



Développement d'un microréacteur biomimétique pour l'analyse in situ d'activités enzymatiques par couplage de l'électrochimie et de la microscopie de fluorescence

Pauline Lefrançois

► To cite this version:

Pauline Lefrançois. Développement d'un microréacteur biomimétique pour l'analyse in situ d'activités enzymatiques par couplage de l'électrochimie et de la microscopie de fluorescence. Chimie théorique et/ou physique. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0759 . tel-01680949v1

HAL Id: tel-01680949

<https://theses.hal.science/tel-01680949v1>

Submitted on 11 Jan 2018 (v1), last revised 22 Jan 2018 (v2)

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR
DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE
de SCIENCES CHIMIQUES

Par Pauline LEFRANÇOIS

**Développement d'un microréacteur biomimétique pour
l'analyse *in situ* d'activités enzymatiques par couplage de
l'électrochimie et de la microscopie de fluorescence**

Sous la direction de : Stéphane ARBAULT

Soutenue le 30 Novembre 2017

Membres du jury :

Sébastien LECOMMANDOUX	Professeur, Bordeaux INP ENSCBP	Président
Miglena ANGELOVA	Professeur, Université Pierre et Marie Curie – Paris 6	Rapporteur
Fethi BEDIOUI	Directeur de Recherche CNRS Chimie ParisTech	Rapporteur
Olivier BURIEZ	Chargé de Recherche CNRS Ecole Normale Supérieure	Examineur
Marie-Pierre ROLS	Directeur de Recherche CNRS Université de Toulouse	Examineur
Jérôme SANTOLINI	Chercheur CEA, CEA Saclay	Examineur
Stéphane ARBAULT	Directeur de Recherche CNRS Université de Bordeaux	Directeur de thèse

Titre : Développement d'un microréacteur biomimétique pour l'analyse *in situ* d'activités enzymatiques par couplage de l'électrochimie et de la microscopie de fluorescence

Résumé : De nombreuses réactions enzymatiques sont à l'origine de processus physiologiques au sein des organismes vivants. Ces réactions sont basées sur des transferts de protons et d'électrons et conduisent souvent à la production d'espèces secondaires. Parmi elles, les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS, RNS) présentent un intérêt particulier puisqu'elles jouent un double rôle : d'une part en permettant à l'organisme de réagir à un stress par l'activation de voie de signalisation redox, et d'autre part ces ROS et RNS peuvent causer des dommages tissulaires et être à l'origine de dysfonctionnement (stress oxydant) au sein de l'organisme. La haute réactivité de ces espèces induit leurs faibles durées de vie (ns-min) et rend l'étude de certaines réactions enzymatiques difficiles en solution. Ce projet de thèse a pour objectif de développer un microréacteur biomimétique pour l'étude d'activités enzymatiques produisant des ROS/RNS. En effet, en confinant une réaction au sein d'un compartiment de taille équivalente à celle d'une cellule (20-100 μm de diamètre), les espèces générées (H_2O_2 , $\text{NO}^\bullet$, NO_2^-) doivent pouvoir être sondées *in situ* avec une résolution cinétique et quantitative. Des vésicules unilamellaires géantes sont formées en conditions physiologiques et servent de microréacteurs pour l'analyse des activités enzymatiques de la glucose oxydase et des NO-synthases. La microscopie de fluorescence permet l'observation des vésicules et le suivi du déclenchement de la réaction assuré par microinjection. Les espèces produites sont ensuite détectées en temps réel par électrochimie afin de déchiffrer à terme les différentes voies enzymatiques des NO-Synthases.

Mots clés : Liposomes – Biomimétisme – Enzymes – Glucose oxydase – NO-Synthase – Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote – Peroxyde d'hydrogène – Monoxyde d'azote

Title : Development of a single biomimetic microreactor for enzymatic activities *in situ* analyzes by coupling electrochemistry and fluorescence microscopy

Abstract : Enzymatic reactions are involved in many physiological phenomena in living organisms. These reactions are based on protons and electrons transfers and can lead to the production of by-products. Among them, reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) are of great interest as they play a double role: on the one hand by allowing the organism to react to a stress by the activation of signaling redox pathways, and on the other hand, ROS and RNS can cause oxidative damages to tissues ensuing dysfunctions in the organism. The high reactivity of such species induce their short lifetimes (ns-min) and leads to uncertainties when it comes to the study of some enzymatic reactions in bulk. This PhD project aims to develop a biomimetic microreactor for the study of enzymatic activities producing ROS/RNS. Indeed, by confining a reaction within a cell-sized compartment (20-100 μm diameter), the generated species (H_2O_2 , $\text{NO}^\bullet$, NO_2^-) could be analyzed *in situ* with a quantitative and kinetic resolution. Giant unilamellar vesicles are formed in physiological conditions and are used as microreactors for the monitoring of enzymatic activities of glucose oxidase and NO-synthases. Fluorescence microscopy allows individual vesicle observation and the monitoring of reactions triggered by microinjection. Then, released species are detected in real-time by electrochemistry in order to decipher the diverse enzymatic pathways of NO-Synthases.

Keywords : Liposomes – Biomimicry – Enzymes – Glucose oxidase – NO-Synthase – Reactive Oxygen and Nitrogen Species – Hydrogen peroxide – Nitric oxide

Unité de recherche : Institut des Sciences Moléculaires – CNRS UMR 5255
Groupe NSysA – ENSCBP - 56 Avenue Pey Berland - 33603 Pessac Cedex

Remerciements

Trois années de thèse, trois années de recherches, d'expériences et de discussions mais aussi trois années de vie, de rencontres et de changements... Je souhaite adresser mes remerciements à toutes les personnes qui m'ont accompagné au cours de cette aventure.

Pour commencer, je tiens à remercier les rapporteurs, Miglena Angelova et Fethi Bedioui, ainsi que les examinateurs, Marie-Pierre Rols, Olivier Buriez, Sébastien Lecommandoux et Jérôme Santolini d'accepter de juger mes travaux.

Mes remerciements vont ensuite à Stéphane Arbault, mon directeur de thèse. Merci de m'avoir fait confiance dès nos premiers échanges puis tout au long de cette thèse. Je vous en suis très reconnaissante. Je tiens à souligner vos qualités tant professionnelles qu'humaines. Vous m'avez beaucoup appris lors de nos nombreuses discussions grâce à vos connaissances, votre patience et surtout, votre bienveillance perpétuelle. Vous m'avez accompagnée au quotidien en me permettant de voir les choses d'un autre œil lorsque les difficultés se présentaient. Vous m'avez également laissé une grande autonomie dans le travail. Je tiens aussi à vous remercier de m'avoir donné l'opportunité de partir en Suède lors de notre échange avec le laboratoire d'Ann-Sofie Cans. Ce voyage a, de toute évidence, donné de nouvelles perspectives à ce projet. Finalement, un grand merci pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse dans les meilleures conditions possibles grâce à votre soutien mais également en me fournissant les moyens matériels pour y parvenir. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous au quotidien.

Ensuite, je souhaite remercier les autres personnes qui m'ont guidée au travers de leurs différentes expertises.

Jérôme, je te remercie pour ta grande disponibilité et tes conseils. Merci de m'avoir fait partager ta passion pour la NO-Synthase mais également pour ta philosophie, ta bienveillance et ton honnêteté. J'ai toujours beaucoup apprécié nos discussions.

Bertrand, tu m'as initiée à la microscopie confocale avant que je ne vole de mes propres ailes. Je te remercie d'abord pour ta pédagogie mais également pour ton soutien et ton intérêt tout au long de ma thèse.

Laurent, je tiens à te remercier pour ta grande disponibilité et tes conseils précieux. Nos discussions ont toujours été très enrichissantes.

Adeline, merci de m'avoir permis d'accéder à la salle blanche avec toi. Malgré les conditions intrinsèques imposées par le lieu, nous avons brillé dans nos habits de lumière et ce fut un plaisir de partager ces moments avec toi.

Je remercie toutes les autres personnes que j'ai pu solliciter au NSysA et qui ont toujours été disponibles : Stéphane, Patrick, Véro, Aline, Valérie, Pascal, Dodzi, Neso et Alexander ; mais aussi mes anciens encadrants qui ont continué à veiller sur moi : Jeff, Christophe et Chrystel. Et d'autres avec qui j'ai eu l'occasion de discuter : Olivier Sandre, Emmanuel Ibarboure et Emmanuel Suraniti.

Je pense également à Ann-Sofie Cans qui nous a accueillis avec une grande générosité au sein de son laboratoire à Göteborg et nous a permis de développer une nouvelle technologie ici à Bordeaux. Je la remercie également pour l'intérêt particulier qu'elle a montré pour mon projet et sa disponibilité. Merci également aux autres personnes qui nous accueillis à Chalmers : Aldo Jesorka, Neda Najafinobar et Hoda Mashadi Fathali.

Trois années de vie et de rencontres... effectivement, la thèse n'est pas qu'une expérience professionnelle mais aussi une expérience de vie. La mienne a été marquée par les rencontres que j'ai pu faire avec tous les étudiants qui se sont succédé au NSysA : Vasilica, Anne, Justine, Milica, Aleksandar, Eugenio, Gibràn, Sathya, Priscilla, Samuel, Léo, Maew, Win, Damien, Bea, Alessandra, Aileen, Sabina, Saioa...

Je remercie particulièrement Hélène, ma sœur de thèse. On a commencé ensemble et on finit ensemble. On s'est encouragées et conseillées pendant trois ans. Ça n'aurait pas été pareil sans toi derrière moi au quotidien (littéralement !).

Then, I would like to thank Suresh with who I spent a first year of PhD full of positive energy. Thanks for your support and for all the good moments we shared in the lab but also outside.

Aujourd'hui, je tiens à remercier les gens qui m'entourent pour le grand final : Top, Lin, Camille, Bhavana, Maria, Iuliia, Silvia, Alice et Laura. Thanks guys! All of you have made the days awesome in the lab during these last months!

A special thanks to Jerry (aka Panda aka Goat aka Perrito depending on the mood) for your great support these last weeks, for your sense of humor and all the rest! You have made this writing period much better than I expected!

Je pense aussi à Fanny qui a démarré sa thèse sous la direction de Stéphane en même temps que moi mais depuis Pau. J'ai réellement apprécié tous les moments passés ensemble lorsque tu étais en visite à Bordeaux et nos échanges de conseils à propos de ce fameux NO' !

Je n'oublie pas les gens avec qui j'ai pu collaborer : Ariane et Louis au LCPO (Bordeaux), Xavier au LCP (Orsay) ; et aussi les stagiaires que j'ai eu l'occasion d'encadrer : Kenny et Raphaël, ce fut souvent surprenant mais, avec le recul, enrichissant.

