



HAL
open science

Sondes moléculaires multifonctionnelles pour l'imagerie de fluorescence de membranes cellulaires

Rémy Kreder

► **To cite this version:**

Rémy Kreder. Sondes moléculaires multifonctionnelles pour l'imagerie de fluorescence de membranes cellulaires. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université de Strasbourg, 2015. Français. NNT : 2015STRAJ006 . tel-01357734

HAL Id: tel-01357734

<https://theses.hal.science/tel-01357734>

Submitted on 30 Aug 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE DE STRASBOURG



École Doctorale
des Sciences de la Vie
et de la Santé
STRASBOURG

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Chimie biologique

Domaine : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

par

Rémy KREDER

SONDES MOLECULAIRES MULTIFONCTIONNELLES POUR L'IMAGERIE DE FLUORESCENCE DE MEMBRANES CELLULAIRES

Soutenue le 6 mars 2015 devant la commission d'examen :

Pr. Alain BURGER

Rapporteur externe

Pr. Antony ROMIEU

Rapporteur externe

Pr. Alain WAGNER

Rapporteur interne

Dr. Andrey KLYMCHENKO

Directeur de thèse

UMR CNRS 7213, Faculté de Pharmacie, ILLKIRCH

Tout d'abord, je tiens à remercier le Dr. Andrey Klymchenko pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail de thèse et d'avoir cru en moi jusqu'à la fin. Je le remercie aussi pour son support tout au long de ma thèse ainsi que pour ses précieux conseils qui m'ont permis de mener à bien ce projet. Encore merci pour tout Andrey.

Je voulais ensuite remercier mes collègues chimistes présents ou passés ; Mayeul, Andréas, Ievgen, Bogdan, Yosuke, Ghislaine pour ne citer qu'eux. Merci à vous de faire du labo de chimie ce qu'il est et pour votre aide et vos conseils éclairés. J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec vous. Mayeul, j'espère que mes petites questions ne te manqueront pas trop ! Je n'oublie pas non plus mes collègues biologistes et biophysiciens, trop nombreux pour les citer tous, dont l'aide m'a été des plus précieuses pour toutes mes manip cellulaires et/ou spectroscopiques. Sans vous je n'y serai jamais arrivé, merci pour tout. Merci aussi à mes co-bureaux (si je peux les appeler ainsi), Noémie, Vanille, Avisek et les autres de passage, pour ces bons moments passés entre deux expériences. Merci à nos hommes de l'ombre, et spécialement à Nicolas et Romain, sans qui tout cela n'aurait pas été possible, merci pour votre aide, vos conseils et votre dévouement à toujours voler à notre secours pour nous sortir d'une mauvaise passe. Je remercie aussi toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail, Luliia et son labo avec qui j'ai partagé une partie de celui-ci, aux autres équipes de l'UMR que je suis allé consulter pour des avis et des conseils, parfois plus (merci Guillaume pour les cellules !) et à tous ceux que j'ai pu oublier ici.

Je terminerai en remerciant les « copains du RU », pour ces soirées, apéros, restos, l'initiation au Mōlkky, tournois Mario Kart et j'en passe. Notre petit rituel de l'horoscope du 20 min va me manquer, vous êtes les meilleurs ! A mes chers parents, que je n'oublie pas, je ne saurai trouver les mots justes pour leur témoigner toute ma gratitude, sans vous je ne serai jamais arrivé jusque-là. Merci pour votre soutien et votre amour indéfectible et inconditionnel, merci pour tout !

-R

I. INTRODUCTION	13
1. La membrane plasmique	14
1.1. Description	14
1.2. Composition	15
1.3. L'asymétrie transmembranaire	16
1.4. Les rôles de la membrane	17
1.4.1. La communication intra- et intercellulaire	17
1.4.2. L'adhérence cellulaire	20
1.4.3. Transport	21
2. Les différents modèles d'organisation membranaire	23
2.1. Les anciens modèles membranaires et le modèle actuel	23
2.2. La transition de phase dans les membranes lipidiques	25
2.3. La théorie des radeaux lipidiques	26
3. Les membranes modèles	28
3.1. Les films ou « self-assembled monolayers » (SAMs)	29
3.2. Les vésicules unilamellaires	31
3.3. Les vésicules multi-lamellaires	32
3.4. Les bicouches supportées	33
4. Les techniques d'analyses de la membrane plasmique	35
4.1. Les DRMs	35
4.2. La spectrométrie de masse	36
4.3. La microscopie de force atomique	37
4.4. La résonance magnétique nucléaire	38
4.5. Spectroscopie et microscopie de fluorescence	39
5. Les sondes fluorescentes pour l'étude de la membrane plasmique	45
5.1. Les sondes lipidiques	47
5.2. Les sondes sélectives d'une phase, Lo ou Ld	47
5.2.1. Les dérivés lipidiques	49
5.2.2. Les dérivés lipophiliques	53
5.3. Les sondes sensibles à leur environnement	55
5.3.1. Les sondes solvatochromes	56
5.3.2. Les rotors moléculaires	59
II. RESULTATS ET DISCUSSIONS	65
1. Nouveaux dérivés Nile Red	65
1.1. Nouvelle sonde Nile Red et FRET-Quencher spécifique aux phases Ld	65
1.2. Nouvelles sondes Nile Red fixables et compatibles avec du sérum	102

2. Sondes spécifiques à un récepteur donné	115
2.1. Sonde fluorescente basée sur Nile Red à effet « turn-on » pour visualiser et quantifier des récepteurs couplés aux protéines G dans des cellules vivantes	115
2.2. Sonde membranaire liée à un récepteur	119
3. De nouvelles sondes membranaires bleues et rouge lointain	127
3.1. Sondes membranaires fluorogènes bleues basées sur le fluorophore 3-méthoxychromone	127
3.2. Sondes membranaires fluorogènes rouge lointain basées sur le fluorophore squaraine	147
III. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	171
IV. MATERIELS ET METHODES	179
1. Synthèse chimique	179
1.1. Dérivé Nile Red et Black Hole Quencher	180
1.2. Dérivé squaraine, SQ12S, dSQ12S et SQ10S	201
1.3. Dérivés 3-hydroxyflavone (F2N12SM) et 3-hydroxychromone (FC12SM)	210
2. Matériels	212
3. Méthodes	213
3.1. Préparation des vésicules lipidiques	213
3.1.1. Préparation de vésicules unilamellaires larges (LUVs)	213
3.1.2. Préparation de vésicules unilamellaires géantes (GUVs)	215
3.2. Préparation des cellules et traitements	216
3.2.1. Culture cellulaire	217
3.2.2. 2.1.1 Préparation des suspensions cellulaires pour la spectroscopie de fluorescence	217
3.2.3. 2.2 Préparation des échantillons de cellules pour la microscopie de fluorescence	218
3.3. Mesures physiques	219
3.3.1. 3.1. Spectroscopie optique	219
3.3.2. Microscopie de fluorescence	220
V. RÉFÉRENCES	227
VI. ANNEXE	247

Liste des abréviations

AFM	Atomic Force Microscopy
ACTH	Hormone corticotrope
CBT	Carbétocine
Chol	Cholestérol
CCM	Chromatographie sur couche mince
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOPC	Dioléoylphosphatidylcholine
DOPS	Dioléoylphosphatidylsérine
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DPPE	Dipalmitoylphosphatidyléthanolamine
DRM	Detergent Resistant Membrane
DSPC	Distéarylphosphatidylcholine
DSPE	Distéarylphosphatidyléthanolamine
ϵ	Coefficient d'extinction molaire
FRET	Förster Resonance Energy Transfer
GFP	Green Fluorescent Protein (BFP ; blue, YFP ; yellow, etc.)
GPMVs	Giant Plasma Membrane Vesicles
GUVs	Giant Unilamellar Vesicles
LAH	Longues chaînes hydrocarbures
LUVs	Large Unilamellar Vesicles
Ld	Phase liquide désordonnée
Lo	Phase liquide ordonnée
NR	Nile Red
PAH	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
PEG	Polyéthylène glycol
QY	Rendement quantique
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G
RE	Réticulum Endoplasmique

SM	Sphingomyéline
SQ	Squaraine
TA	Température ambiante
THF	Tétrahydrofuranne
T_m	Température de transition de phase
λ_{abs}	Longueur d'onde d'absorption
λ_{em}	Longueur d'onde d'émission
λ_{em}	Longueur d'onde d'excitation

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

Une cellule, par définition, est la plus petite entité capable de vie, elle est la base même de chaque être vivant sur la planète, animal ou végétal. Il existe deux grands types de cellules, les cellules procaryotes et eucaryotes. Les cellules procaryotes sont des formes de vie plus simples, des êtres unicellulaires comme les bactéries ou les archaea, quant aux cellules eucaryotes, elles sont la sous-unité de base des formes de vie plus évoluées comme les animaux, les plantes, les champignons ou encore les protistes (groupe regroupant tous les eucaryotes n'appartenant pas aux autres groupes d'eucaryotes). Ce qui différencie les eucaryotes des procaryotes, dont le matériel génétique flotte librement dans le cytoplasme, est la présence d'un noyau dans la cellule, regroupant l'essentiel du matériel génétique de celle-ci. De plus ces dernières possèdent une structure plus complexe avec la présence de différents organites (noyau, mitochondries, reticulum endoplasmique, lysosomes et ribosomes) indispensables à la vie. Ces différents organites se retrouvent dans le cytoplasme de la cellule et sont protégés du milieu extérieur par une barrière hydrophobe appelée membrane plasmique.

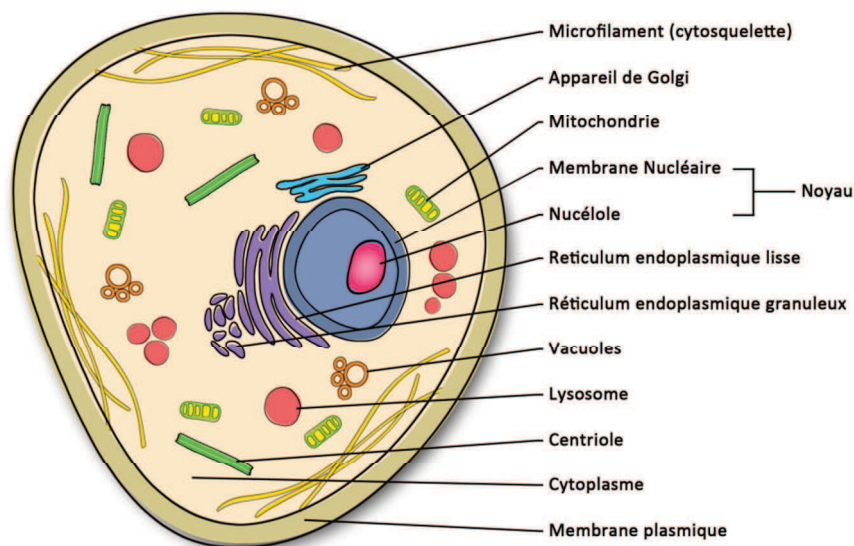


Figure 1 : Représentation schématique d'une cellule eucaryote.

1. La membrane plasmique

1.1. Description

La membrane plasmique joue un rôle très important dans la vie de la cellule, elle entoure le cytoplasme d'une cellule vivante, séparant physiquement les constituants intracellulaires de l'environnement extracellulaire. Elle maintient la forme de la cellule en ancrant le cytosquelette et grâce à sa perméabilité sélective, elle contrôle le flux hors et dans la cellule des substances nécessaire à la vie de celle-ci. Elle est constituée de deux feuillets lipidiques distincts, le feuillet externe et le feuillet interne. Les deux feuillets se font face par leur pôle hydrophobe et des molécules intrinsèques (protéines, récepteurs, canaux, etc ...) ainsi que du cholestérol (chez les eucaryotes et dans le monde animal uniquement, les phytostérols jouant le même rôle chez les plantes) se retrouvent entre les molécules de phospholipides. Sur les faces externes, constituées par les têtes polaires hydrophiles des phospholipides, viennent se fixer des protéines extrinsèques sur lesquelles vont venir se fixer le cytosquelette par exemple (du côté intracellulaire). Le feuillet externe peut aussi se retrouver recouvert de glycocalyx (reconnaissance intercellulaire, composée de glycoprotéines et de protéoglycanes) ou de dérivés glucidiques. Les lipides et les protéines sont maintenus ensemble par des interactions non-covalentes (liaisons hydrogènes, forces de van der Waals ...) alors que les sucres vont être rattachés du côté extérieur de la membrane par des liaisons covalentes aux protéines ou aux lipides.

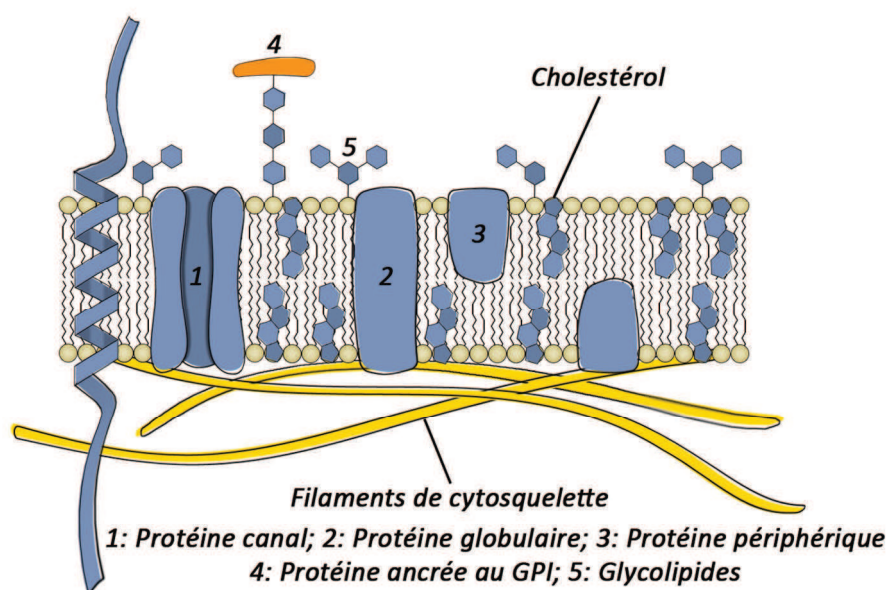


Figure 2 : Représentation schématique d'une membrane plasmique selon le modèle de mosaïque fluide.

1.2. Composition

La membrane plasmique est composée de plusieurs centaines d'espèces de phospholipides qui diffèrent par la longueur de la chaîne alkyle, leur nombre d'insaturations ou encore la structure de leur tête polaire (Mouritsen, 2011). Ces phospholipides sont synthétisés au niveau du réticulum endoplasmique (RE) de la cellule et sont définis comme des molécules amphiphiles, avec une tête polaire hydrophile et une chaîne alkyle hydrophobe.

Trois types majoritaires de lipides composent les membranes biologiques :

Les phosphoglycérides :

Lipide dominant dans les cellules eucaryotes, ayant un squelette diglycéride (deux résidus d'acide gras liés covalamment à un résidu glycérol) portant un résidu de l'acide phosphatidique estérifié par, une choline (phosphatidylcholine, PC), une sérine (phosphatidylsérine, PS), une éthanolamine (phosphatidyléthanolamine, PE) (Fig. 3) ou encore un inositol (phosphatidylinositol, PI). Les dérivés choline sont le composant majoritaire des lipides membranaires et représentent 50% du total des lipides d'une membrane. Les dérivés PC possèdent généralement une insaturation dans leurs chaînes alkyles.

Les sphingolipides :

Les sphingolipides sont aussi un composant important de la membrane cellulaire, avec le céramide comme partie hydrophobe. La sphingomyéline (SM) et les glycosphingolipides sont les représentants majoritaires des sphingolipides présents dans les membranes de cellules de mammifères (Fig. 3). Il existe un autre dérivé des sphingolipides appelé ganglioside, il est composé d'un glycosphingolipide (céramide et oligosaccharide) portant un ou plusieurs groupements acide sialique (ex. l'acide N-Acétylneuraminique NANA). Ils sont généralement impliqués dans la transduction du signal et semblent se concentrer dans les radeaux lipidiques.

Les stéroles :

Les stéroles avec les cholestérols sont le troisième grand groupe de lipides que l'on rencontre couramment dans les membranes des cellules de mammifères. Leur structure est différente des autres lipides (Fig. 3), elle contient une structure stéroïde couplée à une petite chaîne hydrocarbure et à un groupement hydroxyle (van Meer et al., 2008).

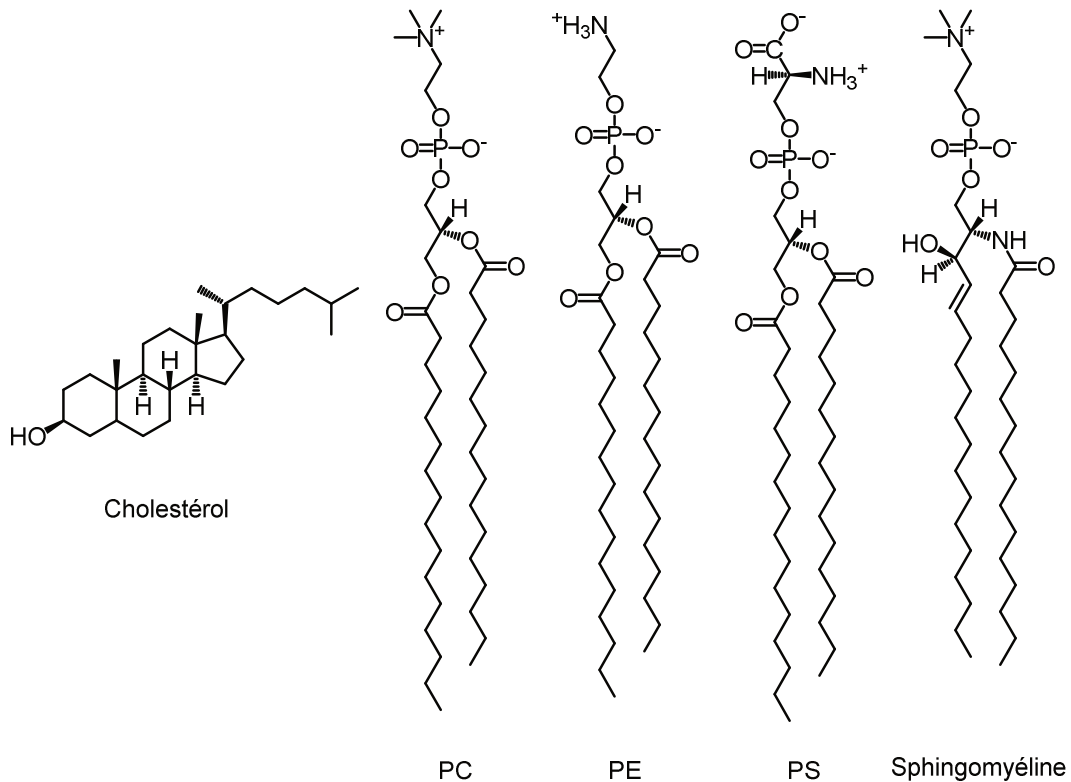


Figure 3 : Exemples de lipides membranaires majoritaires. Pour plus de simplicité, seuls les lipides insaturés ont été représentés.

1.3. L'asymétrie transmembranaire

Les propriétés amphiphiles des lipides leur permettent de s'auto-assembler dans des milieux aqueux pour former différentes nanostructures, micelle, micelle inverse, bicouche lipidique, etc (Mouritsen, 2011). Parmi les structures citées précédemment, la bicouche lipidique est la plus importante au niveau biologique. La membrane plasmique cellulaire présente une asymétrie au niveau de sa composition lipidique entre les feuillet la composant. Le feuillet externe (non cytosolique) contient majoritairement SM et PC alors que PS et PE sont prédominants dans le feuillet interne (cytosolique) de la membrane (van Meer, 1989)(Feigenson, 2007). De plus les glycolipides, comme les gangliosides sont présents uniquement du côté extracellulaire (Fig. 4).

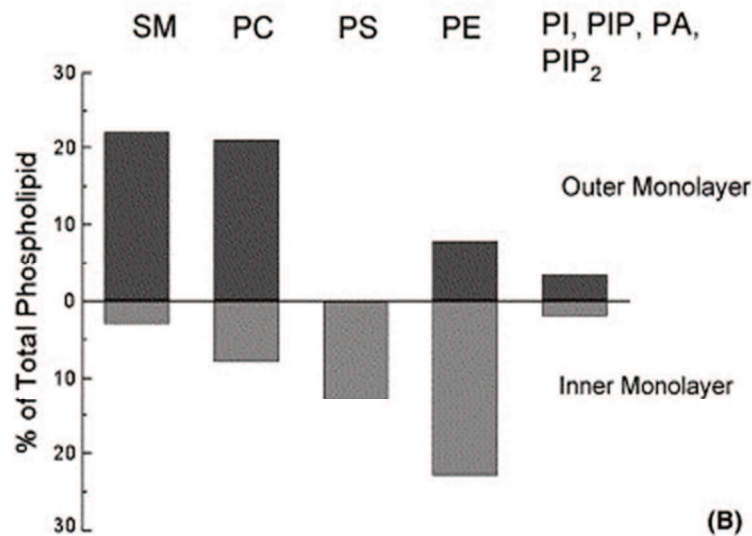


Figure 4 : Distribution des lipides entre les feuillet internes et externes de la membrane plasmique cellulaire (Hanshaw and Smith, 2005). PIP = Phosphatidylinositol monophosphate, PIP₂ = Phosphatidylinositol bisphosphate, PA = acide phosphatidique

Il est important pour la cellule de maintenir cette asymétrie qui est accomplie par l'activité d'une aminophospholipide translocase ATP-dépendante aussi appelée flipase. Elle va transporter PS et PE du feuillet externe vers le feuillet interne (Williamson and Schlegel, 1994). Un exemple de la rupture de l'asymétrie membranaire est l'exposition de PS à la surface de la cellule dans les premières étapes de l'apoptose cellulaire (Zwaal and Schroit, 1997).

1.4. Les rôles de la membrane

La membrane plasmique joue plusieurs rôles importants dans la vie d'une cellule. Elle sert à la communication intercellulaire, à l'adhérence cellulaire ainsi qu'au transport de différentes substances dans et hors de la cellule.

1.4.1. La communication intra- et intercellulaire

La communication entre les cellules se fait par l'intermédiaire de différents récepteurs situés sur la membrane de la cellule. Ces récepteurs vont reconnaître différents stimuli du milieu extérieur et vont déclencher une chaîne de réactions qui va créer une réponse de la cellule. Cette

réponse va modifier le métabolisme cellulaire, son expression génétique ou encore sa faculté de division (Ashkenazi and Dixit, 1998; Ferrara et al., 2003).

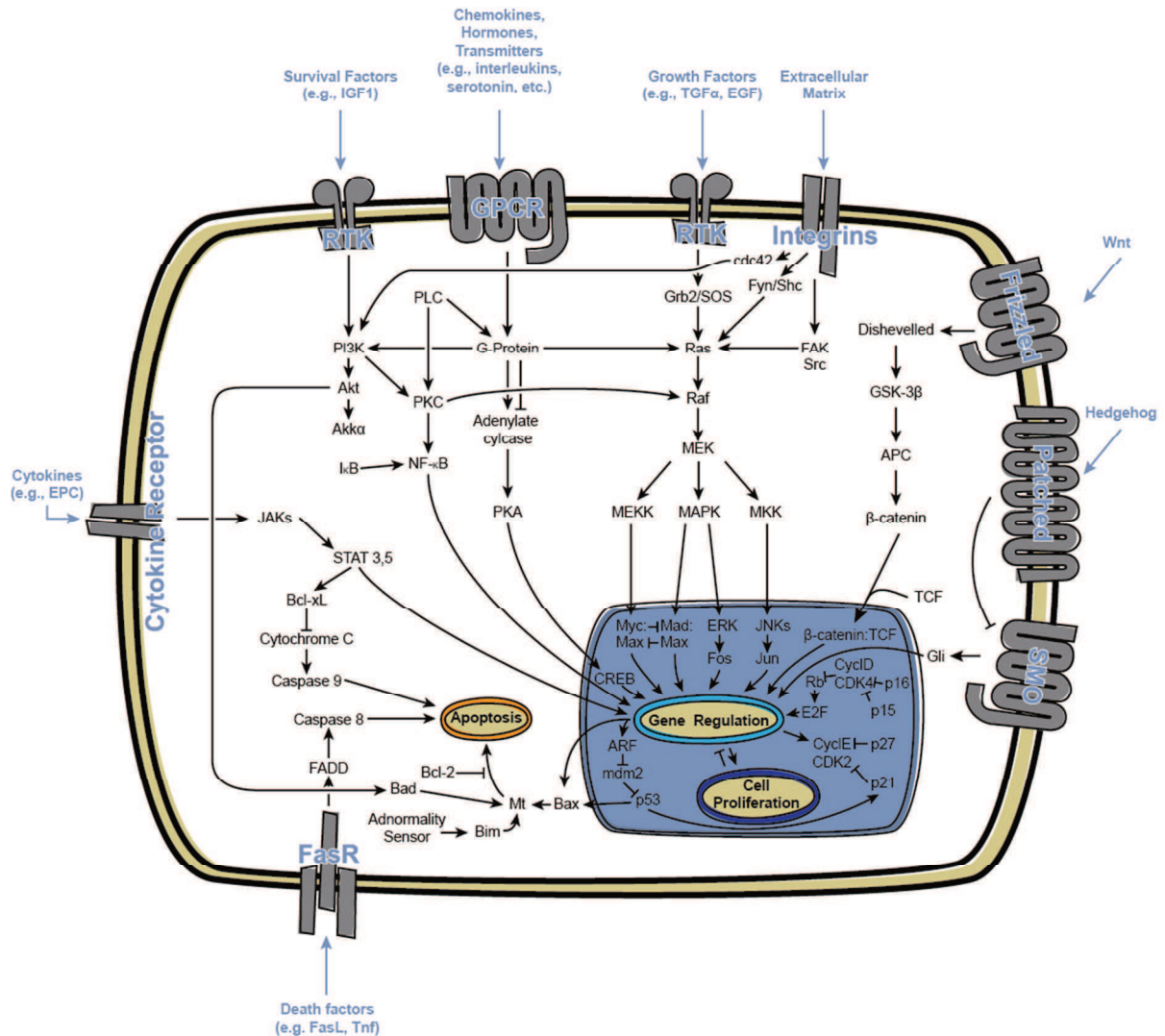


Figure 5 : Vue d'ensemble des voies de signalisation cellulaire simplifiée. En bleu, les voies intercellulaires et en noir, les voies intracellulaires.

Les récepteurs à protéines G (RCPG) :

Ces récepteurs possèdent une capacité à se coupler à des protéines hétérotrimériques utilisant l'échange de GTP (guanosine triphosphate) en GDP (guanosine diphosphate) comme interrupteur moléculaire (protéine G) pour inhiber ou déclencher des réactions biochimiques au sein de la cellule. Les premières évidences de l'existence de tels récepteurs remontent aux années 1970 par l'observation de la nécessité du GTP dans l'activation de l'adénylyl cyclase (Gilman, 1970,

1987). Avec le développement de nouvelles méthodes d'analyses comme l'utilisation de radio ligand (ligand radioactif) ou la solubilisation et la purification de RCPG liant des monoamines, cette super-famille de récepteurs a fortement grandi. Les récepteurs couplés aux protéines G sont impliqués dans de nombreuses maladies et sont la cible d'approximativement 40% des médicaments modernes (Overington et al., 2006). Ils sont aujourd'hui regroupés dans 5 familles en fonction de leur similitude structurelle (Lagerström and Schiöth, 2008). La première famille, nommée *Rhodopsin* est la plus grande famille de RCPG et est divisée en 4 sous familles : α , β , γ et δ . Ces récepteurs sont impliqués dans la vision (Yoshizawa and Wald, 1963) ou encore dans l'odorat (Malnic et al., 2004). La seconde famille, nommée *Secretin* est impliquée dans différents processus de sécrétion cellulaire, comme la sécrétion de l'insuline, l'ACTH (hormone corticotrope), d'enzymes par le pancréas et régule le rythme circadien ou encore l'homéostasie du glucose dans le sang (Harmar, 2001). La troisième famille, *Adhesion*, joue un rôle dans le système immunitaire. La quatrième famille, *Glutamate*, ainsi que la cinquième famille *Frizzled/Taste*, vont être par exemple impliquées dans le goût (Fredriksson et al., 2003).

Les récepteurs tyrosine kinases (RTK) :

Ces récepteurs jouent un rôle important dans le contrôle des processus fondamentaux de la vie cellulaire, comme le cycle cellulaire, la migration cellulaire, le métabolisme cellulaire ou encore la prolifération et la différenciation des cellules (Schlessinger, 2000). L'exemple typique est le récepteur du facteur de croissance épidermal (EGFR ; Epidermal Growth Factor Receptor) qui est particulièrement important dans différentes maladies cancéreuses (Cunningham et al., 2004; Paez et al., 2004). Ces récepteurs sont constitués de deux domaines, l'un extracellulaire, qui va reconnaître et lier le ligand connecté par une hélice transmembranaire à un autre domaine, intracellulaire, composé principalement d'une protéine kinase. Cette kinase va, lorsque le récepteur est activé par un ligand, catalyser le transfert du phosphate γ d'une molécule d'ATP à un groupement hydroxyle de tyrosines sur des protéines cibles (Hunter, 1998). L'activation de ces récepteurs nécessite leur dimérisation dans la membrane plasmique, le dimère étant stabilisé par le ligand (Schlessinger, 1988). Il existe aussi des récepteurs à histidine kinases que l'on retrouve principalement chez les procaryotes, les champignons ainsi que chez les plantes (Wolanin et al., 2002).

Les intégrines :

Les intégrines sont composées de deux sous-unités α et β de glycoprotéine, liées non covalamment. Leur fonction de récepteur provient de leur habilité à reconnaître ainsi qu'à lier des protéines matricielles extracellulaires et certains contre-récepteurs membranaires d'autres cellules. Elles sont aussi capables de reconnaître certaines protéines plasmiques solubles, certains virus et bactéries (Gilcrease, 2007). Elles sont exprimées dans presque chaque cellule d'un animal multicellulaire. Les intégrines sont un vaste ensemble de récepteurs servant à l'adhésion cellulaire, ainsi qu'à l'activation de certaines voies métaboliques intracellulaires comme le contrôle de la transcription, la prolifération cellulaire ou encore la mobilité cellulaire (Hynes, 1992, 2002).

Les récepteurs de type Toll (TLR) :

Les TLRs sont des récepteurs à reconnaissance de motif et sont un groupe de protéines jouant un rôle important dans le système immunitaire inné. C'est un récepteur membranaire, exprimé principalement dans les macrophages et les cellules dendritiques, qui va reconnaître des structures moléculaires dérivées d'agents pathogènes. Une fois activé, le récepteur, va déclencher une réponse immunitaire de l'organisme (Akira and Takeda, 2004).

1.4.2. L'adhérence cellulaire

L'adhésion cellulaire est la liaison entre une cellule et une surface ou un substrat comme la matrice extracellulaire d'une autre cellule. Elle est réalisée par des protéines, appelées molécules d'adhésion cellulaires dont les sélectines (Springer, 1994), les intégrines (Hynes, 2002) ou encore les cadhérines (Takeichi, 1991) font partie. L'adhésion cellulaire est primordiale pour le maintien de la structure multicellulaire, comme les différents tissus ou organes composant un organisme. Pour maintenir la cohésion tissulaire, les cellules vont être reliées entre elles par des jonctions cellulaires. Il existe plusieurs types de jonction ; les jonctions ancrées, les jonctions communicantes ou encore les jonctions serrées chez les vertébrés (Fig. 6). Chez les invertébrés il existe d'autres types de jonction comme les jonctions septates (Matter and Balda, 2003). Chez les plantes, l'analogie des jonctions communicantes est un canal microscopique traversant la paroi cellulaire appelé plasmodesmata (Maule, 2008). Pour plus de simplicité seules les jonctions des vertébrés seront abordées.

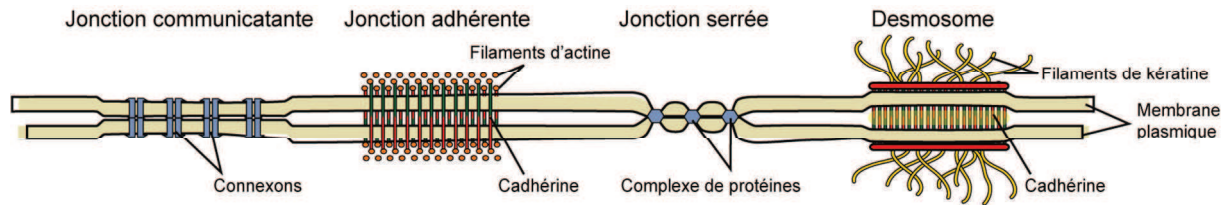


Figure 6 : Schéma de différents exemples de jonction cellulaire chez les vertébrés.

1.4.3. Transport

L'entrée et la sortie des différents matériaux biochimiques (nutriments, électrolytes, petites molécules organiques, etc ...) composant la vie d'une cellule se font par l'intermédiaire d'une collection de mécanismes de transport à travers la membrane. Ils sont séparés en deux groupes, par leur nécessité à utiliser de l'énergie ou non.

Les transports passifs :

Le premier groupe, les transports passifs (Fig. 7), ne nécessite pas de consommation d'énergie pour avoir lieu. Parmi ce groupe, on retrouve la diffusion, qui permet le passage de petites molécules liposolubles ou organiques, directement à travers la membrane (ex : appelée osmose pour l'eau) ou des ions par l'intermédiaire de canaux spécifiques (uniport). La force motrice de ce mode de transport est la différence de concentration (présence d'un gradient) ou le potentiel thermodynamique de l'espèce entre les deux faces de la membrane. La diffusion facilitée, ne consomme pas non plus d'énergie mais fait intervenir des protéines de transport pour faciliter le passage des molécules à travers la membrane (Friedman, 2008).

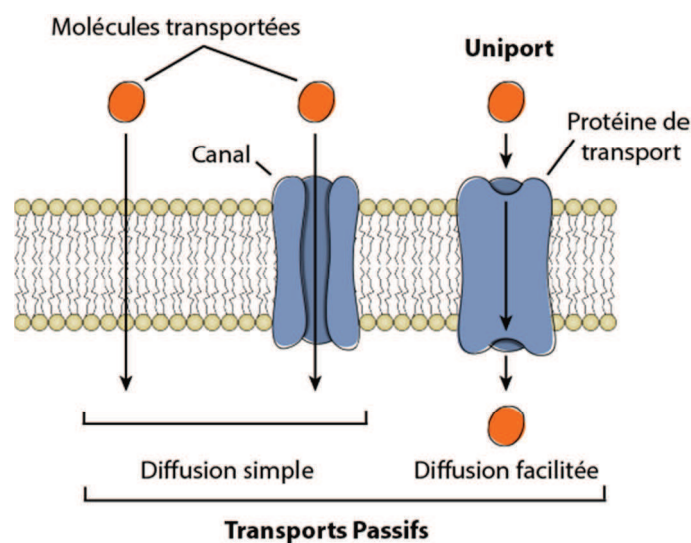


Figure 7 : Schéma des différents transports membranaires passifs.

Les transports actifs :

Il existe aussi des systèmes de transport actifs qui permettent le transport d'un soluté contre son gradient de concentration par exemple. Le transport actif primaire fait intervenir la consommation d'ATP et est généralement réalisé par des ATPases transmembranaires dont la pompe sodium potassium ou la pompe au calcium font partie. Le transport actif secondaire, fait lui, intervenir le transport facilité pour fournir l'énergie nécessaire au passage d'un soluté à travers la membrane plasmique contre son gradient de concentration. Lorsque les différentes espèces vont dans le même sens on parle de symport (symport $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2 \text{Cl}^-$ par exemple) et lorsque celles-ci vont dans un sens inverse, on parle d'antiport (échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) (Fig. 8) (Friedman, 2008).

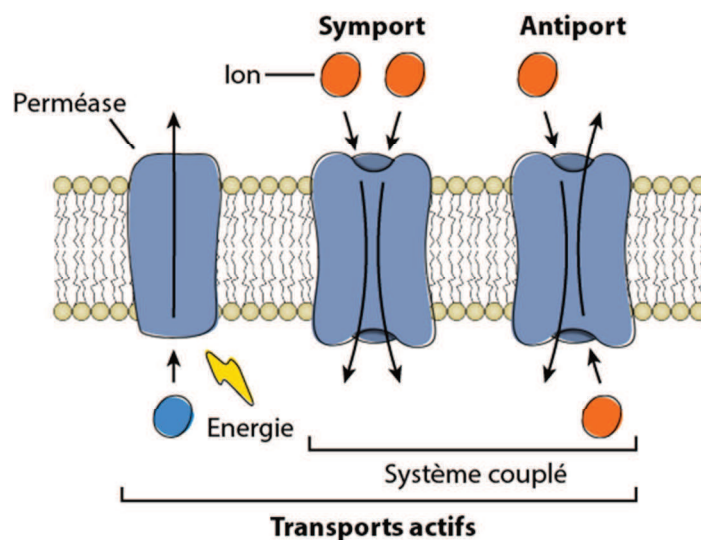


Figure 8 : Schéma des principaux transports actifs membranaires.

L'endocytose :

Il existe un autre type de transport actif qui va venir modifier directement le comportement de la membrane plasmique : l'endocytose. L'endocytose est impliquée dans un grand nombre de processus cellulaires comme la régulation de l'entrée de nutriments dans la cellule, l'adhésion cellulaire, la signalisation cellulaire (régulation de cascades comme celle de la signalisation du récepteur des facteurs de croissance) (Hoeller et al., 2005), l'entrée de pathogène (Marsh and Helenius, 2006) ou encore la croissance et la différenciation ainsi que la distribution de médicaments. Il existe différents mécanismes d'endocytose pour une grande variété de taille de « fret ». Le « fret » va dans un premier temps venir se fixer sur la surface de la membrane

cellulaire, puis celle-ci va commencer à se déformer pour former une invagination pour aboutir à l'internalisation du matériel entouré par un morceau de la membrane plasmique (Krauss and Haucke, 2011). Les différents mécanismes d'endocytose, clathrine-dépendante (le plus connu), arbitré par des clathrines, cavéoline-dépendante, arbitré par des cavéolines, phagocytose, macropinocytose, dépendent de la taille et du type de « fret » à internaliser (Conner and Schmid, 2003) (Fig. 9).

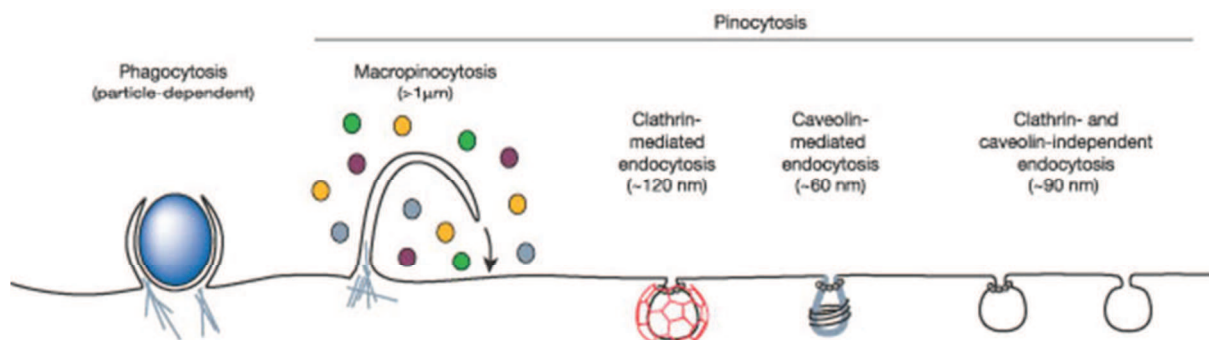


Figure 9 : La voie d'endocytose diffère en fonction de la taille des vésicules endocytotiques, de la nature du fret (ligands, récepteurs, lipides) et du mécanisme de formation des vésicules. (Conner and Schmid, 2003).

2. Les différents modèles d'organisation membranaire

Les lipides associés aux protéines membranaires (intrinsèques ou associées) forment le squelette des membranes biologiques (Bagatolli et al., 2010). Mais l'organisation exacte de la membrane reste inconnue, les protéines « flotteraient »-elles individuellement dans une bicouche lipidique, ou bien plutôt en cluster ? Les lipides sont-ils regroupés en fonction de leur propriété physico-chimique, ou bien un mélange des différents lipides composant la membrane est-il créé ?

2.1. Les anciens modèles membranaires et le modèle actuel

Les premières explorations membranaires remontent à la fin du 19^e siècle par Overton. Basée sur les études du passage à travers la membrane de différentes molécules, Overton émet une première hypothèse dans laquelle il indique une similitude entre les membranes cellulaires et les huiles comme l'huile d'Olive. Certaines molécules comme les lipides par exemple auraient la capacité de se « dissoudre » dans le cœur de la membrane. Quelques années plus tard, un

chercheur en chimie physique, Langmuir, fait état de l'orientation verticale des acides gras plongés dans l'eau, avec la chaîne alkyle loin de l'eau et les têtes polaires au contact de l'eau et propose l'organisation de la membrane en mono-couche lipidique (Langmuir, 1917).

Gorter et Grendel ont réussi à extraire les lipides de cellules sanguines (globules rouges) quelques années plus tard, en utilisant des solvants organiques. Ils ont observé que la surface couverte par les lipides extraits des cellules sanguines était deux fois supérieure à celle de la cellule. Ils ont alors réalisé ces expériences sur des globules rouges provenant de différents animaux et ont réussi à prouver que les lipides étaient capables de s'arranger en double couche lipidique (bi-couche), cela couplé à leur observation sur les cellules sanguines, les ont conduits à proposer la bi-couche lipidique comme modèle d'organisation de la membrane (Gorter, 1925). Une décennie plus tard, un modèle accepté par toute la communauté scientifique, a été proposé par Danielli et Davson. Ils déclarent que la membrane d'une cellule est comme un « sandwich » de lipides, arrangé en bi-couche lipidique, dont chaque côté est recouvert de protéines (Danielli and Davson, 1935). Les phospholipides s'organisent de telle sorte que les têtes polaires se retrouvent à l'extérieur tandis que les chaînes hydrophobes se font face à l'intérieur de la membrane. Ce modèle est resté pendant plusieurs années le modèle utilisé par les biologistes pour décrire l'organisation de la membrane. Un autre scientifique est arrivé au même modèle que Danielli et Davson, en se basant sur des observations au microscope électronique. Robertson observa une apparence « trilamellaire » de la membrane, deux zones apparaissant sombres au microscope électronique et une plus claire entre les deux parties sombres. D'après lui les zones sombres correspondraient aux couches de protéines alors que la zone claire correspondrait à la bi-couche phospholipidique (Robertson, 1957).

Dans les années qui suivirent, de nouvelles études de la membrane ont été réalisées et certaines des nouvelles observations apportées par ces études restent inexplicables par le modèle membranaire en vigueur ces années là. Au début des années 1970, Singer et Nicolson proposent un nouveau modèle (Singer and Nicolson, 1972). Ils partent du modèle de Gorter et Grendel et y ajoutent deux affirmations : 1) le cœur lipidique de la membrane existe dans un état fluide capable de mouvement dynamique ; 2) les protéines sont considérées comme globulaires et flottent dans la bicouche lipidique et la pénètrent à différents degrés (Fig. 10). En clair, les protéines forment une mosaïque à la surface membranaire et depuis ce modèle connu comme « fluid mosaic model » est le modèle préférentiel pour décrire la structure de la membrane.

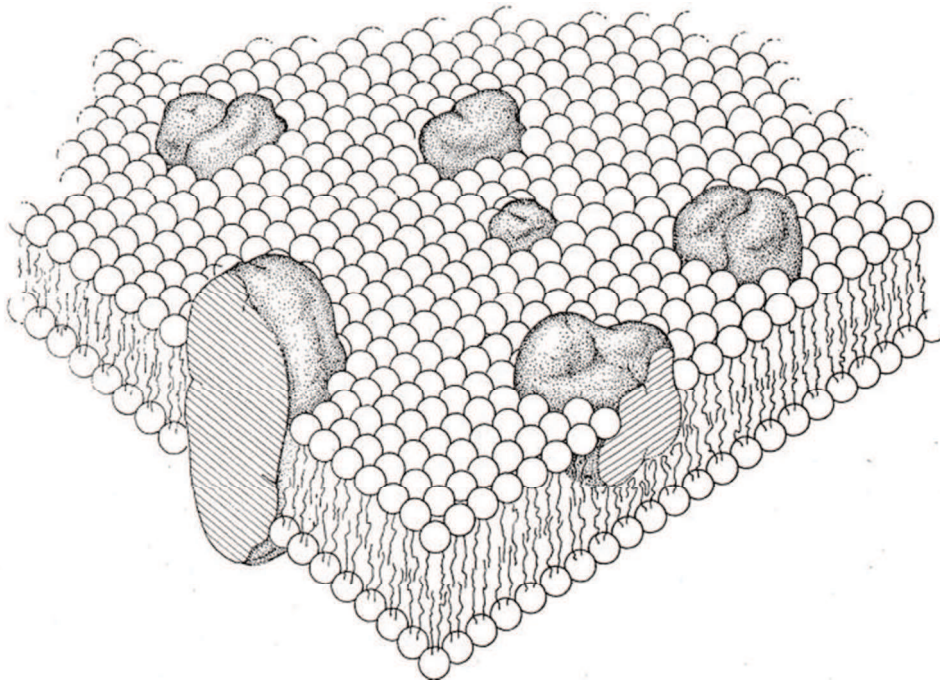


Figure 10 : Le modèle de mosaïque protéine globulaire-lipide avec une matrice lipidique (the fluid mosaic model)(Singer and Nicolson, 1972).

2.2. La transition de phase dans les membranes lipidiques

Une des propriétés les plus importantes des bicouches lipidiques est la mobilité relative des phospholipides (fluidité) au sein de cette structure ainsi que le comportement de cette fluidité en fonction de la température. Cette réponse à la température est connue comme transition de phases des membranes lipidiques. En effet il existe deux types de phases majoritaires, la phase gel (ou solide) et la phase cristal liquide. La première est constituée de lipides saturés majoritairement et possède un point de transition (ou température de transition de phase) claire lui permettant de passer à l'état de phase cristal liquide. La seconde quant à elle, est majoritairement constituée de phospholipides insaturés et reste dans l'état de phase cristal liquide. (Fig. 11) Le modèle membranaire de mosaïque fluide suggère que les membranes cellulaires sont dans un état de phase fluide (=cristal liquide) plutôt que dans un état de phase gel cristallin dans des conditions physiologiques. La membrane cellulaire est composée d'une grande variété de molécules comme les phospholipides, les protéines, le cholestérol, ces composants montrent un comportement de cristal liquide dû la présence d'une phase fluide avec une diffusion latérale élevée. La combinaison

d'une structure orientée, d'une fluidité et d'une labilité importante sont des caractéristiques importantes pour le bon fonctionnement d'une membrane plasmique.

Chapman réalisa en 1975 un nombre important d'expérimentations dans le but de déterminer la transition de phase dans les membranes cellulaires. Lui et son groupe en ont conclu que la modulation de la fluidité membranaire entraînée par une transition de phase solide-fluide, induisait un changement dans la perméabilité membranaire, ainsi que dans la clusterisation de récepteurs et dans la transduction du signal (Chapman, 1975). Remarquablement, une grande similitude a été observée entre la température de transition de phase des membranes modèles et celle des membranes cellulaires.

Des études récentes font le postulat que certaines parties de la membrane ne se trouvent pas en phase fluide, elles possèdent différentes températures de transition de phase, qui vont jouer un rôle important dans la vie cellulaire (Holl, 2008). La transition de phase principale va permettre à la membrane un passage d'une phase solide avec des chaînes grasses ordonnées à une phase fluide avec des chaînes grasses désordonnées.

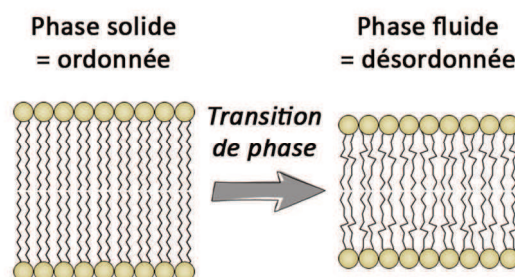


Figure 11 : Schéma représentant une phase fluide et une phase solide d'une bicouche lipidique.

2.3. La théorie des radeaux lipidiques

Une série d'expériences menées par Yu et Streck en 1973, ont montré indirectement la présence d'hétérogénéité dans la membrane. Ils ont étudié l'action de détergents non ioniques sur des cellules sanguines (globules rouges) (Yu et al., 1973). Sous l'action de détergents, la membrane plasmique va se solubiliser mais pas entièrement, des petits morceaux de membranes résistants aux détergents (DRMs) vont alors être observés (Brown and London, 2000; Patra et al., 1999; Schroeder et al., 1994). Les DRMs sont préparés par l'action du détergent Triton X-100 et son action sur des membranes cellulaires à 4°C produit la formation de petites micelles, contenant

la fraction soluble de lipides (choline insaturées) ainsi que des protéines, et des particules plus larges, les DRMs. Ils peuvent être isolés par centrifugation et l'étude de leur composition est assez surprenante. En effet, ceux-ci sont composés d'un enrichissement en cholestérol (3-, 5-fois) et de sphingolipides et sont plutôt pauvres en glycerophospholipides (Pike et al., 2002). Certains phospholipides se montrant insolubles au Triton X-100 dans la phase gel (Ribeiro and Dennis, 1974; Schroeder et al., 1998), la suggestion que les DRMs sont formés par la séparation de phase dans la membrane a alors été faite.

Ces preuves de l'existence d'une hétérogénéité ont amené Simons et Ikonen à revisiter le modèle de Singer et Nicholson en 1997. Ils prirent en compte dans leur modèle la transition dynamique de phase de la membrane plasmique, suggérant l'existence de domaines lipidiques (« radeaux », « rafts ») sur la membrane (Simons and Ikonen, 1997). La théorie des radeaux lipidiques était née. Le nombre important de publications sur le sujet depuis 1997 (>4000) indique le fort intérêt de la communauté scientifique pour ce modèle et de la réelle importance de la transition de phase dans les membranes cellulaires. La théorie proposée par Simons et Ikonen prédit la coexistence de lipides et de micro-domaines protéiques (Fig. 12) (les radeaux). Ces radeaux, enrichis en sphingolipides et en cholestérols, montrent un rôle important dans plusieurs processus cellulaires comme la signalisation ou encore le transport membranaire. Les radeaux lipidiques ont été aujourd'hui définis comme étant relativement petits (10-200 nm) dynamiques et hétérogènes et compartimentent les processus cellulaires. Ils peuvent aussi être stabilisés pour former des domaines plus grands (Pike, 2006).

Les phospholipides saturés existent généralement dans une phase gel à basse température, mais une fois au-dessus de la température de transition de phase (T_m , spécifique à chaque lipide), ils vont adopter le comportement d'un cristal liquide. Dans le cas d'une bicouche composée de deux types de lipides dont la T_m diffère, il va être possible d'observer la coexistence de deux phases. En présence de cholestérol, ces deux phases changent de façon drastique, mais elles préservent une séparation dans les membranes modèles. Les termes désignant ces phases sont liquide ordonné (L_o) et liquide désordonné (L_d) (Brown and London, 1998). Tandis que les phases L_d sont généralement formées par des phospholipides insaturés, des dérivés saturés sont généralement les représentants des phases L_o , ainsi que la sphingomyéline. Les hautes températures vont favoriser la formation de phases L_d alors que des températures basses vont favoriser les phases L_o . Les phases L_o assimilables aux radeaux lipidiques de Simons et Ikonen, vont montrer des chaînes acyles des phospholipides très ordonnées et une diffusion latérale plus

importante alors que les phases Ld (Mouritsen, 1991) vont avoir des propriétés similaires aux phases fluides.

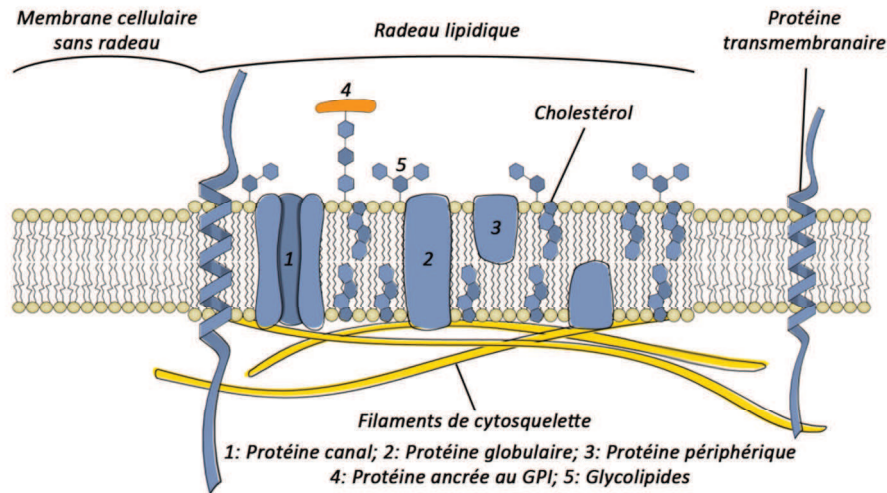


Figure 12 : Représentation schématique d'un radeau lipidique dans la membrane plasmique.

Néanmoins la présence de DRMs, qui contiennent du cholestérol ainsi que des lipides saturés, ne peut pas à elle seule prouver l'existence de radeaux membranaires, l'action du détergent sur la membrane pourrait très bien provoquer la formation des DRMs de façon artificielle (Kurzchalia et al., 1995). De nouvelles données indiquent que l'organisation des lipides dans la membrane est plus complexe que cela. Il est grandement reconnu que la membrane présente une asymétrie latérale (Glaser, 1993; Tocanne et al., 1989, 1994) et transmembranaire (différente composition des deux feuillet) (Devaux, 1993; Zachowski, 1993). La démonstration la plus percutante de l'existence de l'hétérogénéité membranaire est celle apportée par les essais d'immunofluorescence pour montrer la localisation des protéines et des lipides dans la membrane (Gómez-Mouton et al., 2001; Yamaji-Hasegawa and Tsujimoto, 2006).

3. Les membranes modèles

Les membranes plasmiques composées de différents phospholipides, protéines, sucres, etc, présentent une complexité importante. Dans le but de s'affranchir partiellement ou totalement de cette complexité dans les études menées sur les membranes biologiques, de

nombreux modèles ont été développés au cours du temps. Ce sont généralement des mélanges de quelques phospholipides en forme de monocouche ou bicouche (Fig. 13).

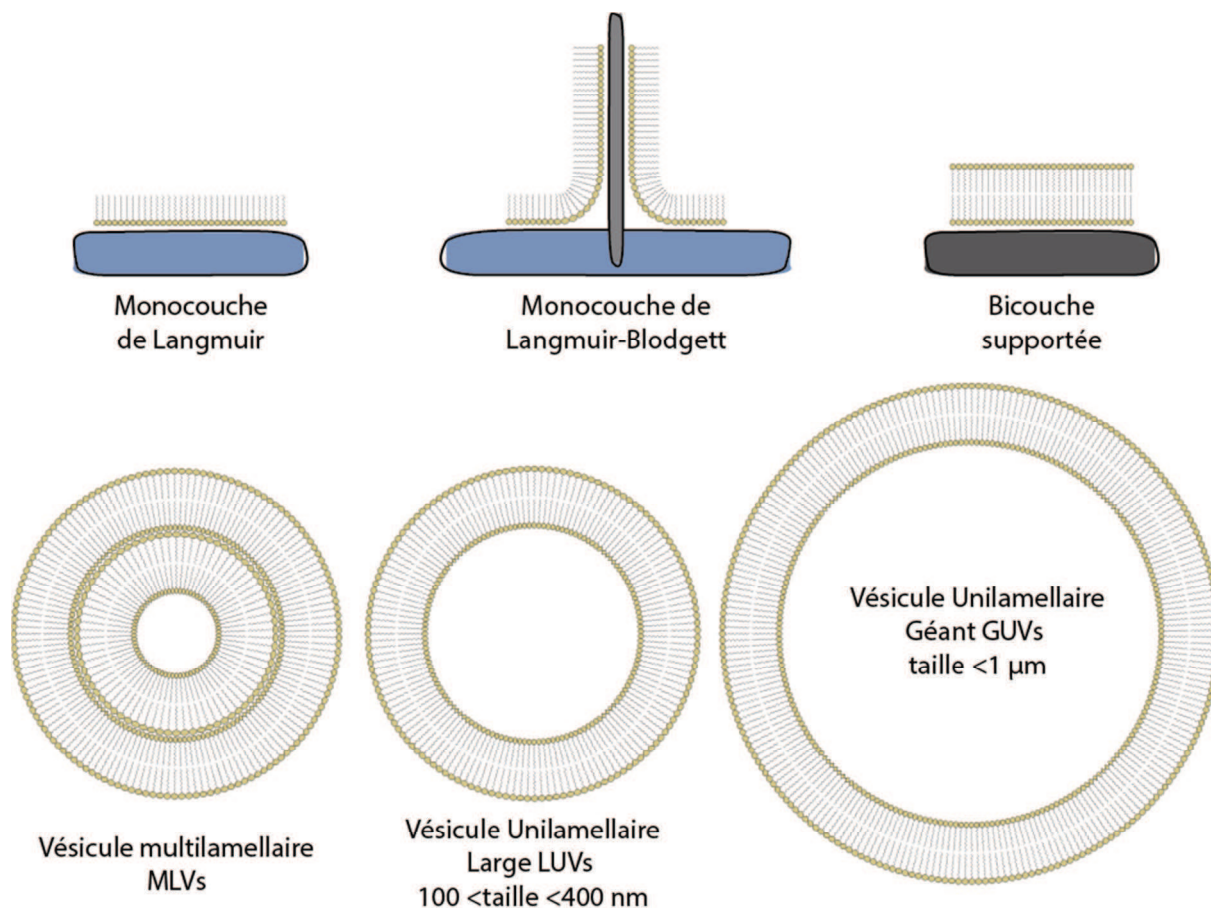


Figure 13 : Schéma des différentes membranes modèles couramment utilisées.

3.1. Les films ou « self-assembled monolayers » (SAMs)

La création de film lipidique est connue depuis la nuit des temps ; répandre de l'huile à la surface d'une solution aqueuse. La première étude scientifique sur le sujet fut rapportée et publiée par Benjamin Franklin en 1774 (Franklin and Brownrigg, 1774). A la fin du 19^e siècle, une scientifique allemande, Pockels, publia ses travaux sur l'étude de monocouches faites de différentes matières (dont l'acide stéarique répandu sur une surface aqueuse) dans le journal Nature (Pockels, 1892, 1893). Ses travaux particulièrement remarquables du fait de sa limitation aux instruments de cuisine à sa disposition, posèrent les bases de ce que nous connaissons aujourd'hui comme les films de Langmuir. Quelques années plus tard Langmuir publia certains de

ses travaux sur l'étude de monocouches flottantes à la surface de l'eau (les films de Langmuir) (Langmuir, 1917), travaux qui lui valurent un prix Nobel quelques années plus tard. En 1935 la première description du dépôt de monocouches lipidiques sur une surface solide a été publiée par Blodgett (Blodgett, 1935), ces monocouches supportées font référence aux films de Langmuir-Blodgett.

Ces films ou monocouches lipidiques sont principalement utilisés pour l'étude des interactions lipide-protéine comme modèle remplaçant la membrane dans des études comme, la perméabilisation de peptide antimicrobien/membrane-lytic (Maget-Dana, 1999), l'interaction de protéines de transport avec la membrane comme l'annexine (Rosengarth et al., 1998), ou encore la pénétration de certaines protéines à travers la membrane plasmique comme la glucose oxidase (Baszkin et al., 1999). Les études de l'interaction lipide-protéine peuvent se faire de différentes manières (Brockman, 1999) : a) La pression de surface (Baszkin et al., 1999; Piéroni et al., 1990) b) Le potentiel de liaison électrique, (Bähr et al., 1998; Brockman, 1994) c) Visualisation microscopique (Grainger et al., 1992; Pisarchick and Thompson, 1990) d) Les vibrations spectroscopiques (Ahuja and Moebius, 1992; Yu and Hui, 1992).

Les monocouches de Langmuir ont surtout servi à l'étude de la transition de phase. La microscopie de fluorescence est souvent utilisée de pair avec ces modèles lors de ces études (Hollars and Dunn, 1998; Lösche et al., 1983, 1984; Mangiarotti et al., 2014; Möhwald, 1990). Elles servent aussi dans les études sur les radeaux lipidiques (Dietrich et al., 2001). En effet cette technique donne de très bonnes informations quantitatives sur la structure et l'organisation de monocouches lipidiques au niveau micrométrique. Mais dûes à la faible résolution des microscopes optiques, les informations à l'échelle sub-micrométrique sont relativement rares. La technique de formation des monocouches de Langmuir-Blodgett est aussi utilisée dans les études de fluorescence améliorée par des métaux (Metal enhanced fluorescence MEF), elle permet de connaître exactement la distance d'un film enrichi en sonde fluorescente par rapport à des films d'îlot d'argent (Silver Island Films SIFs) par des dépôts successifs et ainsi étudié l'effet de la distance sur la MEF (Ray et al., 2006).

3.2. Les vésicules unilamellaires

Il existe plusieurs types de vésicules unilamellaires, les petites (SUVs, dont la taille < 100 nm), les larges (LUVs, dont la taille varie entre 100 et 400 nm) et les géantes (GUVs dont la taille > 1 µm). Les LUVs et GUVs sont les plus couramment utilisées en tant que modèle membranaire.

Les LUVs :

Le premier rapport de procédure de production de liposomes a été fait par Bangham en 1965 (Bangham et al., 1965) mais il s'agissait en réalité de liposomes multilamellaires (MLVs) de taille variable. Ce n'est qu'à partir de 1985 que Hope publia un protocole de production de LUVs par extrusion rapide (Hope et al., 1985). La procédure consiste aux passages répétés d'une solution de MLVs à travers un filtre de porosité donnée et permet une production rapide et simple de LUVs de taille connue et bien contrôlée. Leurs compositions facilement variables (possibilité de faire des mélanges de phospholipides) ainsi que leur structure en bicouche en font d'excellents modèles membranaires. En combinaison avec des méthodes d'analyses de fluorescence, ils permettent l'étude d'un grand nombre de phénomènes liés à la membrane, comme l'étude de l'effet de perméabilisation de la membrane par des peptides antimicrobiens par spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) (Kristensen et al., 2014) ou encore l'étude des transferts lipidiques trans- (entre liposomes) et cis- (entre feuillet = « flip-flop ») membrane par spectroscopie (Wolf et al., 1992). Ils sont utilisés dans les études sur l'effet du pH sur la fluidité et la perméabilité à certaines petites molécules (eau, ammoniacque, protons, etc...) (Lande, 1995) et sont aussi utilisés pour l'étude des radeaux lipidiques en servant par exemple de modèle pour l'étude de sondes solvatochromes (Kucherak et al., 2010). Les LUVs sont aussi utilisés en pharmacologie en tant que vecteur de transport pour des médicaments ou dans la thérapie génique (El-Aneed, 2004).

Les GUVs :

Angelova et Dimitrov furent les premiers en 1986 à rapporter la production de GUVs par électro-formation (Angelova and Dimitrov, 1986), technique la plus couramment utilisée aujourd'hui. Cette technique consiste au dépôt d'un mélange lipidique sur des électrodes de platine dans une chambre en teflon et à l'application d'un courant continu électrique sur les électrodes.

Le gros avantage des GUVs sur les LUVs est leur taille plus importante qui permet, entre autre, de réaliser de la microscopie de fluorescence à l'aide d'un microscope optique courant, confocal, bi-

photon, etc... C'est la raison qui a fait des GUVs le modèle membranaire le plus utilisé pour les études sur les radeaux lipidiques comme en témoigne le nombre important de publications sur le domaine (Wesołowska and Michalak, 2009). Il est possible de créer des GUVs à partir d'un mélange de lipides afin que ceux-ci présentent des phases Lo et Ld puis de marquer ces phases à l'aide de sondes (Dil-Cn, n = 12-22 ou naphtopyrène (NAP) par exemple, Fig. 14) spécifiques à chacune des phases et d'observer la distribution de celles-ci sur les GUVs par microscopie confocale, STED ou encore deux-photons (Bagatolli, 2006; Baumgart et al., 2007a; Honigmann et al., 2013; Kim et al., 2008; Sezgin et al., 2012).

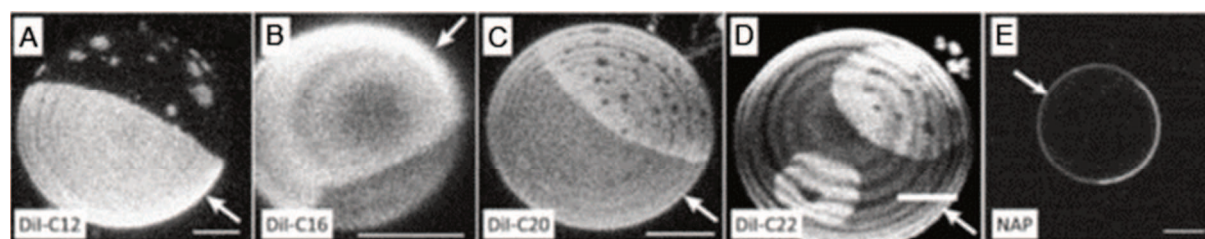


Figure 14 : (A-D) GUVs composé d'un mélange de DSPC/DOPC/Cholestérol marqués par les sondes Dil. (E) NAP montre une remarquable préférence pour les phases Lo sur des GUVs DOPC/SM/Cholestérol. Les phases Lo sont indiquées par les flèches sur les images.

Le même type de GUVs peut aussi servir à l'étude de sondes solvatochromiques, dont la longueur d'onde d'émission va changer en fonction de l'environnement et donc en fonction du type de phase (Kucherak et al., 2010).

Il est aussi possible de réaliser des GUVs à partir de membranes plasmiques de cellules, vésicules de membranes plasmiques géantes (GPMVs, Giant Plasma Membrane Vesicles). Ceux-ci partitionnent aussi leurs lipides en domaine et font de très bons modèles de membranes plasmiques pour l'étude des radeaux lipidiques (Baumgart et al., 2007b; Sengupta et al., 2008).

3.3. Les vésicules multi-lamellaires

Les vésicules multi-lamellaires (MLVs) ont été rapportées pour la première fois par Bangham en 1965, comme indiqué dans le paragraphe précédent, et servent eux aussi de modèles membranaires. Ils sont formés simplement par hydratation, à l'aide d'un tampon aqueux, d'une

dispersion de lipides sèche (Bangham et al., 1965). Ils possèdent des propriétés similaires aux vésicules uni-lamellaires : facilité de formation, composition facilement variable, variation de taille bien moins contrôlable que les LUVs. La présence d'autres bicouches au sein du liposome en font des modèles moins utilisés aujourd'hui, la membrane plasmique ne possède qu'une seule bicouche et nous ne savons pas bien ce qu'implique réellement la présence de ces autres bicouches, échanges lipidiques trans-liposome ? Ségrégation des lipides par couche lors du mélange de plusieurs phospholipides ? Ils vont néanmoins servir de modèle membranaire dans les études de l'effet de la pression sur la transition de phase membranaire (Goto et al., 2010), sur l'étude de l'effet du pH ((Sánchez et al., 2011) ou encore dans l'étude de la fluidité membranaire et de la transition de phase sur des liposomes composés d'un seul lipide (Lentz et al., 1976). Ils sont aussi utilisés en pharmacologie comme vecteur de transport transmembranaire (Touitou et al., 2000).

3.4. Les bicouches supportées

Les bicouches supportées sur support solide sont relativement pratiques et possèdent un intérêt scientifique notable. Il existe plusieurs techniques pour leur création, comme le dépôt successif de deux monocouches lipidiques par la technique de Langmuir-Blodgett (Pisarchick and Thompson, 1990; Wright et al., 1988) ou par l'étalement de vésicules sur des surfaces solides (Feder et al., 1995; Sackmann, 1996). Les bicouches supportées permettent la bio-fonctionnalisation de matériaux polymères et de surfaces solides (semi-conducteurs, ...). Elles peuvent aussi servir d'environnement naturel pour l'immobilisation de protéines (anticorps, récepteurs) dans des conditions physiologiques et dont l'orientation est connue. Elles peuvent aussi servir à l'élaboration de bio-senseurs basés sur la détection optique ou électrique de la liaison d'un ligand. (Sackmann, 1996). Ce sont aussi de bons modèles membranaires pour l'étude de l'action des peptides antimicrobiens sur les membranes bactériennes (Shai, 2002), l'étude de la reconnaissance cellules-cellules dans le système immunitaire (McConnell et al., 1986). Elles servent aussi pour les études sur les radeaux lipidiques (Dietrich et al., 2001). Ces bicouches sont, en revanche, le modèle membranaire de prédilection pour la technique AFM Fluorescence. Cette technique consiste à mettre en parallèle une détection par microscopie de force atomique (AFM) et une microscopie épifluorescente (Henderson and Sakaguchi, 1993; Mathur et al., 2000; Mulligan et al., 2011), deux techniques possédant forces et faiblesses complémentaires afin

d'obtenir un outil puissant pour l'étude d'échantillons biologiques. Cette technique se révèle particulièrement puissante pour l'étude des radeaux lipidiques. Les phases ordonnées étant légèrement plus épaisses que les phases désordonnées, elles seront parfaitement visualisées par AFM. L'ajout de sondes spécifiques à certaines phases permettra une visualisation de ce domaine membranaire directement par microscopie épifluorescente (Lin et al., 2006; Ratto and Longo, 2002).

4. Les techniques d'analyses de la membrane plasmique

De nos jours, il existe différentes techniques mises au point au cours des dernières décennies qui peuvent être appliquées à l'étude de la membrane et des différents constituants la composant (Fig. 15). Chacune possède ses propres forces et faiblesses et permet l'obtention de données complémentaires. Ces techniques sont les membranes résistantes aux détergents (DRM), la spectrométrie de masse (MS), la microscopie de force atomique (AFM), la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la microscopie et spectroscopie de fluorescence.

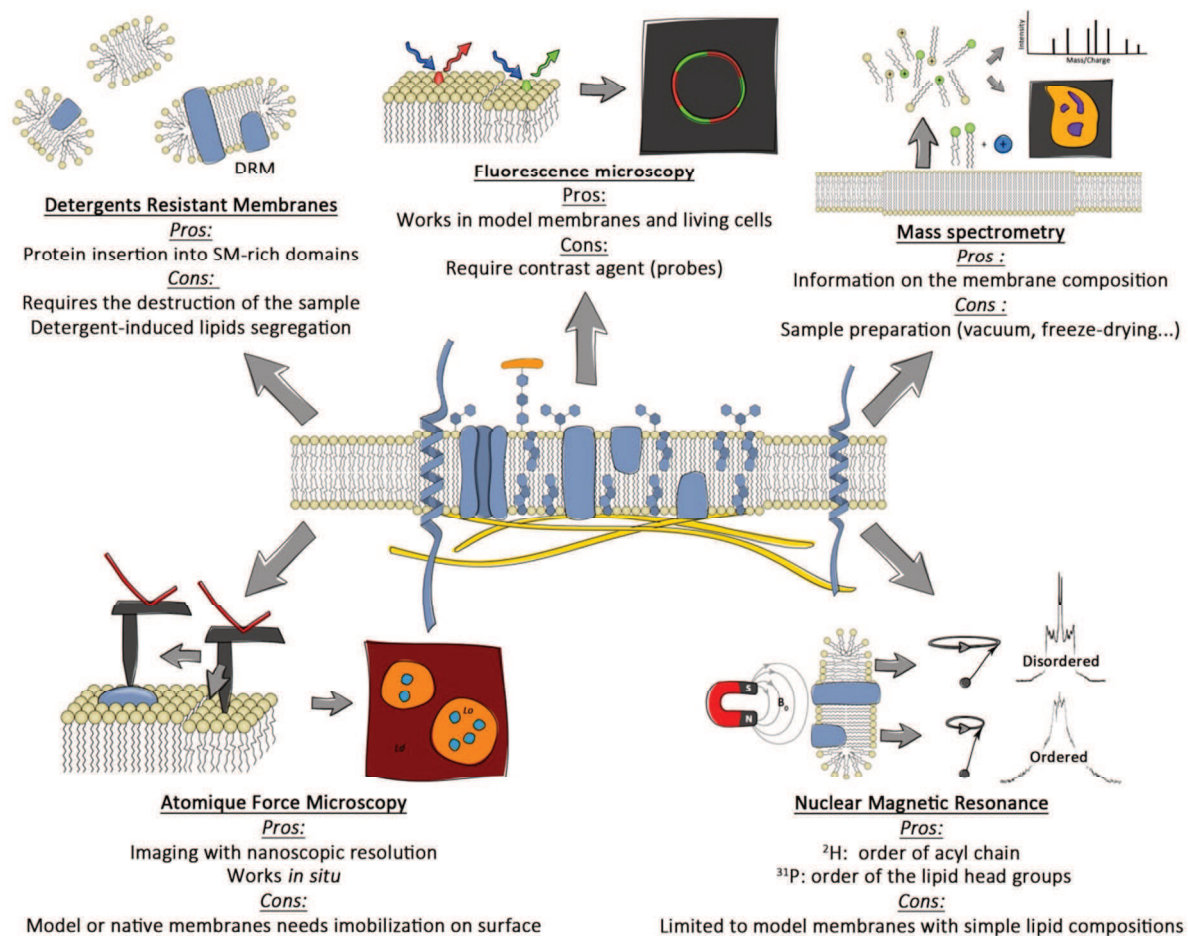


Figure 15 : Points forts et faibles des différentes techniques communes dans la caractérisation des radeaux lipidiques (Klymchenko and Kreder, 2014).

4.1. Les DRM

La méthode traditionnelle pour l'étude des radeaux lipidiques ainsi que leur association avec certaines protéines membranaires repose sur l'observation de l'existence de membranes

résistantes à l'action de détergents, tel le Triton X-100, riche en sphingomyéline (SM), cholestérol ainsi que d'autres lipides saturés (Brown and London, 2000; Lingwood and Simons, 2007). Ils ont été reportés pour la première fois par Brown et Rose en 1992 (Brown and Rose, 1992). Cette technique permet de visualiser directement l'insertion de certaines protéines membranaires au sein des radeaux lipidiques par l'intermédiaire de leur présence dans des DRM (Browman et al., 2007; Brown, 2006). Mais cette technique présente quelques inconvénients relativement importants comme la nécessité de détruire l'échantillon lors de l'analyse et cette technique est de plus en plus critiquée par la communauté scientifique pour son côté artificiel. En effet l'utilisation de détergents pourrait induire, dans la membrane, une ségrégation des lipides ou affecter le partitionnement des protéines au sein d'une phase donnée (Heerklotz, 2002; Lichtenberg et al., 2005; Sot et al., 2006).

4.2. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse conventionnelle est limitée aux analyses chimiques et géochimiques. Les avancées spectaculaires dans les méthodes de désorption/ionisation laser assistée par une matrice (MALDI) et d'ionisation électrospray de ces dix dernières années, ont permis de transformer la spectrométrie de masse en un outil puissant pour la caractérisation de molécules biologiques, même assemblées. Il est possible de réaliser de l'imagerie par spectrométrie de masse et il existe de nos jours deux grands types de techniques. Le premier type est directement basé sur l'ionisation MALDI. Il permet d'enregistrer la distribution spatiale de molécules de masse importante en utilisant des ions moléculaires spécifiques. La résolution de cette technique est de l'ordre du micromètre (Burnum et al., 2008; McDonnell and Heeren, 2006). L'autre technique est basée sur l'utilisation d'un flux d'ions primaires accélérés pour bombarder une surface et ainsi générer des ions secondaires SIMS (Secondary Ion Mass Spectroscopy) (Fig. 16A). Cette technique permet l'obtention d'images de hautes résolutions spatiales (résolution de 50 nm) (Fig. 16B) mais la fourchette de masse des ions moléculaires utilisée est plus faible que pour le MALDI ($m/z < 500$). L'imagerie SIMS est actuellement beaucoup utilisée pour les recherches sur les radeaux lipidiques (Boxer et al., 2009; Frisz et al., 2013; Kraft and Klitzing, 2014; Kraft et al., 2006; Lozano et al., 2013). Le principal inconvénient de cette technique est qu'elle nécessite l'utilisation d'échantillons gelés à sec sous un vide extrême.

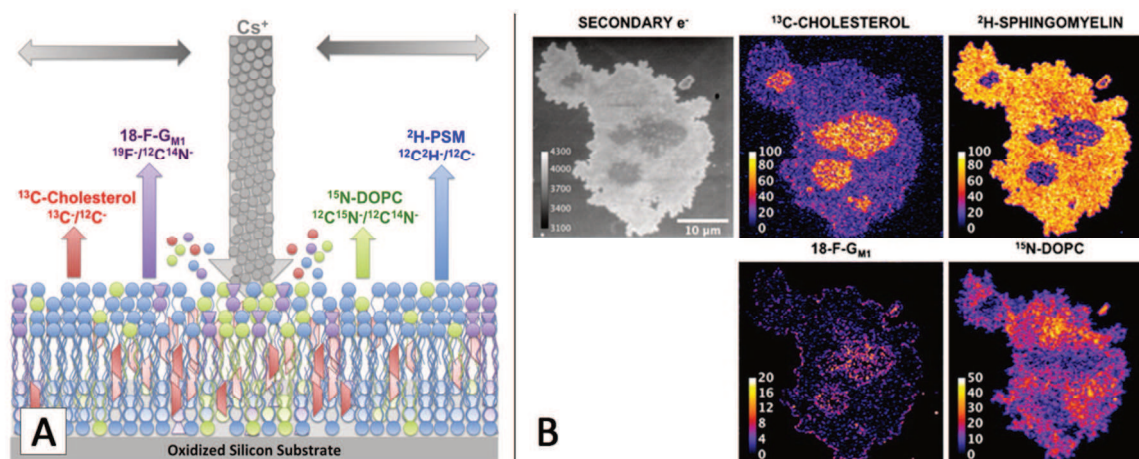


Figure : 16 : A) Schéma d'une expérience NanoSIMS. Un flux d'ion césium est utilisé pour générer des ions secondaires (^{12}C , ^{13}C , $^{12}\text{C}^2\text{H}$, ^{19}F , $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ et $^{12}\text{C}^{15}\text{N}$) depuis une bicouche supportée composée de ^{13}C -Cholestérol, ^2H -Palmitoyl Sphingomyéline (^2H -PSM), ^{18}F -GM₁ et ^{15}N -DOPC. B) Images NanoSIMS d'une bicouche supportée gelée à sec formée par la fusion d'un GUVs composé de 2:2:1 ^2H -Sphingomyéline: ^{15}N -DOPC: ^{13}C -Cholestérol avec 5 mol% ^{18}F -GM₁ (GM = ganglioside) à un substrat de SiO_2/Si . La barre de nuance de gris dans l'image d'électron secondaire correspond à leur nombre et la barre de couleur dans les images spécifiques aux molécules correspond à la composition en pourcentage molaire.

4.3. La microscopie de force atomique

La microscopie de force atomique (AFM) est une technique analytique qui permet de mesurer des forces très faibles sur des particules aussi petites que des atomes seuls. Elle fut présentée pour la première fois par Binnig en 1986 (Binnig and Quate, 1986). Le principe de l'AFM repose sur le parcours rapide d'un échantillon de membranes en phase aqueuse par une aiguille microscopique qui va « lire » la surface de l'échantillon et retransmettre les informations obtenues sur la topographie de l'échantillon à l'ordinateur par l'intermédiaire de la réflexion de lasers au sommet de l'aiguille. Ces informations sur le déplacement de l'aiguille pourront alors être retransposées en image de la surface de l'échantillon. L'AFM permet d'obtenir des images d'une résolution de l'ordre du nanomètre. C'est une technique très utilisée dans l'étude des membranes et des radeaux lipidiques (Chiantia et al., 2006; Giocondi et al., 2000; Goksu et al., 2009; Johnston, 2007; Nicolini et al., 2006; Shaw et al., 2006). En effet, celle-ci permet de distinguer les phases Lo par leur caractéristique à avoir une épaisseur plus importante de $\sim 0,5$ nm par rapport aux domaines Ld. Cette technique peut être couplée à d'autres méthodes de microscopie de fluorescence comme la fluorescence de corrélation de spectroscopie (FCS) (Chiantia et al., 2007)

ou encore la microscopie de réflexion interne totale de fluorescence (TIRF) (Mathur et al., 2000; Mulligan et al., 2011). L'AFM fonctionne très bien sur des membranes modèles ou isolées à partir de membranes natives sur supports solides mais pas sur des échantillons vivants comme une cellule par exemple.

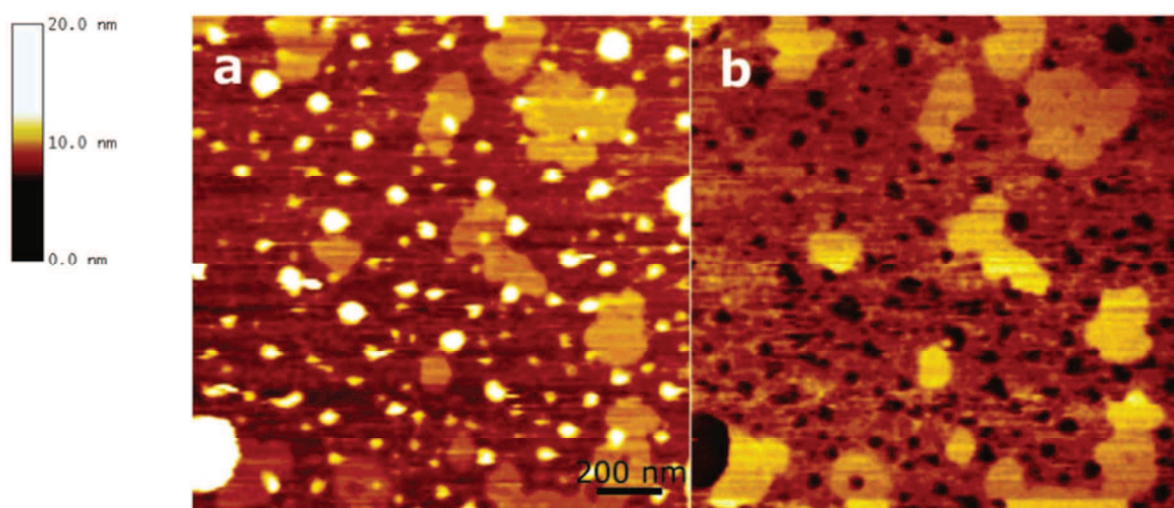


Figure 17 : Images AFM de N-Ras dans des bicouches supportées de POPC/BSM/Chol 43:43:14 ($T = 25\text{ °C}$). Quelques vésicules (ex: un dans le coin inférieur gauche), qui n'ont pas fusionné avec la surface de mica, apparaissent comme de gros points brillants (Nicolini et al., 2006).

4.4. La résonance magnétique nucléaire

Les principes de résonance magnétique nucléaire (RMN) peuvent aussi être appliqués à l'étude des membranes plasmiques. La résonance paramagnétique électronique (EPR) est la capacité de certains électrons à absorber puis à réémettre l'énergie d'un rayonnement électromagnétique lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique. Cette propriété (analogue de la RMN standard) est utilisée dans la spectroscopie RPE et permet de détecter les électrons non appariés (et uniquement eux) et de déterminer leur environnement. Pour l'étude des interactions molécules-membranes, différentes techniques de l'EPR (continuous wave EPR, electron spin echo envelope modulation (ESEEM) et double electron–electron resonance (ENDOR)) peuvent être combinées pour obtenir des informations sur l'ordre, la mobilité et la polarité de phospholipides ainsi que sur la mobilité d'agents exogènes dans la membrane (Gordon-Grossman et al., 2012). Dans le but d'obtenir un jeu complet de données, il est nécessaire d'utiliser des composés

spécifiques dit « spin-marqués » (comme des agents exogènes et/ou des phospholipides marqués à l'aide de nitroxyde) ou encore des lipides deutérés ou de l'eau. L'utilisation de phospholipides spin-marqués à divers endroits permet de sonder l'ordre à différentes profondeurs de la membrane. Il est aussi possible d'avoir des informations sur la profondeur d'insertion, l'orientation ou encore l'agrégation de molécules exogènes sur la membrane. L'EPR est utilisé pour l'étude de l'effet de la présence de surfactant (Deo et al., 2002), de lipopeptides (Dzuba and Raap, 2013), de certaines drogues comme la clomipramine (Yonar et al., 2013) ou encore de dendrimères (Ottaviani et al., 1999) sur la structure de la bicouche lipidique. Il est aussi possible de déterminer la localisation et la dynamique de peptides simples (Victor and Cafiso, 2001) et d'étudier la formation de nanodomains lipidiques (Heberle et al., 2010; Ionova et al., 2012) (Fig. 18) à l'aide de cette technique. L'inconvénient majeur de cette technique est qu'elle se limite à des membranes modèles, il est impossible de l'utiliser sur des échantillons vivants (cellules par exemple) du fait de leur trop grande complexité et du trop grand nombre de signaux parasites (cytoplasme, noyau, etc ...).

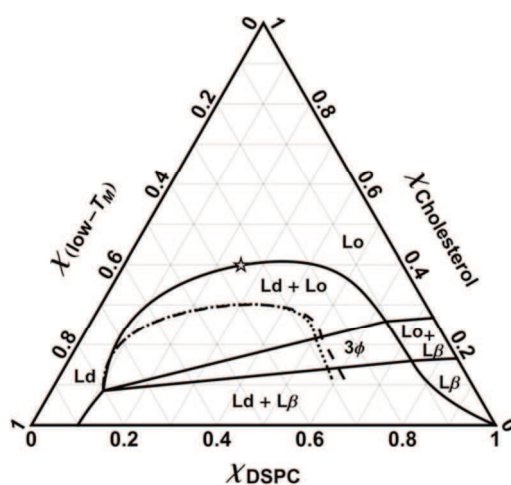


Figure 18 : Diagramme de phases reconstitué par EPR pour les systèmes DSPC/DOPC/chol (lignes pleines), DSPC/POPC/chol (tirets) et DSPC/SOPC/chol (pointillés).

4.5. Spectroscopie et microscopie de fluorescence

Principe de fluorescence :

La fluorescence est un phénomène photo-physique appartenant aux phénomènes de luminescence. Certaines molécules et atomes excités électroniquement sont capables d'émettre

de la lumière, c'est ce phénomène que l'on appelle luminescence. Il existe deux types de luminescence dépendant de la nature de l'état excité. Si l'émission de photons provient de l'état d'excitation singulet, le processus est alors appelé fluorescence, mais si elle provient de l'état d'excitation triplet, on parle alors de phosphorescence. La fluorescence est un phénomène très rapide, l'émission du photon après excitation se produit après un temps de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-6} s, alors que pour la phosphorescence, elle a lieu après 10^{-3} à 10 s pour la majorité de molécules organiques. La fluorescence est composée de trois principales étapes ; l'excitation, la relaxation non radiative et l'émission de fluorescence (Lakowicz, 2006). Toutes les molécules ne sont pas capables de réémettre de la lumière (fluorescence), elles sont représentées majoritairement par les hydrocarbures polyaromatiques et les hétérocycles. Ces molécules fluorescentes sont appelées fluorophores. Le processus responsable de luminescence est représenté par le diagramme de Jablonski (Fig. 19).

