les cellules en apoptose. Nous avons mis en évidence que la liaison covalente se réalisait de façon très efficace. La maîtrise de cette réaction a rendu possible le contrôle de la densité de ligand. Ceci a permis de montrer que la dispersité des solutions et l'efficacité de reconnaissance de la cible sont fonction de la quantité d'Anx5-SH liées aux vésicules. Enfin, des liposomes-Anx5 encapsulant des fluorophores ont été adressés au niveau de cellules en apoptose.

L'utilisation d'Anx5ZZ pour lier des anticorps en surface des liposomes est une approche dans laquelle l'Anx5ZZ permet d'ancrer un ligand, un anticorps, en surface des membranes de liposomes anioniques. Les vecteurs utilisés sont au moins constitués de PS, pour lier des Anx5, mais pour encapsuler des composés de façon stable il est préférable que la composition soit PE / PS. Ils sont rendus furtifs grâce à des Anx5-PEG qui ont été utilisées d'une part pour limiter l'interaction des vésicules avec les opsonines grâce au PEG et d'autre part masquer les PS, grâce aux Anx5, car ces lipides sont reconnus in vivo par les macrophages comme signal d'un élément à éliminer. En ce qui concerne la liaison des anticorps via l'Anx5ZZ, nous avons établi qu'il était préférable de lier l'anticorps à l'Anx5ZZ dans un premier temps puis de lier le complexe Anx5ZZ-anticorps aux liposomes dans un second temps. Cette procédure permet

de maintenir les vecteurs dans un état dispersé sans avoir à utiliser un excès ni d'anticorps ni d'Anx5ZZ.

L'encapsulation a été réalisée soit pour évaluer la perméabilité des membranes vis-à-vis de petites molécules soit pour permettre un suivi des vecteurs par imagerie.

Le suivi des fuites de fluorophores encapsulés a permis d'évaluer la perméabilité membranaire vis à vis d'éléments de faible masse moléculaire qui pourraient être, à terme, des médicaments. Nous avons mis en évidence des fuites faibles et quasi-négligeables pour des liposomes constitués de PC / Cholestérol / DSPE-PEG Maléimides liés covalamment à des Anx5-SH en présence de sérum. Pour réaliser la fixation Ca^{2+} -dépendante de dérivés d'Anx5, il a été nécessaire de mettre au point une composition lipidique qui comprend des PS et reste imperméable lors de la liaison d'Anx5-PEG et lors de la mise en sérum de ces liposomes-Anx5-PEG. De manière surprenante, la composition la plus étanche est PE / PS, une composition très instable en absence d'Anx5-PEG liés en surface des vésicules.

Pour les deux éléments utilisés pour l'imagerie, fluorophores et particules d'oxyde de fer, l'internalisation des composés dans l'intérieur des vésicules a été réalisée par encapsulation passive et cette procédure a été évaluée de façon détaillée pour les particules de maghémite. Comme attendu, la concentration de la solution mère de particules détermine la quantité encapsulée. Les rendements sont plus faibles qu'attendu pour des vésicules électriquement neutres et la présence de lipides anioniques dans la membrane diminue encore l'efficacité d'encapsulation des particules.

La principale limitation à l'encapsulation de particules de maghémite est la déstabilisation des magnétoliposomes, d'autant plus importante qu'il y a des lipides chargés négativement. Il semble que la liaison de lipides en surface des particules, probablement due à une interaction du fer avec le phosphate des lipides, en soit la cause. Une solution à ce problème pourrait être l'utilisation de composés ne possédant pas de phosphates, lipides synthétiques ou polymères formant des membranes, pour encapsuler les particules d'oxyde de fer.

L'association de fluorochromes et de particules d'oxyde de fer aux vésicules, éléments qui donnent un signal en imagerie, a permis de suivre les vecteurs fonctionnalisés par microscopie de fluorescence et par MET. Les liposomes fonctionnalisés grâce au complexe Anx5ZZ-anticorps ont été adressés vers des cibles biologiques. Des vésicules fonctionnalisées encapsulant des particules d'oxyde de fer ont été utilisées pour le ciblage *ex vivo* de thrombus associés à des plaques d'athérome chez le lapin et des liposomes-Anx5ZZ-anticorps fluorescents injectés *in vivo* ont permis d'imager des zones d'inflammation au niveau du cerveau chez le rat.

A terme, les vecteurs liposomaux doivent pouvoir être suivis par IRM ou être utilisés pour transporter des composés thérapeutiques et leur distribution dans organisme vivant lors d'une injection devrait être quantifiée.

Bibliographie

- 1 Voet, D. and Voet, J. G. (1998) Biochimie. (Université, D. B., ed.), Paris, Bruxelles
- 2 Shechter, E. (1990) Biochimie et biophysique des membranes. Masson, Paris
- 3 Lasic, D. D. (1998) Novel applications of liposomes. Trends Biotechnol. **16**, 307-321
- 4 Israelachvili, J. N., Marcelja, S. and Horn, R. G. (1980) Physical principles of membrane organization. Q Rev Biophys. **13**, 121-200
- 5 Israelachvili, J. N., Mitchell, D. J. and Ninham, B. W. (1977) Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. Biochim Biophys Acta. **470**, 185-201
- 6 Lasic, D. D. (1993) Liposome from Physic to application. Elsevier, Amsterdam
- 7 Ulrich, A. S. (2002) Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. Biosci Rep. **22**, 129-150
- 8 Walde, P. and Ichikawa, S. (2001) Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. Biomol Eng. **18**, 143-177
- 9 Arsov, Z. and Quaroni, L. (2007) Direct interaction between cholesterol and phosphatidylcholines in hydrated membranes revealed by ATR-FTIR spectroscopy. Chemistry and physics of lipids. **150**, 35-48
- 10 Ickenstein, L. M., Sandstrom, M. C., Mayer, L. D. and Edwards, K. (2006) Effects of phospholipid hydrolysis on the aggregate structure in DPPC/DSPE-PEG2000 liposome preparations after gel to liquid crystalline phase transition. Biochim Biophys Acta. **1758**, 171-180
- 11 Vrhovnik, K., Kristl, J., Sentjerc, M. and Smid-Korbar, J. (1998) Influence of liposome bilayer fluidity on the transport of encapsulated substance into the skin as evaluated by EPR. Pharmaceutical research. **15**, 525-530
- 12 Brunner, J., Skrabal, P. and Hauser, H. (1976) Single bilayer vesicles prepared without sonication. Physico-chemical properties. Biochim Biophys Acta. **455**, 322-331
- 13 Allen, T. M., Romans, A. Y., Kercret, H. and Segrest, J. P. (1980) Detergent removal during membrane reconstitution. Biochim Biophys Acta. **601**, 328-342
- 14 Jiskoot, W., Teerlink, T., Beuvery, E. C. and Crommelin, D. J. (1986) Preparation of liposomes via detergent removal from mixed micelles by dilution. The effect of bilayer composition and process parameters on liposome characteristics. Pharm Weekbl Sci. **8**, 259-265
- 15 Bangham, A. D., Standish, M. M. and Watkins, J. C. (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. J Mol Biol. **13**, 238-252
- 16 Bangham, A. D., Standish, M. M. and Weissmann, G. (1965) The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations. J Mol Biol. **13**, 253-259
- 17 Szoka, F., Jr. and Papahadjopoulos, D. (1978) Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. Proc Natl Acad Sci U S A. **75**, 4194-4198
- 18 Elorza, B., Elorza, M. A., Frutos, G. and Chantres, J. R. (1993) Characterization of 5-fluorouracil loaded liposomes prepared by reverse-phase evaporation or freezing-thawing extrusion methods: study of drug release. Biochim Biophys Acta. **1153**, 135-142
- 19 Cortesi, R., Esposito, E., Gambarin, S., Telloli, P., Menegatti, E. and Nastruzzi, C. (1999) Preparation of liposomes by reverse-phase evaporation using alternative organic solvents. J Microencapsul. **16**, 251-256
- 20 Szoka, F., Jr. and Papahadjopoulos, D. (1980) Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). Annu Rev Biophys Bioeng. **9**, 467-508