Enfin, je tiens à dire merci à ma famille, notamment à ma sœur Elise ; et à mes amis. En particulier, Vola, tu m'as soutenue (même depuis l'autre côté de l'Atlantique !) pendant cette thèse et depuis de nombreuses années sur tous les plans. Ian, merci à toi aussi pour ton soutien au quotidien, notamment dans les moments de doute qui ont pu marquer ces dernières années. Enfin, Thibault, tu m'as toujours encouragée à viser plus haut et tu as été mon premier soutien pendant des années, merci pour tout.

Sommaire

CHAPITRE 1 : MICROREACTEURS BIOMIMETIQUES ET REACTIVITES ENZYMATIQUES 1

I.	MICROREACTEURS BIOMIMETIQUES.....	1
1.	<i>Généralités sur les lipides et leurs différents assemblages</i>	1
2.	<i>Les vésicules unilamellaires géantes</i>	5
a.	Les différents liposomes	5
b.	Applications des liposomes	6
3.	<i>Propriétés de perméabilité des liposomes</i>	7
a.	Ordre de grandeur et perméabilité.....	7
b.	Généralités sur la perméabilité des membranes	7
c.	Modèle de diffusion simple.....	8
d.	Aspects thermodynamiques – Potentiels diélectriques	9
e.	Effets de température	13
4.	<i>Autres microréacteurs biomimétiques</i>	17
a.	Polymersomes.....	17
b.	Vésicules multi-compartiments.....	18
c.	Capsules microgels	21
II.	REACTIVITES ENZYMATIQUES AU SEIN DE MICROREACTEURS BIOMIMETIQUES	23
1.	<i>La glucose oxydase et la peroxydase de raifort : mécanismes réactionnels et cinétiques</i>	23
a.	Le protocole basé sur la glucose oxydase pour la détection du glucose	23
i.	Mécanisme réactionnel.....	24
ii.	Cinétique enzymatique	25
b.	Le test Amplex Red pour la détection du peroxyde d'hydrogène	26
i.	Mécanisme réactionnel.....	26
ii.	Réactions secondaires et analyse quantitative	28
2.	<i>Le monoxyde d'azote et les NO-Synthases</i>	30
a.	Rôles du monoxyde d'azote	30
b.	Structure des NO-Synthases.....	31
c.	Controverse autour des mécanismes réactionnels des NO-Synthases	34
i.	Etape 1 : hydroxylation de l'arginine.....	34
ii.	Etape 2 : oxydation du N ^ω -hydroxyarginine (NOHA)	36
3.	<i>Méthodes de détection des ROS et RNS</i>	38
a.	Méthodes luminescentes	38
i.	Détection de H ₂ O ₂	38
ii.	Détection de NO [•]	40
iii.	Détection de O ₂ ^{• -}	42
iv.	Détection de ONOO ⁻	44
b.	Capteurs et méthodes électrochimiques	45
i.	Principes généraux	45
ii.	Electrodes et phénomènes de diffusion.....	50
iii.	Electroanalyse de ROS et RNS	52
iv.	Détection de H ₂ O ₂	53
v.	Détection du NO [•]	54
c.	Autres techniques d'analyses.....	56
i.	Résonance paramagnétique électronique	56
ii.	Au-delà des ROS et RNS.....	57
III.	OBJECTIFS DU PROJET DE THESE	58

CHAPITRE 2 : FORMATION D'UN MICROREACTEUR BIOMIMETIQUE 60

I.	L'ELECTROFORMATION.....	60
1.	<i>Principe</i>	60
2.	<i>Electroformation en conditions physiologiques</i>	63
a.	Conditions expérimentales	63
i.	Supports d'électrodes	63
ii.	Compositions de membrane	64
b.	Mise en place du protocole.....	65
c.	Limitations.....	71

II.	HYDRATATION SUR GEL DE POLY(ACETATE DE VINYLE)	76
1.	<i>Introduction</i>	76
2.	<i>Dynamique du gel</i>	77
III.	REHYDRATATION DE VESICULES MULTILAMELLAIRES	79
1.	<i>Introduction</i>	79
2.	<i>Gonflement de vésicules unilamellaires géantes sur un réservoir de lipides</i>	79
a.	Composition et propriétés des lipides.....	79
b.	Gonflement de vésicules	83
c.	Exploitation de ce type de vésicules	85
CHAPITRE 3 : MODIFICATION DU MILIEU INTERNE ET DECLENCHEMENT CONTROLE DE LA REACTION ENZYMATIQUE		87
I.	ENCAPSULATION D'ESPECES AU COURS DE LA FORMATION DES VESICULES	87
1.	<i>Introduction</i>	87
2.	<i>Encapsulation au cours de l'électroformation</i>	88
a.	Fluorophores	88
i.	Calcéine	88
ii.	Resorufine	89
b.	Systèmes enzymatiques	91
i.	Amplex Red et peroxydase	91
ii.	NO-Synthase inductible (domaine oxygénase).....	92
c.	Effet du champ électrique sur l'activité enzymatique	94
II.	MICROINJECTION DE VESICULES UNILAMELLAIRES GEANTES.....	97
1.	<i>Introduction</i>	97
2.	<i>Electro-microinjection de vésicules avec réservoir</i>	98
III.	PERMEABILITE DES VESICULES	101
1.	<i>Observations et hypothèses</i>	101
2.	<i>Contrôles et conclusions</i>	104
a.	Photoblanchiment.....	104
b.	Déséquilibre osmotique	104
c.	Pores permanents dus à l'électroporation.....	104
d.	Domaines lipidiques	106
e.	Pores transitoires et complément sur l'oxydation des lipides	109
IV.	CONTROLE DU DECLENCHEMENT DE LA REACTION ENZYMATIQUE	111
1.	<i>Formation d'un réseau de vésicules connectées par des nanotubes : principe</i>	111
2.	<i>Déclenchement réactionnel contrôlé par minimisation d'énergie libre</i>	114
CHAPITRE 4 : COUPLAGE ENTRE ELECTROCHIMIE ET MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE POUR LA DETECTION DES ESPECES PRODUITES.....		115
I.	ETUDE DE L'OXYDATION DIRECTE DE L'AMPLEX RED EN RESORUFINE.....	116
1.	<i>Mise en évidence d'une oxydation directe de l'Amplex Red par voltamétrie cyclique</i>	118
2.	<i>Caractérisation du produit issu de l'oxydation de l'Amplex Red par spectroélectrochimie</i>	120
3.	<i>Imagerie in situ de la formation de la resorufine à la surface de l'électrode par microscopie confocale</i> 122	
II.	DETECTION <i>IN SITU</i> DU PEROXYDE D'HYDROGENE PRODUIT PAR LA REACTION ENZYMATIQUE DE LA GLUCOSE OXYDASE AU SEIN D'UNE VESICULE UNILAMELLAIRE GEANTE.....	125
1.	<i>La réaction modèle bienzymatique dans une vésicule : la perméabilité comme limitation majeure</i> 125	
a.	Etude cinétique préliminaire par spectrophotométrie	126
b.	Calibration	127
c.	Microinjection en vésicule	128
2.	<i>Combiner propriétés de perméabilité et analyse quantitative du système glucose-GOX</i>	133
a.	Etalonnage du système de détection vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène	134
i.	En solution.....	134
ii.	Sous flux	136
b.	Production de peroxyde d'hydrogène par le système glucose/GOX dans un microréacteur et détection électrochimique in situ	138
i.	Injection d'H ₂ O ₂	138

ii.	Production enzymatique de H_2O_2	140
III.	MISE EN PLACE DE LA DETECTION DU NO^* ET DU NO_2^- : VERS LA CARACTERISATION DES ACTIVITES DES NO-SYNTASES .	146
1.	<i>Calibration du système de détection vis-à-vis du NO^* et du NO_2^-</i>	146
a.	En solution : NO^*	147
b.	En solution : NO_2^-	149
2.	<i>Microinjection de produits et substrats de l'activité NO-Synthase dans un liposome géant</i>	151
a.	Généralités sur les NONOates	151
b.	Détection de NO^* et NO_2^- injectés au sein d'une GUUV	152
i.	NO_2^-	152
ii.	DEA-NONOate	153
iii.	Interférents possibles à l'analyse de la NO-Synthase <i>in situ</i>	153
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	156
	ANNEXES.....	158
I.	MATERIELS	158
1.	<i>Produits chimiques</i>	158
2.	<i>Appareils</i>	160
3.	<i>Autres</i>	160
II.	METHODES.....	161
1.	<i>Electroformation</i>	161
a.	Préparation des solutions de lipides	161
b.	Dépôt et séchage	161
c.	Montage pour l'électroformation	162
2.	<i>Fabrication des micropipettes</i>	164
3.	<i>Fabrication des UMEs</i>	166
4.	<i>Préparation des lames pour immobilisation des GUUVs</i>	168
a.	Poly-L-lysine	168
b.	SU-8 2002.....	169
5.	<i>Détermination du pK_a de la resorufine avec le tampon universel de Britton Robinson</i>	170
a.	Préparation du tampon universel de Britton Robinson	170
b.	Spectroscopie	170
6.	<i>Caractérisation de la NO-Synthase</i>	171
a.	Conformation et concentration	171
b.	Activité (test de Griess)	172
7.	<i>Préparation de solutions saturées en NO^*</i>	176
8.	<i>Dosage du NO^* par le test oxyhémoglobine</i>	176
a.	Préparation de la solution d'oxyhémoglobine	176
b.	Dosage par ajouts successifs	177
c.	Suivi cinétique de production de NO^*	179
III.	SPECTRES DE REFERENCE.....	180
1.	<i>Calcéine</i>	180
2.	<i>Resorufine</i>	180
3.	<i>Fluoresceine</i>	181
4.	<i>DiD</i>	181
5.	<i>Nile Red</i>	182
IV.	CALIBRATION EN SOLUTION : L'HYPOTHESE DE LA DECOMPOSITION DU NO^* PAR O_2	183
	BIBLIOGRAPHIE	185

Chapitre 1 : Microréacteurs biomimétiques et réactivités enzymatiques

Chapitre 1 : Microréacteurs biomimétiques et réactivités enzymatiques

Dans un contexte où le développement de nouvelles technologies est de plus en plus pressant, la biologie synthétique apporte de nouvelles opportunités pour mieux comprendre les phénomènes mis en jeu dans la nature. La fabrication de microréacteurs biomimétiques permet l'étude de réactions biochimiques et biologiques dans un environnement proche de la structure cellulaire en s'affranchissant de sa complexité.