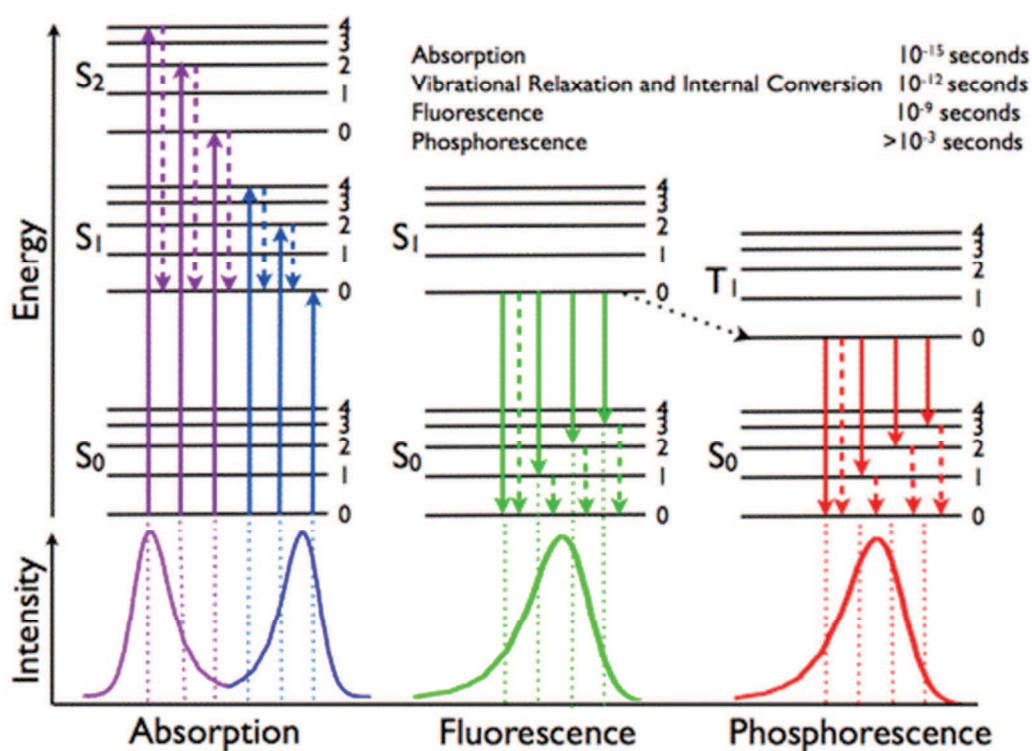


Figure 19 : Diagramme de Jablonski (www.photobiology.info). Les flèches pleines correspondent à des transitions radiatives qui se produisent lors de l'absorption (bleu et violet) ou de l'émission (vert pour la fluorescence, rouge pour la phosphorescence). Les flèches en pointillés représentent des transitions non radiatives.

L'émission de fluorescence est un processus radiatif dans lequel un photon est émis lors du retour à l'état fondamental S_0 du fluorophore. La différence d'énergie, ou longueur d'onde, qu'il peut y avoir entre l'absorption et l'émission est appelée déplacement de Stokes. Ce phénomène est un paramètre très important pour les fluorophores car plus il est grand, plus il permet de discriminer les photons provenant de l'excitation de ceux provenant de l'émission. Cela permet une détection de ces photons avec une plus grande sensibilité et donc un bruit de fond moindre. Une autre caractéristique importante des fluorophores est le rendement quantique de fluorescence (ϕ ou QY), soit le ratio du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés. Ce paramètre permet de décrire l'efficacité de fluorescence de la molécule à laquelle il appartient, soit la quantité d'énergie perdue par transitions non radiatives lors du retour à l'état S_0 . Chaque fluorophore possède d'autres paramètres qui lui sont propres comme la longueur d'onde à laquelle l'absorption de photons sera maximal ($\lambda_{\text{max abs}}$), la longueur d'onde à laquelle le plus de photons seront réémis ($\lambda_{\text{max em}}$) ainsi que son coefficient d'extinction molaire (ϵ) qui correspond à la probabilité de la molécule à absorber un photon (plus il est grand plus la probabilité que la molécule absorbe un photon est grande) ainsi que le temps de vie de fluorescence soit le temps durant lequel le fluorophore restera à l'état excité. L'intensité de fluorescence ou brillance qui caractérise un fluorophore est définie par le produit de son coefficient d'extinction molaire et de son rendement quantique ($\epsilon \times \text{QY}$) (Lavis and Raines, 2008).

Il existe différents paramètres de fluorescence exploitables en spectroscopie et microscopie comme l'intensité, le temps de vie (durée de vie à l'état excité), le transfert d'énergie par résonance de type Förster (et autres systèmes rationométriques), l'anisotropie ou encore le solvatochromisme. Ces deux derniers phénomènes sont couramment utilisés pour la création de senseurs environnementaux. Le premier, l'anisotropie de fluorescence, est la particularité d'une molécule à réémettre la lumière de façon non égale le long de différents axes de polarisation. Le manque de mouvement des fluorophores, sous application d'une lumière polarisée pour l'excitation, induira la réémission d'une lumière qui sera elle aussi polarisée. C'est ce phénomène que l'on appelle l'anisotropie de fluorescence (Jahnig, 1979; Maiti et al., 1998). Le second phénomène est la capacité d'un fluorophore à changer sa longueur d'onde d'émission en fonction du solvant dans lequel il se trouve. Certains fluorophores présentent un moment dipolaire plus grand dans l'état excité induit par un déplacement de charge photo induit (PCT), et suivant l'excitation, le solvant peut alors interagir avec la molécule en réduisant l'énergie de l'état

excité par une stabilisation de celui-ci par les molécules du solvant. Le dipôle de celle-ci va pouvoir se réorienter ou alors se relaxer suivant le dipôle du fluorophore, phénomène qui va ainsi réduire l'énergie de l'état excité de la molécule fluorescente. Ce phénomène est appelé relaxation du solvant (Fig. 20) (Yeh et al., 2014). Plus le solvant sera polaire, plus l'énergie d'émission sera faible (longueur d'onde d'émission plus importante).

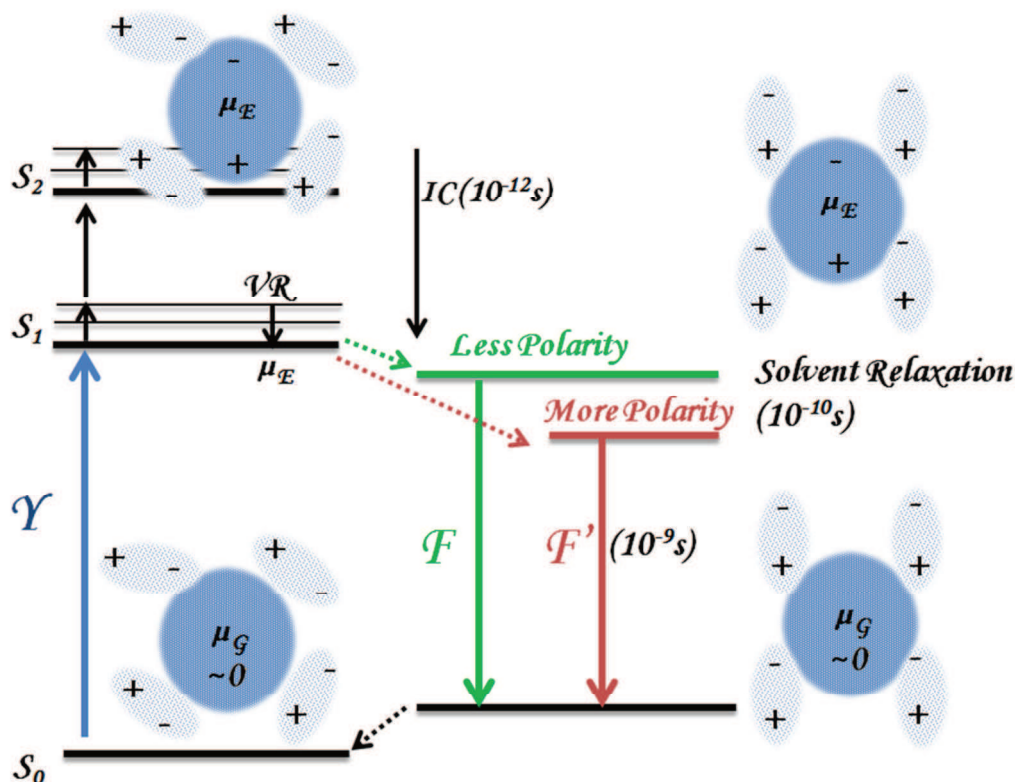


Figure 20 : Relaxation du solvant autour d'une sonde avec un moment dipolaire plus important dans l'état excité que dans l'état fondamental (Yeh et al., 2014).

Dans certaines conditions, il est possible de faire émettre de la lumière à un fluorophore en utilisant un second fluorophore qui va donner l'énergie qu'il a emmagasinée au premier fluorophore. Ce phénomène est appelé transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET). Ce phénomène peut avoir lieu entre deux fluorophores ayant un recouvrement entre le spectre d'émission du premier fluorophore appelé donneur et le spectre d'absorption du second appelé accepteur. La distance entre les deux fluorophores ne doit pas dépasser plus de $1,8 \times R_0$. R_0 est le rayon de Förster et correspond à la distance à laquelle le FRET, entre deux fluorophores donnés, a une efficacité de 50%. De plus l'orientation du dipôle entre le donneur et l'accepteur est importante, l'angle entre les deux ne doit pas être égal à 90° sous peine de ne pas avoir de

transfert d'énergie (Fig. 21). Ce phénomène est très utile dans les études de changements de conformations de protéines ou encore pour l'étude de liaisons entre différentes molécules (Sekar and Periasamy, 2003).

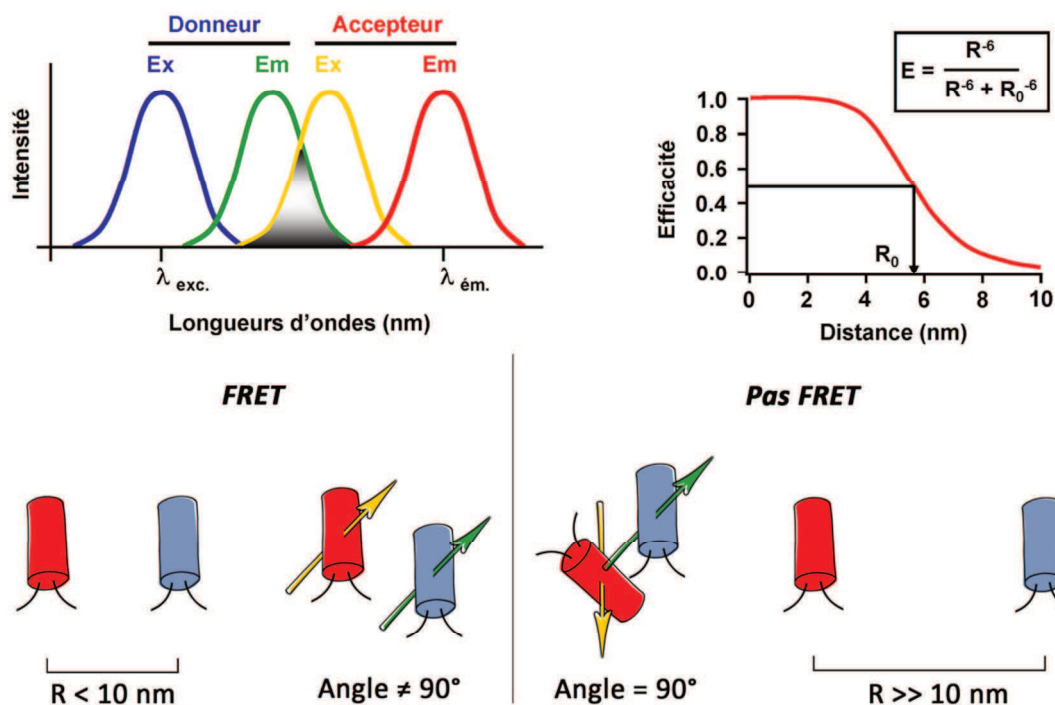


Figure 21 : Condition nécessaire au transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET).

La spectroscopie de fluorescence :

L'étude des phénomènes de fluorescence peut se faire directement par spectroscopie, et ainsi caractériser les nouveaux fluorophores. On peut ainsi définir le spectre d'absorption (à l'aide de spectrophotomètre UV-visible), le spectre d'émission (à l'aide d'un spectrofluorimètre) ainsi que de calculer les différents paramètres introduits dans le paragraphe précédent (ϵ , ϕ , λ_{\max} absorption et émission, etc...). Le suivi des phénomènes biophysiques ou biochimiques est réalisable directement, mais cela requiert soit le marquage de protéines ou de tout composé d'intérêt par un fluorophore de type « green fluorescent protein » (GFP) (Tsien, 1998), soit l'utilisation de sondes moléculaires adaptées au phénomène que l'on veut observer. Il est possible par exemple de suivre l'agrégation de certaines molécules (Maiti et al., 1998), l'ordre lipidique d'une membrane (Van Blitterswijk et al., 1981; Jahnig, 1979), de suivre la viscosité d'un milieu (Haidekker and Theodorakis, 2007), ou encore de suivre le comportement d'une seule et unique molécule (Weiss, 1999).

La microscopie de fluorescence :

L'utilisation de sondes spécifiques ou le marquage de protéines à l'aide de fluorophores permettent de visualiser directement par microscopie optique les zones d'un échantillon mises en évidence à l'aide de ces marqueurs : la microscopie de fluorescence. Il en existe deux types, la microscopie de fluorescence dite « classique » et celle dite de « haute résolution ».

La microscopie de fluorescence classique regroupe les techniques de microscopie, épifluorescente (confocale, deux-photons, TIRF...), de détection à champ large et en molécule unique. Ces techniques sont aujourd'hui utilisées de façon routinière dans les laboratoires et permettent de suivre une multitude de phénomènes biologiques comme la localisation de protéines, la régulation de l'exocytose, ou encore de suivre l'organisation des lipides dans la membrane (Bezzi et al., 2004; Dietrich et al., 2001; Douglass and Vale, 2005; Helmchen and Denk, 2005; Nguyen and Hildreth, 2000; Sekar and Periasamy, 2003). La microscopie de super résolution (ou haute résolution) est une technique de microscopie de fluorescence relativement récente. Elle permet de s'affranchir des limites de résolution du microscope épifluorescent et donc de visualiser des objets plus petits. Pour ce faire, deux approches ont été utilisées. La première, mise au point par S. Hell (Prix Nobel de Chimie 2014), nommée microscopie à déplétion par émission stimulée (STED, stimulated emission depletion) est basée sur l'utilisation de deux faisceaux afin de forcer les molécules à l'extérieur du champ à se désexciter et ainsi ne conserver que les informations provenant du centre, soit une région de quelques nanomètres (Hell, 2007, 2009; Hell and Wichmann, 1994; Willig et al., 2006). La seconde méthode, développée par Betzig et Moerner est basée sur la microscopie en molécule unique et permet la détection de lumière émise par une seule et unique molécule. Deux techniques super résolution majoritaires ont découlé de ces travaux ; PALM et STORM (Bates et al., 2007; Betzig et al., 2006; Manley et al., 2008; Moerner and Kador, 1989; Rust et al., 2006; Shroff et al., 2008). Les techniques de super résolution sont particulièrement prometteuses pour les recherches sur les radeaux lipidiques grâce à la possibilité de descendre à l'échelle nanoscopique. Malgré tout, les vitesses d'acquisition restent restrictes, ce qui est une limitation importante pour la détection de structures lipidiques aussi dynamiques.

Les techniques de fluorescence sont un domaine de choix pour l'étude des radeaux lipidiques et de l'organisation de la membrane plasmique d'une cellule, mais ces techniques nécessitent l'utilisation de marqueurs spécifiques pour mettre en évidence les radeaux ou certaines propriétés membranaires.

5. Les sondes fluorescentes pour l'étude de la membrane plasmique

Les différentes recherches menées sur l'étude de la membrane et des radeaux lipidiques ont introduit un grand nombre de marqueurs différents, appelés sondes, au cours des années. Chacune de ces sondes présente ses intérêts et ses limitations, dépendant du type de membrane étudiée (native versus modèle) ainsi que de la technique utilisée. Elles peuvent être divisées en trois classes.

La première classe regroupe les sondes qui marquent spécifiquement les composants des radeaux lipidiques comme les gangliosides (GM1 par exemple) ou le cholestérol. La seconde classe, quant à elle, regroupe les sondes qui vont s'avérer sélectives à un domaine, Lo ou Ld. En revanche, les sondes sensibles à leur environnement pouvant distinguer les phases Lo et Ld (probablement la classe de sonde la plus récente) se retrouvent affiliées à la troisième classe. Une description plus détaillée des différentes classes va s'ensuivre et le tableau 1 résume les propriétés spectroscopiques ainsi que la préférence de phase de sondes moléculaires et lipidiques (Klymchenko and Kreder, 2014).

Fluorescent Membrane Probes: Spectral and Phase Partitioning Properties					
Name	Abs Max (nm)	Fluo Max (nm)	Partitioning in GUVs ^a	Partitioning in GMPVs	Reference
Cholesterol derivatives					
TF-Chol	495	507	Lo (A, 80%)	Lo (66%)	Sezgin et al., 2012b)
NBD-Chol	470	538	Ld (A)	–	Baumgart et al., 2007a)
Cholestatrienol	324	390	Lo (A)	–	Baumgart et al., 2007a)
PE head group labeled					
NBD-DOPE	470	538	Ld (A)	Ld ^b	Baumgart et al., 2007a
NBD-DPPE	470	538	Lo/Ld (A-C)	Lo ^b	Baumgart et al., 2007a
Rh-DOPE	560	583	Ld (A)	Ld ^b	Baumgart et al., 2007a
Rh-DPPE	560	583	Ld (A)	Ld ^b	Baumgart et al., 2007a
Texas Red-DPPE	595	614	Ld (A)	–	Baumgart et al., 2007a
DSPE-KK114	640	660	Ld (D)	–	Honigmann et al., 2013
DSPE-PEG-KK114	640	660	Lo (D)	–	Honigmann et al., 2013
PC acyl chain labeled					
5-BODIPY-PC	505	512	Ld (A)	–	Baumgart et al., 2007a
12-NBD-PC	470	538	–	Ld	Sengupta et al., 2008
SM acyl chain labeled					
5-BODIPY-SM	505	512	Ld (A, 78%)	–	Sezgin et al., 2012b
12-BODIPY-SM	505	512	Ld (A, 69%)	Lo (66%)	Sezgin et al., 2012b
6-NBD-SM	470	538	Ld (A, 88%)	Ld (54%)	Sezgin et al., 2012b
12-NBD-SM	470	538	Ld (A, 95%)	Ld (65%)	Sezgin et al., 2012b
4-Atto647N-SM	644	669	Ld (A, 97%)	Ld (82%)	Sezgin et al., 2012b
4-Atto532-SM	532	552	Ld (A, 90%)	Ld (53%)	Sezgin et al., 2012b
SM head group labeled					
SM-Atto647N	644	669	Ld (A, 97%)	Ld (85%)	Sezgin et al., 2012b
SM-Atto532	532	552	Ld (A, 88%)	Ld (62%)	Sezgin et al., 2012b
LCH dyes					
DiI-C18	550	568	Ld (A), Lo (B)	–	Baumgart et al., 2007a
DiD-C18	648	670	Ld (A)	Ld	Sezgin et al., 2012b
FAST DiO	490	505	Ld (A)	–	Baumgart et al., 2007a
R18	554	627	Ld (A)	–	Baumgart et al., 2007a
DPH	350	452	Lo/Ld (A, B)	–	Baumgart et al., 2007a
LcTMA-DPH	350	452	Lo (A)	–	Xu et al., 2001
PAH dyes					
Naphthopyrene	–	460	Lo (A)	–	Baumgart et al., 2007a
Perylene	436	447	Lo/Ld (A)	–	Baumgart et al., 2007a
Terrylene	–	–	Lo (A)	–	Baumgart et al., 2007a
Solvatochromic probes					
Laurdan	363	460-520	Lo/Ld (A,E)	Lo/Ld	Bagatolli, 2006
C-Laurdan	383	460-520	Lo/Ld (C)	Lo/Ld	Kim et al., 2007
di-4-ANEPPDHQ	482	681	Lo/Ld (C)c	–	Jin et al., 2006
F2N12S	416	490/580	Lo/Ld (A) ^c	–	Klymchenko et al., 2009
F66NS	416	490/580	Lo/Ld (A) ^c	–	Darwich et al., 2013
NR12S	550	626	Lo/Ld (A) ^c	–	Kucherak et al., 2010
Molecular rotors					
FCVJ	433	500	–	–	Haidekker et al., 2001
C-Laurdan-2	390	530	Lo/Ld (C)	–	Kim et al., 2008
BODIPY-Ph-C12	500	512	Lo/Ld (A)	–	Kuimova et al., 2008
GM1 derivatives					
5-BODIPY-GM1	505	512	Ld (A, 79%)	Lo (65%)	Sezgin et al., 2012b
BODIPY-GM1	505	512	Lo (A)	–	Samsonov et al., 2001
6-NBD GM1	470	538	Ld (A, 75%)	Lo (67%)	Sezgin et al., 2012b

Abs Max, absorption maxima; Fluo max, fluorescence maxima

^aPartitioning of probes in GUVs for the following lipid mixtures: A, SM/DOPC/Cholesterol; B, DSPC/DOPC/Cholesterol; C, DPPC/DOPC/Cholesterol; D, DPPC/PhyPC/Cholesterol; E, SM/POPC/Cholesterol

^bReference to (Sengupta et al., 2008)

^cSome preference to Ld phase.

Tableau 1 : Caractéristiques spectrales et préférence de phase de sondes fluorescentes membranaires (Klymchenko and Kreder, 2014).

5.1. Les sondes lipidiques

Parmi cette classe de sondes, il en existe une, célèbre et bien documentée, très utilisée dans les recherches sur les radeaux lipidiques, la toxine cholérique B marquée par un fluorophore (CT-B, Cholera Toxin B). Cette sous-unité protéique (de 12kDa), sécrétée par la bactérie *Vibrio cholera*, est capable de lier sous forme pentamérique le ganglioside GM1 (Merritt et al., 1994), GM1 qui est considéré comme le composant clé des domaines lipidiques (Simons and Ikonen, 1997). Le principal défaut de CT-B est son manque de spécificité, cette protéine est capable de marquer d'autres sucres présents à la surface de la membrane plasmique comme le galactose (Munro, 2003; Uesaka et al., 1994). De plus, CT-B induit la formation de domaines lipidiques en s'agrégant à la surface de la membrane en présence de GM1 (Wang et al., 2004). L'utilisation de CT-B ne doit pas se faire à la légère et une attention importante doit être apportée lors de l'expérimentation. De plus, les résultats obtenus doivent être comparés avec d'autres sondes et techniques de détection.

Une alternative est l'utilisation d'anticorps fluorescents capables de lier spécifiquement certains lipides comme le cholestérol (Bíró et al., 2007; Perl-Treves et al., 1996). L'utilisation d'anticorps fluorescents dans ce contexte est chose plutôt rare, le cholestérol étant présent dans les deux types de domaines lipidiques, Lo et Ld. Le seul exemple connu, à ce jour, d'une petite molécule spécifique aux composants lipidiques est la filipine. Cette molécule est très utilisée comme marqueur histochimique pour le cholestérol dans les membranes cellulaires (Harzer and Kustermann-Kuhn, 2001). Malgré tout, son application pour le marquage lipidique est finalement peu utilisée, de par ses faibles propriétés fluorescentes, sa toxicité intrinsèque et sa capacité à perturber les radeaux (Orlandi and Fishman, 1998). L'intérêt de petites molécules organiques capables de reconnaître des composants lipidiques spécifiques n'est plus à démontrer, mais elles restent manquantes à ce jour.

5.2. Les sondes sélectives d'une phase, Lo ou Ld

L'approche la plus directe pour l'étude des domaines lipidiques reste l'utilisation de sondes ressemblant à des lipides, ayant une forte affinité pour la membrane et étant capables de se lier spécifiquement dans une phase, Lo ou Ld (Fig. 22). Jusqu'ici, plusieurs travaux ont été menés dans le but de comprendre la relation entre la structure d'une telle sonde et sa préférence pour les

phases Lo/Ld (Baumgart et al., 2007a; Sengupta et al., 2008; Sezgin et al., 2012; Shaw et al., 2006). Ces études ont montré que la plupart de ces sondes se lient préférentiellement dans les phases Ld, seules quelques exceptions vont se lier dans les phases Lo. Il semblerait que ce soit une tendance générale, la plus haute compacité lipidique des phases Lo exclut la liaison de molécules exogènes à ces phases. Deux familles sont utilisées pour décrire cette classe de sonde, la première basée sur les lipides marqués par un fluorophore, la seconde sur des molécules lipophiles marquées de nature non lipidique.

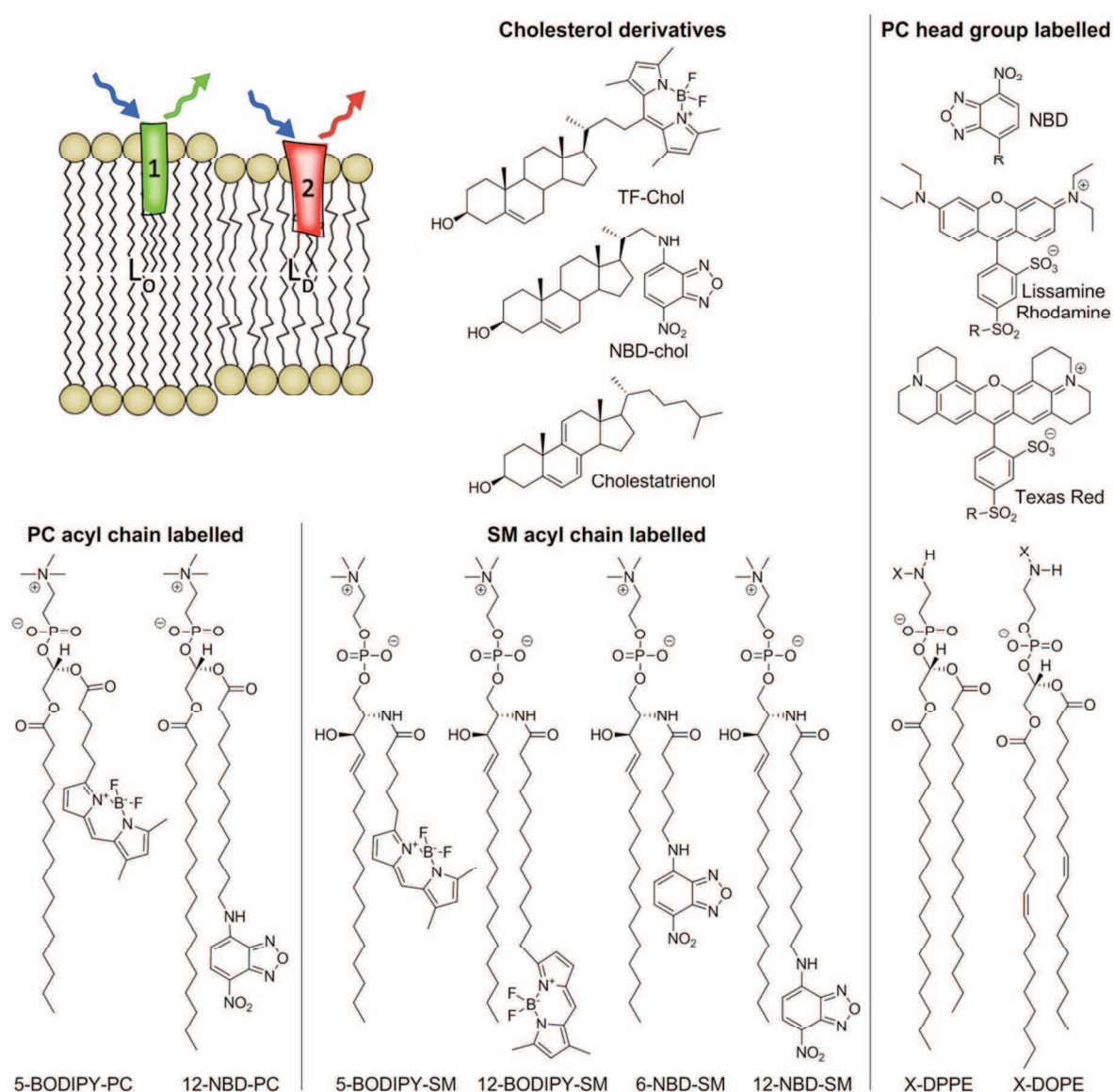


Figure 22 : Dérivés lipidiques fluorescents avec une préférence entre les phases Lo et Ld. Le schéma dans le coin supérieur gauche montre le principe du partage entre les phases des sondes.

5.2.1. Les dérivés lipidiques

La méthode la plus commune pour l'obtention d'une sonde fluorescente membranaire est de marquer un lipide, phospholipide ou cholestérol, à l'aide d'un fluorophore (Maier et al., 2002). Parmi les dérivés du cholestérol, 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl (NBD)-cholesterol, TopFluor-Cholesterol, et Cholestatriénol font partie des plus intéressants (Fig. 22) (Wüstner, 2007). Les deux premières molécules sont des dérivés de cholestérol portant un groupement fluorescent le long de la chaîne latérale. Phénomène intéressant, malgré leur structure proche, ces deux molécules présentent une préférence de phase différente dans les GUVs de composition mixte Lo/Ld ; NBD-Chol préfère les phases Ld (Baumgart et al., 2007a) alors que TopFluor-Chol préfère les phases Lo (Sezgin et al., 2012). Ces différences de comportement proviennent du fluorophore : NBD étant plus polaire que les BODIPY, celui-ci peut se loger dans la partie hydrophile de la membrane et perturbe l'insertion du cholestérol dans la bicouche dans les phases Lo (Abrams and London, 1993; Kaiser and London, 1998). De plus il a été démontré que même une modification mineure de la structure du cholestérol entraîne une diminution drastique de la répartition dans les phases Lo (Scheidt et al., 2003; Xu et al., 2001). Le cholestariénol quant à lui présente la meilleure répartition dans les phases Lo (Baumgart et al., 2007a), phénomène pas surprenant de par sa structure très proche du cholestérol. Malheureusement sa faible photo-stabilité limite grandement ses applications en microscopie.

Les phospholipides présentent la plateforme de préparation de sonde membrane la plus versatile. Ils peuvent être facilement marqués soit au niveau de leur chaîne acyle soit au niveau de leur tête polaire, marquage préférentiel pour les lipides à base d'éthanolamine (PE). Les dérivés PE avec des chaînes acide gras insaturées (tel que DOPE, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoéthanolamine) marquées avec un fluorophore montrent une nette préférence pour les phases Ld (Baumgart et al., 2007a). Les dérivés PE avec des chaînes acide gras saturées (tel que DPPE, 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) montrent quant à eux une préférence moins prévisible après la modification de leur tête polaire. Ceux portant un dérivé de sulforhodamines (Lissamine Rhodamine, Texas Red, Texas Red capryol) vont se loger préférentiellement dans les domaines Ld par l'action du groupement sulfite (charge et taille). Ce comportement met en avant les problèmes que peuvent causer la taille ainsi que la charge du fluorophore (Baumgart et al., 2003; Dietrich et al., 2001; Veatch and Keller, 2003). Le dérivé NBD-DPPE, portant le fluorophore le plus petit et le plus neutre NBD, présente tout juste une préférence pour les phases Lo dans un mélange lipidique SM/POPC/cholestérol (POPC, 1-

palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) (Dietrich et al., 2001). D'autres travaux ont montré qu'en utilisant des mélanges de DSPC/DOPC/cholestérol (DSPC, 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DOPC, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) et de SM/DOPC/cholestérol, NBD-DPPE va montrer une préférence pour les phases Ld, bien qu'une faible répartition dans les phases Lo peut être observée de ces travaux (Fig. 23A) (Baumgart et al., 2007a). Les études réalisées à partir de vésicules géantes de membrane plasmique (GPMVs, Giant Plasma Membrane Vesicles), indiquent que NBD-DPPE lie préférentiellement les phases Lo (Fig. 23B-D) (Sengupta et al., 2008). La répartition de NBD-DPPE est très dépendante de la composition lipidique choisie pour la création des phases Lo/Ld. Un exemple remarquable est un ganglioside GM1 modifié au niveau de sa tête polaire qui présente une forte affinité pour les phases Lo dans un mélange SPM/DOPC/DOPE/cholestérol (Samsonov et al., 2001).

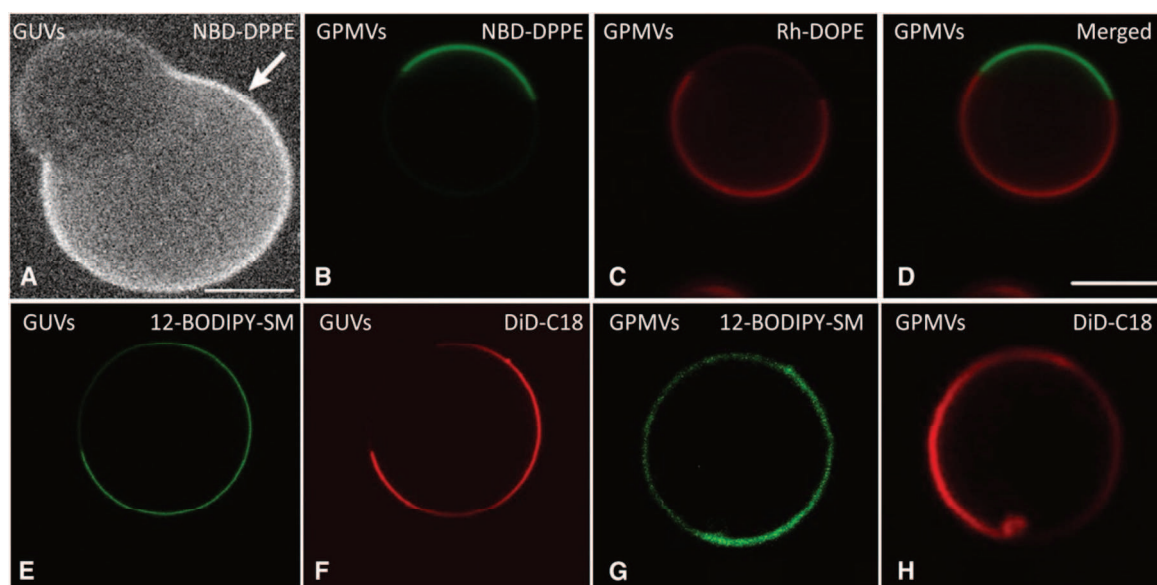


Figure 23 : Répartition de dérivés lipidiques fluorescents entre les phases Lo et Ld dans des membranes modèles et natives. (A-D) Projection hémisphérique d'images confocales de GUVs (A : mélange DSPC/DOPC/Cholestérol, la flèche indique la phase Ld) et (B-D) images confocales de GPMVs marqué par NBD-DPPE (Lo) et RH-DOPE (Ld) (A) adapté de Baumgart et al., 2007b (B-D) adapté de Sengupta et al., 2008. (E-H) Répartition de phase de 12-BODIPY-SM (Lo) (E et G) et DiD-C18 (Ld) (F et H). Images fluorescentes confocales de la répartition de de 12-BODIPY-SM (E et G) et DiD-C18 (F et H) dans des GUVs (SM/DOPC/cholestérol) et dans des GPMVs. Adapté de Sezgin et al., 2012.

Une autre approche est de marquer les têtes polaires PE en utilisant un long espaceur hydrophile comme le polyéthylène glycol (PEG) par exemple, développé à l'origine à l'aide de la biotine et utilisé dans les études de l'agglomération lipides/protéines dans la membrane plasmique (Wang et al., 2005). Dans des études récentes, le lipide DSPE (DPSE, 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) a été modifié au niveau de sa tête polaire à l'aide d'un analogue hydrophile de Atto647N (KK114) par un espaceur PEG2000 (Fig. 24) ((Honigmann et al., 2013). Le lipide ainsi obtenu présente une remarquable préférence pour la phase Lo dans des membranes supportées composées de phases Lo et Ld provenant d'un mélange ternaire de 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), cholestérol et 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PhyPC) comme substitut pour le DOPC. L'analogue contrôle, sans espaceur PEG, présente, lui, une exclusion des phases Lo, indiquant ainsi que l'espaceur joue un rôle important dans la diminution de l'effet perturbant du fluorophore dans la répartition dans les phases. Ce phénomène d'exclusion de la phase Lo en faveur de la phase Ld a été observé avec d'autres fluorophores ATTO directement liés au niveau de la tête polaire de sphingomyéline (SM-Atto532 et SM-Atto647N, Fig. 24) (Sezgin et al., 2012), la sphingomyéline étant pourtant un constituant clé des phases Lo. Ce comportement confirme que de larges fluorophores chargés attachés aux têtes polaires perturbent fortement la répartition de ce type de sonde dans les phases Lo.

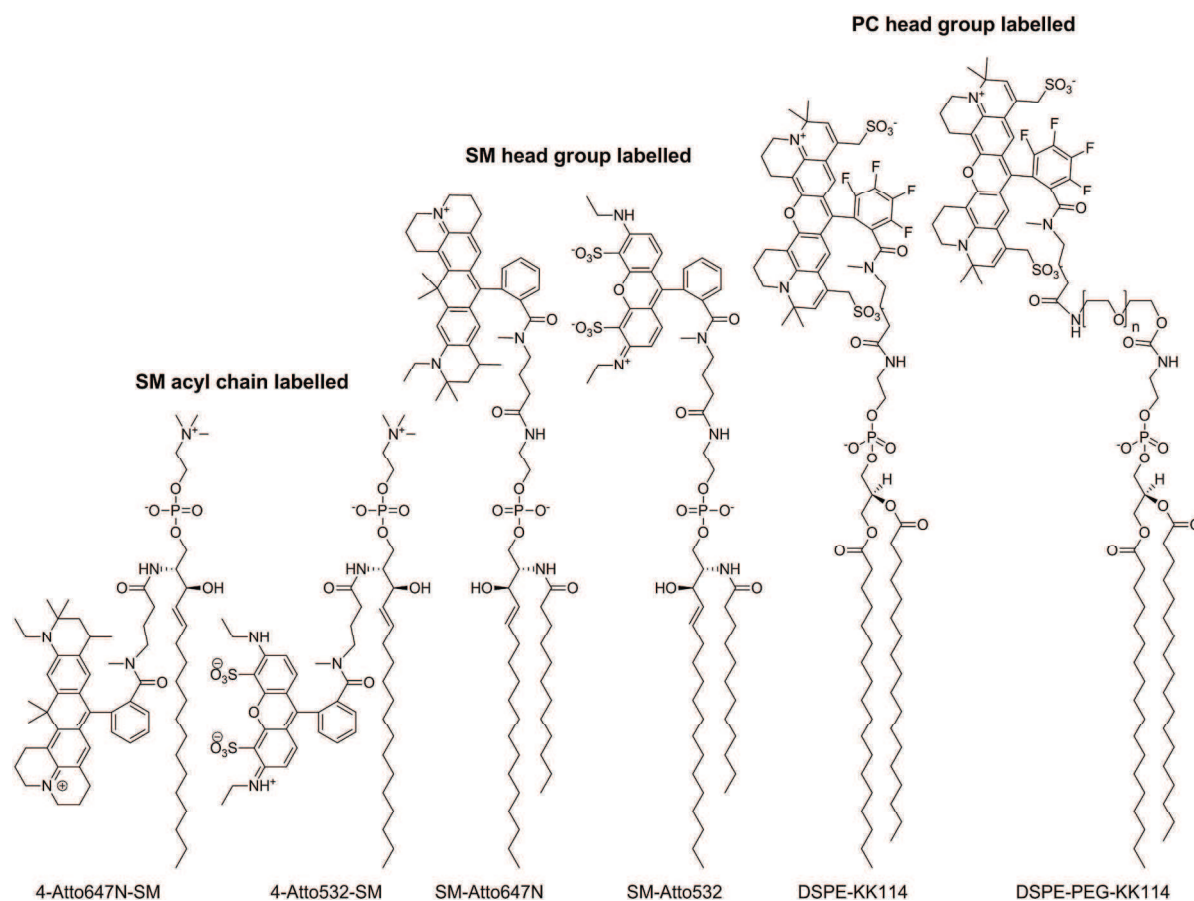


Figure 24 : Lipides porteurs de fluorophores ATTO pour l'étude des radeaux lipidiques.

Parmi les lipides dont la chaîne acyle a été modifiée, on va retrouver principalement les dérivés BODIPY et NBD de phosphocholine (PC) et de SM. La raison principale de cela est que ce type de modification nécessite l'utilisation de petits fluorophores peu polaires, les habituelles rhodamines et cyanines ne peuvent donc pas être utilisées ici. Les représentants des dérivés PC (5-BODIPY-PC, (Fig. 22) et SM (5-BODIPY-SM) sont clairement exclus des phases Lo avec une forte préférence pour les phases Ld. (Fig. 25E et 25F) ((Baumgart et al., 2007a; Sezgin et al., 2012). Ces données sont particulièrement surprenantes, PC doit se retrouver dans les deux types de phase et SM est le constituant majoritaire des phases Lo. D'autres rapports indiquent que 5-BODIPY-SM est utilisée pour marquer les domaines riches en sphingomyéline dans les membranes plasmiques (Marks et al., 2008) ainsi que pour mimer SM dans les études de transport membranaire (Chen et al., 1997; Cheng et al., 2006; Maier et al., 2002). De plus, les données obtenues sur les GPMVs suggèrent que la préférence des sondes 12-BODIPY-SM et 5-BODIPY-SM va aux phases Lo (Fig. 23G) ((Sezgin et al., 2012) et que la répartition des sondes NBD marquant SM (6-NBD-SM, 12-NBD-SM, Fig. 22) et GM1 (6-NBD-GM1) se fait dans les deux phases sans préférence (Sengupta et al., 2008; Sezgin et al., 2012). D'autres dérivés de SM marqués par un fluorophore au niveau de leur chaîne acyle, dont les récents dérivés ATTO (4-Atto532-SM et 4-Atto647N-SM, Fig. 24) ainsi que les

dérivés de GM1 (Atto-647-GM1), montrent une nette préférence pour les domaines Ld aussi bien dans les GUVs que dans les GPMVs (Sezgin et al., 2012). Cette préférence est clairement reliée à l'effet du fort encombrement stérique de ces imposants fluorophores chargés, les rejetant des phases compactes Lo pour les phases Ld plus accessibles. Le marquage fluorescent, aussi bien sur les têtes polaires que sur les chaînes acyles, peut provoquer une forte altération de la répartition de ces sondes lipidiques. A cet égard les fluorophores NBD et BODIPY apparaissent comme étant les moins perturbants par leur compacité et leur nature peu polaire.

5.2.2. Les dérivés lipophiliques

Une alternative simple aux sondes basées sur les lipides est l'utilisation de marqueurs ayant des propriétés hautement lipophiliques ou amphiphiliques, marqueurs appelés sondes lipophiliques. Ici seuls les exemples de sondes lipophiliques les plus importantes pour les recherches sur les radeaux lipidiques seront abordées. Il existe deux classes de sondes définies comme suit : les marqueurs portant de longues chaînes hydrocarbures (marqueurs LCH) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (marqueurs PAH). Les représentants typiques des marqueurs LCH sont des cyanines et rhodamines alkylées (Fig. 25A). Les cyanines, comme 1,1'-dialkyl-3,3,3',3'-tetraméthylindodicarbocyanine (DiI) et 1,1'-dialkyl-3,3'-oxacarbo-cyanine (DiO) portent deux chaînes hydrocarbures ensemble avec une charge nette positive qui leur permet de ressembler aux lipides. Les cyanines portant des chaînes insaturées (fast DiI et fast DiO) sont des sondes classiques des phases Ld (Baumgart et al., 2007a). D'un autre côté, les sondes cyanines portant des chaînes saturées révèlent un comportement moins prévisible. L'augmentation de la longueur de chaîne va favoriser la répartition des marqueurs DiI dans les phases Lo de mélange DSPC/DOPC/cholestérol (Fig. 25B-25E), les marqueurs portant des chaînes d'une longueur de 20 et 22 carbones préfèrent les phases Lo (Baumgart et al., 2007a). Malgré tout cette règle ne s'applique pas au mélange SM/DOPC/cholestérol où tous les marqueurs DiI étudiés dont la taille de chaîne varie entre 12 et 22 carbones montrent une préférence pour les phases Ld. Il est clair que la répartition des marqueurs DiI dans les phases ne dépend pas uniquement de la nature de celle-ci mais aussi de la compatibilité entre les lipides et le marqueur. En effet la structure de DiI-C20 est plus proche de DSPC que de SM. Néanmoins, les études cellulaires ont montré que l'endocytose de ces marqueurs dépend fortement de la longueur de la chaîne alkyle ainsi que de son insaturation. Ces résultats ont été interprétés comme une répartition différentielle de ces

marqueurs dans les phases Lo et Ld des membranes plasmiques (Mukherjee et al., 1999). Malgré tout, dû à leur forte photostabilité, DiI-C18 et ses analogues restent des outils indispensables pour les études sur les radeaux lipidiques en microscopie de fluorescence, en particulier dans les études de diffusion latérale par microscopie de corrélation de fluorescence (FCS) (Gielen et al., 2009; Gombos et al., 2008; Kahya et al., 2003). Étonnamment, un analogue de DiI-C18 avec une conjugaison étendue, DiD-C18, est exclu de la phase Lo au profit de la phase Ld dans des GUVs et GPMVS (Fig. 23F et 23H) (J et al., 2010; Sezgin et al., 2012). Rhodamine-C18 (R18), un autre marqueur commun des lipides, porte une unique longue chaîne hydrocarbure ainsi qu'un fluorophore chargé positivement. Il montre une nette préférence pour les phases Ld (Baumgart et al., 2007a), ce qui confirme la tendance générale que les marqueurs membranaires basés sur rhodamine sont exclus des phases Lo.

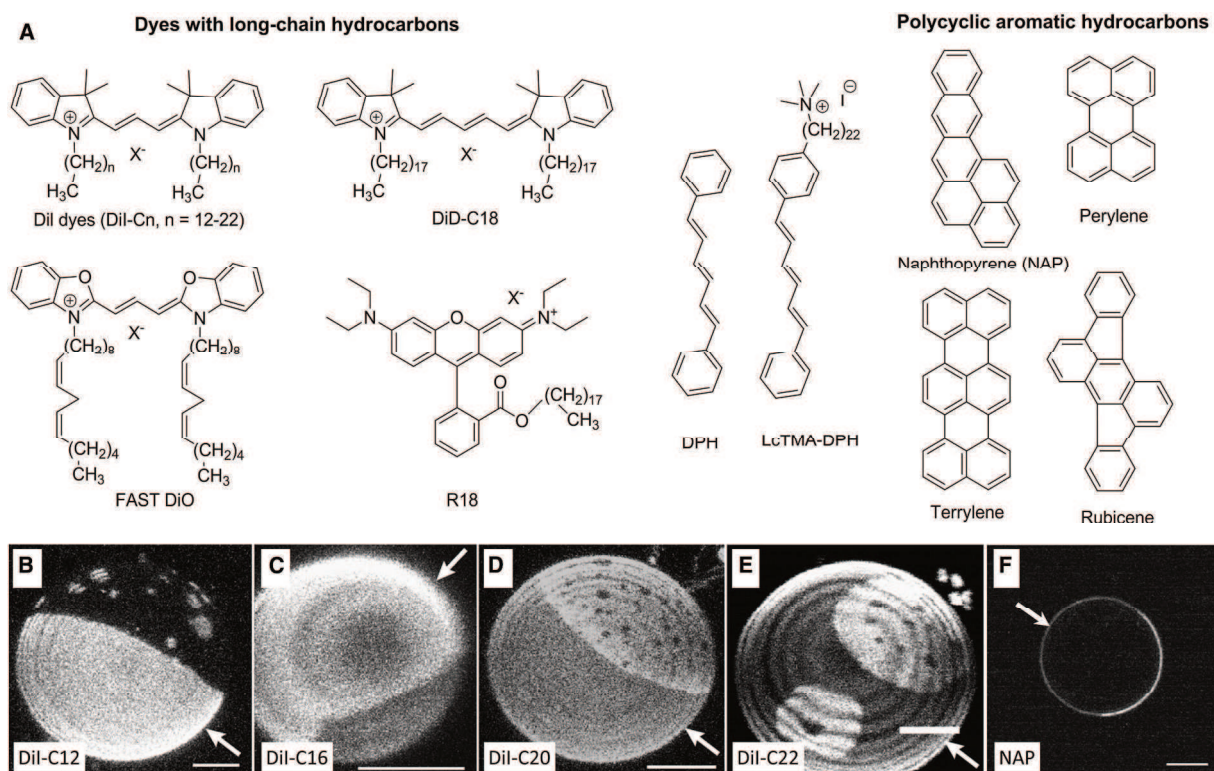


Figure 25 : Marqueurs lipophiliques et leur répartition entre les phases Lo et Ld de GUVs. (A) Structures chimiques des marqueurs lipophiliques. (B-F) Images de GUVs (la flèche indiquant les phases Ld). (B-E) Effet de la longueur de la chaîne des marqueurs DiI sur leur répartition entre les phases. Projection hémisphérique d'images confocales de GUVs (DSPC/DOPC/cholestérol) marquées par les sondes DiI. (F) Remarquable présence du marqueur NAP dans les phases Lo de GUVs (SM/DOPC/cholestérol). Les images équatoriales de GUVs ont été obtenues par microscopie deux photons à une longueur d'ondes d'excitation de 750 nm. (B-F)

Adapté de (Baumgart et al., 2007b).

La seconde classe de marqueurs lipophiliques, les marqueurs PAH, sont des composés de nature aromatique neutre sans chaîne alkyle (Fig. 25A). Les plus connus des marqueurs PAH, comme le terrylène ou le naphthopyrène (NAP), montrent une préférence claire pour les phases Lo (pour NAP voir Fig. 25F) (Baumgart et al., 2007a; J et al., 2010). Leur structure planaire, similaire au cholestérol, leur confère la capacité de s'intercaler efficacement entre les lipides de la phase Lo. D'autres marqueurs PAH comme le pérylène et le rubicène, ne vont pas montrer de préférence pour une phase particulière dans un mélange de SM/DOPC/cholestérol (Baumgart et al., 2007a), alors que dans un mélange de DSPC/DOPC/cholestérol, le pérylène montre quelques préférences pour les phases Lo (Zhao et al., 2007). L'application de ce type de marqueurs reste, malgré tout, limitée à des membranes modèles. Ces marqueurs sont très éloignés structurellement des lipides ou d'amphiphiles, ce qui, dans un contexte cellulaire, va provoquer une faible spécificité aux membranes plasmiques. Ils peuvent se lier à n'importe quelle biomolécule possédant un site de liaison apolaire. Une combinaison intéressante, des marqueurs LCH et de PAH, sont les dérivés DPH (LcTMA-DPH ; Fig. 25A) portant un groupement chargé au bout d'une longue chaîne hydrocarbure (Beck et al., 1993). Contrairement à ses composés parents, il lie avec une haute spécificité la phase Lo (Haluska et al., 2008; Xu et al., 2001), montrant ainsi l'importance de la chaîne alkyle pour l'accommodation du marqueur dans cette phase fortement compacte. La présence du groupement chargé pourrait permettre à ce marqueur de montrer une spécificité aux membranes cellulaires nettement plus importante que les marqueurs PAH, mais l'application cellulaire de ce type de marqueur reste à explorer.

5.3. Les sondes sensibles à leur environnement

Comme montrées précédemment, les sondes sélectives aux phases sont des outils puissants pour les membranes modèles mais leurs applications au niveau du vivant sont plus obscures car leur répartition entre les phases Lo et Ld dépend fortement de la nature des lipides constituant ces phases. Afin d'éviter ce problème d'imprécision de répartition, il est conseillé d'avoir recours à des sondes reconnaissant les propriétés des phases (Bagatolli, 2006), en changeant par exemple leur couleur d'émission, leur temps de vie ou encore leur intensité. Cela est possible en utilisant les sondes sensibles à leur environnement. Elles possèdent la capacité de modifier leurs propriétés spectroscopiques en réponse aux paramètres environnementaux comme la polarité, l'hydratation, la viscosité, etc. (Demchenko et al., 2009). Ici, deux classes de sondes

peuvent être mentionnées, les sondes solvatochromes et les sondes sensibles à la viscosité (rotors moléculaires). La première classe change sa couleur en réponse à la polarité de l'environnement alors que la seconde change son intensité de fluorescence et son temps de vie en fonction de la viscosité du milieu. La phase Lo est caractérisée par une compacité plus importante de ces lipides comparés aux phases Ld, cela signifie aussi une plus grande viscosité et une hydratation moindre (moins d'espace pour les molécules d'eau) de ces phases (M'Baye et al., 2008). Par conséquent les sondes solvatochromiques aussi bien que les rotors moléculaires possèdent la capacité de distinguer les phases Lo des phases Ld.

5.3.1. Les sondes solvatochromes

Les sondes solvatochromes font partie des mieux connues et des plus anciennes sondes membranaires, mais leur application aux recherches sur les radeaux lipidiques est assez récente. Ces marqueurs montrent de forts changements de moment dipolaire sous une excitation électronique. Les interactions dipôle-dipôle et spécifiques de ces sondes avec leur environnement vont provoquer des changements au niveau de l'énergie de transition électronique du marqueur et ainsi affecter le maximum d'émission et d'excitation par un déplacement de ces longueurs d'ondes. L'exemple le plus classique est le marqueur Laurdan (Fig. 26A) (Bagatolli, 2006), qui est parmi les premiers marqueurs à avoir apporté une image des phases Lo et Ld dans des membranes modèles (Dietrich et al., 2001). Laurdan se distribue équitablement entre les phases Lo et Ld, montrant un fort déplacement vers le bleu de son émission dans les phases Lo de membranes modèles, ce qui permet d'imager des domaines séparés sur des GUVs composés de lipides synthétiques ainsi que de surfactants pulmonaires naturels (Fig. 26B) (Bagatolli, 2006; Dietrich et al., 2001; Parasassi et al., 1997). Récemment, cette sonde a été appliquée à des études sur les radeaux membranaires dans des cellules vivantes (Gaus et al., 2003; Owen et al., 2012a), mais l'analyse de ces résultats reste compliquée dû à l'internalisation rapide de ce marqueur. Afin d'améliorer la localisation membranaire de Laurdan dans la cellule, un dérivé carboxylique a été réalisé (C-Laurdan) (Kim et al., 2007), et utilisé dans l'étude de l'organisation latérale de membranes biologiques. (Dodes Traian et al., 2012; Sezgin et al., 2012). Étonnamment, Patman, un analogue cationique de Laurdan développé bien avant pour les études des phases membranaires (Lakowicz et al., 1983) a été très peu utilisé pour les recherches sur les radeaux lipidiques.

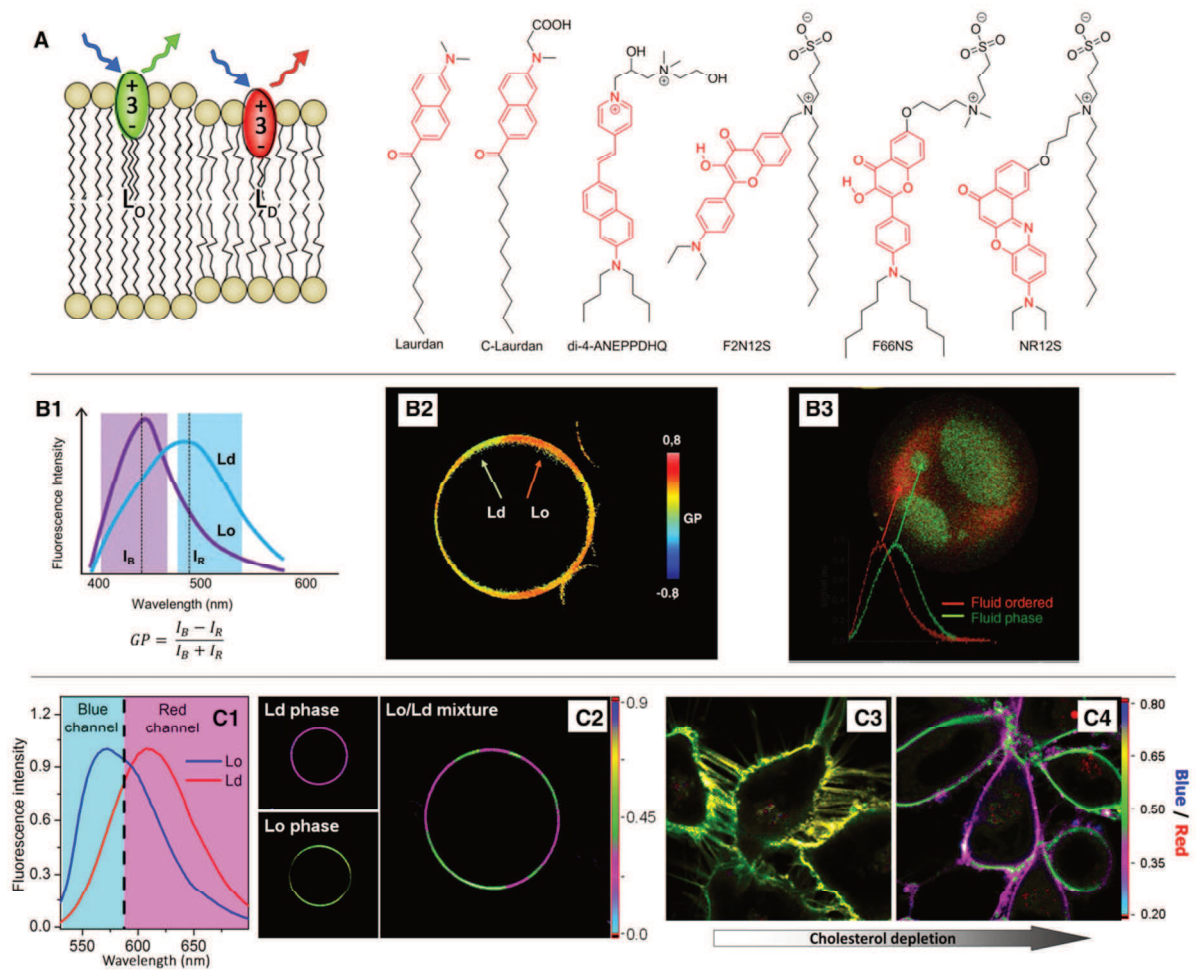


Figure 26 : Sondes solvatochromes pour les radeaux lipidiques et leur application dans les membranes modèles et cellulaires. (A) Principe de sondes solvatochromes pour les radeaux lipidiques (gauche) et exemples de leur structure chimique (droit). (B1-B3) Application de Laurdan pour les études de séparation de phase sur des membranes modèles. Spectre de fluorescence de Laurdan dans des membranes modèles de phases Lo (Violet) et de Ld (Bleu) (B1), image ratiométrique de GUVs présentant les deux phases (mélange de SM/DOPC/cholestérol) (B2) et dans des membranes de surfactant pulmonaire, avec insert montrant les spectres de fluorescence dans les deux phases (B3) (B1) Owen et al., 2012 (B2-B3) Bagatolli, 2006. (C1-C4) Application de la sonde NR12S aux études des phases dans des membranes modèles et cellulaires. Spectre de fluorescence de NR12S dans des vésicules de membranes modèles représentant les phases Lo (SM/cholestérol) et Ld (DOPC/cholestérol) (C1). Images ratiométriques obtenues par excitation deux-photons (830 nm) de GUVs, marqué par NR12S, présentant les phases Lo et Ld dans leur mélange (SM/DOPC/cholestérol) (C2). Changement dans l'ordre lipidique dans des membranes cellulaires (U87MG, cellule de glioblastome humain), par déplétion du cholestérol à l'aide méthyl- β -cyclodextrine (C3 et C4), observé par image ratiométrique de la sonde NR12S. Adapté de Kucherak et al., 2010.

Un autre exemple important est le marqueur di-4-ANEPPDHQ (Jin et al., 2006) et ses dérivés récemment développés (Kwiatek et al., 2013). Ces marqueurs solvatochromes, similairement à Laurdan, peuvent lier les deux phases Lo et Ld (avec généralement une préférence pour les phases Ld), et les marquer par une couleur différente dû à de forts déplacements spectraux dépendant de la polarité du milieu, comme pour Laurdan. La présence de deux groupes cationiques et de longues chaînes hydrocarbures dans di-4-ANEPPDHQ minimise l'effet de « flip-flop » entre les feuillettes membranaires, ce qui rend cette sonde particulièrement intéressante pour les applications cellulaires. Cependant, dû à la relativement faible brillance, cette sonde requiert d'assez haute concentration ($\sim 5 \mu\text{M}$) pour de l'imagerie cellulaire (Owen et al., 2012b).

Dans le but de développer des sondes solvatochromes pour les radeaux lipidiques, une attention particulière a été portée sur des fluorophores optimisés avec une location précise dans la membrane plasmique et ne marquant qu'un seul feuillet (Demchenko et al., 2009; Klymchenko et al., 2002; Kucherak et al., 2010) ; les marqueurs 3-hydroxychromone sont particulièrement intéressants pour ce développement car leur double émission montre une excellente sensibilité aux propriétés de l'environnement (Demchenko et al., 2009, 2013; Klymchenko et al., 2013). Pour créer la sonde membranaire F2N12S, le composé basique 4'-(diéthylamino)-3-hydroxyflavone a été modifié par une longue chaîne hydrocarbure et un groupement zwitterionique (Fig. 26A). Ces modifications lui assurent une liaison spécifique au feuillet extérieur de la membrane plasmique (Shynkar et al., 2007). F2N12S se répartit entre les phases Lo et Ld et montre une différence de ratio de ces deux bandes d'émission, permettant ainsi l'obtention d'images ratiométriques de ces phases dans des vésicules géantes (Klymchenko et al., 2009). Cette sonde permet aussi de suivre le changement d'ordre lipidique au niveau du feuillet extérieur après extraction du cholestérol ou bien après induction de l'apoptose (Oncul et al., 2010a; Shynkar et al., 2007). Étonnamment, les analogues modifiés de F2N12S (F66NS), présentent une orientation verticale dans la bicouche lipidique, montrant une amélioration de la sensibilité à l'ordre lipidique et à l'apoptose (Darwich et al., 2013a). En comparaison de di-4-ANEPPDHQ, F2N12S et ces analogues requiert une concentration bien moindre ; 0,1-0,5 μM . Néanmoins ils nécessitent une excitation dans la région violette du spectre du visible (400 nm) ou par un laser deux-photons et leur photostabilité est limitée.

Afin de surmonter ces inconvénients, le fluorophore Nile Red a été sélectionné. C'est un fluorophore très brillant et sensible à son environnement avec une forte absorption et une émission décalées vers le rouge (Greenspan et al., 1985). Similairement à F2N12S, Nile Red a été

modifié par une longue chaîne hydrocarbure et un groupement zwitterionique pour obtenir NR12S (Fig. 26A). En utilisant la propriété unique d'interrupteur de NR12S en présence d'ions dithionites (réduction réversible de Nile Red qui induit une suppression de la fluorescence de la molécule), il a été possible de mettre en évidence une liaison spécifique de cette sonde sur le feuillet externe de membranes lipidiques avec un taux de flip-flop lent (de l'ordre de plusieurs heures) (Kucherak et al., 2010). Sa longueur d'onde d'émission change entre 605 nm pour les phases Ld et 570 nm pour les phases Lo, permettant ainsi de distinguer les phases par couleur (Fig. 26C2). Cette sonde permet de suivre l'ordre lipidique après extraction du cholestérol (Fig. 26C3) ainsi que l'hydrolyse de SM (Darwich et al., 2012; Kucherak et al., 2010). Remarquablement la sonde NR12S montre que la perte de l'asymétrie membranaire due à l'apoptose décroît l'ordre lipidique dans des membranes plasmiques de cellule, en lien direct avec les données précédemment obtenues à l'aide de F2N12S (Oncul et al., 2010a) ainsi qu'avec celles obtenues récemment avec PATMAN (Gibbons et al., 2013). Le lien trouvé entre l'ordre lipidique et l'apoptose tire probablement son origine du transfert de SM du feuillet externe vers le feuillet interne (Tepper et al., 2000) et son remplacement par des lipides insaturés du feuillet interne. Mais plus important encore, NR12S ne nécessite qu'une concentration de l'ordre de 20 nM pour effectuer de l'imagerie cellulaire, ce qui est très faible comparé aux autres sondes solvatochromes utilisées jusqu'à présent. Malheureusement la photostabilité de cette sonde est elle aussi plutôt limitée.

5.3.2. Les rotors moléculaires

Les rotors moléculaires sont des fluorophores qui montrent une forte variation de leur rendement quantique de fluorescence en fonction de leur rotation intramoléculaire, qui va dépendre de la viscosité du milieu dans lequel ils sont (Haidekker and Theodorakis, 2007; Kuimova, 2012). En effet dans des milieux plus visqueux, les rotations moléculaires sont plus lentes, ce qui va augmenter ici le rendement quantique de fluorescence du marqueur. En étant incorporés dans une membrane lipidique, ces fluorophores observent la microviscosité des lipides alentours (Haidekker and Theodorakis, 2007; Kuimova, 2012). Des exemples typiques de ces sondes sont FCVJ, ces analogues et certains analogues de Prodan et BODIPY récemment développés (Fig. 27). Du fait que la phase Lo présente une viscosité plus importante que la phase Ld, les rotors moléculaires montrent un rendement quantique de fluorescence beaucoup plus important dans ces phases. Un analogue étendu de Laurdan, récemment développé, C-Laurdan-2

(Fig. 27) (Kim et al., 2008), présente une forte augmentation de sa brillance lorsqu'il se lie aux phases Lo de membranes modèles et a été proposé comme une sonde « turn-on » pour visualiser les radeaux lipidiques dans la membrane plasmique cellulaire. Le problème d'internalisation de C-Laurdan-2 a été résolu par une substitution du groupement carboxylate par un groupement sulfonate (S-Laurdan-2, Fig. 27) (Lim et al., 2011). Néanmoins, comme aucune évaluation du phénomène de flip-flop de cette sonde a été réalisée, une question reste en suspens, ce marqueur s'adresse-t-il à un ou aux deux feuillettes de la membrane cellulaire. Le rotor moléculaire BODIPY-Ph-C12, qui possède les excellentes propriétés de fluorescence de la famille des BODIPY, a montré récemment un bon contraste pour l'imagerie de radeaux dans des membranes modèles en utilisant la technique de microscopie par imagerie de temps de vie de fluorescence (FLIM, Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) (Wu et al., 2013). Des exemples d'applications de ces marqueurs dans la recherche sur les radeaux lipidiques restent rares et ne sont apparus que récemment, montrant quelques lacunes dans le domaine. De plus, la plupart des rotors moléculaires rapportés jusqu'à aujourd'hui, incluant FCVJ et les dérivés de BODIPY, ne sont pas réellement adaptés aux études sur des membranes plasmiques de cellules, comme leurs structures s'avèrent très différentes de celles d'un lipide. Lorsqu'ils sont ajoutés à des cellules vivantes, ils montrent une fluorescence intracellulaire avec seulement une fluorescence membranaire très limitée (Haidekker et al., 2001; Kuimova, 2012; Kuimova et al., 2008; Peng et al., 2011). L'existence d'analogues de FCVJ, attachés aussi bien aux têtes polaires ou aux chaînes acyles de lipides, doit aussi être mentionnée (Fig. 27). Le premier ne présente aucune dépendance à la viscosité membranaire, probablement du fait de sa localisation à la surface de la membrane, alors que le second, immergé dans la bicouche lipidique, est lui parfaitement capable de suivre la viscosité de la membrane (Haidekker et al., 2002). Malgré tout, l'application de cette molécule à la recherche sur les radeaux lipidiques reste à explorer. Il est clair que cette classe de sondes peut devenir un outil très puissant pour l'étude de l'ordre lipidique dans les membranes cellulaires, mais elle nécessite un design moléculaire approprié ainsi que des études systématiques sur les membranes.

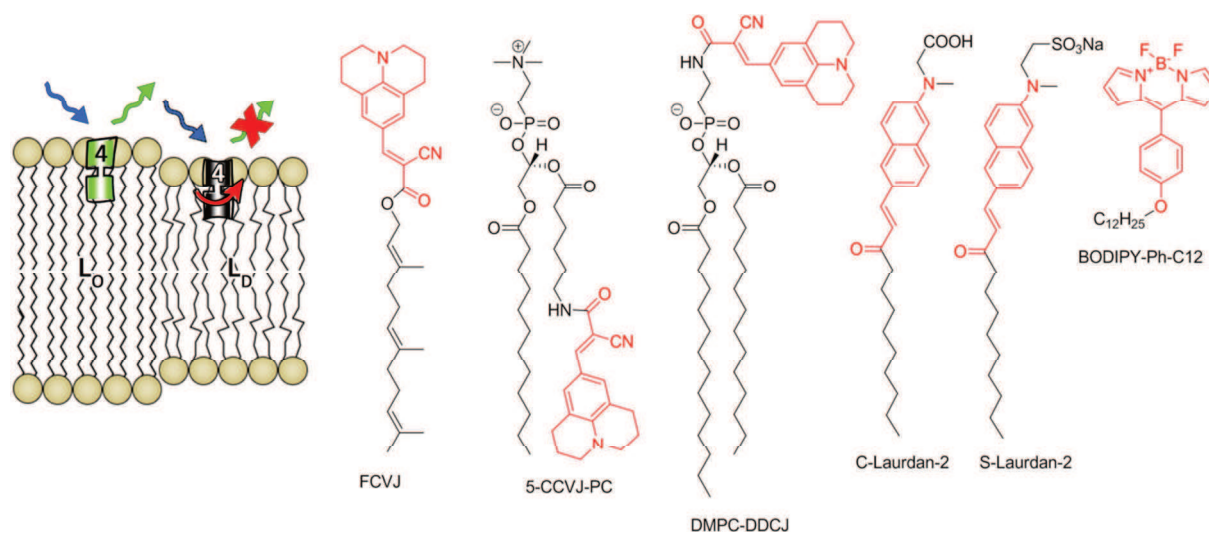


Figure 27 : Principe des rotors moléculaires pour les radeaux lipidiques et exemples de leurs structures chimiques.

Les techniques d'analyses par fluorescence sont probablement aujourd'hui les techniques les plus utilisées pour les études biologiques et surtout dans le cas de l'étude des radeaux lipidiques. En effet ces méthodes permettent l'obtention de données rapides et directes par observation du ou des phénomènes d'intérêts. Dans le domaine d'études des radeaux lipidiques, le développement de nouveaux marqueurs est primordial, il manque aujourd'hui des sondes brillantes, spécifiques à certaines phases (qui ne se redistribuent pas dans toute la membrane). Il pourrait être intéressant d'avoir des sondes membranaires liées à des protéines d'intérêts ou des ligands pour étudier l'environnement lipidique proche de la protéine ou du récepteur associé au ligand.

Nous avons voulu créer de nouvelles sondes multifonctionnelles, phase spécifique et phase sensible dans un premier temps puis spécifiques à certains récepteurs. Pour les sondes phase spécifique et phase sensible, l'idée est d'avoir un jeu de sondes ne se logeant que dans un type de phase membranaire (L_o ou L_d) tout en étant capable de la discriminer par un changement de couleur. Cela dans le but de pousser l'étude des radeaux dans les membranes cellulaires. Pour les sondes spécifiques à un récepteur donné, le but ici est de pouvoir étudier l'environnement proche d'un récepteur afin d'en connaître la nature.

Nous nous sommes ensuite penchés sur le design de nouvelles sondes membranaires à partir de fluorophores peu utilisés. Nous avons choisi des fluorophores dont la couleur est peu

représentée actuellement (bleu et rouge lointain) et ayant de bonnes propriétés photophysiques (plus brillants et plus photostables).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

II. RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. Nouveaux dérivés Nile Red

1.1. Nouvelle sonde Nile Red et FRET-Quencher spécifique aux phases Ld

La détection et la mise en lumière des micro-domaines lipidiques (radeaux) sur les membranes cellulaires restent un défi de taille malgré les recherches intensives dans le domaine. Pour se faire, deux types de sondes sont utilisés, l'un marquant spécifiquement une phase donnée (liquide ordonné, Lo ou liquide désordonné, Ld), l'autre, sensible à l'ordre lipidique, marquant les deux phases d'une couleur différente. Ici, nous avons voulu combiner les deux techniques citées précédemment, en développant une sonde sensible aux phases capable de se lier spécifiquement dans les phases Ld et un quencher spécifique lui aussi aux phases Ld (Fig. 28). L'objectif est de développer un groupe d'outils nous permettant de visualiser spécifiquement les phases Lo ou Ld en gardant leur sensibilité à l'ordre lipidique (par solvatochromisme) et de pouvoir marquer les deux phases mais de couleurs différentes.

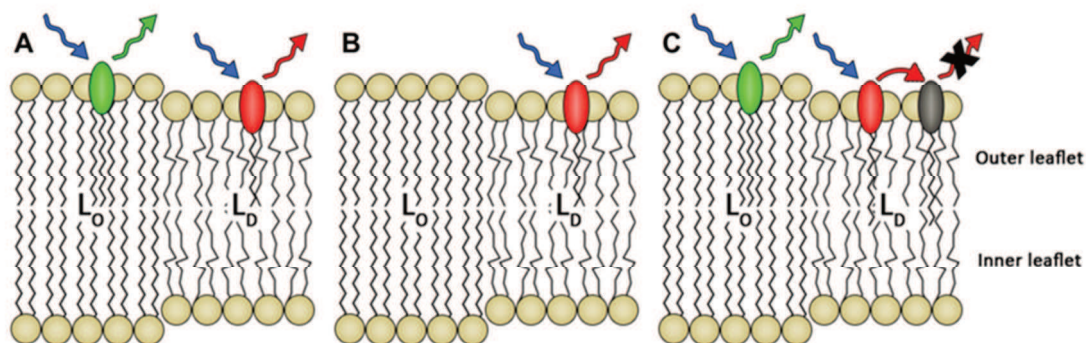


Figure 28 : Schéma du principe de l'investigation des radeaux lipidiques sur la membrane plasmique. (A) Sonde sensible à son environnement marquant les phases Lo et Ld par une couleur différente (comme NR12S). (B) Sonde sélective aux phases exclue du domaine Lo. (C) Quencher exclu de la phase Lo, capable d'éteindre la fluorescence d'une sonde sensible à son environnement dans les phases Ld.

La conception de la nouvelle sonde ainsi que du quencher est basée sur la sonde NR12S (Fig. 29). Dans la sonde NR12S, le fluorophore Nile Red est couplé à un groupement zwitterionique et une longue chaîne hydrocarbonnée, servant d'ancre, par l'intermédiaire d'un espaceur court.

Afin d'obtenir un analogue de NR12S pouvant se partitionner spécifiquement dans la phase Ld, nous avons substitué le groupement dodécyle par un groupement 3,7-diméthyl-octyle, ramifié. La synthèse a été effectuée en partant de 1-bromo-3,7-diméthyl-octane, converti en amine, puis utilisé selon le même protocole que NR12S pour obtenir la sonde bNR10S désirée. Le quencher bQ10S a été conçu comme un analogue de bNR10S en suivant la même stratégie, en remplaçant le fluorophore Nile Red par Black Hole Quencher-2 (BHQ-2). BHQ-2 a été sélectionné pour le recouvrement de son spectre d'absorption et celui d'émission de NR12S, permettant ainsi un quenching efficace basé sur le FRET. La synthèse de bQ10S a été réalisée de la manière similaire que pour bNR10S, mais cette fois en partant de l'intermédiaire commercial BHQ-2 acide carboxylique.

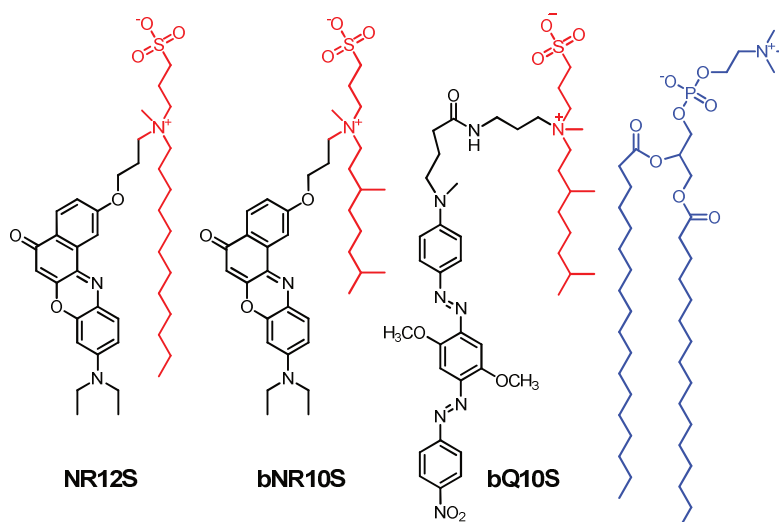


Figure 29 : Schéma des structures chimiques des sondes NR12S et bNR10S ainsi que du quencher bQ10S ainsi que leur localisation hypothétique par rapport aux lipides (en bleu). Les ancres de ces molécules sont représentées en rouge.

Dans un premier temps, la sonde bNR10S a été caractérisée par spectroscopie et microscopie de fluorescence sur des membranes modèles ; LUVs (Large Unilamellar Vesicles) et GUVs (Giant Unilamellar Vesicles) de différentes compositions pour faire varier l'ordre de la composition lipidique. NR12S a été utilisé en parallèle afin de vérifier la spécificité de phases de cette sonde. Les résultats obtenus montrent que bNR10S possède une forte préférence pour la phase Ld. En effet, il est possible d'observer par spectroscopie, à partir d'une suspension de LUVs marqués par cette sonde, un spectre typique des phases Ld. En plus, des images microscopiques

de GUVs de phases mixtes (Lo et Ld) marquées par bNR10S montrent une absence de fluorescence dans les phases Lo du GUVs (Fig. 30). Les études spectroscopiques menées sur des suspensions cellulaires de 3 lignées différentes (HeLa, HEK, CHO) à l'aide de la sonde bNR10S ont montré des spectres typiques de phase Ld, spectres différents de ceux obtenus avec NR12S, qui lie les deux types de phases Lo et Ld.

Les analyses spectrométriques nous fournissent des preuves directes de l'existence de phases hétérogènes dans la membrane plasmique de cellules vivantes. Malheureusement, les tests microscopiques réalisés à l'aide de cette nouvelle sonde sur des cellules, ne permettent pas de visualiser les différentes phases de la membrane plasmique, le contraste de couleur n'étant pas suffisant.

Nous avons alors caractérisé le quencher dans les mêmes conditions que précédemment. BHQ-2 a été sélectionné en raison du fort recouvrement de son spectre d'absorption avec le spectre d'émission de NR12S. Les études spectroscopiques menées sur des modèles ont montré que ce quencher a une forte préférence pour les phases Ld, comme bNR10S. De plus, il possède une bonne capacité à quencher la sonde NR12S. Les expériences de microscopie sur GUVs ont montré que bQ10S possède l'aptitude d'éteindre spécifiquement NR12S dans la phase Ld (Fig. 30). Les études cellulaires ont confirmé par spectroscopie la présence de phases hétérogènes dans les trois lignées cellulaires.

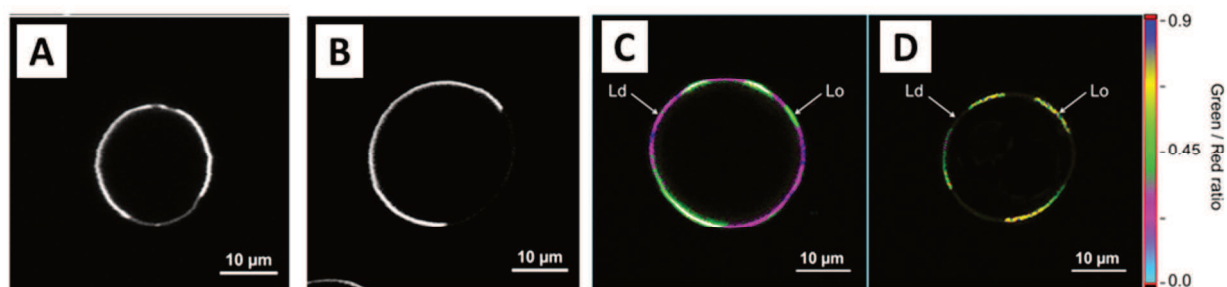


Figure 30 : Images microscopiques par excitation 2-photons de GUVs marqués par (A) bNR10S et (B) NR12S (0.1 μ M). Images ratiométriques de GUVs marqués par NR12S (0.1 μ M) seul (C) et avec (D) bQ10S (0.2 μ M).

En conclusion, nos nouvelles sondes ont permis pour la première fois de mettre en évidence la présence de phases séparées dans des membranes plasmiques de cellules vivantes. Elles ont aussi permis de montrer que ces phases sont proches de celles des membranes modèles.

Le détail de ce travail est présenté dans le manuscrit ci-dessous. Il est actuellement considéré par ACS Chemical Biology après révision majeure.

SOLVATOCHROMIC NILE RED PROBES WITH FRET QUENCHER SPECIFICALLY TARGET AND IDENTIFY SEPARATE MEMBRANE PHASES IN LIVING AND APOPTOTIC CELLS

Rémy Kreder,¹ Kyrylo A. Pyrshev,^{1,2} Zeinab Darwich,¹ Oleksandr A. Kucherak,¹ Yves Mély,¹ Andrey S. Klymchenko^{1,*}

¹Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, UMR 7213 CNRS, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74, Route du Rhin, 67401 ILLKIRCH, France.

²Laboratory of Nanobiotechnologies, Department of Molecular immunology, Palladin Institute of biochemistry of the NASU, Kiev, 01601, Ukraine

ABSTRACT: Detecting and imaging lipid microdomains (rafts) in cell membranes remain a challenge despite intensive research in the field. Two types of fluorescent probes are used for this purpose: one specifically labels a given phase (liquid ordered, Lo or liquid disordered, Ld), while the other, being environment-sensitive (solvatochromic), stains the two phases in different emission colors. Here, we combined the two approaches by designing a phase-sensitive probe of the Ld phase and a quencher of the Ld phase. The former is an analogue of the recently developed Nile Red-based probe NR12S, bearing a bulky hydrophobic chain (bNR10S), while the latter is based on Black Hole Quencher-2 designed as bNR10S (bQ10S). Fluorescence spectroscopy of large unilamellar vesicles and microscopy of giant vesicles showed that the bNR10S probe can partition specifically into Ld phase, while bQ10S can specifically quench NR12S probe in the Ld phase, so that only its fraction in the Lo phase remains fluorescent. Thus, the toolkit of two probes with quencher can specifically target Ld and Lo phases and identify their lipid order from the emission color. Application of this toolkit in living cells (HeLa, CHO and 293T cell lines) revealed the coexistence of separated Lo- and Ld-like phases with varied relative contributions dependent on the cell line. In HeLa cells undergoing apoptosis, our toolkit showed formation of separate domains of the Ld-like phase in form of blebs. The developed tools revealed phase separation in plasma membranes of living and apoptotic cells, opening new directions in the lipid raft research.

INTRODUCTION

Lipid domains, defined as liquid-ordered phase (Lo) enriched in cholesterol, sphingomyelin (SM) and glycosphingolipids, can be observed in model lipid membranes and plasma membrane vesicles as “rafts” floating in a sea of loosely-packed phase enriched in unsaturated phospholipids, so-called liquid disordered (fluid) phase (Ld) (1-5). For more than a decade these domains were a subject of intensive research, because they may be associated in cell membranes with several key functions, such as signal transduction, lipid trafficking and activity of membrane proteins (6-9). Despite significant progresses in the field, the existence of lipid rafts is still debated, as the direct observation of separated lipid phases in living cell remains a challenge (7, 10-12). A variety of techniques, such as imaging mass spectrometry (13), atomic force microscopy (14), electron paramagnetic resonance (15) and optical spectroscopy and microscopy have been applied to address this problem. Optical techniques are particularly suitable in this context, as they allow non-invasive *in situ* studies on living cells with exquisite spatial and temporal resolution. For instance, single particle tracking (16), Förster Resonance Energy Transfer (FRET) (17-19), fluorescence correlation spectroscopy (FCS) (20, 21) and superresolution imaging (22-24) enabled analysis of oligomerization, transient confinement and diffusion of membrane proteins, suggesting their nanoscale ordering within putative lipid rafts. However, other reports argue that the observed protein confinement is due to complex membrane topography (25) or intrinsic capacity of proteins to form nanoclusters (islands) (26) and interact with actin cytoskeleton (27). Moreover, far fewer reports showed directly at the lipid level the co-existence of separate phase domains in living cells (15, 28-30), which stimulated the development of new fluorescent membrane probes for lipid rafts (31).

These probes could be split into two main classes. Class I probes stain selectively the Lo/Ld phase in model membranes. This class includes the fluorescently labeled cholera toxin B-subunit (CT-B) (19, 32), saturated/unsaturated phospholipids and cholesterol (33, 34) as well as dyes with long alkyl chains, such as LcTMA-DPH (35) and cyanines (28, 33), or polycyclic aromatic hydrocarbons (33, 36). Class II combines environment-sensitive probes, such as Laurdan (29, 37, 38) and its derivatives (39), di-4-ANEPPDHQ (38, 40) and derivatives of 3-hydroxyflavone (41, 42) and Nile Red (43, 44). These probes partition into both the Ld and Lo phases and provide color or intensity contrast due to differences in the local polarity/hydration or fluidity of these phases (Figure 1A) (31, 45). The probes of class I and II are complementary, as the former provides the specificity to the phase, while the latter can identify the phase through the spectroscopic response. Although these probes are very useful to study model membranes, they are much less efficient for studying lipid rafts in living cells.