- 21 Li, C. and Deng, Y. (2004) A novel method for the preparation of liposomes: freeze drying of monophasic solutions. *J Pharm Sci.* **93**, 1403-1414
- 22 Castile, J. D. and Taylor, K. M. (1999) Factors affecting the size distribution of liposomes produced by freeze-thaw extrusion. *International journal of pharmaceutics.* **188**, 87-95
- 23 Olson, F., Hunt, C. A., Szoka, F. C., Vail, W. J. and Papahadjopoulos, D. (1979) Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim Biophys Acta.* **557**, 9-23
- 24 Bosworth, M. E., Hunt, C. A. and Pratt, D. (1982) Liposome dialysis for improved size distributions. *J Pharm Sci.* **71**, 806-812
- 25 Zhu, T. F. and Szostak, J. W. (2009) Preparation of large monodisperse vesicles. *PLoS One.* **4**, e5009
- 26 Kolchens, S., Ramaswami, V., Birgenheier, J., Nett, L. and O'Brien, D. F. (1993) Quasi-elastic light scattering determination of the size distribution of extruded vesicles. *Chemistry and physics of lipids.* **65**, 1-10
- 27 Elorza, B., Elorza, M. A., Sainz, M. C. and Chantres, J. R. (1993) Analysis of the particle size distribution and internal volume of liposomal preparations. *J Pharm Sci.* **82**, 1160-1163
- 28 Berger, N., Sachse, A., Bender, J., Schubert, R. and Brandl, M. (2001) Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. *International journal of pharmaceutics.* **223**, 55-68
- 29 Alino, S. F., Garcia-Sanz, M., Irruarrizaga, A., Alfaro, J. and Hernandez, J. (1990) High encapsulation efficiencies in sized liposomes produced by extrusion of dehydration-rehydration vesicles. *J Microencapsul.* **7**, 497-503
- 30 Sou, K., Naito, Y., Endo, T., Takeoka, S. and Tsuchida, E. (2003) Effective encapsulation of proteins into size-controlled phospholipid vesicles using freeze-thawing and extrusion. *Biotechnol Prog.* **19**, 1547-1552
- 31 Mayer, L. D., Hope, M. J. and Cullis, P. R. (1986) Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim Biophys Acta.* **858**, 161-168
- 32 Amselem, S., Gabizon, A. and Barenholz, Y. (1990) Optimization and upscaling of doxorubicin-containing liposomes for clinical use. *J Pharm Sci.* **79**, 1045-1052
- 33 Grabielle-Madelmont, C., Lesieur, S. and Ollivon, M. (2003) Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography. *J Biochem Biophys Methods.* **56**, 189-217
- 34 Ryan, P. J., Davis, M. A. and Melchior, D. L. (1983) The preparation and characterization of liposomes containing X-ray contrast agents. *Biochim Biophys Acta.* **756**, 106-110
- 35 Wasserman, V., Kizelshtein, P., Garbuzenko, O., Kohen, R., Ovadia, H., Tabakman, R. and Barenholz, Y. (2007) The antioxidant tempamine: in vitro antitumor and neuroprotective effects and optimization of liposomal encapsulation and release. *Langmuir.* **23**, 1937-1947
- 36 Haran, G., Cohen, R., Bar, L. K. and Barenholz, Y. (1993) Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases. *Biochim Biophys Acta.* **1151**, 201-215
- 37 Chiu, G. N., Abraham, S. A., Ickenstein, L. M., Ng, R., Karlsson, G., Edwards, K., Wasan, E. K. and Bally, M. B. (2005) Encapsulation of doxorubicin into thermosensitive liposomes via complexation with the transition metal manganese. *J Control Release.* **104**, 271-288

- 38 Fritze, A., Hens, F., Kimpfler, A., Schubert, R. and Peschka-Suss, R. (2006) Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate gradient. *Biochim Biophys Acta.* **1758**, 1633-1640
- 39 Abra, R. M., Bankert, R. B., Chen, F., Egilmez, N. K., Huang, K., Saville, R., Slater, J. L., Sugano, M. and Yokota, S. J. (2002) The next generation of liposome delivery systems: recent experience with tumor-targeted, sterically-stabilized immunoliposomes and active-loading gradients. *J Liposome Res.* **12**, 1-3
- 40 Zhigaltsev, I. V., Maurer, N., Edwards, K., Karlsson, G. and Cullis, P. R. (2006) Formation of drug-arylsulfonate complexes inside liposomes: a novel approach to improve drug retention. *J Control Release.* **110**, 378-386
- 41 De Cuyper, M. and Joniau, M. (1988) Magnetoliposomes. Formation and structural characterization. *Eur Biophys J.* **15**, 311-319
- 42 de Cuyper, M. and Joniau, M. (1990) Potentialities of magnetoliposomes in studying symmetric and asymmetric phospholipid transfer processes. *Biochim Biophys Acta.* **1027**, 172-178
- 43 Bulte, J. W. and De Cuyper, M. (2003) Magnetoliposomes as contrast agents. *Methods Enzymol.* **373**, 175-198
- 44 Soenen, S. J., Hoenen, M. and De Cuyper, M. (2009) Magnetoliposomes: versatile innovative nanocolloids for use in biotechnology and biomedicine. *Nanomed.* **4**, 177-191
- 45 Ioffe, V., Kalendarev, T., Rubinstein, I., Mizerikhin, E. and Tsibulsky, E. (2003) Reversed-phase liquid chromatography of biologically active lipophilic chelators. II. Improvement of chromatographic performance and selected applications in biochemical analysis. *J Chromatogr A.* **987**, 169-180
- 46 Ioffe, V., Kalendarev, T., Rubinstein, I., Zabetski, R. and Zupkovitz, G. (2004) Reversed-phase high-performance liquid chromatography of polar lipids. II. Procedure for a phospholipid derivative of methotrexate. *J Chromatogr A.* **1031**, 249-258
- 47 Ioffe, V., Kalendarev, T., Rubinstein, I. and Zupkovitz, G. (2002) Reverse phase HPLC for polar lipids. Simple and selective HPLC procedures for analysis of phospholipid-based derivatives of valproic acid and various non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Pharm Biomed Anal.* **30**, 391-403
- 48 Kaye, S. B. and Richardson, V. J. (1979) Potential of liposomes as drug-carriers in cancer chemotherapy: a review. *Cancer Chemother Pharmacol.* **3**, 81-85
- 49 Drummond, D. C., Noble, C. O., Hayes, M. E., Park, J. W. and Kirpotin, D. B. (2008) Pharmacokinetics and in vivo drug release rates in liposomal nanocarrier development. *J Pharm Sci.* **97**, 4696-4740
- 50 Allen, T. M. and Cullis, P. R. (2004) Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science.* **303**, 1818-1822
- 51 Torchilin, V. P. (2005) Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov.* **4**, 145-160
- 52 Allen, T. M. (2002) Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer.* **2**, 750-763
- 53 Langer, R. (1998) Drug delivery and targeting. *Nature.* **392**, 5-10
- 54 Lasic, D. D. and Papahadjopoulos, D. (1995) Liposomes revisited. *Science.* **267**, 1275-1276
- 55 Pagano, R. E. and Weinstein, J. N. (1978) Interactions of liposomes with mammalian cells. *Annu Rev Biophys Bioeng.* **7**, 435-468
- 56 Takakura, Y., Nishikawa, M., Yamashita, F. and Hashida, M. (2002) Influence of physicochemical properties on pharmacokinetics of non-viral vectors for gene delivery. *J Drug Target.* **10**, 99-104