I. Microréacteurs biomimétiques

1. Généralités sur les lipides et leurs différents assemblages

La cellule est l'unité fondamentale de tout organisme vivant. Elle possède une structure et une fonction propre. Les deux principaux types de cellules sont les cellules procaryotes et les cellules eucaryotes. Les premières sont constituées d'une membrane plasmique contenant le cytoplasme dans lequel se trouve l'ADN. Ce type de cellule regroupe principalement les eubactéries et les archées et mesurent entre 5 et 10 μm de diamètre. Quant aux cellules eucaryotes, leur structure est plus complexe bien que quelques éléments structuraux soient communs. Tout comme les cellules procaryotes, les eucaryotes possèdent une membrane plasmique et un cytoplasme. Cependant au sein du cytoplasme se trouvent également un noyau entouré d'une membrane nucléaire et de nombreux organites, tels que les mitochondries ou encore l'appareil de Golgi. La membrane plasmique est formée par une bicouche phospholipidique contenant de nombreuses biomolécules dont des protéines de transport, assurant des échanges entre intérieur et extérieur de la cellule, des enzymes ou des glucides (glycoprotéines, glycolipides) ayant un rôle d'agent de reconnaissance et de structuration (Figure 1).

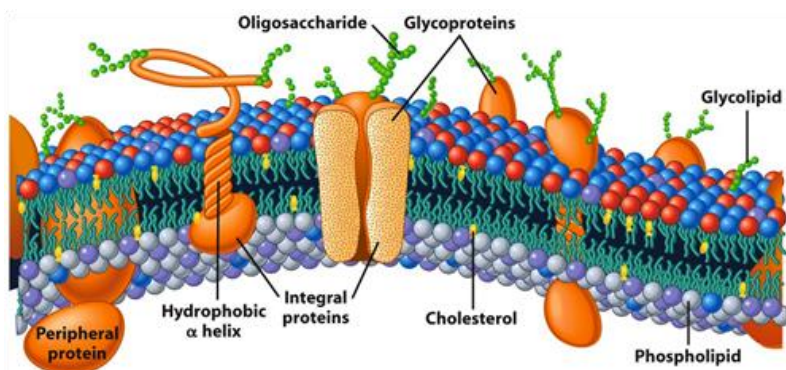


Figure 1 Représentation schématisée d'une membrane cellulaire et des différentes sous-unités la composant.

Les lipides sont des molécules amphiphiles possédant une tête polaire hydrophile (surface d'environ $50 \text{ \AA}^2$) et une chaîne aliphatique hydrophobe (longueur de 2-3 nm). Il existe différentes catégories de lipides dont les acides gras, les stérols, les mono-, di- ou triglycérides ou encore les phospholipides. C'est cette dernière catégorie de lipides qui composent majoritairement la membrane cellulaire avec le cholestérol (50 wt.%).

Ce sont donc les phospholipides qui sont particulièrement utilisés pour la formation de microréacteurs biomimétiques. Parmi les phospholipides, on distingue à nouveau plusieurs catégories incluant les sphingophospholipides et les glycérophospholipides. Les sphingophospholipides sont formés par la sphingosine, un résidu d'acide gras, un résidu d'acide phosphorique et un groupe hydroxyle

ou d'acides aminés. Les glycérophospholipides ou phosphoglycérides sont formés par association de deux résidus d'acides gras, d'un résidu glycérol et d'un résidu phosphate (acide phosphatidique) lié à un acide aminé ou à un groupe hydroxyle, tels que la sérine (phosphatidylsérine), l'éthanolamine (phosphatidyléthanolamine), l'inositol (phosphatidylinositol) ou encore la choline (phosphatidylcholine) (Figure 2).

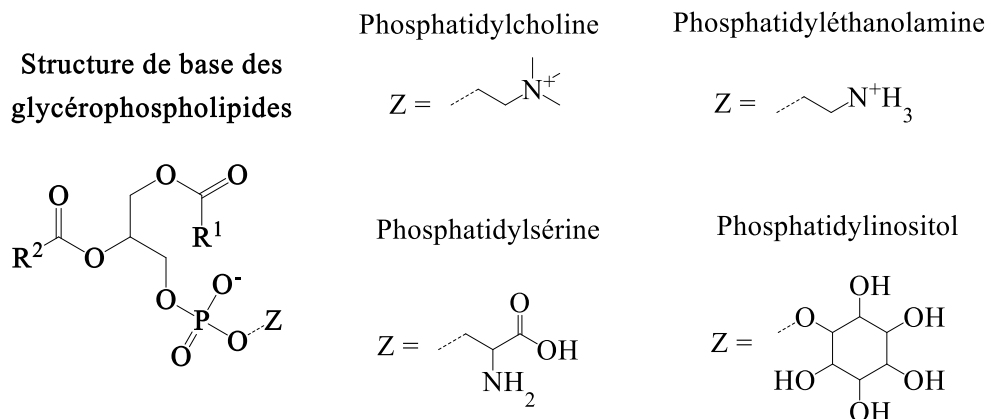


Figure 2 Structures des principaux phospholipides. R^1 et R^2 représentent les chaînes d'acides gras.

Le groupement apolaire des phosphoglycérides correspond aux deux résidus d'acides gras qui forment la queue hydrophobe de la molécule. Le reste constitue la tête hydrophile et peut être neutre, cationique, anionique ou zwitterionnique. De plus, pour un lipide donné (ex. phosphatidylcholine), on compte plusieurs structures dépendant de la longueur de la chaîne carbonée et du nombre d'insaturations. De plus, plusieurs configurations d'un même phospholipide sont possibles et dépendent de la rotation autour de la liaison C-C de la chaîne carbonée. Le plus souvent ces configurations sont de type *trans* (Figure 3) mais on peut également observer des configurations *gauche* [1].

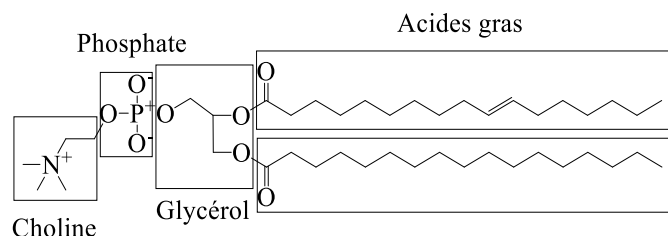


Figure 3 Structure possible de la phosphatidylcholine.

En solution aqueuse, ces lipides vont s'auto-assembler pour minimiser l'interaction des domaines hydrophobes avec l'eau. De plus, la thermodynamique confère aux lipides des propriétés d'auto-assemblage en fonction de la composition d'un mélange. Ainsi en variant ce mélange, différentes phases plus ou moins complexes peuvent être observées. Les principales structures obtenues en solution aqueuse sont des micelles ou des bicouches lipidiques. Dans les micelles, les têtes polaires sont orientées vers l'extérieur et les queues aliphatiques sont isolées du milieu extérieur. Dans les bicouches lipidiques, les têtes correspondent à l'extérieur de la membrane et les chaînes carbonées forment l'intérieur de la membrane. Ce sont ces bicouches qui forment des liposomes (Figure 4).

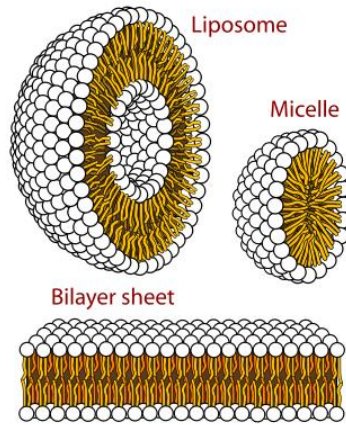


Figure 4 Représentation schématique de différentes structures auto-assemblées de phospholipides.

Les bicouches lipidiques, constituées de deux feuillets de phospholipides, forment la matrice des membranes biologiques. Lorsque cette bicouche est repliée et se referme sur elle-même pour former un liposome, on distingue alors le feuillet interne de la membrane et le feuillet externe. La composition du feuillet interne se différencie de celle du feuillet externe et les lipides d'un feuillet peuvent, d'une part se déplacer latéralement au sein d'un feuillet mais aussi passer de manière transversale dans l'autre feuillet, c'est le processus de *flip-flop* (Figure 5).

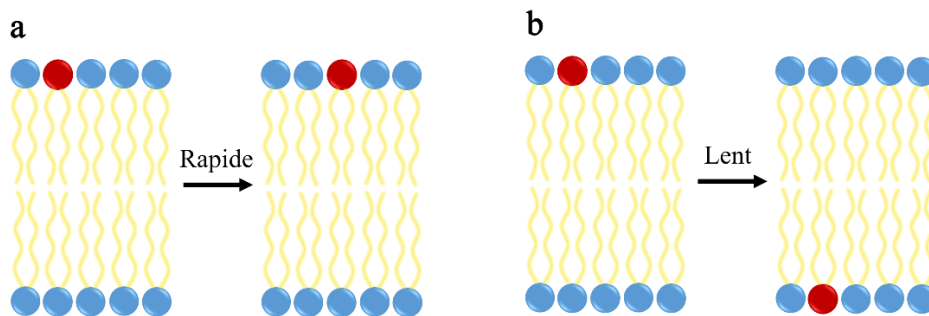


Figure 5 Représentation schématique du déplacement latéral (a) et transversal (b) au sein d'une bicouche de phospholipides.

Cependant, ce phénomène est assez rare (demi-temps de réaction de plusieurs jours au minimum d'après Voet et al [2], ou de quelques heures d'après Kornberg et al [3]). Dans les systèmes biologiques, des enzymes telles que les flippases, les floppases ou les scramblases permettent le passage des phospholipides d'un feuillet à l'autre. La diffusion latérale est quant à elle beaucoup plus rapide. En effet, il a été établi par diverses méthodes (microscopie FRAP, spectroscopie RMN) que la vitesse de déplacement latéral d'un lipide au sein d'un feuillet est de l'ordre de 1 μm par seconde [2]. Par ailleurs, en fonction de la configuration *trans* ou *gauche* de la chaîne alkyle, il existe trois conformations de la bicouche ou des phases : α , β et cristalline. La conformation α , composée de phospholipides *gauche* est désordonnée : l'entropie des chaînes d'acides gras et la diffusion latérale sont élevées. Dans la conformation β les chaînes sont parallèles les unes aux autres, la cohésion est assurée par des interactions de type Van der Waals entre les chaînes hydrophobes ainsi que par des liaisons hydrogènes et électrostatiques au niveau des têtes polaires. Dans cette conformation, la translation intra-feuillet est faible (Figure 6). La phase cristalline correspond à un état ordonné figé dans lequel le mouvement des phospholipides est quasi inexistant [4], [5].