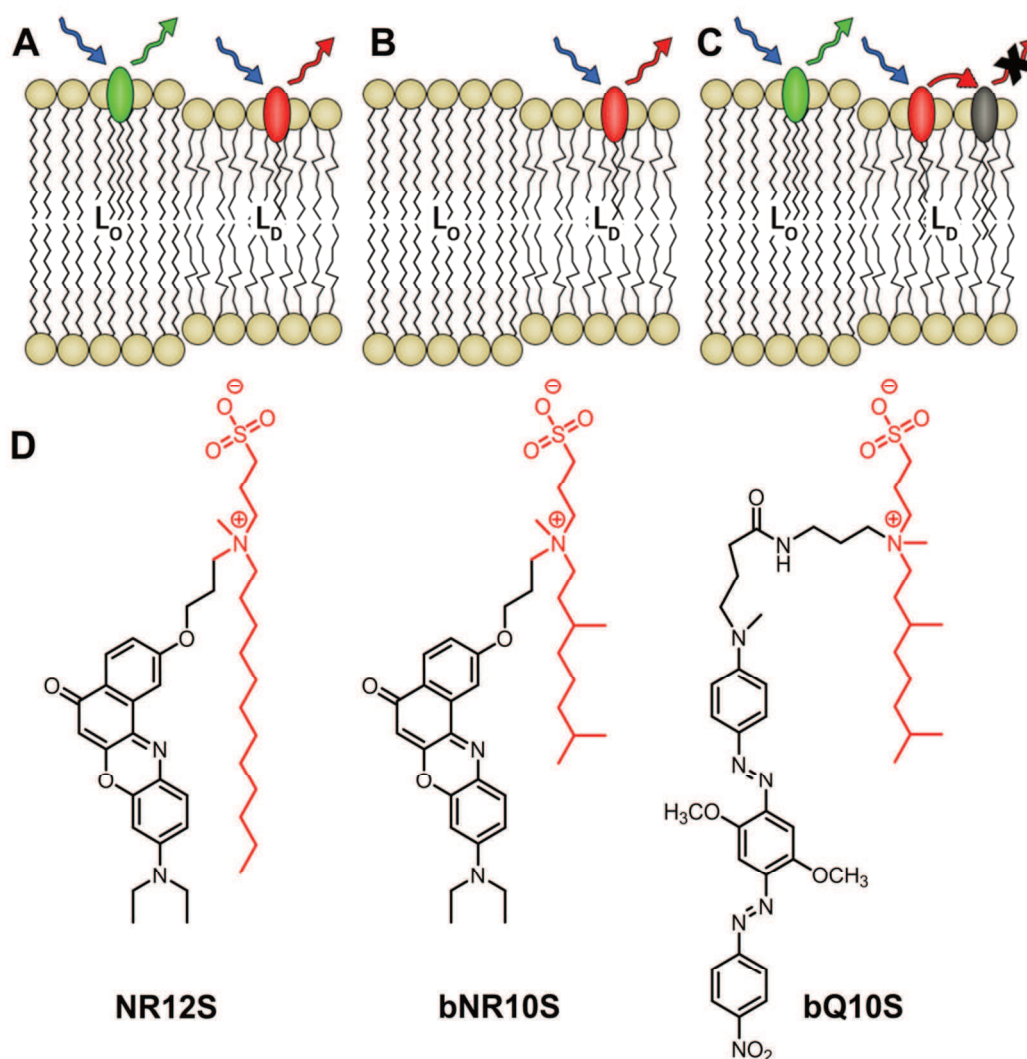


Figure 1. Concepts for probing lipid domains in cell membranes. (A) Environment-sensitive probe that stains L_o and the L_d phases in different colors (such as NR12S). (B) Phase-selective probe excluded from the L_o phase. (C) Quencher excluded from the L_o phase, which quenches the fluorescence of the environment-sensitive probe selectively in the L_d phase. Thus, (B) and (C) approaches allow probing the L_d and L_o phases, respectively. (D) Chemical structure of NR12S and bNR10S probes together with bQ10S quencher. Lipid anchor groups are in red.

We hypothesized that combining phase-specificity with sensitivity to the environment could bring the application of these probes in cells to a new level. So far, there are no environment-sensitive (class II) probes showing strong preference to the L_o/L_d phases. To achieve specificity to the L_d phase (Figure 1B), the fluorophore can be modified with bulky or unsaturated alkyl chains, as it was realized for class I probes (31, 33, 35). Targeting the L_o phase is more complicated, because most dyes tend to be excluded from this highly ordered phase (33). This problem can be solved by using a probe that binds both phases in combination with a quencher partitioning selectively to the L_d phase. As a consequence, the probe should fluoresce mainly from the L_o phase (Figure 1C), as it was previously proposed for class I probes (28, 35, 46). However, this concept has never been realized with

environment-sensitive (class II) probes. Moreover, the existing quenchers of the Ld phase cannot bind selectively the outer leaflet of cell plasma membranes and quench a probe at low concentrations. FRET should be the best quenching mechanism for this purpose, as it can act at sufficiently long distance (47, 48), in contrast to spin-based quenchers that require rather high quencher concentrations (35, 49).

In the present work, to develop probes that combine environment-sensitivity with phase-specificity, we based our design on the recently developed Nile Red probe NR12S (44). This probe, which was specially made for cell plasma membranes, partitions into the Ld and Lo phases of model membranes showing different emission colors. Importantly, this probe distinguishes well the Lo and Ld phases even at high cholesterol content in both phases (44), which is less evident for other probes of class II. Presently, we synthesized a “bulky” analogue of NR12S able to bind selectively the Ld phase. Moreover, to detect selectively the Lo phase, we designed a membrane quencher that turns off the fluorescence of NR12S selectively in the Ld phase. The combination of environment-sensitivity with phase-selectivity allowed us to identify clearly distinct Lo- and Ld-like phases in the plasma membranes of three different cell lines and to show that the Lo/Ld ratio depends on cell type. In HeLa cells undergoing programmed cell death (apoptosis) (50), the probes evidenced formation of separate domains of the Ld-like phase in form of blebs. The developed toolkit of probes with quencher opens a new avenue for studies of lipid organization and phase heterogeneity in live cells using optical techniques.

RESULTS AND DISCUSSION

Probe design. The design of the new probe and quencher is based on NR12S (Figure 1D). In NR12S, the Nile Red fluorophore is attached through a short spacer to a long hydrocarbon chain and a zwitterionic group, which serve as an anchor to fix the fluorophore at the interface and prevent the flip-flop of the probe between the leaflets (44). To obtain an analogue of NR12S that can specifically partition into the Ld phase, we substituted its dodecyl group with a bulky 3,7-dimethyloctyl group. The synthesis was started from 1-bromo-3,7-dimethyloctane, which was converted into corresponding amine and further used to obtain the desired probe bNR10S, similarly to the protocol for NR12S (supplementary Schemes S1,3). The quencher bQ10S was designed as a close analogue of bNR10S, bearing a Black Hole Quencher-2 (BHQ-2) unit instead of Nile Red. BHQ-2 was selected as its absorption spectrum overlaps perfectly with Nile Red fluorescence, allowing efficient FRET-based quenching of Nile Red probes in lipid membranes. The synthesis of bQ10S was done starting from the commercially available BHQ-2 carboxylic acid and an amine bearing 3,7-dimethyloctyl group (supplementary Scheme S2).

Evaluation in model membranes. Similarly to parent NR12S, the new probe bNR10S exhibited strong binding to model lipid membranes of large unilamellar vesicles (LUVs) composed of DOPC (the Ld phase), which was accompanied by >200-fold increase in the fluorescence intensity (Supplementary Figure S1). The titration curves for bNR10S and

NR12S looked nearly the same (Supplementary Figure S1), indicating that they exhibited very similar affinity to the Ld phase membranes. Moreover, the emission maxima in DOPC vesicles for the two probes were identical (609 nm) and their fluorescence quantum yields were very close (39 and 41 % for NR12S and bNR10S, respectively). These results confirm that the mode of binding of NR12S and bNR10S to the Ld phase is the same. We also checked whether the quantum yield depended on the probes addition method, namely direct addition to already prepared LUVs vs. premixing of the probes with DOPC before LUVs preparation. Both methods of probe addition gave the same quantum yield values: 39 vs. 42% for NR12S and 41 vs. 42% for bNR10S. These values are as high as those in organic solvents (44), suggesting a nearly complete binding of the probes to LUVs. Flip-flop of the bNR10S between two leaflets of DOPC LUVs was further evaluated using previously proposed technique based on sodium dithionite bleaching of Nile Red (44). In line with our earlier results, addition of the dithionite LUVs prepared by pre-mixing of NR12S with DOPC gave ~40% bleaching (Supplementary Figure S2), indicating that only probes in the outer leaflet were bleached by the agent. The same phenomenon was observed for bNR10S. Then, the probes were added to already prepared LUVs and incubated for 1h at rt. In this case for both probes the bleaching was nearly 100% (Supplementary Figure S2), which shows that bNR10S, similarly to NR12S (44), can bind selectively the outer leaflet and remain there without detectable flip-flop for at least 1h at rt.

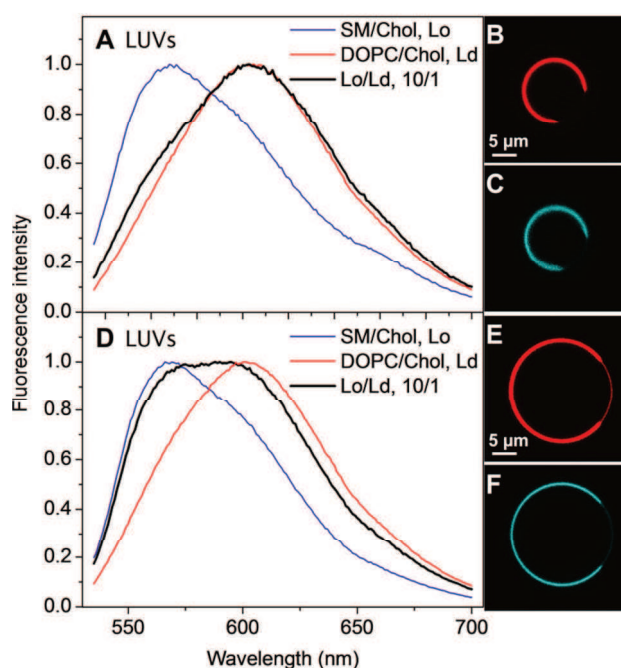


Figure 2. Comparison of NR12S and bNR10S in model membranes. (A, D) Fluorescence spectra of bNR10S (A) and NR12S (D) in suspensions of vesicles (LUVs) composed of DOPC/Chol (1/0.9), SM/Chol (1/0.9), presenting the Ld and Lo phases, respectively, and a mixture of these vesicles corresponding to a Lo/Ld phase ratio 10/1. (B, E) Red-channel confocal microscopy images (excitation 561 nm) of a Giant Unilamellar Vesicles (GUVs), prepared from a mixture of DOPC, Chol and SM (1/1/0.7) stained by bNR10S (B) and NR12S (E). (C, F) Blue-channel images (excitation 488 nm) of the same GUVs corresponding to fluorescence of Ld-phase marker NBD-DOPE. Concentration of the probes was 0.4 μM in LUVs (200 μM of lipids) and 0.1 μM in GUVs.

Next, we evaluated the effect of the phase state on the emission color of the probes. Addition of cholesterol to DOPC produced only minor changes on the emission maximum of both probes (603 nm). In contrast, in LUVs composed of sphingomyelin (from bovine brain) and cholesterol, representing the L_o phase, bNR10S showed, similarly to NR12S, emission shifted to the blue by nearly 40 nm (Figure 2). We used phospholipid/cholesterol molar ratio 1/0.9 to ensure that for DOPC and SM, it corresponds, according to phase diagrams, to the L_d (1, 3) and L_o (51) phases, respectively. Thus, both probes can distinguish the L_d from the L_o phase by emission, which, according to the earlier data on NR12S (44), is due to decreased local polarity/hydration affecting the environment-sensitive Nile Red fluorophore. Using this property, we characterized the preference of NR12S and bNR10S to a particular phase, by recording the fluorescence spectra of these probes in LUVs presenting the L_o and L_d phases, mixed at different ratio. At a L_o/L_d ratio 10/1, the spectrum of bNR10S corresponded to a single red shifted band that clearly resembled that in the L_d phase vesicles (Figure 2A). Thus, in the presence of both phases, bNR10S partitions selectively into the L_d phase. By contrast, the spectrum of NR12S was very broad, being a superposition of the spectra in the L_o and L_d phases (Figure 2D). Thus, NR12S partitions into both L_o and L_d phases, in line with our previous report (44). Importantly, the shape of the spectra of both probes stabilized rapidly and remained constant for at least 15 min after probe addition (Supplementary Figure S3), indicating that the equilibrium of their partitioning between the phases was rapidly reached. Using the spectra of the probes in pure phases, we calculated the partition of the dyes between the two phases (Supplementary Figure S4). For NR12S, the found L_d/L_o partition ratio was 12 ± 2 , while for bNR10S it was 300 ± 200 , so that bNR10S exhibited a much higher preference to the L_d phase. These observations were further confirmed by direct imaging of the probes bound to giant unilamellar vesicles (GUVs) composed of both the L_d and L_o phases. A bright fluorescence of bNR10S was observed exclusively from one part of the membrane that was also specifically stained by the marker of the L_d phase, NBD-DOPE (Figure 2B,C) (33), indicating a clear preference of this probe to the L_d phase. By contrast, NR12S stained both phases, though with preference to the L_d phase (Figure 2E) co-localizing with the reference NBD-DOPE (Figure 2F). These data are in line with the estimated L_d/L_o partition ratio of the probes. Thus, the bulky alkyl chain expels effectively bNR10S from the L_o towards the L_d phase.

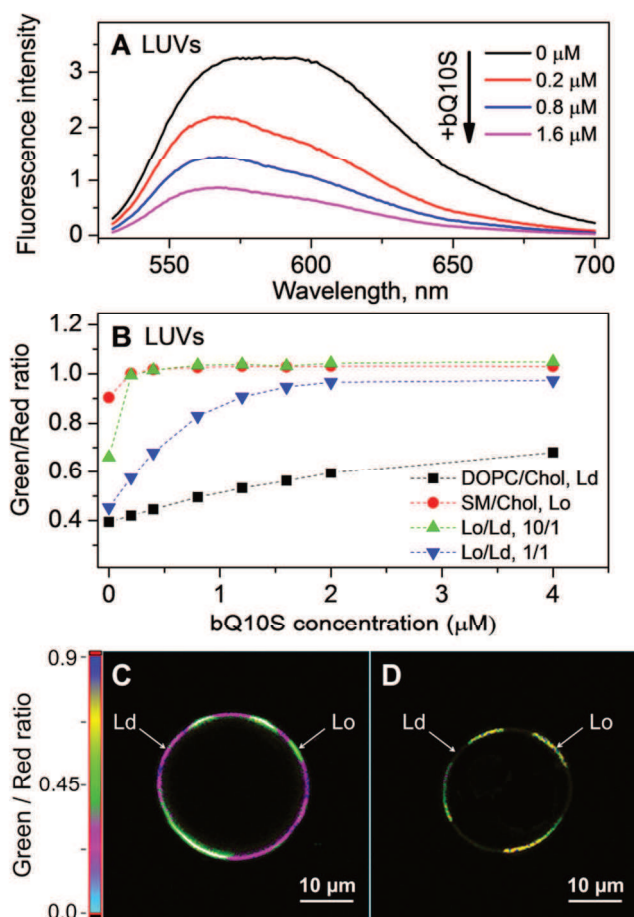


Figure 3. Fluorescence quenching of membrane probe NR12S by bQ10S in LUVs. (A) Fluorescence spectra of NR12S (0.4 μM) in a 10/1 mixture of Lo LUVs and Ld LUVs (200 μM of lipids) with increasing concentration of bQ10S quencher. The Lo and Ld LUVs were composed of SM/Chol (1/0.9) and DOPC/Chol (1/0.9), respectively. (B) Fluorescence Green/Red intensity ratio of NR12S probe in Lo and Ld LUVs and in their mixtures (1/1 and 10/1) as a function of bQ10S concentration. (C, D) Ratiometric images of GUVs stained by NR12S (0.1 μM) without (C) and with (D) bQ10S (0.2 μM) using two-photon excitation microscopy. GUVs are prepared from a mixture of DOPC, SM and Chol (1/1/0.7). Violet parts correspond to the Ld phase and Green/Yellow parts correspond to the Lo phase.

Using the same set of vesicles, we then examined the new quencher bQ10S in association with NR12S probe. For a mixture of Lo LUVs and Ld LUVs at a 10/1 ratio, addition of the quencher transformed the broad spectrum, a signature of both Lo and Ld phases, into a blue shifted spectrum identical to that in the Lo phase (Figure 3A). To characterize the effect of the quencher, we measured the green/red ratio of the probes, using the integrals under their spectra before and after 585 nm (Figure 3B). Addition of bQ10S to the Lo LUVs affected weakly the green/red ratio of NR12S, while in the case of mixed phases, this ratio increased much stronger with the quencher concentration, reaching the values close to those in the Lo phase.

Thus, bQ10S works as a highly specific quencher of the probes in the Ld phase. Next, the quenching specificity of bQ10S was directly visualized by confocal microscopy on GUVs. NR12S-stained GUVs, presenting both Lo and Ld phases, showed two domains that could be clearly distinguished by their green/red intensity ratio. In line with our previous work (44), regions of high ratio (green) could be assigned to the Lo phase, while those of low ratio (violet) – to Ld phase. After addition of the quencher bQ10S, the regions of low ratio (violet) disappeared, while the high ratio ones (green-yellow) remained, so that the fluorescence from the Lo phases was preserved (Figure 3C,D). Thus, due to specificity of bQ12S quencher to the Ld phase, selective probing of the Lo phase could be achieved.

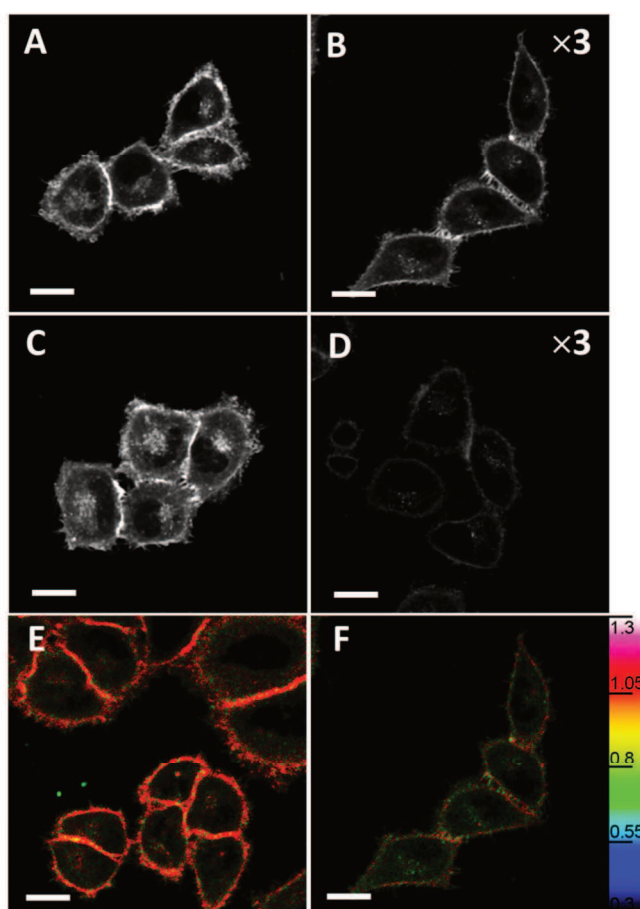


Figure 4. Confocal images of HeLa cells stained with NR12S (A, C) and bNR10S (B, D) without (A and B) and with (C and D) bQ10S. The concentration of NR12S and bNR10S was 40 nM, and bQ10S – 100 nM. The scale bar is 20 μm . (E, F) Confocal fluorescence ratiometric images of HeLa cells stained with NR12S (E) and bNR10S (F). Concentration of probes was 40 nM. The scale bar is 20 μm . For visibility, the signal in panels B and D was amplified 3-fold. The pseudo-color codes the green/red ratio.

Cellular Studies. After validation in model membranes, we moved to cellular studies. Primarily, we checked whether bNR10S can bind cell plasma membranes. Confocal images of adherent HeLa cells in the presence of bNR10S (Figure 4B) showed a very similar staining

profile as NR12S (Figure 4A), typical for the cell plasma membrane (44). A small fraction of intracellular fluorescence in both cases was probably related to endosomal uptake of the probes, as shown earlier for NR12S (52). The fluorescence intensity of bNR10S appeared significantly lower than for NR12S (Supplementary Figure S5), which correlated with its capacity to partition selectively into the Ld phase. Remarkably, in ratiometric images, the green/red ratio for bNR10S was lower compared to that for NR12S (Figure 4E,F, Supplementary Figure S6). As the green/red ratio reflects the level of lipid order (44), these data suggest that, being bound to cell membranes, the two probes could be located in different lipid phases, so that bNR10S is in a more disordered phase than NR12S. Addition of bQ10S quencher did not change significantly the intensity of NR12S probe, but produced a very efficient quenching in the case of bNR10S (Figures 4C, D). As bNR10S binds only Ld phase, it should be efficiently quenched by Ld-specific bQ10S, which is not the case of NR12S that partitions into both phases.

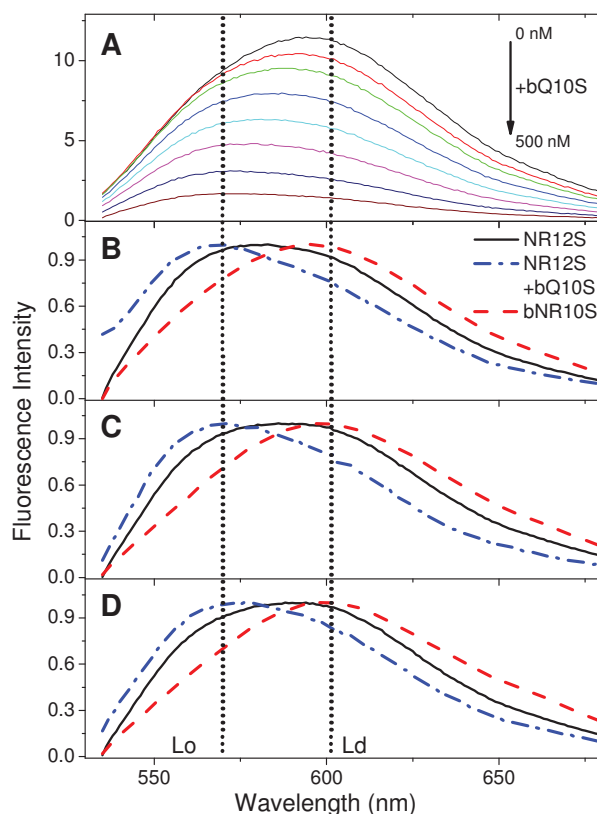


Figure 5. Application of the probes and the quencher to living cells. (A) Fluorescence spectra of NR12S in 293T cells at different concentrations of bQ10S quencher (0, 5, 10, 20, 40, 80, 200, 500 nM). (B-D) Normalized fluorescence spectra of NR12S without and with bQ10S quencher (160 nM) and bNR10S in HeLa (B), CHO (C) and 293T (D) cells. Vertical dots show the position of the maxima for NR12S in Lo and Ld phases of model membranes. Probes concentration was 40 nM.

Next, we moved to fluorescence spectroscopy studies in cell suspension. We first verified whether the binding of the probe to the cells produced a stable green/red ratio signal. Addition of NR12S to the cells resulted in the growth of the fluorescence intensity and the green/red ratio with their stabilization after 5 min of incubation at rt (Supplementary Figure S7). By contrast, for bNR10S the intensity and the ratio stabilized immediately, indicating that this probe binds much faster. This rapid binding could be connected with selectivity of bNR10S to Ld phase. On the other hand, NR12S can also partition into Lo phase, which may take significantly longer time. Thus, these simple kinetics experiments already show that these two probes may partition into two distinct phases within cell plasma membranes. We further found that 40 nM was maximal concentration of NR12S where the fluorescence spectrum remained nearly concentration-independent (Supplementary Figure S8). According to our earlier estimation that assumes spherical cells with flat plasma membrane (43), 10^6 HeLa cells per mL should contain $\sim 2.2 \mu\text{M}$ lipids at the outer plasma membrane leaflet, which corresponds to a still acceptable lipid/probe ratio $\sim 55/1$ (the real ratio is probably higher as the membrane surface is not flat). Then, we studied the fluorescence spectra of the probes with and without bQ10S quencher in cell suspensions of three common cell lines, HeLa, CHO and 293T (Figures 5 and 6A). The emission maximum of NR12S varied with the cell line between 580 and 590 nm, which was between the Lo (~ 570 nm) and Ld (~ 610 nm) phases of model membranes. When bQ10S was added to cells stained with NR12S, the drop in the fluorescence intensity was accompanied by a blue shift in the spectrum (Figure 5A, Supplementary Figure S9), so that the obtained spectra became closer to that observed for NR12S in the Lo phase (Figure 2). This blue shift was reproduced in all three cell lines (Figure 5B-D), suggesting that independently of the cell line, bQ10S quenches specifically NR12S fluorescence from separated Ld-like phase domains, so that the emission is exclusively observed from Lo-like phase. As the quencher produced this shift already at 5 nM concentration (Figure 5A), its binding to cell plasma membranes should be efficient, while its direct effect on the observed heterogeneity should be minimal. On the other hand, the spectrum of bNR10S was significantly red shifted with respect to NR12S (Figure 5B-D), and was very close to that observed in the Ld phase of model membranes (Figure 2). Remarkably, the spectrum of NR12S in cells could be expressed as a superposition of the spectra of bNR10S and NR12S with bQ10S quencher (Supplementary Figure S10). This result confirms the model of the distinct Lo- and Ld-like phases in the cell plasma membranes. The analysis of the green/red intensity ratio showed even more impressive differences between NR12S and bNR10S (Figure 6B). Moreover, while addition of bQ10S produced a strong increase in this ratio for NR12S, for bNR10S, the ratio changes were negligible. These sharp differences between NR12S and bNR10S, together with their ratiometric images in HeLa cells (Figure 4), show that bNR10S, unlike NR12S, is located mainly in the separated the Ld-like phase of the plasma membranes independently of the cell line. Thus, our new probes revealed phase heterogeneity in cell membranes, suggesting that the Lo- and Ld-like phases do exist as separate entities in the three cell lines. Indeed, a continuous phase of intermediate properties would produce the identical spectra for bNR10S, NR12S without and with bQ10S,

which is not the case. Moreover, the probes also show that the two separate phases are very close to the Lo and Ld phases in model vesicles.

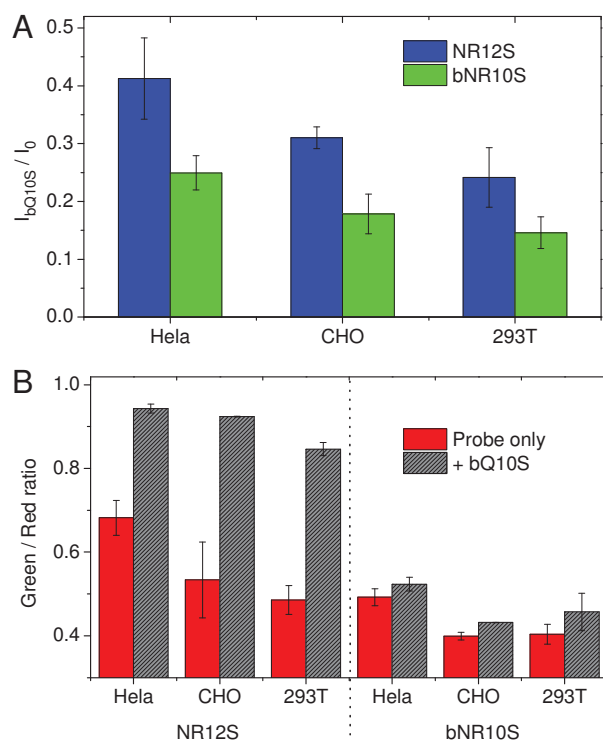


Figure 6. Quenching of NR12S and bNR10S probes by bQ10S in suspensions of different cell lines. Changes in the integral intensity (A) and Green/Red ratio (B) of probes (40 nM) in the presence of 160 nM of bQ10S.

Remarkably, the quenching of both probes depended on the cell line being the lowest for HeLa and the highest for 293T cells (Figure 6A). We could speculate that these differences are related to the fraction of the Lo-like phase in the plasma membranes of these cell lines, where HeLa and 293T cells present the largest fraction of this phase, respectively. Further analysis of the green/red intensity ratio, which is proportional to the fraction of Lo phase, confirmed this hypothesis, as this ratio was the highest for HeLa cells and the lowest for 293T cells (Figure 6B). As the two separate phases in cell membranes appear very close to the Lo and Ld phases of model vesicles, we could assume that the spectrum of NR12S in cells is a superposition of the spectra in the model Lo and Ld phases and its phase partitioning in cells is the same as in lipid vesicles (1/12). These assumptions allowed us to recalculate the content of the Lo-like phase at the outer membrane leaflet of each cell line. Surprisingly, we found that the content of the Lo-like phase is very large for all three cell lines, namely 90 ± 1 , 92 ± 1 and $96 \pm 1\%$, for 293T, CHO and HeLa cells, respectively. A similar conclusion was recently made using phase-sensitive probe Laurdan in HeLa cells (29), F2N12S in U87MG human glioblastoma cells (41), as well as using phase-partitioning dyes in vesicles composed of plasma membrane lipids (53). It can be rationalized taking into account that sphingomyelin is the major component of cell plasma membranes in their outer leaflet.

Nevertheless, the obtained values are probably overestimated, because the probe partitioning in model membranes could be different from that in plasma membranes (34).

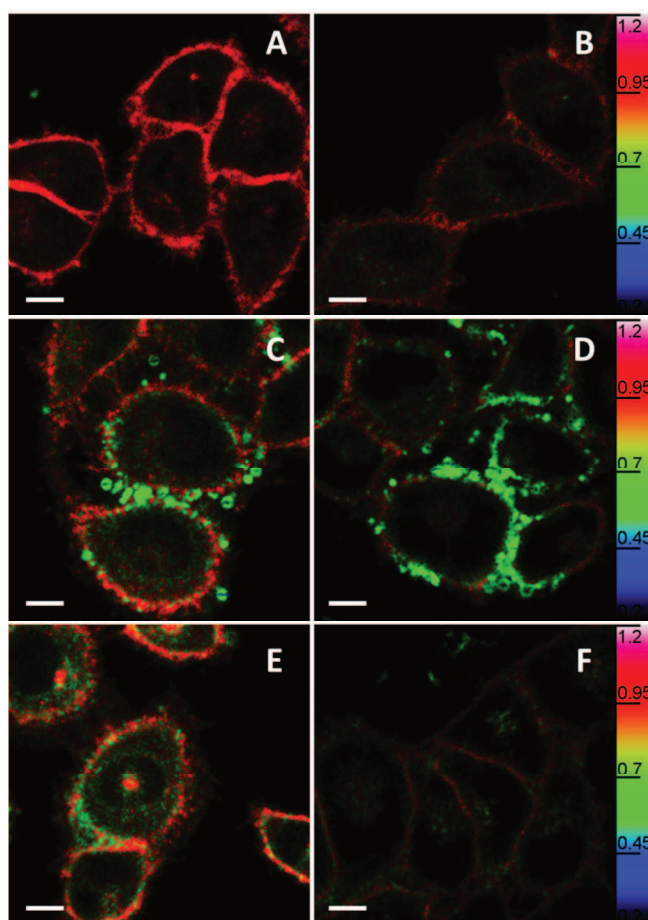


Figure 7. Vesicular domains of the Ld-like phase in cell membranes of apoptotic cells visualized by the probes. Fluorescence ratiometric images of intact HeLa cells (A and B) and cells treated with apoptosis-inducing agent IPA-3 (54) (25 μ M) for 48 h (C and D). The cells were stained with NR12S (A and C) and bNR10S (B and D) probes (40 nM). Addition of bQ10S quencher (100 nM) to apoptotic cells turns off the Ld-like phase regions in green for NR12S (E) and bNR10S (F). Scale bar is 10 μ m. The pseudo-color codes the green/red ratio.

Finally, we evaluated our new toolkit in cells undergoing apoptosis. Previously, it was shown that apoptosis, due to the loss of transmembrane asymmetry (55) and sphingomyelin hydrolysis into ceramide (56), may decrease the lipid order of cell plasma membrane (41, 43). Here, using our probes we studied the spatial distribution of the lipid order in the apoptotic cells produced by IPA-3 (54) treatment (Supplementary Figure S11). It can be seen that in comparison to the intact cells, the apoptotic ones stained with NR12S and bNR10S present small vesicles that appear in different color (green) from the main plasma membrane (red) (Figure 7A-D). These vesicles were described earlier as apoptotic blebs (57,

58), though their lipid order remained unclear. As the green color corresponds to low green/red ratio, the results suggest that the apoptotic blebs are characterized by lower lipid order compared to the plasma membrane. In the case of bNR10S, these vesicles were much brighter than the rest of the cell membrane, which is not the case of NR12S, where the differences were not pronounced. Thus, due to specificity of bNR10S to the Ld phase, it binds strongly apoptotic blebs confirming the low lipid order in their membranes. Therefore, in addition to color changes bNR10S exhibits strong fluorescence enhancement in apoptotic cells, which is a very useful property for apoptosis detection (59). Addition of bQ10S quencher resulted in nearly complete disappearance of these green vesicles (Figure 7E,F), which confirms that new vesicles present the Ld-like phase. Indeed, bQ10S, due to its specificity to the Ld phase, should bind preferentially the apoptotic blebs, thus providing their quenching without strong effect on the rest of the plasma membrane. Thus, our toolkit provided a triple evidence supporting formation of separated domains of the Ld-like phase in form of apoptotic blebs during apoptosis. It should be noted that the observed phase changes are related to the outer leaflet of the plasma membrane, because both NR12S and bNR10S probes do not undergo flip-flop in the model membranes. In this outer leaflet, initially dominated by the Lo-like phase, the loss of transmembrane asymmetry and the sphingomyelin hydrolysis during executive stage of apoptosis can generate large domains of the Ld-like phase, which could further be converted into exosomal structures observed in our studies. In summary, a toolkit of probes and quencher was developed for studying lipid microdomains (rafts) in model and cell membranes. The concept was to combine sensitivity of dyes to separated phase domains with selective probing of each phase. To this end, an analogue of recently developed Nile Red-based probe NR12S, bearing a bulky hydrophobic chain (bNR10S) was synthesized. It can partition selectively into the Ld phase, which was evidenced by spectroscopy of large unilamellar vesicles and microscopy of giant vesicles. On the other hand, a Black Hole Quencher-2 was modified with an anchor group bearing a bulky hydrophobic chain similarly to bNR10S. This molecule enabled specific quenching of NR12S probe in the Ld phase, so that only its fraction in the Lo phase remains fluorescent. Thus, the toolkit of two probes and quencher can specifically target, visualize and identify the Lo and Ld phases. Application of this toolkit in living cells (HeLa, CHO and 293T cell lines) revealed the coexistence of separated Lo- and Ld-like phases and their relative contribution was found to depend on the cell line. Moreover, in apoptotic cells, our toolkit evidenced formation of separate domains of the Ld-like phases in form of blebs. The results show the importance of the developed toolkit for research on lipid rafts, which due to their elusive nature remain a matter of intensive debates.

METHODS

See Supporting Information for a detailed description of the experimental methods.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information. Description of experimental methods. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

* The correspondence should be addressed to A. S. Klymchenko; tel: (+33) 390 24 42 55; fax: +33 390 24 43 13; e-mail: andrey.klymchenko@unistra.fr.

ACKNOWLEDGMENT

This work and RK were supported by ANR JCJC (ANR-11-JS07-014-01). ZD acknowledges support from CNRS and Region Alsace. Dr. Gábor Csúcs (ETH Zurich) is acknowledged for providing confocal microscopy facilities and fruitful discussions. We thank to Dr. Cyril Antheaume and Dr. Patrick Wehrung for NMR and Mass measurements and to R. Vauchelles from PIQ imaging platform for help with fluorescence microscopy image analysis.

REFERENCES

1. Dietrich, C., Bagatolli, L. A., Volovyk, Z. N., Thompson, N. L., Levi, M., Jacobson, K., and Gratton, E. (2001) Lipid rafts reconstituted in model membranes, *Biophys. J.* **80**, 1417.
2. Baumgart, T., Hess, S. T., and Webb, W. W. (2003) Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension, *Nature* **425**, 821-824.
3. Veatch, S. L., and Keller, S. L. (2003) Separation of Liquid Phases in Giant Vesicles of Ternary Mixtures of Phospholipids and Cholesterol, *Biophys. J.* **85**, 3074-3083.
4. Baumgart, T., Hammond, A. T., Sengupta, P., Hess, S. T., Holowka, D. A., Baird, B. A., and Webb, W. W. (2007) Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **104**, 3165-3170.
5. Veatch, S. L., Cicuta, P., Sengupta, P., Honerkamp-Smith, A., Holowka, D., and Baird, B. (2008) Critical fluctuations in plasma membrane vesicles, *ACS Chem. Biol.* **3**, 287-293.
6. Simons, K., and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes, *Nature* **387**, 569.
7. Lingwood, D., and Simons, K. (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle, *Science* **327**, 46-50.

8. Brown, D. A., and London, E. (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane raft, *J. Biol. Chem.* *275*, 17221.
9. Staubach, S., and Hanisch, F. G. (2011) Lipid rafts: Signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer, *Expert Rev. Proteomic.* *8*, 263-277.
10. Munro, S. (2003) Lipid Rafts: Elusive or Illusive?, *Cell* *115*, 377.
11. Hancock, J. F. (2006) Lipid rafts: Contentious only from simplistic standpoints, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *7*, 456-462.
12. Truong-Quang, B. A., and Lenne, P. F. (2014) Membrane microdomains: From seeing to understanding, *Front. Plant Sci.* *5*.
13. Lozano, M. M., Liu, Z., Sunnick, E., Janshoff, A., Kumar, K., and Boxer, S. G. (2013) Colocalization of the ganglioside GM1 and cholesterol detected by secondary ion mass spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.* *135*, 5620-5630.
14. Goksu, E. I., Vanegas, J. M., Blanchette, C. D., Lin, W. C., and Longo, M. L. (2009) AFM for structure and dynamics of biomembranes, *Biochim. Biophys. Acta* *1788*, 254-266.
15. Swamy, M. J., Ciani, L., Ge, M., Smith, A. K., Holowka, D., Baird, B., and Freed, J. H. (2006) Coexisting domains in the plasma membranes of live cells characterized by spin-label ESR spectroscopy, *Biophys. J.* *90*, 4452-4465.
16. Suzuki, K. G. N., Fujiwara, T. K., Sanematsu, F., Iino, R., Edidin, M., and Kusumi, A. (2007) GPI-anchored receptor clusters transiently recruit Lyn and G α for temporary cluster immobilization and Lyn activation: Single-molecule tracking study 1, *J. Cell Biol.* *177*, 717-730.
17. Goswami, D., Gowrishankar, K., Bilgrami, S., Ghosh, S., Raghupathy, R., Chadda, R., Vishwakarma, R., Rao, M., and Mayor, S. (2008) Nanoclusters of GPI-Anchored Proteins Are Formed by Cortical Actin-Driven Activity, *Cell* *135*, 1085-1097.
18. Bader, A. N., Hoetzel, S., Hofman, E. G., Voortman, J., Van Bergen En Henegouwen, P. M. P., Van Meer, G., and Gerritsen, H. C. (2011) Homo-FRET imaging as a tool to quantify protein and lipid clustering, *ChemPhysChem* *12*, 475-483.
19. Kenworthy, A. K., Petranova, N., and Edidin, M. (2000) High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI- anchored proteins in cell plasma membranes, *Mol. Biol. Cell* *11*, 1645-1655.
20. Lasserre, R., Guo, X. J., Conchonaud, F., Hamon, Y., Hawchar, O., Bernard, A. M., Soudja, S. M. H., Lenne, P. F., Rigneault, H., Olive, D., Bismuth, G., Nunès, J. A., Payrastra, B., Marguet, D., and He, H. T. (2008) Raft nanodomains contribute to Akt/PKB plasma membrane recruitment and activation, *Nat. Chem. Biol.* *4*, 538-547.
21. Bacia, K., Scherfeld, D., Kahya, N., and Schwille, P. (2004) Fluorescence correlation spectroscopy relates rafts in model and native membranes, *Biophys. J.* *87*, 1034-1043.
22. Eggeling, C., Ringemann, C., Medda, R., Schwarzmann, G., Sandhoff, K., Polyakova, S., Belov, V. N., Hein, B., Von Middendorff, C., Schönle, A., and Hell, S. W. (2009) Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell, *Nature* *457*, 1159-1162.
23. Sengupta, P., Jovanovic-Taliman, T., Skoko, D., Renz, M., Veatch, S. L., and Lippincott-Schwartz, J. (2011) Probing protein heterogeneity in the plasma membrane using PALM and pair correlation analysis, *Nat. Methods* *8*, 969-975.
24. Wilmes, S., Staufenbiel, M., Liße, D., Richter, C. P., Beutel, O., Busch, K. B., Hess, S. T., and Piehler, J. (2012) Triple-color super-resolution imaging of live cells: Resolving

- submicroscopic receptor organization in the plasma membrane, *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 4868-4871.
25. Adler, J., Shevchuk, A. I., Novak, P., Korchev, Y. E., and Parmryd, I. (2010) Plasma membrane topography and interpretation of single-particle tracks, *Nat. Methods* **7**, 170-171.
 26. Lillemeier, B. F., Mörtelmaier, M. A., Forstner, M. B., Huppa, J. B., Groves, J. T., and Davis, M. M. (2010) TCR and Lat are expressed on separate protein islands on T cell membranes and concatenate during activation, *Nat. Immunol.* **11**, 90-96.
 27. Kusumi, A., Nakada, C., Ritchie, K., Murase, K., Suzuki, K., Murakoshi, H., Kasai, R. S., Kondo, J., and Fujiwara, T. (2005) Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: High-speed single-molecule tracking of membrane molecules, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **34**, 351-378.
 28. Sengupta, P., Holowka, D., and Baird, B. (2007) Fluorescence resonance energy transfer between lipid probes detects nanoscopic heterogeneity in the plasma membrane of live cells, *Biophys. J.* **92**, 3564-3574.
 29. Owen, D. M., Williamson, D. J., Magenau, A., and Gaus, K. (2012) Sub-resolution lipid domains exist in the plasma membrane and regulate protein diffusion and distribution, *Nat. Commun.* **3**, 1256.
 30. Brameshuber, M., Weghuber, J., Ruprecht, V., Gombos, I., Horváth, I., Vigh, L., Eckerstorfer, P., Kiss, E., Stockinger, H., and Schütz, G. J. (2010) Imaging of mobile long-lived nanoplateforms in the live cell plasma membrane, *J. Biol. Chem.* **285**, 41765-41771.
 31. Klymchenko, A. S., and Kreder, R. (2014) Fluorescent Probes for Lipid Rafts: From Model Membranes to Living Cells, *Chem. Biol.* **21**, 97-113.
 32. Dietrich, C., Yang, B., Fujiwara, T., Kusumi, A., and Jacobson, K. (2002) Relationship of lipid rafts to transient confinement zones detected by single particle tracking, *Biophys. J.* **82**, 274-284.
 33. Baumgart, T., Hunt, G., Farkas, E. R., Webb, W. W., and Feigenson, G. W. (2007) Fluorescence probe partitioning between Lo/Ld phases in lipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 2182-2194.
 34. Sezgin, E., Levental, I., Grzybek, M., Schwarzmann, G., Mueller, V., Honigmann, A., Belov, V. N., Eggeling, C., Coskun, Ü., Simons, K., and Schwille, P. (2012) Partitioning, diffusion, and ligand binding of raft lipid analogs in model and cellular plasma membranes, *Biochim. Biophys. Acta* **1818**, 1777-1784.
 35. Xu, X., Bittman, R., Duportail, G., Heissler, D., Vilcheze, C., and London, E. (2001) Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebroside, and ceramide, *J. Biol. Chem.* **276**, 33540-33546.
 36. Doval, D. A., Fin, A., Takahashi-Umebayashi, M., Riezman, H., Roux, A., Sakai, N., and Matile, S. (2012) Amphiphilic dynamic NDI and PDI probes: Imaging microdomains in giant unilamellar vesicles, *Org. Biomol. Chem.* **10**, 6087-6093.
 37. Bagatolli, L. A. (2006) To see or not to see: Lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy, *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 1541-1556.

38. Owen, D. M., Rentero, C., Magenau, A., Abu-Siniyeh, A., and Gaus, K. (2012) Quantitative imaging of membrane lipid order in cells and organisms, *Nat. Protoc.* **7**, 24-35.
39. Hwan, M. K., Byeong, H. J., Hyon, J. Y., Myoung, J. A., Mun, S. S., Jin, H. H., Lee, K. J., Chul, H. K., Joo, T., Hong, S. C., and Bong, R. C. (2008) Two-photon fluorescent turn-on probe for lipid rafts in live cell and tissue, *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 4246-4247.
40. Jin, L., Millard, A. C., Wuskell, J. P., Dong, X., Wu, D., Clark, H. A., and Loew, L. M. (2006) Characterization and application of a new optical probe for membrane lipid domains, *Biophys. J.* **90**, 2563-2575.
41. Oncul, S., Klymchenko, A. S., Kucherak, O. A., Demchenko, A. P., Martin, S., Dontenwill, M., Arntz, Y., Didier, P., Duportail, G., and Mely, Y. (2010) Liquid ordered phase in cell membranes evidenced by a hydration-sensitive probe: Effects of cholesterol depletion and apoptosis, *Biochim Biophys Acta* **1798**, 1436-1443.
42. Klymchenko, A. S., Oncul, S., Didier, P., Schaub, E., Bagatolli, L., Duportail, G., and Mély, Y. (2009) Visualization of lipid domains in giant unilamellar vesicles using an environment-sensitive membrane probe based on 3-hydroxyflavone, *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 495-499.
43. Darwich, Z., Klymchenko, A. S., Kucherak, O. A., Richert, L., and Mély, Y. (2012) Detection of apoptosis through the lipid order of the outer plasma membrane leaflet, *Biochim. Biophys. Acta* **1818**, 3048-3054.
44. Kucherak, O. A., Oncul, S., Darwich, Z., Yushchenko, D. A., Arntz, Y., Didier, P., Mely, Y., and Klymchenko, A. S. (2010) Switchable Nile red-based probe for cholesterol and lipid order at the outer leaflet of biomembranes, *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 4907.
45. Demchenko, A. P., Mély, Y., Duportail, G., and Klymchenko, A. S. (2009) Monitoring biophysical properties of lipid membranes by environment-sensitive fluorescent probes, *Biophys. J.* **96**, 3461-3470.
46. London, E. (2002) Insights into lipid raft structure and formation from experiments in model membranes, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 480-486.
47. Loura, L. M. S., and Prieto, M. (2011) FRET in membrane biophysics: An overview, *Front. Physiol.* **2 NOV**, art. no. 82.
48. Sapsford, K. E., Berti, L., and Medintz, I. L. (2006) Materials for fluorescence resonance energy transfer analysis: Beyond traditional donor-acceptor combinations, *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 4562-4588.
49. Ahmed, S. N., Brown, D. A., and London, E. (1997) On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: Physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes, *Biochemistry* **36**, 10944-10953.
50. Hengartner, M. O. (2000) The biochemistry of apoptosis, *Nature* **407**, 770-776.
51. Sankaram, M. B., and Thompson, T. E. (1990) Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin, *Biochemistry* **29**, 10670-10675.
52. Darwich, Z., Klymchenko, A. S., Dujardin, D., and Mély, Y. (2014) Imaging lipid order changes in endosome membranes of live cells by using a Nile Red-based membrane probe, *RSC Adv.* **4**, 8481-8488.
53. Levental, I., Byfield, F. J., Chowdhury, P., Gai, F., Baumgart, T., and Janmey, P. A. (2009) Cholesterol-dependent phase separation in cell-derived giant plasma-membrane vesicles, *Biochem. J.* **424**, 163-167.

54. Ong, C. C., Jubb, A. M., Haverty, P. M., Zhou, W., Tran, V., Truong, T., Turley, H., O'Brien, T., Vucic, D., Harris, A. L., Belvin, M., Friedman, L. S., Blackwood, E. M., Koeppen, H., and Hoeflich, K. P. (2011) Targeting p21-activated kinase 1 (PAK1) to induce apoptosis of tumor cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **108**, 7177-7182.
55. Zwaal, R. F. A., and Schroit, A. J. (1997) Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells, *Blood* **89**, 1121-1132.
56. Tepper, A. D., Ruurs, P., Wiedmer, T., Sims, P. J., Borst, J., and Van Blitterswijk, W. J. (2000) Sphingomyelin hydrolysis to ceramide during the execution phase of apoptosis results from phospholipid scrambling and alters cell-surface morphology, *J. Cell Biol.* **150**, 155-164.
57. Coleman, M. L., Sahai, E. A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., and Olson, M. F. (2001) Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I, *Nat. Cell Biol.* **3**, 339-345.
58. Sebbagh, M., Renvoizé, C., Hamelin, J., Riché, N., Bertoglio, J., and Bréard, J. (2001) Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing, *Nat. Cell Biol.* **3**, 346-352.
59. Krysko, D. V., Vanden Berghe, T., D'Herde, K., and Vandenabeele, P. (2008) Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis, *Methods* **44**, 205-221.

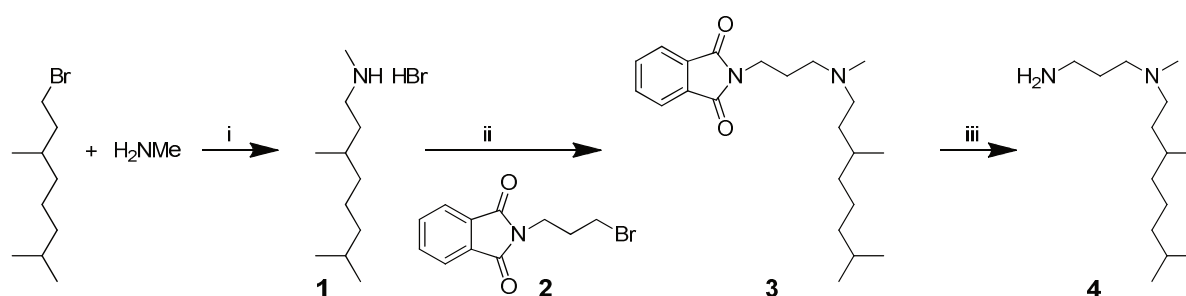
Supporting information

Solvatochromic Nile Red Probes with FRET Quencher Specifically Target and Identify Separate Membrane Phases in Living and Apoptotic Cells

Rémy Kreder, Kyrylo A. Pyrshev, Zeinab Darwich, Oleksandr A. Kucherak, Yves Mély, Andrey S. Klymchenko

Methods

All chemicals and solvents for synthesis were from Sigma-Aldrich, Alfa Aesar or TCI Europe. NMR spectra were recorded at 20°C on Bruker Avance III 400 MHz spectrometer. Mass spectra were obtained using an Agilent Q-TOF 6520 mass spectrometer.

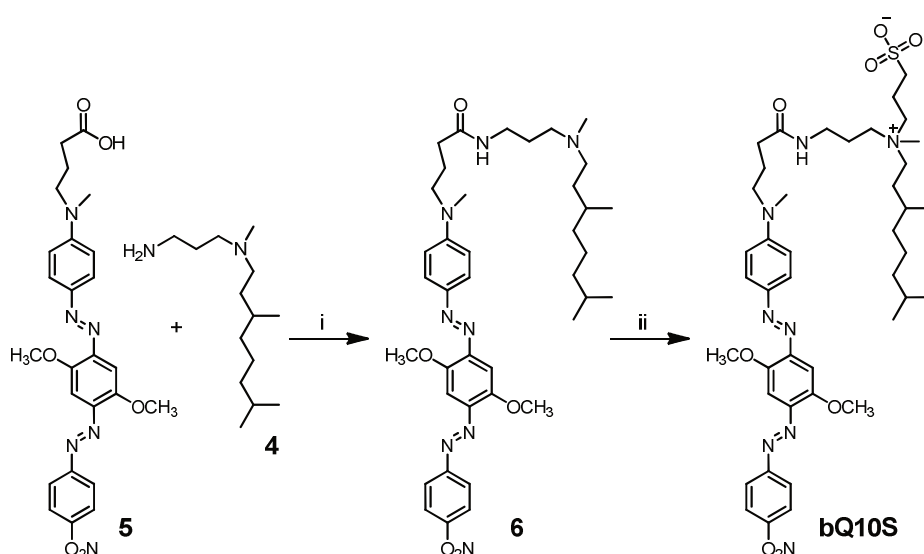
Synthesis bNR10S probe and bQ10S quencher


Scheme S1. Synthesis of the intermediate amines for bNR12S and bQ10S. (i) THF, RT overnight ; (ii) K_2CO_3 , DMF, heating (110 °C) 2h (40%) ; (iii) Hydrazine, EtOH, reflux 3 h (82%).

N,3,7-trimethyloctan-1-amine hydrobromide (1). To the solution of H_2NMe (2.5 eq, 25 mL) in THF, 1-bromo-3,7-dimethyloctane (1.05 eq, 4 mL) was added slowly. The mixture was stirred overnight at room temperature. The solvent was removed under vacuum to give the desired product as a white precipitate. The residue was used directly in the next step without further purification 1H RMN (400 MHz, dioxane) δ 3.33 (s, 2H), 2.88 (m, 2H), 2.55(t, $J = 5.2$ Hz, 3H), 2.37 (q, $J = 6$ Hz, 2H), 1.62-1.07 (m; 10H), 0.85 (d, $J = 6.8$ Hz, 9H). HR-LC-MS: m/z $C_{11}H_{25}N$ Calcd. 171.1987, found 171.1983.

2-(3-((3,7-dimethyloctyl)(methyl)amino)propyl)isoindoline-1,3-dione (3). N^1 -(3,7-dimethyloctyl)- N,3,7-trimethyloctan-1-amine hydrobromide **1** (1.05 eq, 1.1 g) and N-(3-bromopropyl)phthalimide **2** (1 eq, 1.0 g) were dissolved in DMF then, K_2CO_3 (4 eq, 2.16 g) was added to the reaction. The mixture was then heated to 110°C for 2h. The solvent was removed under vacuum and, after addition of water, the product was extracted by EtOAc three times and washed with water. Then, it was purified by column chromatography using $CH_2Cl_2/MeOH$ (9:1) as eluent to obtain the desired product as yellowish oil. 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.82 (q, $J = 2.8$ Hz, 2H), 7.69 (q, $J = 2.8$ Hz, 2H), 3.71 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.48(m, 2H), 2.38 (m, 2H), 2.23 (s, 3H), 1.89 (quin, $J = 7.6$ Hz, 2H) 1.55-1.02 (m, 10H), 0.83 (d, $J = 6.4$ Hz, 9H). HR-LC-MS: m/z $C_{22}H_{34}N_2O_2$ Calcd. 358.2620, found 358.2632.

N^1 -(3,7-dimethyloctyl)- N^1 -methylpropane-1,3-diamine (4). to a solution of 2-(3-((3,7-dimethyloctyl)(methyl)amino)propyl)isoindoline-1,3-dione (1 eq, 100 mg) in EtOH, ninhydrine (1.5 eq, 21 μ L) was added and the mixture was heated to reflux for three hours. The crude product was dissolved in CH_2Cl_2 and washed by a solution of NaOH 1M three times (100 mL). The solvent is removed under vacuum to obtain the crude product as yellowish oil. The residue was used directly in the next step without further purification.

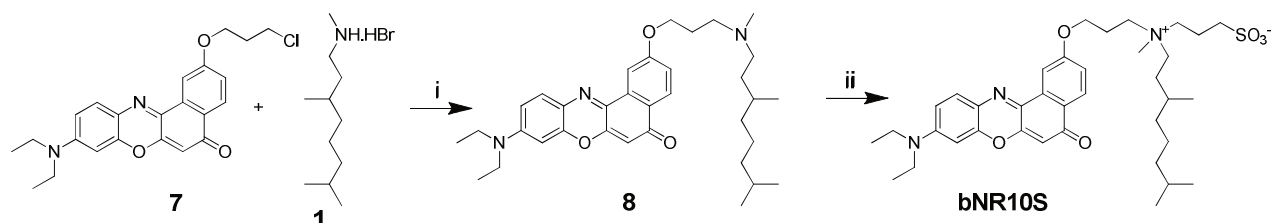


Scheme S2. Synthesis of bQ10S quencher. (i) DMF/CH₂Cl₂, BOP, HOBt, DIEA, rt 6h (45%); (ii) 1,3-propanesultone, K₂CO₃, CH₃CN, reflux 48 h (51%).

4-((4-((E)-(2,5-dimethoxy-4-((E)-(4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)diazenyl)phenyl)(methyl)amino)-N-(3-((3,7-dimethyloctyl)(methyl)amino)propyl)butanamide (6). 4-((4-((E)-(2,5-dimethoxy-4-((E)-(4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)diazenyl)phenyl)(methyl)amino)butanoic acid (**5**) (1 eq, 20 mg), N1-(3,7-dimethyloctyl)-N1-methylpropane-1,3-diamine (**4**) (1.5 eq, 14 mg), BOP (1.1eq, 19 mg), HOBt (1.38 eq, 8 mg), DIEA (5 eq, 35 μ L) were dissolved in a mixture of DMF/CH₂Cl₂ (1:1; 2 mL) and left at room temperature for 6h. Then the crude product was purified on preparative TLC using MeOH/CH₂Cl₂ (1:9) and then EtOAc/CH₂Cl₂ (2:8) as eluents to obtain a dark purple crystalline powder. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.33 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 8.01 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.9 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.45 (d, J = 15.6 Hz, 2H), 6.75 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 4.06 (s, 3H), 4.01 (s, 3H), 3.49 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.33 (q, J = 6Hz, 2H), 3.07 (s, 3H), 2.53 (m, 2H), 2.43 (m, 2H), 2.26 (s, 3H) 2.2 (t, J = 6.8Hz, 2H) 1.96 (m, 2H), 1.70 (m, 2H), 1.50 (m, 2H), 1.35-1.04 (m, 9H), 0.85 (d, J = 7.6 Hz, 3H), 0.83 (d, J = 6.8 Hz, 6H). HR-LC-MS: m/z C₃₉H₅₆N₈O₅ Calcd. 716.9125, found 716.9145.

3-((3-(4-((E)-(2,5-dimethoxy-4-((E)-(4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)diazenyl)phenyl)(methyl)amino)butanamido)propyl)(3,7-dimethyloctyl)(methyl)ammonio)propane-1-sulfonate (bQ10S). 4-((4-((E)-(2,5-dimethoxy-4-((E)-(4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)diazenyl)phenyl)(methyl)amino)-N-(3-((3,7-dimethyloctyl)(methyl)amino)propyl)butanamide (**6**) (1 eq, 6.7 mg), 1,3-propanesultone (3 eq, 2.4 μ L) and K₂CO₃ (4 eq, 5 mg) were mixed in CH₃CN (5 mL). The reaction mixture was heated to reflux for 48h and the crude product was purified by preparative TLC using MeOH/CH₂Cl₂ (2:8) as eluent. A dark purple crystalline powder was obtained. ¹H RMN (400

MHz, CDCl₃) δ 8.34 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 8.01 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.87 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.44 (d, J = 14.4 Hz, 2H), 6.81 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.05 (s, 3H), 4.00 (s, 3H), 3.49 (t, J = 7.2 Hz, 2H) 3.6 (br, 2H), 3.07 (s, 3H), 2.98 (s, 3H), 2.89 (br, 2H), 2.36 (m, 2H), 2.31 (m, 2H), 2.17 (br, 2H), 1.96 (m, 2H), 1.59 (m, 2H), 1.52-1.04 (m, 16H), 0.87 (d, J = 6 Hz, 3H), 0.82 (d, J = 6.8 Hz, 6H). HR-LC-MS: C₄₂H₆₂N₈O₈S Calcd. 838.4411, found 838.4482.



Scheme S3. Synthesis of bNR10S. (i) KI, K₂CO₃, CH₃CN, reflux 48h (55%); (ii) 1,3-propanesultone, K₂CO₃, CH₃CN, reflux 24 h (49%).

9-(diethylamino)-2-(3-((3,7-dimethyloctyl)(methyl)amino)propoxy)-5H-benzo[a]phenoxazin-5-one (8).

2-(3-Chloropropoxy)-9-(diethylamino)-5H-benzo[a]phenoxazin-5-one (**7**) (1eq, 100 mg) was dissolved in CH₃CN (~15 mL) and then N¹-(3,7-dimethyloctyl)-N¹-methylpropane-1,3-diamine (**1**) (2.2 eq, 156.57 mg), KI (0.5 eq, 20 mg) and K₂CO₃ (2.5 eq, 84 mg) were added to the solution. The reaction mixture was heated to reflux for 48h. After evaporation of the solvent, the crude product was purified by column chromatography using CH₂Cl₂/MeOH (95:5 then 9:1) as eluent. A dark red crystalline powder was obtained. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.19 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.14 (dd, J = 8.8, 2.8 Hz, 1H), 6.63 (dd, J = 8.8, 2.8 Hz, 1H), 6.43 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.27 (s, 1H), 4.22 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.44 (q, J = 6.8 Hz, 4 H), 2.66 (m, 2H), 2.47 (m, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.08 (quin, J = 6.4 Hz, 2H) 1.58-1.05 (m, 16H), 0.86 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 0.82 (d, J = 6.8 Hz, 6H). HR-LC-MS: m/z C₃₄H₄₇N₃O₃ Calcd. 545.3617, found 545.3612.

3-((3-((9-(diethylamino)-5-oxo-5H-benzo[a]phenoxazin-2-yl)oxy)propyl)(3,7-dimethyloctyl)(methyl)ammonio)propane-1-sulfonate (bNR10S).

9-(Diethylamino)-2-(3-((3,7-dimethyloctyl)(methyl)amino)propoxy)-5H-benzo[a]phenoxazin-5-one (**8**) (1eq, 60 mg) was dissolved in CH₃CN (5 mL) and then 1,3-propanesultone (2.7 eq; 32.9 μL) and K₂CO₃ (2 eq, 30.4 mg) was added to the solution. The reaction mixture was refluxed for 48 h. After solvent evaporation, the crude product was purified by column chromatography using CH₂Cl₂/MeOH (9:1 then 8:2) as eluent. A dark red crystalline powder was obtained. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.94 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.61 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.98 (dd, J = 9.2, 2 Hz, 1H), 6.35 (dd, J = 9.2, 2 Hz, 1H), 6.12 (d, J = 2 Hz, 1H), 5.94 (s, 1H), 4.11 (br, 2H), 3.67 (br, 5H), 3.55 (br, 2H), 6.29 (q, J = 6.4Hz, 4H), 3.22 (s, 3H), 2.99 (m, 2H), 2.27 (m,

4H), 1.66 (m, 1H), 1.55-1.18 (m, 8H), 1.14 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H), 1.02 (m, 2H), 0.86 (d, $J = 6$ Hz, 3H), 0.74 (d, $J = 6$ Hz; 6H). HR-LC-MS: m/z $C_{38}H_{55}N_3O_6S$ Calcd. 667.3655, found 667.3646.

Lipid Vesicles. Dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) and cholesterol were purchased from Sigma-Aldrich. Bovine brain sphingomyelin (SM) was from Avanti Polar Lipids.

Large unilamellar vesicles (LUVs) were obtained by the extrusion method as previously described.⁽²⁾ Briefly, a suspension of multilamellar vesicles was extruded by using a Lipex Biomembranes extruder (Vancouver, Canada). The size of the filters was first 0.2 μm (7 passages) and thereafter 0.1 μm (10 passages). This generates monodisperse LUVs with a mean diameter of 0.11 μm as measured with a Malvern Zetamaster 300 (Malvern). LUVs were labeled by adding aliquots (generally 2 μL) of probe stock solutions in dimethyl sulfoxide to 1-mL solutions of vesicles to obtain a 0.4 μM final probe concentration (final DMSO volume <0.25%). Since the probe binding kinetics is very rapid, the fluorescence experiments were performed a few minutes after addition of the aliquot. A 20 mM phosphate buffer, pH 7.4, was used in these experiments. Concentration of the lipids was generally 200 μM .

Giant unilamellar vesicles (GUVs) were generated by electroformation in a home-built liquid cell (University of Odense, Denmark), using previously described procedures.⁽³⁾ A 0.1 mM solution of lipids in chloroform was deposited on the platinum wires of the chamber, and the solvent was evaporated under vacuum for 30 min. The chamber, thermostated at 55 $^{\circ}\text{C}$, was filled with a 300 mM sucrose solution, and a 2-V, 10-Hz alternating electric current was applied to this capacitor-like configuration for ca. 2 h. Then, a 50 μL aliquot of the obtained stock solution of GUVs in sucrose (cooled down to room temperature) was added to 200 μL of 300 mM glucose solution to give the final suspension of GUVs used in microscopy experiments. The staining of GUVs was performed by addition of an aliquot of the probe stock solution in DMSO to obtain a 0.1 μM final probe concentration (final DMSO volume <0.25%). Marker of Ld phase NBD-DOPE was added before the electroformation at the probe/ lipid ratio 1/500 (total lipid).

Cell Lines, Culture Conditions, and Treatment. HeLa and 293 T cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (D-MEM, Low glucose, +GlutaMAX, Gibco-Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Lonza), and 1% antibiotic solution (penicillin–streptomycin, Gibco-Invitrogen) in a humidified incubator with 5% CO_2 /95% air atmosphere at 37 $^{\circ}\text{C}$. CHO cells were cultured in Ham's F-12 Nutrient Mixture (F-12 Nut Mix (1X) + GlutaMax, Gibco-Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Lonza), and 1% antibiotic solution (penicillin–streptomycin, Gibco-Invitrogen) in a humidified incubator with 5% CO_2 /95% air atmosphere at 37 $^{\circ}\text{C}$. A cell concentration of 5–10 $\times 10^4$ cells ml^{-1} was maintained by removal of a portion of the culture and replacement with fresh medium 3 times per week. For apoptosis studies, cells were treated with 25 μM IPA-3 (Sigma-Aldrich) for 48 h in a humidified incubator with 5% CO_2 atmosphere at 37 $^{\circ}\text{C}$, as it was described elsewhere (4). To verify the apoptosis induction, the cells treated with an

apoptosis-inducing agent IPA-3 were stained using GFP-labeled Annexin V, and monitored with Beckman Coulter Epic XL flow cytometer. To get sufficiently high signal 25000 events were counted per sample. Obtained data was analyzed with FCS express software.

In fluorescence spectroscopy experiments, cells were detached by trypsinization. DMEM medium was first removed from the culture dish, and cells were washed two times with DPBS. Trypsin 10x (Lonza) solution was diluted 10 times by DPBS and incubated with the cells at 37 °C for 4 min. The solution of trypsinized cells was then diluted by DPBS, transferred to Falcon tubes and centrifuged at 900 rpm for 5 min. The washing procedure was repeated one more time with HBSS solution. To stain the cell suspension with NR12S or bNR10S probes, an appropriate aliquot of its stock solution in DMSO was added to 0.5 mL of HBSS buffer, and after vortexing the solution was immediately added to 0.5 mL of the cell suspension to obtain a final probe concentration of 40 nM (<0.25% DMSO) and a cell concentration of 5×10^5 - 10^6 cells/mL. This low concentration of NR12S was necessary to minimize any possible artifacts related to the probe excess.⁽⁵⁾ In the case of bNR10S, this concentration was also appropriate, as our tests in three cell lines showed that the spectral shifts due to excessive binding of the probe are observed only above 40 nM (Fig. S8). It should be noted that only freshly prepared solutions of the probe in HBSS should be used (<1 min) for cell staining, because of the slow aggregation of the probe in water. Before measurements, the cell suspension with probe was incubated for 7 min at room temperature in the dark. In spectroscopy experiments, the quencher (bQ10S) can be added directly from the stock solution (at an appropriate concentration) into the cell sample.

For microscopy studies, HeLa cells were seeded onto the 2-well Lab-Tek chambers at the density of 75×10^3 cells/well. After washing the cells with Ringer's solution, a freshly prepared solution of probes in Ringer's solution was added to the cells (< 0.25% DMSO volume) and incubated for 7 min in the dark with 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. Final probe concentration was 40 nM. bQ10S was added the same way; an appropriate aliquot of its stock solution in DMSO was added to 200µL of Ringer's solution, and after vortexing the solution was immediately added to the cell sample.

Fluorescence Spectroscopy and Microscopy. Absorption spectra were recorded on a Cary 4 spectrophotometer (Varian) and fluorescence spectra on a Fluorolog (Jobin Yvon, Horiba) spectrofluorometer. Fluorescence emission spectra were systematically recorded at 520 nm excitation wavelength at room temperature, unless otherwise indicated. All the spectra were corrected from the fluorescence of the corresponding blank (suspension of cells or lipid vesicles without the probe). The analysis of the fluorescence spectra in order to recalculate the partition of the probes between Lo and Ld phases was done as described in the supplementary information.

Fluorescence microscopy experiments of giant vesicles were performed by using a Leica TSC SPE confocal microscope. For ratiometric imaging excitation was provided by 488 nm, while the emission was split on two channels: "green" (550-580 nm) and "red" (590-620 nm). The

images were processed with a homemade program under ImageJ that generates a ratiometric image by dividing the image of the green channel by that of the red channel. For each pixel, a pseudocolor scale is used for coding the ratio, while the intensity is defined by the integral intensity recorded for both channels at the corresponding pixel. To image selectively the Nile Red probes (NR12S and bNR10S) and NBD-DOPE without significant cross-talk, the former were excited at 561 nm and detected at 570-650 nm, while the latter was excited at 488 nm and detected at 500-520 nm.

Fluorescence ratiometric imaging of giant vesicles were performed by using a home-built two-photon laser scanning setup based on an Olympus IX70 inverted microscope with an Olympus 60x 1.2NA water immersion objective (6). Two-photon excitation was provided by a titanium-sapphire laser (Tsunami, Spectra Physics), and photons were detected with Avalanche Photodiodes (APD SPCM-AQR-14-FC, Perkin-Elmer) connected to a counter/timer PCI board (PCI6602, National Instrument). Imaging was carried out using two fast galvo mirrors in the descanned fluorescence collection mode. Typical acquisition time was 50 s with an excitation power around 30 mW (λ 830 nm) at the sample level. Images corresponding to the green and red channels were recorded simultaneously using a dichroic mirror (Beamsplitter 585 DCXR) and two APDs. The experiments were done at 25 °C.

Confocal microscopy experiments with HeLa cells were performed by using ZEISS LSM 710-FCS with HXC PL APO 63x/1.40 OIL CS objective at 37°C, 5% CO₂ and high humidity. The excitation was provided by 488 nm Argon laser. Emission was spitted on two channels: "green" (550-580 nm) and "red" (590-620 nm). For full quality information from the cells the transmission channel was applied. The images were processed with the Image J software.

To obtain ratiometric images a plug-in for Image J, prepared by Romain Vauchelles, was used. It generates a ratiometric image by dividing the image of the short-wavelength band by that of the long-wavelength band. For each pixel, a pseudo-color scale is used for coding the ratio, while the intensity is defined by the integral intensity recorded for both channels at the corresponding pixel.

Binding of probes to lipid vesicles

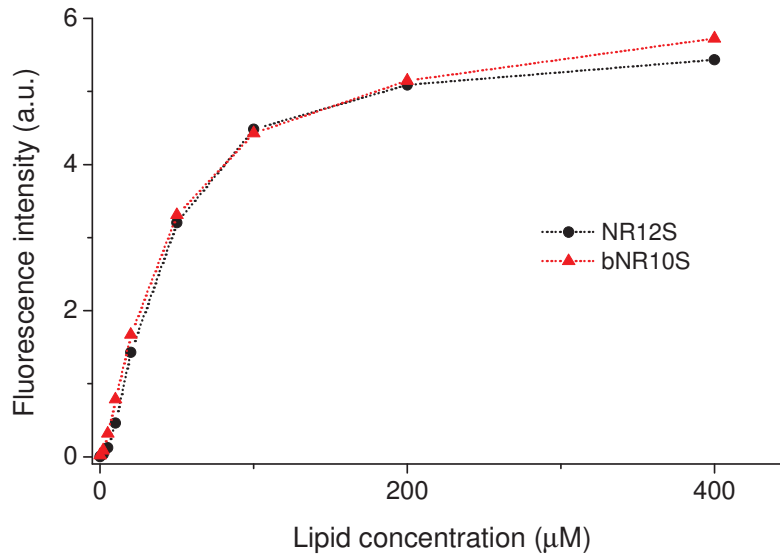


Figure S1. Fluorescence intensity at the emission maximum (607 nm) of NR12S and bNR10S in DOPC vesicles (LUVs) as a function of lipid concentration.

Analysis of probe flip-flop

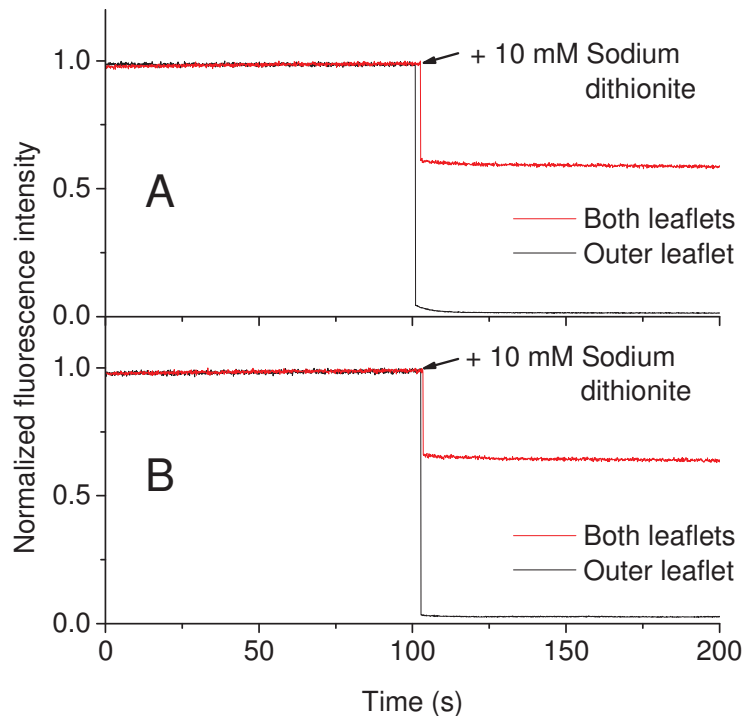


Figure S2. Flip-flop studies of NR12S and bNR10S. Effect of sodium dithionite addition on the fluorescence intensity of NR12S (A) and bNR10S (B) added to LUVs in two ways: before LUVs preparation (expected both leaflets staining) and after the LUVs preparation (expected outer leaflet staining) with 1h incubation at rt.

Binding kinetics to model membranes

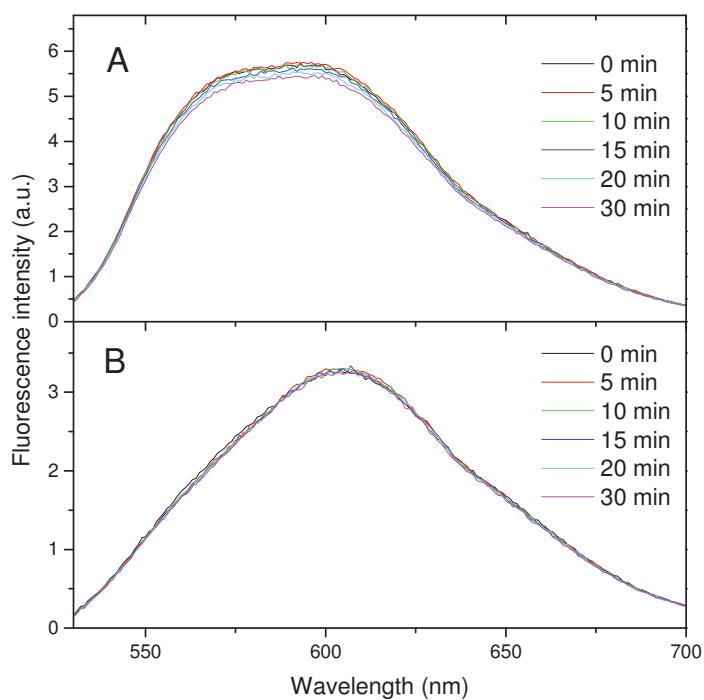


Figure S3. Fluorescence spectra of NR12S (A) and bNR10S (B) recorded at different time after addition of the probes to the mixture of lipid vesicles presenting Lo and Ld phases (Lo/Ld ratio is 10/1). The time 0 corresponds to recording rapidly after the probe addition (approximate delay time is 30 s).

Analysis of the probe partitioning

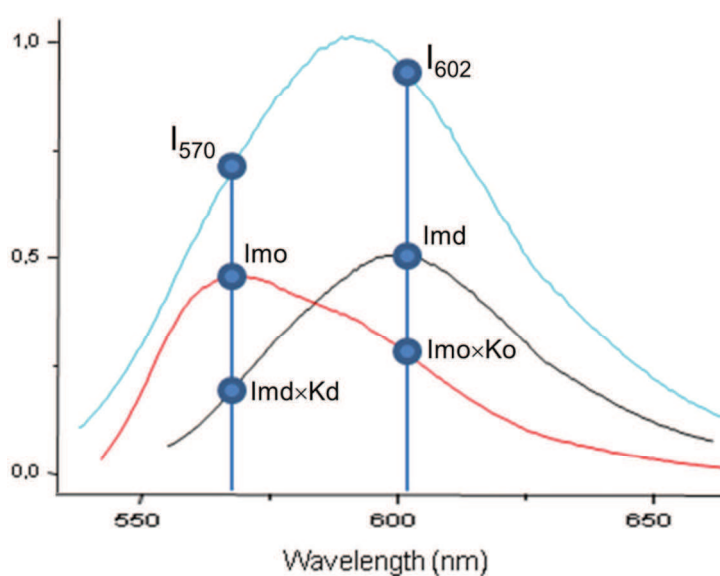


Figure S4. Presentation of the spectrum of the probe in the mixture of phases as an overlap of two spectra in the individual Lo (red) and Ld (black) phases.

It is possible to calculate the partition ratio of a probe between two types of phases, by calculating the contribution of the probe signal from each phase into final spectrum in the phase mixtures. Assuming that the observed spectrum in the mixture of phases is a sum of two spectra in the Lo and Ld phases, the fluorescence intensity at 570 nm (maximum for Lo phase) and 602 nm (maximum for Ld phase) of the spectrum, $I_t(570)$ and $I_t(602)$, respectively, can be expressed as follows:

$$I_{570} = I_{mo} + I_{md} * K_d \quad (1)$$

$$I_{602} = I_{md} + I_{mo} * K_o \quad (2)$$

Where I_{mo} and I_{md} are intensities at the maximum in Lo (570 nm) and Ld (602 nm) phases,

K_d and K_o are coefficients obtained from individual spectra of a probe in pure Lo and Ld phases as follows: $K_o = I_{602}(Lo) / I_{570}(Lo) = 0.773$; $K_d = I_{570}(Ld) / I_{602}(Ld) = 0.683$, where $I_{602}(Lo)$ and $I_{570}(Lo)$ are intensities at 602 and 570 nm for the spectrum in pure Lo phase, while $I_{570}(Ld)$ and $I_{602}(Ld)$ are the intensities at 570 and 602 nm for the spectrum in pure Ld phase.

The solution of the equations (1) and (2) gives:

$$I_{md} = \frac{I_{602} - I_{570} * K_o}{1 - K_d * K_o} \quad (3)$$

$$I_{mo} = I_{570} - I_{md} * K_d \quad (4)$$

Thus, using equations (3) and (4), we could recalculate the pick intensities of the spectra in Lo and Ld phases that contribute to the spectrum in the mixture. These intensities provide direct information about the partition ratio of the probe between Lo and Ld phases (mixed at 1/1 ratio):

$$\frac{[Probe]_{Ld}}{[Probe]_{Lo}} = \frac{I_{md}}{I_{mo}} * \frac{I_{570}(Lo)}{I_{602}(Ld)} \quad (5)$$

Equation (5) converts the ratio I_{mo}/I_{md} in the partition ratio by taking into account the intensity ratio of the spectra in pure Lo and Ld.

Cellular data

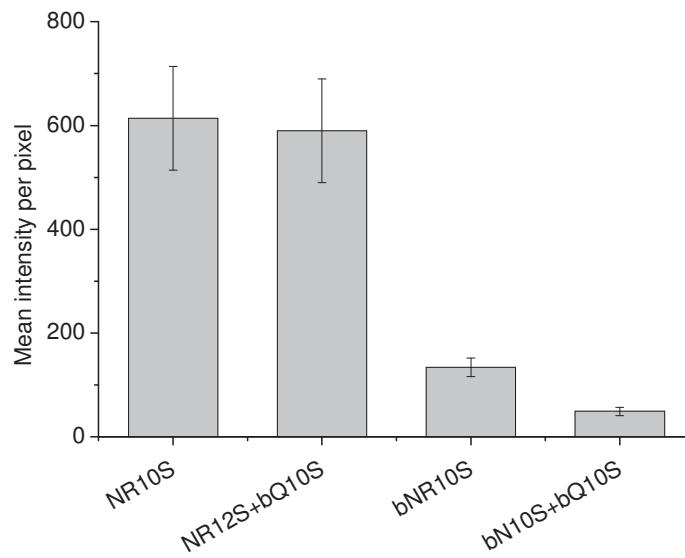


Figure S5. Mean fluorescence intensity of NR12S and bNR10S probes in HeLa cells without and with bQ10S quencher. The analysis was done using confocal images from Fig. 4.

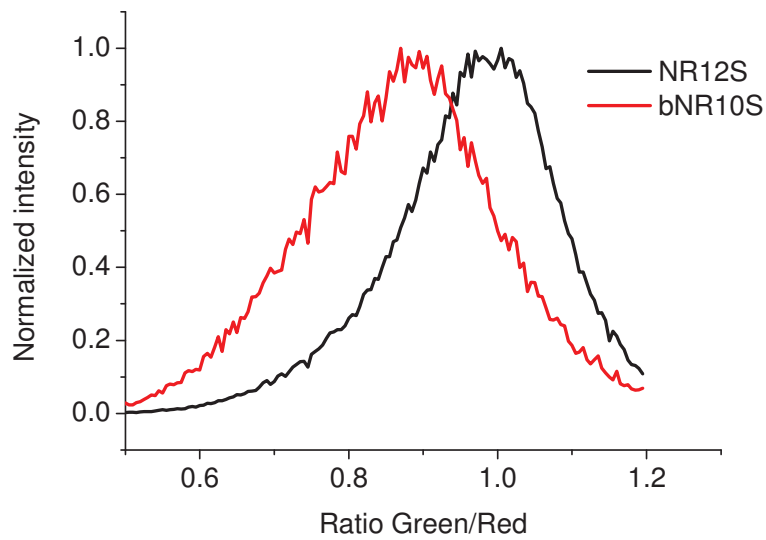


Figure S6. Distribution of the intensity ratio at the Green to Red channels for HeLa cells stained with NR12S and bNR10S probes obtained from analysis of corresponding ratiometric images in Figs. 4E,F. The normalized intensity represents the total intensity of all pixels with a given Green to Red ratio.

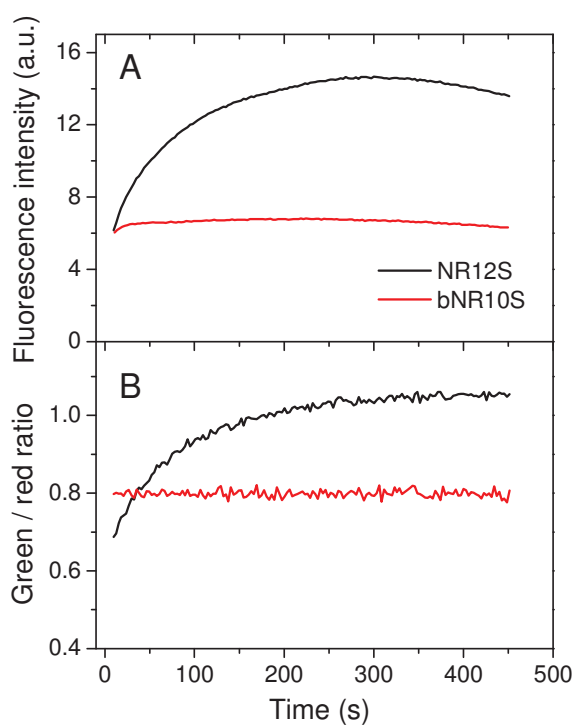


Figure S7. Binding kinetics of NR12S and bNR10S probes to HeLa cells followed from fluorescence intensity (A) and the green/red ratio (B). The intensity was a sum of intensities at the green (570 nm) and the red (602 nm) channels. Excitation wavelength was 520 nm. The intensity ratio green/red was measured between 570 nm (green) and 602 nm (red) channels.

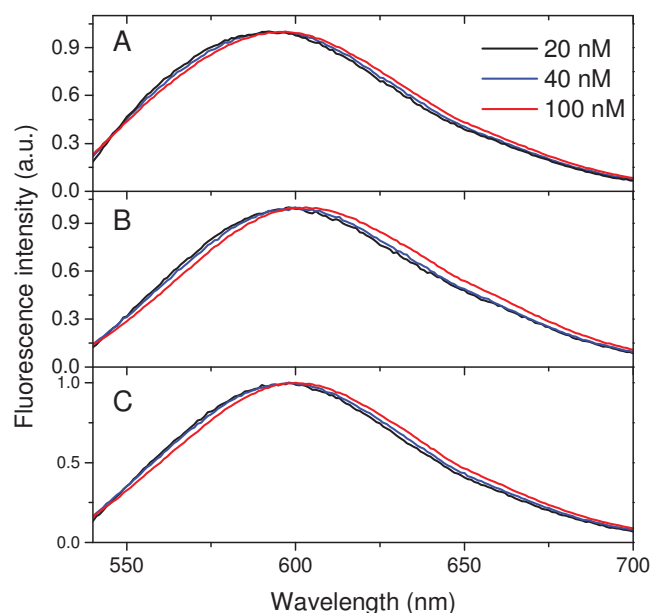


Figure S8. Normalized fluorescence spectra of bNR10S in suspensions of HeLa (A), CHO (B) and T293 (C) cells at different probe concentrations. The spectral shift to the red at 100 nM for all three cell lines shows the beginning of the excessive probe binding.

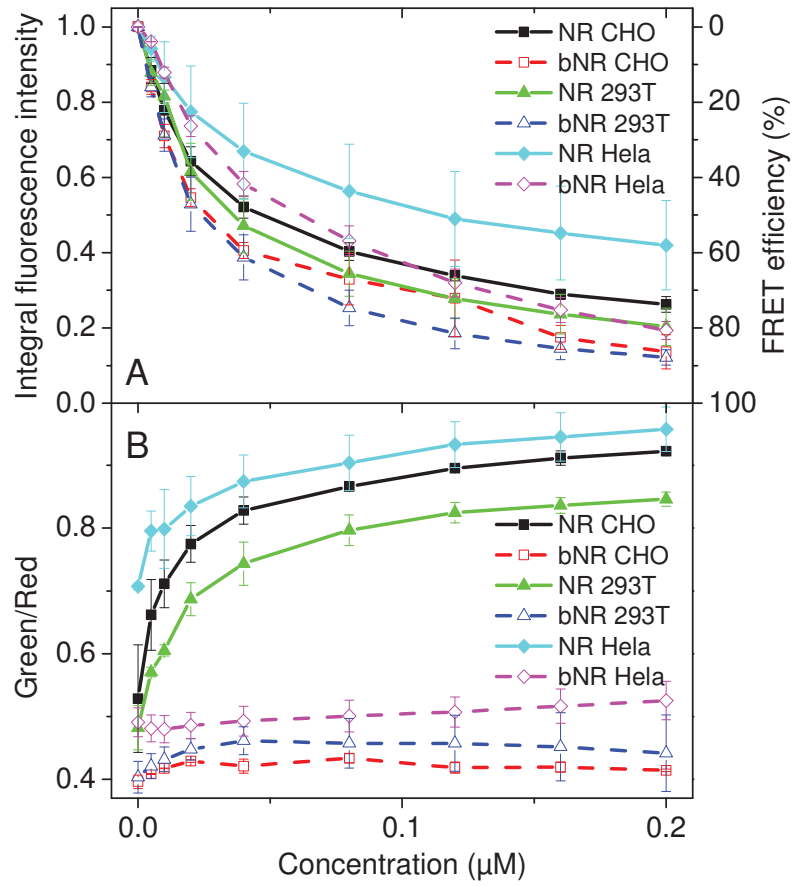


Figure S9. Relative integral intensity with FRET efficiency (A) and Green/Red Ratio of NR12S and bNR10S in different cell lines as a function of bQ10S quencher concentration.