- 57 Gregoriadis, G. and Senior, J. (1980) The phospholipid component of small unilamellar liposomes controls the rate of clearance of entrapped solutes from the circulation. *FEBS letters*. **119**, 43-46
- 58 Stuart, L. M. and Ezekowitz, R. A. (2008) Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. *Nat Rev Immunol*. **8**, 131-141
- 59 Devine, D. V. and Marjan, J. M. (1997) The role of immunoproteins in the survival of liposomes in the circulation. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. **14**, 105-131
- 60 Moghimi, S. M. and Hamad, I. (2008) Liposome-mediated triggering of complement cascade. *J Liposome Res*. **18**, 195-209
- 61 Szebeni, J. (1998) The interaction of liposomes with the complement system. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. **15**, 57-88
- 62 Szebeni, J., Baranyi, L., Savay, S., Milosevits, J., Bodo, M., Bunger, R. and Alving, C. R. (2003) The interaction of liposomes with the complement system: in vitro and in vivo assays. *Methods Enzymol*. **373**, 136-154
- 63 Yamada, M., Harashima, H. and Kiwada, H. (1998) Kinetic analysis of the interaction between liposomes and the complement system in rat serum: re-evaluation of size-dependency. *Biol Pharm Bull*. **21**, 964-968
- 64 Moghimi, S. M. and Hunter, A. C. (2001) Recognition by macrophages and liver cells of opsonized phospholipid vesicles and phospholipid headgroups. *Pharmaceutical research*. **18**, 1-8
- 65 Ishida, T., Harashima, H. and Kiwada, H. (2001) Interactions of liposomes with cells in vitro and in vivo: opsonins and receptors. *Curr Drug Metab*. **2**, 397-409
- 66 Senior, J. H. (1987) Fate and behavior of liposomes in vivo: a review of controlling factors. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. **3**, 123-193
- 67 Senior, J. and Gregoriadis, G. (1982) Stability of small unilamellar liposomes in serum and clearance from the circulation: the effect of the phospholipid and cholesterol components. *Life Sci*. **30**, 2123-2136
- 68 Woodle, M. C., Matthey, K. K., Newman, M. S., Hidayat, J. E., Collins, L. R., Redemann, C., Martin, F. J. and Papahadjopoulos, D. (1992) Versatility in lipid compositions showing prolonged circulation with sterically stabilized liposomes. *Biochim Biophys Acta*. **1105**, 193-200
- 69 Du, H., Chandaroy, P. and Hui, S. W. (1997) Grafted poly-(ethylene glycol) on lipid surfaces inhibits protein adsorption and cell adhesion. *Biochim Biophys Acta*. **1326**, 236-248
- 70 Papahadjopoulos, D. and Gabizon, A. (1990) Liposomes designed to avoid the reticuloendothelial system. *Prog Clin Biol Res*. **343**, 85-93
- 71 Klibanov, A. L., Maruyama, K., Torchilin, V. P. and Huang, L. (1990) Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS letters*. **268**, 235-237
- 72 Woodle, M. C. and Lasic, D. D. (1992) Sterically stabilized liposomes. *Biochim Biophys Acta*. **1113**, 171-199
- 73 Allen, T. M., Hansen, C., Martin, F., Redemann, C. and Yau-Young, A. (1991) Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochim Biophys Acta*. **1066**, 29-36
- 74 Allen, T. M. and Hansen, C. (1991) Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose. *Biochim Biophys Acta*. **1068**, 133-141
- 75 Mayhew, E. G., Lasic, D., Babbar, S. and Martin, F. J. (1992) Pharmacokinetics and antitumor activity of epirubicin encapsulated in long-circulating liposomes incorporating a polyethylene glycol-derivatized phospholipid. *Int J Cancer*. **51**, 302-309
- 76 Blume, G. and Cevc, G. (1993) Molecular mechanism of the lipid vesicle longevity in vivo. *Biochim Biophys Acta*. **1146**, 157-168