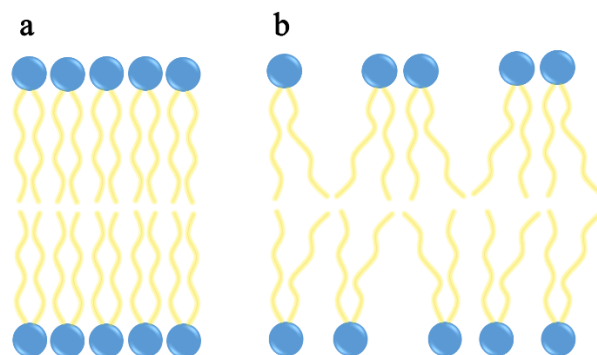


Figure 6 Conformation ordonnée β (a) et désordonnée α (b) des phospholipides dans une membrane

Au niveau cellulaire, la fluidité des lipides se révèle être nécessaire au fonctionnement de cette machinerie puisqu'elle permet d'absorber, de sécréter, de se protéger, d'adhérer, de communiquer, *etc.* à l'interface entre les membranes et le milieu environnant. Cependant, certains paramètres vont modifier cette fluidité. Une augmentation de température donne lieu à une fluidification membranaire puisque les lipides possèdent une température de transition de phase (T_m) au-delà de laquelle ils passent d'une phase gel ordonnée (conformation β) à une phase fluide désordonnée (conformation α). Cette température de transition est définie comme la quantité d'énergie qu'il faut fournir au système pour rompre la cohésion moléculaire. C'est la température à laquelle la variation d'enthalpie équivaut à l'entropie générée par le désordre des chaînes : $\Delta H = T_m \cdot \Delta S$. Elle dépend à la fois de la longueur des chaînes alkyles et du nombre d'insaturations : plus les chaînes carbonées des acides-gras sont courtes et insaturées, plus la température de transition est basse, donc plus la membrane est fluide à température ambiante [6]. Enfin, toute molécule s'intégrant à la membrane, telles que les protéines ou le cholestérol, diminuent la fluidité. Le cholestérol, présent uniquement dans les cellules animales, est un lipide qui s'intègre entre les chaînes des phospholipides, limitant le mouvement de celles-ci et conférant un caractère rigidifiant et solidifiant à la membrane.

Face à la complexité des membranes cellulaires, des modèles de membrane artificielle ont été développés pour comprendre les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles de ces membranes. Parmi ces modèles, les liposomes sont ceux qui miment le mieux la membrane cellulaire tout en s'affranchissant de sa complexité due aux protéines et glucides additionnels.

2. Les vésicules unilamellaires géantes

a. Les différents liposomes

Les liposomes ont été formés et observés pour la première fois par microscopie électronique à coloration négative par Alec Bangham *et al.* en 1961, qui ne publia ses travaux qu'en 1965 [7]. Cependant, ce n'est que quelques mois plus tard que ces objets seront nommés « liposomes » par G. Weissmann en référence aux lysosomes sur lesquels il travaillait [8]. Très vite, ces objets ont suscité un grand intérêt, notamment auprès de la communauté travaillant sur les membranes supportées dites « *Black Lipid Membrane* » (BLM), qui a rapidement vu en eux le potentiel d'un nouveau système modèle capable de mimer la biologie.

Les liposomes représentent le modèle cellulaire le plus simple puisqu'il ne s'agit que d'une (ou plusieurs) bicouche(s) de phospholipides refermée(s) sur elle(s)-même(s). La taille caractéristique de ces vésicules, à savoir le diamètre pour des objets sphériques, varie d'une dizaine de nanomètres à quelques centaines de micromètres. C'est ce critère qui a été défini comme classement. Ainsi, quatre catégories de liposomes sont différenciées (Figure 7) :

- Les SUVs pour *Small Unilamellar Vesicles* : ces petites vésicules unilamellaires mesurent moins de 200 nm de diamètre.
- Les LUVs pour *Large Unilamellar Vesicles* : ces vésicules unilamellaires larges ont un diamètre allant de 200 nm à 1 μ m.
- Les GUVs pour *Giant Unilamellar Vesicles* : les vésicules unilamellaires géantes peuvent mesurer de 1 à plus de 100 μ m de diamètre.
- En plus de ces trois grandes classes, deux autres classes intègrent les vésicules multilamellaires ou multivésiculaires : les MLV (pour multilamellar vesicles) et MVV (pour multivesicular vesicles).

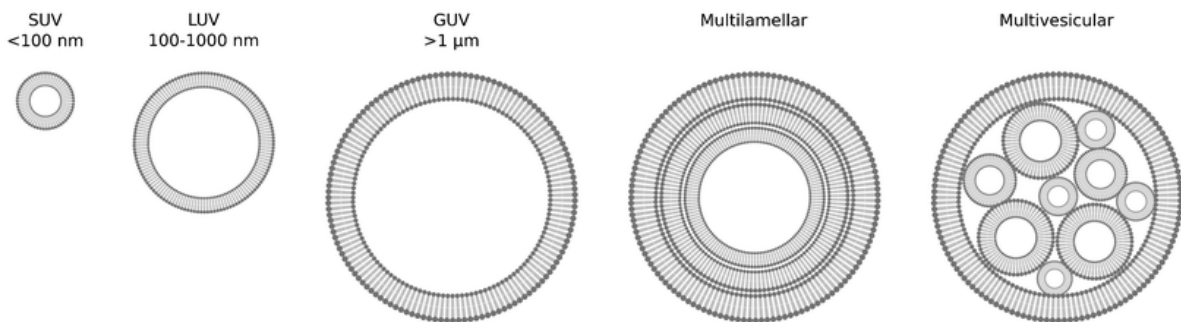


Figure 7 Classification des liposomes. [1]

Outre le diamètre des vésicules, l'épaisseur de la membrane correspond à environ deux fois la longueur des lipides qui la compose. Des protéines peuvent être intégrées à cette membrane, entraînant une augmentation d'épaisseur, on parle alors de protéoliposome. En moyenne, l'épaisseur d'une membrane est de 3 à 4 nm et ne dépasse pas 10 nm [9].

b. Applications des liposomes

Les liposomes sont aujourd'hui utilisés dans de nombreux domaines d'application pharmaceutiques ou en cosmétologie sur la base qu'un principe actif peut être encapsulé au sein d'un liposome. En fonction de sa nature, il sera encapsulé à l'intérieur du liposome, c'est-à-dire dans la phase aqueuse ou dans la membrane lipidique. Dans les fluides biologiques, notamment la circulation sanguine, ces liposomes peuvent fusionner avec une cellule ou être endocytés, libérant alors le principe actif [10]. Cependant, ils peuvent être rapidement éliminés par les macrophages et s'accumulent au niveau du foie et de la rate, en faisant de parfait candidat pour cibler ces organes en particulier [11], [12]. La phagocytose peut être limitée en intégrant des molécules furtives telles que des gangliosides [13] ou du polyéthylène glycol [14]. De plus, les liposomes sont utilisés comme vecteur en thérapie génique, lorsqu'ils présentent un promoteur de fusion pour une meilleure intégration cellulaire [15] ou une fonction sensible au pH pour qu'il y ait fusion avec le lysosyme (pH acide) et libération du principe actif à l'intérieur de la cellule [16]. Par ailleurs, en cosmétique, l'encapsulation d'un principe actif dans un liposome est proposée comme une alternative aux émulsions ou solutions alcooliques, évitant ainsi d'éventuels problèmes d'irritations ou facilitant le passage dans la barrière cutanée [17].

Cependant, le plus vaste domaine d'application des liposomes est la recherche en biochimie et biophysique. En effet, depuis qu'il est possible de former des liposomes à façon, ceux-ci ont suscité un élan d'intérêt, d'une part pour la compréhension des propriétés des membranes cellulaires et d'autre part, dans le domaine de l'encapsulation et de l'effet de confinement. De par leur nature, il est possible de modifier plusieurs paramètres physico-chimiques, tels que la composition de la membrane ou la température, le pH ou la force ionique. Un large spectre de paramètres est alors exploitable et donne accès à de nombreuses propriétés, parmi lesquelles, la fluidité ou la perméabilité.

3. Propriétés de perméabilité des liposomes

a. Ordre de grandeur et perméabilité

Dans une revue de 1986 sur la perméabilité de l'eau et des solutés ioniques [18], Deamer et Bramhall ont illustré à quel point une membrane phospholipidique est perméable à l'eau et en comparaison, très peu aux ions sodium. Ils se sont interrogés sur la façon dont l'eau et les solutés ioniques traversent la membrane : si l'eau traverse la membrane, un soluté ionique la traverse-t-il *via* le même chemin ? Ils ont cherché à comparer de façon relative la vitesse de passage d'une molécule d'eau ou de soluté ionique à travers une même membrane. Pour cela, ils se sont placés dans un système où les molécules d'eau ou de soluté ionique passent à travers un phospholipide. En prenant $0,7 \text{ nm}^2$ comme l'aire moyenne d'un phospholipide insaturé dans une membrane et en considérant un gradient de concentration de 1 mol/L de part et d'autre de la membrane, ils calculèrent qu'avec un coefficient de perméabilité de $10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$, environ 4000 molécules d'eau traversent la membrane par seconde. Par ailleurs, en prenant un coefficient de perméabilité de $10^{-12} \text{ cm.s}^{-1}$ pour les ions sodium, seulement un ion sodium passe la membrane toutes les 70 heures. Ceci illustre bien la notion de perméabilité relative de 10^9 entre l'eau et les ions sodium.

b. Généralités sur la perméabilité des membranes

Le coefficient de perméabilité est obtenu par l'intégration de la première loi de Fick sur la diffusion et est défini selon :

$$P = \frac{KD}{d} \quad (1)$$

Où $P (\text{cm.s}^{-1})$ est le coefficient de perméabilité, K est le coefficient de partition du soluté entre la membrane et le milieu, $D (\text{cm}^2.\text{s}^{-1})$ est le coefficient de diffusion du soluté et $d (\text{cm})$ est l'épaisseur de la membrane. Le coefficient de partition est la mesure relative de la solubilité du soluté entre la membrane et la phase aqueuse, les deux étant considérées comme des phases isotropes pures. Ce coefficient est donné par la différence entre les potentiels standards chimiques (énergie libre) du soluté dans l'eau et dans la membrane.