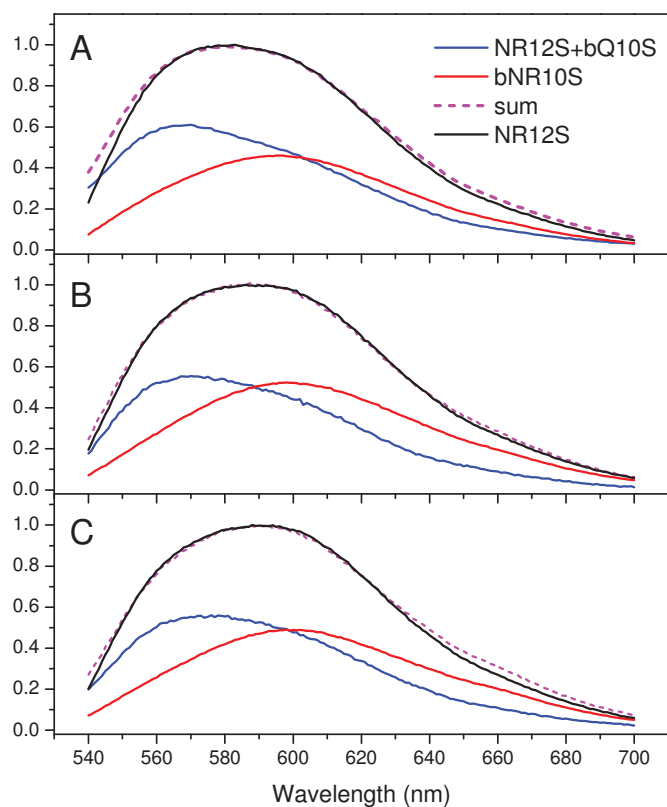


Figure S10. Fluorescence spectra of NR12S (black) in HeLa (A), CHO (B) and T293 (C) cells and a linear a combination (sum, magenta) of spectra of bNR10S, (specific to Ld phase, red), and NR12S with BQ10S quencher (specific to Lo phase, blue). The relative intensities of the blue and the red spectra were obtained by iteration until the best correspondence of their sum with the real spectra of NR12S is achieved.

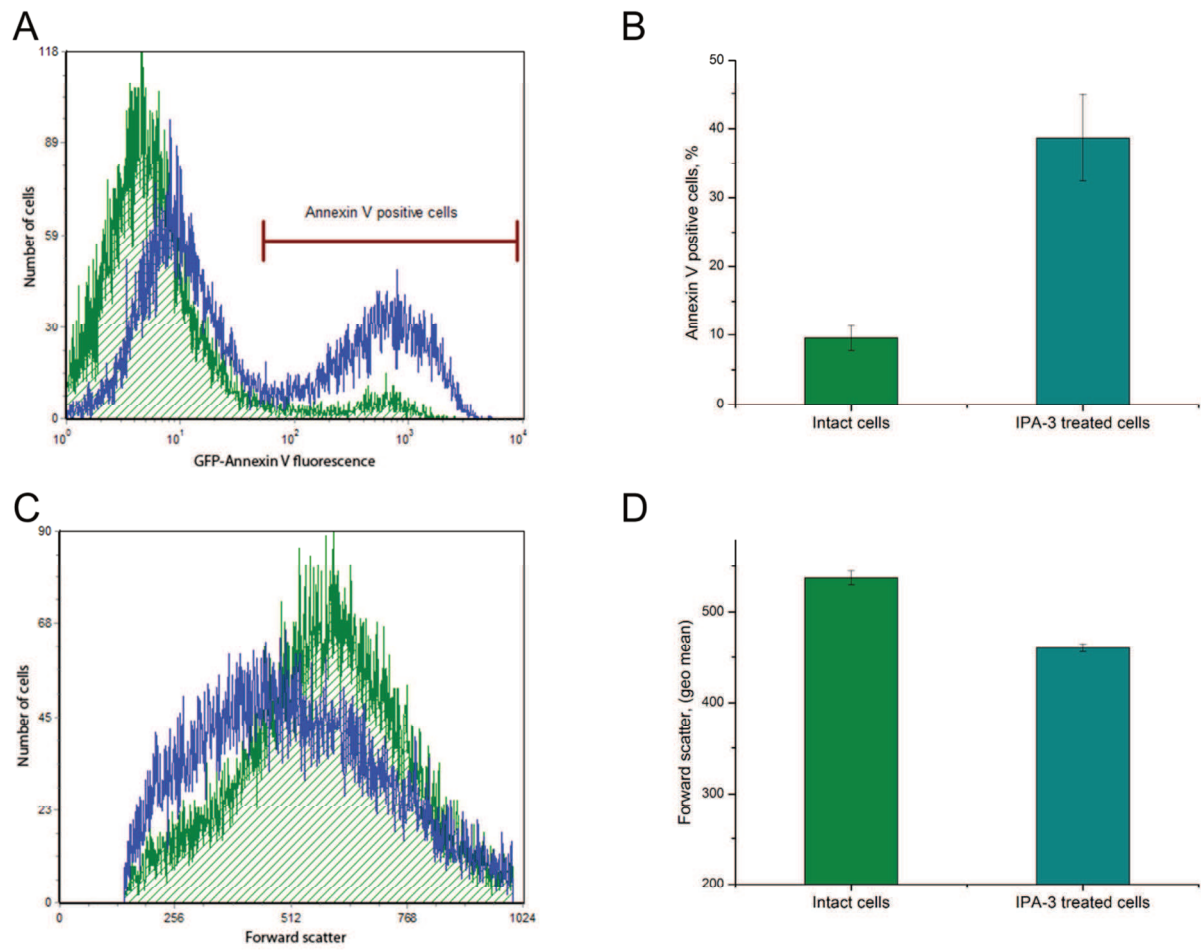


Figure S11. The flow cytometry data of intact and IPA-3 treated HeLa cells stained with GFP-labeled Annexin V. (A, C) Original histograms of GFP-Annexin V fluorescence intensity (A) and the forward scatter of HeLa cells following exposure for 48 hours to complete DMEM media without (green line) and with (blue line) 25 μ M IPA-3. (B, D) Arithmetic means \pm SEM (n = 4-8) of Annexin V-positive HeLa cells (B) forward scatter (D) following exposure for 48 hours to complete DMEM media without (green bar) or with (blue bar) IPA-3.

References

1. Kucherak, O. A., Oncul, S., Darwich, Z., Yushchenko, D. A., Arntz, Y., Didier, P., Mely, Y., and Klymchenko, A. S. (2010) Switchable Nile red-based probe for cholesterol and lipid order at the outer leaflet of biomembranes, *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 4907.
2. Hope, M. J., Bally, M. B., Webb, G., and Cullis, P. R. (1985) Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential, *Biochim. Biophys. Acta* **812**, 55-65.
3. Klymchenko, A. S., Oncul, S., Didier, P., Schaub, E., Bagatolli, L., Duportail, G., and Mély, Y. (2009) Visualization of lipid domains in giant unilamellar vesicles using an environment-sensitive membrane probe based on 3-hydroxyflavone, *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 495-499.
4. Ong, C. C., Jubb, A. M., Haverty, P. M., Zhou, W., Tran, V., Truong, T., Turley, H., O'Brien, T., Vucic, D., Harris, A. L., Belvin, M., Friedman, L. S., Blackwood, E. M., Koeppen, H., and Hoeflich, K. P. (2011) Targeting p21-activated kinase 1 (PAK1) to induce apoptosis of tumor cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **108**, 7177-7182.
5. Darwich, Z., Klymchenko, A. S., Kucherak, O. A., Richert, L., and Mély, Y. (2012) Detection of apoptosis through the lipid order of the outer plasma membrane leaflet, *Biochim. Biophys. Acta* **1818**, 3048-3054.
6. Clamme, J. P., Azoulay, J., and Mély, Y. (2003) Monitoring of the formation and dissociation of polyethylenimine/DNA complexes by two photon fluorescence correlation spectroscopy, *Biophys. J.* **84**, 1960-1968.

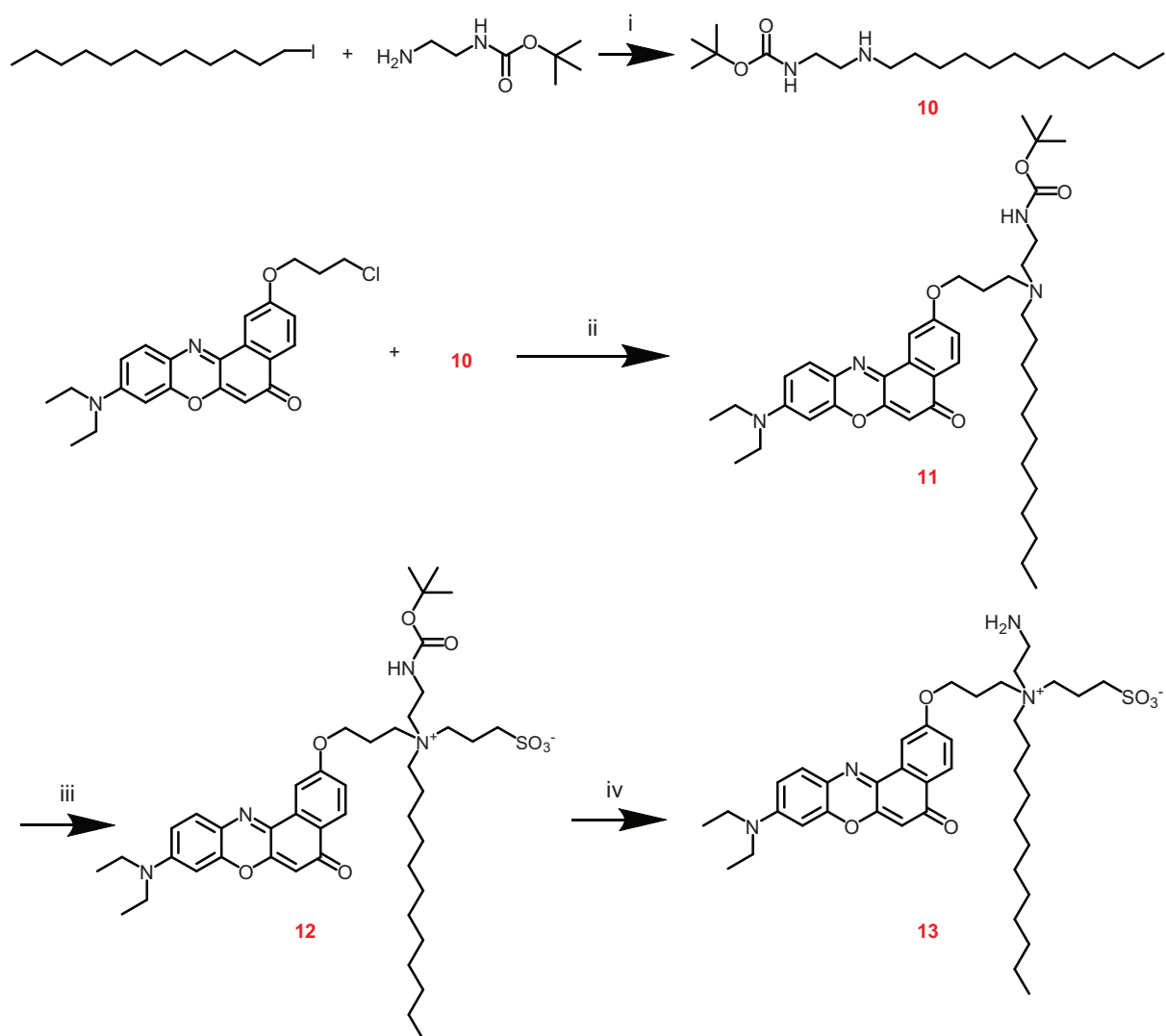
1.2. Nouvelles sondes Nile Red fixables et compatibles avec du sérum

La sonde membranaire solvatochrome NR12S (Kucherak et al., 2010) développée préalablement au laboratoire, possède d'excellentes caractéristiques pour les recherches sur les radeaux lipidiques : brillance correcte, bon rendement quantique, localisée dans la membrane et faible effet de « flip-flop » (localisé dans le feuillet externe de la membrane) et surtout une excellente sensibilité à son environnement. Elle peut facilement différencier les phases Lo et Ld sur des membranes modèles de mélange ternaire (DOPC/SM/cholestérol par exemple), avec un déplacement de l'ordre de 40 nm entre les deux types de phases, 610 nm pour le $\lambda_{em\ max}$ des phases Ld et 570 pour celui des phases Lo. De plus, elle possède la capacité à rester éteinte dans un milieu aqueux et à s'allumer une fois liée à la membrane. Mais cette sonde possède certaines limitations. Il est impossible de l'utiliser en présence de sérum (nécessaire pour la culture cellulaire) ou sur des échantillons fixés. En présence de sérum, elle va s'agréger à l'albumine et va s'allumer dans le milieu suite à sa liaison avec cette protéine et ainsi rendre les conditions d'utilisation très compliquées (rapport signal sur bruit très faible, beaucoup de fluorescence du milieu, difficulté à différencier la membrane du milieu, etc...). L'utilisation de NR12S sur des échantillons cellulaires fixés va conduire à un marquage de tout ce qui est lipophile dans la cellule, membrane, réticulum endoplasmique, ou encore lysosomes. La fixation va créer une perméabilisation de la membrane et permettre l'entrée de la sonde directement dans la cellule, ce qui est particulièrement dérangeant. La sonde est destinée à un usage membranaire et l'utilisation d'échantillons fixés en biologie est quelque chose de commun (Sabatini, 1963). De plus, la fixation de la membrane plasmique peut s'avérer utile dans les recherches sur les radeaux lipidiques, ceux-ci étant petits (<100 nm) et ayant une dynamique rapide (Kusumi et al., 2004), il peut être intéressant de fixer la membrane afin de voir quel va être le comportement de celle-ci à la fixation.

Nous avons alors voulu créer deux nouvelles sondes basées sur le fluorophore Nile Red. La première, capable d'être « invisible » aux différents composants du sérum, se comportant comme NR12S, et la seconde capable d'être fixée dans la membrane en même temps que celle-ci et ainsi d'imager une membrane plasmique fixée, soit pour l'étude des

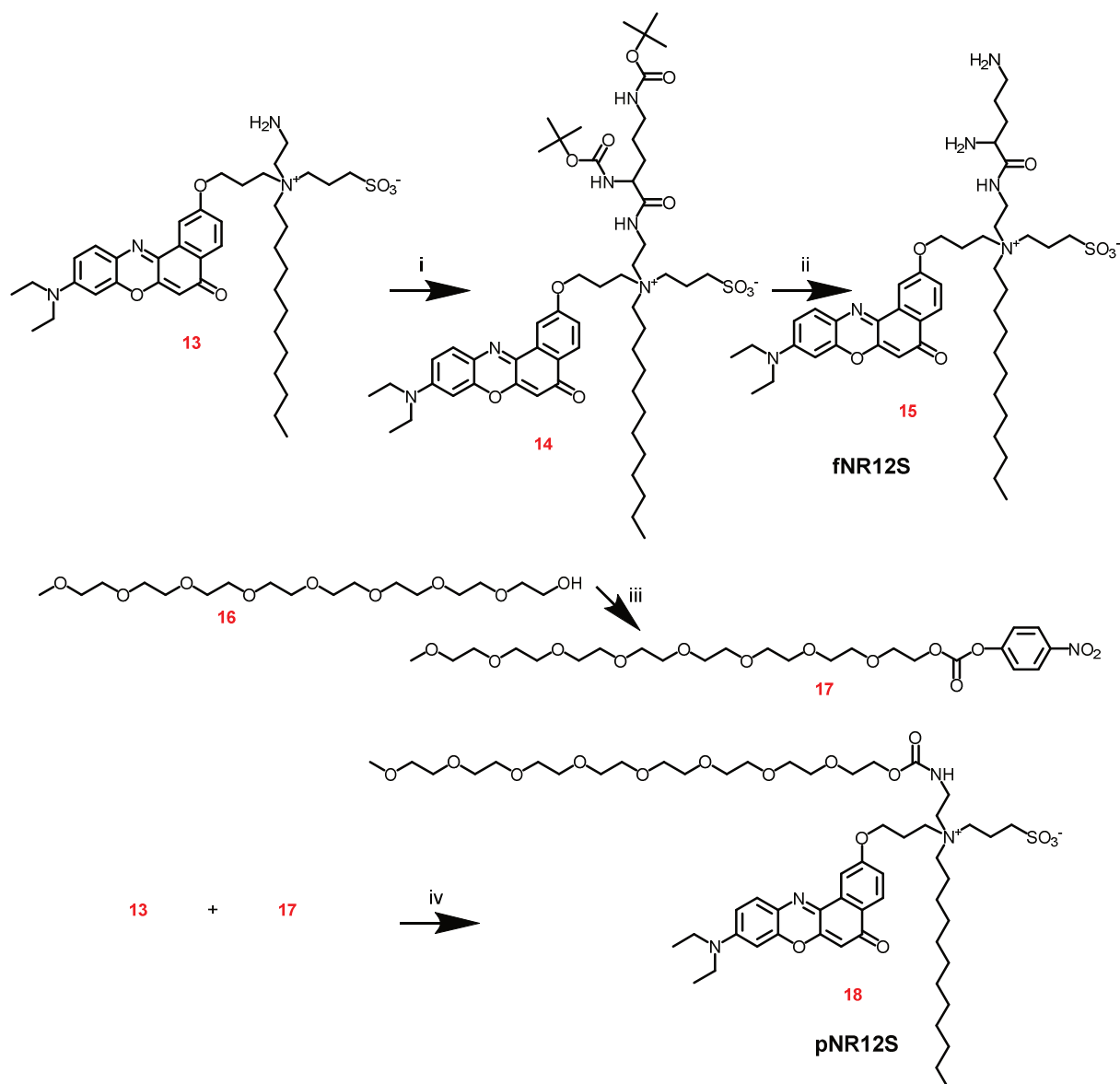
radeaux lipidiques soit pour d'autres études biologiques, les sondes membranaires fixables étant plutôt rares. Nous avons alors repris la même structure générale de la sonde NR12S et l'avons modifiée dans un premier cas en ajoutant une chaîne polyéthylène glycol 8 (PEG(8)) à la place du N-méthyl de la chaîne aliphatique de la sonde. Les groupements PEG améliorent la solubilité du composé dans les milieux aqueux en lui permettant une meilleure circulation dans les milieux biologiques, le rendant ainsi « invisible » au sérum. Dans un autre cas une ornithine a pris la place du N-méthyl de la chaîne aliphatique de la sonde. Le résidu ornithine (disponible au laboratoire) doit fournir les groupements NH_2 nécessaires à la fixation cellulaire par un aldéhyde (polymérisation de celui-ci avec les fonctions NH_2 présentes dans l'échantillon biologique). Ces deux nouvelles sondes ont été appelées fNR12S pour le dérivé fixable avec ornithine et pNR12S pour le dérivé avec la chaîne PEG compatible avec le sérum.

Pour la conception de ces sondes, nous avons réalisé un premier intermédiaire commun aux deux marqueurs. Cet intermédiaire devait conserver la même structure que NR12S, c'est-à-dire le fluorophore couplé par un petit espaceur à une chaîne hydrocarbure et à un groupement zwitterionique, tout en étant pourvu d'un groupement aisément modifiable. La stratégie la plus simple pour obtenir la molécule désirée était de remplacer le groupement N-méthyl de NR12S par un groupement $-\text{NH}_2$. Nous avons alors modifié la structure de l'ancre de la sonde, plutôt que de partir de N-méthyl dodécylamine, nous avons synthétisé une nouvelle molécule (molécule **10**, Fig. 31) en alkylant la fonction $-\text{NH}_2$ de N-Boc-éthylènediamine par 1-iodododécane. Cette molécule a ensuite été couplée au fluorophore Nile Red, portant un dérivé chloroalkyle pour obtenir le composé **11**. Ce dernier a été quaternisé à l'aide de 1,3-propanesultone pour donner le composé **12**. Une fois le groupement protecteur Boc retiré, la molécule (**13**) a été couplée, une première fois avec Boc-Orn(Boc)-OH par couplage peptidique (**14**). Cette molécule, une fois déprotégée, a ainsi donné la sonde fNR12S (**15**). Le composé **12** a aussi été couplé avec un PEG(8) dont la fonction OH a été activée par du 4-nitrophényl chloroformate (carbonate activé), ce qui a donné naissance à la sonde pNR12S (**18**).



i) CH_3CN , 80°C 6h (73%) ; ii) CH_3CN , KI, K_2CO_3 , 90°C , 24h (67%) ; iii) 1,3-Propanesultone, K_2CO_3 , CH_3CN , reflux 12h, (41%) ; iv) CH_2Cl_2 TFA, TA 45 mins (97%).

Figure 31 : Synthèse d'un précurseur des nouveaux dérivés Nile Red.



i) Boc-Orn(Boc)-OH, HBTU, HOBt, DIEA, DCM/DMF (1/1) 45 min, TA (21%); ii) TFA, 45 min, TA (91%);
 iii) 4-nitrophenyl chloroformate, pyridine, DCM, 3h, TA (42%) ; iv) DIEA, DMF, 45 min, 80°C (42%)

Figure 32 : Schéma de synthèse des deux nouveaux dérivés de NR12S ; fNR12s et pNR12S

Analyses spectroscopiques :

Ces nouvelles sondes ont été comparées avec leur composé parent NR12S et nous avons cherché à caractériser ces nouvelles molécules. Dans un premier temps, les rendements quantiques ainsi que les maxima d'émission et d'excitation dans du tampon phosphate, de

l'éthanol, du dioxane ainsi que dans une suspension de vésicules de DOPC de ces molécules ont été caractérisés.

		λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	QY
NR12S^(a)	Tampon	521	657	0,2
	Dioxane	526	592	74
	Ethanol	550	626	52
	LUVs DOPC	530	608	48
fNR12S	Tampon	527	660	1,7
	Dioxane	527	585	68
	Ethanol	551	625	63
	LUVs DOPC	531	612	43
pNR12S	Tampon	529	658	1.0
	Dioxane	523	584	44
	Ethanol	549	626	41
	LUVs DOPC	534	611	31

Tableau 2 : Longueur d'onde d'émission et d'absorption maximal ainsi que les rendements quantiques des sondes NR12S, fNR12S et pNR12S dans du tampon phosphate, du dioxane de l'éthanol et une suspension de LUVs de DOPC. ^(a)Données de Kucherak et al., 2010.

La caractérisation des maximums d'émission et d'absorption ainsi que du rendement quantique (Table 1) des nouvelles sondes nous apporte quelques informations intéressantes. En effet, les maximums d'émission et d'absorption de fNR12S et pNR12S sont très proches de ceux de NR12S (quelques nanomètres d'écart) (Table 2 et Fig. 33). Le remplacement du groupement N-méthyl par un groupement PEG ou ornithine ne provoque pas de déplacement des maximums et permet de garder les mêmes propriétés dans ce domaine que NR12S. En revanche, dans le cas de pNR12S, on observe une diminution variable (de 12 à 20% en fonction du solvant) du rendement quantique de cette sonde par rapport à NR12S. Néanmoins, le rendement quantique dans les solvants organiques reste élevé, indiquant que le groupement PEG ne provoque que des effets mineurs sur la fluorescence de Nile Red. En ce qui concerne fNR12S, les rendements quantiques sont proches de ceux de NR12S dans le cas du dioxane et de la suspension de vésicules de DOPC. Par contre, dans l'eau, on observe une augmentation du rendement quantique par rapport à NR12S. Celui-ci reste faible dans l'eau (<2%), la molécule conserve donc son effet « turn-on » (fluorogénéicité), mais il est tout de même presque 10 fois plus important que NR12S dans les mêmes conditions. L'ajout du

groupement ornithine, très polaire, semble favoriser la solubilité de cette molécule dans l'eau. La plus grande solubilité de la molécule réduit le quenching induit par l'agrégation de celle-ci et augmente quelque peu l'efficacité de fluorescence.

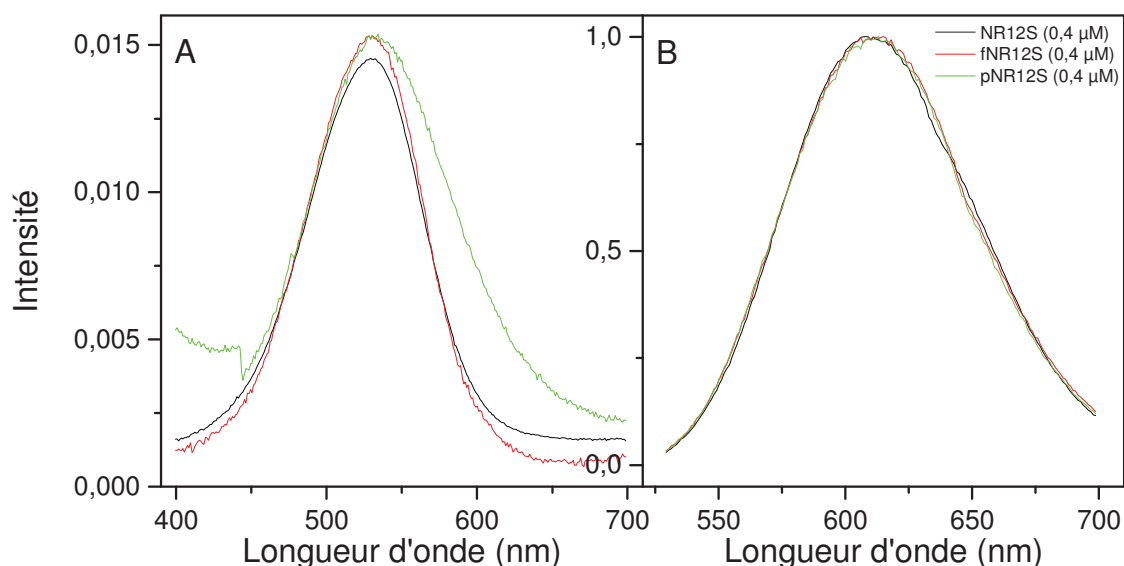


Figure 33 : Spectres d'absorption (A) et d'émission normalisés (B) des sondes NR12S, fNR12S et pNR12S dans une suspension de LUVs de DOPC (200µM) à une concentration de 0,4 µM. L'acquisition de ces données s'est faite à une longueur d'onde de 520 nm pour l'excitation et 600 nm pour l'émission et à une concentration en sonde de 40 nM.

Nous avons ensuite réalisé des tests de liaison de ces molécules en titrant une dispersion de LUVs de DOPC de concentration 200 µM par ces sondes (concentration variant de 0.05 µM à 4 µM) (Fig. 34A et 34B). Pour chacune des sondes, l'augmentation de l'intensité n'est plus proportionnelle à la concentration à partir de 1,2 µM, ce qui peut être compris car cela correspond au ratio sonde/lipide 1,2/100 (pour le feuillet externe). En effet, à une concentration au-delà du ratio sonde/lipide 1/100, la sonde doit avoir une tendance à l'autoquenching, ce qui affecte la linéarité de la courbe de titration. De plus, au-dessus de cette concentration, le maximum de fluorescence est déplacé vers le rouge, indiquant de ce fait que l'excès de sonde se lie probablement à la partie la plus superficielle de la surface membranaire. Nous avons aussi étudié des cinétiques de liaison de ces molécules sur une dispersion de cellules CEMSS (1×10^6 cellules/mL) (Fig. 34C).

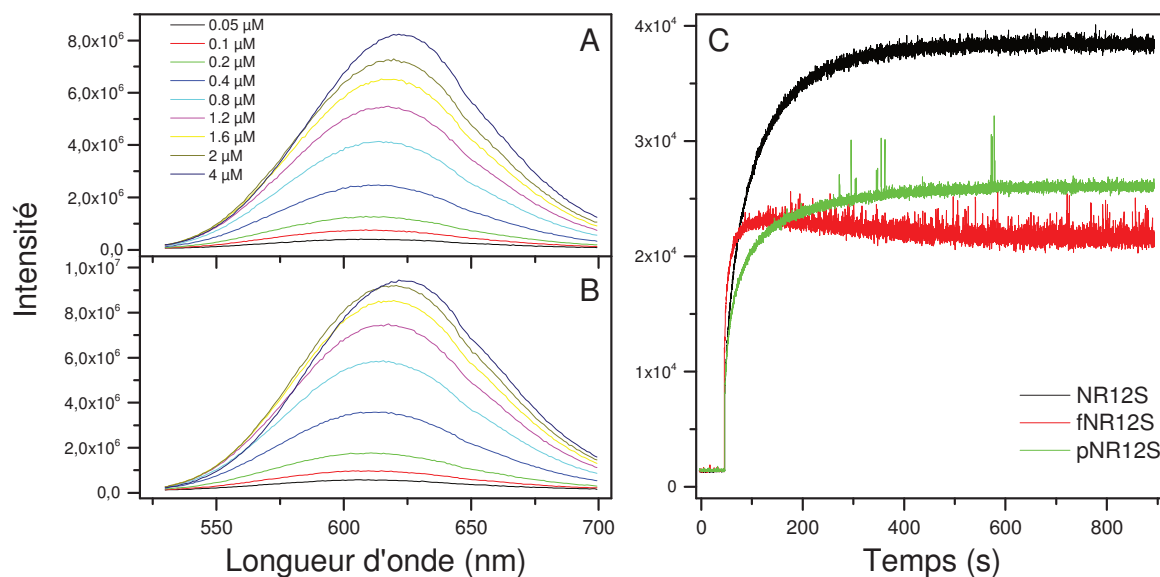


Figure 34 : (A-B) Courbes de liaison des sondes pNR12S (B) et fNR12S (A) sur une dispersion de vésicules de DOPC (200 nM) à une concentration croissante. L'excitation des sondes a eu lieu à 520 nm. (C) Cinétique de liaison des sondes NR12S, fNR12S et pNR12S (40 nM) sur des cellules CEMSS (1×10^6 cellules/mL). L'excitation des sondes a eu lieu à 520 nm, l'émission à 600 nm.

D'après ces résultats, on remarque que la sonde fNR12S possède une cinétique de liaison remarquablement rapide (de l'ordre 1 min 30) alors pNR12S possède une vitesse de liaison à la membrane similaire à NR12S (le plateau de fluorescence apparaît entre 6 et 7 min) (Fig. 34A).

Lors de l'élaboration de ces sondes, un paramètre important doit être conservé : leur solvatochromisme dans les membranes. C'est pourquoi nous avons aussi testé ces sondes dans des vésicules de DOPC/cholestérol (1/0,9 ; pour mimer les phases Ld) et des vésicules de SM/cholestérol (1/0,9 ; pour mimer les phases Lo). On remarque que ces sondes conservent parfaitement leur propriété solvatochrome et sont toujours capables de distinguer les phases Lo et Ld sur des membranes modèles. La différence de longueur d'onde entre le maxima dans les phases Lo (603 nm) et dans les phases Ld (570 nm) est la même que pour NR12S : 33 nm (Fig. 35) (Kucherak et al., 2010).

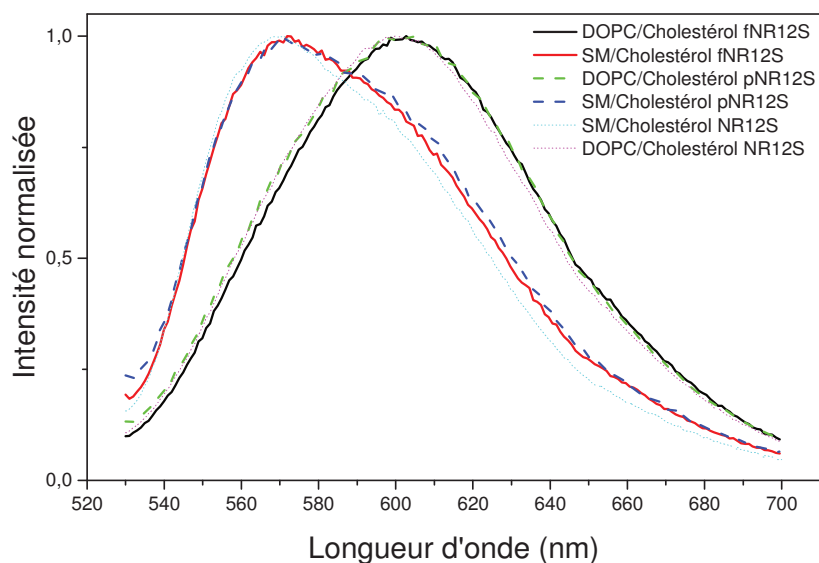


Figure 35 : Spectres d'émission des sondes fNR12S et pNR12S ($0,4\mu\text{M}$) dans des suspensions de LUVs de DOPC/Cholestérol (1/0.45) et de SM/Cholestérol (1/0.45).

Imagerie microscopique :

Nous avons ensuite entrepris d'analyser ces sondes par microscopie afin de voir si elles remplissaient bien le rôle auquel elles étaient destinées. Tout d'abord ces sondes ont été testées sur des GUVs de composition simple (DOPC) afin de voir leur capacité à marquer une membrane. Leur comportement en présence de sérum de veau fœtal (FBS : Foetal Bovine Serum) a aussi été évalué à l'aide de ces modèles. Les images ont été prises à l'aide d'un microscope deux-photons (Fig. 36). Ces expériences nous montrent que les sondes marquent effectivement les membranes lipidiques (Fig. 36A et 36B) mais l'effet de la présence de FBS est assez difficile à déterminer, le milieu semble plus « rouge » à l'œil (présence de fluorescence de la sonde dans celui-ci), mais cela ne paraît pas sur les images issues du microscope (Fig. 36C et 36D). Il est aussi difficile de faire une conclusion du fait qu'en présence de sérum les nouvelles sondes se comportent de façon similaire à leur parent NR12S (Fig. 36).

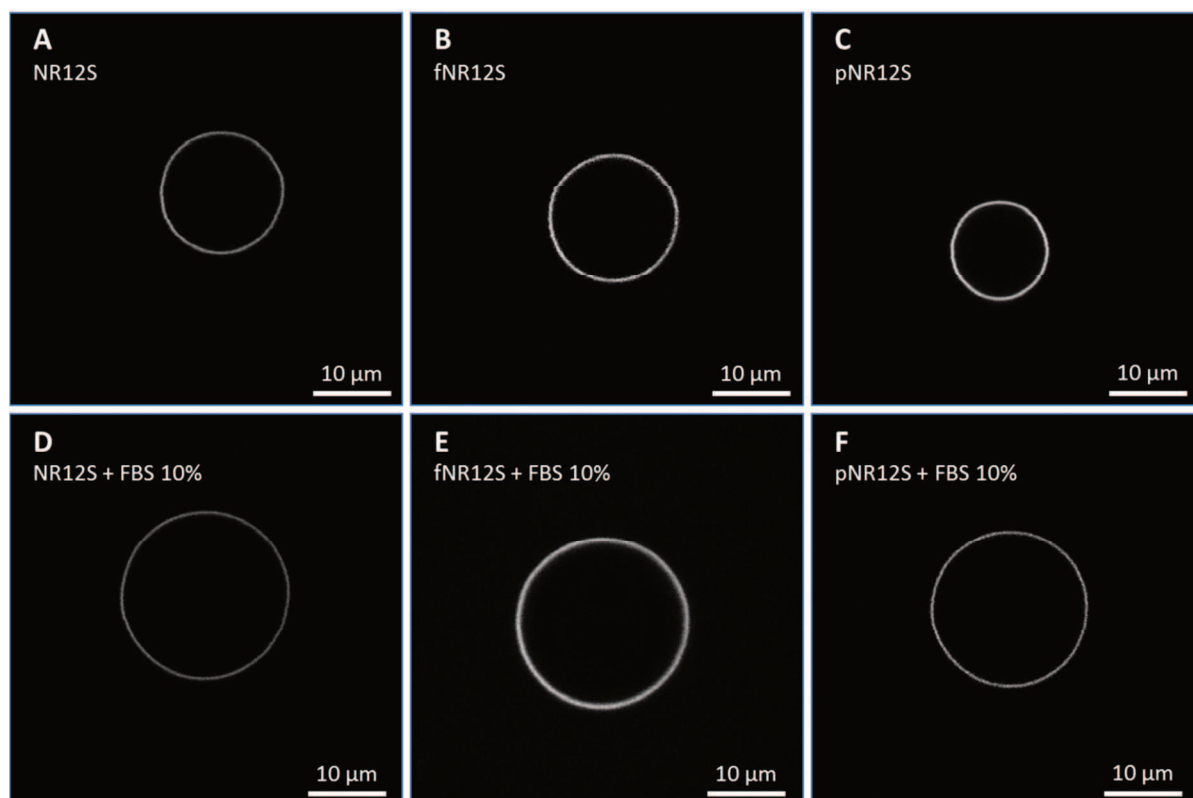


Figure 36 : GUVs de DOPC marqué par les sondes NR12S (A) (0,1 μ M), fNR12S (B) (0,1 μ M) et pNR12S (C) (0,1 μ M) avec FBS (FBS : Fœtal Bovine Serum) 10% (D-E) et sans (A-C) observés par microscope deux-photons (la longueur d'onde d'excitation est 830 nm).

En parallèle, des expériences ont été menées sur des lignées cellulaires HeLa afin de voir le comportement de ces sondes dans un milieu biologique.

Les premiers résultats de marquages cellulaires sont encourageants dans un cas et très surprenants dans l'autre. La sonde fNR12S se comporte comme prévue dans le cas de cellules HeLa standards vivantes, celle-ci marque bien la membrane cellulaire (Fig. 37A-37C) et reste principalement localisée dans celle-ci même après plusieurs minutes d'expérimentation (légère internalisation après une dizaine de minutes). Son comportement est très proche de notre sonde de référence NR12S (Kucherak et al., 2010). En ce qui concerne la sonde pNR12S, les résultats sont plus surprenants. En effet, il semblerait que cette sonde pénètre la membrane plasmique très rapidement ($t < 5$ min) et qu'elle aille marquer des vésicules au sein de la cellule (Fig. 37D-37F). On observe toutefois un léger marquage de la membrane mais la fluorescence principale provient de petits points dans le cytoplasme cellulaire.

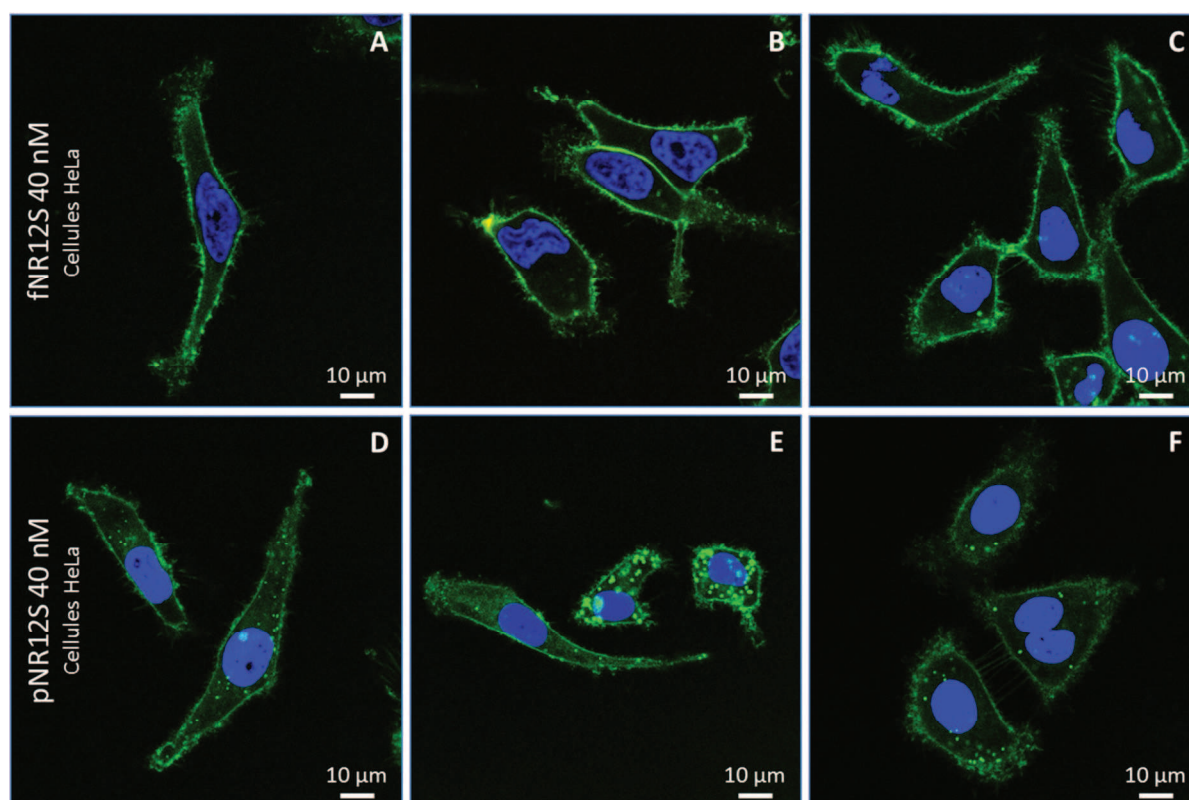


Figure 37 : Images de microscopie confocale de cellules HeLa marquées par les sondes fNR12S (A-C) et pNR12S (D-F) à une concentration de 40 nM. Canal bleu : l'excitation se fait à 405 nm et l'émission entre 430 et 480 nm (Hoescht). Canal vert : l'excitation se fait à 488 nm et l'émission entre 530 et 585 nm.

Les résultats encourageants de la sonde fNR12S nous ont poussés à tester la sonde en condition de fixation cellulaire. Les cellules ont été fixées à l'aide d'un mélange glutaraldéhyde/formaldéhyde de concentration variable (0%/4%, 1%/1%, 1%/4% et 5%/10%). Le temps d'incubation de la sonde avant fixation a aussi été varié afin de voir si cela pouvait influencer la capacité de l'agent à fixer la sonde sur la membrane. Dans un premier cas, nous avons fixé les cellules juste après le marquage et dans un second cas, elles ont été fixées 7 min après ajout du marqueur. Il suffit de quelques minutes (~90 sec) à la sonde fNR12S pour atteindre un plateau de fluorescence mais, par sécurité, nous avons attendu 5 min supplémentaires.

Les résultats obtenus en fonction des différentes conditions que nous avons fixées ne sont pas ceux à quoi nous nous attendions. Dans des conditions standard de fixation avec

0%/4% de mélange glutaraldéhyde/formaldéhyde, le marquage réalisé par notre sonde de référence NR12S nous donne quelque chose d'inexploitable (marquage de la membrane rompue, réticulum endoplasmique (RE), etc) (Fig. 38A). Dans le cas d'un marquage par fNR12S dans les mêmes conditions, nous observons un léger marquage membranaire ainsi qu'un léger marquage du RE (RE : Réticulum endoplasmique). Du glutaraldéhyde a été ajouté dans le mélange de fixation afin de produire une fixation plus rapide et plus durable. Toutefois, le marquage membranaire reste léger et la présence d'une fluorescence provenant du RE demeure, que l'on ait attendu ou non, les quelques minutes d'incubation nécessaires à la sonde pour s'insérer dans la membrane (Fig. 38E et 38H). La perméabilisation de la membrane semble avoir lieu plus rapidement que la fixation de la cellule par le mélange de fixation ce qui entraîne une internalisation de la sonde dans le cytoplasme de la cellule. Si l'on essaye de faire varier les concentrations du mélange fixateur en les augmentant (5%/10%) afin de favoriser la fixation de la sonde sur la membrane, on ne fait qu'amplifier le phénomène observé précédemment (Fig. 38F et 38I). En effet, la totalité de la sonde se retrouve à l'intérieur de la cellule, la fluorescence membranaire a totalement disparu. De plus, on observe dans le milieu, des petits points de fluorescence qui semblent être de petites particules de sonde agrégées. Dans le cas inverse, où l'on essaye de changer les conditions de fixation de la cellule afin d'avoir quelque chose de plus doux en descendant à un ratio 1%/1% de mélange glutaraldéhyde/formaldéhyde, on n'observe plus que des particules de sondes fluorescences provenant de l'agrégation de celles-ci sous l'action du mélange de fixation. Le glutaraldéhyde semble avoir une forte tendance à agréger les molécules de sondes entre elles et non pas avec la membrane environnante.

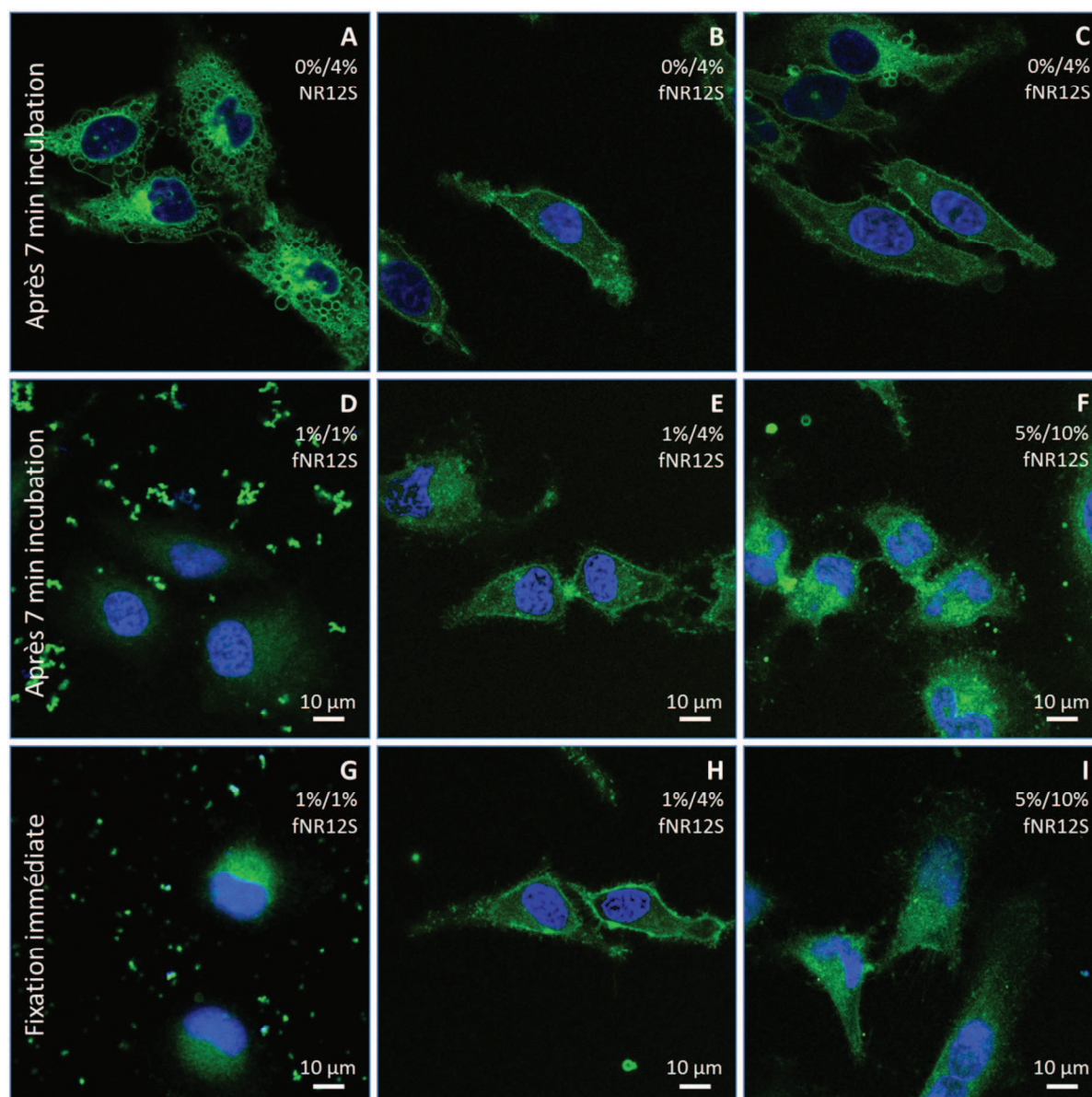


Figure 38 : Images de microscopie confocale de cellules HeLa fixée, marquées par les sondes NR12S (40nM) (A) et fNR12S (40 nM) (B-I). Les conditions de fixation varient de 0%/4% (A-C) 1%/1% (D et G), 1%/4% (E et H) et 5%/10% (F et I) de glutaraldéhyde/formaldéhyde. La fixation a eu lieu immédiatement après le marquage (A-F) ou après 7 min d'incubation de la sonde à l'abri de la lumière (A-C). Les réglages du microscope sont les mêmes que pour la Fig. 37.

En conclusion, dans le cas de notre sonde pNR12S les différents résultats obtenus nous indiquent, qu'il semblerait que l'ajout du groupement PEG permet à la sonde la formation de micelle non fluorescente recouverte d'un manteau PEG qui améliore sa solubilité (QY plus important dans les milieux aqueux) ainsi que sa stabilité (insertion de la sonde plus difficile dans les vésicules de DOPC, QY plus faible dans les solvants organiques). Cet assemblage en

micelle semble faciliter l'entrée de la sonde dans les cellules vivantes et entraîne ainsi le marquage de ce qui semblerait être une vésicule cellulaire. En ce qui concerne l'effet du PEG en présence de sérum FBS, les résultats obtenus ne sont pas concluants. L'appareil utilisé ici ne semble pas être le plus optimal (impossibilité de retrouver la fluorescence du milieu sur les images obtenues). Ils seraient à refaire à l'aide du microscope confocal disponible au laboratoire. Mais avant tout, il serait intéressant d'étudier où se retrouve cette sonde dans les cellules vivantes, les points brillants sont-ils des vésicules d'endocytoses ? Des « lipid droplets »(Greenspan et al., 1985) ? L'utilisation de marqueurs spécifiques de ces formations cellulaires nous permettrait d'effectuer un co-marquage et ainsi voir où se retrouve réellement notre sonde. Il pourrait aussi être intéressant de réduire la longueur de la chaîne PEG afin de voir l'effet de celle-ci sur le comportement de la sonde. Pour fNR12S, les premiers résultats cellulaires obtenus sont encourageants comparativement au comportement de la sonde NR12S dans des conditions identiques. Le choix de l'agent fixateur semble avoir un rôle primordial afin de pouvoir réaliser un « cross-linking » entre les groupements $-NH_2$ extra-membranaire de la sonde et leur pendant membranaire. L'utilisation d'un « cross-linker » plus long pourrait nous donner des résultats intéressants comme par exemple le « cross-linker » Bis-sulfosuccinimidyl suberate (BS3). Quoiqu'il en soit, ces premiers résultats sont plutôt encourageants pour le développement de nouvelles sondes solvatochromes à partir du fluorophore Nile Red. Les modifications apportées à notre sonde de référence NR12S, ne modifient en rien les propriétés spectrales du fluorophore et les propriétés photophysiques restent très bonnes (conservation de la sensibilité aux phases, bon QY, phénomène « turn-on » toujours observé, etc...). De plus, nous avons pu déterminer de nouvelles pistes intéressantes quant à l'amélioration de notre première génération de sondes, piste qui pourrait bien nous permettre d'aboutir à l'élaboration de sondes solvatochromes fixables ou utilisables en présence de sérum.

2. Sondes spécifiques à un récepteur donné

2.1. Sonde fluorescente basée sur Nile Red à effet « turn-on » pour visualiser et quantifier des récepteurs couplés aux protéines G dans des cellules vivantes

Les systèmes fluorescents « turn-on » permettent une visualisation d'un échantillon biologique en se passant des étapes de lavage non nécessaire. Ces systèmes sont particulièrement intéressants pour l'étude des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Actuellement les techniques d'anisotropie de fluorescence et de FRET sont surtout utilisées pour ces études, mais elles possèdent certains inconvénients sérieux. La première a une sensibilité faible, alors que la seconde nécessite le marquage du ligand et du récepteur. Dans l'optique de surmonter ces limitations, nous avons mis au point, en collaboration avec l'équipe du Dr. Bonnet du Laboratoire d'Innovation Thérapeutique (UMR 7200 Uds CNRS), la première sonde rouge « turn-on », basée sur Nile Red, pour les études des RCPG (récepteur à l'ocytocine) à la surface des membranes plasmiques (Fig. 39).

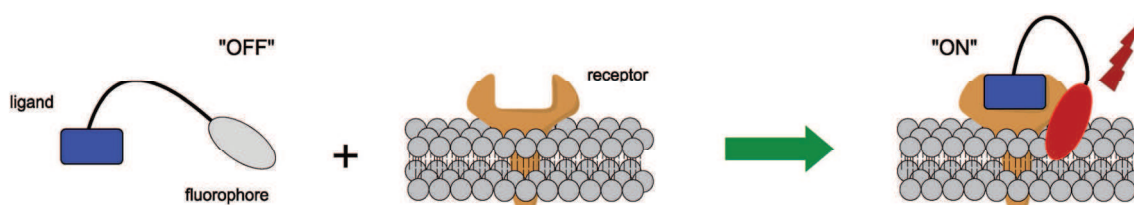


Figure 39 : Schéma de principe du fonctionnement de la sonde rouge « turn-on » pour l'étude des récepteurs couplés aux protéines G (Karpenko et al., 2014).

Le peptide carbétocine (CBT : Carbétocine), agoniste de l'ocytocine, a été conjugué à un excellent fluorophore solvatochrome, Nile Red. Celui-ci possède une excellente capacité à s'allumer dans l'environnement hydrophobe du récepteur. Différents ligands ont été développés sur ce modèle, l'un couplant Nile Red directement à CBT, un autre faisant intervenir un linker octa(éthylène glycol) entre le fluorophore et CBT et un dernier plus commun, liant le fluorophore Lissamine Rhodamine B (LRh : Lissamine Rhodamine B) directement à CBT (Fig. 40). Une synthèse multi-étapes a été réalisée en utilisant les

techniques de bioconjugaison classique et le produit a été purifié par HPLC (semi-préparative en phase inverse). Ce travail a été réalisé par I. Karpenko, une étudiante en doctorat du laboratoire de nos collaborateurs (Dr D. Bonnet et Pr M. Hibert). Ces différentes molécules ont été testées sur des lignées cellulaires HEK 293T, sur-exprimant le récepteur à l'ocytocine (OTR), ou ne l'exprimant pas du tout, en plus des analyses spectrométriques standards (test sur LUVs, sur cellules en suspension, etc.).

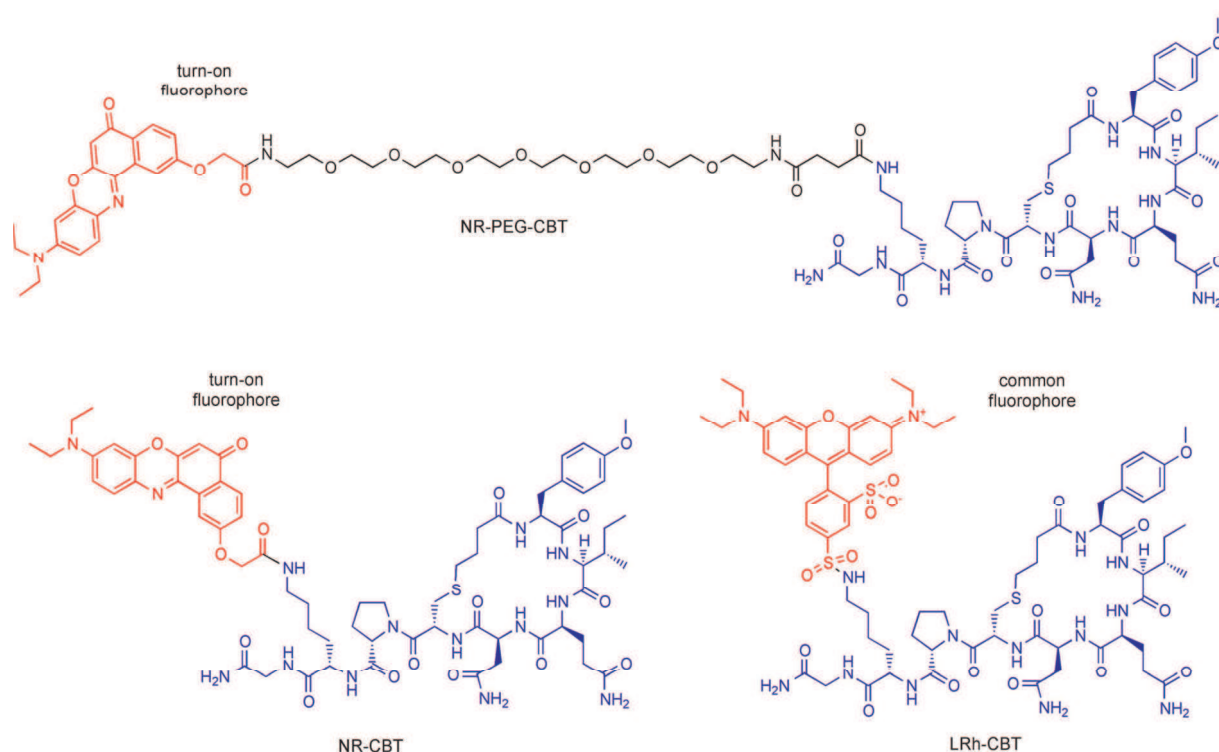


Figure 40 : Schéma des structures chimiques des différents ligands aux récepteurs à l'ocytocine développé lors de ces travaux (Karpenko et al., 2014).

Les tests dans des solvants organiques ont montré que les conjugués de Nile Red avec CBT possèdent une intensité de fluorescence faible dans l'eau et que celle-ci augmente de façon notable dans les solvants organiques. La propriété fluorogénique (« turn-on ») de Nile Red est conservée. Le parent Nile Red et le dérivé sans le linker PEG, ont montré une forte augmentation de la fluorescence en présence de vésicules de phospholipides et 10% de sérum de veau fœtal. A contrario, le conjugué avec PEG ne présentait pas cette propriété, ce qui suggère que le groupement PEG supprime toutes les interactions non spécifiques du

fluorophore Nile Red avec les structures lipidiques. Dans les cultures cellulaires, NR-CBT et NR-PEG-CBT ont présenté un excellent effet « turn-on » en réponse à la présence du récepteur OTR, alors que le conjugué de référence, portant le fluorophore non fluorogène rhodamine, n'a montré aucune amélioration de sa fluorescence (Fig. 41F). L'imagerie de fluorescence a confirmé la forte liaison de la sonde aux récepteurs, qui a pu être observée grâce à la fluorescence membranaire (Fig. 41C). A une concentration relativement haute, la sonde « turn-on » permet une imagerie avec un bruit de fond négligeable, alors que le dérivé basé sur une sulforhodamine montre lui un bruit de fond important. Ces outils ont permis aussi une estimation du nombre de récepteurs à la surface de la cellule par technique spectroscopique. L'imagerie microscopique réalisée sur un microscope confocal a permis un excellent marquage des récepteurs sans requérir à l'utilisation de lavage de l'échantillon afin de supprimer l'éventuel bruit de fond grâce à la capacité de « turn-on » de la molécule (Fig. 41C et 41F). De plus, l'ajout du groupement PEG(8) (PEG(8) : octa(éthylène glycol)) présente l'effet intéressant de limiter grandement les interactions non spécifiques de la molécule, la rendant ainsi spécifique aux récepteurs OTR. Remarquablement, l'espaceur PEG(8) préserve les propriétés agonistes du ligand CBT, ce qui n'est pas le cas des conjugués sans PEG(8) (NR-CBT) qui se comportent comme des antagonistes. La molécule NR-PEG-CBT permet même l'imagerie en présence de sérum dans l'échantillon sans présence de bruit de fond nuisible à la manipulation, ainsi que la capacité à suivre le phénomène d'internalisation de ces récepteurs par endocytose. Ce travail présente le premier exemple de ligand fluorogène rouge pour les RCPGs.

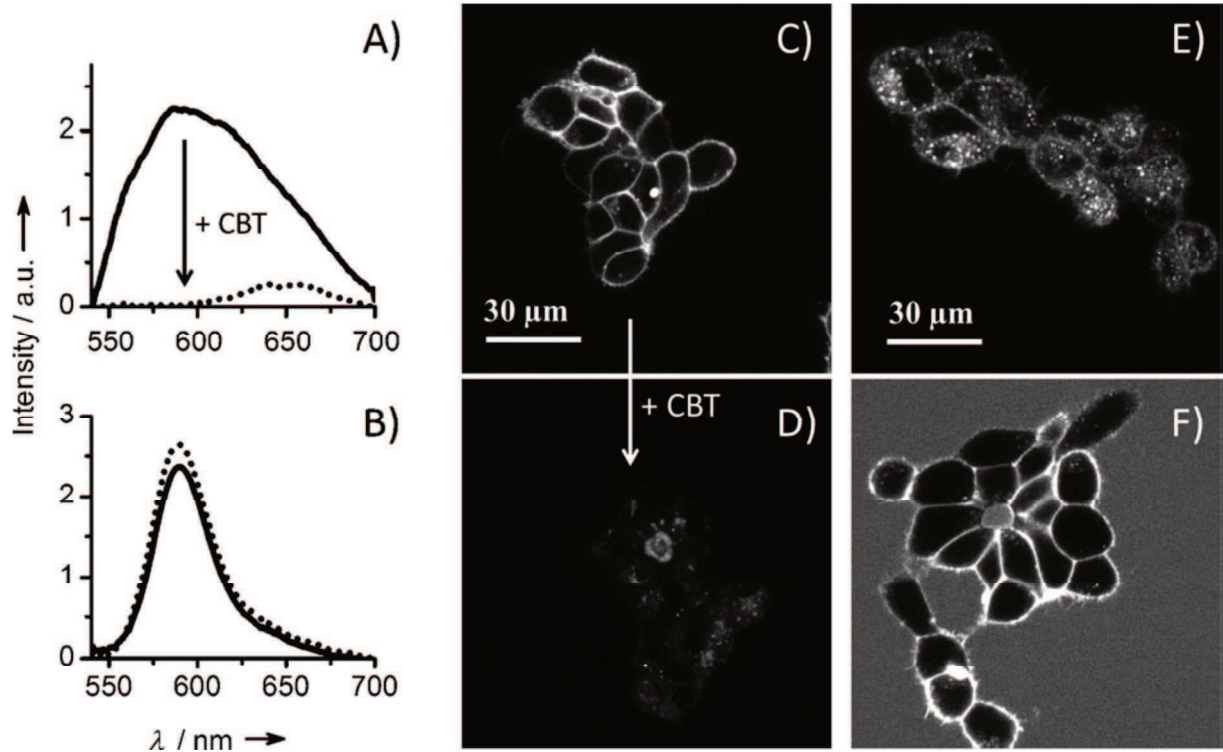


Figure 41 : Liaison des ligands des récepteurs OTR sur des cellules HEK 293. Spectre de fluorescence de (A) NR-PEG-CBT et (B) LRh-CBT à une concentration de 10 nM dans une suspension de cellules HEK OTR+ en absence (ligne pleine) ou en présence (pointillet) de 1 μ M de CBT. Expériences de substitution : image confocale de (C) cellules OTR+ avec 20 nM de NR-PEG-CBT et (D) les mêmes cellules après addition de 1 μ M de CBT. (E) Cellules OTR+ avec 100 nM de NR-PEG-CBT et (F) cellules OTR+ avec 100 nM de LRh-CBT (Karpenko et al., 2014).

DOI: 10.1002/cbic.201300738

Red Fluorescent Turn-On Ligands for Imaging and Quantifying G Protein-Coupled Receptors in Living Cells

Iuliia A. Karpenko,^[a] Rémy Kreder,^[b] Christel Valencia,^[c] Pascal Villa,^[c] Christiane Mendre,^[d] Bernard Mouillac,^[d] Yves Mély,^[b] Marcel Hibert,^[a] Dominique Bonnet,^{*[a]} and Andrey S. Klymchenko^{*[b]}

Classical fluorescence-based approaches to monitor ligand–protein interactions are generally hampered by the background signal of unbound ligand, which must be removed by tedious washing steps. To overcome this major limitation, we report here the first red fluorescent turn-on probes for a G protein-coupled receptor (oxytocin receptor) at the surface of living cells. The peptide ligand carbetocin was conjugated to one of the best solvatochromic (fluorogenic) dyes, Nile Red, which turns on emission when reaching the hydrophobic environment of the receptor. We showed that the incorporation of hydrophilic octa(ethylene glycol) linker between the pharmacophore and the dye minimized nonspecific interaction of the probe with serum proteins and lipid membranes, thus ensuring receptor-specific turn-on response. The new ligand was successfully applied for background-free imaging and quantification of oxytocin receptors in living cells.

Fluorescence turn-on systems are probably the most powerful tools in biological sensing, as they enable direct quantification of an analyte without removal of unreacted probe and provide the possibility of *in vivo* monitoring of molecular interactions.^[1,2] Turn-on probes are of particularly high interest in the study of G protein-coupled receptors (GPCRs),^[3] the largest and most diverse group of membrane receptors in eukaryotes. Currently, fluorescence anisotropy^[4] and FRET^[5] are well-established fluorescence techniques for GPCR studies without removal of the non-interacted ligand (homogeneous conditions). However, the first method suffers from low sensitivity, and the

second requires fluorescent labeling of both ligand and receptor. Therefore, efforts have been made to achieve a turn-on response based exclusively on fluorescent labeling of the ligand. In one approach, the ligand was designed in the form of a non-fluorescent nanostructure complex; it disassembles after interaction with the target receptor and thus turns on fluorescence.^[6] Even though this concept is highly innovative it is not quantitative, because it suffers from poor control of the effective ligand concentration and requires a large excess of the ligand. The second approach, which is still largely underexplored, involves environment-sensitive dyes^[1c–e] that are not fluorescent in aqueous medium but turn on in a hydrophobic environment (“fluorogenic” dyes). Few GPCR ligands bearing fluorogenic dyes have been reported to date.^[7] In addition, they suffer from limited efficacy because of nonspecific interactions^[8] or the requirement to perform studies on isolated membranes (not living cells).^[9] Moreover, all these examples were limited to blue dyes, whereas red dyes are advantageous for cellular studies because of lower sample photodamage, light scattering, and autofluorescence. Among known fluorogenic dyes, Nile Red (NR) is probably the best represented, and features red emission and excellent sensitivity to solvent polarity.^[1e,10] It has been successfully applied to study apolar environments in micelles,^[11] lipid nanoparticles,^[12] and biomembranes,^[10b] but it has never been used in receptor studies.

Our strategy was to covalently link the NR fluorophore to a ligand of the oxytocin receptor (OTR)^[13] through an inert polar spacer. Then, ligand–receptor interaction would change the fluorophore environment from aqueous to apolar, thus turning on the fluorescence (Scheme 1). As the OTR endogenous ligand oxytocin lacks *in vivo* enzymatic stability,^[14] its stable analogue carbetocin (CBT)^[15] was used. To functionalize CBT, a Lys residue was introduced at position 8, by following a previously described approach for oxytocin analogues.^[16]


Thus, Lys8-carbetocin obtained by solid-phase peptide synthesis (Scheme S1 in the Supporting Information), was coupled to the NR derivative with a PEG(8) linker to yield the fluorescent ligand NR-PEG-CBT (Scheme 1). To investigate the importance of the PEG spacer, Lys8-carbetocin was also coupled directly to the NR carboxyl derivative to provide NR-CBT. Finally, a conjugate (LRh-CBT) of CBT with Lissamine Rhodamine B, a classical nonfluorogenic dye, was synthesized as a control. Following the preparation of NR-labeled ligands, their binding affinities for OTR were determined by competition experiments against [³H]AVP (labeled arginine vasopressin) as described previously^[17] (Figure S1). Interestingly, both NR-PEG-CBT and NR-

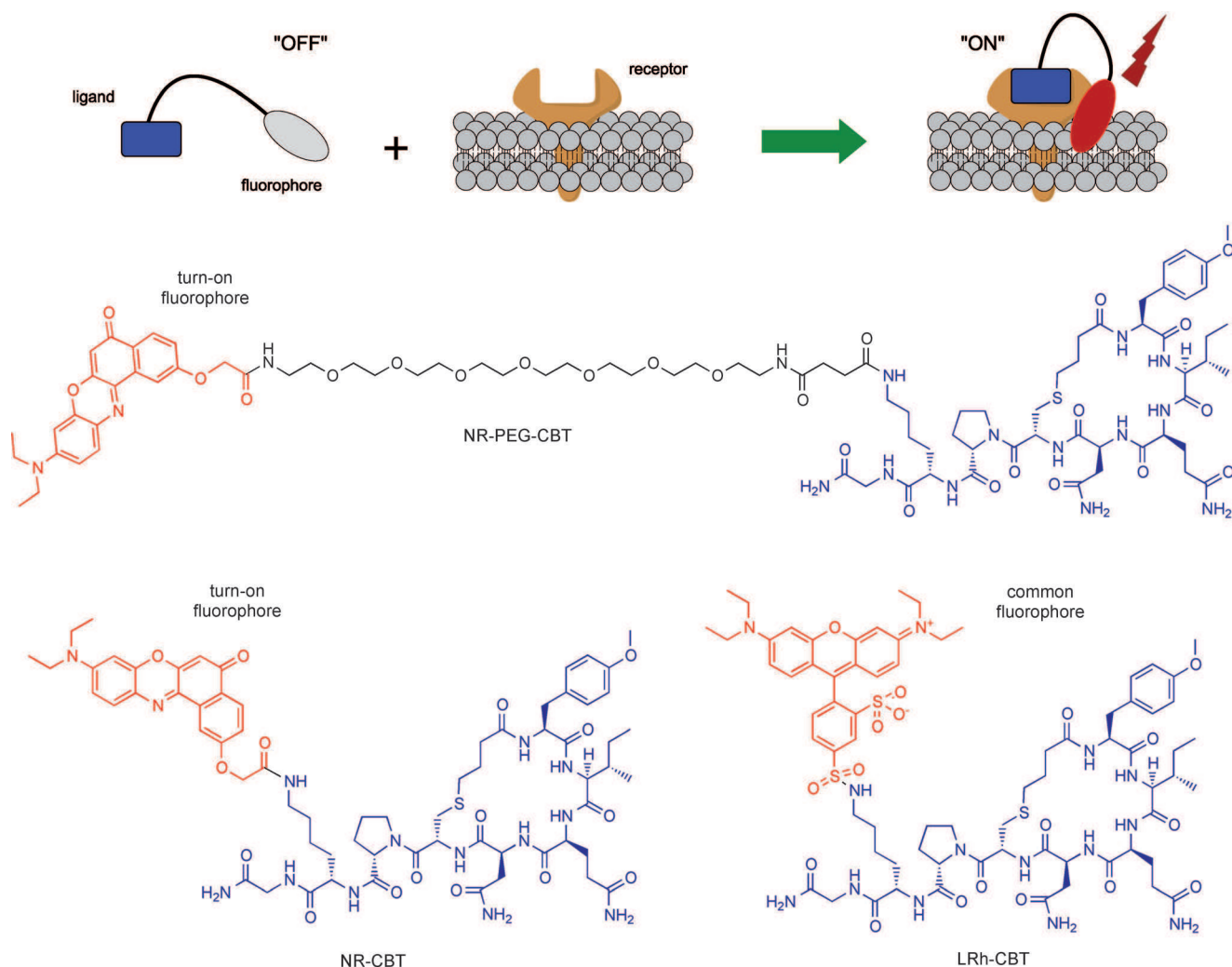
[a] I. A. Karpenko, Prof. Dr. M. Hibert, Dr. D. Bonnet
Laboratoire d'Innovation Thérapeutique UMR 7200 Uds CNRS
LabEx Medalis, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg
74 route du Rhin, 67401 Illkirch Cedex (France)
E-mail: dominique.bonnet@unistra.fr

[b] R. Kreder, Prof. Dr. Y. Mély, Dr. A. S. Klymchenko
Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie UMR 7213 Uds CNRS
Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg
74 route du Rhin, 67401 Illkirch Cedex (France)
E-mail: andrey.klymchenko@unistra.fr

[c] C. Valencia, Dr. P. Villa
PCBIS, FMTS, UMS 3286, CNRS-Uds, LabEx Medalis, ESBS Pôle API
Bld Sébastien Brant, 67401 Illkirch Cedex (France)

[d] Dr. C. Mendre, Dr. B. Mouillac
Institut de Génomique Fonctionnelle, CNRS UMR 5203
INSERM U661, Université de Montpellier I et II
141 rue de la Cardonille, 34094 Montpellier Cedex 5 (France)

 Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201300738>.



Scheme 1. Fluorescent ligands for the oxytocin receptor.

CBT conjugates showed high affinity for OTR ($K_i=0.54$ and 0.55 nM, respectively). In addition, the activities of NR-PEG-CBT and NR-CBT were evaluated by measuring intracellular calcium release^[18] (Figure S2). NR-CBT inhibited oxytocin-induced calcium release in a dose-dependent manner, thus highlighting its antagonistic character ($IC_{50}=74$ nM); however, NR-PEG-CBT induced calcium release in a dose-dependent manner, thus showing its agonistic character ($EC_{50}=244$ nM). These results demonstrate the crucial role of the linker to preserve the functional activity of the ligand.

The turn-on properties of the fluorescent ligands were first studied in organic solvents. For both NR conjugates, the fluorescence spectrum (Figures 1 and S4) blue-shifted and the fluorescence intensity increased with decreasing solvent Reichardt polarity index^[19] (Table S1); this is consistent with the solvatochromism of NR and its derivatives.^[10b,20] Good correlation was observed between quantum yield and position of the emission maximum (Figure 1). Remarkably, the change from polar aqueous environment to apolar 1,4-dioxane results in $\sim 10^4$ -fold fluorescence enhancement at 580 nm.

Turn-on ligands applied in cellular studies should exhibit minimal nonspecific binding. As NR and its derivatives have

shown relatively high affinity to lipid membranes^[10b] and serum albumins,^[21] we assessed the behavior of our ligands. In the presence of large unilamellar vesicles (cell membrane models), we observed no change in the fluorescence spectrum for NR-PEG-CBT and only a little intensity increase for NR-CBT, whereas the parent NR showed a blue shift and an intensity increase typical for membrane binding (Figure 1). Very similar data were obtained in the presence of bovine serum albumin or blood serum (Figure S6). It thus appears that the hydrophilic PEG spacer decreases non-specific binding to lipid membranes and serum constituents, and this makes NR-PEG-CBT highly promising for cellular studies.

The ligands were further evaluated in suspensions of HEK293 cells overexpressing the oxytocin receptor (OTR+). In the presence of unlabeled CBT (a competitor that saturates all the receptors), the emission of NR-PEG-CBT had a very low intensity (Figure 2A, dotted line) with a maximum corresponding to that in aqueous medium. In cells without the competitor (Figure 2A, solid line), we observed a 250-fold intensity increase at 580 nm, thus demonstrating the receptor-specific turn-on response of the ligand. Remarkably, the blue-shifted maximum (585 nm) corresponds to a rather apolar environ-

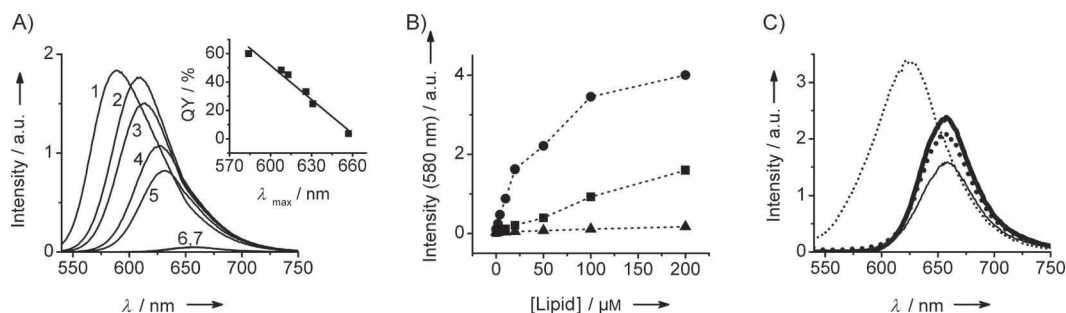


Figure 1. Fluorescence properties of the turn-on ligands. A) Fluorescence spectra of NR-PEG-CBT in 1) 1,4-dioxane, 2) acetone, 3) CH₃CN, 4) EtOH, 5) MeOH, 6) H₂O, and 7) HEPES buffer; inset: correlation between quantum yield and emission maximum for NR-PEG-CBT. B) Fluorescence intensity at 580 nm as a function of the liposome concentration in HEPES buffer; ●: Nile Red, ■: NR-CBT, ▲: NR-PEG-CBT. C) Fluorescence spectra of NR (thin line) and NR-PEG-CBT (bold line) in HEPES buffer (solid line) and in the presence of liposomes (200 μM lipid; dotted line).

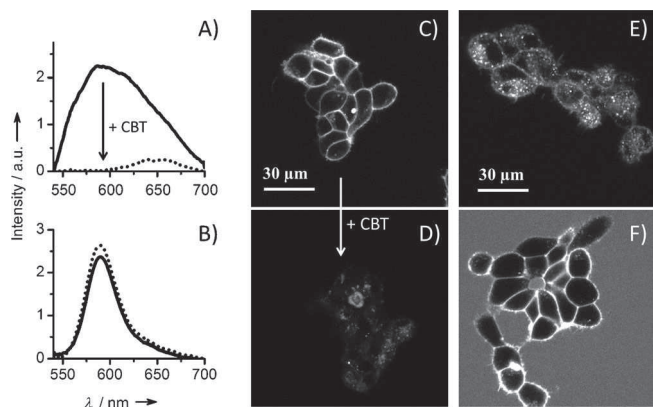


Figure 2. Binding of the ligands to OTRs on HEK293 cells. Fluorescence spectra of A) NR-PEG-CBT and B) LRh-CBT at 10 nM in suspensions of OTR+ cells in the absence (solid line) or the presence (dotted line) of 1 μM CBT. Substitution experiments: confocal images of C) OTR+ cells with 20 nM NR-PEG-CBT and D) the same cells following the addition of 1 μM CBT. E) OTR+ cells with 100 nM NR-PEG-CBT, and F) OTR+ with 100 nM LRh-CBT.

ment,^[10b] thus suggesting that after ligand–receptor interaction, the NR moiety protrudes into the lipid environment of the receptor. Similar results were obtained with NR-CBT (Figure S7), though the turn-on response was somewhat weaker (15-fold) as a result of the broader emission band in the presence of CBT. Thus, the turn-on response of the slightly more lipophilic NR-CBT is likely compromised by nonspecific binding to cell membranes. LRh-CBT (NR-CBT analogue with a non-fluorogenic dye) exhibited no significant spectral change between cells with and without available OTR receptors (Figure 2B). Thus, the ligand bearing a classical fluorophore did not show a turn-on response upon binding to the receptor, as it always was in the “on” state.

We then performed confocal microscopy studies of adherent OTR+ and OTR– (wild-type) HEK293 cells in the presence of the turn-on ligands. Clear fluorescence staining at the plasma membrane of OTR+ cells was observed with just 20 nM NR-PEG-CBT (Figure 2C) or NR-CBT (Figure S8), whereas in control (OTR–) cells the intensity was close to the autofluorescence level (Figure S8). Moreover, both fluorescent ligands were readily substituted by unlabeled CBT, which led to disappearance of membrane staining (Figures 2D and S7C). These results con-

firm that the developed ligands bind to the cell surface in a receptor-specific manner. The comparative ligand LRh-CBT also showed good membrane staining (Figure S8). However, in contrast to the turn-on ligands, it presented non-negligible background fluorescence, particularly strong at higher ligand concentrations (Figures 2F and S9) due to the fluorescence of unbound ligand in the cellular medium. These results show that although the turn-on response is not mandatory for imaging applications,^[22] it improves the image quality by decreasing the background fluorescence. Incidentally, even in the presence of 10% serum (typical concentration in cell culture medium), no background fluorescence was observed for either NR derivative (Figure S10). This is crucial for the development of probes for *in vivo* imaging, as high nonspecific fluorescence is the main reason for their failure.

Microscopy also revealed particular differences in the pharmacological profiles of the dyes. OTR is rapidly internalized after agonist stimulation.^[13] NR-PEG-CBT induced OTR internalization, whereas the ligand without a spacer remained at the cell surface regardless of incubation time (Figure 3). Moreover, receptor internalization by NR-PEG-CBT was even faster at higher ligand concentrations (compare Figure 2C and 2E). This difference in behavior of two CBT derivatives is in accordance with their functional activity profiles, described above.

Finally, the successful turn-on ligand NR-PEG-CBT was evaluated as a tool to rapidly estimate the number of receptors available for ligand binding at the cell surface. Currently, quantification of receptors at the cell surface uses either radioli-

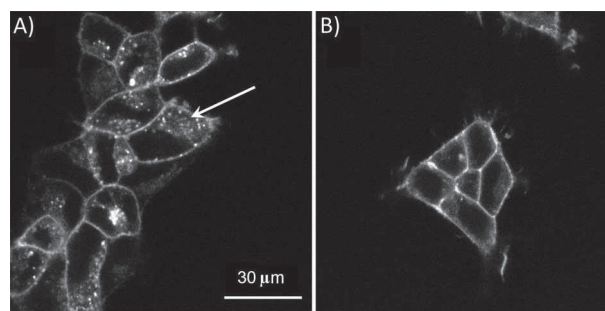


Figure 3. Receptor internalization. OTR+ cells in the presence of A) 20 nM NR-PEG-CBT or B) 20 nM NR-CBT after 30 min incubation at 37 °C in 5% CO₂.

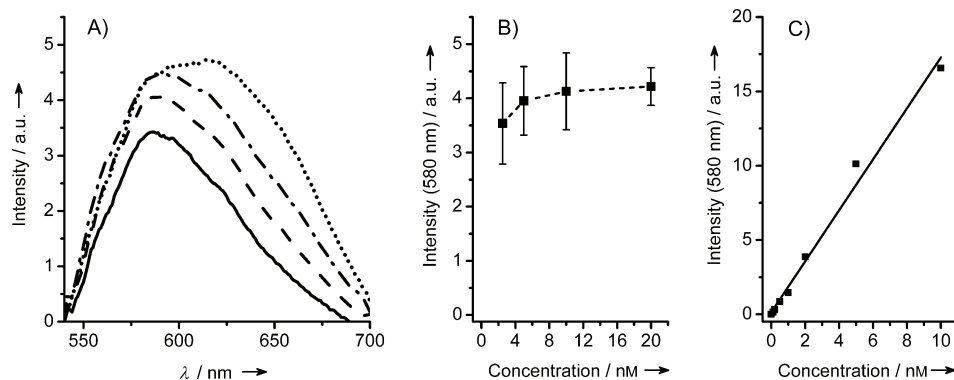


Figure 4. Receptor quantification. A) Titration of OTR⁺ cells in HEPES buffer with 2.5 (—), 5 (---), 10 (· · ·), and 20 nM (— · —) NR-PEG-CBT. B) The corresponding saturation curve for fluorescence intensity at 580 nm. C) Calibration curve for NR-PEG-CBT in 1,4-dioxane.

gands^[23] (which require protective equipment and result in radioactive waste) or fluorescently labeled antibodies (expensive specialized equipment is needed).^[24] Moreover, in both techniques a wash step is required. Turn-on ligands present a simple and inexpensive alternative to these established methods.

Because of the clear turn-on response of NR-PEG-CBT, the fluorescence detected at 580 nm originates mainly from the ligands bound to the receptor. Titration of the OTR⁺ cells showed that all available receptors are saturated below 20 nM ligand (Figure 4A and B). The obtained saturation intensity allowed us to calculate the concentration of the bound fluorescent ligand with a calibration curve in organic solvent (1,4-dioxane, Figure 4C) that is thought to mimic the environmental polarity of the bound ligand (i.e., similar emission maximum and quantum yield). Thus, a value of 29000 ± 5000 available receptors per cell was obtained (see the Supporting Information). This value is in good agreement with that we determined for the same cell line by a classical radioactive binding assay (46000 ± 8000) receptors per cell; see the Supporting Information), thus suggesting that turn-on ligands are a very promising alternative tools for receptor quantification without radioactive handle.

In conclusion, we present the concept of turn-on ligands to study wild-type receptors without requiring removal of unbound ligand, and without the need for expensive and time-consuming fluorescence techniques or the use of radioactive ligands. It is potentially interesting for the development of a high-throughput screening assay for GPCRs at the cell surface as well as for background-free *in vivo* molecular imaging.