- 77 Zalipsky, S. (1993) Synthesis of an end-group functionalized polyethylene glycol-lipid conjugate for preparation of polymer-grafted liposomes. *Bioconjugate chemistry*. **4**, 296-299
- 78 Sou, K., Endo, T., Takeoka, S. and Tsuchida, E. (2000) Poly(ethylene glycol)-modification of the phospholipid vesicles by using the spontaneous incorporation of poly(ethylene glycol)-lipid into the vesicles. *Bioconjugate chemistry*. **11**, 372-379
- 79 Ashok, B., Arleth, L., Hjelm, R. P., Rubinstein, I. and Onyuksel, H. (2004) In vitro characterization of PEGylated phospholipid micelles for improved drug solubilization: effects of PEG chain length and PC incorporation. *J Pharm Sci*. **93**, 2476-2487
- 80 Johnsson, M. and Edwards, K. (2001) Phase behavior and aggregate structure in mixtures of dioleoylphosphatidylethanolamine and poly(ethylene glycol)-lipids. *Biophysical journal*. **80**, 313-323
- 81 Sandstrom, M. C., Johansson, E. and Edwards, K. (2007) Structure of mixed micelles formed in PEG-lipid/lipid dispersions. *Langmuir*. **23**, 4192-4198
- 82 Georgiev, G. A., Sarker, D. K., Al-Hanbali, O., Georgiev, G. D. and Lalchev, Z. (2007) Effects of poly (ethylene glycol) chains conformational transition on the properties of mixed DMPC/DMPE-PEG thin liquid films and monolayers. *Colloids Surf B Biointerfaces*. **59**, 184-193
- 83 Hashizaki, K., Taguchi, H., Tsuchiya, K., Sakai, H., Abe, M., Saito, Y. and Ogawa, N. (2006) Calorimetry and cryo-transmission electron microscopic studies of PEG2000-grafted liposomes. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. **54**, 561-563
- 84 Belsito, S., Bartucci, R. and Sportelli, L. (2001) Lipid chain length effect on the phase behaviour of PCs/PEG:2000-PEs mixtures. A spin label electron spin resonance and spectrophotometric study. *Biophys Chem*. **93**, 11-22
- 85 Montesano, G., Bartucci, R., Belsito, S., Marsh, D. and Sportelli, L. (2001) Lipid membrane expansion and micelle formation by polymer-grafted lipids: scaling with polymer length studied by spin-label electron spin resonance. *Biophysical journal*. **80**, 1372-1383
- 86 Belsito, S., Bartucci, R., Montesano, G., Marsh, D. and Sportelli, L. (2000) Molecular and mesoscopic properties of hydrophilic polymer-grafted phospholipids mixed with phosphatidylcholine in aqueous dispersion: interaction of dipalmitoyl N-poly(ethylene glycol)phosphatidylethanolamine with dipalmitoylphosphatidylcholine studied by spectrophotometry and spin-label electron spin resonance. *Biophysical journal*. **78**, 1420-1430
- 87 Edwards, K., Johnsson, M., Karlsson, G. and Silvander, M. (1997) Effect of polyethyleneglycol-phospholipids on aggregate structure in preparations of small unilamellar liposomes. *Biophysical journal*. **73**, 258-266
- 88 Bedu-Addo, F. K., Tang, P., Xu, Y. and Huang, L. (1996) Interaction of polyethyleneglycol-phospholipid conjugates with cholesterol-phosphatidylcholine mixtures: sterically stabilized liposome formulations. *Pharmaceutical research*. **13**, 718-724
- 89 Bedu-Addo, F. K., Tang, P., Xu, Y. and Huang, L. (1996) Effects of polyethyleneglycol chain length and phospholipid acyl chain composition on the interaction of polyethyleneglycol-phospholipid conjugates with phospholipid: implications in liposomal drug delivery. *Pharmaceutical research*. **13**, 710-717
- 90 Kenworthy, A. K., Hristova, K., Needham, D. and McIntosh, T. J. (1995) Range and magnitude of the steric pressure between bilayers containing phospholipids with covalently attached poly(ethylene glycol). *Biophysical journal*. **68**, 1921-1936
- 91 Kenworthy, A. K., Simon, S. A. and McIntosh, T. J. (1995) Structure and phase behavior of lipid suspensions containing phospholipids with covalently attached poly(ethylene glycol). *Biophysical journal*. **68**, 1903-1920
- 92 Marsh, D., Bartucci, R. and Sportelli, L. (2003) Lipid membranes with grafted polymers: physicochemical aspects. *Biochim Biophys Acta*. **1615**, 33-59

- 93 Rex, S., Zuckermann, M. J., Lafleur, M. and Silvius, J. R. (1998) Experimental and Monte Carlo simulation studies of the thermodynamics of polyethyleneglycol chains grafted to lipid bilayers. *Biophysical journal*. **75**, 2900-2914
- 94 Tirosh, O., Barenholz, Y., Katzhendler, J. and Priel, A. (1998) Hydration of polyethylene glycol-grafted liposomes. *Biophysical journal*. **74**, 1371-1379
- 95 Moghimi, S. M. and Szebeni, J. (2003) Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog Lipid Res*. **42**, 463-478
- 96 Mori, A., Klibanov, A. L., Torchilin, V. P. and Huang, L. (1991) Influence of the steric barrier activity of amphipathic poly(ethyleneglycol) and ganglioside GM1 on the circulation time of liposomes and on the target binding of immunoliposomes in vivo. *FEBS letters*. **284**, 263-266
- 97 Moghimi, S. M., Hunter, A. C. and Murray, J. C. (2001) Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev*. **53**, 283-318
- 98 Allen, T. M. (1994) Long-circulating (sterically stabilized) liposomes for targeted drug delivery. *Trends Pharmacol Sci*. **15**, 215-220
- 99 Levchenko, T. S., Rammohan, R., Lukyanov, A. N., Whiteman, K. R. and Torchilin, V. P. (2002) Liposome clearance in mice: the effect of a separate and combined presence of surface charge and polymer coating. *International journal of pharmaceutics*. **240**, 95-102
- 100 Gabizon, A. and Papahadjopoulos, D. (1988) Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **85**, 6949-6953
- 101 Gabizon, A. A. (1992) Selective tumor localization and improved therapeutic index of anthracyclines encapsulated in long-circulating liposomes. *Cancer Res*. **52**, 891-896
- 102 Gabizon, A. and Martin, F. (1997) Polyethylene glycol-coated (pegylated) liposomal doxorubicin. Rationale for use in solid tumours. *Drugs*. **54 Suppl 4**, 15-21
- 103 Maurer, N., Fenske, D. B. and Cullis, P. R. (2001) Developments in liposomal drug delivery systems. *Expert Opin Biol Ther*. **1**, 923-947
- 104 Yuan, F., Leunig, M., Huang, S. K., Berk, D. A., Papahadjopoulos, D. and Jain, R. K. (1994) Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft. *Cancer Res*. **54**, 3352-3356
- 105 Hobbs, S. K., Monsky, W. L., Yuan, F., Roberts, W. G., Griffith, L., Torchilin, V. P. and Jain, R. K. (1998) Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**, 4607-4612
- 106 Hashizume, H., Baluk, P., Morikawa, S., McLean, J. W., Thurston, G., Roberge, S., Jain, R. K. and McDonald, D. M. (2000) Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol*. **156**, 1363-1380
- 107 Charrois, G. J. and Allen, T. M. (2003) Rate of biodistribution of STEALTH liposomes to tumor and skin: influence of liposome diameter and implications for toxicity and therapeutic activity. *Biochim Biophys Acta*. **1609**, 102-108
- 108 Gregoriadis, G. (1992) Liposomes as immunological adjuvants: approaches to immunopotentialization including ligand-mediated targeting to macrophages. *Res Immunol*. **143**, 178-185
- 109 Senior, J., Waters, J. A. and Gregoriadis, G. (1986) Antibody-coated liposomes. The role of non-specific antibody adsorption. *FEBS letters*. **196**, 54-58
- 110 Nobs, L., Buchegger, F., Gurny, R. and Allemann, E. (2004) Current methods for attaching targeting ligands to liposomes and nanoparticles. *J Pharm Sci*. **93**, 1980-1992
- 111 Hansen, C. B., Kao, G. Y., Moase, E. H., Zalipsky, S. and Allen, T. M. (1995) Attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes: evaluation, comparison and optimization of coupling procedures. *Biochim Biophys Acta*. **1239**, 133-144