L'eau étant un milieu fortement diélectrique comparée à la membrane ($\epsilon_{\text{eau}} = 80$, $\epsilon_{\text{membrane}} = 2$), les membranes phospholipidiques sont considérées, comme imperméables aux espèces ioniques (Na^+ , Cl^- , K^+ ...) et aux grosses molécules polaires (sucres, acides aminés...), alors qu'elles sont légèrement perméables aux petites molécules polaires (éthanol, H_2O , glycérol...) et perméables aux petites molécules hydrophobes (CO_2 , O_2 , N_2 ...). La diffusion de ces dernières se fait par diffusion simple lorsqu'un gradient de concentration est établi de part et d'autre de la membrane. Les molécules vont alors diffuser de la zone la plus concentrée vers la zone la moins concentrée pour créer un équilibre.

Cependant, un certain nombre de paramètres tels que la composition de la membrane, le pH ou la température modifie cette interprétation. En effet, ce sont ces mêmes paramètres qui sont pris en compte dans la description de la fluidité membranaire. Il est alors aisé de faire le lien entre fluidité et perméabilité puisque plus les lipides sont fluides, plus la membrane est dynamique, autorisant alors un passage plus simple de molécules au sein de la membrane. Ainsi, il est difficile d'établir des valeurs

de référence concernant la perméabilité des membranes phospholipidiques vis-à-vis d'une molécule puisqu'un ensemble de paramètres doit être pris en compte.

Finalement, deux modèles complémentaires sont définis. D'une part, un modèle où les molécules sont solubilisées transitoirement dans la partie non polaire de la membrane, et diffusent simplement d'un côté à l'autre de celle-ci. Ce modèle dépend alors fortement de la composition de la membrane. Et d'autre part, un modèle de diffusion à travers des défauts transitoires créés par des fluctuations thermiques [18]. Ces deux modèles impliquent des phénomènes concomitants et il est décrit, dans les premiers articles s'intéressant à la perméabilité des membranes, que le modèle de diffusion simple s'applique plus certainement aux molécules d'eau alors que le modèle des pores transitoires est plutôt mis en jeu dans le passage de solutés [19]. Plus récemment, des études de simulation membranaire ont cherché à mettre en évidence un troisième mécanisme de défauts induits par les ions qui complète alors les théories présentées jusqu'alors (Figure 8) [20]. Les principaux mécanismes proposés à ce jour sont décrits dans les paragraphes suivants.

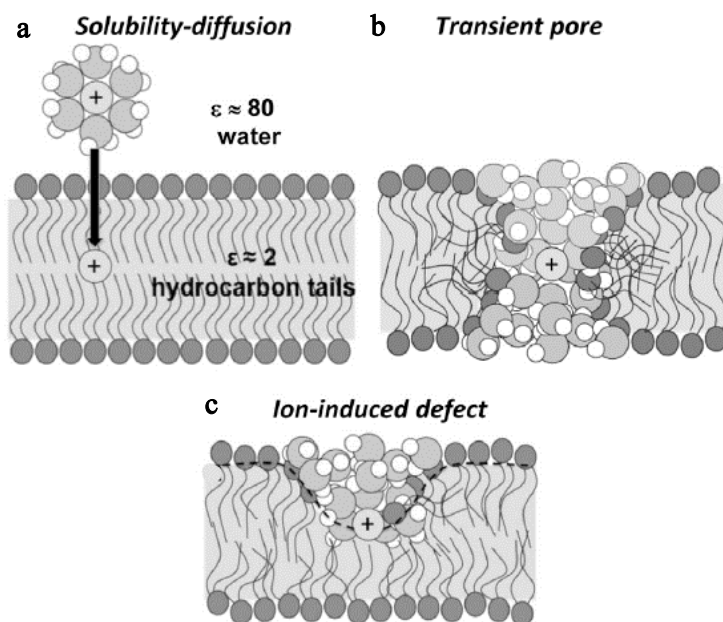


Figure 8 Représentation schématique des trois mécanismes de perméabilité proposés par Vorobyov dans [20]. (A) Mécanisme de solubilisation/diffusion. (B) Mécanisme de pore transitoire. (C) Mécanisme de défaut induit par un ion.

c. Modèle de diffusion simple

Dans le modèle de diffusion simple, le profil du potentiel de la membrane se résume à une décroissance, plus ou moins brutale, entre la solution et le domaine hydrocarbure des lipides. Ainsi, le profil est de forme rectangulaire ou trapézoïdal au niveau de la membrane. D'un côté, les molécules d'eau solvant largement les têtes polaires, puis une coupure apparaît au niveau du glycérol et des acides gras. Au-delà, les molécules d'eau sont présentes occasionnellement et leur mouvement dépend de leur capacité à se solubiliser dans le domaine hydrocarbure. En effet, le mouvement des molécules d'eau est alors possible pour les molécules ayant suffisamment d'énergie pour rompre les

liaisons hydrogènes formées avec leurs voisines. Le nombre d'insaturations le long de la chaîne carbonée et la présence ou non de cholestérol influenceront drastiquement la diffusion des molécules d'eau dans la membrane. Il a été montré qu'en présence de cholestérol, les molécules d'eau ont moins d'interactions avec les groupements carbonyles des acides gras, ces derniers ayant plus d'affinité avec les molécules de cholestérol, ce qui a pour effet de limiter la diffusion à travers la membrane. Une étude a déterminé que pour des membranes de phosphatidyléthanolamine, la présence de cholestérol diminue la pénétration de l'eau dans la membrane de 0,25 nm [21]. Par ailleurs, des modélisations moléculaires ont permis d'établir différents profils de diffusion en fonction du taux de cholestérol dans la membrane (Figure 9) [22].

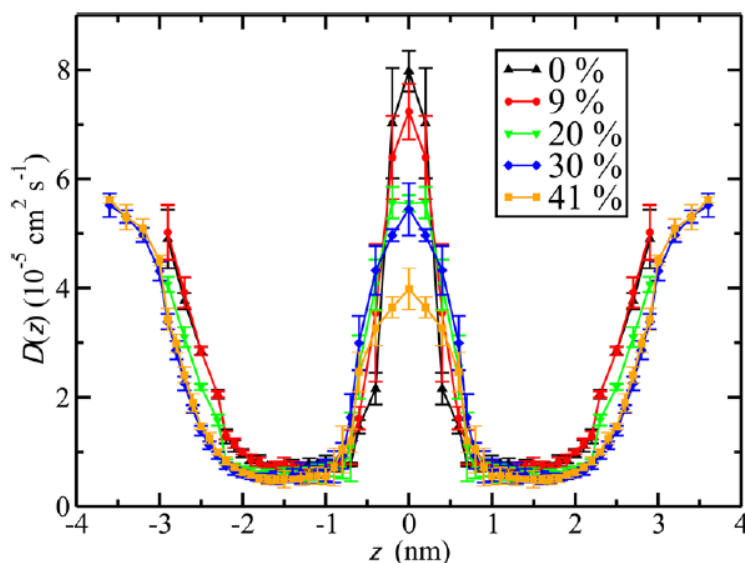


Figure 9 Profiles de diffusion de molécules d'eau dans des bicouches de DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholine) contenant différentes concentrations en cholestérol. [22]

Cependant, le profil de polarité de la membrane et la solubilité de l'eau dans le domaine hydrophobe ne décrit pas les mécanismes de diffusion de petits solutés ionique ou polaires. D'autres modèles, dont celui des pores transitoires, dépendent d'un certain nombre de phénomènes thermodynamiques et sont décrits dans les paragraphes suivants.

d. Aspects thermodynamiques – Potentiels diélectriques

Dans la théorie des pores transitoires, on s'interroge sur les mécanismes permettant à un ion de traverser une membrane et notamment aux énergies mises en jeu pour faire passer un ion d'un milieu fortement diélectrique (eau) vers un milieu faiblement diélectrique (chaîne carbonée). La différence de potentiels électriques transmembranaire a donc un impact direct sur la vitesse du flux d'ions.

Certaines études sur la perméabilité des ions reportent que les anions diffusent plus vite que les cations [18], [19], [23]–[25]. Par exemple, il est mis en évidence que les cations monovalents comme le sodium et le potassium sont peu perméables alors que les ions chlorure sont trois fois plus perméables et l'ion hydroxyde est huit fois plus perméable [18].

C'est en 1969 que Parsegian *et al.* ont relié pour la première fois la perméabilité ionique à l'énergie de Born. L'énergie de Born est l'énergie d'un ion dans un environnement diélectrique donné [26]. La différence d'énergie de Born est calculée pour la première fois à 40 kcal.mol⁻¹ (170 kJ.mol⁻¹) pour le transport d'un ion monovalent à travers une couche de lipides. Une telle énergie n'a jamais été constatée dans un milieu physiologique, signifiant alors que le passage d'ions à travers les membranes physiologiques n'est possible qu'en présence de canaux protéiques ou de pompes. Par ailleurs, l'énergie de Born peut être réduite par addition de porteurs ionophores (l'ion se positionne au niveau d'un site polarisable) ou par la formation de pores. Il est reporté qu'un pore de 0,5 nm réduit la différence d'énergie de Born à 6,7 kcal.mol⁻¹ (contre 40 kcal.mol⁻¹).

Dix ans plus tard, Dilger *et al.* ont mesuré les conductances de bicouches membranaires planes avec deux solvants de constantes diélectriques éloignées [27]. Ils ont alors mis en place un test simple pour prouver que l'énergie de Born contrôle la conductance ionique, en étudiant la diffusion des anions thiocyanate et perchlorate dans des membranes de phosphatidylcholine. Les calculs ont mis en évidence que la constante diélectrique de la membrane joue un rôle dans la perméabilité de la membrane aux ions, ce qui pourrait expliquer pourquoi les membranes des mitochondries sont des membranes biologiques assez perméables. En effet, la présence d'une grande quantité de protéines intégrées à la membrane entraînerait une augmentation de la constante diélectrique, rendant alors la membrane des mitochondries plus perméables que la membrane plasmique cellulaire.

Une étude sur les halogènes a mis en évidence que la diffusion de ceux-ci est dû à un mécanisme de solubilisation/diffusion plutôt qu'à la formation de pores transitoires car la vitesse de diffusion des ions est liée à la fois à l'épaisseur de la membrane et à la taille de l'ion, ce qui n'est pas le cas s'il y a formation de pores [24]. Il est décrit que l'anion bromure diffuse six fois plus vite que le chlorure pour une même épaisseur de bicouche. Les ions iodures, eux, traversent trois à quatre fois plus vite que le bromure. Le coefficient de perméabilité des halogènes est compris entre 10⁻⁹ et 10⁻⁷ cm.s⁻¹. Une étude plus récente caractérise la diffusion d'anions dans une membrane hybride par électrochimie [28]. Elle met en évidence que le mécanisme de solubilisation/diffusion est certainement plus probable dans le cas des anions chlorures (Cl⁻), bromures (Br⁻), iodures (I⁻), dihydrogénophosphates (H₂PO₄⁻), perchlorates (ClO₄⁻) et hexafluorophosphates (PF₆⁻).