Acknowledgements

This work was supported by ANR JCJC (ANR-11-JS07-014-01), CNRS, INSERM, the Université de Strasbourg, and the Université Montpellier I and II. We warmly thank Pascale Buisine and Patrick Wehrung from the Service de Chimie Analytique (SCA) for LC-MS analyses. I.A.K. was supported by a fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Keywords: fluorescent probes · GPCR · Nile Red · oxytocin receptors · solvatochromism

- [1] a) A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515–1566; b) A. Nadler, C. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 2408–2410; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 2466–2469; c) G. S. Loving, M. Sainlos, B. Imperiali, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 73–83; d) A. S. Klymchenko, Y. Mely, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2013**, *113*, 35–58; e) J. B. Grimm, L. M. Heckman, L. D. Lavis, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2013**, *113*, 1–34.
- [2] a) P. Venkatraman, T. T. Nguyen, M. Sainlos, O. Bilsel, S. Chitta, B. Imperiali, L. J. Stern, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 222–228; b) N. K. Devaraj, S. Hilderbrand, R. Upadhyay, R. Mazitschek, R. Weissleder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2869–2872; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2931–2934; c) G. Lukinavičius, K. Umezawa, N. Olivier, A. Honigsmann, G. Yang, T. Plass, V. Mueller, L. Reymond, I. R. Corrêa, Z.-G. Luo, C. Schultz, E. A. Lemke, P. Heppenstall, C. Eggeling, S. Manley, K. Johnsson, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 132–139; d) Y.-D. Zhuang, P.-Y. Chiang, C.-W. Wang, K.-T. Tan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8124–8128; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 8282–8286.
- [3] D. M. Rosenbaum, S. G. F. Rasmussen, B. K. Kobilka, *Nature* **2009**, *459*, 356–363.
- [4] L. Albizu, G. Teppaz, R. Seyer, H. Bazin, H. Ansanay, M. Manning, B. Mouillac, T. Durroux, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4976–4985.
- [5] a) D. Maurel, L. Comps-Agrar, C. Brock, M.-L. Rives, E. Bourrier, M. A. Ayoub, H. Bazin, N. Tinel, T. Durroux, L. Prézeau, E. Trinquet, J.-P. Pin, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 561–567; b) B. Ilien, C. Franchet, P. Bernard, S. Morisset, C. O. Weill, J.-J. Bourguignon, M. Hibert, J.-L. Galzi, *J. Neurochem.* **2003**, *85*, 768–778.
- [6] a) K. Mizusawa, Y. Takaoka, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13386–13395; b) Y. Zhang, J.-M. Liu, X.-P. Yan, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 228–234.
- [7] R. Sridharan, J. Zuber, S. M. Connelly, E. Mathew, M. E. Dumont, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2014**, *1838*, 15–33.
- [8] a) I. Berque-Bestel, J.-L. Soulier, M. Giner, L. Rivail, M. Langlois, S. Sicsic, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2606–2620; b) E. Lacivita, M. Leopoldo, A. C. Massotti, C. Inglese, F. Berardi, R. Perrone, S. Ganguly, M. Jafurulla, A. Chattopadhyay, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7892–7896.
- [9] F. Krieger, A. Mouro, R. Araoz, F. Kotzyba-Hibert, J. Molgó, E. Bamberg, M. Goeldner, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1146–1153.
- [10] a) P. Greenspan, S. D. Fowler, *J. Lipid Res.* **1985**, *26*, 781–789; b) O. A. Kucherak, S. Oncul, Z. Darwich, D. A. Yushchenko, Y. Arntz, P. Didier, Y. Mély, A. S. Klymchenko, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4907–4916.
- [11] A. Datta, D. Mandal, S. K. Pal, K. Bhattacharyya, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 10221–10225.
- [12] a) K. Jores, A. Haberland, S. Wartewig, K. Mäder, W. Mehnert, *Pharm. Res.* **2005**, *22*, 1887–1897; b) A. S. Klymchenko, E. Roger, N. Anton, H. Anton, I. Shulov, J. Vermot, Y. Mely, T. F. Vandamme, *RSC Adv.* **2012**, *2*, 11876–11886.
- [13] G. Gimpl, F. Fahrenholz, *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 629–683.
- [14] D. Gazis, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1978**, *158*, 663–665.
- [15] T. Engström, T. Barth, P. Melin, H. Vilhardt, *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *355*, 203–210.
- [16] S. Terrillon, L. L. Cheng, S. Stoev, B. Mouillac, C. Barberis, M. Manning, T. Durroux, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2579–2588.
- [17] C. Breton, H. Chellil, M. Kabbaj-Benmansour, E. Carnazzi, R. Seyer, S. Philipou, D. Morin, T. Durroux, H. Zingg, C. Barberis, B. Mouillac, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 26931–26941.
- [18] N. Weill, C. Valencia, S. Gioria, P. Villa, M. Hibert, D. Rognan, *Mol. Inf.* **2011**, *30*, 521–526.

- [19] C. Reichardt, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2319–2358.
[20] J. Jose, K. Burgess, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 11021–11037.
[21] D. M. Davis, D. J. S. Birch, *J. Fluoresc.* **1996**, *6*, 23–32.
[22] S. J. Briddon, R. J. Middleton, Y. Cordeaux, F. M. Flavin, J. A. Weinstein, M. W. George, B. Kellam, S. J. Hill, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 4673–4678.
[23] N. Parker, M. J. Turk, E. Westrick, J. D. Lewis, P. S. Low, C. P. Leamon, *Anal. Biochem.* **2005**, *338*, 284–293.
[24] C. J. Daly, J. C. McGrath, *Pharmacol. Ther.* **2003**, *100*, 101–118.
-

Received: October 24, 2013

Published online on January 21, 2014

2.2. Sonde membranaire liée à un récepteur

Le groupe de Chapman en 1975 a fait l'hypothèse que la clusterisation des récepteurs pouvait être connectée avec répartition différente des lipides dans les différentes phases membranaires (Chapman, 1975). Il semblerait donc que l'environnement proche des différents récepteurs présente des différences notables par rapport au reste de la membrane. Cela semble encore plus vrai pour les récepteurs impliqués dans la transduction du signal. Toutefois, il n'existe actuellement pas de méthode permettant de mettre en évidence directement l'état des phases lipidiques entourant un récepteur. En reprenant les résultats obtenus précédemment avec les récepteurs couplés aux protéines G, nous avons voulu mettre au point une sonde sur le même modèle mais ayant la capacité de loger son fluorophore dans la membrane environnant le récepteur. Dans le cas où le fluorophore possède des propriétés solvatochromes, cela devrait permettre de visualiser la nature de la membrane au niveau du récepteur (phase Lo ou Ld) (Fig. 42).

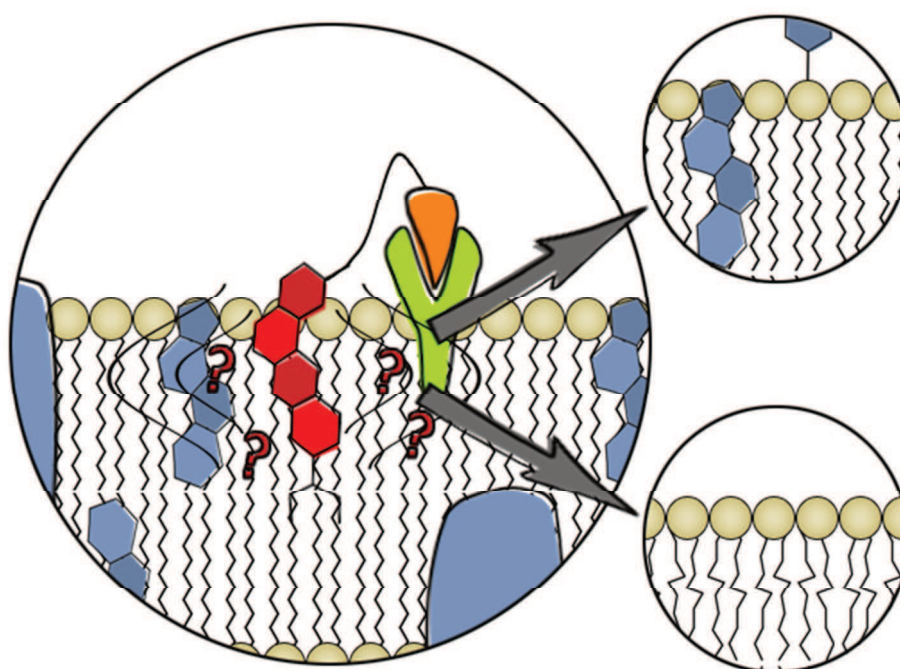
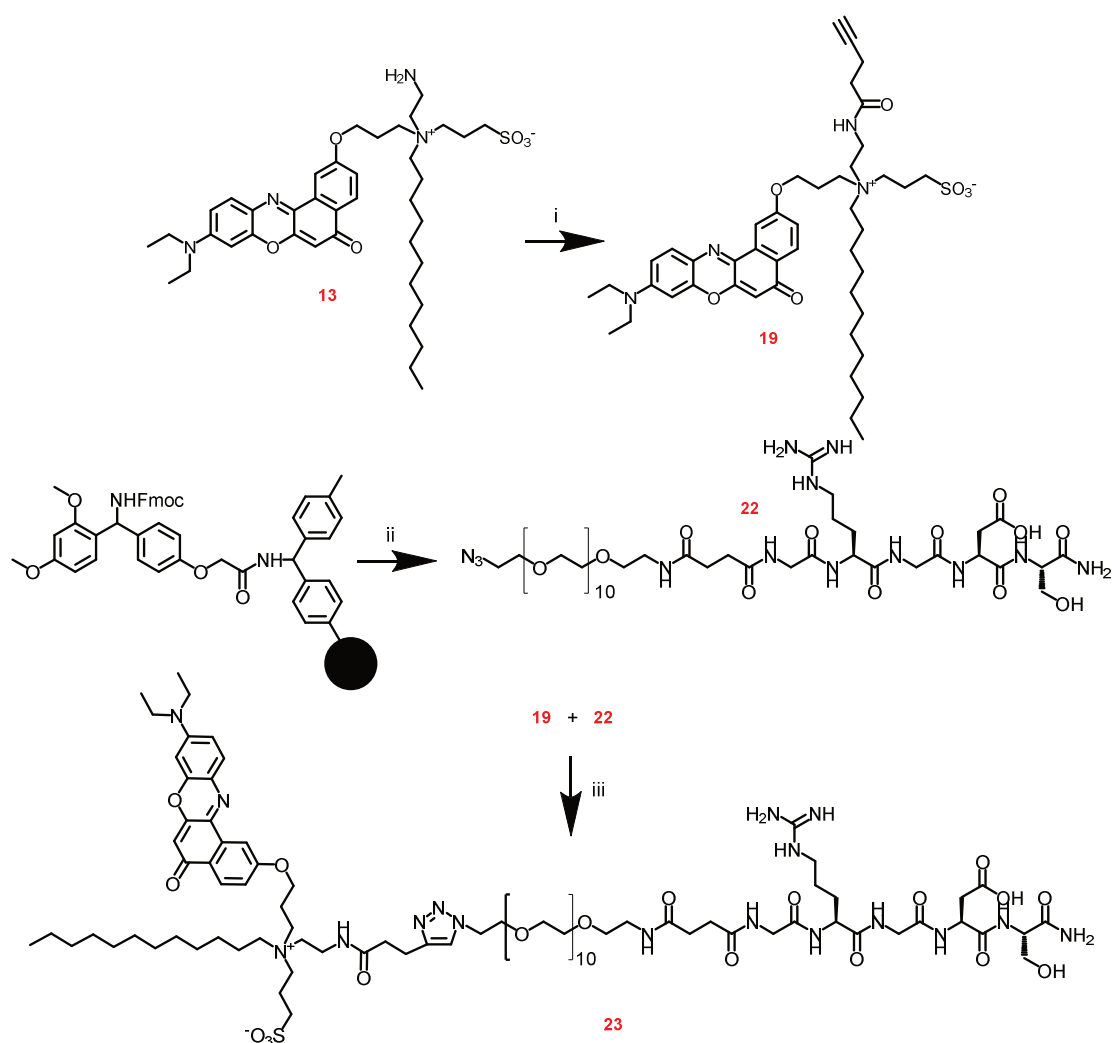


Figure 42 : Schéma de principe du fonctionnement de la sonde membranaire liée au récepteur.

Nous avons sélectionné comme fluorophore, Nile Red, pour ses propriétés « turn-on » et son excellente sensibilité aux phases, et RGD/intégrine comme couple d'étude ligand récepteur, (RGD : acide arginylglycylaspartique, Arg-Gly-Asp). Les ligands et le fluorophore sont séparés l'un de l'autre par un groupement PEG(12) (12 sous-unité EG) afin de permettre au fluorophore de s'ancrer dans la membrane. La structure du peptide RGD retenu est GRGDS (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser), structure minimale nécessaire pour la reconnaissance par les intégrines, inspirée des travaux de Houseman and Mrksich, 1998. Pour être sûr que le fluorophore se loge bien dans la membrane, celui-ci possède les mêmes attributs que la sonde NR12S, à savoir une longue chaîne alkyle (l'ancre), ainsi qu'une tête polaire (Fig. 43).



i) Acide pent-4-ynoïque, BOP, HOBT, DIEA, DMF/ CH_2Cl_2 (1/1), TA, 12h (90%); ii) Synthèse en phase solide en stratégie Fmoc sur résine Rink amide (voir description) ; iii) CuSO_4 , ascorbate de sodium, DMF, 60°C, 6h (42%)

Figure 43 : Schéma de synthèse de la sonde membranaire liée aux récepteurs NR-PEG-RGD.

La conception de cette sonde s'est faite en plusieurs étapes. Dans un premier temps, la partie peptidique RGD a été synthétisée puis la partie sonde, avant d'être couplées ensemble. Le peptide GRGDS a été synthétisé sur support solide (résine Rink Amide) par stratégie Fmoc. Le composé N_3 -PEG(12)-NH₂ modifié par anhydride succinique pour convertir le groupement NH₂ en groupement COOH, a été ajouté en fin de séquence sur le peptide GRGDS toujours accroché sur la résine par couplage peptidique. Il a ensuite été décroché de la résine puis purifié par HPLC semi-préparative en phase inverse (**22**). La partie sonde quant à elle a été produite à partir de l'intermédiaire NR12S-NH₂ (molécule **13**), produit lors de la création des sondes fNR12S et pNR12S, auxquelles nous avons ajouté un groupement alcyne en couplant l'acide 4-pentynoïque par couplage peptidique à l'intermédiaire NR12S-NH₂ (**19**). Les deux intermédiaires ainsi obtenus ont été rassemblés par stratégie « click » et la molécule finale (**23**) a été purifiée par exclusion stérique (colonne avec résine LH-20).

Analyses spectroscopiques :

La sonde a, dans un premier temps été testée sur des LUVs de DOPC de concentration croissante (0 à 400 μ M) afin de voir sa capacité à se lier à la membrane lipidique. On remarque une augmentation de la fluorescence à la concentration en vésicules. La partie fluorophore de la sonde possède donc bien une capacité à s'insérer dans la membrane, de plus on remarque à concentration nulle en LUVs dans le milieu, que la fluorescence de la molécule est particulièrement faible (~5% de ce qu'elle est avec une concentration en vésicule égale à 200 μ M). Elle conserve donc une propriété « turn-on » (Fig. 44B). Nous avons ensuite voulu vérifier si les modifications apportées au fluorophore lui permettent toujours de rester sensible aux phases. Le marqueur a donc été testé sur une dispersion de LUVs de DOPC (200 μ M), mimant les phases de type Ld, ainsi que sur une dispersion composée d'un mélange SM/cholestérol, mimant lui les phases de type Lo. Le maximum d'émission de fluorescence se situe à 570 nm pour les phases Lo (SM/cholestérol) et à 610 nm pour les phases Ld, un écart de 40 nm similaire à celui de NR12S (Fig. 44A).

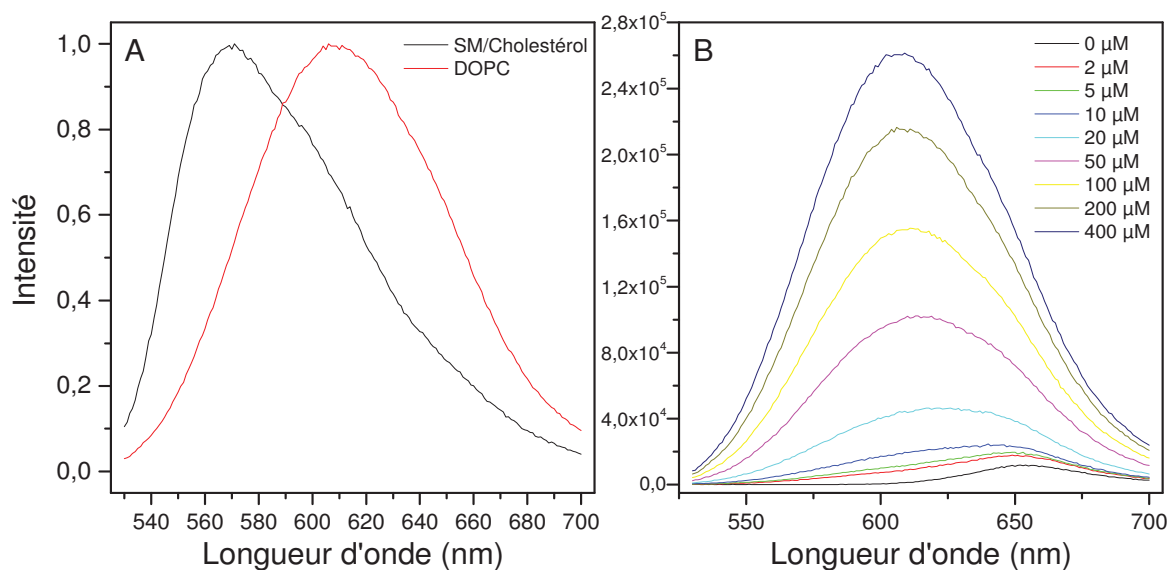


Figure 44 : Spectres de fluorescence de la sonde de la sonde NR-PEG-RGD ($0,4 \mu\text{M}$) sur une dispersion de LUVs de DOPC et d'un mélange SM/cholestérol (A) et sur une dispersion de LUVs de DOPC de concentration croissante (de 0 à $400 \mu\text{M}$ de DOPC) (B).

Imagerie microscopique :

Des tests sur des cellules U87 sur- et sous-exprimant l'intégrines $\alpha 5$ ont été réalisés, afin de pouvoir observer le comportement de cette sonde sur un échantillon biologique. NR12S a été utilisé en parallèle comme sonde contrôle, non liée à un récepteur. Ces cellules étant utilisées pour des études sur l'adhésion cellulaire, elles sont réputées pour être très adhérentes et très étalées. Elles ont donc été préparées (transférées dans des ibidis) quelques heures avant observation ($\sim 4\text{h}$). Les premières observations sont assez ambiguës, mais il semblerait que le marquage avec NR12S et NR-PEG-RGD soit différent, marquage membranaire très net pour NR12S (Fig. 45A) alors qu'il semble beaucoup plus diffus pour l'autre sonde (Fig. 45B) pour les cellules U87 $\alpha 5^+$. On observe aussi que l'intensité de fluorescence dans ces conditions soit plus faible pour la sonde NR-PEG-RGD. Dans le cas des U87 $\alpha 5^-$ il n'y a pas de différence notable entre les deux marqueurs. L'intégrine $\alpha 5$ étant impliquée dans l'adhésion cellulaire il paraîtrait normal que celle-ci soit plus présente au niveau des zones d'adhésion de la cellule, soit à la surface dans la zone de contact entre la cellule et son support ici. Nous avons donc réalisé une série d'images au niveau de cette interface (Fig. 45E-45H). Ici encore une fois les résultats ne présentent pas vraiment de différences entre les différents échantillons, on observe malgré tout une fluorescence moins

importante et une membrane moins bien délimitée dans le cas des cellules U87 α 5+ marquées par NR-PEG-RGD (Fig. 45F).

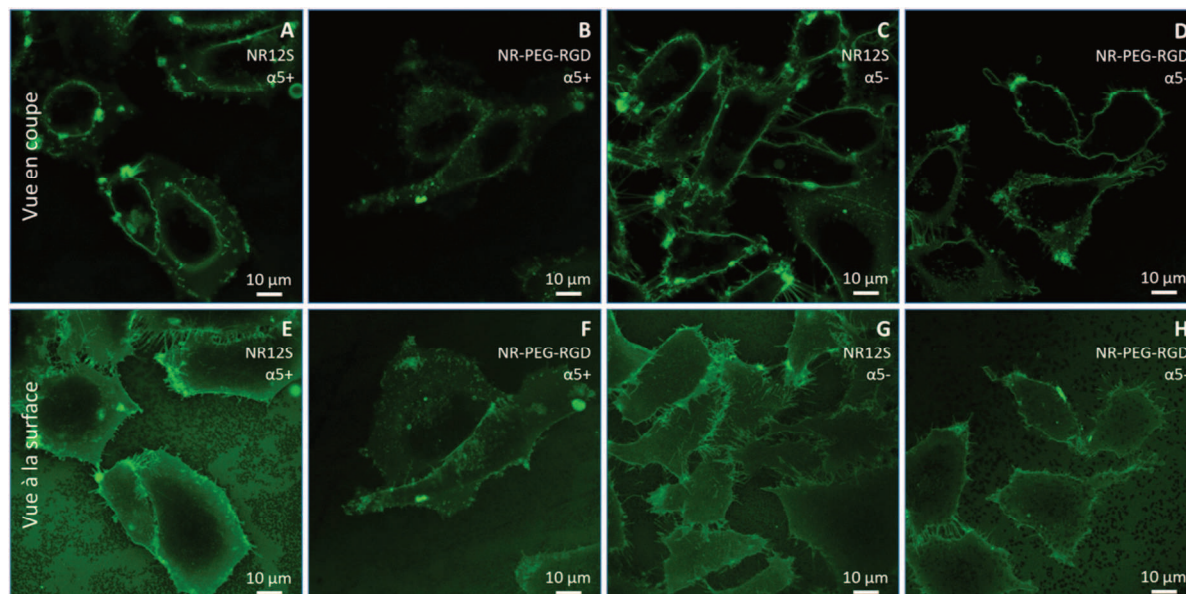


Figure 45 : Images d'intensité de fluorescence de cellules astrocytes, marquées par NR12S (A, C, E et G) ou NR-PEG-RGD (B, D, F et H), sur-exprimant l'intégrine α 5 (α 5+ ; A, B, E et F) ou la sous-exprimant (α 5- ; C, D, G et H). Les images ont été réalisées à la surface (E-H) ou en coupe dans les cellules (A-D). Les concentrations de sonde utilisées sont de 40 nM. L'excitation se fait à 488 nm et l'émission entre 530 et 558 nm.

Comme dit précédemment, la clusterisation des récepteurs peut entraîner une modification de la nature de l'environnement lipidique dans le cluster. Notre sonde est dessinée spécialement dans le but d'analyser cet environnement, sa liaison à un ligand du récepteur et un espaceur de taille fixe devrait faire en sorte que la majorité de la sonde se loge dans l'environnement proche du récepteur auquel elle s'est liée dans une cellule sur-exprimant ce récepteur. Par contre, dans le cas d'une cellule n'exprimant pas ou sous-exprimant le récepteur cible, la répartition de celle-ci devrait être plus aléatoire au sein de la membrane. C'est pourquoi nous avons réalisé des images ratiométriques de nos cellules marquées par NR12S et NR-PEG-RGD. Basées sur les propriétés solvatochromes de nos sondes, ces images devraient nous donner une idée de l'ordre lipidique dans l'environnement proche de la sonde. Les résultats ainsi obtenus ne sont pas convaincants.

Dans le cas des images en coupe, la couleur (correspondante au ratio de fluorescence des canaux vert/rouge) est généralement verte, quelque soient les conditions d'expérimentation, les rares points de couleur orange ou rouge proviennent généralement d'agglomérats de sonde sur la membrane (trace de sérum, protéine, etc...) qui saturent le détecteur de l'appareil et provoquent ainsi ces artéfacts plus ordonnés. Il ne semble pas y avoir de différences entre l'environnement détecté par NR12S et NR-PEG-RGD (Fig. 46A-46D). Lorsque l'on situe les images au niveau de la surface, les résultats ne sont pas plus concluants, la nuance semble identique partout, verte (Fig. 46E-46H). Si l'échantillon peut apparaître plus bleu, il semblerait que ce soit dû à une part plus importante du signal reçu à la sonde collée au support qui fluoresce aussi (Fig. 46E-46F).

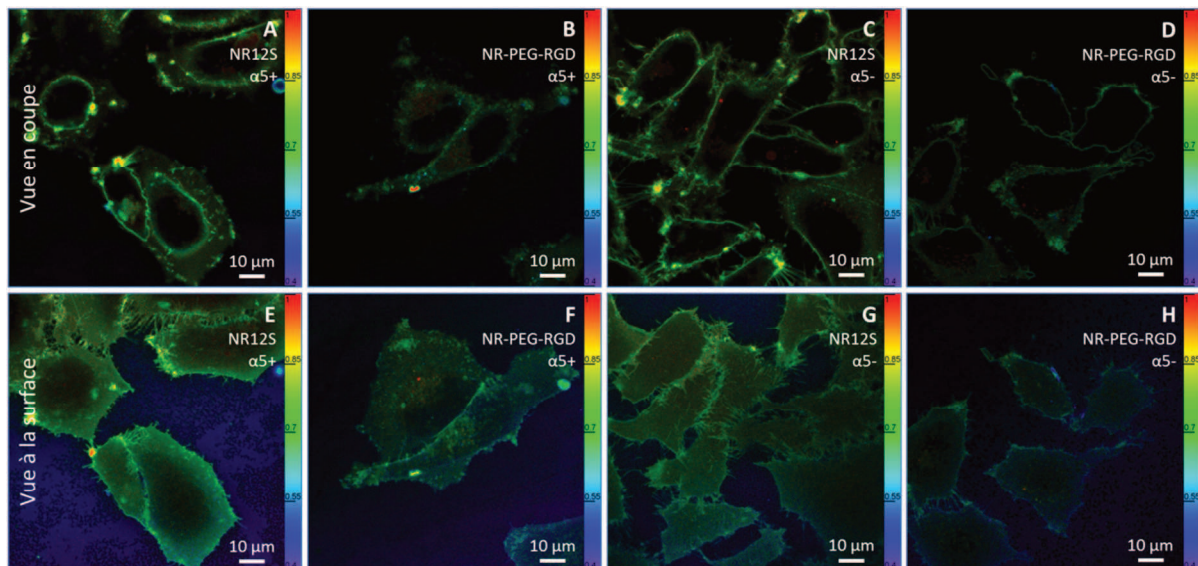


Figure 46 : Images ratiométriques de cellules astrocytes, marquées par NR12S (A, C, E et G) ou NR-PEG-RGD (B, D, F et H), sur-exprimant l'intégrine $\alpha 5$ ($\alpha 5+$; A, B, E et F) ou la sous-exprimant ($\alpha 5-$; C, D, G et H). Les images ont été réalisées à la surface (E-H) ou en coupe dans les cellules (A-D). Les concentrations de sonde utilisées sont de 40 nM. L'excitation se fait à 488 nm et l'émission entre 530-585 nm (canal bleu) et 585-640 nm (canal rouge).

Nous avons aussi voulu voir ce que pouvait nous apporter une saturation préalable des récepteurs par un agoniste à RGD, le peptide cilengitide. Celui-ci a été ajouté quelques minutes avant le marquage par les différentes sondes afin de saturer un maximum les récepteurs. Pour les images en coupe, en présence de la sonde NR12S, on remarque que le

peptide cilengitide a un effet direct sur l'adhésion cellulaire, on observe un grand nombre d'extensions membranaires (sortes de « cheveux ») témoignant de l'ancien étalage de la cellule (Fig. 47A-47D). On remarque aussi que la membrane des cellules U87 α 5+ marquée par NR-PEG-RGD et ayant subi ce traitement semble présenter une membrane légèrement plus nette (Fig. 47B). La même remarque peut être faite dans le cas des images au niveau de l'interface cellule/support (Fig. 47E-47H), la membrane semble juste légèrement plus nette dans le cas de la sonde NR-PEG-RGD sur des cellules U87 α 5+ (Fig. 47F).

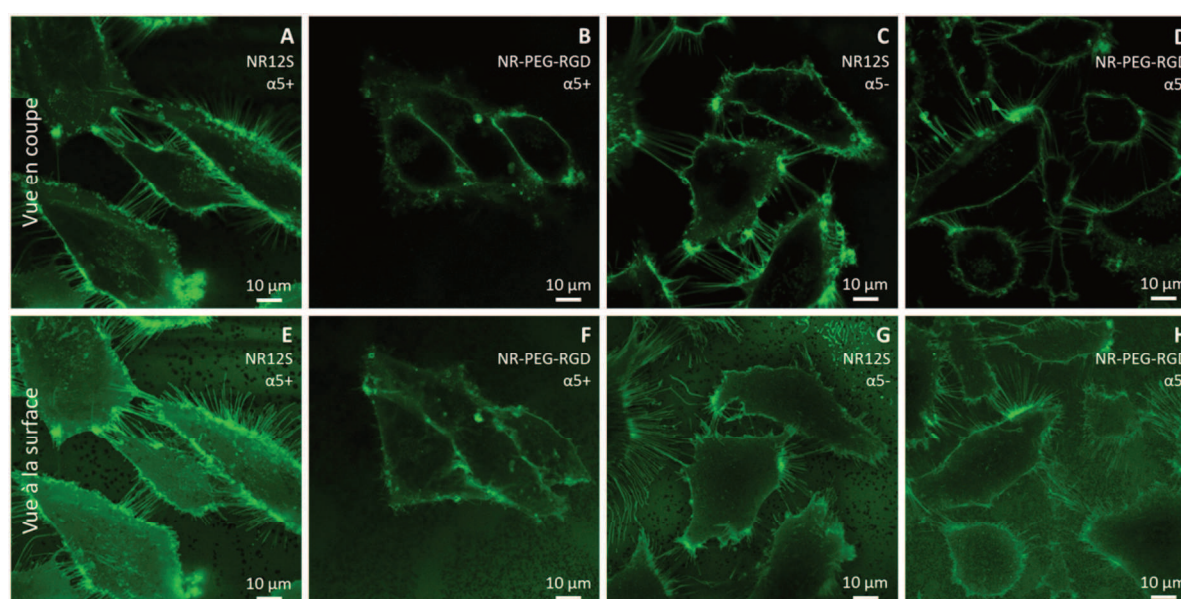


Figure 47 : Images d'intensité de fluorescence de cellules astrocytes, marquées par NR12S (A, C, E et G) ou NR-PEG-RGD (B, D, F et H), sur-exprimant l'intégrine α 5 (α 5+ ; A, B, E et F) ou la sous-exprimant (α 5- ; C, D, G et H). Les images ont été réalisées à la surface (E-H) ou en coupe dans les cellules (A-D). Les cellules ont d'abord été mises en présence d'un agoniste à RGD, le peptide cilengitide (cRGD ; 4 μ m), 5 min avant le marquage. Les concentrations de sonde utilisées sont de 40 nM. Les réglages du microscope sont les mêmes que pour la Fig. 45.

A nouveau des images ratiométriques ont été réalisées dans les mêmes conditions que précédemment et les mêmes conclusions peuvent être tirées de ces analyses. Encore une fois, lorsque l'on situe les images au niveau de la surface, la nuance est identique partout, verte (Fig. 48E-48H). Si l'échantillon peut apparaître plus bleu, il semblerait que ce

soit dû à une part plus importante du signal reçu à la sonde collée au support qui fluoresce aussi (Fig. 48E-48F).

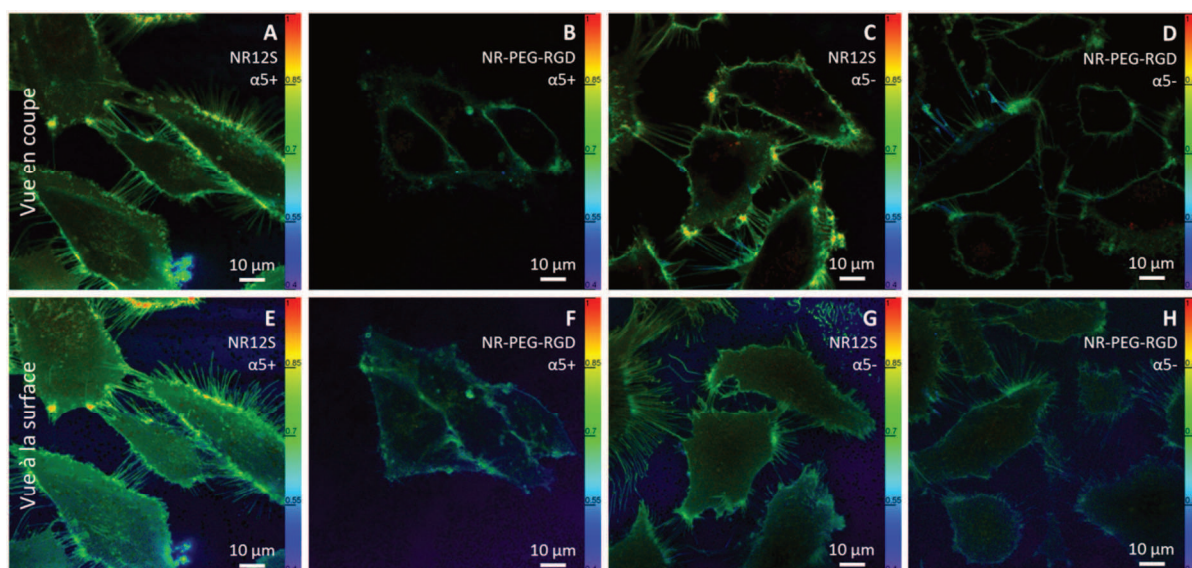


Figure 48 : Images ratiométriques de cellules astrocytes, marquées par NR12S (A, C, E et G) ou NR-PEG-RGD (B, D, F et H), sur-exprimant l'intégrine $\alpha 5$ ($\alpha 5+$; A, B, E et F) ou la sous-exprimant ($\alpha 5-$; C, D, G et H). Les images ont été réalisées à la surface (E-H) ou en coupe dans les cellules (A-D). Les cellules ont d'abord été mises en présence d'un agoniste à RGD, le peptide ciligentide (cRGD ; $4 \mu\text{m}$), 5 min avant le marquage. Les concentrations de sonde utilisées sont de 40 nM. Les réglages du microscope sont les mêmes que pour la Fig. 46.

Ces premiers résultats ne sont pas très concluants et ces expériences nécessitent certaines améliorations afin d'affiner les résultats obtenus. Les résultats spectroscopiques sont encourageants mais incomplets, la sonde conserve ses propriétés solvatochromes et « trun-on », et la partie fluorophore se loge plutôt bien dans la membrane, comme pour NR12S. Il serait intéressant d'avoir le rendement quantique de cette sonde afin de voir si la diminution de fluorescence observée sur les cellules provient d'un marquage moins important de NR-PEG-RGD ou est simplement due à une fluorescence moins efficace de cette sonde. De plus, des expérimentations sur des suspensions cellulaires avec analyses spectroscopiques pourraient nous donner des informations importantes quant à l'action du peptide ciligentide ou encore nous permettraient de quantifier avec plus de précision le niveau de fluorescence de cette sonde par rapport à NR12S. Des analyses d'affinité de la sonde pour son récepteur serait un gros plus, cela nous permettrait d'estimer le ratio de

sonde dans la membrane liée à un récepteur, et de sonde simplement liée à la membrane. En ce qui concerne les résultats microscopiques, les conditions expérimentales semblent mal choisies. En effet les cellules s'étalent trop et trop vite (encore plus vite en ce qui concerne les U87 α 5+ qui sur-expriment intégrine), la membrane est mal résolue. De l'utilisation de cilengitide ou de notre sonde NR-PEG-RGD entraine (ou peut entrainer dans le cas de la sonde) des changements de morphologie trop importantes de la cellule, ce qui peut fausser les résultats obtenus. L'utilisation d'une lignée qui sur-exprime des récepteurs marqués par un autre fluorophore (comme BFP ou GFP compatible avec Nile Red) permettrait de s'assurer de la localisation de la sonde à proximité du récepteur, ou plus vraisemblablement de voir quelle proportion de sonde est liée au récepteur. Cela nous permettrait aussi de déterminer si les observations faites avec les images Fig. 45B et 47B sont vraiment dûes à la localisation à proximité d'un récepteur de la sonde ou tout simplement artéfactuelles. De plus, les concentrations de sondes utilisées devraient être réduites, de cette façon elles correspondraient à la concentration de récepteurs intégrines présents à la surface de la cellule. Par conséquent, de plus amples expériences sont requises avant de pouvoir statuer sur la sonde et sur l'environnement lipidique entourant les récepteurs.

3. De nouvelles sondes membranaires bleues et rouge lointain

3.1. Sondes membranaires fluorogènes bleues basées sur le fluorophore 3-méthoxychromone

Les sondes membranaires émettant dans le bleu pour l'imagerie cellulaire sont rarement utilisées et peu développées. La forte auto-fluorescence des cellules dans ces longueurs d'ondes en font des candidates passables. Malgré tout, les images multi-couleurs nécessitent l'utilisation de ces sondes bleues comme les marqueurs nucléaires omniprésents DAPI et Hoechst, qui peuvent être parfaitement utilisés en parallèle aux marqueurs verts et rouges (sondes ou protéines fluorescentes) utilisés couramment pour ce type d'expérience. La membrane plasmique cellulaire est une cible de choix pour l'imagerie mais les sondes émettant dans la gamme de longueur d'onde 400 et 500 nm sont manquantes à ce jour. Des travaux antérieurs ont montré que la sonde 3-hydroxaflavone F2N12S portant une chaîne

alkyl et un groupe zwitterionique est capable de se lier spécifiquement sur le feuillet externe des membranes cellulaires. Ces sondes ont permis de suivre les changements d'ordre lipidique lors de l'apoptose ainsi que lors d'extraction de cholestérol (Oncul et al., 2010b; Shynkar et al., 2007).

Les nouveaux analogues de F2N12S synthétisés préalablement, censés s'orienter verticalement dans les membranes lipidiques, ont été caractérisés avec des membranes modèles ainsi que sur des cellules. Ils ont démontré des propriétés supérieures à la sonde parent (Darwich et al., 2013b). L'attention a ensuite été portée sur les sondes 3-méthoxyflavones de par leur unique bande d'émission très sensible aux solvants ainsi que pour meilleure brillance et photostabilité comparée à leurs parents analogues des 3-hydroxyflavone (Kucherak et al., 2012).

Deux nouvelles sondes ont été développées (Fig. 49A) à partir des fluorophore 3-hydroxyflavone (pour le parent F2N12S) et à partir de 3-hydroxychromone (pour le parent FC12S). F2N12SM a été conçu simplement en méthylant la fonction –OH du fluorophore de la sonde parent F2N12S à l'aide de CH₃I. FC12SM a été réalisé selon le même modèle que F2N12S mais en utilisant cette fois le dérivé 3-hydroxychromone et, une fois cet intermédiaire obtenu, la même réaction de méthylation du groupement –OH du fluorophore, que pour F2N12S, a été réalisée. Ces deux nouvelles sondes ont alors été caractérisées par spectroscopie et microscopie de fluorescence. Dans un premier temps, nous avons vérifié leurs comportements sur des membranes modèles, des liposomes de différentes compositions lipidiques faisant ainsi varier l'ordre lipidique des membranes. Une bonne sensibilité à la composition lipidique était attendue, mais étonnement celle-ci est plutôt faible ce qui nous empêche de nous en servir pour monitorer l'ordre lipidique des membranes cellulaires, ce à quoi nous destinions originalement ces sondes. D'un autre côté, les nouvelles sondes montrent une bien meilleure photostabilité, lorsqu'elles sont liées à des membranes lipidiques, que leur parent F2N12S.

De plus, nous avons réalisé de la microscopie de fluorescence de ces sondes afin de voir leurs comportements sur des cellules vivantes. Ces sondes, que nous avons développées, sont très brillantes (~5 fois plus brillantes que le parent F2N12S) et restent un temps conséquent, ancrées au niveau de la membrane cellulaire. De plus, ces sondes

montrent une absorption et une émission dans la région bleue du spectre visible ce qui les rendent complémentaires des marqueurs fluorescents courants verts et rouges. Il est pour le moment possible d'utiliser ces sondes simultanément avec les marqueurs LysoTracker vert et mCherry (Fig. 49B). Les détails de ce travail sont présentés dans le manuscrit ci-dessous, qui sera accepté dans RSC Advances après une révision mineure.

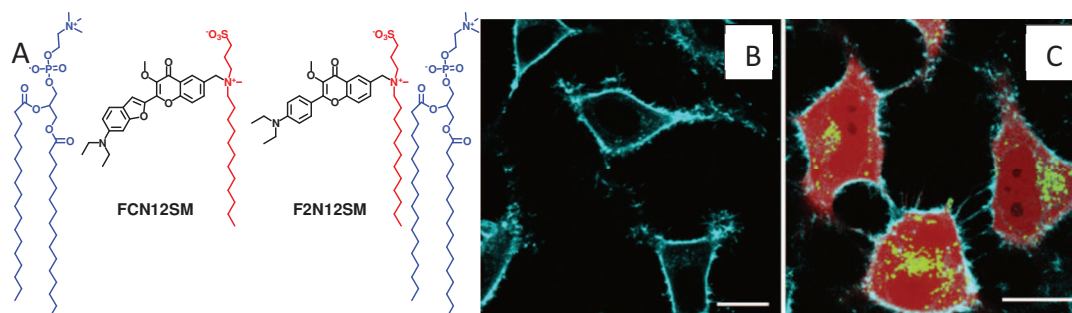


Figure 49 : (A) Structure des nouvelles sondes FCN12SM et F2N12SM. (B) Image confocale de cellules HeLa marquées par FCN12SM. (C) Image confocale multicolore utilisant F2N12SM (bleu), LysoTracker (vert) et mCherry (rouge). Les cellules HeLa ont été transfectées par un plasmide mCherry. Les longueurs d'excitation/émission sont : 405/450-500 nm (bleu) ; 488/505-550 nm (vert) et 561/580-670 nm (rouge).

Quantification de la surface de la membrane cellulaire basée sur du FRET :

Comme ces nouvelles sondes se lient spécifiquement à la membrane cellulaire, et similairement à F2N12S, elles sont probablement localisées uniquement au niveau du feuillet externe, elles peuvent donc être utiles comme donneur FRET pour la quantification de la surface de lipide dans la membrane. En effet, combinées à l'accepteur FRET NR12S, qui se lie aussi exclusivement au feuillet externe, nous espérons que le signal FRET corrèle directement avec la surface de la membrane plasmique. Nous avons testé cette hypothèse dans un premier temps sur des vésicules lipidiques avec une concentration en lipide variable mais constante pour NR12S et F2N12SM (20 nM chacune). Le ratio d'intensité de fluorescence du donneur à l'accepteur corrèle bien avec la concentration absolue en lipides dans la suspension de LUVs aussi bien pour DOPC que le mélange DOPC/cholestérol (Fig. 50). Remarquablement, l'efficacité du FRET, calculée à l'intensité du donneur, devient ~50% à une concentration en lipides ~10 μ M, par exemple au ratio de lipide/sonde accepteur 500.

En prenant en compte que seul le feuillet externe est occupé, la condition de FRET $\sim 50\%$ a été atteinte à un ratio lipide/sonde de 250/1. En utilisant la valeur de $0,72 \text{ nm}^2$ de surface par lipide de DOPC (Kucerka et al., 2005), la surface moyenne prise par un accepteur entouré de 250 lipides est alors de 180 nm^2 , ce qui correspond à un rayon de cercle de $7,6 \text{ nm}$. Cette valeur devrait correspondre à la distance moyenne entre donneur et accepteur. Cependant le modèle FRET est plus compliqué que cela car un donneur est entouré par de multiples accepteurs, donc la distance effective donneur-accepteur est $< 7,6 \text{ nm}$. Plus important, cette estimation correspond bien au rayon de Forster calculé précédemment pour la même paire de fluorophores dans un environnement huileux ($7,0 \text{ nm}$) (Klymchenko et al., 2012).

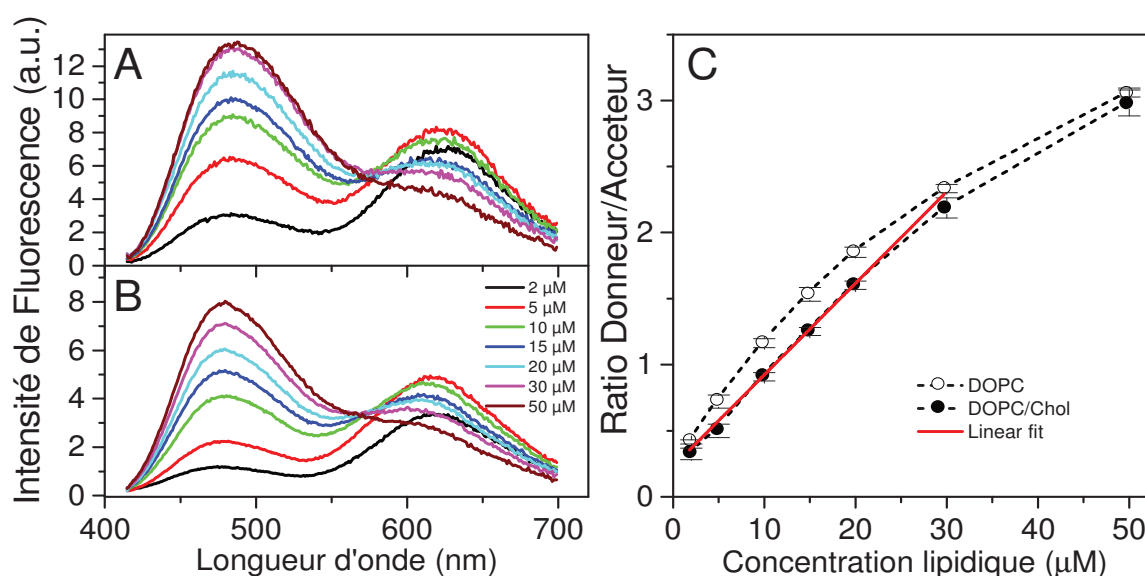


Figure 50 : FRET entre F2N12SM et NR12S dans une suspension de vésicules. Spectres de fluorescence des fluorophores dans des LUVs à différentes concentrations en lipide : (A) DOPC et (B) DOPC avec 45 % molaire de cholestérol (chol). (C) Courbe de calibration du ratio d'intensité donneur/accepteur en fonction de la concentration en lipide. L'ajustement de courbe (fit) linéaire est montré uniquement pour le mélange DOPC/cholestérol. La concentration en sonde est de 20 nM pour chaque. La longueur d'onde d'excitation est 400 nm .

En utilisant le même protocole, nous avons réalisé des expériences FRET dans des suspensions cellulaires. Le couple de sondes (20 nM chacune) a été ajouté à suspension de cellules HeLa et de lymphocytes (CEM-SS) à différentes concentrations. Remarquablement,

la double émission observée montre de fortes variations. Le ratio d'intensité de fluorescence donneur/accepteur augmente en même temps que la concentration en cellules (Fig. 51A et 51B). La dépendance est proche de la linéarité entre 10^5 et 10^6 cellules/mL pour chacun des types cellulaires, mais la valeur absolue du ratio est plus haute pour les cellules HeLa (Fig. 51C). Pour estimer la concentration lipidique dans la membrane plasmique de cellules, nous avons utilisé une courbe de calibration obtenue à l'aide des membranes modèles composées de DOPC avec du cholestérol (Fig. 50C), où le spectre d'émission du donneur était très proche de celui dans les cellules HeLa. L'estimation fait pour 10^6 cellules/mL donne 45 et 19 μM de lipides pour les cellules HeLa et CEM-SS respectivement. De plus, le nombre de lipides par cellule est de $2,7 \times 10^{10}$ et $1,1 \times 10^{10}$ pour les cellules HeLa et CEM-SS respectivement. Ces différences dans le nombre de lipides peuvent être liées à la taille plus importante des cellules HeLa comparées aux CEM-SS. En utilisant le nombre de lipides par cellule, obtenu par l'intermédiaire de nos mesures FRET, et en prenant l'aire par lipide à $0,7 \text{ nm}^2$, la valeur estimée de la surface occupée par les lipides dans une cellule est de 19000 et $7700 \mu\text{m}^2$ pour les cellules HeLa et CEM-SS respectivement. Puis, par microscopie confocale de ces cellules (marquées par NR12S 40 nM), nous avons estimé le diamètre des cellules ; $17,3 \pm 1,5 \mu\text{m}$ ($n=20$) pour les cellules HeLa et $14,1 \pm 1,3 \mu\text{m}$ ($n=58$) pour les cellules CEM-SS, ce qui nous donne une surface couverte par les lipides de 940 et $630 \mu\text{m}^2$ respectivement. Les données obtenues par les méthodes de fluorescence sont de ~ 20 et ~ 10 fois, respectivement, supérieures aux valeurs théoriques. Il existe différentes raisons qui peuvent expliquer ces différences. Tout d'abord notre méthode se base sur un marquage complet et homogène de la membrane lipidique. Bien que ce soit le cas pour les membranes modèles d'après les mesures de rendement quantique et les données de titration, il est impossible d'écarter que le marquage des cellules ne soit pas complet, ce qui induit une diminution de l'efficacité du FRET et par la même induit une surestimation les valeurs de concentrations lipidiques. Nous ne pouvons toutefois pas exclure que la présence de traces de sérum provenant du milieu puisse lier nos sondes, ce qui provoquerait là aussi une diminution de l'efficacité de liaison à la membrane cellulaire, conduisant ainsi à la même surestimation de la quantité de lipides. D'un autre côté, notre considération géométrique de la surface lipidique est basée sur le fait que la membrane plasmique est parfaitement plane. Or les membrane de cellules vivantes sont loin d'être plates : nombreuses protubérances et invaginations, ce qui conduit à une surface de la membrane plasmique plus importante que celle estimée théoriquement de la

taille des cellules. Il nous est donc nécessaire de déterminer avec plus d'exactitude la réelle concentration en lipides d'une cellule par d'autres techniques analytiques (spectrométrie de masse par exemple) afin de valider ou non le principe de cette méthode.

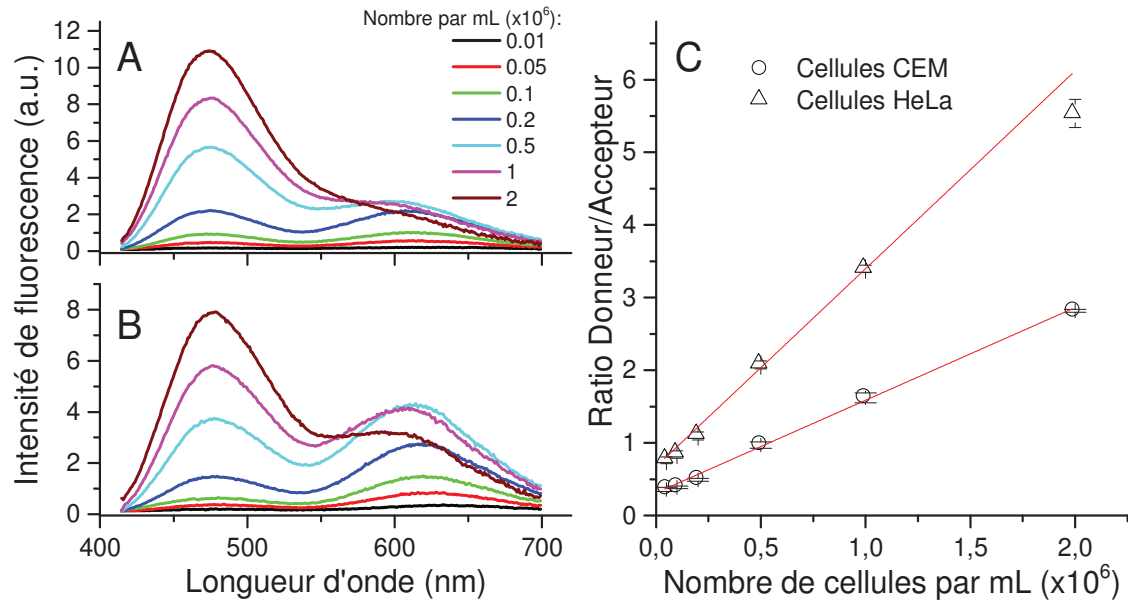


Figure 51 : FRET entre F2N12SM et NR12S dans une suspension, de cellules HeLa (A) et de cellules CEM-SS (B) de concentration variable. (C) Estimation du total de surface lipidique : utilisation d'une courbe de calibration dans les vésicules lipidiques. Concentration en sonde égale à 20 nM. La longueur d'onde d'excitation est 400 nm.

BLUE FLUOROGENIC PROBES FOR CELL PLASMA MEMBRANES FILL THE GAP IN MULTICOLOUR IMAGING

Rémy Kreder,¹ Sule Oncul,^{1,2} Oleksandr A. Kucherak,¹ Kyrylo A. Pyrshev,^{1,3} Eleonore Real,¹ Yves Mély,¹ Andrey S. Klymchenko^{1*}

¹ Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie UMR 7213 CNRS/Université de Strasbourg, Illkirch, France.

² Istanbul Medeniyet University, School of Medicine, Department of Biophysics, Istanbul, Turkey.

³ Laboratory of Nanobiotechnologies, Department of Molecular immunology, Palladin Institute of biochemistry of NASU, Kiev, 01601, Ukraine.

* Corresponding author. E-mail: andrey.klymchenko@unistra.fr

Abstract

Blue fluorescent probes for cellular imaging are poorly developed and rarely used because of strong cell auto-fluorescence at these wavelengths. However, multi-colour imaging needs blue probes, such as ubiquitous nucleus markers DAPI and Hoechst, because they can be readily combined with common green and red markers based on dyes and fluorescent proteins. Cell plasma membrane is an important target for imaging, but membrane probes that absorb and emit light between 400 and 500 nm are missing. Here, using 3-methoxychromone dyes we designed two blue membrane probes exhibiting >100-fold fluorescence turn-on (fluorogenic response) on membrane binding, large Stokes shift (70-90 nm) as well as high brightness and photostability. These unique properties enabled cellular imaging at low probe concentrations (20-50 nM) with minimal background from cell auto-fluorescence and from free probe. RGB multicolour imaging was successfully realized using these probes in combination with common green and red markers. As the new probes enable high-quality imaging of cell plasma membranes in the poorly explored blue spectral region, they may become popular tools that fill the gap in multi-colour microscopy.

1. Introduction

Recent years have seen a tremendous expansion of fluorescence techniques and tools for cellular research. In addition to genetically encoded fluorescence proteins, a number of molecular probes for monitoring cellular life have been developed.¹⁻⁴ Notably, membrane probes underwent rapid development during the last years.⁵⁻⁸ The first reason is that plasma membrane plays a key role in cell functions and it is the first barrier that molecules and ions need to cross to enter the cells. Secondly, fluorescent probes able to concentrate within the confined space of lipid plasma membrane, permit not only to clearly delimit the cell surface, but also to characterize its biophysical properties and monitor cell internalization of molecules.^{5, 9-13} Finally, the hypothesis of lipid rafts formed by sphingomyelin/cholesterol rich domains¹⁴ stimulated chemists to develop appropriate imaging tools.^{6, 15-17} Nevertheless, the performance of membrane probes is limited, so that biologists generally use membrane proteins bearing fluorescent protein tags or fluorescently labelled membrane binding-proteins, such as wheat germ agglutinin (WGA).¹⁸ Among the existing molecular membrane probes, two large families, namely fluorescently labelled lipids and specially designed probes, should be mentioned. Labelled lipids are ideal for model membranes, but their use for living cells requires special lipid delivery systems, such as cyclodextrins.¹⁹ The second class is based on specially designed fluorescent probes, which can spontaneously stain lipid membranes without using delivery agents.^{5-7, 11-13, 15} To achieve specific staining of cell plasma membranes with minimal internalization, fluorescent dyes are usually modified with a polar head group, as it was done for FM4-64,²⁰ TMA-DPH,²¹ di-4-ANEPPDHQ,²² C-Laurdan,²³ Mem-SQAC,²⁴ push-pull glycoconjugates,¹² and oligothiophene amphiphiles¹¹. We should also mention F2N12S²⁵ and NR12S,¹³ bearing an amphiphilic anchor group that enables specific staining of the outer membrane leaflet with minimal internalization and flip-flop between the leaflets.¹³ However, the membrane probes developed so far, being highly useful for studying biomembranes,⁵ overlap with the 500 to 650 nm spectral window of common molecular probes and fluorescent proteins,²⁶ which limit their applications for multi-colour imaging. Exceptions are TMA-DPH and C-Laurdan and their analogues, but these probes require ultraviolet excitation (~360 nm), which is harmful for the cells. Therefore, there is a strong need for powerful blue probes for cell plasma membranes, which, similarly to DAPI and Hoechst, the blue stains of nucleus, could become ubiquitous cell imaging tools. These blue probes should be excitable by violet light (~400 nm), emit efficiently around 450-500 nm and exhibit large Stokes shift in order to minimize the contribution of cell auto-fluorescence, commonly observed in the blue spectral region. Moreover, they should be fluorogenic, i.e. non-fluorescent in water but highly fluorescent in lipid membranes, which would enable imaging without background noise from the non-bound probes.^{27, 28} As prospective building blocks for preparation of blue membrane probes, we considered 3-methoxychromones, because they were recently shown to be bright and photostable, and to exhibit large Stokes shift and fluorogenic response to solvent polarity.²⁹

In the present work using 3-methoxychromone dyes, we developed the first high-performance blue membrane probes, characterized by high brightness and photostability as well as by suitable absorption and emission wavelengths, allowing their combination with green and red markers. We showed that these probes could be used at concentrations as low as 20-50 nM and that their high brightness, large Stokes shift and efficient membrane binding with fluorogenic response provided excellent signal-to-noise ratio in cellular imaging.

2. Experimental

2.1. Synthesis of probes

All chemicals and solvents for synthesis were from Sigma-Aldrich. Synthesis of F2N12S was described elsewhere.²⁵

2-(6-(diethylamino)benzofuran-2-yl)-3-hydroxy-6-(methoxymethyl)-4H-chromen-4-one (1). 6-(Diethylamino)benzofuran-2-carbaldehyde³⁰ (1eq., 1 g) and 5-chloromethyl-2-hydroxyacetophenone³¹ (1eq., 0.85 g) were dissolved in 10 mL of cold DMF (ice bath) and then treated with 0.5 g sodium methoxide (4eq., 1 g). The obtained mixture was stirred for 24 h to give dark red chalcone, which was used in the next step without isolation. This mixture was then diluted with 40 mL of ethanol followed by addition of sodium methoxide (12eq., 1.5 g) and hydrogen peroxide (10eq., 2.3 mL). The mixture was shaken intensively and heated gently to reflux. Within 5 min, the dark red solution turned orange. Then, the solution was rapidly cooled to room temperature (RT) and poured into water. The product was then extracted with dichloromethane. The solvent was removed under vacuum and the crude product was purified by column chromatography with dichloromethane/MeOH (95/5) as an eluent. Yellow powder, yield 19%. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.20 (s, 1H), 7.75 – 7.63 (m, 3H), 7.50 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.78 (dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 1H), 4.59 (s, 1H), 3.53 – 3.43 (m, 7H), 1.26 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H). HR-LC-MS: (m/z) C₂₃H₂₃NO₅ Calc. 393.1576, found 393.1592.

6-(bromomethyl)-2-(6-(diethylamino)benzofuran-2-yl)-3-hydroxy-4H-chromen-4-one (2). 2-(6-(diethylamino)benzofuran-2-yl)-3-hydroxy-6-(methoxymethyl)-4H-chromen-4-one (1) (1 eq., 260 mg) was dissolved in a hydrobromic acid solution (48%) (5 mL) and the mixture was heated for 10 min at 100°C. The reaction was then cool down to RT and neutralized with a solution of NaOH (50%) (2 mL). The obtained brown orange precipitate was filtrated and washed with 15 mL of heptane. The product was dried and used directly without further purification. Brown red powder, yield 85%. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.27 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.78 – 7.73 (m, 1H), 7.67 (d, *J* = 11.2 Hz, 2H), 7.50 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.81 – 6.76 (m, 1H), 4.63 (s, 2H), 3.48 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H), 1.26 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H). HR-LC-MS: (m/z) C₂₂H₂₀BrNO₄ Calc. 441.0576, found 441.0582.

2-(6-(diethylamino)benzofuran-2-yl)-6-((dodecyl(methyl)amino)methyl)-3-hydroxy-4H-chromen-4-one (3). 6-(bromomethyl)-2-(6-(diethylamino)benzofuran-2-yl)-3-hydroxy-4H-chromen-4-one (2) (1 eq., 150 mg) was dissolved in THF (10 mL) and then N-methyldodecylamine (2.5 eq., 210 μ L) was added upon stirring. After 2h of stirring, the mixture was analysed by TLC, showing full conversion. The crude product was then dried under vacuum and purified by column chromatography with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95/5) as eluent. Brown orange oil, yield 25%. ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.03 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.67 (dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, 1H), 7.55 (t, $J = 4.4$ Hz, 2H), 7.40 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.68 (dd, $J = 8.7, 2.2$ Hz, 1H), 3.51 (s, 2H), 3.38 (q, $J = 7.0$ Hz, 5H), 2.32 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 2.13 (s, 3H), 1.45 (p, $J = 7.7, 6.9$ Hz, 2H), 1.17 (q, $J = 6.7$ Hz, 34H), 0.84 – 0.73 (m, 6H). HR-LC-MS: (m/z) $\text{C}_{35}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_4$ Calc. 560.3614, found 560.3632.

3-(((2-(6-(diethylamino)benzofuran-2-yl)-3-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-6-yl)methyl)(dodecyl)-(methyl)ammonio)propane-1-sulfonate (4). 2-(6-(diethylamino)benzofuran-2-yl)-6-((dodecyl(methyl)amino)methyl)-3-hydroxy-4H-chromen-4-one (3) (1 eq, 50 mg) was dissolved in CH_3CN (5 mL) and then 1,3-propanesultone (3 eq, 23 μ L) was added. The mixture was heated to reflux for 24h. The solvent was then removed under vacuum and the crude product was solved in CH_2Cl_2 and washed with a brine solution 3 times. It was used without further purification directly into the next step. Dark orange oil, yield 33%.

3-(((2-(6-(diethylamino)benzofuran-2-yl)-3-methoxy-4-oxo-4H-chromen-6-yl)methyl)(dodecyl)-(methyl)ammonio)propane-1-sulfonate (5). 3-(((2-(6-(diethylamino)benzofuran-2-yl)-3-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-6-yl)methyl)(dodecyl)(methyl)ammonio)propane-1-sulfonate (4) (1 eq.; 15 mg) was firstly dissolved into MeOH (5 mL), then K_2CO_3 (4 eq., 12 mg) and CH_3I (10 eq., 31.92 mg) were added to the mixture. The reaction was stirred overnight at RT. After one night, 5 eq of K_2CO_3 (15mg) and a large excess of CH_3I (1.14 g) were added to the mixture. After a few hours, solvent was removed under vacuum and the crude product was purified by preparative TLC using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (8/2) as eluent. Yellow orange powder, yield 85%. ^1H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.26 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.86 (dd, $J = 8.6, 2.2$ Hz, 1H), 7.74 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.44 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.76 (d, $J = 9.5$ Hz, 2H), 4.61 (s, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.47 – 3.37 (m, 8H), 2.95 (s, 3H), 2.81 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.46 – 1.37 (m, 2H), 1.34 – 1.11 (m, 20H), 0.87 – 0.76 (m, 9H). HR-LC-MS: (M+H⁺) $\text{C}_{39}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$ Calc. 696.3808, found 696.3793.

3-(((2-(4-(diethylamino)phenyl)-3-methoxy-4-oxo-4H-chromen-6-yl)methyl)(dodecyl)(methyl)-ammonio)propane-1-sulfonate (F2N12SM). F2N12S (1 eq, 15 mg) was first dissolved into MeOH (5 mL), and then K_2CO_3 (2 eq., 10 mg) and CH_3I (10 eq., 15 μ L) were added to the mixture. The reaction was stirred for two days at RT. The solvent was then removed under vacuum and the crude product was purified by preparative TLC using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9/1) as eluent. Yellow orange powder, yield 80%. ^1H NMR (400 MHz,

Chloroform-*d*) δ 8.16 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8.02 (dd, $J = 8.7, 2.2$ Hz, 1H), 7.96 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.50 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.64 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 4.85 (d, $J = 13.1$ Hz, 1H), 4.71 (d, $J = 13.1$ Hz, 1H), 3.83 – 3.71 (m, 5H), 3.37 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 3.10 – 2.93 (m, 6H), 2.58 – 2.28 (m, 5H), 1.84 (s, 1H), 1.71 (s, 1H), 1.30 – 1.07 (m, 24H), 0.78 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H). HR-LC-MS: (M+H⁺) C₃₇H₅₆N₂O₆S Calc. 656.3859, found 656.3556.

2.2. Lipid Vesicles

Diioleoylphosphatidylcholine (DOPC) and cholesterol were purchased from Sigma-Aldrich. Bovine brain sphingomyelin (SM) was from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Large unilamellar vesicles (LUVs) were obtained by the extrusion method as previously described.³² Briefly, a suspension of multilamellar vesicles, prepared from the hydrated film of lipids, was extruded with the Lipex Biomembranes extruder (Vancouver, Canada). The size of the filters was first 0.2 μm (7 passages) and thereafter 0.1 μm (10 passages). This generates monodisperse LUVs with a mean diameter of 0.11 μm as measured with a Malvern Zetamaster 300 (Malvern, U.K.). LUVs were labelled by adding aliquots (generally 2 μL) of probe stock solutions in dimethyl sulfoxide to 1 mL solutions of vesicles. Since the probe binding kinetics is very rapid, the fluorescence experiments were performed a few minutes after addition of the aliquot. 20 mM phosphate buffer, pH 7.4, was used in these experiments. Concentrations of the probes and lipids were generally 0.4 and 200 μM , respectively, unless indicated.

2.3. Cell Lines, Culture Conditions, and Treatment

HeLa cells (ATCC) were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (D-MEM, Low glucose, +GlutaMAX, Gibco-Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Lonza), and 1% antibiotic solution (penicillin–streptomycin, Gibco-Invitrogen) in a humidified incubator with 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. Cells cultures passages were realized every 2-3 days.

In fluorescence spectroscopy experiments, HeLa cells were detached by trypsinization. DMEM medium was first removed from the culture dish, and cells were washed two times with DPBS. Trypsin 1x (LONZA) solution in DPBS was added to the cells and the cells were incubated at 37 °C for 4 min. The solution of trypsinized cells was then diluted by DPBS, transferred to Falcon tubes and centrifuged for 5 min. The washing procedure was repeated one more time with HBSS solution. To stain the cell suspension with the probes, an appropriate aliquot of their stock solution in DMSO was added to 0.5 mL of HBSS buffer, and after vortexing, the solution was immediately added to 0.5 mL of the cell suspension to obtain a final probe concentration of 40 nM (<0.25% DMSO) and a cell concentration of 5×10^5 - 10^6 cells/mL. It should be noted that only freshly prepared solutions of the probes in HBSS should be used (<1 min) for cell staining, because of the slow aggregation of the probe in water. Before measurements, the cell suspension with the probe was incubated for 7 min at RT in the dark.

For microscopy studies with the probes, attached HeLa cells were washed two times by gentle rinsing with HBSS. Then, a freshly prepared solution of F2N12S, F2N12SM or FC12SM in Opti-MEM (or HBSS) was added to the cells to a final probe concentration of 50 nM (<0.25% DMSO volume) and incubated for 7 min in the dark at RT. The obtained samples were imaged directly without washing.

For tri-colour fluorescence imaging, HeLa cells were transfected by a plasmid coding mCherry. 3.10^5 HeLa cells were seeded in 35 mm glass coverslips (μ -Dish IBIDI, Germany) in DMEM supplemented with 10% FBS and antibiotics (penicillin 100 UI/ml, streptomycin 100UI/ml) and kept at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Transfection was performed at 24 hours post-seeding with 1 μ g of pcDNA3.1 mCherry plasmid using jetPEI™ (PolyPlus transfection, France) according to supplier's recommendations. All observations were done between 16-24 hours post DNA transfection. To stain lysosomes in green, LysoTracker® Green DND-26 (Life technologies) was added to the cells at 50 nM final concentration and incubated for 30 min at 37°C. Then F2N12SM was added as described above.

2.4. Fluorescence Spectroscopy and Microscopy

Absorption spectra were recorded on a Cary 4 spectrophotometer (Varian) and fluorescence spectra on a Fluorolog (Jobin Yvon, Horiba) spectrofluorometer. Fluorescence emission spectra were systematically recorded at 410 nm excitation wavelength at room temperature, unless indicated. All spectra were corrected for the fluorescence of the corresponding blank (suspension of cells or lipid vesicles without the probe) and wavelength-dependent sensitivity of the detector. Fluorescence quantum yield were measured using 4'-(dimethylamino)-3-hydroxyflavone in methanol as a reference (27 %).³³

Confocal microscopy experiments were performed by using a Leica TCS SPE-II microscope with HXC PL APO 63x/1.40 OIL CS objective. The excitation was provided by 405 and 488 nm laser and the images were processed with the Image J software.

3. Results and discussion

3.1. Design and synthesis

F2N12SM is an analogue of F2N12S, where the 3-hydroxy group is methylated (Fig. 1). It was prepared by direct methylation of F2N12S with methyl iodide in acetonitrile (Fig. S1 in SI). To prepare FC12SM (Fig. 1), 6-(diethylamino)benzofuran-2-carbaldehyde³⁰ was condensed with 5-chloromethyl-2-hydroxyacetophenone³¹ in basic conditions and then oxidized in the presence of hydrogen peroxide into the corresponding 3-hydroxychromone derivative (Fig. S2 in SI). It was then reacted with N-methyl-dodecylamine and the obtained tertiary amine was quaternized with 1,3-propanesultone. The 3-hydroxy group of the chromone was then methylated to obtain the FC12SM probe. The final probes were purified

by thin layer chromatography and their structure was confirmed by NMR and mass spectrometry.

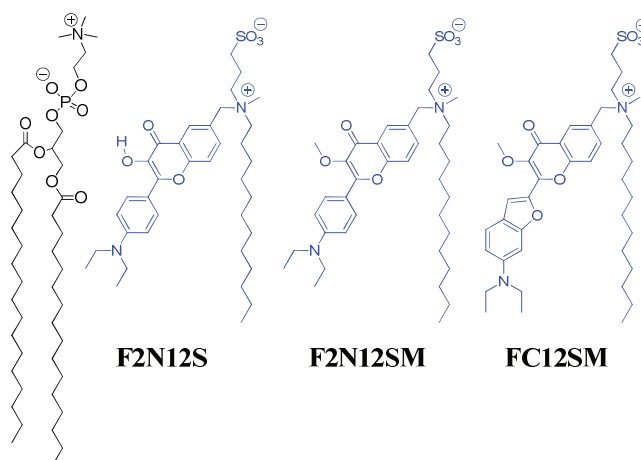


Fig. 1. Chemical structures of F2N12S and the new membrane probes, F2N12SM and FC12SM, and their hypothetical location with respect to a lipid (black) of the membrane bilayer.

3.2. Fluorescence spectroscopy in model membranes

F2N12SM and FC12SM showed very poor fluorescence intensity in aqueous media (QY < 0.5% for both probes), but they were highly emissive in organic solvents (Table 1). On addition of large unilamellar vesicles (LUVs), the fluorescence intensity of both probes grew rapidly with lipid concentration and reached stable values at lipid/probe ratios ≥ 125 (Fig. 2), indicating that above this probe/lipid ratio nearly all dye molecules were bound to lipids. These data indicate an efficient binding of the probes to lipid membranes. Remarkably, the fluorescence intensity increased >200-fold and the emission band shifted by 30 and 65 nm to the blue for F2N12SM and FC12SM, respectively (Fig. 2). The position of the emission band also stabilized at lipid/probe ratios ≥ 125 , confirming that optimal binding was achieved in these conditions. The obtained quantum yields in DOPC vesicles were 33 and 37%, for F2N12SM and FC12SM, respectively, which confirmed their efficient binding to the lipid vesicles. The fluorogenic response of F2N12SM and FC12SM to membrane binding can have two mechanisms. On one hand, their 3-methoxychromone moieties, owing to the charge transfer character, exhibit efficient quenching in polar media, particularly in water.²⁹ Therefore, the transfer of the probes from polar aqueous medium to apolar lipid membrane should drastically increase the fluorescence efficiency of the probes. On the other hand, our works on Nile Red-based probe NR12S¹³ and its analogue,³⁴ presenting similar structure, as well as other recent reports^{35, 36} suggest that membrane probes can be self-quenched due to aggregation in water and then disaggregate after binding to lipid membrane. We expect that

both environment-sensitivity and disaggregation of F2N12SM and FC12SM contribute to their remarkable fluorogenic character.

Table 1. Spectroscopic properties of F2N12SM and FC12SM in different media.^a

Probe	Medium	λ_{abs} , nm	λ_{fluo} , nm	QY, %
F2N12SM	Water	412	537	<0.5
	Acetone	398	501	61
	Dioxane	400	471	56
	DOPC LUVs	402	480	33
FC12SM	Water	445	621	<0.5
	Acetone	445	578	69
	Dioxane	449	536	51
	DOPC LUVs	450	544	37

^a λ_{abs} and λ_{fluo} are positions of the absorption and fluorescence maxima, respectively (nm); QY is fluorescence quantum yield (%).

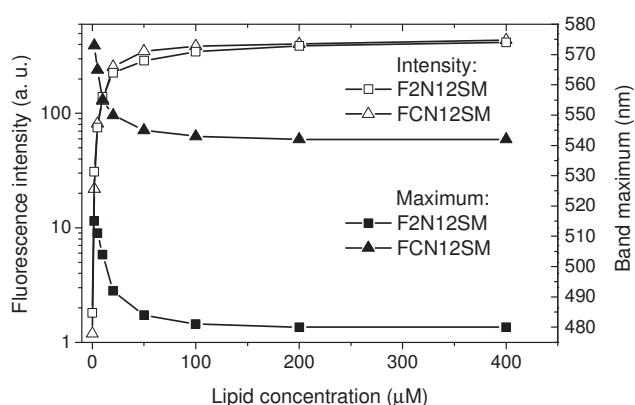


Fig. 2. Fluorescence intensity (open symbols) and emission maximum (filled symbols) of F2N12SM (squares) and FC12SM (triangles) in lipid vesicles (composed of DOPC) at different concentrations of lipids. Probe concentration was 0.4 μM , while the lipid concentration was varied.

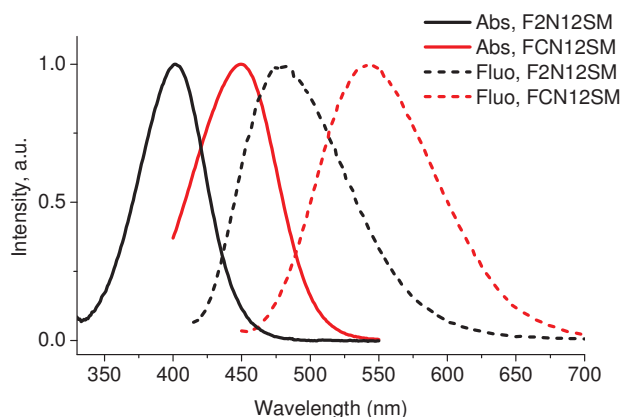


Fig. 3. Normalized absorption and fluorescence spectra of F2N12SM and FC12SM in lipid vesicles composed of DOPC. Probe and lipid concentrations were 0.4 and 200 μM , respectively.

In lipid vesicles composed of dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), F2N12SM and FC12SM showed an absorption maximum around 400 and 450 nm, respectively (Fig. 3). Thus, both probes were compatible with the 405 nm laser source, commonly used in fluorescence microscopy. Moreover, they exhibited a single emission band, centred at 480 and 544 nm (Fig. 3), confirming that methylation of the 3-hydroxy group prevented the formation of the tautomer form observed for F2N12S.²⁵ According to our earlier studies of the corresponding 3-methoxychromones in organic solvents,²⁹ these emission maxima indicate a relatively apolar environment similar to the one of ethyl acetate-dichloromethane (dielectric constant $\epsilon = 6-9$), suggesting the insertion of the fluorophores of both probes into apolar ester region of the lipid bilayer. In comparison with the commercially available blue dyes of the coumarin (aminomethylcoumarin acetate, AMCA) or pyrene (Cascade Blue) families, our probes exhibit significantly larger Stokes shifts, which are of key importance for minimizing contribution of the auto-fluorescence in microscopy applications. These large Stokes shifts originate from the dipolar nature of these chromone derivatives, which ensures significant solvent relaxation of the fluorophores.³⁷ As these dyes are solvatochromic, we checked their sensitivity to changes in the lipid composition. Surprisingly, the new dyes showed relatively small variation of their emission maximum for different lipid compositions corresponding to liquid crystalline (DOPC), liquid disordered (DOPC/cholesterol) and liquid ordered (sphingomyelin/cholesterol) phases (Fig. 4). This poor sensitivity to lipid composition is in clear contrast with F2N12S or other solvatochromic membrane probes based on Nile Red¹³ and Laurdan.^{23, 38} Nevertheless, this property is of interest for standard imaging and FRET applications, which require stable position of the emission maximum.

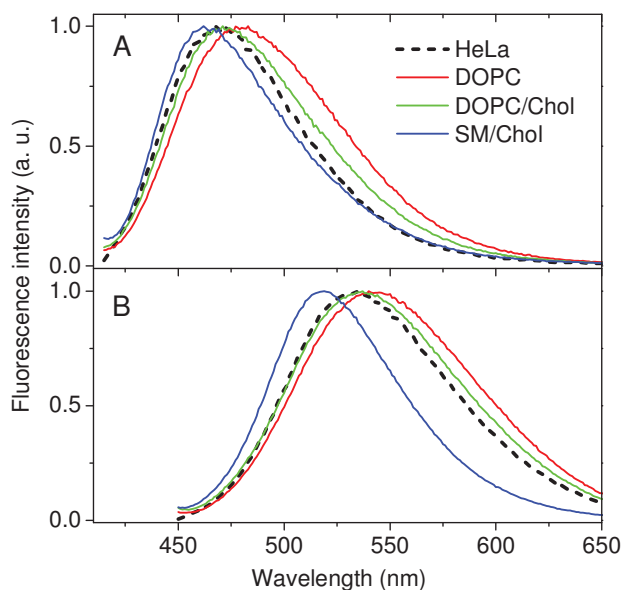


Fig. 4. Normalized fluorescence spectra of probe F2N12SM (A) and FC12SM (B) in vesicles of different lipid compositions and in HeLa cells. Probe concentrations were 0.4 μM and 20 nM in lipid vesicles and HeLa cells, respectively.

Then, we evaluated the photostability of the new probes bound to lipid membranes in comparison to their parent analogue F2N12S. After 1h of illumination (light flux of $\sim 1 \text{ mW/cm}^2$), the fluorescence decreased only by 16% and 14% for F2N12SM and FC12SM, respectively, whereas for F2N12S the corresponding fluorescence loss was as high as 88 % (Fig. 5). This strongly improved photostability is in agreement with our previous report on 3-methoxychromones in organic solvents²⁹ and is explained by the absence in these dyes of the excited state intramolecular proton transfer generating the less photostable tautomeric form.

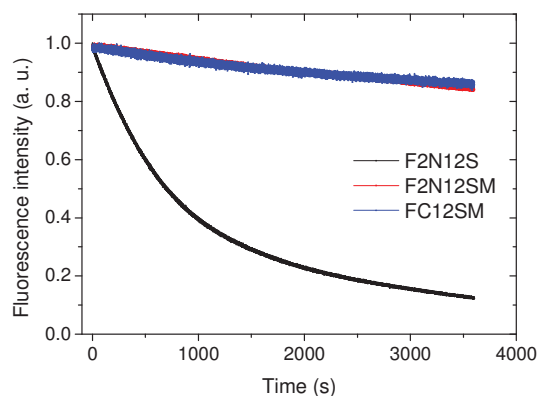


Fig. 5. Photostability of the new probes in DOPC vesicles compared to the parent F2N12S probe. Fluorescence emission at the corresponding emission maximum was recorded as a function of the illumination time. Excitation wavelength was 410 nm, where the extinction coefficient for both probes is close and the excitation light intensity was ~ 1 mW/cm². Probe and lipid concentrations were 0.4 and 200 μ M, respectively.

3.3. Application for cellular imaging

After addition to suspensions of HeLa cells, the new probes exhibited a single emission band similar to that observed in model membranes composed of DOPC/cholesterol mixture (Fig. 4). The fluorescence intensity and the band shape stabilized within <5 min. The new probes were then added to adherent HeLa cells and studied by confocal fluorescence microscopy. A clear membrane staining was observed for both new probes. They exhibited excellent fluorescence contrast even at low probe concentrations (50 nM), with a signal-to-background ratio of 15-20, while for our reference membrane probe F2N12S it was only 3-4 (Fig. 6B-D). Fluorescence imaging at different concentrations of probes revealed that already at 20 nM of F2N12SM we obtained high-quality images, in contrast to F2N12S that needed concentrations >100 nM (Fig. S4), in line with our earlier studies of F2N12S.²⁵ To the best of our knowledge, these are the first blue dyes that can be used at such low concentrations for cell membrane staining. Despite these low concentrations, the cell auto-fluorescence remained negligible, which is due to the efficient binding of the probes to cell plasma membranes as well as their high brightness ($\epsilon \times$ quantum yield $\sim 35000 \times 0.4$) and large Stokes shift allowing detection far from the excitation wavelength. Importantly, the blue emission region is very convenient, as biologists use extensively green and red emission channels with fluorescent proteins and organic dyes. Particularly interesting in this respect is F2N12SM, because its absorption maximum matches perfectly with the 405 nm laser excitation, while its emission does not overlap with the green channel. We evaluated the compatibility of this probe with markers representative of the most commonly used colours. The first one is LysoTracker® Green DND-26, which labels lysosomes and uses the same instrumental settings as fluorescein, AlexaFluor 488, and eGFP. The second one is mCherry, which stains

the cytoplasm and corresponds spectrally to common Rhodamine and Cyanine 3 dyes. From the obtained multi-colour images (Fig. 6 E-H), it can be seen that F2N12SM clearly stains the plasma membranes in the presence of the other markers (Fig. 6 E). Moreover, its fluorescence is not detectable in the green (Fig. 6F) and red (Fig. 6G) channels, indicating the absence of cross-talk between the channels. Thus, F2N12SM is perfectly compatible with both LysoTracker® Green DND-26 and mCherry, allowing RGB imaging. Therefore, this new probe could be used to stain the cellular contour with a complementary blue colour, similarly to Hoechst or DAPI used for staining nucleus.

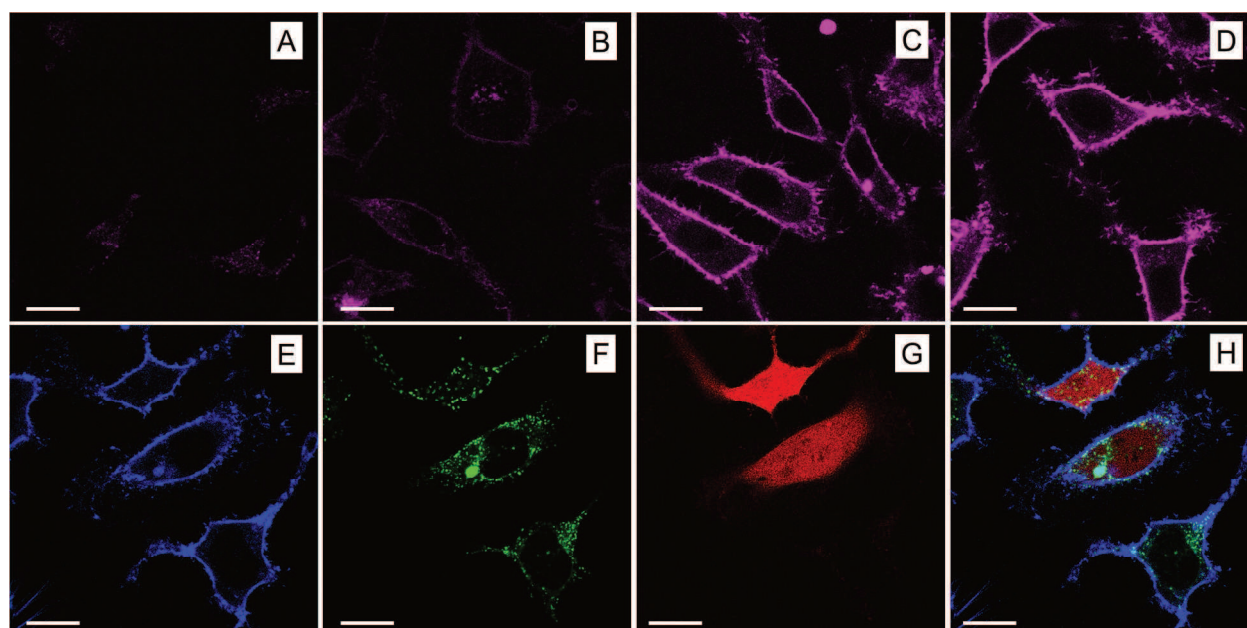


Fig. 6. Fluorescence confocal images of HeLa cells without probes (A) and stained with F2N12S (B), F2N12SM (C) or FC12SM (D) at 50 nM concentrations. Excitation wavelength was 405 nm; emission was detected between 450 and 550 nm (A-C) or between 460-610 nm (D). (E-H) Multicolour confocal imaging using F2N12SM (blue, E), LysoTracker® Green DND-26 (green, F) and mCherry (red, G) and merge of the three images (H). Excitation/emission wavelengths were: 405/450-500 nm (E); 488/505-550 nm (F) and 561/580-670 nm (G). HeLa cells were transfected with the mCherry plasmid, so that only some fraction of the cells expressed this protein. Opti-MEM buffer was used. Scale bar is 20 μ m.

In conclusion, we describe fluorescent membrane probes with convenient absorption in a blue region allowing their combination with common green and red cellular markers for multicolor imaging. To overcome the problem of auto-fluorescence common for blue dyes, our probes were developed with several key features. Firstly, these probes are fluorogenic, so that they turn-on their fluorescence >100-fold after nearly quantitative binding to the lipid membranes. Secondly, they exhibit high brightness and large Stokes shift, which enables their use at low concentrations (20 nM), applying a simple staining protocol. We

expect that these new probes may become as common for multicolour cellular staining as blue nucleus staining dye Hoechst or DAPI.

Acknowledgments

This work was supported by ANR JCJC (ANR-11-JS07-014-01), CNRS, and the University of Strasbourg. We warmly thank Pascale Buisine, Dr. Justine Viéville and Patrick Wehrung from the Service de Chimie Analytique (SCA) for LC-MS and RMN analyses.