- 112 Loughrey, H. C., Choi, L. S., Cullis, P. R. and Bally, M. B. (1990) Optimized procedures for the coupling of proteins to liposomes. *Journal of immunological methods*. **132**, 25-35
- 113 Martin, F. J. and Papahadjopoulos, D. (1982) Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles. An improved method for liposome targeting. *J Biol Chem*. **257**, 286-288
- 114 Schwendener, R. A., Trub, T., Schott, H., Langhals, H., Barth, R. F., Groscurth, P. and Hengartner, H. (1990) Comparative studies of the preparation of immunoliposomes with the use of two bifunctional coupling agents and investigation of in vitro immunoliposome-target cell binding by cytofluorometry and electron microscopy. *Biochim Biophys Acta*. **1026**, 69-79
- 115 Maruyama, K. (2000) In vivo targeting by liposomes. *Biol Pharm Bull*. **23**, 791-799
- 116 Loughrey, H., Bally, M. B. and Cullis, P. R. (1987) A non-covalent method of attaching antibodies to liposomes. *Biochim Biophys Acta*. **901**, 157-160
- 117 Klibanov, A. L., Maruyama, K., Beckerleg, A. M., Torchilin, V. P. and Huang, L. (1991) Activity of amphipathic poly(ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavorable for immunoliposome binding to target. *Biochim Biophys Acta*. **1062**, 142-148
- 118 Blume, G., Cevc, G., Crommelin, M. D., Bakker-Woudenberg, I. A., Kluft, C. and Storm, G. (1993) Specific targeting with poly(ethylene glycol)-modified liposomes: coupling of homing devices to the ends of the polymeric chains combines effective target binding with long circulation times. *Biochim Biophys Acta*. **1149**, 180-184
- 119 Moreira, J. N., Ishida, T., Gaspar, R. and Allen, T. M. (2002) Use of the post-insertion technique to insert peptide ligands into pre-formed stealth liposomes with retention of binding activity and cytotoxicity. *Pharmaceutical research*. **19**, 265-269
- 120 ElBayoumi, T. A. and Torchilin, V. P. (2009) Tumor-targeted nanomedicines: enhanced antitumor efficacy in vivo of doxorubicin-loaded, long-circulating liposomes modified with cancer-specific monoclonal antibody. *Clin Cancer Res*. **15**, 1973-1980
- 121 Khalid, M. N., Simard, P., Hoarau, D., Dragomir, A. and Leroux, J. C. (2006) Long circulating poly(ethylene glycol)-decorated lipid nanocapsules deliver docetaxel to solid tumors. *Pharmaceutical research*. **23**, 752-758
- 122 Jestin, E., Mougin-Degraef, M., Faivre-Chauvet, A., Remaud-Le Saec, P., Hindre, F., Benoit, J. P., Chatal, J. F., Barbet, J. and Gestin, J. F. (2007) Radiolabeling and targeting of lipidic nanocapsules for applications in radioimmunotherapy. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. **51**, 51-60
- 123 Gabizon, A., Horowitz, A. T., Goren, D., Tzemach, D., Shmeeda, H. and Zalipsky, S. (2003) In vivo fate of folate-targeted polyethylene-glycol liposomes in tumor-bearing mice. *Clin Cancer Res*. **9**, 6551-6559
- 124 Nishiya, T. and Sloan, S. (1996) Interaction of RGD liposomes with platelets. *Biochemical and biophysical research communications*. **224**, 242-245
- 125 Zhu, J., Xue, J., Guo, Z., Zhang, L. and Marchant, R. E. (2007) Biomimetic glycoliposomes as nanocarriers for targeting P-selectin on activated platelets. *Bioconjugate chemistry*. **18**, 1366-1369
- 126 Bunka, D. H. and Stockley, P. G. (2006) Aptamers come of age - at last. *Nat Rev Microbiol*. **4**, 588-596
- 127 Proske, D., Blank, M., Buhmann, R. and Resch, A. (2005) Aptamers--basic research, drug development, and clinical applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. **69**, 367-374
- 128 Cerchia, L., Giangrande, P. H., McNamara, J. O. and de Franciscis, V. (2009) Cell-specific aptamers for targeted therapies. *Methods Mol Biol*. **535**, 59-78

- 129 McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. and Chiswell, D. J. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*. **348**, 552-554
- 130 Thie, H., Meyer, T., Schirrmann, T., Hust, M. and Dubel, S. (2008) Phage display derived therapeutic antibodies. *Curr Pharm Biotechnol*. **9**, 439-446
- 131 Newton, J. and Deutscher, S. L. (2008) Phage peptide display. *Handb Exp Pharmacol*, 145-163
- 132 Vaughan, T. J., Osbourn, J. K. and Tempest, P. R. (1998) Human antibodies by design. *Nat Biotechnol*. **16**, 535-539
- 133 Sarikaya, M., Tamerler, C., Jen, A. K., Schulten, K. and Baneyx, F. (2003) Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. *Nat Mater*. **2**, 577-585
- 134 Mancini, N., Carletti, S., Perotti, M., Canducci, F., Mammarella, M., Sampaolo, M. and Burioni, R. (2004) Phage display for the production of human monoclonal antibodies against human pathogens. *New Microbiol*. **27**, 315-328
- 135 Colcher, D., Pavlinkova, G., Beresford, G., Booth, B. J., Choudhury, A. and Batra, S. K. (1998) Pharmacokinetics and biodistribution of genetically-engineered antibodies. *Q J Nucl Med*. **42**, 225-241
- 136 Filpula, D. (2007) Antibody engineering and modification technologies. *Biomol Eng*. **24**, 201-215
- 137 Beckman, R. A., Weiner, L. M. and Davis, H. M. (2007) Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors. *Cancer*. **109**, 170-179
- 138 Honegger, A. (2008) Engineering antibodies for stability and efficient folding. *Handb Exp Pharmacol*, 47-68
- 139 Holliger, P. and Hudson, P. J. (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol*. **23**, 1126-1136
- 140 Carter, P. (2001) Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer*. **1**, 118-129
- 141 Vingerhoeds, M. H., Storm, G. and Crommelin, D. J. (1994) Immunoliposomes in vivo. *Immunomethods*. **4**, 259-272
- 142 Martin, D. W., Jr. and Gelfand, E. W. (1981) Biochemistry of diseases of immunodevelopment. *Annu Rev Biochem*. **50**, 845-877
- 143 Guo, X. and Szoka, F. C., Jr. (2003) Chemical approaches to triggerable lipid vesicles for drug and gene delivery. *Acc Chem Res*. **36**, 335-341
- 144 Torchilin, V. (2009) Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. *Eur J Pharm Biopharm*. **71**, 431-444
- 145 Karanth, H. and Murthy, R. S. (2007) pH-sensitive liposomes--principle and application in cancer therapy. *J Pharm Pharmacol*. **59**, 469-483
- 146 Drummond, D. C., Zignani, M. and Leroux, J. (2000) Current status of pH-sensitive liposomes in drug delivery. *Prog Lipid Res*. **39**, 409-460
- 147 Simoes, S., Moreira, J. N., Fonseca, C., Duzgunes, N. and de Lima, M. C. (2004) On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Adv Drug Deliv Rev*. **56**, 947-965
- 148 Venugopalan, P., Jain, S., Sankar, S., Singh, P., Rawat, A. and Vyas, S. P. (2002) pH-sensitive liposomes: mechanism of triggered release to drug and gene delivery prospects. *Pharmazie*. **57**, 659-671
- 149 Andresen, T. L., Jensen, S. S. and Jorgensen, K. (2005) Advanced strategies in liposomal cancer therapy: problems and prospects of active and tumor specific drug release. *Prog Lipid Res*. **44**, 68-97
- 150 Merlin, J. L. (1991) In vitro evaluation of the association of thermosensitive liposome-encapsulated doxorubicin with hyperthermia. *Eur J Cancer*. **27**, 1031-1034