D'autres études ont mesuré des flux de sodium et de chlorure à travers différentes compositions de membranes et mettent en évidence que la diffusion des ions chlorure est cinq fois plus rapides que celles des ions sodium (à pH 5,5) [29]. Les auteurs font l'hypothèse que les ions chlorure s'associent de manière covalente avec les protons au niveau de l'interface lipide/eau, ce qui, d'après eux, permettrait d'augmenter la cinétique de diffusion des ions Cl⁻ par rapport aux ions Na⁺.

Par ailleurs, une attention particulière a été faite quant à la diffusion des protons et du couple proton/hydroxyde issu de la dissociation d'une molécule d'eau en fonction du pH, puisque ceux-ci montrent une perméabilité bien plus élevée que tout autre ion [18][30]. Une étude a montré que les protons diffusent huit fois plus rapidement que les ions sodium ou potassium pour un même type de liposomes (SUV) et donne des coefficients de perméabilités à 10⁻⁴ cm.s⁻¹ pour les protons contre 10⁻¹² cm.s⁻¹ pour les ions sodium ou potassium [18]. Cependant, des anomalies dépendantes du pH ont été constatées en ce qui concerne la diffusion des protons et des ions hydroxydes. En particulier, en dehors de la gamme de pH neutre, la perméabilité varie drastiquement et se rapproche de celle des

cations monovalents métalliques (sodium et potassium). La perméabilité n'est donc assurément pas une propriété intrinsèque à la membrane. La perméation des protons et des ions hydroxyde semble dépendre plus de la conductance des ions et notamment, il existerait un passage conducteur spécifique des ions H^+/HO^- . Deux types de mécanismes sont présentés, avec tout d'abord l'idée que certains groupements d'un lipide soient hydrolysés ou oxydés, entraînant une conductance élevée. Et par ailleurs, cette différence de perméabilité entre protons et autres ions monovalents serait due à la capacité des protons à se déplacer à travers des liaisons hydrogènes, créant une « chaîne » qui assure le passage des protons au sein de la membrane. Si une « chaîne » de ce type existe, alors un flux de protons se crée de part et d'autre de la membrane entraînant la formation d'un gradient de pH. D'un côté de la membrane, le milieu est acide et de l'autre alcalin. D'après les auteurs, du côté alcalin, un ion hydroxyde pourrait se combiner avec un proton de cette chaîne conduisant à la diminution du gradient de pH. Une rencontre d'un proton et d'un ion hydroxyde au centre de la membrane est aussi envisageable.

Flewelling et Hubbell ont étudié la thermodynamique de transfert des ions hydrophobes à travers une membrane phospholipidique. Ils ont établi un modèle de potentiel complet de membrane dans lequel ils ont pris en compte plusieurs termes dans l'expression de l'énergie libre F [23] :

$$F = E_{Born} + E_{image} + E_{dipole} + E_{neutre} \quad (2)$$

L'énergie libre F est la somme de l'énergie de Born, de l'énergie « image », de l'énergie dipolaire et de l'énergie neutre. Ces différents termes sont explicités brièvement ici :

L'énergie de Born correspond à l'énergie de transfert (énergie électrostatique) d'un ion de charge q et de rayon r d'un milieu de constante diélectrique ϵ_2 vers un milieu de constante diélectrique ϵ_1 (Figure 10) et est donnée par :

$$E_{Born} = \left[\frac{1}{4\pi\epsilon_0} \right] \frac{q^2}{2r} \left(\frac{1}{\epsilon_1} - \frac{1}{\epsilon_2} \right) \quad (3)$$

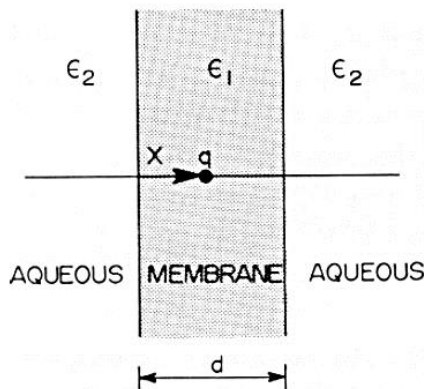


Figure 10 Modèle de bicouche lipidique simple. Une fine section de constante diélectrique ϵ_1 et d'épaisseur d est entourée de deux couches semi-infinies (aqueuses) de constante diélectrique ϵ_2 . Un ion de charge q est localisé à une distance x de l'interface.

L'énergie « image » correspond aux interactions électrostatiques entre l'ion et l'interface. De par la faible épaisseur de la membrane ($d \approx 40 \text{ \AA}$), cette interaction reste importante quand l'ion est dans l'environnement de la membrane. Le terme « image » renvoie au principe d'action-réaction pour une force électrostatique s'exerçant à l'interface entre un ion et la membrane [31]. Les auteurs donnent une expression combinée de l'énergie de Born et de l'énergie « image » où q est la charge de l'ion se

trouvant dans la membrane d'épaisseur d et de constante diélectrique ϵ_1 à une distance x de l'interface diélectrique (Figure 10) :

$$E_{Born-image}(x) = \left[\frac{1}{4\pi\epsilon_0} \right] \frac{q^2}{2\epsilon_1 r} \left[1 - \frac{r}{2x} - 1,2 \left(\frac{r}{d} \right) \left(\frac{x}{d} \right)^2 \right] \quad (4)$$

Cette expression n'est valable que dans l'approximation où :

$$r \lesssim 4 \text{ \AA} ; d \simeq 40 \text{ \AA} ; r \lesssim x \lesssim d/2$$

En effet, cette expression serait dénuée de sens pour des distances plus faibles que la taille de l'ion car l'énergie de Born-image ne peut pas être négative. La valeur minimale de l'énergie de Born-image est donc fixée à zéro.

L'énergie dipolaire est la conséquence des forces intermoléculaires présentes à l'interface entre deux phases mobiles en contact. Dans le cas d'une monocouche homogène d'acides gras à une interface air/eau, le modèle du simple condensateur s'applique et le potentiel dipolaire (V) s'exprime selon :

$$\Delta V_{dipole} \simeq 38 \frac{nu}{\epsilon} \quad (5)$$

n représente la densité de surface de la couche ($\text{\AA}^{-2}$)

u représente le moment dipolaire, normal à l'interface (Debye = C.m)

ϵ est la constante diélectrique ($\text{C.V}^{-1}.\text{m}^{-1}$)

Cette expression est une première approximation de la contribution dipolaire du potentiel de surface mais il faut maintenant considérer les interactions entre groupements polaires et l'interface. En effet, les trois sources possibles de la création d'un potentiel dipolaire sont les molécules d'eau de surface, les têtes polaires des lipides (chargées ou zwitterioniques) et les chaînes carbonées des lipides, notamment les groupements ester qui relient les acides gras au groupement glycérol. De manière globale, c'est l'organisation des molécules à l'interface lipide/eau qui conduisent à la formation du potentiel dipolaire.

L'énergie neutre est décrite comme l'énergie de transfert d'un ion du milieu aqueux vers la membrane en ne prenant pas en compte les contributions électriques et électrostatiques. Elle prend notamment en compte l'énergie hydrophobe et les facteurs stériques. Elle s'exprime selon :

$$E_{neutre} = \frac{E_{neutre}^0}{1 + 10^{y_n}} \quad (6)$$

Avec :

- E_{neutre}^0 = constante correspondant à l'énergie neutre dans la membrane pour une molécule neutre, c'est-à-dire à l'énergie libre de transfert sans tenir compte des contributions électriques et électrostatiques ; l'ordre de grandeur est compris entre - 4 et - 8 kcal.mol⁻¹ (- 17 à - 33 kJ.mol⁻¹)
- $y_n = -\frac{1}{r} \times 2(t_c - z)$
- r correspond au rayon de l'ion
- z correspond à la distance de l'ion par rapport au centre de la membrane
- t_c correspond à la demi-épaisseur efficace de la membrane et s'exprime selon $t_c = t + \frac{h}{4}$

- h correspond approximativement à l'épaisseur de la tête polaire du lipide
- t correspond approximativement à la longueur de la chaîne hydrocarbure du lipide

Parameter	Expected values	Significance
t	10 – 20 Å	Hydrocarbon (tail) region thickness where $E(z) = \epsilon_1$
h	4 – 10 Å	Dielectric transition (head-group) region thickness
p	$t - t + h$ Å	Dipole layer location
r	1 – 5 Å	Effective ion radius
a	4 – 9 Å	Effective point dipole separation distance
u	0 – 2 D	Effective point dipole strength
q	e	Ion charge
ϵ_1	2	Membrane dielectric constant
ϵ_2	78	Water dielectric constant
W_N^0	-4 – -8 kcal/mol	Free energy of transfer for neutral molecule

Tableau 1 Résumé des paramètres pris en compte dans le modèle de potentiel total, valeurs attendues et significations de ces paramètres. [23]

Finalement, les études sur les potentiels dipolaires tendent à justifier la différence entre diffusion cationique et anionique aux interfaces et seraient pour majeure partie responsable de la perméabilité. Cependant, d'autres études montrent que l'énergie de Born ne suffit pas à expliquer à elle seule les phénomènes de perméabilité et les flux d'ions observés seraient alors liés à des défauts membranaires causés par des effets de température.

e. Effets de température

En plus des effets énergétiques de type coulombiens (énergie de Born), d'autres paramètres ont une influence sur la perméabilité, notamment la température [32] et la longueur des chaînes carbonées, donc la composition de la membrane. Ces paramètres influencent les forces de cohésion au sein de la membrane et donc les cinétiques de diffusion des ions.

Bien qu'il n'y ait pas d'accord général sur le mécanisme moléculaire de perméation des ions, des variations sont reportées en fonction des ions étudiés. L'ion sodium a particulièrement été étudié. Les premières études de Papahadjopoulos datent de 1973 et tendent à démontrer que la perméabilité maximale est obtenue à la température de transition de phase (T_C) du lipide étudié (ex. la phosphatidylcholine) [32]. Plus tard, d'autres études ont montré des profils de perméabilité similaires pour l'étude de la diffusion de molécules en fonction de la température [33]–[35]. Dans chaque cas, une nette augmentation de la perméabilité est observée au-delà de T_C . Différentes hypothèses ont alors émergé, avec en premier lieu, celle qui associe température et fluidité. En effet, au-delà de la température de transition, les lipides changent de conformation et passent d'une phase gel à une phase fluide.