References

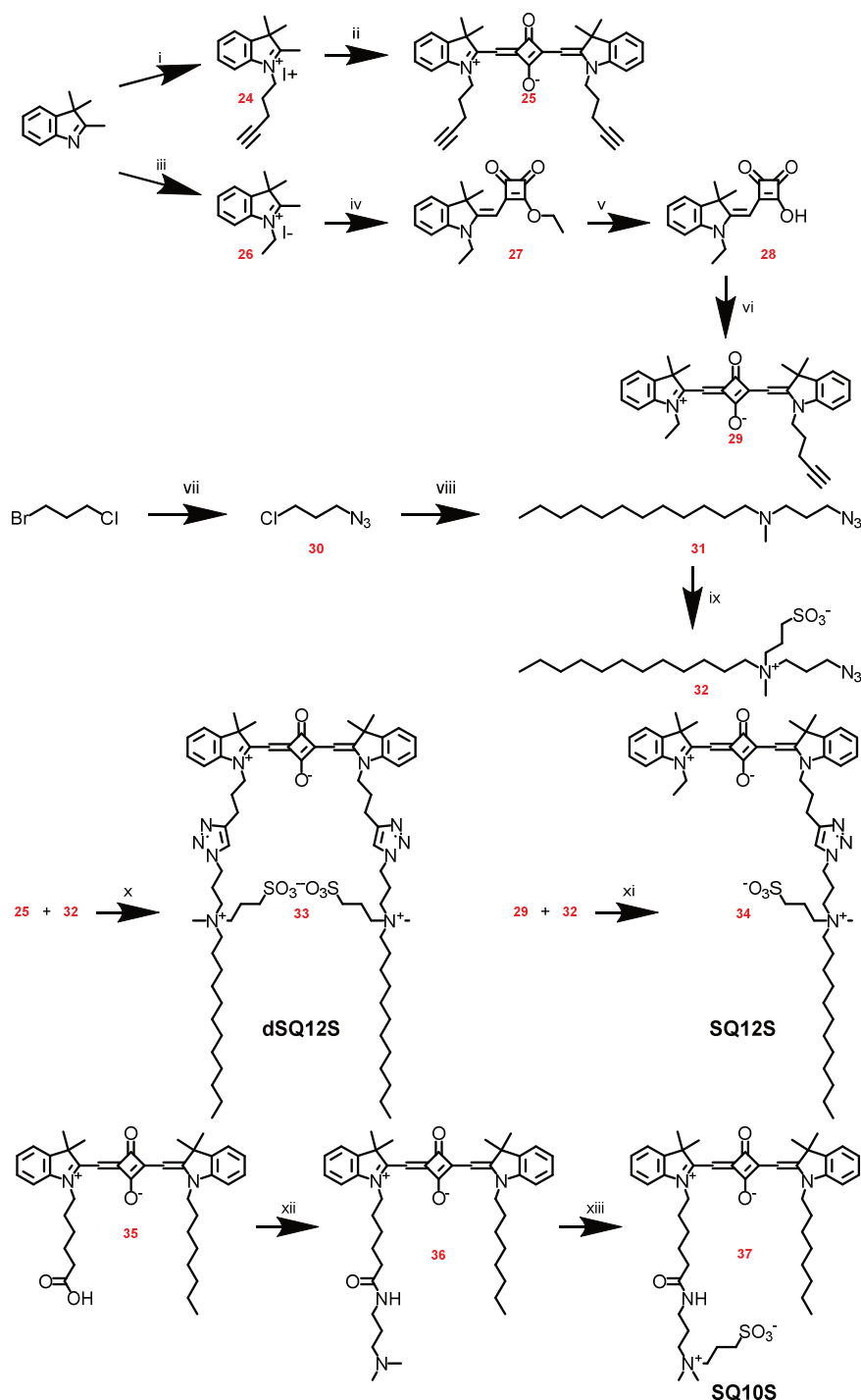
1. L. D. Lavis and R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.*, 2008, **3**, 142-155.
2. B. N. G. Giepmans, S. R. Adams, M. H. Ellisman and R. Y. Tsien, *Science*, 2006, **312**, 217-224.
3. M. Fernández-Suárez and A. Y. Ting, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2008, **9**, 929-943.
4. H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke and Y. Urano, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 2620-2640.
5. A. P. Demchenko, Y. Mély, G. Duportail and A. S. Klymchenko, *Biophys. J.*, 2009, **96**, 3461-3470.
6. A. S. Klymchenko and R. Kreder, *Chem. Biol.*, 2014, **21**, 97-113.
7. C. W. Cairo, J. A. Key and C. M. Sadek, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2010, **14**, 57-63.
8. L. M. S. Loura and J. P. P. Ramalho, *Molecules*, 2011, **16**, 5437-5452.
9. Z. Darwich, A. S. Klymchenko, D. Dujardin and Y. Mély, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 8481-8488.
10. D. A. Doval, A. Fin, M. Takahashi-Umebayashi, H. Riezman, A. Roux, N. Sakai and S. Matile, *Org. Biomol. Chem.*, 2012, **10**, 6087-6093.
11. A. Fin, A. Vargas Jentzsch, N. Sakai and S. Matile, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, **51**, 12736-12739.
12. S. Redon, J. Massin, S. Pouvreau, E. De Meulenaere, K. Clays, Y. Queneau, C. Andraud, A. Girard-Egrot, Y. Bretonnière and S. Chambert, *Bioconjug. Chem.*, 2014, **25**, 773-787.
13. O. A. Kucherak, S. Oncul, Z. Darwich, D. A. Yushchenko, Y. Arntz, P. Didier, Y. Mély and A. S. Klymchenko, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 4907-4916.
14. D. Lingwood and K. Simons, *Science*, 2010, **327**, 46-50.
15. H. Mizuno, M. Abe, P. Dedecker, A. Makino, S. Rocha, Y. Ohno-Iwashita, J. Hofkens, T. Kobayashi and A. Miyawaki, *Chem. Sci.*, 2011, **2**, 1548-1553.
16. E. Sezgin, I. Levental, M. Grzybek, G. Schwarzmann, V. Mueller, A. Honigmann, V. N. Belov, C. Eggeling, Ü. Coskun, K. Simons and P. Schwille, *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, **1818**, 1777-1784.
17. L. A. Bagatolli, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, **1758**, 1541-1556.
18. M. A. Model, J. L. Reese and G. C. Fraizer, *Cytometry Part A*, 2009, **75**, 874-881.
19. J. E. González and R. Y. Tsien, *Chem. Biol.*, 1997, **4**, 269-277.
20. S. Bolte, C. Talbot, Y. Boutte, O. Catrice, N. D. Read and B. Satiat-Jeunemaitre, *J. Microsc.*, 2004, **214**, 159-173.
21. J. G. Kuhry, P. Fonteneau, G. Duportail, C. Maechling and G. Laustriat, *Cell Biophys.*, 1983, **5**, 129-140.
22. L. Jin, A. C. Millard, J. P. Wuskell, X. Dong, D. Wu, H. A. Clark and L. M. Loew, *Biophys. J.*, 2006, **90**, 2563-2575.
23. H. M. Kim, H. J. Choo, S. Y. Jung, Y. G. Ko, W. H. Park, S. J. Jeon, C. H. Kim, T. Joo and B. R. Cho, *ChemBioChem*, 2007, **8**, 553-559.

24. X. Zhang, C. Wang, L. Jin, Z. Han and Y. Xiao, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, **6**, 12372-12379.
25. V. V. Shynkar, A. S. Klymchenko, C. Kunzelmann, G. Duportail, C. D. Muller, A. P. Demchenko, J. M. Freyssinet and Y. Mely, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 2187-2193.
26. N. C. Shaner, R. E. Campbell, P. A. Steinbach, B. N. G. Giepmans, A. E. Palmer and R. Y. Tsien, *Nat. Biotechnol.*, 2004, **22**, 1567-1572.
27. X. Li, X. Gao, W. Shi and H. Ma, *Chem. Rev.*, 2014, **114**, 590-659.
28. A. Nadler and C. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, **52**, 2408-2410.
29. O. A. Kucherak, L. Richert, Y. Mély and A. S. Klymchenko, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, **14**, 2292-2300.
30. A. S. Klymchenko, T. Ozturk, V. G. Pivovarenko and A. P. Demchenko, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 7967-7970.
31. A. S. Klymchenko, G. Duportail, T. Ozturk, V. G. Pivovarenko, Y. Mély and A. P. Demchenko, *Chem. Biol.*, 2002, **9**, 1199-1208.
32. M. J. Hope, M. B. Bally, G. Webb and P. R. Cullis, *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, **812**, 55-65.
33. S. M. Ormson, R. G. Brown, F. Vollmer and W. Rettig, *J. Photochem. Photobiol. A*, 1994, **81**, 65.
34. Y. Niko, A. Y., Y. Mely, G. Konishi and A. S. Klymchenko, *Chem. Eur. J.*, 16473-16477.
35. M. Montalti, G. Battistelli, A. Cantelli and D. Genovese, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 5326-5329.
36. D. Zhai, W. Xu, L. Zhang and Y. T. Chang, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 2402-2411.
37. P. Jurkiewicz, J. Sýkora, A. Olzyńska, J. Humpolíčková and M. Hof, *J. Fluoresc.*, 2005, **15**, 883-894.
38. T. Parasassi, E. K. Krasnowska, L. Bagatolli and E. Gratton, *J. Fluoresc.*, 1998, **8**, 365-373.

3.2. Sondes membranaires fluorogènes rouge lointain basées sur le fluorophore squaraine

Une autre direction importante pour la création de sonde membranaire est l'utilisation de fluorophore émettant dans le rouge lointain (600-700 nm). C'est une gamme du spectre visible qui se combine lui aussi avec les marqueurs standards verts ou rouges couramment utilisés en biologie. Le principal avantage de cette région est que l'autofluorescence ainsi que les dommages photo-induits sont limités. De plus, cette région du spectre est appropriée aussi bien pour la spectroscopie que pour la microscopie conventionnelle de fluorescence et permet même *in vivo* une imagerie de l'animal entier. Il existe différents fluorophores qui sont d'excellents candidats pour la création de nouvelles sondes membranaires, comme les cyanines de type Cy5 ou Cy5.5 et squaraine. Notre choix s'est porté ici sur le fluorophore squaraine qui présente d'excellentes caractéristiques photophysiques, un haut coefficient d'extinction molaire ($\sim 350000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), une bonne photostabilité et brillance.

Nous avons tout d'abord développé une première sonde basée sur ce fluorophore, SQ10S, à partir d'un intermédiaire fourni par un collaborateur (L. Patsenker, Ukraine). La fonction alcool de cette molécule a été modifiée afin de pouvoir y adjoindre une tête polaire (Fig. 52). Nous avons donc voulu développer deux sondes capables de s'orienter différemment dans la membrane lipidique, une parallèlement et l'autre perpendiculairement. En se basant sur les résultats obtenus précédemment avec NR12S et son orientation perpendiculaire à la membrane, la structure primaire de cette sonde devait être conservée pour le développement de la sonde squaraine perpendiculaire à la membrane. De ces observations, la structure de la seconde sonde parallèle, découlait naturellement de l'utilisation de deux ancres (chaîne aliphatique plus tête polaire), une à chaque extrémité du fluorophore. Le choix de développement s'est donc porté sur l'utilisation de stratégie « Click » afin de pouvoir créer différents précurseurs facilement assemblables pour la réalisation de ces sondes (Fig. 52).



i) 5-chloro-1-pentyne, KI, CH₃CN, 85°C, 48 h (20%) ; ii) Acide squarique, pyridine, 100°C, 12 h (10%) ; iii) Idoethane, CH₃CN, 85°C, 48 h (97%) ; iv) Diéthyl squarate, Et₃N, EtOH, 80°C, 6 h (59%) ; v) NaOH (40%) EtOH, 80°C, 20 min ; vi) Composé **24**, toluène, n-butanol, 110°C, 18 h (76%) ; vii) NaN₃, DMF, 25°C, 20 h (86%) ; viii) N-méthyl-dodecylamine, CH₃CN, 80°C, 6 h (38%) ; ix) 1,3-Propanesultone, K₂CO₃, CH₃CN, 90°C, 12 h (61%) ; x) CuSO₄, ascorbate de sodium, dioxane/eau (3/1), TA, 30 min (72 %) ; xi) CuSO₄, ascorbate de sodium, dioxane/eau (3/1), TA, 30 min (82 %) ; xii) 3-(Diméthylamino)-1-propylamine, BOP, HOBT, DIEA, DMF/CH₂Cl₂ (1/1), TA, durant une nuit (64 %) ; xiii) 1,3-propanesultone, K₂CO₃, CH₃CN, 80°C, durant une nuit (62 %)

Figure 52 : Schéma de synthèse des sondes bQ12S et SQ12S, SQ10S.

La conception de la première sonde SQ10S a été relativement simple, le fluorophore fourni par notre collaborateur (**35**) possédait déjà une chaîne aliphatique pouvant servir d'ancre lipidique, il ne nous restait donc plus qu'à lui adjoindre une tête polaire afin de loger le fluorophore directement à la membrane. Nous avons donc modifié cette molécule par couplage peptidique avec la 3-(diméthylamino)-1-propylamine afin de pouvoir créer une amine quaternaire (**36**). La molécule ainsi obtenue a alors été quaternisée par la 1,3-propanesultone afin de créer le groupement zwitterionique dans le produit final (SQ10S) (**37**). Pour les sondes SQ12S (**34**) et dSQ12S (**33**) nous sommes partis d'un développement en blocs de construction. En effet la synthèse du fluorophore squaraine est basée sur l'utilisation d'indolénines, identique pour une molécule symétrique et différente pour une molécule asymétrique. Nous avons donc développé deux indolénines, l'une avec un groupement alcyne (**24**) pour la réaction click et l'autre avec un groupement éthyle (**26**) pour la molécule asymétrique. Les deux fluorophores ont alors été synthétisés à partir de ces indolénines. La molécule qui servirait d'ancre a été créée à partir de 1-bromo-3-chloropropane auquel le groupement bromo a été remplacé par un groupement azoture à l'aide d'azoture de sodium (**30**). Cette molécule a servi à alkyler N-méthyl dodécylamine (**31**) qui a ensuite été quaternisée par 1,3-propanesultone (**32**). Les fluorophores et l'ancre ont ensuite été assemblés par stratégie click puis purifiés par exclusion stérique (colonne avec gel LH-20).

L'utilisation de cette stratégie nous a permis d'améliorer nos rendements de réaction. Cela nous a permis l'obtention de deux sondes dont l'insertion dans la membrane devrait être différente (Fig. 53). Les trois molécules obtenues ont ensuite été testées par spectroscopie et microscopie sur des lignées cellulaires HeLa standards ainsi que sur diverses suspensions de LUVs de DOPC.

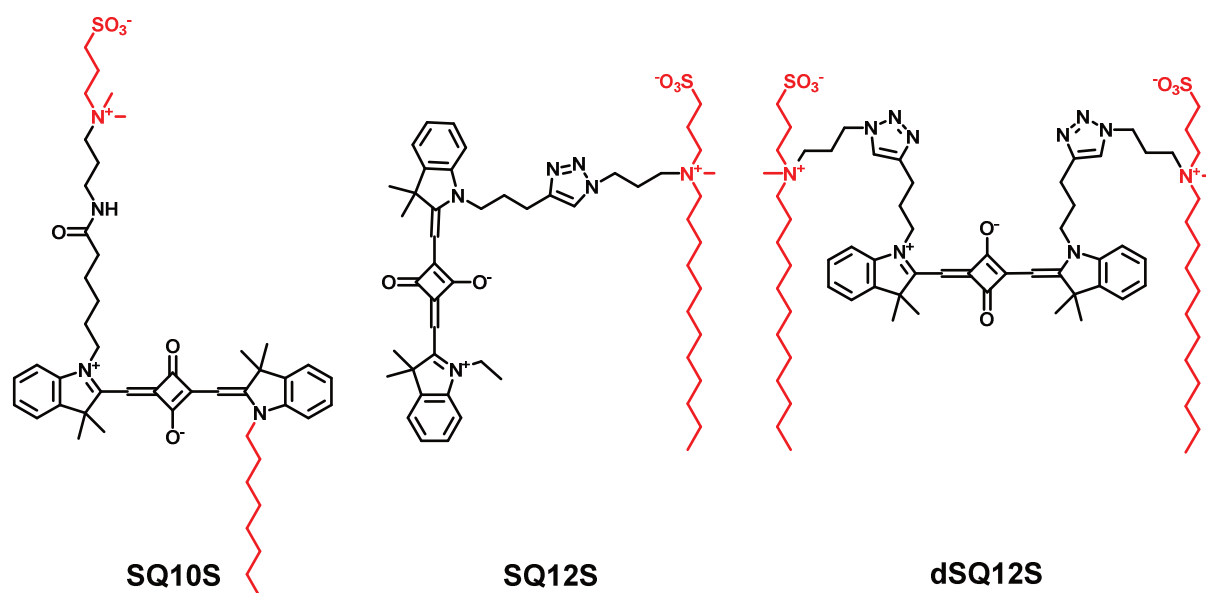


Figure 53 : Représentation de la structure des sondes SQ10S, SQ12S et dSQ12S lors de leur insertion dans une membrane lipidique.

Analyses spectroscopiques :

Ces nouvelles sondes ont été comparées au marqueur DiD, dérivé de cyanine 5 très utilisé dans les études lipidiques. Il servira de référence dans la suite des expériences. Dans un premier temps, les rendements quantiques ainsi que les maxima d'émission et d'excitation dans du tampon phosphate, de l'éthanol, du dioxane ainsi que dans une suspension de vésicules de DOPC de ces molécules ont été caractérisés.

« (λ_{abs}	λ_{em}	QY
DiD	Tampon	599	700	0,04
	Dioxane	645	660	92
	Ethanol	649	667	50
	Luvs DOPC aj. ^(a)	649	668	65
	Luvs DOPC	655	671	4,9
SQ10S	Tampon	631	636	1,0
	Dioxane	640	646	45
	Ethanol	635	640	28
	Luvs DOPC	642	647	61
SQ12S	Tampon	626	635	0,49
	Dioxane	638	645	42
	Ethanol	632	639	20
	Luvs DOPC	640	647	36
dSQ12S	Tampon	642	638	0,17
	Dioxane	643	650	42
	Ethanol	636	643	32
	Luvs DOPC	643	650	29

Tableau 3 : Longueur d'onde d'émission et d'absorption maximale ainsi que rendements quantiques des sondes DiD, SQ10S, SQ12S et dSQ12S dans du tampon phosphate, du dioxane de l'éthanol et une suspension de LUVs de DOPC. (a) Ici le marqueur DiD a été ajouté dans le mélange de lipides lors de la création des LUVs.

On remarque que les nouvelles sondes ne fluorescent pas ou peu dans les milieux aqueux (QY ~1% pour SQ10S), elles possèdent une bonne capacité fluorogène (capacité « turn-on »), ce qui est plutôt une bonne chose. On remarque ensuite qu'elles fluorescent bien lorsqu'elles sont ajoutées à une suspension de LUVs de DOPC, avec SQ10S qui semble se lier plus fortement (QY =61%), puis SQ12S et bSQ12S qui présentent un rendement quantique un peu plus faible (36 et 29%). Le rendement quantique de ces trois sondes est très appréciable et montre déjà une supériorité de ces sondes par rapport à DiD qui ne fluoresce pas lorsqu'on l'ajoute une suspension de LUVs de DOPC (QY ~5%), il est nécessaire de l'ajouter durant la production des LUVs (QY ~65%), ce qui le rend peu utilisable sur des milieux cellulaires. Il semble que l'augmentation du nombre d'ancres membranaires entraîne une augmentation de la difficulté de la sonde pour s'insérer dans la membrane, probablement dû à un effet de l'augmentation de l'encombrement stérique ou de l'augmentation du nombre de charge de la molécule. De plus ces sondes possèdent des longueurs d'émission et d'excitation très proches (faible déplacement de Stokes) dans les différents milieux testés mais leur déplacement de Stokes est malheureusement assez réduit

(5-8 nm) (Table 3). Les maximums d'émission se situent aux alentours de 650 nm, ce qui est ce que nous attendions afin de pouvoir exploiter la partie rouge lointain du spectre visible.

Les spectres d'absorption de ces sondes dans du tampon phosphate (Fig. 54A) présente des formes très larges avec une maximale à 620-640 nm et un épaulement entre 570 et 600 nm très présent. Cela indique une agrégation probable des sondes sous forme micellaire conduisant à l'extinction du signal de fluorescence dans l'eau (auto-quenching), propriétés fluorogènes de ces sondes. En ce qui concerne DiD l'épaulement est même le constituant principal du spectre obtenu, ce qui indique plutôt une formation en microcristaux. Une fois dans un milieu lipidique, suspension de vésicule de DOPC, les spectres d'absorption (Fig. 54B) présentent un pic majoritaire vers 640nm, pic typique d'absorption des squaraines dans les solvants organiques. Les sondes nouvellement élaborées semblent donc bien insérées dans la membrane. Lorsque l'on regarde les spectres d'émission de ces sondes dans une dispersion de vésicules de DOPC (Fig. 54C), on observe un maximum d'émission à 640 nm avec une belle bande d'émission bien fine, malgré tout un léger épaulement vers 700 nm reste présent. Malgré un déplacement de Stokes relativement faible, il est parfaitement possible de les utiliser dans des conditions d'imagerie microscopique.

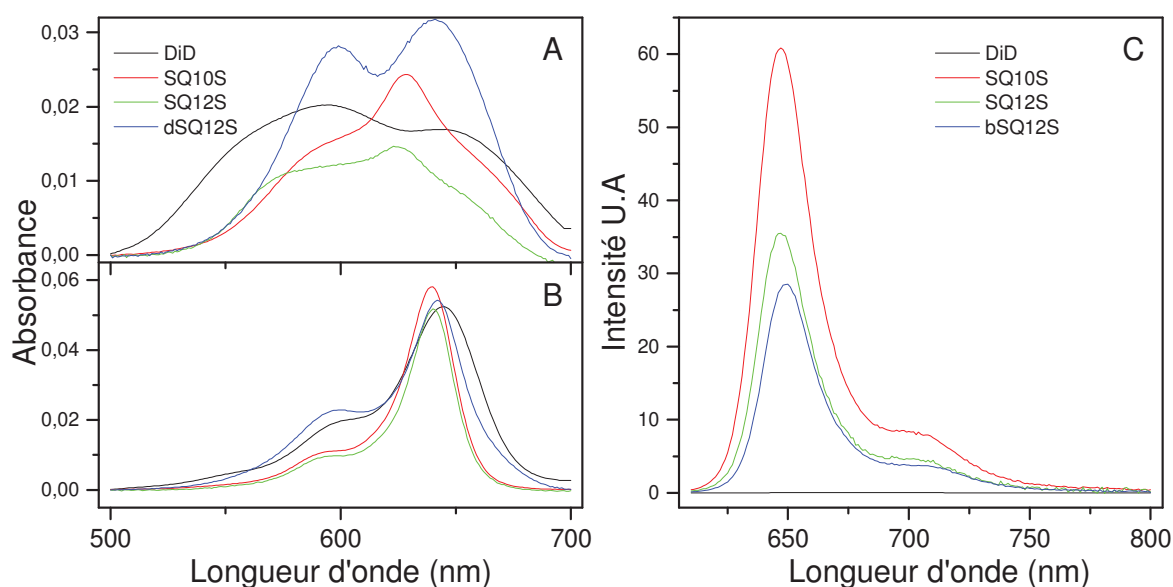


Figure 54 : Spectres d'absorption des sondes DiD, SQ10S, SQ12S et dSQ12S dans (A) du tampon phosphate 20 nM pH 7.4 et (B) dans une dispersion de vésicules de DOPC (200 nM). (C) Spectres d'émissions normalisés par le rendement quantique de ces sondes dans une dispersion de vésicules de DOPC. La concentration des sondes est de 20 μ M dans chacun des cas. λ_{ex} = 600 nm.

Des expériences de titration ont ensuite été réalisées sur une dispersion de vésicules de DOPC (200 μM). La concentration de sonde a été variée entre 0.05 μM et 2 μM et les trois sondes SQ10S, SQ12S et dSQ12S ont été testées. Les sondes SQ10S et dSQ12S présentent une diminution du maximum d'intensité lors de l'ajout d'une concentration de 1 μM de sonde à une dispersion de lipides de 200 μM . Cette diminution provient en grande partie d'un auto-quenching de la molécule lorsque sa concentration excède un ratio sonde/lipide de 1/200 (Fig. 55A). Il est intéressant de noter que cela n'arrive pas pour la sonde SQ12S qui présente une légère augmentation de sa fluorescence entre 1 et 2 μM de sonde (Fig. 55A). Une cinétique de liaison sur une suspension de cellules HeLa a aussi été réalisée (Fig. 55B). La fluorescence de la suspension de cellules a été enregistrée pendant 90s, servant ainsi de ligne de base, puis la sonde a été ajoutée directement à l'échantillon et la mesure de la fluorescence reprise quelques secondes plus tard ($\sim 30\text{s}$). Une agitation est conservée durant toute la durée de l'expérimentation. Tout d'abord, la cinétique de la sonde DiD nous permet de confirmer les résultats de QY dans les liposomes, la fluorescence n'augmente pas, cette sonde semble ne pas se lier sur la membrane plasmique cellulaire. On remarque ensuite que la sonde SQ12S possède une cinétique de liaison qui pourrait être qualifiée de classique comparativement aux sondes que nous avons préalablement développées (NR12S, etc), elle atteint un plateau de fluorescence après 2 min, puis une légère décroissance est observée par la suite ($\sim 7\%$ de diminution). Pour la sonde SQ10S, la cinétique est très rapide, le maximum d'émission est presque atteint au moment où la mesure reprend. Une trentaine de secondes supplémentaires sont nécessaires pour atteindre le maximum de fluorescence. Étonnamment, on observe une diminution conséquente de la fluorescence par la suite, de quasiment 20%. Le fluorophore de cette sonde étant le même que la sonde SQ12S, cette baisse ne peut pas être due au photo-blanchiment de la sonde (3x supérieur pour SQ10S que pour SQ12S), un autre phénomène difficilement identifiable ici semble induire cette diminution de fluorescence. Le plus surprenant est le comportement de la sonde dSQ12S. Sa cinétique est beaucoup plus lente que celle de ses deux sœurs. En effet après 2 min le plateau de fluorescence n'est pas atteint, on se situe en plein dans la zone d'inflexion de la courbe. Après 3 min 30, l'augmentation se stabilise mais continue et ce jusqu'à la fin de l'expérience. Il semblerait que l'ajout de la deuxième ancre de la molécule dSQ12S ralentisse sensiblement la vitesse de liaison de la molécule à la membrane plasmique. De plus, on remarque aussi que ces sondes ne possèdent pas la même intensité maximale dans ce

milieu, SQ10S à une fluorescence 2 fois supérieure à SQ12S et 1.5 fois à celle de dSQ12S (après 3 min d'incubation).

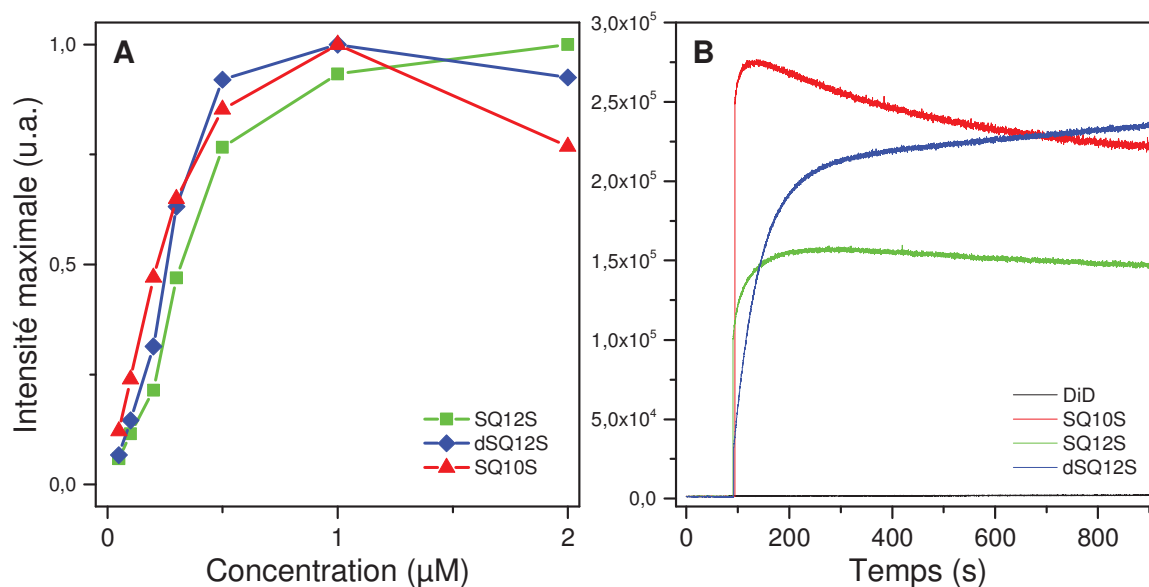


Figure 55 : (A) Courbes de titration d'une suspension de LUVs de DOPC (200 μM) par les sondes SQ10S, SQ12S et dSQ12S, intensité maximale observée en fonction de la concentration en sonde. (B) Cinétique de liaison des sondes DiD, SQ10S, SQ12S et dSQ12S (20 nM chaque) sur des cellules HeLa (1×10^6 cellules /mL . $\lambda_{ex} = 600$ nm.

Ces données sont toutefois en contradiction avec les valeurs de rendement quantique calculées précédemment, elles sont en adéquation pour les sondes SQ10S mais pas pour dSQ12S. Il faut noter toutefois que lors de ces mesures, la cinétique plus lente de la sonde dSQ12S n'avait pas été prise en compte et qu'elle semble jouer un rôle important (les acquisitions ont été faites 2 min après l'ajout de la sonde dans la suspension). Si l'on compare les données obtenues lors des calculs des QY ainsi que celle des cinétiques, le rendement quantique de dSQ12S devrait se situer autour de 45% et non pas 28% comme calculé. Si l'on compare le spectre de dSQ12S obtenu à 0,2 μM lors des titrations d'une suspension de DOPC à 200 μM, lors de laquelle la sonde est ajoutée graduellement à la même suspension, au spectre obtenu dans dioxane, qui indique un QY de 41% pour cette sonde, dans des conditions d'expériences similaires (même réglage pour l'appareil, etc) on remarque que les spectres présentent un maximum d'émissions très similaires (Fig. 56). Le

rendement quantique de dSQ12S dans une suspension de DOPC devrait être donc très proche de celui dans dioxane. Il serait intéressant d'observer la cinétique de liaison de cette sonde dans une suspension de vésicules et de mesurer le rendement quantique après 2 minutes d'incubation, après 5 min puis après 15 min afin d'observer l'évolution de celui-ci au cours du temps.

Il résulte tout de même que ces sondes possèdent de bonnes prédispositions pour l'imagerie de fluorescence, même si un léger doute peut être émis en ce qui concerne l'utilité de SQ10S.

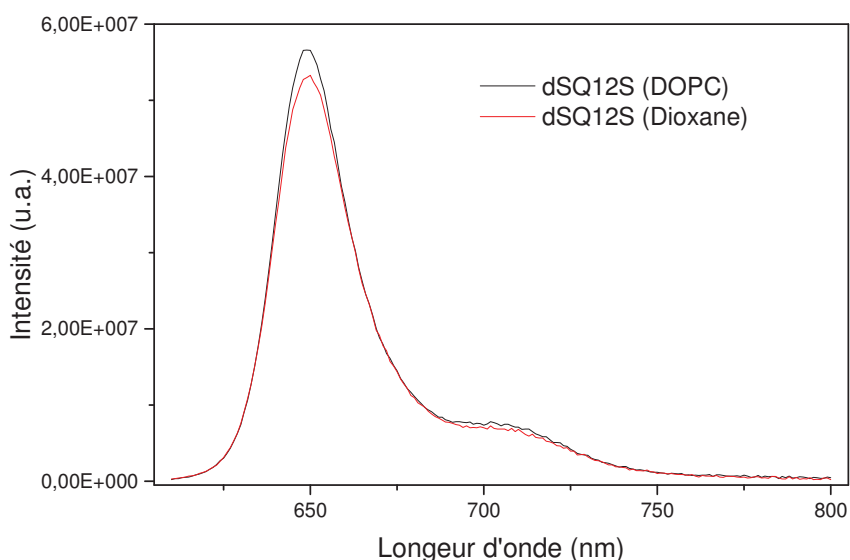


Figure 56 : Spectre d'émission de dSQ12S dans dioxane et dans une suspension de DOPC. Acquisition réalisée après plusieurs minutes d'incubation (plus de 5 min). L'absorbance de ces sondes (ex. leur concentration) est identique dans ces deux cas. $\lambda_{ex} = 600$ nm.

Imagerie microscopique :

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier l'orientation de ces sondes dans la membrane, pour vérifier que comme prédit, SQ10S et SQ12S s'orientent perpendiculairement à la membrane et dSQ12S parallèlement. Le plus simple pour observer cela est de détecter l'effet de polarisation de la lumière sur des GUVs marqués par ces sondes. En effet, si la lumière arrivant sur l'échantillon est polarisée et perpendiculaire par

rapport au moment de transition du fluorophore ancré dans la membrane, celui-ci n'absorbera pas la lumière et ne fluorescera donc pas. Des GUVs de DOPC marqués par ces différents marqueurs ont été observés sur un microscope deux-photons possédant une polarisation de lumière haut-bas sur les images observées. Étonnamment toutes les sondes possèdent le même niveau de polarité, les pôles du GUVs présentent une fluorescence moindre par rapport aux pôles latéraux, ce qui signifie que les fluorophores s'orientent parallèlement à la membrane lipidique (Fig. 57A-57C). Nous avons alors voulu vérifier le niveau de spécificité de cette orientation (plus ou moins parallèle). Pour se faire, un ratio entre le point le plus brillant et le plus sombre du GUVs a été calculé à l'aide d'un plug-in ImageJ, fait maison (R. Vauchelles), capable de nous donner l'intensité de fluorescence en fonction de l'angle sur la vésicule (Fig. 57D-57F). SQ12S semble être la sonde la plus polarisée avec un ratio de $6,70 \pm 1,28$ suivie de dSQ12S avec un ratio de $4,61 \pm 0,72$ puis de SQ10S avec un ratio de $3,50 \pm 0,02$. Ces résultats sont surprenants, la structure de SQ10S lui permet plus de liberté dans la membrane que les deux autres, son ratio est donc logique mais dSQ12S possède deux ancres aliphatiques ce qui lui laisse beaucoup moins de liberté quant à la manière de se loger dans la membrane, elle devrait avoir le ratio de polarisation le plus élevé.

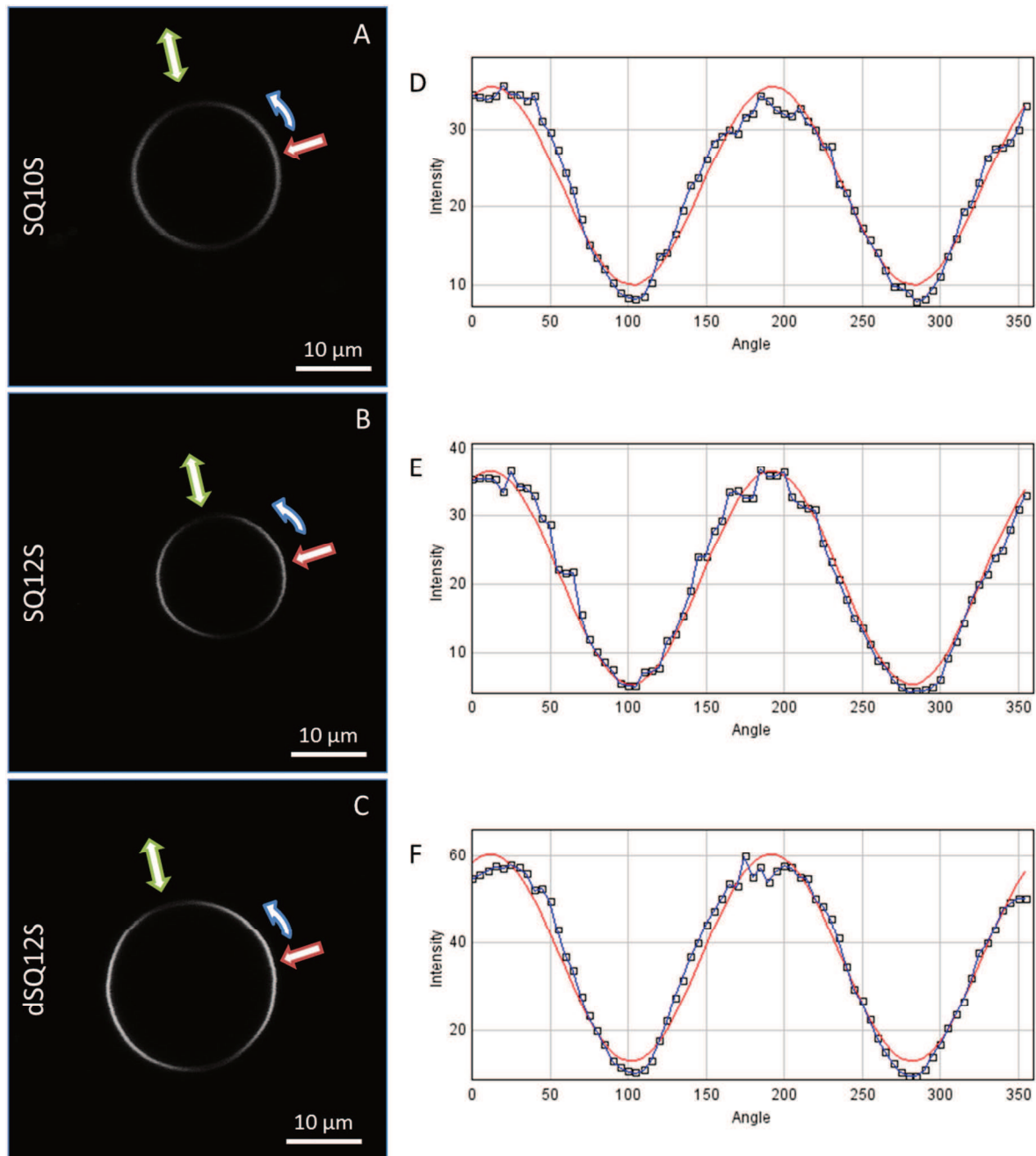


Figure 57 : (A-C) Images de GUVs de DOPC marqués par les sonde SQ10S (A), SQ12S (B) et dSQ12S (C) (50 nM chacune). (D-F) Spectre de représentation de l'intensité en fonction de l'angle du GUV. 0° est représenté par la flèche rouge et la flèche bleue représente le sens de l'acquisition. La double flèche verte représente quant à elle le sens de polarisation de la lumière. La distance entre deux acquisitions est de 5°. La courbe bleue représente le relevé réel de l'expérimentation alors que la courbe rouge représente la sinusoïde mathématique la plus proche (ajustement de courbe ; « fitting »). L'excitation deux-photons a été faite à 830 nm.

Le fluorophore étant zwitterionique neutre, un effet électrostatique peut expliquer l'orientation de SQ12S parallèlement à la membrane. En effet, une attraction électrostatique entre les charges des têtes polaires et celles du fluorophore semble bloquée ce dernier parallèlement dans la membrane sans lui permettre de s'introduire plus profondément. La nature de la structure de SQ10S et le nombre de degrés de liberté supplémentaire de celle-ci par rapport à celle de ces sœurs rend la prédiction de son orientation sans intervention informatique (et même dans ce cas, elle reste très complexe) très difficile. Il est assez difficile avec les résultats que nous avons, d'expliquer pourquoi la sonde dSQ12S présente une orientation parallèle à la membrane moins franche que sa sœur SQ12S. Quoi qu'il en soit, sans essai de modélisation ou d'expérience complémentaire à ce sujet, il est difficile de donner une explication autre qu'une simple hypothèse.

Nous avons ensuite voulu voir ce que ces marqueurs pouvaient donner sur des échantillons biologiques vivants. Ils ont donc été testés sur des lignées de cellules HeLa et observés par microscopie confocale. Des co-marquages ont été réalisés à l'aide de Hoechst afin de visualiser le noyau de la cellule et de WGA-Alexafluor 488, protéine marquant la membrane cellulaire. Nous nous sommes servis de WGA-Alexafluor 488 afin de nous assurer de la localisation membranaire de la sonde. Les cellules ont dans un premier temps été incubées 15 min en présence de WGA-Alexafluor 488 et Hoechst, puis les cellules ont été rincées et marquées par les sondes. Les images ont été réalisées après 5 min d'incubation de la sonde (Fig. 58). La première chose que l'on peut observer est l'absence de signal de fluorescence de la part DiD, ce qui corrobore parfaitement ce que nous avons observé préalablement avec ce marqueur dans les membranes modèles. Il ne se fixe pas directement aux membranes plasmiques (Fig. 58A-58C). On remarque ensuite que la sonde dSQ12S se lie remarquablement bien à la membrane, la co-localisation avec WGA-Alexafluor 488 est excellente (couleur orange sur la membrane qui indique le mélange de la couleur verte de WGA et rouge de dSQ12S) (Fig. 58J-58L), ce qui indique une localisation membranaire de la molécule. De plus, aucune couleur rouge n'apparaît dans le cytoplasme cellulaire, la sonde ne semble pas être internalisée rapidement par la cellule. Étonnement lorsque l'on regarde la sonde SQ12S (Fig. 58G-58I) on remarque la présence de couleur rouge dans le cytoplasme de certaines cellules. Après 5 min, la sonde reste majoritairement membranaire comme l'indique la co-localisation avec WGA mais certaines cellules présentent un marquage rouge

de leur cytoplasme ce qui indique une internalisation rapide de la sonde dans la cellule. En ce qui concerne SQ10S, la présence de la sonde à l'intérieur de la cellule est indéniable (Fig. 58D-58F). L'intensité de fluorescence de la membrane est identique à celle du cytoplasme, il semble y avoir autant de marqueurs sur la membrane que sur dans la cellule. La vitesse à laquelle a lieu l'internalisation tend à indiquer qu'elle n'est pas dûe à un transport actif de la cellule mais très probablement par diffusion directe à l'intérieur de la cellule.

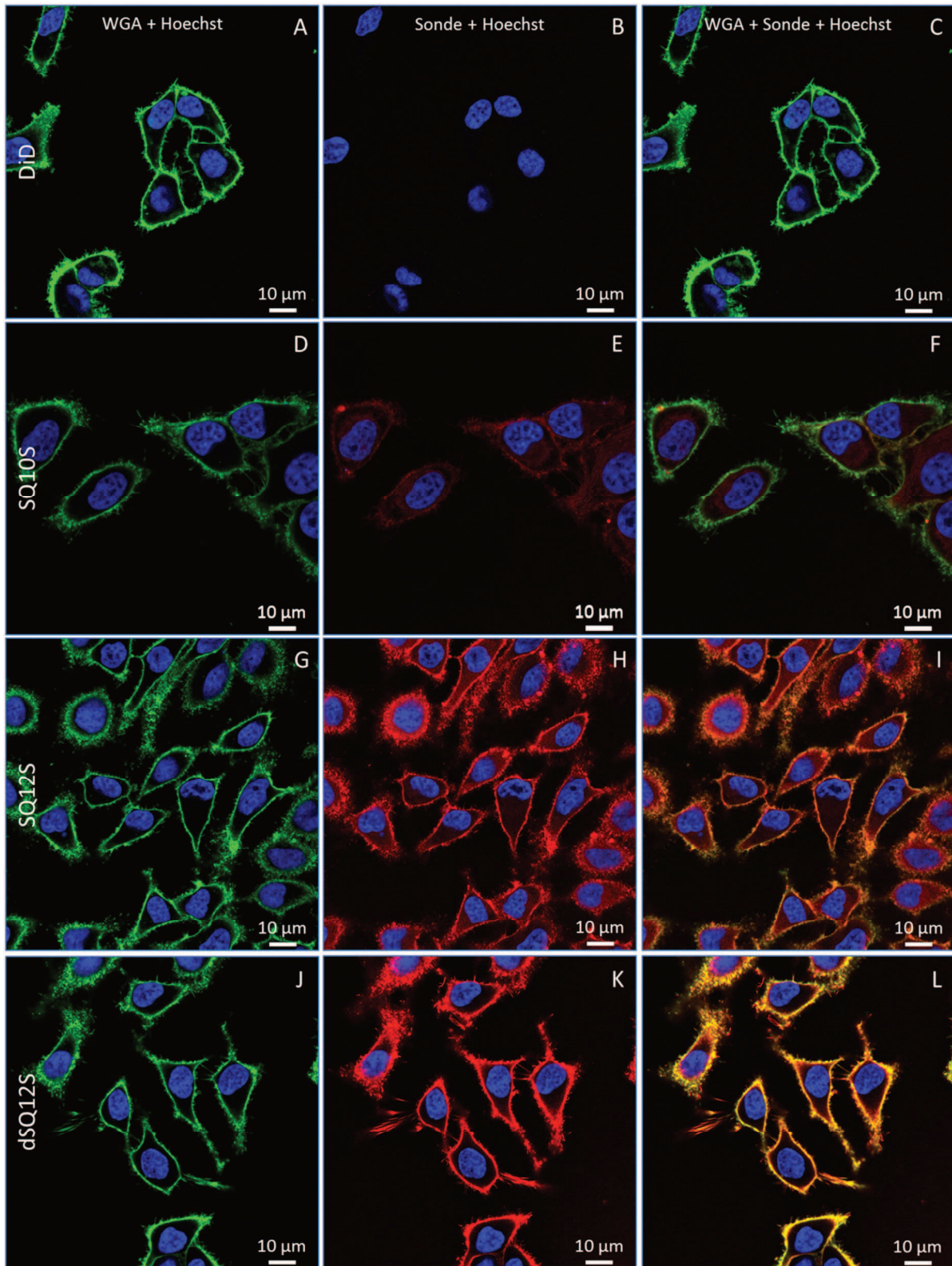
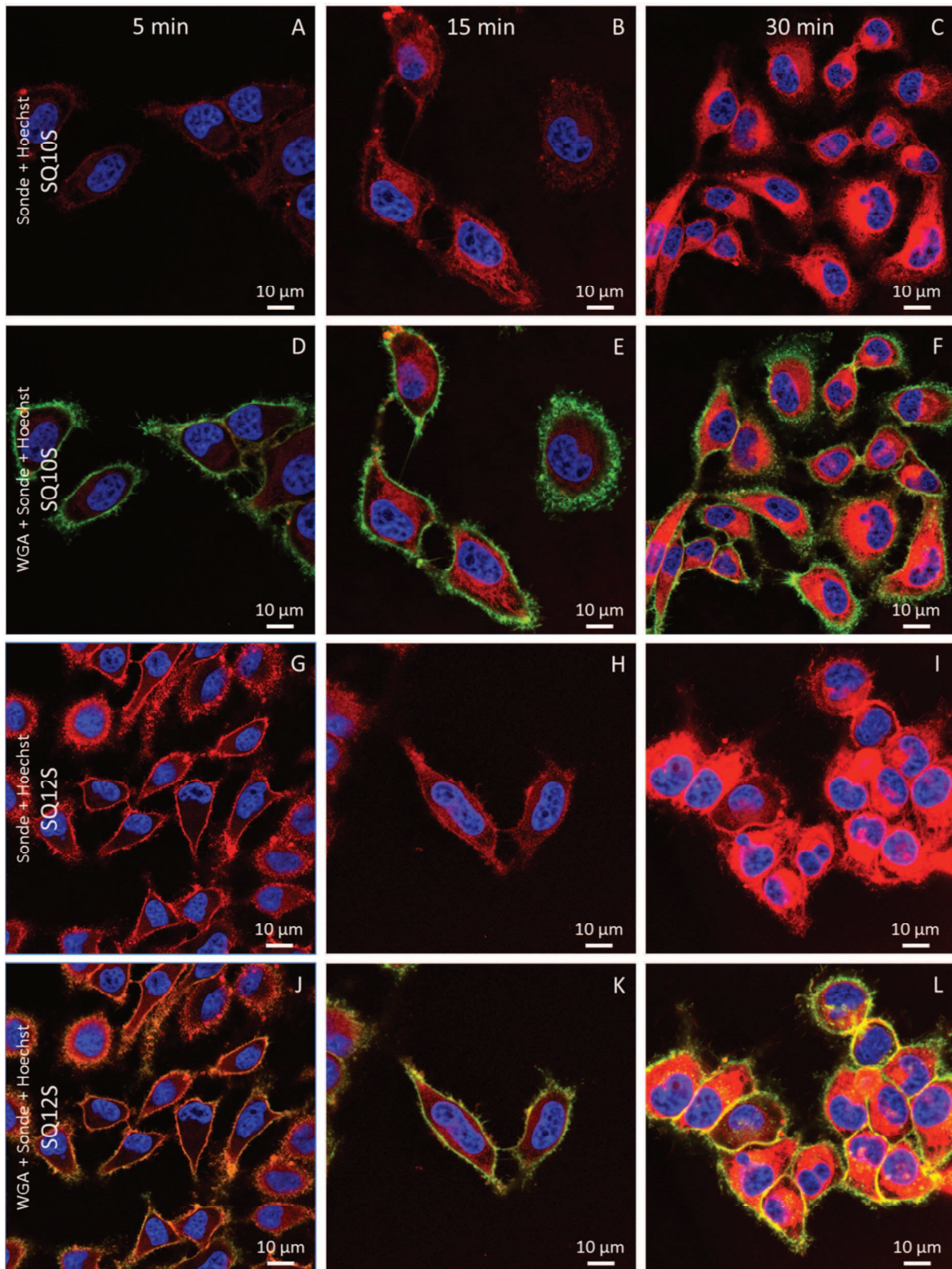


Figure 58 : Images confocales de cellules HeLa marquées par DiD (A-C), SQ10S (D-F), SQ12S (G-I) et dSQ12S (J-L) (20 nM de concentration chacune). Les images ont été prises 5 min après le marquage par les sondes squaraines et DiD. Les longueurs d'onde d'excitation ainsi que les plages de détection sont 405 nm et 430-480 nm pour Hoechst, 488 nm et 500-540 nm pour Alexa fluor 488 et 635 nm et 650-750 nm pour les dérivés squaraine.

Afin de vérifier le devenir exact de ces sondes au cours du temps, nous avons réalisé le même type d'expériences que précédemment, mais cette fois nous avons en plus réalisé des images à 5 min, 15 min et 30 min après ajout de la sonde (température ambiante) dans le but de suivre le déplacement de ces sondes au cours du temps, internalisation ou immobilisation sur la membrane plasmique. Les résultats obtenus par cette expérience sont très intéressants. SQ10S s'internalise très vite dans la cellule, la sonde s'accumule dans le cytoplasme cellulaire, sans véritablement passée par une étape membranaire, en suggérant qu'elle pénètre directement à travers la membrane cellulaire (Fig. 59A-59F). En ce qui concerne SQ12S, le sentiment que cette molécule était internalisée rapidement dans la cellule se confirme ici, à 5 min, la sonde est très majoritairement membranaire, puis à 15 min elle est autant cytoplasmique que membranaire, et enfin à 30 min elle est majoritairement cytoplasmique (Fig. 59G-59L). Cette vitesse d'internalisation est surprenante, sa structure étant similaire à la sonde NR12S qui elle, possède la capacité de rester membranaire (une endocytose de la membrane finit tout de même par internaliser cette sonde), mais pour SQ12S une 15^{aine} de minutes sont suffisantes afin d'internaliser $\pm 50\%$ de la sonde dans la cellule alors que pour NR12S, les premiers signes d'internalisation ne sont visibles qu'à partir de 30 min (température ambiante). La sonde dSQ12S montre un comportement exemplaire, même après 30 min la sonde reste membranaire (Fig. 59M-59R). Après 30 min des traces d'endocytose de la sonde commencent à apparaître (flèche blanche Fig. 59R). La structure de la sonde SQ10S semble induire un assemblage de la sonde sous une forme facilitant son entrée dans la cellule (agrégat micellaire, micelle inverse ?) mais il nous est difficile de statuer sur la véritable raison de cette pénétration rapide dans la cellule. En ce qui concerne les sondes sœurs SQ12S et dSQ12S, l'ajout de la seconde chaîne alkyle a un véritable effet bénéfique sur l'ancrage de cette sonde dans la membrane plasmique. dSQ12S est vraiment une sonde très intéressante pour l'imagerie microscopique.



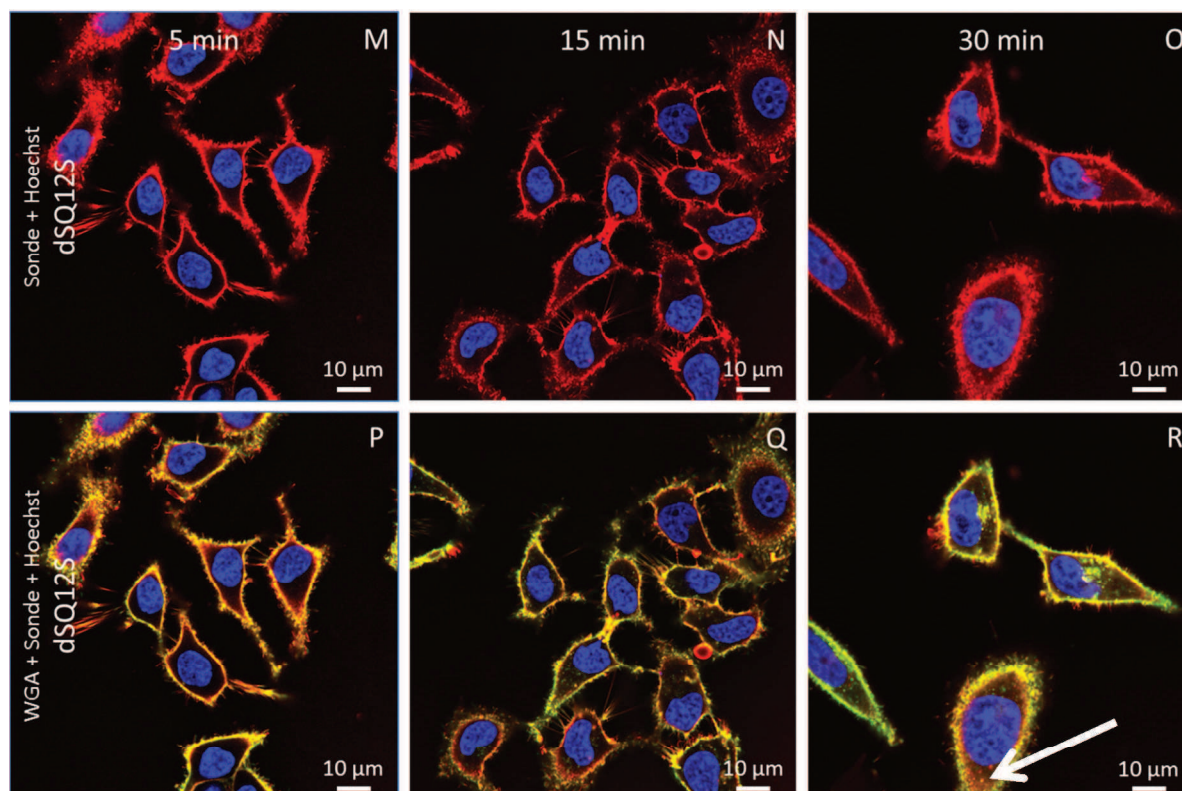


Figure 59 : Images confocales de cellules HeLa marquées par les sondes SQ10S (A-F), SQ12S (G-L) et dSQ12S (M-R) (20 nM chacune). Un co-marquage à l'aide de Hoechst et WGA-Alexafluor 488 a été réalisé. Les images ont été prises 5, 15 et 30 min après le marquage par les sondes squaraines. Les réglages microscopes sont les mêmes que pour la Fig. 58.

Les bons résultats de la sonde dSQ12S nous ont poussés à vérifier deux paramètres supplémentaires de cette sonde. Le fluorophore squaraine est connu pour être très brillant et plutôt photostable, c'est donc naturellement que nous avons vérifié si sa brillance et sa photostabilité étaient à la hauteur de ce que nous attendions. Des images confocales de cellules HeLa marquées par dSQ12S à une concentration de 1 nM ont alors été réalisées, toujours en présence d'un co-marquage WGA-Alexafluor 488 et Hoechst (Fig. 60C-60E). Remarquablement, en adaptant les paramètres du microscope (augmentation de la puissance du laser (70%) ainsi que le gain (1047 V)) il est parfaitement possible de visualiser le marquage membranaire de la sonde et le co-marquage avec WGA indique que même à une concentration aussi faible, elle reste bien membranaire. Nous avons ensuite voulu vérifier la photostabilité de cette sonde, mais ne possédant pas au laboratoire une sonde membranaire rouge lointain et DiD n'étant pas utilisable, nous avons comparé notre molécule avec WGA-Alexafluor 488. Alexafluor 488 est un fluorophore très stable mais il ne

se situe pas dans la même gamme de longueur d'onde de squaraine et nécessite l'utilisation d'un autre laser pour l'excitation. Les lasers étant différents, ils ne possèdent pas une puissance identique dans le microscope, ce qui rend la comparaison stricte difficile, il ne sera possible de n'avoir qu'un ordre d'idée de la photostabilité de dSQ12S. Les résultats obtenus nous indique une stabilité assez similaire de nos sondes (~70% de diminution, avec une puissance (75%) identique pour les deux lasers). On peut donc en déduire que dSQ12S possède une excellente photostabilité, dans la droite ligne d'Alexafluor 488. Il est tout de même judicieux de reprendre cette expérience avec un marqueur rouge-lointain connu (comme WGA-Cy5 par exemple) afin de pouvoir correctement comparer la photo-stabilité de notre marqueur.

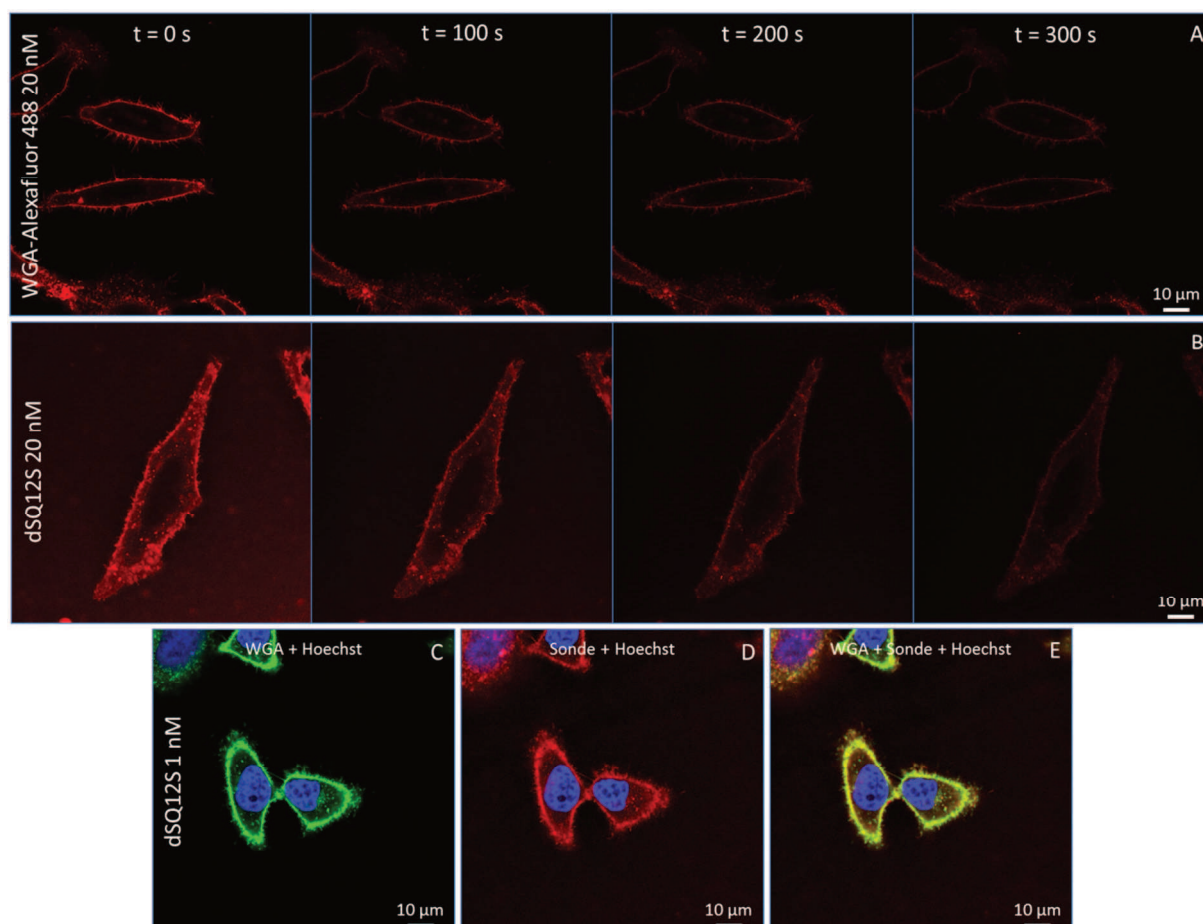


Figure 60 : Photo-blanchiment des sondes WGA-Alexafluor 488 (A) et dSQ12S (B) (20 nM chacune) sur une période de 5 min, réalisée sur un microscope confocal. Images confocales de cellules HeLa marquées par dSQ12S à une concentration de 1 nM (C-F) avec un co-marquage WGA-Alexafluor 488 et Hoechst. Puissance du laser à 75% pour WGA (488 nm) et dSQ12S (635 nm).

Malgré les résultats en demi-teinte des deux autres sondes, même si elles sont internalisées plus ou moins rapidement dans la cellule, elles montrent un marquage intéressant du cytoplasme cellulaire. La totalité de ce dernier n'est pas marquée par la molécule, ce pourrait-il que ces sondes marquent le réticulum endoplasmique (RE) de la cellule ? Dans le but d'affirmer ou d'infirmer cette hypothèse, nous avons réalisé un co-marquage des sondes squaraines avec un marqueur du RE, ER-Tracker Green. Les images ont été réalisées sur un microscope confocal, une concentration en sonde à 20 nM ainsi que 0.75 μ M d'ER-Tracker. Elles ont été prises à $t = 0$ min puis à $t = 30$ min. Comme on s'y attendait, dSQ12S reste membranaire et l'on observe aucune co-localisation avec ER-Tracker et donc le RE. Par contre SQ10S montre une remarquable similitude de marquage avec ER-Tracker après 30 min et SQ12S présente aussi ces similitudes, même si celles-ci restent plus nuancées (Fig. 61). Cette différence de marquage entre SQ10S et SQ12S doit probablement être due à la différence de vitesse d'internalisation des deux sondes et le passage par l'étape membranaire de SQ12S.

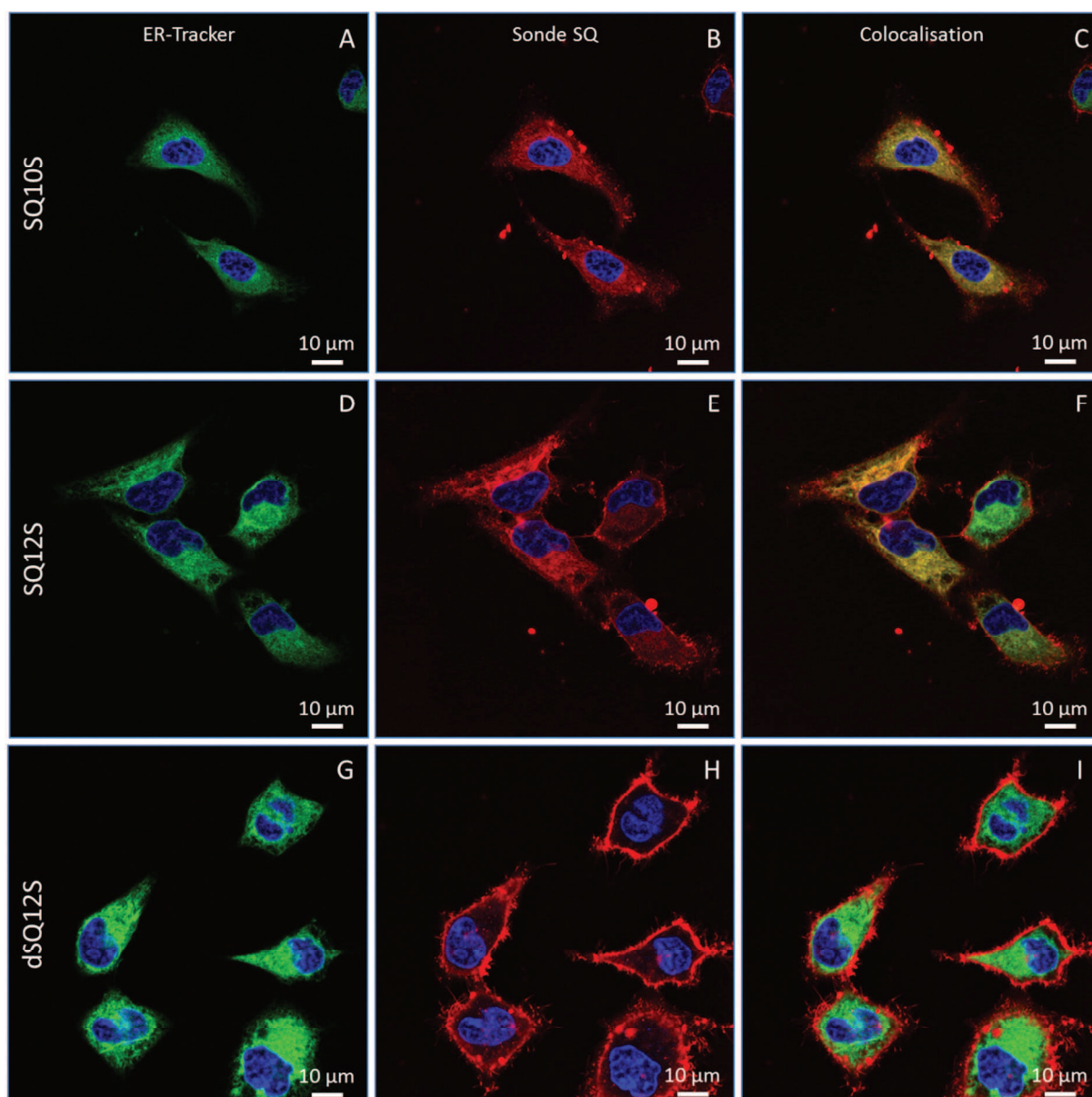


Figure 61 : Images confocales de cellules HeLa marquées par ER-Tracker et les sondes SQ10S (A-C), SQ12S (D-F) et dSQ12S (G-I). Une incubation de 30 min après marquage par les sondes SQ10S, SQ12S et dSQ12S a été observée. Les longueurs d'onde d'excitation ainsi que les plages de détection sont 405 nm et 430-480 nm pour Hoechst, 488nm et 500-540 nm pour ER-Tracker et 635 nm et 650-750 nm pour les dérivés squaraine.

Ces travaux nous permis de développer une nouvelle sonde membranaire aux propriétés intéressantes (dSQ12S), très brillante, localisée dans la membrane pour un temps important (30 min), une bonne photostabilité et un rendement quantique qui semble être important. Ces deux derniers paramètres sont à prendre au conditionnel toutefois, il est nécessaire de vérifier la photostabilité en la comparant à un marqueur rouge lointain et le rendement

quantique demande à être recalculé suite à l'observation de la cinétique de liaison plus faible que pour les autres sondes. Cette sonde présente aussi l'intérêt de se situer dans la partie rouge lointain du spectre visible et est utilisable en parallèle des autres couleurs de marqueurs couramment utilisés en biologie, rouge, vert et bleu. De plus, ces marqueurs sont d'intérêt pour l'imagerie in vivo sur l'animal, car les tissus vivants n'absorbent pas les rayonnements lumineux de longueurs d'ondes supérieures à 630 nm. La sonde SQ10S présente finalement un intérêt autre que celui auquel elle était préalablement destinée, celui de marqueur du RE. En effet, sa rapide internalisation dans la cellule et ses propriétés photo-physiques intéressantes peuvent faire de cette molécule un atout pour le marquage du RE dans le cas d'images en quatre couleurs, avec le bleu, vert, rouge et rouge lointain. SQ12S quant à elle présente un intérêt plus mitigé, en effet, elle semble être un intermédiaire entre les sondes SQ10S et dSQ12S sans vraiment avoir de caractéristiques intéressantes propres. En outre, ces résultats démontrent que la variation dans la structure chimique d'une sonde fluorescente peut changer drastiquement sa spécificité de marquage des membranes plasmiques ainsi que sa vitesse d'internalisation.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

III. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En nous basant sur les techniques génériques de fluorescence (spectroscopiques et microscopiques), nous nous sommes penchés sur l'élaboration de nouvelles sondes fluorescentes dans le but de pouvoir répondre à certaines interrogations sur la membrane plasmique et plus précisément sur l'hypothèse des domaines lipidiques qui la composent. Nous avons alors mis au point, avec plus ou moins de succès, différentes sondes membranaires.

Le premier groupe, composé des sondes NR12S, bNR12S et bQ10S avait comme objectif de permettre un marquage sélectif des différents domaines de la membrane. Il a été possible à l'aide de ses sondes de marquer sélectivement les domaines Ld (bNR12S) ou Lo (NR12S + bQ10S). Des expériences sur des membranes modèles (LUVs ou GUVs) nous ont permis de visualiser directement les phases de façon distincte (par spectroscopie et microscopie), et une fois retransposées sur des cellules vivantes, nous avons pu observer l'existence de deux phases distinctes. En effet, comme les sondes bNR12S et bQ10S se lient préférentiellement sur les phases Ld, les résultats spectroscopiques obtenus sur des cellules, indiquent clairement que la membrane cellulaire est composée de plusieurs domaines. En associant ces résultats à ceux obtenus sur les membranes modèles, nous avons pu remarquer que les domaines composants la membrane plasmique se comportent comme les phases Lo et Ld des modèles membranaires. De plus, ces sondes ont permis de mettre en évidence que les domaines de type ordonné sont majoritaires. Ces résultats ont été éprouvés sur trois lignées cellulaires, HeLa, HEK 293 T et CHO et chaque fois des résultats similaires ont été obtenus, seule la fraction de phase Lo change mais reste majoritaire. Toutefois les résultats en microscopie de fluorescence sont moins nets. En effet, la résolution microscopique que nous avons à disposition ne nous a pas permis de voir par imagerie ces domaines. Il serait intéressant de voir si il est possible d'améliorer encore la sélectivité des sondes bNR12S et bQ10S aux phases Ld afin d'améliorer la résolution de marquage et ainsi pouvoir les observer par microscopie. De plus, le quencher peut être utilisé comme accepteur FRET spécifique des phases Ld pour des protéines membranaires et ce groupe de sondes pourrait apporter des informations importantes en microscopie super-résolution ou encore en microscopie haute vitesse. La sonde NR12S développée

préalablement au laboratoire, présente d'excellentes propriétés photo-physiques mais possède quelques inconvénients. En effet, celle-ci ne peut être utilisée en présence de sérum et sur des échantillons fixés, elle va marquer la totalité de la cellule (membrane, cytoplasme, etc), deux conditions qui sont retrouvées régulièrement en biologie. Nous avons alors modifié NR12S pour lui adjoindre un groupement PEG (pNR12S) et un groupement ornithine (fNR12S), le premier pour rendre la molécule compatible avec le sérum et le second pour pouvoir fixer la sonde sur la membrane. Nous avons vu que la sonde pNR12S censée être compatible avec le sérum avait tendance à être internalisée relativement rapidement dans la cellule. Il semblerait que la chaîne PEG choisie dans un premier temps permet à la molécule de pénétrer trop rapidement à l'intérieur de la cellule. Cela est probablement dû à la forme de l'agrégat prise par ces molécules dans un milieu aqueux (micelle recouverte de PEG, voire peut être même micelle inverse lorsqu'elles sont liées à la membrane). Il serait intéressant donc de faire varier la longueur de la chaîne PEG. Cela permettrait de voir si la longueur a un effet direct sur la force de pénétration de la molécule dans la membrane ainsi que sur la compatibilité avec le sérum. La sonde fNR12S quant à elle, va, soit se trouver agrégée en particules fluorescentes soit la fixation n'est pas suffisante pour empêcher l'internalisation de celle-ci dans la cellule, dans les conditions testées ici. Toutefois rien n'est perdu, en effet, l'agent de fixation choisi lors des expériences que nous avons réalisées, est trop petit. Il ne permet pas de relier les sondes aux protéines et autres molécules diverses portant un groupement $-NH_2$ sur la membrane et va forcer une agrégation des molécules entre elles. Il existe d'autres crosslinkers utilisables comme le bissulfosuccinimidyle subérate (BS3 crosslinker) qui est presque 2 fois plus long que glutaraldéhyde et presque 10 fois plus long que formaldéhyde. Des essais de fixation de cellules marquées par cette sonde à l'aide de différents crosslinkers pourraient nous permettre de trouver le protocole idéal pour l'utilisation de ce marqueur. Une fois ce protocole correctement établi, il serait important de l'appliquer à l'étude des domaines lipidiques, nous pourrions ralentir la dynamique des radeaux lipidiques et peut être ainsi les observer.

Nous avons ensuite voulu connaître l'environnement lipidique proche d'une protéine dans la membrane (ici un récepteur), c'est pourquoi dans un premier temps, une sonde capable de se lier à un récepteur a été mise au point avec des collaborateurs (I. Karpenko de

l'équipe du Dr D. Bonnet). Le récepteur d'étude était le RCPG de l'ocytocine et les résultats obtenus nous ont permis de suivre le devenir du récepteur membranaire (quantité, internalisation, devenir, etc.). Le caractère fluorogène de Nile Red a pu être conservé, et l'utilisation d'un linker PEG a même permis de rendre la liaison de la molécule spécifique à la liaison ligand-récepteur. Il a même été possible de mettre au point une méthode permettant de quantifier les récepteurs sur la membrane. Ces résultats ont été probants pour l'étude de l'environnement du récepteur et nous avons donc développé une sonde capable de se loger dans la membrane plasmique. Cette sonde a été dessinée en se basant sur la structure de NR12S et nous avons choisi comme couple ligand/récepteur d'étude, le couple RGD/intégrine. Les premiers résultats obtenus sont assez peu concluants. La molécule possède bien la capacité de se lier à la membrane et conserve sa capacité à distinguer les phases Lo des phases Ld. Par contre, il est difficile d'affirmer que la molécule se lie dans la membrane par l'intermédiaire d'une liaison ligand-récepteur spécifique ou à une liaison due à la nature lipophile de la sonde. La concentration en sonde utilisée était probablement trop importante : excès de sonde par rapport au récepteur et permettait une liaison non spécifique de cette dernière sur la membrane plasmique. De plus, le modèle de cellules choisi n'est pas le plus optimal pour l'imagerie. En effet, celles-ci ont tendance à bien trop s'étaler sur la surface et la membrane apparaît mal résolue. Une série d'expériences supplémentaires est nécessaire, l'utilisation de lignées ayant le récepteur marqué avec un autre fluorophore (BFP, GFP) permettrait de discriminer quel type de liaisons loge la molécule dans la membrane et des études spectroscopiques avec l'antagoniste cylligentide permettrait aussi d'éclaircir le comportement de la molécule. Une diminution de la concentration en sonde devrait aussi être envisagée pour les études microscopiques afin de ne pas saturer les récepteurs. En dernier lieu un changement de modèle pourrait être envisagé, afin d'avoir quelque chose définissant mieux la membrane et ayant moins d'effet sur la morphologie de cette dernière. L'utilisation de la fixation cellulaire serait ici aussi très importante. En effet, cela permet de stabiliser les échantillons biologiques et permet ainsi une observation au microscope dans des conditions optimales. De plus, la fixation arrête les procédés biologiques (systèmes enzymatiques, systèmes membranaires, etc) et peut permettre une mise en évidence de radeaux hautement dynamiques dans la membrane plasmique en les bloquant.

D'un autre côté, nous avons essayé de mettre au point de nouvelles sondes solvatochromes à partir du parent F2N12S. Il s'est avéré que les sondes obtenues, F2N12SM (dérivé de 3-méthoxyflavone) et FC12SM (dérivé de 3-méthoxychromone) possèdent un solvatochromisme important dans les solvants organiques, mais de façon remarquable elles ne présentent pas de sensibilité à l'état des phases des membranes lipidiques. Ces sondes sont toutefois très utiles car elles s'avèrent très brillantes et plus photostables que leur parent F2N12S. Ces marqueurs montrent une absorption et une émission dans la région bleue du spectre visible ce qui les rendent complémentaires des marqueurs fluorescents courants verts et rouges. Il est possible d'utiliser ces sondes simultanément avec les marqueurs LysoTracker vert et mCherry par exemple. Nous avons tenté de mettre au point une technique de quantification de lipides en utilisant le rapport FRET entre F2N12SM et NR12S mais nous n'avons pas la référence exacte de la quantité de lipides présente dans les lignées cellulaires utilisées, ce qui nous empêche de valider cette technique. Toutefois la couleur de ces sondes peut en faire des marqueurs membranaires standards universels, utilisés en parallèle avec les fluorophores courants rouges et verts en imagerie multi-couleurs. Ces marqueurs pourraient aussi être utilisés sur des modèles animaux entiers comme le poisson zèbre. Ils marqueraient les membranes et il serait par exemple possible de suivre le déroulement d'un autre phénomène biologique à l'aide d'un autre marqueur, rouge ou vert.

Nous avons enfin voulu obtenir une sonde à partir de la famille de fluorophore squaraine. Ce fluorophore possède des propriétés photo-physiques excellentes (brillance, rendement quantique, stabilité), une absorption et une émission dans la région rouge lointain du spectre visible, zone également complémentaire des fluorophores courants rouge et vert. De plus, elle présente peu d'auto-fluorescence de la part des échantillons biologiques ce qui permettrait ainsi de l'imagerie in vivo. Nous avons développé un groupe de trois sondes avec des structures différentes (SQ10S, SQ12S et dSQ12S), où une ou deux ancres lipidiques ont été introduites à la partie squaraine, à la dernière étape, par chimie « click ». Il s'est avéré que deux d'entre elles pénètrent plus ou moins rapidement la cellule et qu'elles possèdent toutes trois une orientation parallèle à la membrane. Elles conservent malgré tout les excellentes propriétés du fluorophore et dSQ12S s'avère être une sonde membranaire remarquable. SQ10S, quant à elle, peut servir de marqueur du réticulum

endoplasmique dans le rouge lointain et SQ12S présente une utilité mal définie. Il serait intéressant toutefois de voir s'il est possible d'ancrer SQ12S dans la membrane et de l'orienter perpendiculairement en modifiant la structure du fluorophore, en ajoutant un groupement alkyle sur le cycle aromatique de l'indolénine portant le groupement éthyle afin de plonger le fluorophore dans le cœur lipophile de la membrane. Il serait aussi intéressant d'essayer dSQ12S dans un modèle animal in vivo comme le poisson zèbre ou la souris afin de voir quelles pourraient être les applications en imagerie de l'animal entier de cette sonde. Des essais en imagerie super-résolution pourraient aussi être révélateurs des excellentes capacités de ce marqueur.

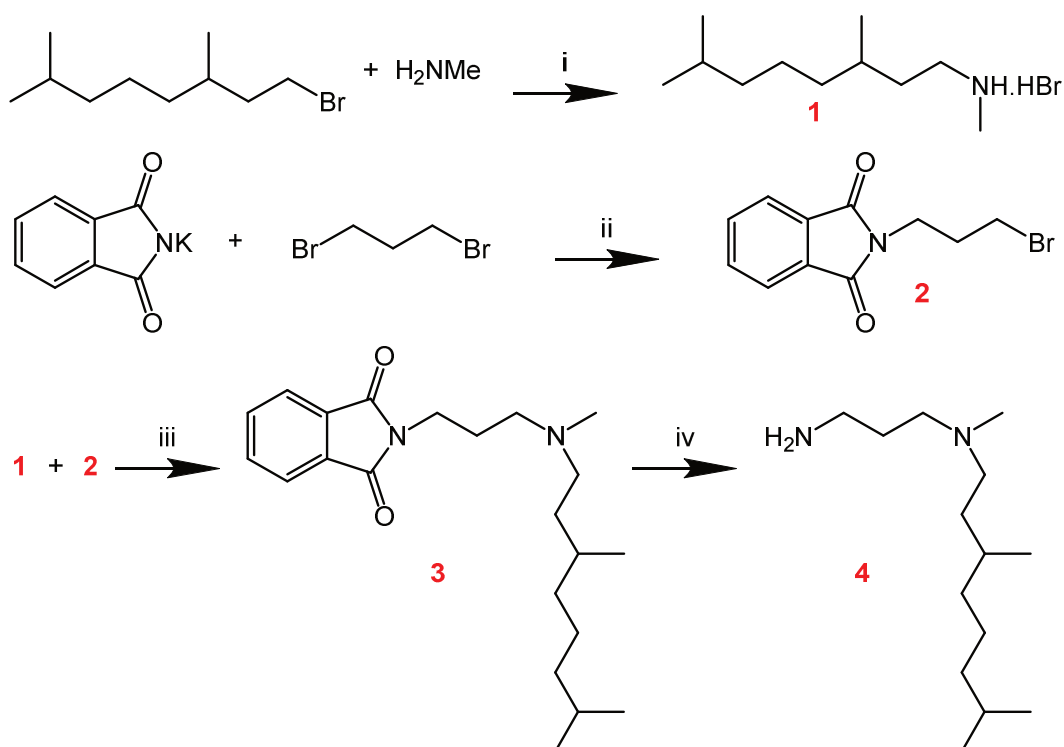
MATERIELS ET METHODES

IV. MATERIELS ET METHODES

1. Synthèse chimique

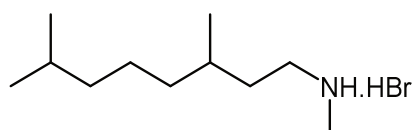
Tous les solvants et produits chimiques ont été achetés chez Alfa Aesar, Sigma-Aldrich ou chez TCI-Europe. Les solvants utilisés sont de qualité analytique. Les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker (Bruker Biospin, Billerica USA) à une fréquence de 400 ou 500 MHz. Les mesures de spectrométrie de masse ont été réalisées sur un Agilent 6520 Accurate Mass QToF et sur un Agilent 1200 RRLC (Agilent Technologies, Santa Clara USA). La purification HPLC (Shimadzu, SPD20A Prominence) a été réalisée sur une colonne C18 (Nucleosil 100Å, 5µm, 250x10, Macherey-Nagel, France) selon les conditions décrites dans le paragraphe correspondant.

1.1. Dérivé Nile Red et Black Hole Quencher



i) THF, TA durant une nuit ; ii) K_2CO_3 , CH_3CN , reflux ($100^\circ C$) durant une nuit ; iii) K_2CO_3 , DMF, chauffage ($110^\circ C$) 2h (40%) ; iv) Hydrazine, EtOH, reflux 3h (82%)

Schéma 1 : Synthèse de l'ancre pour les sondes bNR10S et bQ10S.

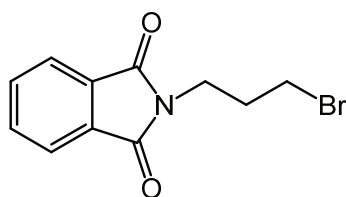


Composé 1 : N,3,7-trimethyloctan-1-amine hydrobromide.

A une solution de H_2NMe (2,5 éq, 25 mL) dans THF, 1-bromo-3,7-diméthyl-octane (1,05 éq), 4 mL) est ajouté lentement. Le mélange est agité durant une nuit à température ambiante. Le solvant est retiré sous vide pour donner le produit désiré sous forme de précipité blanc. Le produit est utilisé directement dans la prochaine étape.

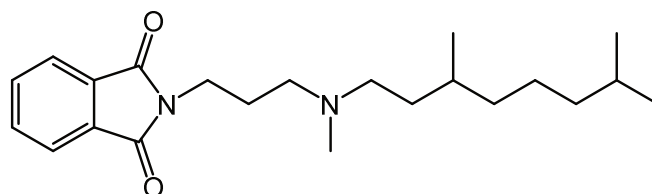
1H RMN (400 MHz, dioxane) δ 3.33 (s, 2H), 2.88 (m, 2H), 2.55(t, $J = 5.2Hz$, 3H), 2.37 (q, $J = 6 Hz$, 2H), 1.62-1.07 (m; 10H), 0.85 (d, $J = 6.8Hz$, 9H).

HR-LC-MS: (m/z), $C_{11}H_{25}N$ Calc. 171,1987, trouvé 171,1983.



Composé 2 : 2-(3-bromopropyl)isoindoline-1,3-dione

Potassium 1,3-dioxoisoindolin-2-ide (1 éq, 10 g) a été ajouté en une fois à une solution de 1,3-dibromopropane (1,05 éq, 6,4 mL) dans CH₃CN avec K₂CO₃ (0,2 éq, 2 g). Le mélange réactionnel est agité durant une nuit à reflux (100°C). Il est ensuite refroidi, trituré et le solvant organique est évaporé. Il en résulte une huile jaune pâle, utilisée directement dans l'étape suivante sans plus ample purification.



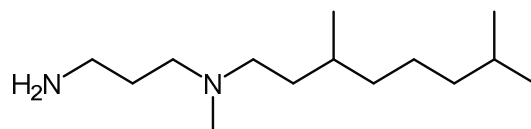
Composé 3 : 2-(3-((3,7-dimethyloctyl)(methyl)amino)propyl)isoindoline-1,3-dione

N¹-(3,7-dimethyloctyl)- N,3,7-trimethyloctan-1-amine hydrobromide (**1**) (1,05 éq, 1,1g) et 2-(3-bromopropyl)isoindoline-1,3-dione (**2**) (1 éq, 1 g) sont dissous dans DMF puis K₂CO₃ (4 éq, 2,16 g) et ajouté au mélange. La réaction est portée à 110°C pour 2h. Le solvant est retiré sous vide. Le produit est alors extrait par EtOAc trois fois et lavé à l'eau. Il est ensuite purifié par colonne chromatographique avec CH₂Cl₂/MeOH (9 :1) comme éluant. Le produit désiré est obtenu sous forme d'une huile jaune à un rendement de 40 %.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.82 (q, J = 2.8 Hz, 2H), 7.69 (q, J = 2.8 Hz, 2H), 3.71 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.48(m, 2H), 2.38 (m, 2H), 2,23 (s, 3H), 1.89 (quin, J = 7.6Hz, 2H) 1.55-1.02 (m, 10H), 0.83 (d, J = 6.4Hz, 9H). HR-LC-MS: (m/z), C₂₂H₃₄N₂O₂ Calc. 358.2620, trouvé 358.2632.

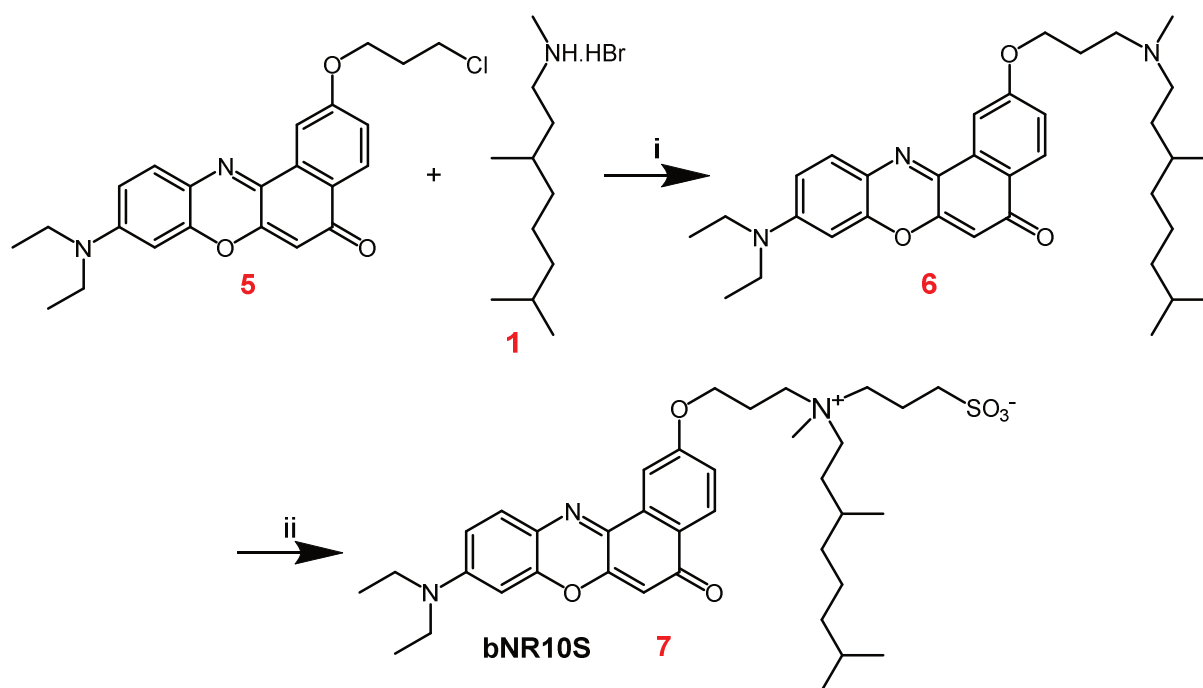
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 168.36, 133.89, 132.16, 123.19, 77.33, 77.21, 77.01, 76.69, 55.65, 55.06, 41.68, 39.26, 37.33, 36.35, 31.26, 27.94, 25.91, 24.66, 22.70, 22.60, 19.70.