- 151 Iga, K., Hamaguchi, N., Igari, Y., Ogawa, Y., Gotoh, K., Ootsu, K., Toguchi, H. and Shimamoto, T. (1991) Enhanced antitumor activity in mice after administration of thermosensitive liposome encapsulating cisplatin with hyperthermia. *J Pharmacol Exp Ther.* **257**, 1203-1207
- 152 Gaber, M. H., Hong, K., Huang, S. K. and Papahadjopoulos, D. (1995) Thermosensitive sterically stabilized liposomes: formulation and in vitro studies on mechanism of doxorubicin release by bovine serum and human plasma. *Pharmaceutical research.* **12**, 1407-1416
- 153 Kong, G. and Dewhirst, M. W. (1999) Hyperthermia and liposomes. *Int J Hyperthermia.* **15**, 345-370
- 154 Maruyama, K., Unezaki, S., Takahashi, N. and Iwatsuru, M. (1993) Enhanced delivery of doxorubicin to tumor by long-circulating thermosensitive liposomes and local hyperthermia. *Biochim Biophys Acta.* **1149**, 209-216
- 155 Kono, K. (2001) Thermosensitive polymer-modified liposomes. *Adv Drug Deliv Rev.* **53**, 307-319
- 156 Kono, K., Nakai, R., Morimoto, K. and Takagishi, T. (1999) Thermosensitive polymer-modified liposomes that release contents around physiological temperature. *Biochim Biophys Acta.* **1416**, 239-250
- 157 Gerke, V., Creutz, C. E. and Moss, S. E. (2005) Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**, 449-461
- 158 Huber, R., Romisch, J. and Paques, E. P. (1990) The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *Embo J.* **9**, 3867-3874
- 159 Concha, N. O., Head, J. F., Kaetzel, M. A., Dedman, J. R. and Seaton, B. A. (1993) Rat annexin V crystal structure: Ca(2+)-induced conformational changes. *Science.* **261**, 1321-1324
- 160 Mosser, G., Ravanat, C., Freyssinet, J. M. and Brisson, A. (1991) Sub-domain structure of lipid-bound annexin-V resolved by electron image analysis. *J Mol Biol.* **217**, 241-245
- 161 Voges, D., Berendes, R., Burger, A., Demange, P., Baumeister, W. and Huber, R. (1994) Three-dimensional structure of membrane-bound annexin V. A correlative electron microscopy-X-ray crystallography study. *J Mol Biol.* **238**, 199-213
- 162 Oling, F., Bergsma-Schutter, W. and Brisson, A. (2001) Trimers, dimers of trimers, and trimers of trimers are common building blocks of annexin a5 two-dimensional crystals. *J Struct Biol.* **133**, 55-63
- 163 Oling, F., Santos, J. S., Govorukhina, N., Mazeres-Dubut, C., Bergsma-Schutter, W., Oostergetel, G., Keegstra, W., Lambert, O., Lewit-Bentley, A. and Brisson, A. (2000) Structure of membrane-bound annexin A5 trimers: a hybrid cryo-EM - X-ray crystallography study. *J Mol Biol.* **304**, 561-573
- 164 Tait, J. F., Gibson, D. and Fujikawa, K. (1989) Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the lipocortin family. *J Biol Chem.* **264**, 7944-7949
- 165 Reviakine, I. I., Bergsma-Schutter, W. and Brisson, A. (1998) Growth of Protein 2-D Crystals on Supported Planar Lipid Bilayers Imaged in Situ by AFM. *J Struct Biol.* **121**, 356-361
- 166 Richter, R. P. and Brisson, A. R. (2005) Following the formation of supported lipid bilayers on mica: a study combining AFM, QCM-D, and ellipsometry. *Biophysical journal.* **88**, 3422-3433