A la température de transition, les deux conformations coexistent et des domaines de phases se forment, on parle alors de « séparation de phase latérale » [36], [37]. Les zones interfaciales entre ces domaines de phases sont décrites comme des régions instables conduisant à une diminution d'énergie d'activation pour la perméation d'un ion (Figure 11) [18], [38]. D'autres études ont montré que cette théorie était en accord avec les premiers résultats de Papahadjopoulos sur la diffusion des ions sodium [32], [39], [40]. Cependant, plusieurs éléments sont en désaccord avec cette théorie, notamment le fait qu'il n'y a pas de preuve physique claire quant à l'existence de séparation de phase latérale pour de petites vésicules unilamellaires composées d'un seul lipide. Par ailleurs, en considérant que ces défauts sont responsables d'une augmentation de la perméabilité, cette tendance devrait s'appliquer pour tout type de molécules, or aucun maximum de perméabilité n'a été observée pour les molécules d'eau à T_C [33].

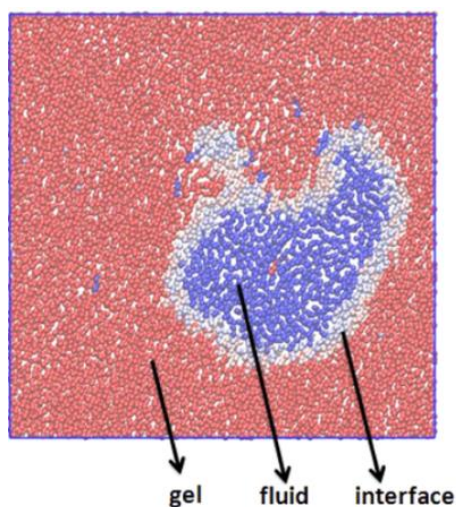


Figure 11 Modélisation des domaines de phases pouvant exister au sein d'une membrane de lipide proche de la température de transition. Le rouge représente les lipides en phase gel, le bleu représente les lipides en phase fluide et le mélange bleu clair et rose représente une interface dans laquelle les deux phases coexistent. [38]

Bien que les résultats montrent une augmentation de la perméabilité avec la température, l'origine physique de ce phénomène n'est pas encore établie. D'autres hypothèses tendent à démontrer que cet effet de température serait dû à l'assemblage des lipides et à leur capacité à se compresser latéralement [41]–[44]. En effet, plus la distance entre deux lipides est élevée, plus la compressibilité latérale est grande, permettant ainsi une meilleure pénétration des ions au niveau des têtes polaires jusque dans le cœur hydrophobe de la membrane. Cette théorie considère que la diffusion au travers du domaine hydrophobe n'est pas le paramètre limitant à la perméabilité mais plutôt la fréquence de pénétration d'un ion dans la membrane. Cette fréquence est maximale autour de T_C puisque les lipides se fluidifient. Cependant, à nouveau, cette explication n'est pas pleinement satisfaisante puisque des différences sont observées en fonction des molécules étudiées. La perméabilité de plusieurs sondes colorées chargées a été testée et comparée avec celles d'ions dans des conditions où la probabilité de pénétration était la même et il est reporté que les sondes colorées, bien que plus larges en taille que les ions, diffusent plus rapidement que ces derniers, et ce, même à une température bien en dessous de T_C [45]. Ces observations remettent donc en cause l'hypothèse que le mouvement des têtes polaires et la fréquence de pénétration des ions dans la bicouche soient les paramètres déterminants pour expliquer le phénomène de perméabilité.

Une autre hypothèse a été proposée par Träuble pour de petites molécules de soluté neutre [46]. Des fluctuations thermiques entraînent le mouvement des chaînes hydrocarbures. Une molécule peut alors être piégée entre deux chaînes et les mouvements oscillants entraînent le déplacement de

la molécule le long du lipide, lui permettant ainsi de diffuser à travers la membrane. Ces « espaces » entre lipides sont des pores statistiques générés par une isomérisation rotationnelle le long de la chaîne carbonée (Figure 12) [47]. Träuble explique que ces trous se forment à partir d'une chaîne carbonée droite dont les liaisons C-C sont en conformation *trans*. Le mouvement rotationnel d'une double liaison d'un angle de 120° conduit à la formation d'une configuration *gauche*. L'enchaînement d'une rotation de $+120^\circ$ puis de -120° sur la liaison suivante crée cet espace entre deux lipides. Le mouvement de ce trou le long de la chaîne dépend donc du changement de conformation des liaisons C-C de la chaîne. L'énergie nécessaire pour ce déplacement est donnée à $4,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$ et doit être fournie sous forme thermique. Finalement, ces « trous » se déplacent et permettent le transport de molécules de part et d'autre de la membrane mais ne peuvent pas être, de fait, considérés comme des pores. Dans la théorie développée par Träuble, le mécanisme de transport est décrit tel qu'un complexe se forme entre le soluté et un espace vide au niveau de la surface polaire de la membrane, puis les changements de conformation le long de la chaîne entraînent le déplacement de la molécule de soluté. Les complexes « trou-soluté » dépendent de constantes de formation et de dissociation de chaque côté de la membrane. Ces constantes sont déterminées par le coefficient de partition du soluté entre la phase aqueuse et le domaine hydrocarbure, ainsi que par la barrière de potentiel à l'interface membrane/solution. Enfin, il est mentionné que ce modèle s'applique uniquement aux molécules dont la taille ne peut pas être plus large que celle du volume d'une unité monomère CH_2 .

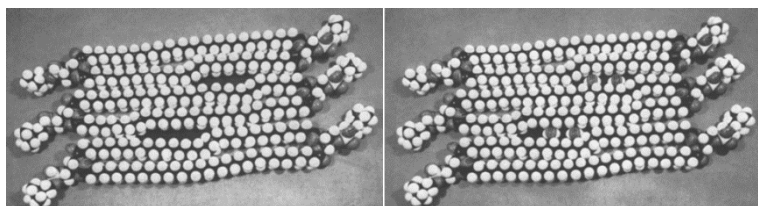


Figure 12 Molécules de phosphatidylcholine organisées en bicouche. (a) Les fluctuations thermiques génèrent des zones de volume libre entre les chaînes hydrocarbures. (b) Des molécules d'eau ou autres peuvent être transportées par ces pores. [46]

L'augmentation de perméabilité à la température de transition T_C n'est pas directement explicitée par Träuble mais il est aisé de faire le lien entre sa théorie et l'augmentation de la fluidité avec la température. Les transitions rotationnelles des chaînes dont il parle seront effectivement plus fréquentes dans une membrane déstabilisée par résonance entre deux conformations, sachant que le temps de relaxation et l'amplitude des oscillations seront plus importants autour de T_C [44]. Cependant, la théorie de Träuble ne s'applique pas dans le cas d'un trop grand degré de désordre, c'est-à-dire à une température trop élevée par rapport à T_C .

Finalement, cette théorie repose sur un mécanisme concerté où les molécules d'eau peuvent servir de porteur à d'autres molécules. Selon Deamer et Bramhall, cette théorie fournit une explication mécanistique raisonnable quant à la pénétration lente des ions dans les bicouches composées de longues chaînes carbonées [18]. En effet, ici la diffusion est réglée par une séquence coordonnée d'événements qui sera d'autant plus complexe que la chaîne est longue. Par ailleurs, la présence d'insaturations inhibera alors complètement ce phénomène d'oscillations puisqu'elles n'autorisent pas la rotation libre le long de l'axe de la double liaison C-C. La progression de l'oscillation le long de la chaîne sera alors stoppée en cas d'insaturation. Par exemple, une membrane formée de lipides insaturés DOPC (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) est très peu perméable tandis que son analogue saturé DSPC (1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) offre une meilleure diffusion, malgré la meilleure mobilité intrinsèque des chaînes de DOPC [48].

De plus, de Gier *et al.* ont proposé que la pénétration d'un soluté dans une membrane à l'équilibre, qui contient des molécules d'eau, conduit à une différence de potentiel chimique et entraîne un flux de molécules d'eau au sein de la membrane. Ce flux d'eau, généré pour que la membrane revienne à l'équilibre, entraînerait un gonflement de celle-ci, et formerait ainsi une voie à travers la membrane [49].

Ces théories ont récemment été reprises par les études de Disalvo *et al.* dans lesquelles ils mettent en évidence le rôle de l'eau dans les phénomènes de perméabilité des membranes par diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS), calorimétrie à balayage différentiel (DSC), résonnance paramagnétique d'électrons (RPE), résonnance magnétique nucléaire (RMN) ou encore spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) [50]. Ils concluent que la formation de trous de quelques nanomètres de diamètre, occupés par des molécules d'eau peuvent expliquer la perméabilité d'une membrane lipidique pour des molécules polaires. Ils ont mis en évidence que la dynamique et la structure des liaisons hydrogène entre les molécules dans la membrane étaient drastiquement différentes de celles connues dans le volume. La conformation des liaisons hydrogène conduit à différents états d'énergie libre favorisant plus ou moins la perméabilité des membranes.

En conclusion, la perméabilité des membranes lipidiques repose sur plusieurs aspects thermodynamiques (énergie de Born) et cinétiques (coefficient de partage) complexes qui se combinent à la présence de toute une gamme de défauts. Il est donc difficile d'établir *a priori* le comportement d'une membrane puisqu'elle sera plus ou moins perméable aux espèces en fonction de la nature des lipides qui la composent et donc de son épaisseur, de la température, du pH, ainsi que de la nature et de la polarité des espèces. Ces paramètres doivent donc être maîtrisés le plus possible dans le but d'utiliser un liposome géant comme microréacteur biomimétique.

Par ailleurs, les vésicules unilamellaires géantes ne sont pas les seules vésicules à pouvoir servir de microréacteur biomimétique. En effet, avec l'idée de pouvoir développer une cellule artificielle, de nombreuses idées ont émergé en parallèle du développement des liposomes.