HR-LC-MS: (m/z), C₂₂H₃₄N₂O₂ Calc. 358.2620, trouvé 358.2632.



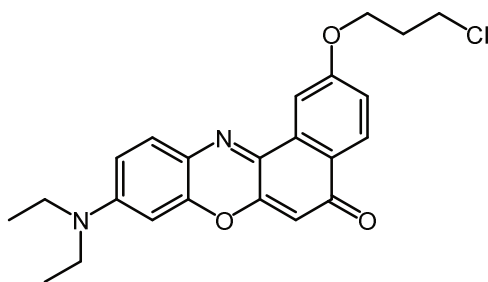
Composé 4 : N^1 -(3,7-dimethyloctyl)- $N1$ -methylpropane-1,3-diamine

A une solution de 2-(3-((3,7-dimethyloctyl)(methyl)amino)propyl)isoindoline-1,3-dione (1 éq, 100 mg) (**3**) dans EtOH, hydrazine (1,5 éq, 21 μ L) a été ajouté et la solution a été chauffée à reflux pendant 3h. Le produit brut a été dissous dans du CH_2Cl_2 et lavé à l'aide d'une solution de NaOH 1M, trois fois (100 mL). Le solvant est retiré sous vide pour obtenir le produit désiré sous forme d'une huile jaunâtre. Le produit a été utilisé directement dans l'état sans plus de purification.



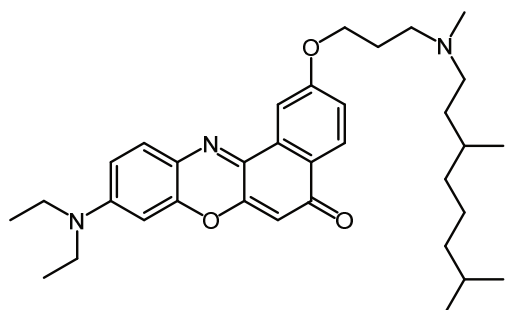
i) KI, K_2CO_3 , CH_3CN , reflux 48h (55%); ii) 1,3-Propanesultone, K_2CO_3 , CH_3CN , reflux 24h (49%)

Schéma 2: Synthèse de bNR10S



Composé 5 : 2-(3-chloropropoxy)-9-(diethylamino)-5H-benzo[a]phenoxazin-5-one

2-(3-Chloropropoxy)-9-(diethylamino)-5H-benzo[a]phenoxazin-5-one a été synthétisé d'après la description de Kucherak et al., 2010.



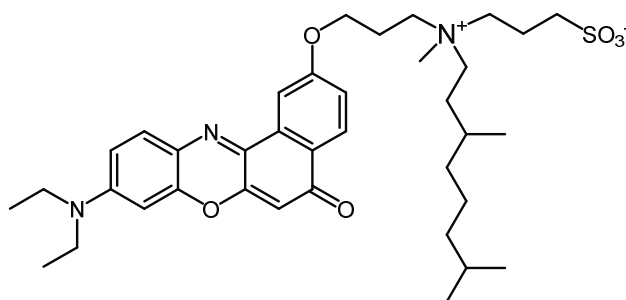
Composé 6 : 9-(diethylamino)-2-(3-((3,7-dimethyloctyl)(methyl)amino)propoxy)-5H-benzo[a]phenoxazin-5-one

2-(3-Chloropropoxy)-9-(diethylamino)-5H-benzo[a]phenoxazin-5-one (**5**) (1 éq, 100 mg) a été dissous dans le plus petit volume de CH₃CN nécessaire (≈15 mL), puis N,3,7-trimethyloctan-1-amine hydrobromide (**1**) (2,2 éq, 156,57 mg). KI (0,5 éq, 20 mg) et K₂CO₃ (2,5 éq, 84 mg) ont ensuite été ajoutés au mélange. La réaction a été chauffée à reflux pour 48h. Le produit brut a ensuite été purifié par colonne chromatographique en utilisant CH₂Cl₂/MeOH (95:5 puis 9:1) comme solvant. Une poudre cristalline rouge sombre a été obtenue avec un rendement de 55%.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.19 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.14 (dd, J = 8.8, 2.8 Hz, 1H), 6.63 (dd, J = 8.8, 2.8 Hz, 1H), 6.43 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.27 (s, 1H), 4.22 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.44 (q, J = 6.8 Hz, 4 H), 2.66 (m, 2H), 2.47 (m, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.08 (quin, J = 6.4 Hz, 2H) 1.58-1.05 (m, 16H), 0.86 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 0.82 (d, J = 6.8 Hz, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 183.27, 161.63, 152.06, 150.72, 146.86, 140.06, 134.08, 131.06, 127.75, 125.68, 124.70, 118.26, 109.49, 106.66, 105.31, 96.32, 77.22, 66.49, 55.81, 54.20, 45.07, 42.07, 39.26, 37.34, 31.30, 27.94, 26.79, 24.69, 22.70, 22.60, 19.73, 12.62.

HR-LC-MS: (m/z), C₃₄H₄₇N₃O₃ Calc. 545.3617, trouvé 545.3612.



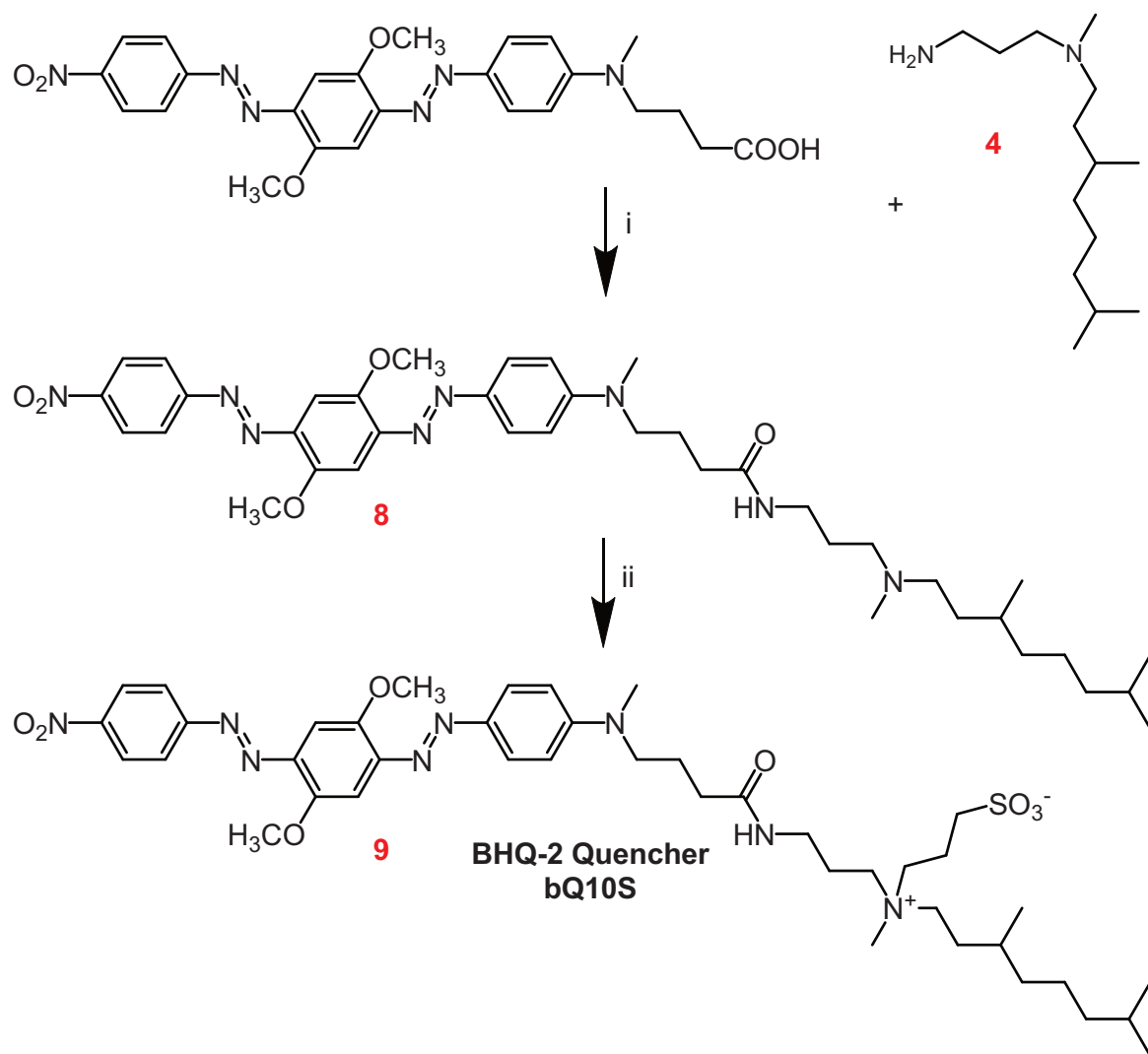
Composé 7 : 3-((3-((9-(diethylamino)-5-oxo-5H-benzo[a]phenoxazin-2-yl)oxy)propyl)(3,7-dimethyloctyl)(methyl)ammonio)propane-1-sulfonate (bNR10S)

9-(Diethylamino)-2-(3-((3,7-dimethyloctyl)(methyl)amino)propoxy)-5H-benzo[a]phenoxazin-5-one (**6**) (1 éq, 60 mg) a été dissous dans CH₃CN (5 mL). 1,3-propanesultone (2,7 éq; 32,9 µL) et K₂CO₃ (2 éq, 30.4mg) ont alors été ajoutés au mélange. Le milieu est chauffé à reflux (90°C) pendant 24h. Le solvant est retiré sous vide et le produit brut est purifié par colonne chromatographique avec CH₃CN/MeOH (9:1 puis 8:2) comme éluant. Une poudre rouge sombre est obtenue avec un rendement de 49%.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.94 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.61 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.98 (dd, J = 9.2, 2 Hz, 1H), 6.35 (dd, J = 9.2, 2 Hz, 1H), 6.12 (d, J = 2 Hz, 1H), 5.94 (s, 1H), 4.11 (br, 2H), 3.67 (br, 5H), 3.55 (br, 2H), 6.29 (q, J = 6.4Hz, 4H), 3.22 (s, 3H), 2.99 (m, 2H), 2.27 (m, 4H), 1.66 (m, 1H), 1.55-1.18 (m, 8H), 1.14 (t, J = 7.2 Hz, 6H), 1.02 (m, 2H), 0.86 (d, J = 6 Hz, 3H), 0.74 (d, J = 6 Hz; 6H).

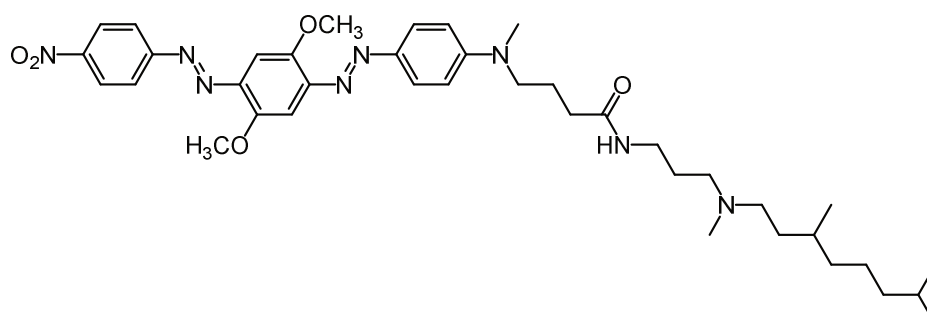
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 182.69, 163.00, 160.65, 151.83, 150.84, 146.55, 138.76, 133.79, 131.10, 127.60, 125.52, 124.74, 117.85, 109.83, 106.63, 104.66, 95.94, 90.75, 64.71, 63.75, 62.62, 48.83, 47.61, 45.06, 39.01, 37.04, 36.99, 30.96, 28.97, 27.88, 24.60, 22.66, 22.54, 19.22, 18.82, 12.68.

HR-LC-MS: (m/z), C₃₈H₅₅N₃O₆S Calc. 667.3655, trouvé 667.3646.



i) $\text{DMF}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, BOP , HOBT , DIEA , TA 6h (45%) ; ii) 1,3-Propanesultone, K_2CO_3 , CH_3CN , reflux 48h (51%)

Schéma 3 : Synthèse du quencher **bQ10S**.

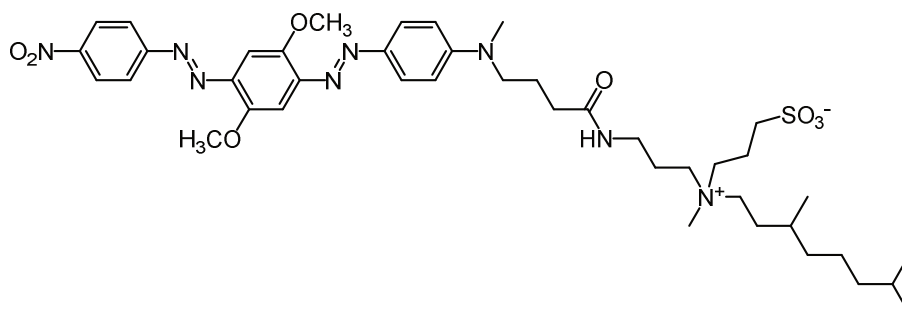


Composé **8** : **4-((4-((E)-(2,5-dimethoxy-4-((E)-(4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)diazenyl)phenyl)(methyl)amino)-N-(3-((3,7-dimethyloctyl)(methyl)amino)propyl)butanamide**

4-((4-((E)-(2,5-dimethoxy-4-((E)-(4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)diazenyl)phenyl)(methyl)amino)butanoic acid (1 éq, 20 mg), N¹-(3,7-dimethyloctyl)-N¹-methylpropane-1,3-diamine (**4**) (1,5 éq, 14 mg), BOP (1.1 éq, 19 mg), HOBT (1.38 éq, 8 mg) et DIEA (5 éq, 35 µL) ont été mélangés ensemble dans un ballon et dissous dans un mélange DMF/CH₂Cl₂ (1:1; 2 mL). La réaction a été laissée à température ambiante pendant 6h. Le produit brut est purifié par CCM préparative, avec MeOH/CH₂Cl₂ (1:9) puis EtOAc/CH₂Cl₂ (2:8) comme éluant. Une poudre cristalline violette sombre est obtenue avec un rendement de 45%.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.33 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 8.01 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.9 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.45 (d, J = 15.6 Hz, 2H), 6.75 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 4.06 (s, 3H), 4.01 (s, 3H), 3.49 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.33 (q, J = 6Hz, 2H), 3.07 (s, 3H), 2.53 (m, 2H), 2.43 (m, 2H), 2.26 (s, 3H) 2.2 (t, J = 6.8Hz, 2H) 1.96 (m, 2H), 1.70 (m, 2H), 1.50 (m, 2H), 1.35-1.04 (m, 9H), 0.85 (d, J = 7.6 Hz, 3H), 0.83 (d, J = 6.8 Hz, 6H).

HR-LC-MS: (m/z), C₃₉H₅₆N₈O₅ Calcd. 716.9125, found 716.9145.



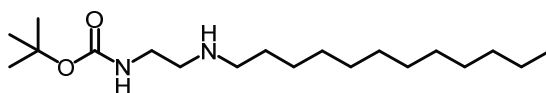
Composé 9 : **3-((3-(4-((4-((E)-(2,5-dimethoxy-4-((E)-(4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)diazenyl)phenyl)(methylamino)butanamido)propyl)(3,7-dimethyloctyl)(methyl)ammonio)propane-1-sulfonate (bQ10S)**

4-((4-((E)-(2,5-dimethoxy-4-((E)-(4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)diazenyl)phenyl)(methylamino)-N-(3-((3,7-dimethyloctyl)(methyl)amino)propyl)butanamide (**5**) (1 éq, 6,7 mg) a été dissous dans CH₃CN (5 mL). 1,3-propanesultone (3 éq ; 2,4 µL) et K₂CO₃ (4 éq, 5 mg) ont été ajoutés au mélange. La réaction a été chauffée à reflux durant 48h et le produit brut a été purifié par CCM préparative avec MeOH/CH₂Cl₂ (2:8) comme éluant. Une poudre cristalline violette sombre est obtenue avec un rendement de 51%.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.34 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 8.01 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.87 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.44 (d, J = 14.4 Hz, 2H), 6.81 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.05 (s, 3H), 4.00 (s, 3H), 3.49 (t, J = 7.2 Hz, 2H) 3.6 (br, 2H), 3.07 (s, 3H), 2.98 (s, 3H), 2.89 (br, 2H), 2.36 (m, 2H), 2.31 (m, 2H), 2.17 (br, 2H), 1.96 (m, 2H), 1.59 (m, 2H), 1.52-1.04 (m, 16H), 0.87 (d, J = 6 Hz, 3H), 0.82 (d, J = 6.8 Hz, 6H). HR-LC-MS: (m/z),

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 156.43, 153.67, 152.32, 150.87, 148.40, 146.79, 144.29, 142.05, 126.21, 124.72, 123.50, 111.53, 101.00, 100.22, 56.89, 56.81, 51.98, 48.49, 38.97, 38.48, 36.86, 34.17, 32.90, 31.92, 30.97, 29.69, 29.35, 29.25, 29.14, 29.03, 27.89, 24.57, 22.96, 22.66, 22.52, 22.34, 19.23, 14.10.

HR-LC-MS: (m/z) C₄₂H₆₂N₈O₈S Calc. 838.4411, trouvé 838.4482.



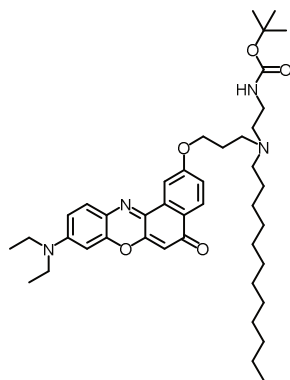
Composé 10 : tert-butyl (2-(dodecylamino)ethyl)carbamate

1-Iodododecane (1 éq ; 8 g) et N-boc-ethylenediamine (1 éq ; 4,33 g) ont été dissous dans du CH₃CN (10 mL) et chauffés à 80°C dans un ballon fermé (dû à la faible température d'ébullition de N-boc-ethylenediamine) durant 6h. Le solvant a été retiré sous vide. Une cristallisation du produit brut est réalisée dans EtOAc (60 mL). Cette étape est faite plusieurs fois afin d'avoir le maximum de produit brut. Les cristaux blancs ainsi obtenus sont alors purifiés par colonne chromatographique en utilisant MeOH/CH₂Cl₂ (de 10 à 20% de MeOH) comme éluant. Le produit se présente sous la forme de cristaux blancs et le rendement de réaction est de 73%.

¹H NMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ 3.27 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.01 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 2.97 – 2.88 (m, 2H), 1.58 (p, J = 7.5 Hz, 2H), 1.36 (s, 9H), 1.32 – 1.17 (m, 18H), 0.80 (t, J = 6.6 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 157.79, 81.23, 48.99, 48.22, 37.56, 31.89, 29.60, 29.59, 29.48, 29.37, 29.32, 28.95, 28.35, 26.57, 25.93, 22.67, 14.10.

HR-LC-MS: (m/z), C₁₉H₄₀N₂O₂S Calc. 329.3123, trouvé 329.3218.



Composé 11 : tert-butyl (2-((3-((9-(diethylamino)-5-oxo-5H-benzo[a]phenoxazin-2-yl)oxy)propyl)(dodecyl)amino)ethyl)carbamate

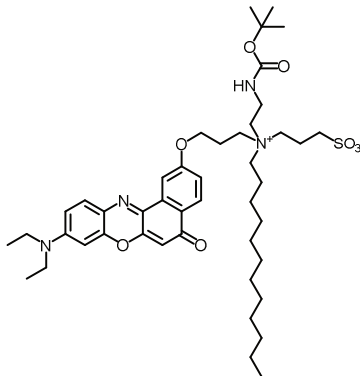
2-(3-Chloropropoxy)-9-(diethylamino)-5H-benzo[a]phenoxazin-5-one (**5**) (1 éq ; 300 mg), KI (0,5 éq ; 60,6 mg) et K₂CO₃ (2.5 éq ; 252.3 mg) sont dissous dans du CH₃CN. Tert-butyl (2-(dodecylamino)ethyl)carbamate (**10**) (1,5 éq ; 359,8 mg) est alors ajouté au mélange, puis la réaction est chauffée à 95°C pendant 24 h. Après cette période 1 équivalent du composé **10**

ainsi que 1 équivalent de K_2CO_3 et 0,5 éq de KI sont ajoutés au milieu et la réaction est encore chauffée à $95^\circ C$ durant 48h supplémentaires. La solution est alors filtrée pour retirer tous les sels présents et le solvant est évaporé. Le produit brut est purifié par colonne chromatographique en utilisant MeOH/ CH_2Cl_2 (5/95) comme éluant. Une poudre rouge sombre est obtenue avec un rendement de 67%.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.14 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.97 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.09 (dd, $J = 8.7, 2.6$ Hz, 1H), 6.58 (dd, $J = 9.1, 2.7$ Hz, 1H), 6.38 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 6.22 (s, 1H), 4.15 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.39 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 3.17 (broad s, 2H), 2.65 (broad s, 2H), 2.55 (broad s, 2H), 2.43 (broad s, 2H), 1.95 (broad s, 2H), 1.35 (s, 11H), 1.26 – 1.11 (m, 25H), 0.80 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 183.24, 161.70, 156.08, 152.04, 150.70, 146.85, 140.12, 134.07, 131.05, 127.77, 125.66, 124.68, 118.19, 109.44, 106.72, 105.33, 96.33, 78.99, 77.22, 66.35, 54.14, 53.44, 50.43, 45.05, 38.36, 31.91, 29.70, 29.68, 29.66, 29.64, 29.35, 28.43, 27.54, 27.06, 22.68, 14.11, 12.62.

HR-LC-MS: (m/z), $C_{42}H_{62}N_4O_5$ Calc. 703.4754, trouvé 703.4882.

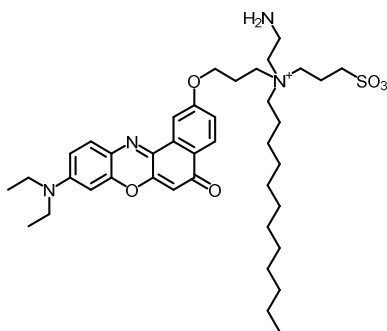


Composé 12 : 3-((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)(3-((9-(diethylamino)-5-oxo-5H-benzo[a]phenoxazin-2-yl)oxy)propyl)(dodecyl)ammonio)propane-1-sulfonate

Tert-butyl (2-((3-((9-(diethylamino)-5-oxo-5H-benzo[a]phenoxazin-2-yl)oxy)propyl)(dodecyl)amino)ethyl)carbamate (**11**) (1 éq ; 200 mg) a été dissous dans CH_3CN (30,68 mL), 1,3-propanesultone (2 éq ; 49,9 μL) et K_2CO_3 (2 éq, 78,6 mg) ont alors été ajoutés au mélange. La réaction est chauffée à $90^\circ C$ sur une nuit. Le solvant est retiré sous vide et le produit brut est purifié par colonne chromatographique avec $CH_3CN/MeOH$ (95:5 puis 9:1) comme éluant. Une poudre rouge sombre est obtenue avec un rendement de 41%.

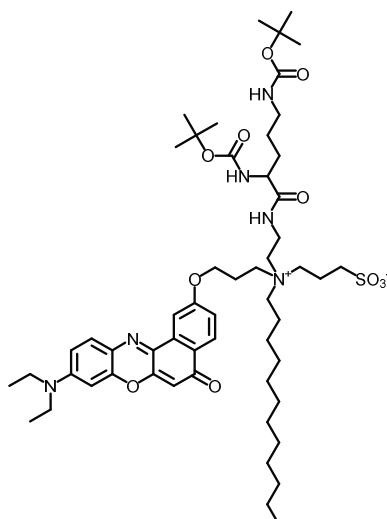
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.87 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.32 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.91 (t, $J = 5.1$ Hz, 1H), 6.63 (m, 1H), 6.53 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.30 (s, 1H), 6.18 (s, 1H), 4.12 (broad s, 2H), 3.87 – 3.70 (m, 2H), 3.66 – 3.48 (m, 5H), 3.39 (q, $J = 7.2$ Hz, 4H), 3.28 (broad s, 2H), 3.05 – 2.77 (m, 4H), 2.32 – 2.17 (m, 3H), 1.72 (broad s, 2H), 1.35 (broad s, 9H), 1.31 – 1.06 (m, 24H), 0.79 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H).

HR-LC-MS: (m/z), $\text{C}_{45}\text{H}_{68}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}$ Calc. 825.4791, trouvé 825.4825.



Composé 13 : 3-((2-aminoethyl)(3-((9-(diethylamino)-5-oxo-5H-benzo[a]phenoxazin-2-yl)oxy)propyl)(dodecyl)ammonio)propane-1-sulfonate

3-((2-((Tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)(3-((9-(diethylamino)-5-oxo-5H-benzo[a]phenoxazin-2-yl)oxy)propyl)(dodecyl)ammonio)propane-1-sulfonate (**12**) (1 éq, 97 mg) est dissous dans CH_2Cl_2 (4 mL) puis TFA est ajouté goutte à goutte sous vive agitation de la réaction pendant 45 min à température ambiante. Le solvant et TFA sont évaporés sous vide et le produit brut est lavé par MeOH, qui est ensuite évaporé sous vide. Cette opération est répétée plusieurs fois. Le TFA résiduel est ensuite enlevé par lavage du produit brut par une solution de Na_2CO_3 . Le produit est utilisé sans plus de purification dans l'étape suivante. Le produit se présente sous la forme d'huile rouge sombre.

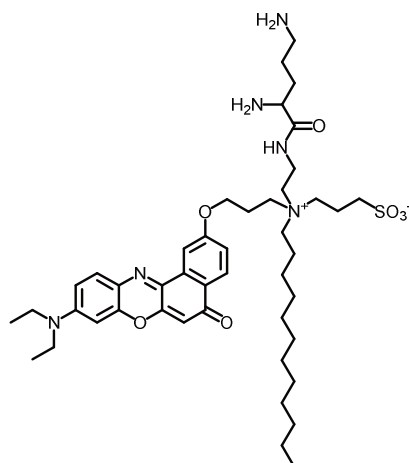


Composé 14 : 9-((tert-butoxycarbonyl)amino)-14-(3-((9-(diethylamino)-5-oxo-5H-benzo[a]phenoxazin-2-yl)oxy)propyl)-14-dodecyl-2,2-dimethyl-4,10-dioxo-3-oxa-5,11,14-triazaheptadecan-14-ium-17-sulfonate

3-((2-Aminoethyl)(3-((9-(diethylamino)-5-oxo-5H-benzo[a]phenoxazin-2-yl)oxy)propyl)(dodecyl)ammonio)propane-1-sulfonate (**13**) (1 éq ; 50 mg), HBTU (1.1 éq ; 28,77 mg), HOBt (1,38 éq ; 12,86 mg) et DIEA (5 éq ; 44,57 mg) sont dissous ensemble dans un mélange CH₂Cl₂/DMF (1/1) (4 mL). Boc-Orn(Boc)-OH est alors ajouté et la réaction est laissée sous agitation pendant 45 min à température ambiante. Le solvant est évaporé sous vide, puis le produit brut est lavé avec une solution saturée en NaCl afin de retirer les sels présents ainsi que les traces résiduelles de DMF. Le produit est purifié sur colonne chromatographique avec CH₂Cl₂/MeOH (95/5 puis 9/1). Les analyses RMN et spectrométrie de masse ont montré la présence du produit accompagné d'une impureté. Il a été utilisé en l'état dans l'étape suivante. Le produit se présente sous la forme d'huile rouge sombre et le rendement de réaction est de 21%.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.04 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.39 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.07 – 6.99 (m, 1H), 6.48 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.25 (s, 1H), 6.07 (s, 1H), 4.31 – 0.90 (m, 92H ; partie mal résolu du spectre, théorique 76H), 0.78 (t, J = 6.7 Hz, 3H).

HR-LC-MS: (m/z) C₅₅H₈₆N₆O₁₁S Calc. 1038.6075, trouvé 1038.6069.

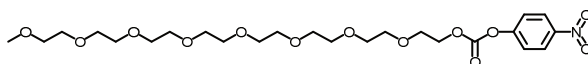


Composé 15 : 3-((2-(2,5-diaminopentanamido)ethyl)(3-((9-(diethylamino)-5-oxo-5H-benzo[a]phenoxazin-2-yl)oxy)propyl)(dodecyl)ammonio)propane-1-sulfonate (fNR12S)

9-((Tert-butoxycarbonyl)amino)-14-(3-((9-(diethylamino)-5-oxo-5H-benzo[a]phenoxazin-2-yl)oxy)propyl)-14-dodecyl-2,2-dimethyl-4,10-dioxo-3-oxa-5,11,14-triazaheptadecan-14-ium-17-sulfonate (**14**) (1 éq ; 15 mg) est dissous dans TFA (4 mL) et le mélange est laissé sous agitation pendant 45 min à température ambiante. Le solvant et TFA sont évaporés sous vide et le produit brut est lavé par MeOH, qui est ensuite évaporé sous vide. Cette opération est répétée plusieurs fois. Le TFA résiduel est ensuite enlevé par lavage du brut par une solution de Na₂CO₃. Le produit se présente sous la forme d'une poudre rouge sombre et le rendement de réaction est de 91%.

¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.94 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.06 (dd, *J* = 8.7, 2.7 Hz, 1H), 6.66 (dd, *J* = 9.1, 2.7 Hz, 1H), 6.41 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.07 (s, 1H), 4.21 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.56 (m, 6H), 3.40 (m, 6H), 2.85 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.53 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.28 (broad s, 2H), 2.18 (broad s, 2H), 1.73 (broad s, 2H), 1.44 (broad s, 2H), 1.33 – 1.02 (m, 34H), 0.76 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H).

HR-LC-MS: (m/z) C₄₅H₇₀N₆O₇S Calc. 838.5027, trouvé 838.5009.

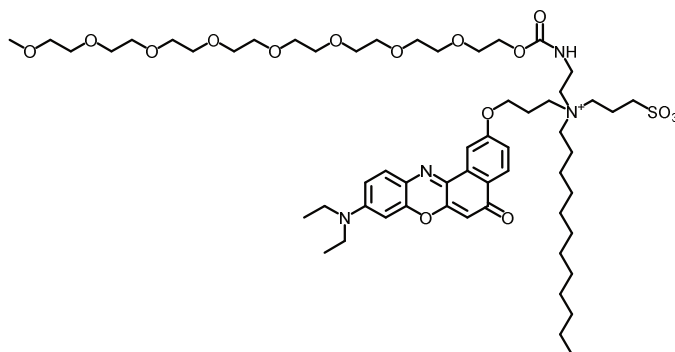


Composé 17 : 4-nitrophenyl (2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-yl) carbonate

2,5,8,11,14,17,20,23-Octaoxapentacosan-25-ol (1 éq ; 100 mg) et pyridine (3 éq ; 61,72 mg) sont dissous dans CH₂Cl₂ (4 mL). 4-nitrophenyl chloroformate (2 éq, 104,9 mg) est alors ajouté à la réaction, celle-ci est laissée sous agitation pendant 3h à température ambiante. Le solvant est retiré par évaporateur rotatif, le produit brut est ensuite purifié par colonne chromatographique utilisant EtOAc/Acétone (1/1) comme solvant. Le produit se présente sous la forme d'huile jaunâtre et le rendement de réaction est de 42%.

¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.33 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.50 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 4.48 – 4.41 (m, 2H), 3.83 – 3.79 (m, 2H), 3.69 – 3.61 (m, 32H), 3.56 – 3.52 (m, 2H), 3.36 (s, 4H). ¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 163.98, 155.76, 152.61, 145.48, 125.72, 124.94, 121.96, 115.25, 71.59, 70.23, 70.19, 70.18, 70.16, 69.98, 68.39, 68.13, 57.74.

HR-LC-MS: ([M+H+CH₃OH]⁺) C₂₄H₄₁NO₁₄ Calc. 567.2527, trouvé 567.2767.



Composé 18 : 31-(3-((9-(diethylamino)-5-oxo-5H-benzo[a]phenoxazin-2-yl)oxy)propyl)-31-dodecyl-27-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26-nonaoxa-28,31-diazatetracontan-31-ium-34-sulfonate (pNR12S)

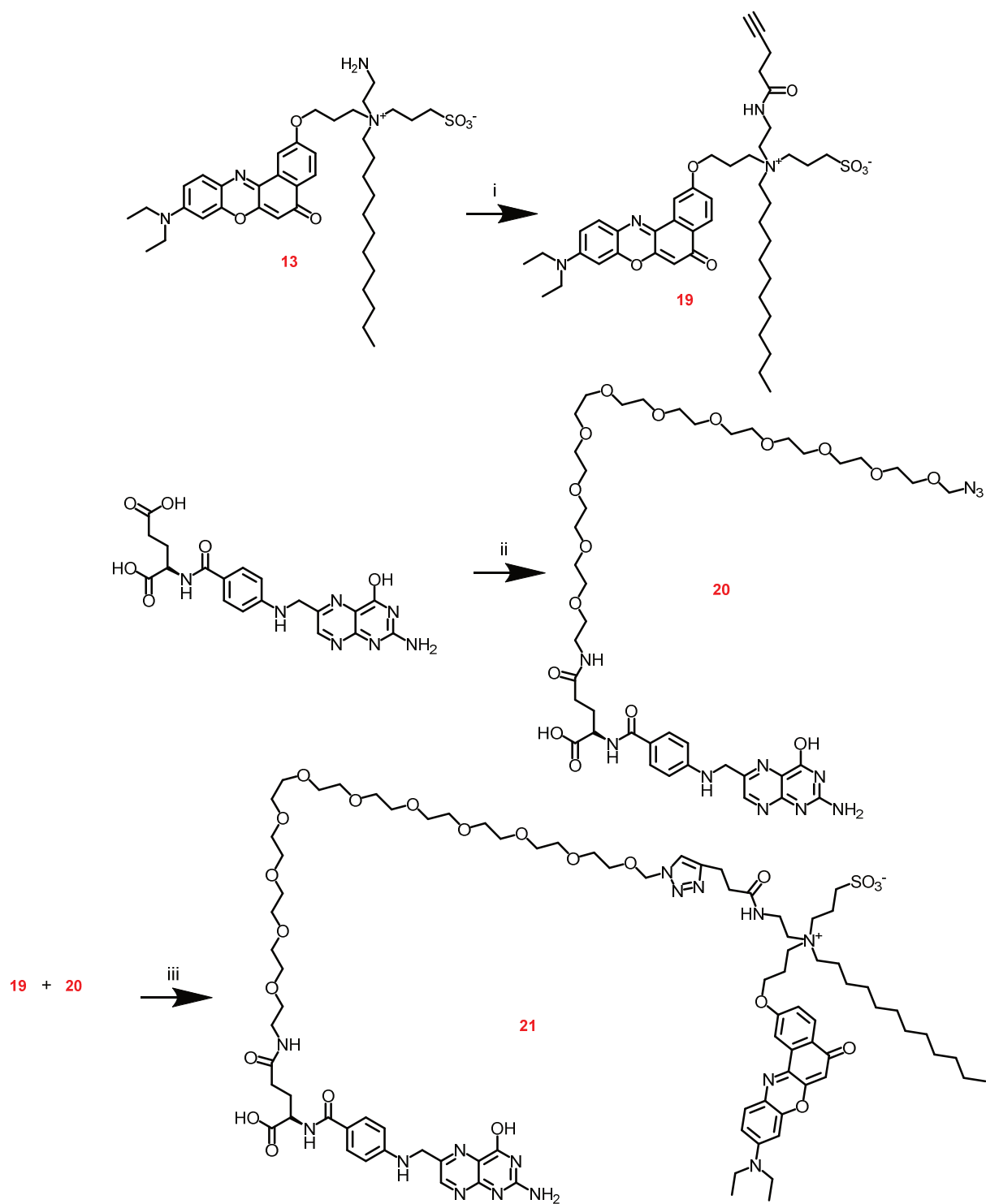
3-((2-Aminoethyl)(3-((9-(diethylamino)-5-oxo-5H-benzo[a]phenoxazin-2-yl)oxy)propyl)(dodecyl)ammonio)propane-1-sulfonate (**13**) (1 éq ; 40,37 mg) et 4-nitrophenyl (2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-yl) carbonate (**17**) (2 éq ; 61,2 mg) sont dissous dans DMF (5mL), DIEA (30 éq ; 215,9 mg) est ensuite ajouté au mélange. La réaction est alors laissée sous agitation pendant 5h à 80°C. Le solvant est ensuite évaporé sous vide et le produit brut est purifié par colonne chromatographique avec CH₂Cl₂/MeOH (9/1) comme

éluant. Le produit se présente sous la forme d'une poudre rouge sombre et le rendement de réaction est de 42%.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.05 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.42 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.03 (dd, *J* = 8.5, 2.5 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 6.49 (dd, *J* = 9.2, 2.6 Hz, 1H), 6.27 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.09 (s, 1H), 4.22 – 4.07 (m, 4H), 3.84 – 3.44 (m, 36H), 3.37 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 3.30 (s, 3H), 3.21 (broad s, 2H), 2.93 (broad s, 2H), 2.26 (broad s, 2H), 2.19 (broad s, 2H), 2.06 (broad s, 2H), 1.71 (broad s, 2H), 1.33 – 1.08 (m, 24H), 0.79 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H).

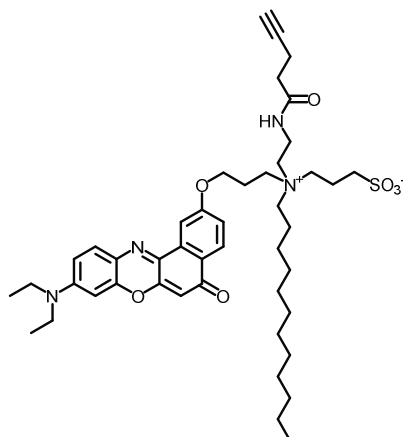
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 206.86, 182.80, 160.53, 157.28, 151.90, 150.81, 146.66, 139.15, 133.94, 131.17, 127.69, 125.93, 124.68, 118.01, 109.66, 106.46, 104.98, 96.06, 71.91, 70.56, 70.53, 70.51, 70.49, 70.47, 69.28, 64.62, 64.17, 58.98, 47.21, 45.05, 34.67, 31.88, 30.89, 29.68, 29.61, 29.60, 29.49, 29.31, 29.18, 26.42, 22.65, 22.03, 21.84, 14.10, 12.66.

HR-LC-MS: (m/z) C₅₈H₉₄N₄O₁₆S Calc. 1136.6542, trouvé 1136.6536.



i) 4-pentynoic acid, BOP, HOBt, DIEA, DMF/CH₂Cl₂ (1/1), TA, 12h (90%); ii) H₂N-PEG₁₂-N₃, DCC, pyridine, DMSO, sur la nuit à 50°C (68%) ; iii) CuSO₄, ascorbate de sodium, dioxane/eau (3/1), TA, 30 min (76%).

Schéma 4 : Synthèse de la sonde dérivée de NR12S spécifique au récepteur à l'acide folique.



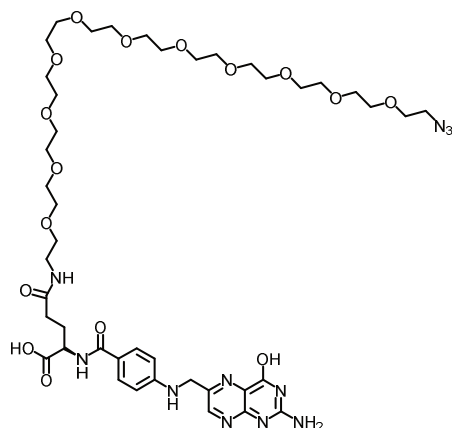
Composé 19 : 3-((3-((9-(diethylamino)-5-oxo-5H-benzo[a]phenoxazin-2-yl)oxy)propyl)(dodecyl)(2-(pent-4-ynamido)ethyl)ammonio)propane-1-sulfonate

3-((2-Aminoethyl)(3-((9-(diethylamino)-5-oxo-5H-benzo[a]phenoxazin-2-yl)oxy)propyl)(dodecyl)ammonio)propane-1-sulfonate (**13**) (1 éq ; 166,1 mg), BOP (1,5 éq ; 182,8mg), HOBt (1,9 éq ; 70,75 mg) et DIEA (5 éq ; 178,1 mg) sont dissous dans un mélange DMF/CH₂Cl₂ (1/1) (4mL). L'acide 4-pentynoïque (1,5 éq ; 40,55 mg) est alors ajouté au mélange et la réaction est gardée sous agitation et sous argon à température ambiante pour 12h. Le solvant est évaporé sous vide, puis le produit brut est lavé avec une solution saturée en NaCl afin de retirer les sels présents ainsi que les traces résiduelles de DMF. Le produit est purifié avec une colonne chromatographique avec CH₂Cl₂/MeOH (95/5 puis 9/1). Le produit se présente sous la forme d'huile rouge sombre et le rendement de réaction est de 90%.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.47 (s, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.27 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.49 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.25 (s, 1H), 6.12 (s, 1H), 4.10 (broad s, 2H), 3.72 (broad s, 4H), 3.44 – 3.32 (m, 4H), 3.26 (broad s, 2H), 3.01 (broad s, 6H), 2.46 (broad s, 4H), 2.29 (broad s, 4H), 2.03 (s, 1H), 1.74 (broad s, 2H), 1.38 – 1.02 (m, 24H), 0.78 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 182.74, 172.78, 160.50, 151.80, 150.76, 146.53, 138.92, 133.79, 131.07, 127.65, 125.74, 124.61, 117.92, 109.67, 106.50, 104.84, 95.96, 83.30, 69.49, 64.59, 59.54, 58.21, 47.42, 45.03, 34.62, 33.06, 31.89, 29.63, 29.61, 29.53, 29.32, 29.24, 26.45, 22.66, 22.05, 21.88, 18.50, 14.62, 14.10, 12.69.

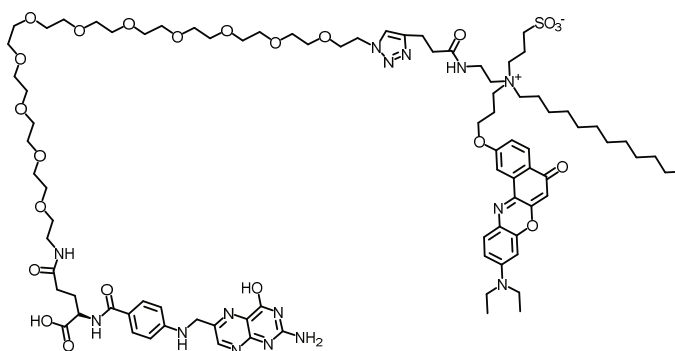
HR-LC-MS: (m/z) C₄₅H₆₄N₄O₇S Calc. 804.4489, trouvé 804.4496.



Composé 20 : (S)-39-(4-(((2-amino-4-hydroxypteridin-6-yl)methyl)amino)benzamido)-1-azido-36-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undeca-oxa-35-azatetracontan-40-oic acid

L'acide folique (1 éq ; 26 mg) est tout d'abord dissous dans DMSO (2 mL), la solution peut être soniquée pour faciliter la dissolution. DCC (2 éq ; 24 mg) est alors ajouté à la solution. H₂N-PEG₁₂-N₃ est solubilisé dans la pyridine (500 µL) est ajouté à la solution. 500 µL supplémentaires de pyridine sont utilisés pour rincer le récipient utilisé pour dissoudre H₂N-PEG₁₂-N₃ puis ajoutés à la solution. La réaction est laissée sous agitation durant une nuit à 50°C. La solution est ensuite ramenée à température ambiante, puis déversée dans de Et₂O froid. Le produit précipite, il est récupéré par filtration. Le solide collant jaune obtenu est donc dissous dans de l'eau et purifié sur colonne pré-tassée G25. L'analyse CCM indique l'absence d'acide folique libre dans le milieu réactionnel. Le produit se présente sous la forme d'un solide jaune et le rendement de réaction est de 68%.

MALDI-MS: C₄₃H₆₇N₁₁O₁₆ Calc. 993.47, trouvé 993.39.

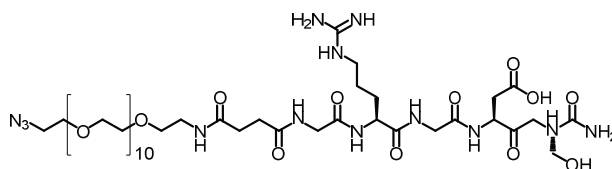


Composé 21 : *3-((2-(3-(1-((S)-41-(4-(((2-amino-4-hydroxypteridin-6-yl)methyl)amino)phenyl)-39-carboxy-36,41-dioxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecaoxa-35,40-diazahentetracontyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propanamido)ethyl)(3-((9-(diethylamino)-5-oxo-5H-benzo[a]phenoxazin-2-yl)oxy)propyl)(dodecyl)ammonio)propane-1-sulfonate*

Le composé 21 va être obtenu par couplage « click ». (S)-39-(4-(((2-amino-4-hydroxypteridin-6-yl)methyl)amino)benzamido)-1-azido-36-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecaoxa-35-azatetracontan-40-oic acid (**20**) (1 éq ; 18,52 mg) et 3-((3-((9-(diethylamino)-5-oxo-5H-benzo[a]phenoxazin-2-yl)oxy)propyl)(dodecyl)(2-(pent-4-ynamido)ethyl)ammonio)propane-1-sulfonate (**19**) (1 éq ; 15 mg) sont dissous dans du dioxane (3 mL). CuSO₄ et l'ascorbate de sodium sont dissous dans un eppendorf avec de l'eau et la solution ainsi obtenue est agitée à l'aide d'une pipette jusqu'à l'obtention d'une couleur jaune/orange opaque. Le Cu²⁺ est alors oxydé en Cu⁺ et va pouvoir servir de catalyseur à la réaction click. Le contenu de l'eppendorf est ensuite ajouté à la solution de **19** et **20** dans dioxane et la réaction est laissée sous agitation pendant 30 min. Le solvant est retiré par évaporation sous vide et le produit brut est purifié par colonne d'exclusion stérique LH-20 avec MeOH/CH₂Cl₂ (1/1) comme éluant. Le produit se présente sous la forme d'une poudre rouge sombre et le rendement de réaction est de 76%.

HR-LC-MS: (m/z) C₈₈H₁₃₁N₁₅O₂₃S Calc. 1797.9263, trouvé 1797.9269.

Le chromatogramme d'HPLC est représenté en annexe (A).

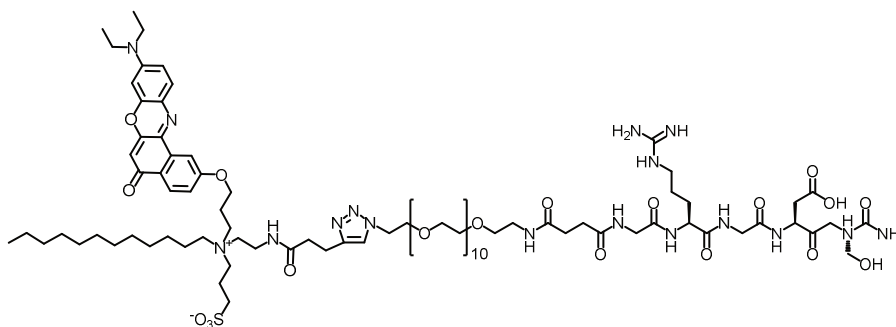


Composé 22 : (44S,50S)-50-((S)-4-amino-3-(hydroxymethyl)-4-oxobutanoyl)-1-azido-44-(3-guanidinopropyl)-36,39,42,45,48-pentaoxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undeca-oxa-35,40,43,46,49-pentaazadopentacontan-52-oic acid

Dans un premier temps, pour le composé **22**, le peptide Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) a été synthétisé sur phase solide en stratégie Fmoc. Le choix de la structure ainsi que la stratégie générale de synthèse de ce peptide ont été inspirés par les travaux de Houseman et Mrksich, 1998. La synthèse a été réalisée sur résine Rink Amide AM (0,58 mmol/gr ; Activotec). Une fois le peptide synthétisé, une fraction de celui-ci a été prélevée et conservée sur la résine (1 éq, 63,14 mg estimé) et le groupement N-terminal a été déprotégé. De l'anhydride succinique (10 éq ; 129,1 mg) a été ouvert sur le peptide afin de convertir le groupement -NH₂ terminal en groupement -COOH. La réaction a eu lieu dans DMF (6 mL) avec DIEA (5 éq ; 83,36 mg) à température ambiante pendant 1h. La résine a ensuite été rincée plusieurs fois avec DMF (5x6 mL). Le groupement H₂N-PEG₁₂-N₃ (1,5 éq ; 118,9 mg) a ensuite été couplé à notre peptide modifié à l'aide de HATU (5 éq ; 245,2mg) et DIEA (5 éq ; 83,36 mg) dans DMF à température ambiante pendant 3h. La résine a ensuite été lavée par DMF (5x6 mL) puis par MeOH (5x6 mL). Le produit a ensuite été décroché de la résine et déprotégé par une solution TFA/TIS/eau (95 :2,5 :2,5) (10 mL) pendant 2h à température ambiante. Le produit ainsi décroché a été précipité dans Et₂O froid. Et₂O a été enlevé, le produit a été alors séché et lyophilisé. Une fois lyophilisé, il a été purifié par HPLC semi-préparative, sur colonne C18 avec la méthode suivante : t=0 à t=5 min 20% de solution B (90% CH₃CN ; 9,95 % H₂O et 0,05% TFA), puis t=5 à t=45 min 35% de solution B, puis de t=45 à t=55 min 100 % de solution B. La solution A quant à elle est un mélange d'eau et de TFA (0.05%).

HR-LC-MS: (m/z) C₉₀H₁₄₇N₁₇O₂₃S Calc. 1141.5827, trouvé 1141.5820.

Le chromatogramme d'HPLC est représenté en annexe (B).



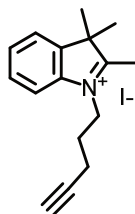
Composé 23 : **3-((2-(3-(1-((4*S*,5*S*,5*S*)-5*A*-amino-5*O*-(carboxyméthyl)-4*A*-(3-guanidinopropyl)-5*S*-(hydroxyméthyl)-3*A*,3*A*,4*A*,4*A*,4*A*,4*A*,5*A*,5*A*-hepta-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undéca-oxa-35,40,43,46,49-pentaazatétrapentacontyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)propanamido)éthyl)(3-((9-(diéthylamino)-5-oxo-5*H*-benzo[*a*]phénoxazin-2-yl)oxy)propyl)(dodécyl)ammonio)propane-1-sulfonate**

Le composé **23** a été obtenu par couplage « click ». (4*S*,5*S*)-5*O*-((*S*)-4-amino-3-(hydroxyméthyl)-4-oxobutanoyl)-1-azido-4*A*-(3-guanidinopropyl)-3*A*,3*A*,4*A*,4*A*,4*A*,4*A*,5*A*,5*A*-hepta-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undéca-oxa-35,40,43,46,49-pentaazadopentacontan-52-oi- acid (**22**) (1 éq ; 17,2 mg) et 3-((3-((9-(diéthylamino)-5-oxo-5*H*-benzo[*a*]phénoxazin-2-yl)oxy)propyl)(dodécyl)(2-(pent-4-ynamido)éthyl)ammonio)propane-1-sulfonate (**19**) (1,5 éq ; 17,52 mg) sont dissous dans du dioxane (3 mL). CuSO₄ et l'ascorbate de sodium sont dissous dans un eppendorf avec de l'eau. La solution ainsi obtenue est agitée à l'aide d'une pipette jusqu'à l'obtention d'une couleur jaune/orange opaque. Le Cu²⁺ est alors réduit en Cu⁺ et va pouvoir servir de catalyseur à la réaction click. Le contenu de l'eppendorf est ajouté à la solution de **19** et **22** dans dioxane et la réaction est laissée sous agitation pendant 30 min. Le solvant est ensuite retiré par évaporation sous vide et le produit brut est purifié par colonne d'exclusion stérique Sephadex® LH-20 avec MeOH/CH₂Cl₂ (1/1) comme éluant.

HR-LC-MS: (m/z) C₉₀H₁₄₇N₁₇O₂₃S Calc. 1946.0322, trouvé 1946.0323.

Le chromatogramme d'HPLC est représenté en annexe (C).

1.2. Dérivé squaraine, SQ12S, dSQ12S et SQ10S



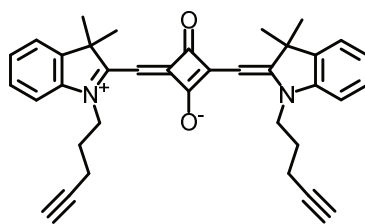
Composé 24 : 2,3,3-triméthyl-1-(pent-4-yn-1-yl)-3H-indol-1-ium iodide

De l'iodure de potassium (2.2 éq ; 7,1 g) est suspendu dans CH₃CN (25 mL), puis 5-chloro-1-pentyne (1 éq, 2,0 g) est ajouté, la suspension jaune est alors agitée à 50°C. Après 10 min, 2,3,3-triméthylindolenine (1 éq, 3,1 g) est ajouté goutte à goutte et le mélange réactionnel est chauffé à reflux durant la nuit. Le mélange est ensuite refroidi à température ambiante et les sels inorganiques sont retirés par filtration. Le solvant est retiré par évaporation sous vide, le produit brut ainsi obtenu est dissous dans une petite quantité d'acétone, puis la solution est précipitée dans de l'éther froid, 3 fois. Le produit final est ainsi obtenu sous la forme de cristaux violets sombres avec un rendement de 20%.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.79 – 7.72 (m, 1H), 7.57 – 7.47 (m, 3H), 4.87 – 4.77 (m, 2H), 3.15 (s, 3H), 2.44 (td, *J* = 6.4, 2.6 Hz, 2H), 2.19 (p, *J* = 6.5 Hz, 3H), 2.05 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 1.61 (s, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 196.53, 141.57, 141.07, 130.20, 129.64, 123.27, 115.58, 81.99, 71.14, 54.77, 48.86, 26.59, 23.28, 17.36, 16.18.

HR-LC-MS: (m/z) C₁₆H₂₀N Calc. 226.1596, trouvé 226.1596.



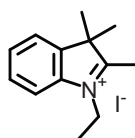
Composé 25 : 4-((3,3-diméthyl-1-(pent-4-yn-1-yl)-3H-indol-1-ium-2-yl)méthylène)-2-((3,3-diméthyl-1-(pent-4-yn-1-yl)indolin-2-ylidène)méthyl)-3-oxocyclobut-1-en-1-olate

2,3,3-triméthyl-1-(pent-4-yn-1-yl)-3H-indol-1-ium (**24**) (0,5 éq; 32,3 mg) et 3,4-dihydroxycyclobut-3-ène-1,2-dione (1 éq ; 200 mg) sont dissous dans de la pyridine (5 mL), le milieu réactionnel est chauffé à 100°C durant une nuit (12/16 h). Le solvant est évaporé sous vide et le produit brut est lavé par une solution HCl 1 M, 3 fois pour retirer la totalité de la pyridine. Le produit est ensuite purifié par colonne chromatographique avec CH₂Cl₂/MeOH (98/2) comme éluant. Le produit est obtenu sous forme d'une poudre bleu-vert avec un rendement de 10 %.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.30 – 7.22 (m, 4H), 7.11 – 7.02 (m, 4H), 5.91 (s, 2H), 4.09 (s, 4H), 2.28 (td, *J* = 6.7, 2.6 Hz, 4H), 2.08 (t, *J* = 2.6 Hz, 2H), 1.98 (p, *J* = 6.9 Hz, 5H), 1.71 (s, 12H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 182.16, 179.99, 170.12, 142.44, 142.05, 127.86, 123.85, 122.31, 109.41, 86.70, 82.66, 77.24, 70.19, 49.35, 42.30, 27.13, 25.65, 16.14.

HR-LC-MS: (m/z) C₃₆H₃₆N₂O₂ Calc. 528.27768, trouvé 528.27705.



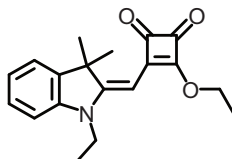
Composé 26 : 1-éthyl-2,3,3-triméthyl-3H-indol-1-ium iodide

2,3,3-Triméthylindolenine (1 éq ; 5,1 g) et idoéthane (3 éq ; 14,8 g) sont dissous dans CH₃CN (75 mL), la réaction est chauffée à 85°C (reflux) sous agitation pendant 48h. Le solvant est entièrement évaporé sous vide et le produit brut est redissous dans une petite quantité d'acétone. La solution est précipitée dans de l'éther froid à plusieurs reprises (3 fois) afin d'obtenir le maximum de produit. Celui-ci est obtenu sous forme de cristaux roses avec un rendement de 97 %.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.67 (tdd, $J = 4.3, 3.7, 2.9, 2.1$ Hz, 1H), 7.57 – 7.48 (m, 3H), 4.71 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.10 (s, 3H), 1.58 (d, $J = 11.5$ Hz, 9H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 195.42, 141.72, 140.63, 130.18, 129.61, 123.38, 115.33, 54.67, 45.56, 23.13, 16.99, 13.52.

HR-LC-MS: (m/z) $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}$ Calc. 188.1439, trouvé 188.1442.



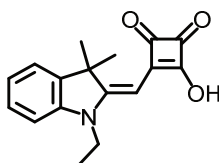
Composé 27 : *(E)-3-ethoxy-4-((1-ethyl-3,3-dimethylindolin-2-ylidene)methyl)cyclobut-3-ene-1,2-dione*

1-Ethyl-2,3,3-trimethyl-3H-indol-1-ium (**26**) (1,2 éq ; 2,2 g), diéthyl squarate (1 éq ; 1 g) et Et_3N (2,7 éq ; 1,6 g) sont dissous dans EtOH (20 mL). Le mélange est porté à reflux pendant 6h (maximum). Le solvant est ensuite retiré par évaporateur rotatif et le produit brut est purifié par colonne chromatographique avec $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95/5) comme éluant. Le produit est obtenu sous forme d'un solide orange avec un rendement de 59 %.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.23 – 7.18 (m, 2H), 7.01 (td, $J = 7.5, 1.0$ Hz, 1H), 6.82 (dd, $J = 8.3, 1.0$ Hz, 1H), 5.34 (s, 1H), 4.83 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.82 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.55 (s, 6H), 1.47 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.27 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H).

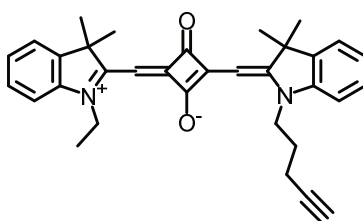
$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 192.53, 187.48, 187.43, 173.78, 167.97, 142.14, 141.07, 127.77, 122.69, 122.03, 108.12, 80.94, 69.89, 47.98, 37.66, 26.89, 15.93, 11.35.

HR-LC-MS: (m/z) $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ Calc. 331.1521, trouvé 311.1509.



Composé 28 : *(E)-3-((1-ethyl-3,3-dimethylindolin-2-ylidene)methyl)-4-hydroxycyclobut-3-ene-1,2-dione*

(E)-3-ethoxy-4-((1-ethyl-3,3-dimethylindolin-2-ylidene)methyl)cyclobut-3-ene-1,2-dione (**27**) (1 éq ; 400 mg) est dissous dans EtOH (5 mL) et porté à reflux. 300 μ L d'une solution de NaOH 40 % est alors ajoutée à la solution, solution chauffée pour 5 min supplémentaire. La réaction est stoppée par de la résine IR120. La résine est filtrée et le solvant retiré par évaporation sous vide. Le produit est utilisé sans plus ample purification.



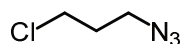
Composé 29 : *2-((3,3-dimethyl-1-(pent-4-yn-1-yl)indolin-2-ylidene)methyl)-4-((1-ethyl-3,3-dimethyl-3H-indol-1-ium-2-yl)methylene)-3-oxocyclobut-1-en-1-olate*

(E)-3-((1-ethyl-3,3-dimethylindolin-2-ylidene)methyl)-4-hydroxycyclobut-3-ene-1,2-dione (**28**) (1 éq ; 200 mg) et 2,3,3-triméthyl-1-(pent-4-yn-1-yl)-3H-indol-1-ium (**24**) (1 éq ; 249,4 mg) sont dissous dans 8 mL d'un mélange toluène/n-butanol (1/1) et chauffés à reflux à l'aide d'un appareil de Dean-Stark pendant 18 h. Au bout de 5 min la solution prend une couleur verte, puis se modifie après une heure en prenant une couleur bleu-vert. Le solvant est retiré sous vide et le produit brut est purifié à l'aide d'une colonne chromatographique en utilisant EtOAc/MeOH (95/5) comme éluant. Le produit est obtenu sous forme d'une poudre bleu-vert avec un rendement de 76 %.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.32 – 7.21 (m, 4H), 7.12 – 7.01 (m, 3H), 6.94 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 5.94 – 5.83 (m, 2H), 4.03 (s, 4H), 3.42 (s, 1H), 2.28 (td, $J = 6.7, 2.6$ Hz, 2H), 1.98 (p, $J = 6.9$ Hz, 2H), 1.72 (s, 12H), 1.33 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 182.36, 180.35, 179.37, 170.09, 169.68, 142.33, 141.92, 127.81, 123.85, 123.65, 122.37, 122.29, 109.23, 86.40, 82.71, 77.33, 77.22, 77.02, 76.70, 70.13, 50.83, 49.43, 49.23, 42.23, 38.48, 27.18, 26.96, 25.62, 16.14, 12.05.

HR-LC-MS: ($\text{M}+\text{H}^+$) $\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_2$ Calc. 491.2698, trouvé 491.2691.

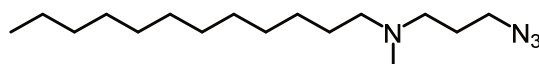


Composé 30 : 1-azido-3-chloropropane

De l'azoture de sodium (1,2 éq ; 3,9 g) est ajouté à une solution de 1-bromo-3-chloropropane (1 éq ; 8 g) dans 100 mL de DMF. La solution est agitée durant une nuit à température ambiante. Le produit est extrait par un mélange diéthy-éther/eau et la phase organique est récupérée. Elle est ensuite lavée plusieurs fois avec de l'eau et séchée à l'aide de Na_2SO_4 . La solution est concentrée sous vide pour donner le produit désiré sous forme d'une huile sans couleur avec un rendement de 86%. L'analyse RMN nous montre la présence du produit de départ à 30 %

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3.57 (t, $J = 6.2$ Hz, 3H), 3.44 (t, $J = 6.4$ Hz, 3H), 1.95 (p, $J = 6.3$ Hz, 3H).

HR-LC-MS: ($\text{M}+\text{H}^+$) $\text{C}_3\text{H}_6\text{ClN}_3$ Calc. 119.0250, trouvé 119.0326.



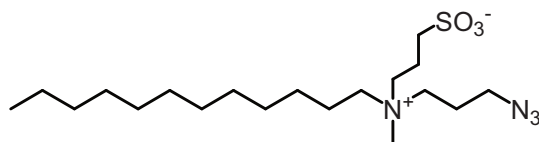
Composé 31 : N-(3-azidopropyl)-N-methyldodecan-1-amine

1-azido-3-chloropropane (**30**) (1 éq ; 0,8 g) et dodecyl(méthyl)amine sont dissous dans 15 mL de CH_3CN . La solution est chauffée (80 °C) dans un ballon fermé (pour éviter l'évaporation du composé **30**) pendant 6 h. Le solvant a été retiré par un évaporateur rotatif, le produit brut est ensuite purifié par colonne chromatographique avec $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (5 à 10 % de MeOH) comme éluant. Le produit est obtenu sous forme d'une huile jaunâtre avec un rendement de 38 %.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3.28 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.38 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.33 – 2.24 (m, 2H), 2.17 (s, 3H), 1.71 (p, $J = 6.9$ Hz, 2H), 1.41 (q, $J = 7.5, 7.0$ Hz, 2H), 1.20 (d, $J = 7.8$ Hz, 18H), 0.86 – 0.75 (m, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 57.92, 54.57, 49.64, 42.15, 31.91, 29.66, 29.63, 29.60, 29.53, 29.34, 27.51, 27.30, 26.80, 22.68, 14.09.

HR-LC-MS: (m/z) $\text{C}_{16}\text{H}_{34}\text{N}_4$ Calc. 282.2783, trouvé 282.2779.



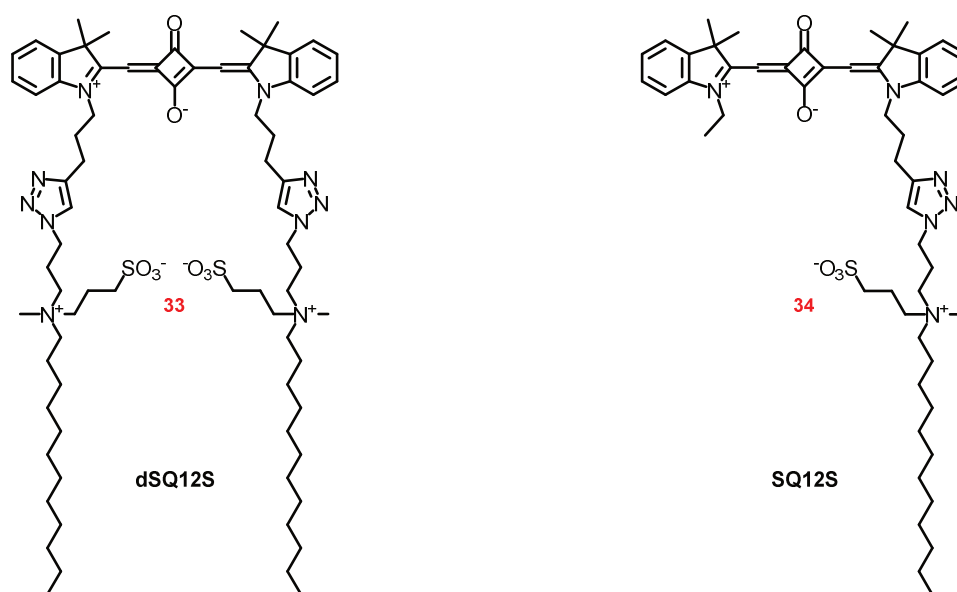
Composé 32 : 3-((3-azidopropyl)(dodecyl)(methyl)ammonio)propane-1-sulfonate

N-(3-azidopropyl)-N-methyldodecan-1-amine (**31**) (1 éq ; 500 mg) est dissous dans CH_3CN (15 mL), puis 1,3-propanesultone (5 éq ; 1,1g) est ajouté au milieu. La réaction ensuite alors chauffée à reflux pendant 12 h. Le solvant est évaporé sous vide et le produit est utilisé sans plus de purification. Le produit est obtenu sous forme d'une poudre blanche avec un rendement de 61 %.

^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 3.46 – 3.36 (m, 4H), 3.31 – 3.24 (m, 2H), 2.96 (s, 3H), 2.77 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.13 – 2.00 (m, 2H), 1.97 – 1.86 (m, 2H), 1.75 – 1.60 (m, 2H), 1.36 – 1.13 (m, 18H), 0.80 (t, J = 6.8 Hz, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 61.98, 61.43, 58.96, 48.65, 48.13, 47.57, 31.89, 29.58, 29.46, 29.40, 29.31, 29.15, 26.39, 22.67, 22.29, 22.27, 19.13, 14.10.

HR-LC-MS: (m/z) $\text{C}_{19}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ Calc. 404.2821, trouvé 404.2826.



Les couplages « clicks » de ces deux sondes sont réalisés selon le même protocole décrit pour les composés **21** et **23**, sauf contre-indication. Seul le solvant est modifié pour un mélange dioxane/eau (3/1) et dans le cas de dSQ12S (**33**) 3 éq du composé **32** sont utilisés. Les produits bruts sont purifiés par colonne d'exclusion stérique LH-20 avec MeOH/CH₂Cl₂ (1/1) comme éluant. L'aspect des deux sondes sont des poudres bleu-vert et elles ont été obtenues avec des rendements de 72% pour bSQ12S (**33**) et de 82% pour SQ12S (34).

dSQ12S : ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.37 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.27 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.17 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.11 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 5.80 (s, 2H), 4.45 (t, *J* = 6.5 Hz, 4H), 4.11 (s, 4H), 3.48 – 3.36 (m, 4H), 3.35 – 3.25 (m, 4H), 2.95 (s, 6H), 2.84 – 2.78 (m, 4H), 2.74 (t, *J* = 6.5 Hz, 4H), 2.40 – 2.28 (m, 4H), 2.20 – 2.08 (m, 4H), 2.06 – 1.98 (m, 4H), 1.65 (s, 12H), 1.60 – 1.46 (m, 6H), 1.28 – 1.05 (m, 40H), 0.78 (t, *J* = 6.7 Hz, 6H).

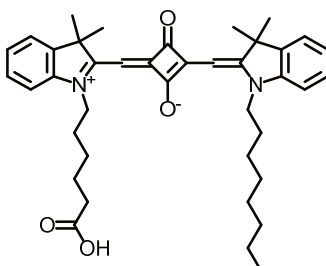
HR-LC-MS: (*m/z*) C₇₄H₁₁₆N₁₀O₈S₂ Calc. 1336.8419, trouvé 1336.8432.

SQ12S : ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.90 (s, 1H), 7.35 – 7.20 (m, 4H), 7.09 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.01 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.99 (s, 1H), 5.83 (s, 1H), 4.60 (s, 2H), 4.04 (s, 4H), 3.60 (d, *J* = 77.4 Hz, 4H), 3.23 – 3.13 (m, 2H), 3.11 (s, 3H), 2.93 – 2.82 (m, 2H), 2.80 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.62 – 2.49 (m, 2H), 2.21 – 2.12 (m, 4H), 1.70 (s, 12H), 1.57 (s, 2H), 1.33 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.26 – 1.06 (m, 20H), 0.78 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 179.20, 178.88, 170.17, 169.72, 146.41, 142.25, 141.91, 127.92, 127.86, 123.85, 123.81, 122.97, 122.42, 122.21, 109.70, 109.22, 86.43, 86.26, 62.22, 61.19,

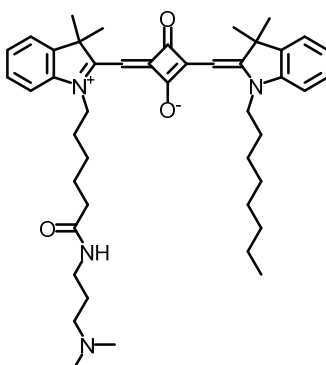
58.92, 49.33, 49.29, 48.63, 47.46, 46.78, 42.83, 38.48, 31.86, 29.55, 29.44, 29.28, 29.16, 27.08, 26.96, 26.41, 26.13, 23.14, 22.81, 22.65, 22.30, 19.02, 14.10, 12.03.

HR-LC-MS: (m/z) $C_{74}H_{116}N_{10}O_8S_2$ Calc. 894.5441, trouvé 894.5450.



Composé 35 : 4-((1-(5-carboxypentyl)-3,3-dimethyl-3H-indol-1-ium-2-yl)methylene)-2-((3,3-dimethyl-1-octylindolin-2-ylidene)methyl)-3-oxocyclobut-1-en-1-olate

Cette molécule nous a été fournie par l'un de nos collaborateurs.



Composé 36 : 2-((3,3-dimethyl-1-octylindolin-2-ylidene)methyl)-4-((1-(6-((3-dimethylamino)propyl)amino)-6-oxohexyl)-3,3-dimethyl-3H-indol-1-ium-2-yl)methylene)-3-oxocyclobut-1-en-1-olate

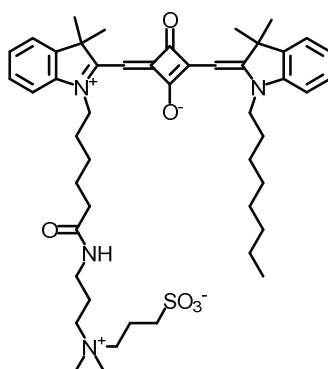
4-((1-(5-carboxypentyl)-3,3-dimethyl-3H-indol-1-ium-2-yl)methylene)-2-((3,3-dimethyl-1-octylindolin-2-ylidene)methyl)-3-oxocyclobut-1-en-1-olate (**35**) (1 éq ; 25 mg), BOP (1,1 éq ; 19,5 mg), HOBt (1,38 éq ; 8 mg) et DIEA (5 éq ; 26 mg) sont dissous dans un mélange DMF/CH₂Cl₂ (1/1) (4 mL). 3-(Diméthylamino)-1-propylamine (1,5 éq ; 6,2 mg) est ajouté à la réaction. Celle-ci est laissée sous agitation à température ambiante durant une nuit. Le solvant est évaporé sous vide et le produit brut est purifié par chromatographie sur couche

mince préparative avec CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ (7,5/2/0,5). Le produit est obtenu sous forme d'une poudre bleu-vert avec un rendement de 64 %.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.55 (s, 1H), 7.29 (m, 2H), 7.24 (tt, *J* = 7.7, 1.5 Hz, 2H), 7.08 (td, *J* = 7.4, 3.4 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 5.89 (s, 1H), 5.85 (s, 1H), 3.91 (s, 4H), 3.30 (q, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.45 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.27 (s, 6H), 2.22 – 2.14 (m, 2H), 1.71 (d, *J* = 2.7 Hz, 12H), 1.44 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.39 – 1.14 (m, 18H), 0.80 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 182.49, 179.24, 178.83, 173.09, 170.19, 170.09, 142.28, 127.85, 123.83, 123.77, 122.35, 109.47, 109.47, 109.33, 86.57, 86.34, 57.56, 49.30, 44.74, 43.81, 43.05, 38.10, 36.31, 31.76, 29.70, 29.35, 29.17, 27.07, 27.05, 26.25, 26.05, 25.89, 24.96, 22.61, 14.08.

HR-LC-MS: (m/z) C₄₅H₆₂N₄O₃ Calc. 706.4822, trouvé 706.4825.



Composé 37 : 3-((3-(6-(2-((3-((3,3-diméthyl-1-octylindolin-2-ylidène)méthyl)-2-oxido-4-oxocyclobut-2-en-1-ylidène)méthyl)-3,3-diméthyl-3H-indol-1-ium-1-yl)hexanamido)propyl)diméthylammonio)propane-1-sulfonate

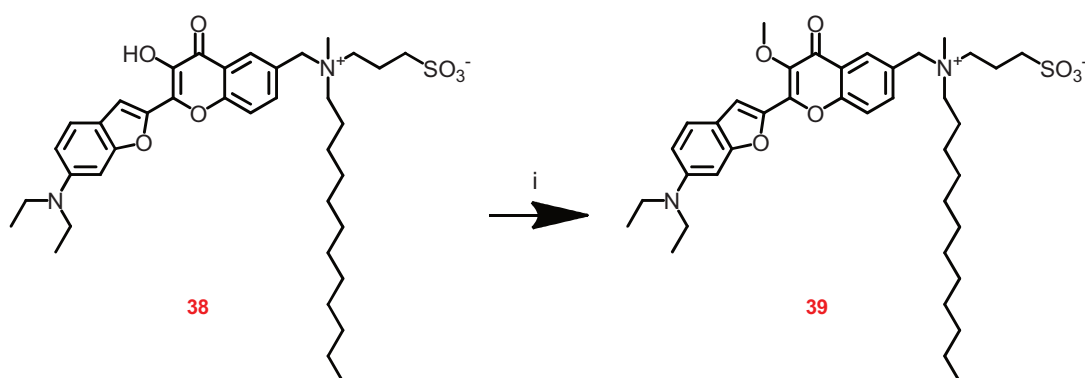
2-((3,3-diméthyl-1-octylindolin-2-ylidène)méthyl)-4-((1-(6-((3-(diméthylamino)propyl)amino)-6-oxohexyl)-3,3-diméthyl-3H-indol-1-ium-2-yl)méthylène)-3-oxocyclobut-1-en-1-olate (**36**) (1 éq; 8,8 mg) a été dissous dans CH₃CN (5 mL), 1,3-propanesultone (2 éq; 3,1mg) et K₂CO₃ (2 éq, 3,4 mg) ont ensuite été ajoutés au mélange. La réaction est chauffée à 90 °C sur une nuit. Le solvant est retiré sous vide et le produit brut est purifié par chromatographie sur couche mince préparative avec CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ (6/3/1). Le produit est obtenu sous forme d'une poudre bleu-vert avec un rendement de 62 %.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.96 (s, 1H), 7.32 – 7.20 (m, 4H), 7.04 (td, $J = 7.4, 4.9$ Hz, 2H), 6.91 (dd, $J = 16.6, 8.0$ Hz, 2H), 5.85 (s, 1H), 5.80 (s, 1H), 3.88 (s, 4H), 3.65 (s, 2H), 3.47 (s, 2H), 3.31 (s, 2H), 3.12 (s, 6H), 2.87 (s, 2H), 2.27 – 2.15 (m, 4H), 2.02 (s, 2H), 1.71 – 1.66 (m, 12H), 1.42 – 1.15 (m, 18H), 0.79 (t, $J = 6.3$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ Pas assez de produit pour obtenir un spectre carbone suffisamment résolu.

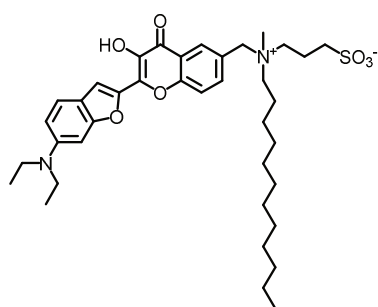
HR-LC-MS: (m/z) $\text{C}_{48}\text{H}_{68}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$ Calc. 829.4893, trouvé 829.4947.

1.3. Dérivés 3-hydroxyflavone (F2N12SM) et 3-hydroxychromone (FC12SM)



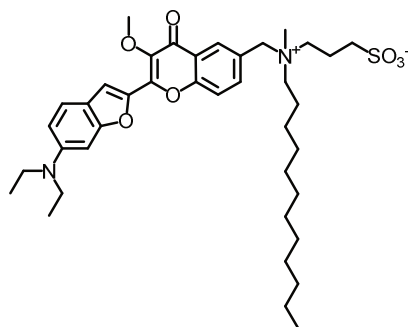
i) MeI, MeOH, K_2CO_3 , TA, durant une nuit (85 %)

Schéma 5 : synthèse de la sonde FC12SM.



Composé 38 : 3-(((2-(6-(diethylamino)benzofuran-2-yl)-3-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-6-yl)methyl)(dodecyl)(methyl)ammonio)propane-1-sulfonate

3-(((2-(6-(diethylamino)-2,3-dihydrobenzofuran-2-yl)-3-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-6-yl)methyl)(dodecyl)(methyl)ammonio)propane-1-sulfonate est obtenu selon les travaux de Kucherak et al, travaux décrits en annexe D.



Composé 39 : 3-(((2-(6-(diethylamino)benzofuran-2-yl)-3-methoxy-4-oxo-4H-chromen-6-yl)methyl)(dodecyl)(methyl)ammonio)propane-1-sulfonate

3-(((2-(6-(diethylamino)benzofuran-2-yl)-3-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-6-yl)methyl)(dodecyl)(methyl)ammonio)propane-1-sulfonate (**38**) (1 éq ; 15 mg) est tout d'abord dissous dans MeOH (5 mL), puis K₂CO₃ (4 éq ; 12 mg) et CH₃I (10 éq ; 31,92 mg) sont ajoutés au mélange. La réaction est laissée sous agitation pendant une nuit à température ambiante. Après une nuit, 5 éq supplémentaire de K₂CO₃ (15 mg) et d'un large excès de CH₃I (1,14 g) sont ajoutés. Après quelques heures, le solvant est évaporé sous vide et le produit brut est purifié par chromatographie sur couche mince préparative en utilisant CH₂Cl₂/MeOH (8/2) comme éluant. Le produit est obtenu sous forme d'une poudre jaune orangé avec un rendement de 85 %.

¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.26 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.86 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.44 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.76 (d, *J* = 9.5 Hz, 2H), 4.61 (s, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.47 – 3.37 (m, 8H), 2.95 (s, 3H), 2.81 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.46 – 1.37 (m, 2H), 1.34 – 1.11 (m, 20H), 0.87 – 0.76 (m, 9H).

HR-LC-MS: (M+H⁺) C₃₉H₅₆N₂O₇S Calc. 696.3808, trouvé 696.3793.

2. Matériels

Lipides : Dioléoylphosphatidylcholine (DOPC) et le cholestérol proviennent de Sigma-Aldrich. La sphingomyéline de cerveau de vache (SM) a été achetée chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Tous les lipides ont été utilisés sans plus de purification.

DOPC : 1,2-Dioléoyl-sn-Glycéro-3-phosphocholine, lipide zwitterionique neutre, a été utilisé dans l'élaboration de vésicules lipidiques (larges et géantes) (Fig. 62).

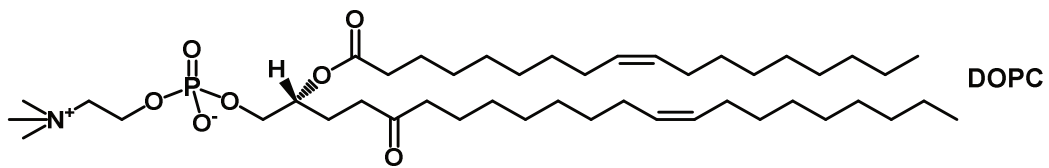


Figure 62 : Structure chimique de DOPC.

Cholestérol : Ce lipide naturel est responsable de nombreuses fonctions dans les organismes vivants, c'est un des constituants principal de la membrane plasmique cellulaire (Fig. 63).

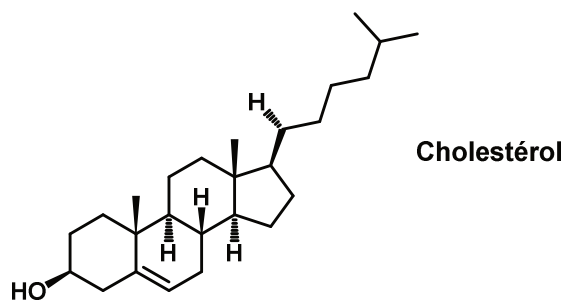


Figure 63 : Structure chimique du cholestérol.

Sphingomyéline : C'est le composant majoritaire des membranes cellulaires des mammifères (Fig. 64).

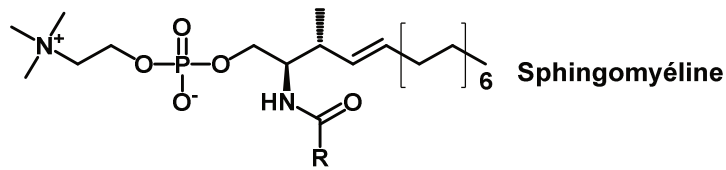


Figure 64 : Structure chimique de la sphingomyéline.

Sucrose : La solution de sucrose a été préparée dans de l'eau mQ avec une concentration de 300 nM (Sigma-Aldrich).

Glucose : La solution de glucose a été préparée dans de l'eau mQ avec une concentration de 300 nM (Sigma-Aldrich).

Methyl- β -cyclodextrine : une solution stock de 40 mM de Methyl- β -cyclodextrine (Sigma-Aldrich) a été préparée dans un tampon phosphate. L'extraction de cholestérol des cellules a été réalisée en ajoutant une solution de 5 mM pendant 2 h à 37 °C.

3. Méthodes

3.1. Préparation des vésicules lipidiques

3.1.1. Préparation de vésicules unilamellaires larges (LUVs)

Les propriétés des vésicules peuvent varier en fonction de leur composition (lipides de type anionique, cationique, neutre). Toutefois la méthode de préparation est indépendante de la composition en lipide et peut se résumer comme suit : i) préparation du film lipidique, ii) hydratation du film avec agitation, iii) homogénéisation à la taille désiré des vésicules. La méthode classique d'extrusion (Hope et al., 1985) est utilisé, à l'aide d'un extruder Lipex Biomembranes (Vancouver, Canada).

Lors de la préparation de vésicule de composition unique ou mixte, les lipides sont préalablement dissous dans un solvant organique (généralement du chloroforme ou

chloroforme/méthanol) afin d'assurer la bonne distribution de ceux-ci. Le solvant est retiré par évaporation sur évaporateur rotatif afin d'obtenir un fin film lipidique à la surface du ballon (Fig. 65). Le film est minutieusement séché par évaporation continue durant 30 min à une température de 40°C.

Ensuite l'hydratation du film est réalisée par addition d'un tampon adéquat et laissée 2 h à la température de transition de phase (T_m) correspondant aux lipides utilisés (RT pour les lipides non saturés et 60 °C pour les lipides saturés). Généralement la solution de lipide réparé a une concentration de 0.2 mM mais une concentration plus importante peut être utilisée (jusqu'à 1 mM). La solution est vortexée pendant 2 min après la période d'hydratation afin d'obtenir une suspension de vésicules multilamellaires de tailles variables.

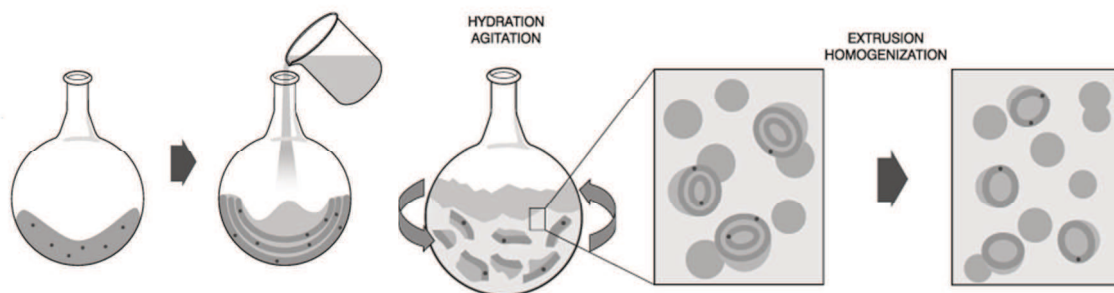


Figure 65 : Protocole de préparation de vésicule par extrusion.