- 167 Richter, R. P., Lai-Kee-Him, J., Tessier, B., Tessier, C. and Brisson, A. R. (2005) On the kinetics of adsorption and two-dimensional self-assembly of annexin A5 on supported lipid bilayers. *Biophysical journal*. **89**, 3372-3385
- 168 Devaux, P. F. (1991) Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry*. **30**, 1163-1173
- 169 Bevers, E. M., Comfurius, P. and Zwaal, R. F. (1983) Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochim Biophys Acta*. **736**, 57-66
- 170 Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L. and Henson, P. M. (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*. **148**, 2207-2216
- 171 Dachary-Prigent, J., Freyssinet, J. M., Pasquet, J. M., Carron, J. C. and Nurden, A. T. (1993) Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation: a flow cytometry study showing a role for free sulfhydryl groups. *Blood*. **81**, 2554-2565
- 172 Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T. and van Oers, M. H. (1994) Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. **84**, 1415-1420
- 173 van Tilborg, G. A., Mulder, W. J., Chin, P. T., Storm, G., Reutelingsperger, C. P., Nicolay, K. and Strijkers, G. J. (2006) Annexin A5-conjugated quantum dots with a paramagnetic lipidic coating for the multimodal detection of apoptotic cells. *Bioconjugate chemistry*. **17**, 865-868
- 174 Blankenberg, F. G., Katsikis, P. D., Tait, J. F., Davis, R. E., Naumovski, L., Ohtsuki, K., Kopiwoda, S., Abrams, M. J., Darkes, M., Robbins, R. C., Maecker, H. T. and Strauss, H. W. (1998) In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**, 6349-6354
- 175 Blankenberg, F. G., Katsikis, P. D., Tait, J. F., Davis, R. E., Naumovski, L., Ohtsuki, K., Kopiwoda, S., Abrams, M. J. and Strauss, H. W. (1999) Imaging of apoptosis (programmed cell death) with ^{99m}Tc annexin V. *J Nucl Med*. **40**, 184-191
- 176 Narula, J., Acio, E. R., Narula, N., Samuels, L. E., Fyfe, B., Wood, D., Fitzpatrick, J. M., Raghunath, P. N., Tomaszewski, J. E., Kelly, C., Steinmetz, N., Green, A., Tait, J. F., Leppo, J., Blankenberg, F. G., Jain, D. and Strauss, H. W. (2001) Annexin-V imaging for noninvasive detection of cardiac allograft rejection. *Nat Med*. **7**, 1347-1352
- 177 Thimister, P. W., Hofstra, L., Liem, I. H., Boersma, H. H., Kemerink, G., Reutelingsperger, C. P. and Heidendal, G. A. (2003) In vivo detection of cell death in the area at risk in acute myocardial infarction. *J Nucl Med*. **44**, 391-396
- 178 Tanaka, K., Einaga, K., Tsuchiyama, H., Tait, J. F. and Fujikawa, K. (1996) Preparation and characterization of a disulfide-linked bioconjugate of annexin V with the B-chain of urokinase: an improved fibrinolytic agent targeted to phospholipid-containing thrombi. *Biochemistry*. **35**, 922-929
- 179 Kenis, H., van Genderen, H., Bennaghmouch, A., Rinia, H. A., Frederik, P., Narula, J., Hofstra, L. and Reutelingsperger, C. P. (2004) Cell surface-expressed phosphatidylserine and annexin A5 open a novel portal of cell entry. *J Biol Chem*. **279**, 52623-52629
- 180 Le Gac, S., Vermes, I. and van den Berg, A. (2006) Quantum dots based probes conjugated to annexin V for photostable apoptosis detection and imaging. *Nano Lett*. **6**, 1863-1869
- 181 Schellenberger, E. A., Sosnovik, D., Weissleder, R. and Josephson, L. (2004) Magneto/optical annexin V, a multimodal protein. *Bioconjugate chemistry*. **15**, 1062-1067

- 182 van Tilborg, G. A., Mulder, W. J., Deckers, N., Storm, G., Reutelingsperger, C. P., Strijkers, G. J. and Nicolay, K. (2006) Annexin A5-functionalized bimodal lipid-based contrast agents for the detection of apoptosis. *Bioconjugate chemistry*. **17**, 741-749
- 183 Stocker, M., Pardo, A., Hetzel, C., Reutelingsperger, C., Fischer, R. and Barth, S. (2008) Eukaryotic expression and secretion of EGFP-labeled annexin A5. *Protein expression and purification*. **58**, 325-331
- 184 Schmitz-Valckenberg, S., Guo, L., Maass, A., Cheung, W., Vugler, A., Moss, S. E., Munro, P. M., Fitzke, F. W. and Cordeiro, M. F. (2008) Real-time in vivo imaging of retinal cell apoptosis after laser exposure. *Investigative ophthalmology & visual science*. **49**, 2773-2780
- 185 Sosnovik, D. E., Nahrendorf, M., Panizzi, P., Matsui, T., Aikawa, E., Dai, G., Li, L., Reynolds, F., Dorn, G. W., 2nd, Weissleder, R., Josephson, L. and Rosenzweig, A. (2009) Molecular MRI detects low levels of cardiomyocyte apoptosis in a transgenic model of chronic heart failure. *Circulation*. **2**, 468-475
- 186 Chen, C., Huang, Q. L., Jiang, S. H., Pan, X. and Hua, Z. C. (2006) Immobilized protein ZZ, an affinity tool for immunoglobulin isolation and immunological experimentation. *Biotechnol Appl Biochem*. **45**, 87-92
- 187 Zhao, Y., Benita, Y., Lok, M., Kuipers, B., van der Ley, P., Jiskoot, W., Hennink, W. E., Crommelin, D. J. and Oosting, R. S. (2005) Multi-antigen immunization using IgG binding domain ZZ as carrier. *Vaccine*. **23**, 5082-5090
- 188 Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-685
- 189 Rodahl, M., Hook, F., Krozer, A., Brzezinski, P. and Kasemo, B. (1995) QUARTZ-CRYSTAL MICROBALANCE SETUP FOR FREQUENCY AND Q-FACTOR MEASUREMENTS IN GASEOUS AND LIQUID ENVIRONMENTS. *Review of Scientific Instruments*. **66**, 3924-3930
- 190 Sauerbrey. (1959) Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei*. **155**, 206-222
- 191 Rouser, G., Fkeischer, S. and Yamamoto, A. (1970) Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*. **5**, 494-496
- 192 Bérat, R., Rémy-Zolghadry, M., Gounou, C., Manigand, C., Tan, S., Saltó, C., Arenas, E., Bordenave, L., and Brisson, A. (2007) Peptide-presenting two-dimensional protein matrix on supported lipid bilayers: an efficient platform for cell adhesion. *BioInterphases*. **2**, 165-172
- 193 Brisson, A. (2005) A device for binding a target entity to a bait entity and detection method using the same. (bureau, i., ed.)^eds.)
- 194 Maruyama, K., Takizawa, T., Yuda, T., Kennel, S. J., Huang, L. and Iwatsuru, M. (1995) Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipathic poly(ethylene glycol)s conjugated at their distal terminals to monoclonal antibodies. *Biochim Biophys Acta*. **1234**, 74-80
- 195 Aida, S. M. a. H. (1978) Hydrolysis of some N-alkylmaleimides. *J. Chem. Soc.*, 1277 - 1280
- 196 Allen, T. M., Brandeis, E., Hansen, C. B., Kao, G. Y. and Zalipsky, S. (1995) A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. **1237**, 99-108
- 197 Kirpotin, D., Park, J. W., Hong, K., Zalipsky, S., Li, W. L., Carter, P., Benz, C. C. and Papahadjopoulos, D. (1997) Sterically stabilized anti-HER2 immunoliposomes: design and targeting to human breast cancer cells in vitro. *Biochemistry*. **36**, 66-75