La suspension de vésicules multilamellaires est ensuite extrudée afin de réduire la taille des vésicules à une taille voulue (Hope et al., 1985). L'extrusion consiste en une technique forçant le passage de la suspension à travers un filtre de polycarbonate possédant une taille de pore définie afin d'obtenir des particules dont la taille est proche de celle des pores du filtre. Un extrudeur (Lipex Biomembranes Inc.) avec des filtres de polycarbonate aux pores de taille connue (Nucléopore) a été utilisé pour réaliser la réduction de taille des vésicules dans la suspension de lipides. La solution passe dans un premier temps à travers un filtre avec des pores de taille plus importante, puis un filtre avec la taille désirée est utilisé. Le nombre de passages à travers le filtre de grands pores (0,2 μm) est de 7, suivi de 10 passages à travers le filtre avec la taille finale de pores (0,1 μm). Le passage à travers le filtre

de 0,1 μm produit des vésicules unilamellaires larges (LUVs) d'une taille moyenne de 110-120 nm. Cette méthode produit une suspension de distribution de taille homogène. Toutes les différentes étapes de préparation incluant, l'hydratation, le vortexage et l'extrusion, doivent avoir lieu à une température supérieure à la température de transition de phase gel-liquide (T_m) des lipides utilisés. Par exemple, un chauffage à 60 °C est nécessaire pour la préparation de vésicules composées de DPPC ou de sphingomyéline, lipide portant des chaînes alkyle saturées.

Les LUVs sont marqués par addition d'aliqots (généralement 2 μL) de solution stock de sonde dans DMSO à 1 mL de suspension de vésicule dans du tampon. Les expériences de fluorescence sont réalisées après une incubation de 5 minutes. Le tampon utilisé dans ces expériences est un tampon phosphate de concentration 20 nM à pH 7,4. Les concentrations en lipides sont en général de 200 μM sauf contre-indication.

3.1.2. Préparation de vésicules unilamellaires géantes (GUVs)

L'électroformation est une des principales méthodes de préparation des GUVs. Le principe de cette méthode est de laisser bourgeonner le film de lipides séchés dans une solution aqueuse sous un potentiel électrique pour permettre la formation des vésicules géantes. (Fig. 66).

Les GUVs sont produits dans une chambre d'électroformation artisanale (Université de Odense, Danemark). Une solution de lipides à 1 mM dans du chloroforme est préparée, puis 3 μL de cette solution sont déposés à l'aide d'une seringue en verre de 10 μL sur chaque fil de platine de la chambre. Après dépôt des lipides, la chambre est agitée légèrement afin de bien distribuer les lipides le long du fil, puis celle-ci est placée dans un dessiccateur sous vide pour 30 min à température ambiante afin d'enlever toute trace de solvant.

La phase d'hydratation est réalisée en ajoutant 500 μL d'une solution de sucre chaud de concentration 300 mM dans chaque puits de la chambre. La chambre, chauffée à 65 °C (pour les mélanges impliquant des lipides à haute T_m comme sphingolmyéline), est scellée par du Parafilm pour éviter l'évaporation de l'eau (attention aux éventuelles fuites). La chambre est ensuite connectée à un générateur basse fréquence (GBF ; 10 Hz ; 2 V)

durant 2h. Le film de lipides va bourgeonner, puis se détacher des fils de platine pour former des GUVs. Les vésicules ainsi produites sont collectées et peuvent être conservées à 4 °C pour une semaine.

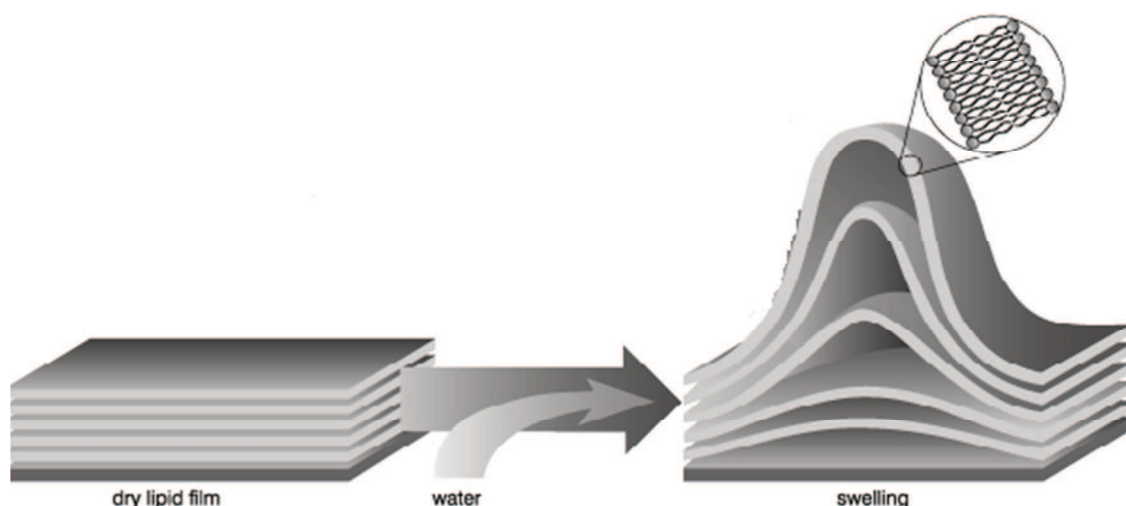


Figure 66 : Principe de formation des GUVs par bourgeonnement.

Des aliquots de 50 μL de la solution de GUVs obtenue, sont ajoutés 200 μL d'une solution de glucose à 300 mM pour obtenir la suspension finale de GUVs utilisée en microscopie. Le marquage de ces vésicules est réalisé par addition d'aliquots de solution de sonde dans le DMSO, afin d'obtenir une concentration de sonde égale à 0,1 μM (sauf contre-indication).

3.2. Préparation des cellules et traitements

La réduction du cholestérol dans les membranes cellulaires a été réalisée à l'aide d'un agent chimique nommé methyl- β -cyclodextrine ($\text{M}\beta\text{CD}$). Une solution stock de $\text{M}\beta\text{CD}$ est préparée dans du Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) à une concentration adéquate, puis filtrée à l'aide de filtre Millipore (0.2 μm) et ajoutée aux cellules à une concentration de 5 mM. Les cellules ainsi traitées sont conservées dans l'incubateur à 37 °C pour 2 h.

Pour les études d'apoptoses, l'actinomycine D a été ajoutée à une concentration de 0,5 µg/mL. Le traitement a été appliqué aux cellules 18 h avant les expériences. Elles ont été conservées dans un incubateur à 37 °C.

3.2.1. Culture cellulaire

Les cellules HeLa et HEK 293T ont été cultivées dans du milieu D-MEM (Dulbecco's modified Eagle medium, high glucose, Invitrogen Corporation, France) complété par 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (FBS) et des antibiotiques (péniciline 100 µL/mL et streptomycine 100 µL/mL) à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂. La transfection de la lignée HeLa a été réalisée 24h après l'ensemencement avec 1 µg de plasmide pcDNA3.1 mCherry utilisant jetPEITM (PolyPlus transfection, France) en accord avec les recommandations du fournisseur. Toutes les observations ont été réalisées 16-24h après la transfection ADN.

Les cellules CHO ont été cultivées dans du milieu Ham's F-12K (Kaighn's, Low glucose, Invitrogen Corporation, France), complété par 10% (v/v) de sérum de veaux fœtal (FBS) et des antibiotiques (péniciline 100 µL/mL et streptomycine 100 µL/mL) à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂. Les cellules U87F8 et U87D4 (glioblastome humain) ont quant à elles étaient cultivées dans des conditions similaires mais le milieu utilisé pour ces cellules est EMEM (Eagle minimal essential medium, Invitrogen corporation, France).

3.2.2. Préparation des suspensions cellulaires pour la spectroscopie de fluorescence

Pour la spectroscopie de fluorescence, les cellules HeLa, CHO et T293 sont cultivées afin d'en obtenir suffisamment pour les besoins de l'expérience (en moyenne 3 jours). Dans un premier temps, le milieu épuisé est retiré des flasques de culture et les cellules sont rincées à l'aide de DPBS. Une solution de trypsine 1X (diluée à partir d'une solution de trypsine 10X LONZA avec PBS) est ajoutée aux cellules pendant 4 min à 37 °C pour les détacher de la flasque. La solution de cellules trypsinisées est ensuite diluée dans DPBS et transférée dans des tubes Falcon, puis centrifugée à 1000 tpm pendant 5 min. La

centrifugation est répétée deux fois. Les cellules sont ensuite diluées à la concentration souhaitée. Le marquage de cette suspension de cellule est réalisé par l'ajout d'un mélange de 0,5 mL de DPBS et d'un aliquot de la solution stock de la sonde d'intérêt dans le DMSO (vortexer le mélange 10 s) à 0,5 mL de suspension cellulaire pour obtenir la concentration en sonde (0,4 μM) et en cellule (1×10^6 cellules/mL, sauf contre-indication) désirée. Pour le marquage à l'aide du quencher bQ10S, celui-ci est directement ajouté en aliquot de la solution stock pour obtenir la concentration finale désirée. Attention le mélange de sonde dans DPBS doit être fraîchement préparé ($t < 2$ min) dû à l'agrégation de la sonde dans les milieux aqueux. Un temps d'incubation de marquage de 5 min est observé avant toutes mesures cellulaires. Cette incubation est réalisée à température ambiante à l'abri de la lumière. Des échantillons contrôles dits « blancs » (=sans sonde) et marqués (=avec sonde) ont été mesurés.

3.2.3. Préparation des échantillons de cellules pour la microscopie de fluorescence

Des supports ronds avec fond en verre (IBiDi) ont été utilisés pour les études microscopiques. Les cellules HeLa et U87 ont étéensemencées dans ces supports à une concentration de 5×10^4 cellules/IBiDi. Dans un premier temps, le milieu de culture épuisé est retiré, puis les cellules adhérentes sont rincées deux fois à l'aide de DPBS. Une solution fraîche de sonde d'intérêt dans Opti-MEM est préparée (Gibco, Life technologies) à une concentration de 0,04 μM en sonde (sauf contre-indication) et est ajouté à l'IBiDi. Pour le marquage à l'aide du quencher bQ10S, celui-ci est dilué d'une solution stock dans une petite quantité d'Opti-MEM (généralement 200 μL) à une concentration donnée et est ajouté goutte à goutte dans l'IBiDi préalablement marqué par la sonde fluorescente. Un temps d'incubation de marquage de 5 min est observé avant toutes mesures avec les cellules. Cette incubation est réalisée à température ambiante à l'abri de la lumière.

3.3. Mesures physiques

3.3.1. Spectroscopie optique

Spectroscopie d'absorption :

Les spectres d'absorptions ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre Cary 4000 (Varian), l'absorbance ou densité optique (OD) est caractérisée par (Valeur, 2002) :

$$OD = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

Où I_0 et I sont respectivement l'intensité de lumière incidente et l'intensité de lumière transmise. Une ligne de base est enregistrée préalablement par l'instrument à l'aide de deux cuvettes remplies uniquement de solvant. Le colorant est ajouté au solvant de l'une des deux cuvettes et le spectre d'absorbance est mesuré. La ligne de base sert de correction au spectre d'absorption nouvellement acquis.

Spectroscopie de fluorescence :

Les mesures de fluorescence ont été réalisées sur un spectrofluorimètre Fluorolog (Jobin Yvon, Horiba) équipé d'un porte-cuvette thermostaté. Le Fluorolog est un dispositif de comptage de photons dont la réponse de détection est automatiquement corrigée par un coefficient correcteur (la sensibilité de détection baisse dans les hautes longueurs d'ondes). L'excitation des molécules est réalisée par une lampe au xénon et le signal de fluorescence est mesuré à l'aide d'un tube photomultiplicateur.

Les spectres d'émissions de fluorescence sont enregistrés à 20 °C et les longueurs d'ondes d'excitations utilisées sont les suivantes :

- 400 nm pour F2N12SM
- 540 nm pour FC12SM
- 530 nm pour les dérivés Nile Red
- 610 nm pour les dérivés Squaraine

Une correction à l'aide des « blancs » correspondants (tampon, suspension cellulaire ou vésiculaire, etc) a été réalisée sur chaque spectre de fluorescences obtenues.

Calcul de rendement quantique :

Le rendement quantique des différentes sondes peut être calculé en utilisant l'absorbance de la sonde ainsi que son maximum d'émission de fluorescence à une longueur d'onde donnée comparativement aux mêmes paramètres à la même longueur d'onde d'un colorant de référence. La formule suivante est alors appliquée :

$$QY = \frac{I_{int \text{ échantillon}}}{I_{int \text{ référence}}} \times \frac{Abs_{\text{échantillon}}}{Abs_{\text{référence}}} \times QY_{\text{Référence}} \times \frac{n_{\text{milieu échantillon}}^2}{n_{\text{milieu référence}}^2}$$

- Où :
- I_{int} est l'intensité intégrale respective de l'échantillon et de la référence
 - Abs est l'absorbance respective de l'échantillon et de la référence à λ d'excitation
 - QY est le rendement quantique de la molécule d'intérêt
 - $QY_{\text{référence}}$ est le rendement quantique de la référence
 - n sont les indices de réfractions respectifs des milieux de l'échantillon et de la référence

Les références utilisées sont Nile Red pour tous les dérivés Nile Red dans l'éthanol (Invitrogen corporation, France) et DiD dans le méthanol (DiIC18(5) 3H-Indolium, 2-(5-(1,3-dihydro-3,3-dimethyl-1-octadecyl-2H-indol-2-ylidene)-1,3-pentadienyl)-3,3-dimethyl-1-octadecyl-, perchlorate, Invitrogen corporation, France) pour tous les dérivés Squaraine. La référence utilisée pour les sondes F2N12SM et FC12SM est FME dans l'éthanol (4'-dimethylamino-3-hydroxychromone, Invitrogen corporation, France).

3.3.2. Microscopie de fluorescence**Microscopie confocale**

La microscopie confocale (Fig. 67) est une des techniques d'imagerie optique les plus avancées utilisée pour des applications biologiques. Elle est basée sur l'illumination de l'échantillon par un faisceau laser dont la fluorescence n'émanant pas du plan focal est supprimée par utilisation d'un diaphragme (pinhole) placé juste avant le détecteur. Cela permet la formation d'une image à partir des photons issue uniquement du plan focal. Il est possible de faire varier l'épaisseur de la section optique du plan focal.

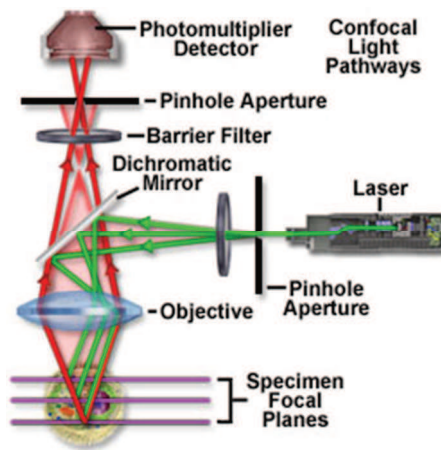


Figure 67 : Schéma du fonctionnement d'un microscope confocal.

Le microscope utilisé pour les mesures est un microscope confocal à scanning laser Leica SPE II (Fig. 68). Le microscope est équipé de 4 lasers d'excitation de longueurs d'ondes 405, 488, 561 et 635 nm. La focalisation et la collecte du signal se font à travers un objectif HXC PL APO 63x/1.40 OIL CS. Les différents lasers utilisés pour l'excitation des différentes sondes sont les suivants :

- Laser 405 nm pour les sondes FC12SM et F2N12SM
- Laser 488 nm pour les dérivés Nile Red
- Laser 635 nm pour les dérivés Squaraine

De plus la puissance du laser est réglée de telle sorte que l'intensité du signal soit maximale, tout en évitant la saturation du détecteur et le photo-blanchiment de l'échantillon.



Figure 68 : Microscope confocal Leica SPE II (PIQ, LBP UMR 7213).

Microscopie à deux photons.

Le principe du microscope à deux photons est que l'excitation se fait par absorption de deux photons possédant la moitié de l'énergie et le double de la longueur d'onde du photon nécessaire. Une longueur d'onde importante permet une meilleure pénétration des tissus et une augmentation de la durée d'acquisition, sans altérer l'échantillon et avec un minimum de photo-blanchiment.

Le microscope à deux photons utilisé pour les acquisitions est un dispositif fait maison par le laboratoire. Il est basé sur un microscope inversé Olympus IX70 avec un objectif Olympus 60x1.2NA à immersion à eau (Azoulay et al., 2003; Clamme et al., 2003).

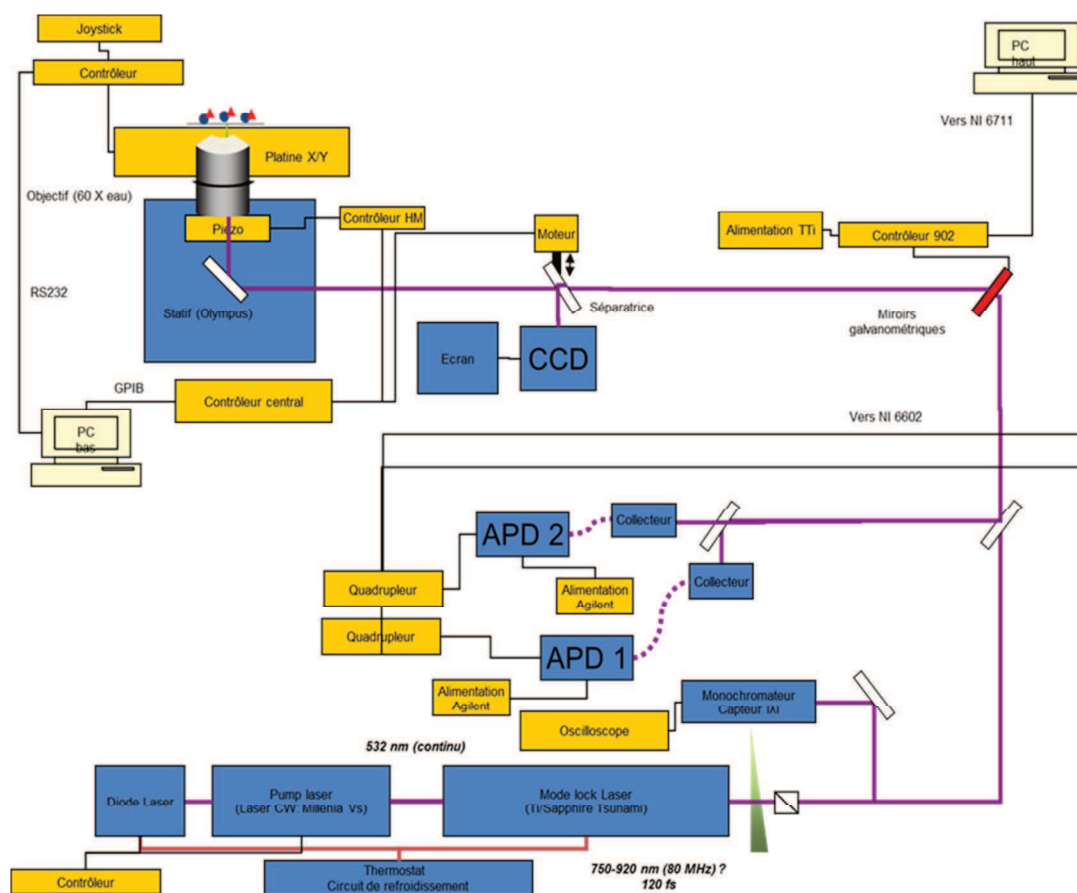


Figure 69 : Mode imagerie de cellule du microscope deux photons. (PIQ, LBP, UMR 7213).

L'excitation des deux photons est réalisée par un laser titane-saphir (Tsunami, Spectra Physics), et la détection est déléguée à un détecteur Avalanche Photodiodes (APD SPCM-AQR-14-FC, Perkin-Elmer) connecté à compteur/chronomètre PCI (PCI6602, National Instrument) (Fig. 69). L'imagerie est réalisée par deux miroirs rapides galvo dont le mode d'acquisition de la fluorescence est dit « descanned ».

L'acquisition est réalisée à un temps de 20 ou 50 ms et à une puissance de laser variant entre 10 et 30 mW ($\lambda=830\text{nm}$). Le signal est coupé en deux à l'aide d'un filtre dichroïc (Beamsplitter 585 nm DXCR) pour le cas des images ratiométriques avec les dérivés Nile Red pour obtenir les images correspondantes aux canaux vert et rouge. Pour ce type d'images deux détecteurs (APD) sont nécessaires, un pour chaque canal. Dans le cas de l'imagerie avec les dérivés Squaraine, une configuration simple a été de mise, sans filtre dichroïque avec un seul détecteur.

Les images ratiométriques sont générées en utilisant un plug-in développé par Romain Vauchelles du logiciel ImageJ qui divise l'image du canal vert par celle obtenue sur le canal rouge. Une échelle arbitraire de couleur est appliquée à chaque pixel en fonction du ratio obtenu et l'intensité est définie par l'intensité intégrale des deux canaux au pixel correspondant (Klymchenko et al., 2009).

REFERENCES

V. RÉFÉRENCES

- Abrams, F.S., and London, E. (1993). Extension of the parallax analysis of membrane penetration depth to the polar region of model membranes: Use of fluorescence quenching by a spin-label attached to the phospholipid polar headgroup. *Biochemistry* 32, 10826–10831.
- Ahuja, R.C., and Moebius, D. (1992). Photophysical properties of a pyrene-labeled phospholipid in matrix monolayers at the gas/water interface. *Langmuir* 8, 1136–1144.
- Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499–511.
- Angelova, M., and Dimitrov, D. (1986). Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem. ...* 303–311.
- Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305–1308.
- Azoulay, J., Clamme, J.-P., Darlix, J.-L., Roques, B.P., and Mély, Y. (2003). Destabilization of the HIV-1 Complementary Sequence of TAR by the Nucleocapsid Protein Through Activation of Conformational Fluctuations. *J. Mol. Biol.* 326, 691–700.
- Bagatolli, L.A. (2006). To see or not to see: lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 1541–1556.
- Bagatolli, L.A., Ipsen, J.H., Simonsen, A.C., and Mouritsen, O.G. (2010). An outlook on organization of lipids in membranes: searching for a realistic connection with the organization of biological membranes. *Prog. Lipid Res.* 49, 378–389.
- Bähr, G., Diederich, A., Vergères, G., and Winterhalter, M. (1998). Interaction of the effector domain of MARCKS and MARCKS-related protein with lipid membranes revealed by electric potential measurements. *Biochemistry* 37, 16252–16261.
- 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–IN27.
- Baszkin, A., Boissonnade, M., Rosilio, V., Kamyshny, A., and Magdassi, S. (1999). Penetration of Glucose Oxidase and of the Hydrophobically Modified Enzyme into Phospholipid and Cholesterol Monolayers. *J. Colloid Interface Sci.* 209, 302–311.
- Bates, M., Huang, B., Dempsey, G.T., and Zhuang, X. (2007). Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science* 317, 1749–1753.
- Baumgart, T., Hess, S.T., and Webb, W.W. (2003). Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature* 425, 821–824.

- Baumgart, T., Hunt, G., Farkas, E.R., Webb, W.W., and Feigenson, G.W. (2007a). Fluorescence probe partitioning between Lo/Ld phases in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* *1768*, 2182–2194.
- Baumgart, T., Hammond, A.T., Sengupta, P., Hess, S.T., Holowka, D.A., Baird, B.A., and Webb, W.W. (2007b). Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 3165–3170.
- Beck, A., Heissler, D., and Duportail, G. (1993). Influence of the length of the spacer on the partitioning properties of amphiphilic fluorescent membrane probes. *Chem. Phys. Lipids* *66*, 135–142.
- Betzig, E., Patterson, G.H., Sougrat, R., Lindwasser, O.W., Olenych, S., Bonifacino, J.S., Davidson, M.W., Lippincott-Schwartz, J., and Hess, H.F. (2006). Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* *313*, 1642–1645.
- Bezzi, P., Gundersen, V., Galbete, J.L., Seifert, G., Steinhäuser, C., Pilati, E., and Volterra, A. (2004). Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat. Neurosci.* *7*, 613–620.
- Binnig, G., and Quate, C.F. (1986). Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* *56*, 930–933.
- Bíró, A., Cervenak, L., Balogh, A., Lorincz, A., Uray, K., Horváth, A., Romics, L., Matkó, J., Füst, G., and László, G. (2007). Novel anti-cholesterol monoclonal immunoglobulin G antibodies as probes and potential modulators of membrane raft-dependent immune functions. *J. Lipid Res.* *48*, 19–29.
- Van Blitterswijk, W.J., Van Hoeven, R.P., and Van Der Meer, B.W. (1981). Lipid structural order parameters (reciprocal of fluidity) in biomembranes derived from steady-state fluorescence polarization measurements. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* *644*, 323–332.
- Blodgett, K.B. (1935). Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface. *J. Am. Chem. Soc.* *57*, 1007–1022.
- Boxer, S.G., Kraft, M.L., and Weber, P.K. (2009). Advances in imaging secondary ion mass spectrometry for biological samples. *Annu. Rev. Biophys.* *38*, 53–74.
- Brockman, H. (1994). Dipole potential of lipid membranes. *Chem. Phys. Lipids* *73*, 57–79.
- Brockman, H. (1999). Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? *Curr. Opin. Struct. Biol.* *9*, 438–443.
- Browman, D.T., Hoegg, M.B., and Robbins, S.M. (2007). The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. *Trends Cell Biol.* *17*, 394–402.
- Brown, D.A. (2006). Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology (Bethesda)*. *21*, 430–439.

- Brown, D.A., and London, E. (1998). Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J. Membr. Biol.* *164*, 103–114.
- Brown, D.A., and London, E. (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* *275*, 17221–17224.
- Brown, D.A., and Rose, J.K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* *68*, 533–544.
- Burnum, K.E., Frappier, S.L., and Caprioli, R.M. (2008). Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry for the investigation of proteins and peptides. *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto, Calif.)* *1*, 689–705.
- Chapman, D. (1975). Phase transitions and fluidity characteristics of lipids and cell membranes. *Q. Rev. Biophys.* *8*, 185.
- Chen, C.S., Martin, O.C., and Pagano, R.E. (1997). Changes in the spectral properties of a plasma membrane lipid analog during the first seconds of endocytosis in living cells. *Biophys. J.* *72*, 37–50.
- Cheng, Z.-J., Singh, R.D., Marks, D.L., and Pagano, R.E. (2006). Membrane microdomains, caveolae, and caveolar endocytosis of sphingolipids. *Mol. Membr. Biol.* *23*, 101–110.
- Chiantia, S., Ries, J., Kahya, N., and Schwille, P. (2006). Combined AFM and two-focus SFCS study of raft-exhibiting model membranes. *Chemphyschem* *7*, 2409–2418.
- Chiantia, S., Kahya, N., and Schwille, P. (2007). Raft domain reorganization driven by short- and long-chain ceramide: a combined AFM and FCS study. *Langmuir* *23*, 7659–7665.
- Clamme, J.P., Azoulay, J., and Mély, Y. (2003). Monitoring of the formation and dissociation of polyethylenimine/DNA complexes by two photon fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.* *84*, 1960–1968.
- Conner, S.D., and Schmid, S.L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* *422*, 37–44.
- Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., et al. (2004). Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* *351*, 337–345.
- Danielli, J.F., and Davson, H. (1935). A contribution to the theory of permeability of thin films. *J. Cell. Comp. Physiol.* *5*, 495–508.
- Darwich, Z., Klymchenko, A.S., Kucherak, O.A., Richert, L., and Mély, Y. (2012). Detection of apoptosis through the lipid order of the outer plasma membrane leaflet. *Biochim. Biophys. Acta* *1818*, 3048–3054.

Darwich, Z., Kucherak, O. a, Kreder, R., Richert, L., Vauchelles, R., Mély, Y., and Klymchenko, A.S. (2013a). Rational design of fluorescent membrane probes for apoptosis based on 3-hydroxyflavone. *Methods Appl. Fluoresc.* *1*, 025002.

Darwich, Z., Kucherak, O.A., Kreder, R., Richert, L., Vauchelles, R., Mély, Y., and Klymchenko, A.S. (2013b). Rational design of fluorescent membrane probes for apoptosis based on 3-hydroxyflavone. *Methods Appl. Fluoresc.* *1*, 025002.

Demchenko, A.P., Mély, Y., Duportail, G., and Klymchenko, A.S. (2009). Monitoring biophysical properties of lipid membranes by environment-sensitive fluorescent probes. *Biophys. J.* *96*, 3461–3470.

Demchenko, A.P., Tang, K.-C., and Chou, P.-T. (2013). Excited-state proton coupled charge transfer modulated by molecular structure and media polarization. *Chem. Soc. Rev.* *42*, 1379–1408.

Deo, N., Somasundaran, P., Subramanyan, K., and Ananthapadmanabhan, K.P. (2002). Electron Paramagnetic Resonance Study of the Structure of Lipid Bilayers in the Presence of Sodium Dodecyl Sulfate. *J. Colloid Interface Sci.* *256*, 100–105.

Devaux, P.F. (1993). Lipid transmembrane asymmetry and flip-flop in biological membranes and in lipid bilayers. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *3*, 489–494.

Dietrich, C., Bagatolli, L.A., Volovyk, Z.N., Thompson, N.L., Levi, M., Jacobson, K., and Gratton, E. (2001). Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys. J.* *80*, 1417–1428.

Dodes Traian, M.M., González Flecha, F.L., and Levi, V. (2012). Imaging lipid lateral organization in membranes with C-laurdan in a confocal microscope. *J. Lipid Res.* *53*, 609–616.

Douglass, A.D., and Vale, R.D. (2005). Single-molecule microscopy reveals plasma membrane microdomains created by protein-protein networks that exclude or trap signaling molecules in T cells. *Cell* *121*, 937–950.

Dzuba, S.A., and Raap, J. (2013). Spin-echo electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy of a pore-forming (Lipo)peptaibol in model and bacterial membranes. *Chem. Biodivers.* *10*, 864–875.

El-Aneed, A. (2004). An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J. Control. Release* *94*, 1–14.

Feder, T., Weissmüller, G., Žekš, B., and Sackmann, E. (1995). Spreading of giant vesicles on moderately adhesive substrates by fingering: A reflection interference contrast microscopy study. *Phys. Rev. E* *51*, 3427–3433.

Feigenson, G.W. (2007). Phase boundaries and biological membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* *36*, 63–77.

- Ferrara, N., Gerber, H.-P., and LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* *9*, 669–676.
- Franklin, B., and Brownrigg, W. (1774). Of the Stilling of Waves by means of Oil. Extracted from Sundry Letters between Benjamin Franklin, LL. D. F. R. S. William Brownrigg, M. D. F. R. S. and the Reverend Mr. Farish. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*
- Fredriksson, R., Lagerström, M.C., Lundin, L., and Schiöth, H.B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* *63*, 1256–1272.
- Friedman, M.H. (2008). *Principles and Models of Biological Transport* (New York, NY: Springer New York).
- Frisz, J.F., Klitzing, H.A., Lou, K., Hutcheon, I.D., Weber, P.K., Zimmerberg, J., and Kraft, M.L. (2013). Sphingolipid domains in the plasma membranes of fibroblasts are not enriched with cholesterol. *J. Biol. Chem.* *288*, 16855–16861.
- Gaus, K., Gratton, E., Kable, E.P.W., Jones, A.S., Gelissen, I., Kritharides, L., and Jessup, W. (2003). Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 15554–15559.
- Gibbons, E., Pickett, K.R., Streeter, M.C., Warcup, A.O., Nelson, J., Judd, A.M., and Bell, J.D. (2013). Molecular details of membrane fluidity changes during apoptosis and relationship to phospholipase A(2) activity. *Biochim. Biophys. Acta* *1828*, 887–895.
- Gielen, E., Smisdom, N., VandeVen, M., De Clercq, B., Gratton, E., Digman, M., Rigo, J.-M., Hofkens, J., Engelborghs, Y., and Ameloot, M. (2009). Measuring diffusion of lipid-like probes in artificial and natural membranes by raster image correlation spectroscopy (RICS): use of a commercial laser-scanning microscope with analog detection. *Langmuir* *25*, 5209–5218.
- Gilcrease, M.Z. (2007). Integrin signaling in epithelial cells. *Cancer Lett.* *247*, 1–25.
- Gilman, A.G. (1970). A Protein Binding Assay for Adenosine 3':5'-Cyclic Monophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *67*, 305–312.
- Gilman, A.G. (1987). G Proteins: Transducers Of Receptor-Generated Signals. *Annu. Rev. Biochem.* *56*, 615–649.
- Giocondi, M.C., Vié, V., Lesniewska, E., Goudonnet, J.P., and Le Grimellec, C. (2000). In situ imaging of detergent-resistant membranes by atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.* *131*, 38–43.
- Glaser, M. (1993). Lipid domains in biological membranes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *3*, 475–481.
- Goksu, E.I., Vanegas, J.M., Blanchette, C.D., Lin, W.-C., and Longo, M.L. (2009). AFM for structure and dynamics of biomembranes. *Biochim. Biophys. Acta* *1788*, 254–266.

- Gombos, I., Steinbach, G., Pomozi, I., Balogh, A., Vámosi, G., Gansen, A., László, G., Garab, G., and Matkó, J. (2008). Some new faces of membrane microdomains: a complex confocal fluorescence, differential polarization, and FCS imaging study on live immune cells. *Cytometry. A* *73*, 220–229.
- Gómez-Móuton, C., Abad, J.L., Mira, E., Lacalle, R.A., Gallardo, E., Jiménez-Baranda, S., Illa, I., Bernad, A., Mañes, S., and Martínez-A, C. (2001). Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 9642–9647.
- Gordon-Grossman, M., Zimmermann, H., Wolf, S.G., Shai, Y., and Goldfarb, D. (2012). Investigation of model membrane disruption mechanism by melittin using pulse electron paramagnetic resonance spectroscopy and cryogenic transmission electron microscopy. *J. Phys. Chem. B* *116*, 179–188.
- Gorter, E. (1925). ON BIMOLECULAR LAYERS OF LIPOIDS ON THE CHROMOCYTES OF THE BLOOD. *J. Exp. Med.* *41*, 439–443.
- Goto, M., Sawaguchi, H., Tamai, N., Matsuki, H., and Kaneshina, S. (2010). Effect of vesicle size on the prodan fluorescence in diheptadecanoylphosphatidylcholine bilayer membrane under atmospheric and high pressures. *Langmuir* *26*, 13377–13384.
- Grainger, D.W., Ahlers, M., Reichert, A., Ringsdorf, H., Salesse, C., Herron, J.N., and Lim, K. (1992). Modeling membrane targeting: interaction and recognition of proteins with model biomembrane systems. *J. Control. Release* *19*, 201–218.
- Greenspan, P., Mayer, E.P., and Fowler, S.D. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J. Cell Biol.* *100*, 965–973.
- Haidekker, M.A., and Theodorakis, E.A. (2007). Molecular rotors--fluorescent biosensors for viscosity and flow. *Org. Biomol. Chem.* *5*, 1669–1678.
- Haidekker, M.A., Ling, T., Anglo, M., Stevens, H., Frangos, J., and Theodorakis, E. (2001). New fluorescent probes for the measurement of cell membrane viscosity. *Chem. Biol.* *8*, 123–131.
- Haidekker, M.A., Brady, T., Wen, K., Okada, C., Stevens, H.Y., Snell, J.M., Frangos, J.A., and Theodorakis, E.A. (2002). Phospholipid-Bound Molecular Rotors: Synthesis and Characterization. *Bioorg. Med. Chem.* *10*, 3627–3636.
- Haluska, C.K., Schröder, A.P., Didier, P., Heissler, D., Duportail, G., Mély, Y., and Marques, C.M. (2008). Combining fluorescence lifetime and polarization microscopy to discriminate phase separated domains in giant unilamellar vesicles. *Biophys. J.* *95*, 5737–5747.
- Hanshaw, R.G., and Smith, B.D. (2005). New reagents for phosphatidylserine recognition and detection of apoptosis. *Bioorg. Med. Chem.* *13*, 5035–5042.
- Harmar, A.J. (2001). Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biol.* *2*, REVIEWS3013.

- Harzer, K., and Kustermann-Kuhn, B. (2001). Quantified increases of cholesterol, total lipid and globotriaosylceramide in filipin-positive Niemann-Pick type C fibroblasts. *Clin. Chim. Acta* 305, 65–73.
- Heberle, F.A., Wu, J., Goh, S.L., Petruzielo, R.S., and Feigenson, G.W. (2010). Comparison of three ternary lipid bilayer mixtures: FRET and ESR reveal nanodomains. *Biophys. J.* 99, 3309–3318.
- Heerklotz, H. (2002). Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. *Biophys. J.* 83, 2693–2701.
- Hell, S.W. (2007). Far-field optical nanoscopy. *Science* 316, 1153–1158.
- Hell, S.W. (2009). Microscopy and its focal switch. *Nat. Methods* 6, 24–32.
- Hell, S.W., and Wichmann, J. (1994). Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* 19, 780.
- Helmchen, F., and Denk, W. (2005). Deep tissue two-photon microscopy. *Nat. Methods* 2, 932–940.
- Henderson, E., and Sakaguchi, D.S. (1993). Imaging F-actin in fixed glial cells with a combined optical fluorescence/atomic force microscope. *Neuroimage* 1, 145–150.
- Hoeller, D., Volarevic, S., and Dikic, I. (2005). Compartmentalization of growth factor receptor signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 107–111.
- Holl, M.M.B. (2008). *Phase Transitions in Cell Biology* (Dordrecht: Springer Netherlands).
- Hollars, C.W., and Dunn, R.C. (1998). Submicron structure in L-alpha-dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers and bilayers probed with confocal, atomic force, and near-field microscopy. *Biophys. J.* 75, 342–353.
- Honigmann, A., Mueller, V., Hell, S.W., and Eggeling, C. (2013). STED microscopy detects and quantifies liquid phase separation in lipid membranes using a new far-red emitting fluorescent phosphoglycerolipid analogue. *Faraday Discuss.* 161, 77–89; discussion 113–150.
- Hope, M.J., Bally, M.B.B., Webb, G., and Cullis, P.R. (1985). Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 812, 55–65.
- Houseman, B., and Mrksich, M. (1998). Efficient solid-phase synthesis of peptide-substituted alkanethiols for the preparation of substrates that support the adhesion of cells. *J. Org. Chem.* 3263, 7552–7555.
- Hunter, T. (1998). The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 353, 583–605.

- Hynes, R.O. (1992). Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11–25.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins : Bidirectional , Allosteric Signaling Machines In their roles as major adhesion receptors , integrins. *Cell* **110**, 673–687.
- Ionova, I. V, Livshits, V.A., and Marsh, D. (2012). Phase diagram of ternary cholesterol/palmitoylsphingomyelin/palmitoyloleoyl-phosphatidylcholine mixtures: spin-label EPR study of lipid-raft formation. *Biophys. J.* **102**, 1856–1865.
- J, J., J, D., and F, S. (2010). Fluorescent probe partitioning in giant unilamellar vesicles of “lipid raft” mixtures.
- Jahnig, F. (1979). Structural order of lipids and proteins in membranes: evaluation of fluorescence anisotropy data. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 6361–6365.
- Jin, L., Millard, A.C., Wuskell, J.P., Dong, X., Wu, D., Clark, H.A., and Loew, L.M. (2006). Characterization and application of a new optical probe for membrane lipid domains. *Biophys. J.* **90**, 2563–2575.
- Johnston, L.J. (2007). Nanoscale imaging of domains in supported lipid membranes. *Langmuir* **23**, 5886–5895.
- Kahya, N., Scherfeld, D., Bacia, K., Poolman, B., and Schwille, P. (2003). Probing lipid mobility of raft-exhibiting model membranes by fluorescence correlation spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **278**, 28109–28115.
- Kaiser, R.D., and London, E. (1998). Determination of the depth of BODIPY probes in model membranes by parallax analysis of fluorescence quenching. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1375**, 13–22.
- Karpenko, I.A., Kreder, R., Valencia, C., Villa, P., Mendre, C., Mouillac, B., Mély, Y., Hibert, M., Bonnet, D., and Klymchenko, A.S. (2014). Red fluorescent turn-on ligands for imaging and quantifying G protein-coupled receptors in living cells. *Chembiochem* **15**, 359–363.
- Kim, H.M., Choo, H.-J., Jung, S.-Y., Ko, Y.-G., Park, W.-H., Jeon, S.-J., Kim, C.H., Joo, T., and Cho, B.R. (2007). A two-photon fluorescent probe for lipid raft imaging: C-laurdan. *Chembiochem* **8**, 553–559.
- Kim, H.M., Jeong, B.H., Hyon, J.-Y., An, M.J., Seo, M.S., Hong, J.H., Lee, K.J., Kim, C.H., Joo, T., Hong, S.-C., et al. (2008). Two-photon fluorescent turn-on probe for lipid rafts in live cell and tissue. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 4246–4247.
- Klymchenko, A.S., and Kreder, R. (2014). Fluorescent probes for lipid rafts: from model membranes to living cells. *Chem. Biol.* **21**, 97–113.

- Klymchenko, A.S., Duportail, G., Ozturk, T., Pivovarenko, V.G., Mély, Y., and Demchenko, A.P. (2002). Novel Two-Band Ratiometric Fluorescence Probes with Different Location and Orientation in Phospholipid Membranes. *Chem. Biol.* *9*, 1199–1208.
- Klymchenko, A.S., Oncul, S., Didier, P., Schaub, E., Bagatolli, L., Duportail, G., and Mély, Y. (2009). Visualization of lipid domains in giant unilamellar vesicles using an environment-sensitive membrane probe based on 3-hydroxyflavone. *Biochim. Biophys. Acta* *1788*, 495–499.
- Klymchenko, A.S., Roger, E., Anton, N., Anton, H., Shulov, I., Vermot, J., Mely, Y., and Vandamme, T.F. (2012). Highly lipophilic fluorescent dyes in nano-emulsions: towards bright non-leaking nano-droplets. *RSC Adv.* *2*, 11876.
- Klymchenko, A.S., Duportail, G., and Mély, Y. (2013). 3-Hydroxychromone Probes Precisely Located and Oriented in Lipid Bilayers: A Toolkit for Biomembrane Research. In *Fluorescent Methods to Study Biological Membranes SE - 44*, Y. Mély, and G. Duportail, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 51–69.
- Kraft, M.L., and Klitzing, H.A. (2014). Imaging lipids with secondary ion mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta* *1841*, 1108–1119.
- Kraft, M.L., Weber, P.K., Longo, M.L., Hutcheon, I.D., and Boxer, S.G. (2006). Phase separation of lipid membranes analyzed with high-resolution secondary ion mass spectrometry. *Science* *313*, 1948–1951.
- Krauss, M., and Haucke, V. (2011). Shaping membranes for endocytosis.
- Kristensen, K., Henriksen, J.R., and Andresen, T.L. (2014). Quantification of leakage from large unilamellar lipid vesicles by fluorescence correlation spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* *1838*, 2994–3002.
- Kucerka, N., Tristram-Nagle, S., and Nagle, J.F. (2005). Structure of fully hydrated fluid phase lipid bilayers with monounsaturated chains. *J. Membr. Biol.* *208*, 193–202.
- Kucherak, O. a, Oncul, S., Darwich, Z., Yushchenko, D. a, Arntz, Y., Didier, P., Mély, Y., and Klymchenko, A.S. (2010). Switchable Nile red-based probe for cholesterol and lipid order at the outer leaflet of biomembranes. *J. Am. Chem. Soc.* *132*, 4907–4916.
- Kucherak, O.A., Richert, L., Mély, Y., and Klymchenko, A.S. (2012). Dipolar 3-methoxychromones as bright and highly solvatochromic fluorescent dyes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* *14*, 2292–2300.
- Kuimova, M.K. (2012). Mapping viscosity in cells using molecular rotors. *Phys. Chem. Chem. Phys.* *14*, 12671–12686.
- Kuimova, M.K., Yahioglu, G., Levitt, J.A., and Suhling, K. (2008). Molecular rotor measures viscosity of live cells via fluorescence lifetime imaging. *J. Am. Chem. Soc.* *130*, 6672–6673.

Kurzchalia, T. V., Hartmann, E., and Dupree, P. (1995). Guilty by insolubility - does a protein's detergent insolubility reflect a caveolar location? *Trends Cell Biol.* *5*, 187–189.

Kusumi, A., Koyama-Honda, I., and Suzuki, K. (2004). Molecular dynamics and interactions for creation of stimulation-induced stabilized rafts from small unstable steady-state rafts. *Traffic* *5*, 213–230.

Kwiatek, J.M., Owen, D.M., Abu-Siniyeh, A., Yan, P., Loew, L.M., and Gaus, K. (2013). Characterization of a new series of fluorescent probes for imaging membrane order. *PLoS One* *8*, e52960.

Lagerström, M.C., and Schiöth, H.B. (2008). Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* *7*, 339–357.

Lakowicz, J.R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Springer).

Lakowicz, J., Bevan, D., and Maliwal, B. (1983). Synthesis and characterization of a fluorescence probe of the transition and dynamic properties of membranes. *Biochemistry* *22*, 5714–5722.

Lande, M.B. (1995). The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia, and protons. *J. Gen. Physiol.* *106*, 67–84.

Langmuir, I. (1917). THE CONSTITUTION AND FUNDAMENTAL PROPERTIES OF SOLIDS AND LIQUIDS. II. LIQUIDS. 1. *J. Am. Chem. Soc.* *39*, 1848–1906.

Lavis, L.D., and Raines, R.T. (2008). Bright ideas for chemical biology. *ACS Chem. Biol.* *3*, 142–155.

Lentz, B.R., Barenholz, Y., and Thompson, T.E. (1976). Fluorescence depolarization studies of phase transitions and fluidity in phospholipid bilayers. 1. Single component phosphatidylcholine liposomes. *Biochemistry* *15*, 4521–4528.

Lichtenberg, D., Goñi, F.M., and Heerklotz, H. (2005). Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends Biochem. Sci.* *30*, 430–436.

Lim, C.S., Kim, H.J., Lee, J.H., Tian, Y.S., Kim, C.H., Kim, H.M., Joo, T., and Cho, B.R. (2011). A two-photon turn-on probe for lipid rafts with minimum internalization. *Chembiochem* *12*, 392–395.

Lin, W.-C., Blanchette, C.D., Ratto, T. V, and Longo, M.L. (2006). Lipid asymmetry in DLPC/DSPC-supported lipid bilayers: a combined AFM and fluorescence microscopy study. *Biophys. J.* *90*, 228–237.

Lingwood, D., and Simons, K. (2007). Detergent resistance as a tool in membrane research. *Nat. Protoc.* *2*, 2159–2165.

- Lösche, M., Sackmann, E., and Möhwald, H. (1983). A Fluorescence Microscopic Study Concerning the Phase Diagram of Phospholipids. *Berichte Der Bunsengesellschaft Für Phys. Chemie* *87*, 848–852.
- Lösche, M., Rabe, J., Fischer, A., Rucha, B.U., Knoll, W., and Möhwald, H. (1984). Microscopically observed preparation of Langmuir-Blodgett films. *Thin Solid Films* *117*, 269–280.
- Lozano, M.M., Liu, Z., Sunnick, E., Janshoff, A., Kumar, K., and Boxer, S.G. (2013). Colocalization of the ganglioside G(M1) and cholesterol detected by secondary ion mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* *135*, 5620–5630.
- M'Baye, G., Mély, Y., Duportail, G., and Klymchenko, A.S. (2008). Liquid ordered and gel phases of lipid bilayers: fluorescent probes reveal close fluidity but different hydration. *Biophys. J.* *95*, 1217–1225.
- Maget-Dana, R. (1999). The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* *1462*, 109–140.
- Maier, O., Oberle, V., and Hoekstra, D. (2002). Fluorescent lipid probes: some properties and applications (a review). *Chem. Phys. Lipids* *116*, 3–18.
- Maiti, N.C., Mazumdar, S., and Periasamy, N. (1998). J- and H-Aggregates of Porphyrin-Surfactant Complexes: Time-Resolved Fluorescence and Other Spectroscopic Studies †. *J. Phys. Chem. B* *102*, 1528–1538.
- Malnic, B., Godfrey, P.A., and Buck, L.B. (2004). The human olfactory receptor gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 2584–2589.
- Mangiarotti, A., Caruso, B., and Wilke, N. (2014). Phase coexistence in films composed of DLPC and DPPC: a comparison between different model membrane systems. *Biochim. Biophys. Acta* *1838*, 1823–1831.
- Manley, S., Gillette, J.M., Patterson, G.H., Shroff, H., Hess, H.F., Betzig, E., and Lippincott-Schwartz, J. (2008). High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nat. Methods* *5*, 155–157.
- Marks, D.L., Bittman, R., and Pagano, R.E. (2008). Use of Bodipy-labeled sphingolipid and cholesterol analogs to examine membrane microdomains in cells. *Histochem. Cell Biol.* *130*, 819–832.
- Marsh, M., and Helenius, A. (2006). Virus entry: open sesame. *Cell* *124*, 729–740.
- Mathur, A.B., Truskey, G.A., and Reichert, W.M. (2000). Atomic force and total internal reflection fluorescence microscopy for the study of force transmission in endothelial cells. *Biophys. J.* *78*, 1725–1735.

- Matter, K., and Balda, M.S. (2003). Signalling to and from tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 225–236.
- Maule, A.J. (2008). Plasmodesmata: structure, function and biogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* *11*, 680–686.
- McConnell, H.M., Watts, T.H., Weis, R.M., and Brian, A.A. (1986). Supported planar membranes in studies of cell-cell recognition in the immune system. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* *864*, 95–106.
- McDonnell, L.A., and Heeren, R.M.A. (2006). Imaging mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* *26*, 606–643.
- Van Meer, G. (1989). Lipid traffic in animal cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* *5*, 247–275.
- Van Meer, G., Voelker, D.R., and Feigenson, G.W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 112–124.
- Merritt, E.A., Sarfaty, S., van den Akker, F., L’Hoir, C., Martial, J.A., and Hol, W.G. (1994). Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide. *Protein Sci.* *3*, 166–175.
- Moerner, W., and Kador, L. (1989). Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid. *Phys. Rev. Lett.* *62*, 2535–2538.
- Möhwald, H. (1990). Phospholipid and phospholipid-protein monolayers at the air/water interface. *Annu. Rev. Phys. Chem.* *41*, 441–476.
- Mouritsen, O.G. (1991). Theoretical models of phospholipid phase transitions. *Chem. Phys. Lipids* *57*, 179–194.
- Mouritsen, O.G. (2011). Lipidology and lipidomics--quo vadis? A new era for the physical chemistry of lipids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* *13*, 19195–19205.
- Mukherjee, S., Soe, T.T., and Maxfield, F.R. (1999). Endocytic sorting of lipid analogues differing solely in the chemistry of their hydrophobic tails. *J. Cell Biol.* *144*, 1271–1284.
- Mulligan, K., Jakubek, Z.J., and Johnston, L.J. (2011). Supported lipid bilayers on biocompatible polysaccharide multilayers. *Langmuir* *27*, 14352–14359.
- Munro, S. (2003). Lipid Rafts. *Cell* *115*, 377–388.
- Nguyen, D.H., and Hildreth, J.E.K. (2000). Evidence for Budding of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Selectively from Glycolipid-Enriched Membrane Lipid Rafts. *J. Virol.* *74*, 3264–3272.
- Nicolini, C., Baranski, J., Schlummer, S., Palomo, J., Lumbierres-Burgues, M., Kahms, M., Kuhlmann, J., Sanchez, S., Gratton, E., Waldmann, H., et al. (2006). Visualizing association of

N-ras in lipid microdomains: influence of domain structure and interfacial adsorption. *J. Am. Chem. Soc.* *128*, 192–201.

Oncul, S., Klymchenko, A.S., Kucherak, O.A., Demchenko, A.P., Martin, S., Dontenwill, M., Arntz, Y., Didier, P., Duportail, G., and Mély, Y. (2010a). Liquid ordered phase in cell membranes evidenced by a hydration-sensitive probe: effects of cholesterol depletion and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* *1798*, 1436–1443.

Oncul, S., Klymchenko, A.S., Kucherak, O.A., Demchenko, A.P., Martin, S., Dontenwill, M., Arntz, Y., Didier, P., Duportail, G., and Mély, Y. (2010b). Liquid ordered phase in cell membranes evidenced by a hydration-sensitive probe: effects of cholesterol depletion and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* *1798*, 1436–1443.

Orlandi, P.A., and Fishman, P.H. (1998). Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J. Cell Biol.* *141*, 905–915.

Ottaviani, M.F., Daddi, R., Brustolon, M., Turro, N.J., and Tomalia, D.A. (1999). Structural Modifications of DMPC Vesicles upon Interaction with Poly(amidoamine) Dendrimers Studied by CW-Electron Paramagnetic Resonance and Electron Spin-Echo Techniques. *Langmuir* *15*, 1973–1980.

Overington, J.P., Al-Lazikani, B., and Hopkins, A.L. (2006). How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discov.* *5*, 993–996.

Owen, D.M., Williamson, D.J., Magenau, A., and Gaus, K. (2012a). Sub-resolution lipid domains exist in the plasma membrane and regulate protein diffusion and distribution. *Nat. Commun.* *3*, 1256.

Owen, D.M., Rentero, C., Magenau, A., Abu-Siniyeh, A., and Gaus, K. (2012b). Quantitative imaging of membrane lipid order in cells and organisms. *Nat. Protoc.* *7*, 24–35.

Paez, J.G., Jänne, P.A., Lee, J.C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F.J., Lindeman, N., Boggon, T.J., et al. (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* *304*, 1497–1500.

Parasassi, T., Gratton, E., Yu, W.M., Wilson, P., and Levi, M. (1997). Two-photon fluorescence microscopy of laurdan generalized polarization domains in model and natural membranes. *Biophys. J.* *72*, 2413–2429.

Patra, S.K., Alonso, A., Arrondo, J.L.R., and Goñi, F.M. (1999). Liposomes Containing Sphingomyelin and Cholesterol: Detergent Solubilisation and Infrared Spectroscopic Studies. *J. Liposome Res.* *9*, 247–260.

Peng, X., Yang, Z., Wang, J., Fan, J., He, Y., Song, F., Wang, B., Sun, S., Qu, J., Qi, J., et al. (2011). Fluorescence ratiometry and fluorescence lifetime imaging: using a single molecular sensor for dual mode imaging of cellular viscosity. *J. Am. Chem. Soc.* *133*, 6626–6635.

- Perl-Treves, D., Kessler, N., Izhaky, D., and Addadi, L. (1996). Monoclonal antibody recognition of cholesterol monohydrate crystal faces. *Chem. Biol.* *3*, 567–577.
- Piéroni, G., Gargouri, Y., Sarda, L., and Verger, R. (1990). Interactions of lipases with lipid monolayers. *Adv. Colloid Interface Sci.* *32*, 341–378.
- Pike, L.J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J. Lipid Res.* *47*, 1597–1598.
- Pike, L.J., Han, X., Chung, K.-N., and Gross, R.W. (2002). Lipid Rafts Are Enriched in Arachidonic Acid and Plasmenylethanolamine and Their Composition Is Independent of Caveolin-1 Expression: A Quantitative Electrospray Ionization/Mass Spectrometric Analysis †. *Biochemistry* *41*, 2075–2088.
- Pisarchick, M.L., and Thompson, N.L. (1990). Binding of a monoclonal antibody and its Fab fragment to supported phospholipid monolayers measured by total internal reflection fluorescence microscopy. *Biophys. J.* *58*, 1235–1249.
- Pockels, A. (1892). On the Relative Contamination of the Water-Surface by Equal Quantities of Different Substances. *Nature* *46*, 418–419.
- Pockels, A. (1893). Relations Between the Surface-Tension and Relative Contamination of Water Surfaces. *Nature* *48*, 152–154.
- Ratto, T. V, and Longo, M.L. (2002). Obstructed diffusion in phase-separated supported lipid bilayers: a combined atomic force microscopy and fluorescence recovery after photobleaching approach. *Biophys. J.* *83*, 3380–3392.
- Ray, K., Badugu, R., and Lakowicz, J.R. (2006). Distance-dependent metal-enhanced fluorescence from Langmuir-Blodgett monolayers of alkyl-NBD derivatives on silver island films. *Langmuir* *22*, 8374–8378.
- Ribeiro, A.A., and Dennis, E.A. (1974). Effect of thermotropic phase transitions of dipalmitoylphosphatidylcholine on the formation of mixed micelles with Triton X-100. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* *332*, 26–35.
- Robertson, J. (1957). New observations on the ultrastructure of the membranes of frog peripheral nerve fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*
- Rosengarth, A., Wintergalen, A., Galla, H.-J., Hinz, H.-J., and Gerke, V. (1998). Ca²⁺-independent interaction of annexin I with phospholipid monolayers. *FEBS Lett.* *438*, 279–284.
- Rust, M.J., Bates, M., and Zhuang, X. (2006). Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods* *3*, 793–795.
- Sabatini, D.D. (1963). CYTOCHEMISTRY AND ELECTRON MICROSCOPY: The Preservation of Cellular Ultrastructure and Enzymatic Activity by Aldehyde Fixation. *J. Cell Biol.* *17*, 19–58.

- Sackmann, E. (1996). Supported Membranes: Scientific and Practical Applications. *Science* (80-.). *271*, 43–48.
- Samsonov, A. V, Mihalyov, I., and Cohen, F.S. (2001). Characterization of cholesterol-sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes. *Biophys. J.* *81*, 1486–1500.
- Sánchez, M., Aranda, F.J., Teruel, J.A., and Ortiz, A. (2011). New pH-sensitive liposomes containing phosphatidylethanolamine and a bacterial dirhamnolipid. *Chem. Phys. Lipids* *164*, 16–23.
- Scheidt, H.A., Muller, P., Herrmann, A., and Huster, D. (2003). The potential of fluorescent and spin-labeled steroid analogs to mimic natural cholesterol. *J. Biol. Chem.* *278*, 45563–45569.
- Schlessinger, J. (1988). Signal transduction by allosteric receptor oligomerization. *Trends Biochem. Sci.* *13*, 443–447.
- Schlessinger, J. (2000). Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases A large group of genes in all eukaryotes encode for. *Cell* *103*, 211–225.
- Schroeder, R., London, E., and Brown, D. (1994). Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 12130–12134.
- Schroeder, R.J., Ahmed, S.N., Zhu, Y., London, E., and Brown, D.A. (1998). Cholesterol and Sphingolipid Enhance the Triton X-100 Insolubility of Glycosylphosphatidylinositol-anchored Proteins by Promoting the Formation of Detergent-insoluble Ordered Membrane Domains. *J. Biol. Chem.* *273*, 1150–1157.
- Sekar, R.B., and Periasamy, A. (2003). Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *J. Cell Biol.* *160*, 629–633.
- Sengupta, P., Hammond, A., Holowka, D., and Baird, B. (2008). Structural determinants for partitioning of lipids and proteins between coexisting fluid phases in giant plasma membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* *1778*, 20–32.
- Sezgin, E., Levental, I., Grzybek, M., Schwarzmann, G., Mueller, V., Honigmann, A., Belov, V.N., Eggeling, C., Coskun, U., Simons, K., et al. (2012). Partitioning, diffusion, and ligand binding of raft lipid analogs in model and cellular plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* *1818*, 1777–1784.
- Shai, Y. (2002). Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* *66*, 236–248.

- Shaw, J.E., Epand, R.F., Epand, R.M., Li, Z., Bittman, R., and Yip, C.M. (2006). Correlated fluorescence-atomic force microscopy of membrane domains: structure of fluorescence probes determines lipid localization. *Biophys. J.* *90*, 2170–2178.
- Shroff, H., Galbraith, C.G., Galbraith, J.A., and Betzig, E. (2008). Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. *Nat. Methods* *5*, 417–423.
- Shynkar, V. V., Klymchenko, A.S., Kunzelmann, C., Duportail, G., Muller, C.D., Demchenko, A.P., Freyssinet, J.-M., and Mely, Y. (2007). Fluorescent biomembrane probe for ratiometric detection of apoptosis. *J. Am. Chem. Soc.* *129*, 2187–2193.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* *387*, 569–572.
- Singer, S.J., and Nicolson, G.L. (1972). The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* (80-). *175*, 720–731.
- Sot, J., Bagatolli, L.A., Goñi, F.M., and Alonso, A. (2006). Detergent-resistant, ceramide-enriched domains in sphingomyelin/ceramide bilayers. *Biophys. J.* *90*, 903–914.
- Springer, T.A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell* *76*, 301–314.
- Takeichi, M. (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* (80-). *865*, 1451–1455.
- Tepper, A.D., Ruurs, P., Wiedmer, T., Sims, P.J., Borst, J., and van Blitterswijk, W.J. (2000). Sphingomyelin hydrolysis to ceramide during the execution phase of apoptosis results from phospholipid scrambling and alters cell-surface morphology. *J. Cell Biol.* *150*, 155–164.
- Tocanne, J.-F., Dupou-Cézanne, L., Lopez, A., and Tournier, J.-F. (1989). Lipid lateral diffusion and membrane organization. *FEBS Lett.* *257*, 10–16.
- Tocanne, J.-F., Dupou-Cézanne, L., and Lopez, A. (1994). Lateral diffusion of lipids in model and natural membranes. *Prog. Lipid Res.* *33*, 203–237.
- Touitou, E., Dayan, N., Bergelson, L., Godin, B., and Eliaz, M. (2000). Ethosomes — novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *J. Control. Release* *65*, 403–418.
- Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 509–544.
- Uesaka, Y., Otsuka, Y., Lin, Z., Yamasaki, S., Yamaoka, J., Kurazono, H., and Takeda, Y. (1994). Simple method of purification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and cholera toxin using immobilized galactose. *Microb. Pathog.* *16*, 71–76.
- Veatch, S.L., and Keller, S.L. (2003). Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol. *Biophys. J.* *85*, 3074–3083.

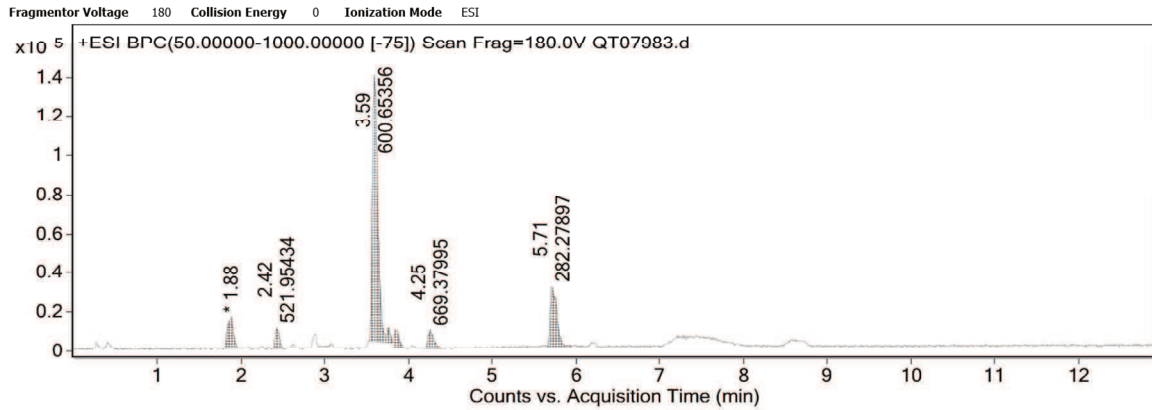
- Victor, K.G., and Cafiso, D.S. (2001). Location and dynamics of basic peptides at the membrane interface: electron paramagnetic resonance spectroscopy of tetramethylpiperidine-N-oxyl-4-amino-4-carboxylic acid-labeled peptides. *Biophys. J.* *81*, 2241–2250.
- Wang, R., Shi, J., Parikh, A.N., Shreve, A.P., Chen, L., and Swanson, B.I. (2004). Evidence for cholera aggregation on GM1-decorated lipid bilayers. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* *33*, 45–51.
- Wang, T., Leventis, R., and Silvius, J.R. (2005). Artificially lipid-anchored proteins can elicit clustering-induced intracellular signaling events in Jurkat T-lymphocytes independent of lipid raft association. *J. Biol. Chem.* *280*, 22839–22846.
- Weiss, S. (1999). Fluorescence Spectroscopy of Single Biomolecules. *Science* (80-.). *283*, 1676–1683.
- Wesołowska, O., and Michalak, K. (2009). Giant unilamellar vesicles—a perfect tool to visualize phase separation and lipid rafts in model systems. *Acta Biochim. Pol* *56*, 33–39.
- Williamson, P., and Schlegel, R.A. (1994). Back and forth. *Mol. Membr. Biol.*
- Willig, K.I., Rizzoli, S.O., Westphal, V., Jahn, R., and Hell, S.W. (2006). STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. *Nature* *440*, 935–939.
- Wolanin, P., Thomason, P., and Stock, J. (2002). Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol.* *3*, reviews3013.1–reviews3013.8.
- Wolf, D.E., Winiski, A.P., Ting, A.E., Bocian, K.M., and Pagano, R.E. (1992). Determination of the transbilayer distribution of fluorescent lipid analogs by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry* *31*, 2865–2873.
- Wright, L.L., Palmer, A.G., and Thompson, N.L. (1988). Inhomogeneous translational diffusion of monoclonal antibodies on phospholipid Langmuir-Blodgett films. *Biophys. J.* *54*, 463–470.
- Wu, Y., Stefl, M., Olzyńska, A., Hof, M., Yahioğlu, G., Yip, P., Casey, D.R., Ces, O., Humpolíčková, J., and Kuimova, M.K. (2013). Molecular rheometry: direct determination of viscosity in Lo and Ld lipid phases via fluorescence lifetime imaging. *Phys. Chem. Chem. Phys.* *15*, 14986–14993.
- Wüstner, D. (2007). Fluorescent sterols as tools in membrane biophysics and cell biology. *Chem. Phys. Lipids* *146*, 1–25.
- Xu, X., Bittman, R., Duportail, G., Heissler, D., Vilcheze, C., and London, E. (2001). Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebroside, and cer. *J. Biol. Chem.* *276*, 33540–33546.

- Yamaji-Hasegawa, A., and Tsujimoto, M. (2006). Asymmetric distribution of phospholipids in biomembranes. *Biol. Pharm. Bull.* *29*, 1547–1553.
- Yeh, S.-C., Patterson, M., Hayward, J., and Fang, Q. (2014). Time-Resolved Fluorescence in Photodynamic Therapy. *Photonics* *1*, 530–564.
- Yonar, D., Horasan, N., Paktaş, D.D., Abramović, Z., Štrancar, J., Sünnetçioğlu, M.M., and Sentjirc, M. (2013). Interaction of antidepressant drug, clomipramine, with model and biological stratum corneum membrane as studied by electron paramagnetic resonance. *J. Pharm. Sci.* *102*, 3762–3772.
- Yoshizawa, T., and Wald, G. (1963). Pre-Lumirhodopsin and the Bleaching of Visual Pigments. *Nature* *197*, 1279–1286.
- Yu, H., and Hui, S.-W. (1992). Merocyanine 540 as a probe to monitor the molecular packing of phosphatidylcholine: a monolayer epifluorescence microscopy and spectroscopy study. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* *1107*, 245–254.
- Yu, J., Fischman, D.A., and Steck, T.L. (1973). Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. *J. Supramol. Struct.* *1*, 233–248.
- Zachowski, A. (1993). Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem. J.* *294 (Pt 1)*, 1–14.
- Zhao, J., Wu, J., Heberle, F.A., Mills, T.T., Klawitter, P., Huang, G., Costanza, G., and Feigenson, G.W. (2007). Phase studies of model biomembranes: complex behavior of DSPC/DOPC/cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta* *1768*, 2764–2776.
- Zwaal, R.F., and Schroit, A.J. (1997). Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* *89*, 1121–1132.

ANNEXE

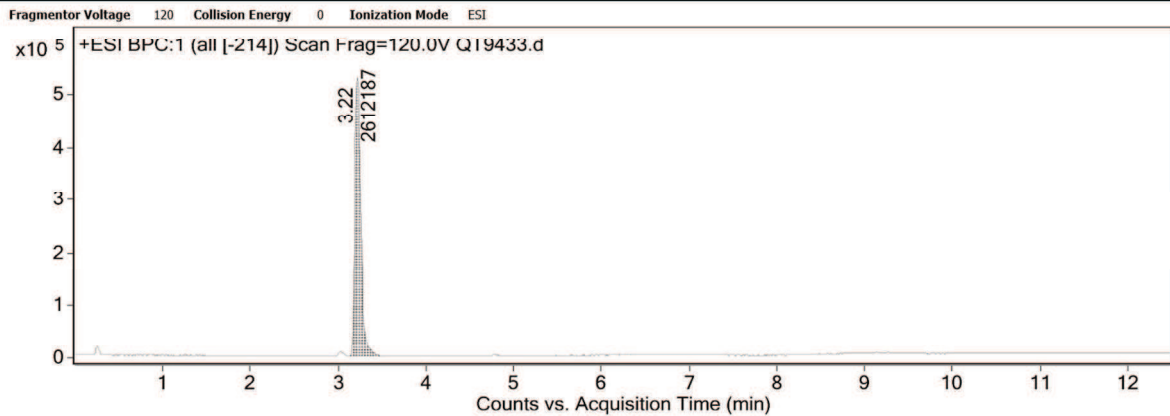
VI. ANNEXE

User Chromatograms



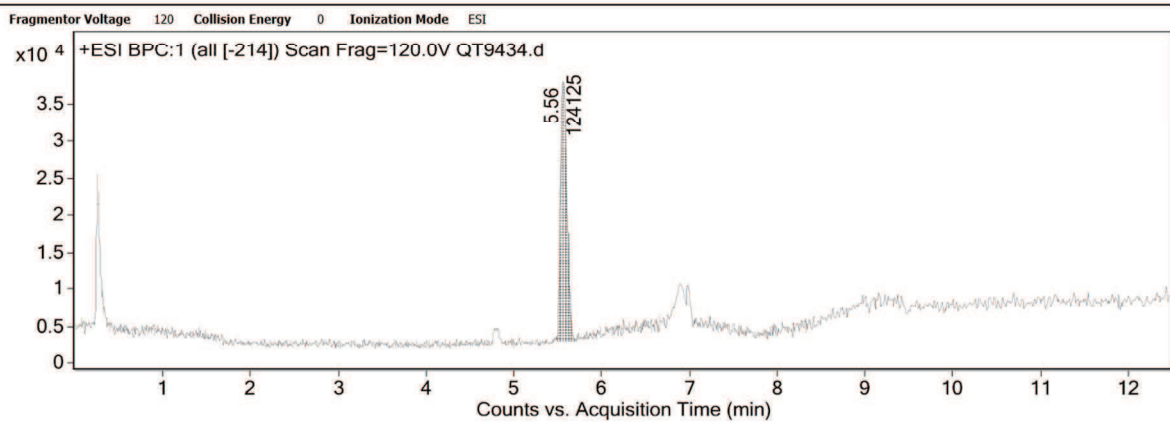
Annexe A : Chromatographe HPLC du composé 21.

User Chromatograms



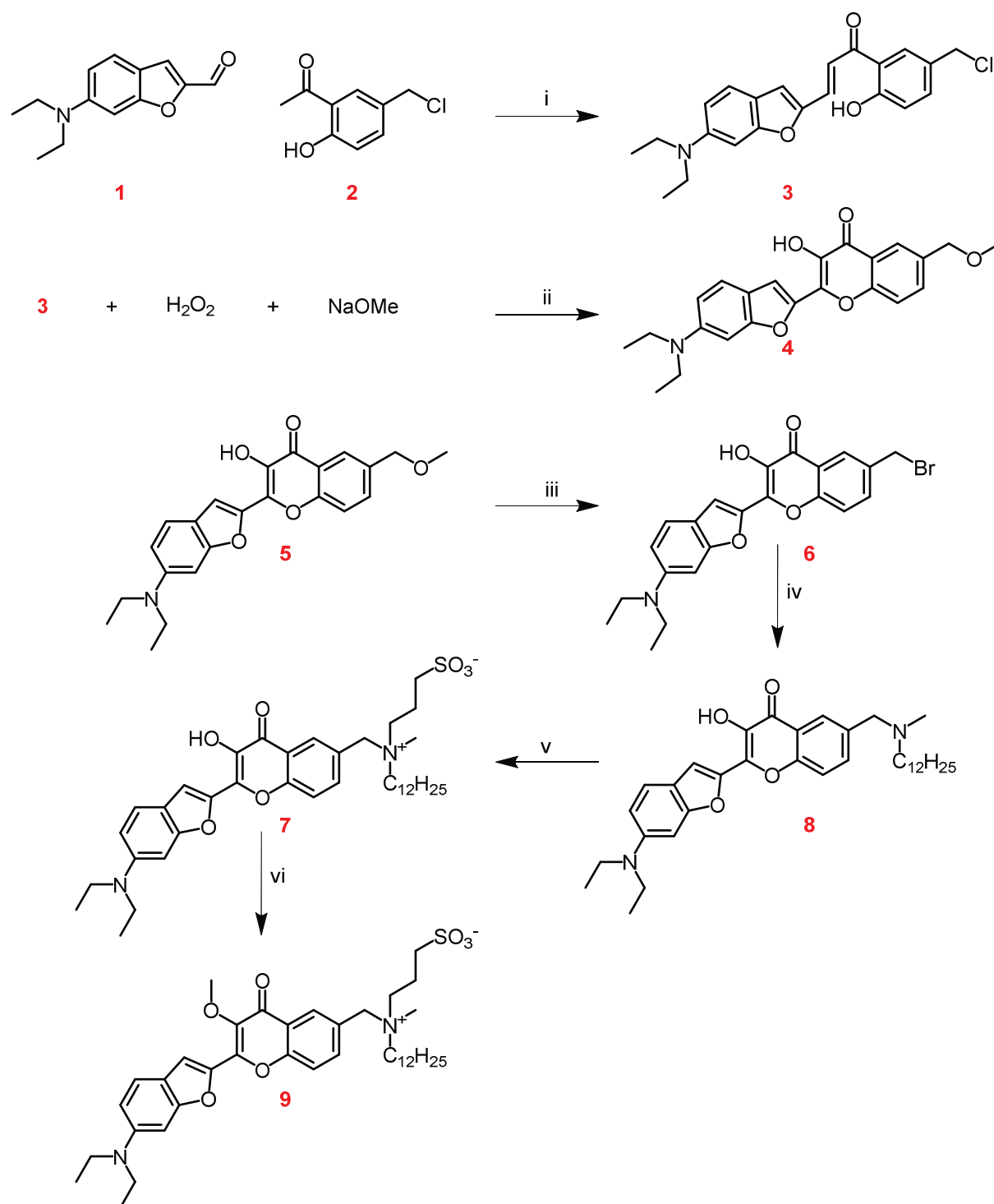
Annexe B : Chromatographe HPLC du composé 22.

User Chromatograms



Annexe C : Chromatographe HPLC du composé 23.

Annexe D : Synthèse de la sonde FC12SM.



i) DMF, MeONa, 0°C, 12 h; ii) EtOH, H_2O_2 , MeONa, reflux, 5 min (19 %); iii) HBr 48%, 100 °C, 10 min (85%); iv) THF, N-methyldodecylamine, RT, 2h (25 %); v) 1,3-propanesultone, CH_3CN , 100°C 24 h (33%), vi) MeI, K_2CO_3 , MeOH, TA overnight (85 %).

Figure 1 : Synthesis scheme of the probe FC12SM.

2-(6-(diethylamino)benzofuran-2-yl)-3-hydroxy-6-(methoxymethyl)-4H-chromen-4-one (1)

6-(diethylamino)-2,3-dihydrobenzofuran-2-carbaldehyde (1 eq, 1g)(1) and 1-(5-(chloromethyl)-2-hydroxyphenyl)ethan-1-one (1.05 eq, 0.85g) have been dissolved into cold DMF (0°C, 5 mL). Then MeONa (4 eq, 1g) have been added. The reaction mixture is let a room temperature for 12h and then EtOH (40 mL) have been added. The reaction is heated to reflux for 5 min and then poured into water. The compound is then extracted with DCM. The solvent is removed under vacuum and the crude product is purified by column chromatography with DCM/MeOH (95/5) as eluent. Yellow powder, yield 19%.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.20 (s, 1H), 7.75 – 7.63 (m, 3H), 7.50 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.89 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 6.78 (dd, $J = 8.8, 2.2$ Hz, 1H), 4.59 (s, 1H), 3.53 – 3.43 (m, 7H), 1.26 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H).

HR-LC-MS: (m/z) $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{NO}_5$ Calc. 393.1576, found 393.1592.

6-(bromomethyl)-2-(6-(diethylamino)benzofuran-2-yl)-3-hydroxy-4H-chromen-4-one (2)

2-(6-(diethylamino)benzofuran-2-yl)-3-hydroxy-6-(methoxymethyl)-4H-chromen-4-one (1) (1 eq, 260 mg) is dissolved into a HBr solution (48%) (5 mL) and the mixture is heated for 10 min at 100°C. The reaction is then cool down to RT and neutralized with a solution of NaOH (50%) (2 mL). The brown orange precipitate formed is filtrated and wash with 15 mL of heptane. The product is dried and use directly without further purification. Brown red powder, yield 85%.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.27 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.78 – 7.73 (m, 1H), 7.67 (d, $J = 11.2$ Hz, 2H), 7.50 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.81 – 6.76 (m, 1H), 4.63 (s, 2H), 3.48 (q, $J = 7.0$ Hz, 4H), 1.26 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H).

HR-LC-MS: (m/z) $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{BrNO}_4$ Calc. 441.0576, found 441.0582.

2-(6-(diethylamino)benzofuran-2-yl)-6-((dodecyl(methyl)amino)methyl)-3-hydroxy-4H-chromen-4-one (3)

6-(bromomethyl)-2-(6-(diethylamino)benzofuran-2-yl)-3-hydroxy-4H-chromen-4-one (2) (1 eq, 150 mg) is dissolved into THF (10 mL) and N-methyldodecylamine (2.5 eq, 210 μL) is added upon stirring. After 2h of stirring the mixture is analyzed by TLC, full conversion was observed. The crude product is then dried under vacuum and purified by column chromatography with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95/5) has eluent. Brown orange oil, yield 25%.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.03 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.67 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 7.55 (t, *J* = 4.4 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.68 (dd, *J* = 8.7, 2.2 Hz, 1H), 3.51 (s, 2H), 3.38 (q, *J* = 7.0 Hz, 5H), 2.32 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.13 (s, 3H), 1.45 (p, *J* = 7.7, 6.9 Hz, 2H), 1.17 (q, *J* = 6.7 Hz, 34H), 0.84 – 0.73 (m, 6H).

HR-LC-MS: (m/z) C₃₅H₄₈N₂O₄ Calc. 560.3614, found 560.3632.

3-(((2-(6-(diethylamino)benzofuran-2-yl)-3-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-6-yl)methyl)(dodecyl)(methyl)ammonio)propane-1-sulfonate (4)

2-(6-(diethylamino)benzofuran-2-yl)-6-((dodecyl(methyl)amino)methyl)-3-hydroxy-4H-chromen-4-one (3) (1 eq, 50 mg) is dissolved into CH₃CN (5 mL) and 1,3-propanesultone (3 eq, 23 μL) is added. The mixture is heated to reflux for 24h. The solvent is then removed under vacuum and the crude product is solved in CH₂Cl₂ and washed with a brine solution 3 times. It is used without further purification directly into the next step. Dark orange oil, yield 33%.

3-(((2-(6-(diethylamino)benzofuran-2-yl)-3-methoxy-4-oxo-4H-chromen-6-yl)methyl)(dodecyl)(methyl)ammonio)propane-1-sulfonate (5)

3-(((2-(6-(diethylamino)benzofuran-2-yl)-3-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-6-yl)methyl)(dodecyl)(methyl)ammonio)propane-1-sulfonate (4) (1 eq ; 15 mg) is firstly dissolved into MeOH (5 mL), then K₂CO₃ (4 eq ; 12 mg) and CH₃I (10 eq ; 31.92 mg) are added to the mixture. The reaction is stirred overnight at room temperature. After one night 5 eq of K₂CO₃ (15mg) and a large excess of CH₃I (1.14 g) is added to the mixture. After a few hours, solvent is removed under vacuum and the crude product is purified by preparative TLC using CH₂Cl₂/MeOH (8/2) as eluent. Yellow orange powder, yield 85%.

¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.26 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.86 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.44 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.76 (d, *J* = 9.5 Hz, 2H), 4.61 (s, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.47 – 3.37 (m, 8H), 2.95 (s, 3H), 2.81 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.46 – 1.37 (m, 2H), 1.34 – 1.11 (m, 20H), 0.87 – 0.76 (m, 9H).

HR-LC-MS: (M+H⁺) C₃₉H₅₆N₂O₇S Calc. 696.3808, found 696.3793.

Annexe E: Liste des publications.

1. Karpenko, I.A., Kreder, R., Valencia, C., Villa, P., Mendre, C., Mouillac, B., Mély, Y., Hibert, M., Bonnet, D., and Klymchenko, A.S. (2014). Red fluorescent turn-on ligands for imaging and quantifying G protein-coupled receptors in living cells. *Chembiochem* 15, 359–363.
2. Klymchenko, A. S. & Kreder, R. Fluorescent probes for lipid rafts: from model membranes to living cells. *Chem. Biol.* 21, 97–113 (2014).
3. Darwich, Z.; Kucherak, O. A.; Kreder, R.; Richert, L.; Vauchelles, R.; Mély, Y.; Klymchenko, A. S. Rational design of fluorescent membrane probes for apoptosis based on 3-hydroxyflavone. *MAF Journal* 2013, 1, 025002.
4. Kreder, R., Pyrshev, K. A., Darwich; Z., Kucherak, O.A., Mély, Y., Klymchenko A.S. Solvatochromic probes with FRET quencher specifically target and identify separate membrane phases in living and apoptotic cells. *Accepté après révision majeur par ACS Chem. Biology.*
5. Kreder, R., Oncul, S., Pyrshev, K., Real, E., Mély, Y., Klymchenko, A.S. Blue fluorogenic probes of plasma membranes for imaging and FRET-based quantification of cellular surface. *Accepté après révision mineur par RSC Advance.*

Liste des communications orales

1. Phase-specific fluorescence quencher for studying lipid domains in model and cell membranes. Andrey S. Klymchenko, Rémy Kreder, Zeinab Darwich, Oleksandr A. Kucherak, Yves Mély. Dijon Domains 2012, International Conference on Membrane Domains, 27-30 Novembre 2012 DIJON, FRANCE
2. Phase-specific fluorescence quencher and probe for studying lipid domains in model and cell membranes. Rémy Kreder, Zeinab Darwich, Oleksandr A. Kucherak, Yves Mély, Andrey S. Klymchenko. *Methods and Applications of Fluorescence: Spectroscopy (MAF13), Imaging and Probes 8-11 Septembre 2013 GÊNES, ITALIE (poster).*
3. Solvatochromic probes with FRET quencher detect selectively ordered and disordered phases in plasma membranes of living cells. Rémy Kreder, Zeinab Darwich, Oleksandr A. Kucherak, Yves Mély, Andrey S. Klymchenko. *Journée Campus Illkirch 2014 7-8 Avril 2014 ILLKIRCH, FRANCE (présentation orale).*

Résumé : Conçues à partir d'une approche rationnelle, nous avons créé de nouvelles sondes membranaires permettant l'imagerie de l'organisation de la membrane plasmique cellulaire. Dans ce travail, nous avons d'abord développé un groupe d'outils, à partir du fluorophore solvatochrome Nile Red et de Black Hole Quencher-2, capable de marquer spécifiquement les domaines ordonnés et désordonnés (radeaux) en les identifiant par leur couleur d'émission. Les études cellulaires, à l'aide de ces sondes, suggèrent que la membrane plasmique est composée de deux phases distinctes. Puis dans le but de créer de nouvelles sondes basées sur Nile Red compatibles avec le sérum et fixables par formaldéhyde/glutaraldéhyde, nous avons modifié la sonde, préalablement développée, NR12S avec un groupement PEG ou amino, respectivement. Étonnamment, la sonde PEGylée est rapidement internalisée dans la cellule et le dérivé amino agrège avec l'agent fixant. D'un autre côté, basée sur Nile Red, nous avons conçu une sonde capable de détecter un récepteur donné et de visualiser son environnement lipidique. Initialement, nous avons obtenu des sondes capables d'allumer leur fluorescence en se liant sur le RCPG à l'ocytocine. Puis, nous avons conjugué NR12S par l'intermédiaire d'un espaceur PEG(12) au ligand de l'intégrine, RGD. Les résultats préliminaires montrent que la molécule peut se lier à la membrane et détecter l'ordre lipidique, cependant les études cellulaires nécessitent un achèvement. Nous avons aussi travaillé sur des sondes membranaires fluorogéniques (turn-on) pour de l'imagerie multi-couleurs. Basées sur le fluorophore 3-méthoxychromone, nous avons obtenu des sondes plus brillantes et plus photostables que la sonde développée originellement à partir de 3-hydroxychromone (F2N12S). Grâce à l'important déplacement de Stokes, elles permettent une imagerie de la membrane cellulaire avec une auto-fluorescence minimale dans la région spectrale bleue, compatible avec les marqueurs communs verts et rouges. Pour finir, basées sur le fluorophore squaraine, nous avons développé trois nouvelles sondes opérant dans la région rouge lointain, qui est particulièrement intéressante pour l'imagerie *in vitro* et *in vivo*. Ces sondes montrent une orientation parallèle avec la membrane lipidique, alors que les expériences cellulaires indiquent que seule la sonde avec deux ancres lipidiques est capable de marquer de façon stable la membrane plasmique. Ces sondes développées ici sont prévues pour être utilisées dans la recherche des radeaux lipidiques aussi bien que pour l'imagerie super-résolution et multi-couleurs de cellules vivantes.

Abstract: Based on rational molecular design, we design new membrane probes that enable fluorescence imaging of cell plasma membrane organization. In this work, we first synthesized a tool kit, based on solvatochromic Nile Red dye and Black Hole Quencher-2, that can stain specifically ordered and disordered lipid domains (rafts) and identify them by the emission color. Cellular studies with these probes suggested that the plasma membrane is composed of two distinct phases. Then, with the idea to make Nile Red-based probes compatible with serum medium and fixable by formaldehyde/glutaraldehyde, we modified previously developed probe NR12S with PEG and amino groups, respectively. Surprisingly, the PEGylated probe is quickly internalized inside the cell and the amino-derivative aggregates with the fixing agent. On the other hand, based on Nile Red we designed probes capable to detect a given receptor and visualize its lipid environment. Initially, we obtained probes that can turn-on fluorescence on binding to the oxytocin GPCR receptor. Then, we conjugated NR12S through a PEG(12) spacer to the ligand of intergrin, RGD. The first data show that the molecule can bind to the membrane and detect the lipid order, though cellular studies have to be completed. We also worked on fluorogenic (turn-on) membrane probes for multi-color imaging. Based on blue 3-methoxychromone dyes, we obtained probes that are brighter and more photostable than the originally developed probe based on 3-hydroxychromone (F2N12S). Due to large Stokes shift, they enabled cell membrane imaging with minimal auto-fluorescence in the blue spectral region, compatible with common green and red probes. At the end, based on squaraine fluorophore, we developed three new probes operating in the far red region, which is also very interesting for *in vitro* and *in vivo* imaging. These dyes show a parallel orientation with the lipid membrane, while the cellular experiments point out that only the probe with two anchor groups is able to stain stably the plasma membrane. The probes developed here are expected to be used for lipid rafts research as well as for super-resolution and multi-color imaging of living cells.