- 198 Mercadal, M., Domingo, J. C., Petriz, J., Garcia, J. and de Madariaga, M. A. (1999) A novel strategy affords high-yield coupling of antibody to extremities of liposomal surface-grafted PEG chains. *Biochim Biophys Acta*. **1418**, 232-238
- 199 Awasthi, V. D., Garcia, D., Goins, B. A. and Phillips, W. T. (2003) Circulation and biodistribution profiles of long-circulating PEG-liposomes of various sizes in rabbits. *International journal of pharmaceutics*. **253**, 121-132
- 200 Mercadal, M., Carrion, C., Domingo, J. C., Petriz, J., Garcia, J. and de Madariaga, M. A. (1998) Preparation of immunoliposomes directed against CD34 antigen as target. *Biochim Biophys Acta*. **1371**, 17-23
- 201 Mercadal, M., Domingo, J. C., Petriz, J., Garcia, J. and de Madariaga, M. A. (2000) Preparation of immunoliposomes bearing poly(ethylene glycol)-coupled monoclonal antibody linked via a cleavable disulfide bond for ex vivo applications. *Biochim Biophys Acta*. **1509**, 299-310
- 202 Nielsen, U. B., Kirpotin, D. B., Pickering, E. M., Hong, K., Park, J. W., Refaat Shalaby, M., Shao, Y., Benz, C. C. and Marks, J. D. (2002) Therapeutic efficacy of anti-ErbB2 immunoliposomes targeted by a phage antibody selected for cellular endocytosis. *Biochim Biophys Acta*. **1591**, 109-118
- 203 Van Beers, B. E., Sempoux, C., Materne, R., Delos, M. and Smith, A. M. (2001) Biodistribution of ultrasmall iron oxide particles in the rat liver. *J Magn Reson Imaging*. **13**, 594-599
- 204 Plassat, V., Martina, M. S., Barratt, G., Menager, C. and Lesieur, S. (2007) Sterically stabilized superparamagnetic liposomes for MR imaging and cancer therapy: pharmacokinetics and biodistribution. *International journal of pharmaceutics*. **344**, 118-127
- 205 Martina, M. S., Fortin, J. P., Menager, C., Clement, O., Barratt, G., Grabielle-Madelmont, C., Gazeau, F., Cabuil, V. and Lesieur, S. (2005) Generation of superparamagnetic liposomes revealed as highly efficient MRI contrast agents for in vivo imaging. *Journal of the American Chemical Society*. **127**, 10676-10685
- 206 Lesieur, S., Grabielle-Madelmont, C., Menager, C., Cabuil, V., Dadhi, D., Pierrot, P. and Edwards, K. (2003) Evidence of surfactant-induced formation of transient pores in lipid bilayers by using magnetic-fluid-loaded liposomes. *Journal of the American Chemical Society*. **125**, 5266-5267
- 207 Sabate, R., Barnadas-Rodriguez, R., Callejas-Fernandez, J., Hidalgo-Alvarez, R. and Estelrich, J. (2008) Preparation and characterization of extruded magnetoliposomes. *International journal of pharmaceutics*. **347**, 156-162
- 208 Martina, M. S., Nicolas, V., Wilhelm, C., Menager, C., Barratt, G. and Lesieur, S. (2007) The in vitro kinetics of the interactions between PEG-ylated magnetic-fluid-loaded liposomes and macrophages. *Biomaterials*. **28**, 4143-4153
- 209 Giri, J., Guha Thakurta, S., Bellare, J., Kumar Nigam, A. and Bahadur, D. (2005) Preparation and characterization of phospholipid stabilized uniform sized magnetite nanoparticles. *J. Magn. Mater.* **293**, 62-68
- 210 McDermott, M., Wakelam, M. J. and Morris, A. J. (2004) Phospholipase D. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. **82**, 225-253
- 211 Ulbrich-Hofmann, R., Lerchner, A., Oblozinsky, M. and Bezakova, L. (2005) Phospholipase D and its application in biocatalysis. *Biotechnology letters*. **27**, 535-544
- 212 Doig, S., D., and Diks, R. M. M. (2003) Toolbox for modification of the lecithin headgroup. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. **105**, 368-376
- 213 Piazza, G., J., Marmer, W., N., . (2007) Conversion of Phosphatidylcholine to Phosphatidylglycerol with Phospholipase D and Glycerol. *J Amer Oil Chem Soc*. **84**, 645-651

- 214 Wang, P., Schuster, M., Wang, Y., Wong, C., (1993) Synthesis of Phospholipid-Inhibitor Conjugates by Enzymatic Transphosphatidylation with Phospholipase D. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 10487-10491
- 215 Dippe, M., Mrestani-Klaus, C., Schierhorn, A. and Ulbrich-Hofmann, R. (2008) Phospholipase D-catalyzed synthesis of new phospholipids with polar head groups. *Chemistry and physics of lipids.* **152**, 71-77
- 216 Ichikawa, S. and Walde, P. (2004) Phospholipase D-mediated aggregation, fusion, and precipitation of phospholipid vesicles. *Langmuir.* **20**, 941-949
- 217 Holland, J. W., Cullis, P. R. and Madden, T. D. (1996) Poly(ethylene glycol)-lipid conjugates promote bilayer formation in mixtures of non-bilayer-forming lipids. *Biochemistry.* **35**, 2610-2617
- 218 Holland, J. W., Hui, C., Cullis, P. R. and Madden, T. D. (1996) Poly(ethylene glycol)-lipid conjugates regulate the calcium-induced fusion of liposomes composed of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine. *Biochemistry.* **35**, 2618-2624
- 219 Feng, B., Tomizawa, K., Michiue, H., Miyatake, S., Han, X. J., Fujimura, A., Seno, M., Kirihata, M. and Matsui, H. (2009) Delivery of sodium borocaptate to glioma cells using immunoliposome conjugated with anti-EGFR antibodies by ZZ-His. *Biomaterials.* **30**, 1746-1755
- 220 Yoshino, T. and Matsunaga, T. (2006) Efficient and stable display of functional proteins on bacterial magnetic particles using mms13 as a novel anchor molecule. *Applied and environmental microbiology.* **72**, 465-471
- 221 Jahns, A. C., Haverkamp, R. G. and Rehm, B. H. (2008) Multifunctional inorganic-binding beads self-assembled inside engineered bacteria. *Bioconjugate chemistry.* **19**, 2072-2080
- 222 Volpers, C., Thirion, C., Biermann, V., Hussmann, S., Kewes, H., Dunant, P., von der Mark, H., Herrmann, A., Kochanek, S. and Lochmuller, H. (2003) Antibody-mediated targeting of an adenovirus vector modified to contain a synthetic immunoglobulin g-binding domain in the capsid. *Journal of virology.* **77**, 2093-2104
- 223 Mottershead, D. G., Alftan, K., Ojala, K., Takkinen, K. and Oker-Blom, C. (2000) Baculoviral display of functional scFv and synthetic IgG-binding domains. *Biochemical and biophysical research communications.* **275**, 84-90
- 224 Brockelbank, J. A., Peters, V. and Rehm, B. H. (2006) Recombinant *Escherichia coli* strain produces a ZZ domain displaying biopolyester granules suitable for immunoglobulin G purification. *Applied and environmental microbiology.* **72**, 7394-7397
- 225 Nizard, P., Liger, D., Gaillard, C. and Gillet, D. (1998) Anchoring antibodies to membranes using a diphtheria toxin T domain-ZZ fusion protein as a pH sensitive membrane anchor. *FEBS letters.* **433**, 83-88