4. Autres microréacteurs biomimétiques

En 1957, quand Thomas M. S. Chang, alors seulement étudiant de licence, inventa la première cellule artificielle, avec l'idée qu'une « cellule artificielle n'est pas une entité physique à part entière » mais plus une « idée impliquant la préparation de structures artificielles de dimensions cellulaires pour le remplacement ou le complément de fonctions cellulaires déficientes » (Chang, 1972), il était alors pionnier dans le développement de toute une série de systèmes à caractère biomimétique. Quatre de ces principaux systèmes seront brièvement présentés ici : les polymersomes, les vésicules multi-compartiments, les microgels et les capsules.

a. Polymersomes

Tout comme les liposomes, les polymersomes se forment par auto-assemblage de molécules amphiphiles. Les phospholipides sont alors remplacés par des copolymères diblocs (ou triblocs) dont un (ou deux) des blocs est (sont) hydrophile(s) et l'autre est hydrophobe. Une des différences souvent reportée dans la littérature entre liposomes et polymersomes, en dehors de la nature de la membrane, est son épaisseur.

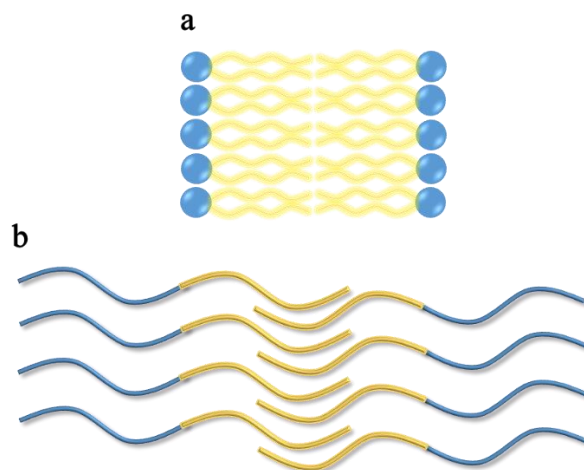


Figure 13 Comparaison relative des épaisseurs d'une bicouche de phospholipides (a) et d'une bicouche de copolymères diblocs (b).

En effet, il est possible de jouer sur la longueur des chaînes de polymères au cours de la synthèse et donc de contrôler l'épaisseur de la membrane. Ainsi, la masse molaire des polymères utilisés est 10 à 100 fois plus élevée que celle des lipides [51]. Ce paramètre induit donc des modifications de propriétés de membrane faisant souvent des polymersomes, des vésicules plus solides que les liposomes [52]. La perméabilité est également fortement liée aux polymères utilisés (présence de charges) et à leurs longueurs.

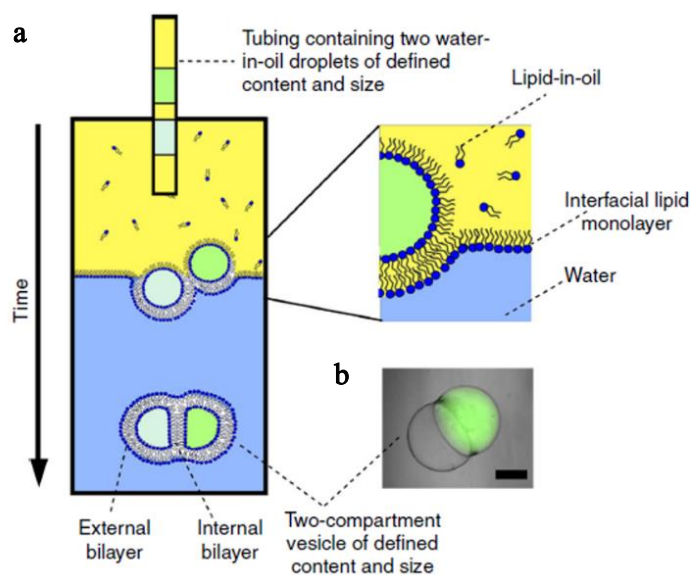
Les polymersomes ont initialement été développés à des fins thérapeutiques (libération contrôlée de principe actif, thérapie génique) pour s'affranchir du manque de tenue mécanique des liposomes, notamment à cause du cisaillement imposé par le flux sanguin [51]. Dans l'optique de cette application, en plus de leur robustesse, ces vésicules doivent être furtives pour atteindre l'organe cible sans être détruites par les cellules immunitaires (macrophages). Le greffage de groupement polyéthylène glycol (PEG) permet d'augmenter la solubilité de certaines molécules dans un milieu aqueux, d'augmenter leur poids moléculaire, d'augmenter leurs temps de vie dans la circulation sanguine et

présente l'avantage d'être biocompatible. Enfin, le principe actif doit pouvoir être libéré à façon, via des *stimuli* chimiques (pH) ou physiques (champ magnétique ou électrique, lumière) [51], [53].

Aujourd'hui, de nombreuses études se portent sur le développement de ces *stimuli* mais également sur la miniaturisation des polymersomes. L'application thérapeutique ne pourra en effet être achevée que quand ces systèmes seront réduits à l'échelle du nanomètre (5 à 100 nm) pour permettre leur circulation dans le système sanguin. L'enjeu ultime de ces systèmes est de pouvoir limiter la prise de médicaments à une fois par jour grâce à l'encapsulation de différents principes actifs dans différents compartiments (mimant les organelles), eux-mêmes encapsulés dans un seul polymersome (mimant la cellule). De nombreux articles traitent de ces polymersomes qui cherchent à mimer à la fois la fonction et la structure d'une cellule, on parle de « Polymersomes in Polymersome » (PiP) [54], [55].

b. Vésicules multi-compartiments

D'autres réacteurs biomimétiques ont par ailleurs été développés dans l'idée de ne pas restreindre ce réacteur à un seul compartiment et ouvrir alors le champ des possibles. Des réactions enzymatiques multi-étapes ont ainsi été étudiées dans des vésicules multi-compartiments dites DIB (*Droplets Interface Bilayer*). Notamment, la réaction en cascade mettant en jeu la lactase, la glucose oxydase et la peroxydase a été étudiée par Elani *et al.* dans des vésicules double- ou triple-compartiments [56] (Figure 14).



Dans cette étude, les réactifs sont encapsulés chacun dans un compartiment et les propriétés de perméabilité des membranes, où l'insertion de pores α -hémolysine (Figure 15) permettent le passage des produits d'un compartiment à l'autre (Figure 16 b-d). La taille des pores formés par le tonneau β complet de l' α -hémolysine est donnée à environ 1,5 nm de diamètre, permettant le passage de petites molécules (inférieures à 2000 g.mol⁻¹) comme le glucose (1 nm). La réaction étudiée comporte trois étapes : la première étape correspond à la transformation du lactose en glucose par la lactase (réaction 1), puis ce glucose est oxydé en peroxyde d'hydrogène et gluconolactone par la glucose oxydase (réaction 2) et enfin le peroxyde d'hydrogène oxyde l'Amplex Red en resorufine en présence

de peroxydase (réaction 3) (Figure 16 a). La resorufine est une espèce fluorescente facilement observable par microscopie de fluorescence, comme nous le verrons dans nos propres études, et permet donc de visualiser la réussite de la réaction en cascade.

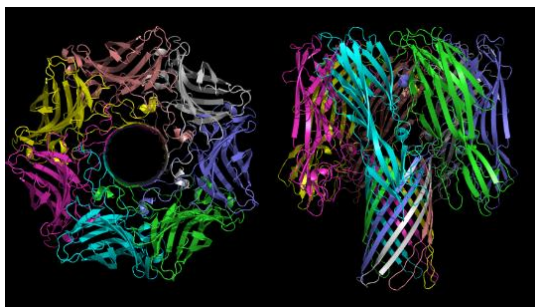


Figure 15 Structure cristallographique de l'α-hémolysine. Au centre de la structure, un tonneau β complet forme un pore dans la membrane.

Trois expériences ont été menées. La première consiste à former une vésicule double-compartiments. Dans le premier compartiment sont encapsulés le glucose et la glucose oxydase. Le peroxyde d'hydrogène est alors produit dans ce premier compartiment et diffuse dans le second compartiment contenant l'Amplex Red et la peroxydase, produisant le produit fluorescent, la resorufine (Figure 16 b). La seconde expérience consiste à nouveau à réaliser l'enchaînement des réactions 2 et 3 mais cette fois, des pores (α-hémolysine) sont présents dans la membrane d'un des compartiments. Le glucose est présent dans le milieu extérieur et diffuse dans le premier compartiment *via* les pores (Figure 16 c). Enfin, une vésicule triple-compartiments est utilisée dans la dernière expérience pour réaliser les trois réactions en cascade dans chacun des trois compartiments. La réaction 1 qui transforme le lactose en glucose a lieu dans un compartiment équipé de pores α-hémolysine, permettant au glucose de passer dans le second compartiment. Le glucose est alors converti en gluconolactone et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier diffuse alors à travers la membrane vers le troisième compartiment où il oxyde l'Amplex Red en resorufine en présence de peroxydase (Figure 16 d).

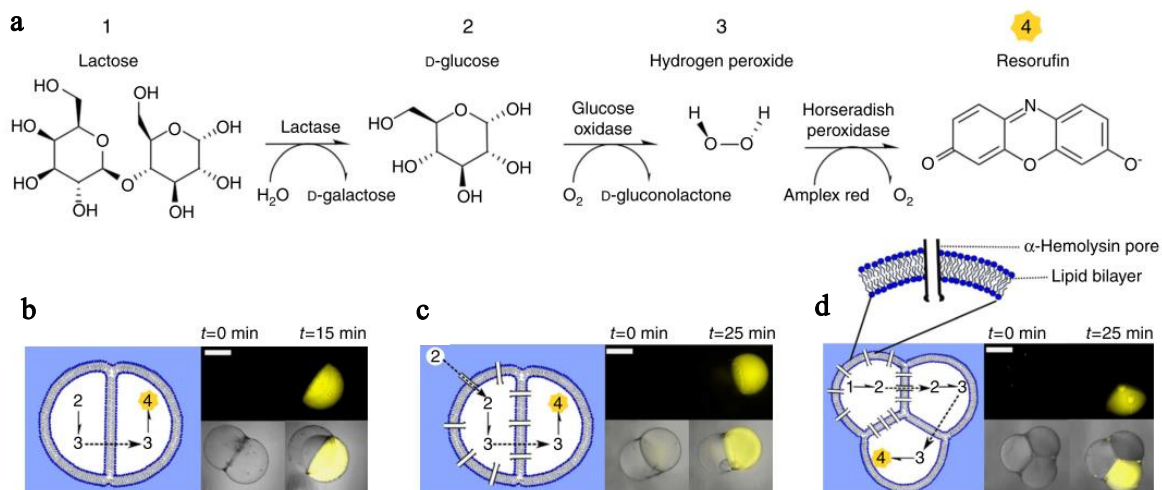


Figure 16 Séquences de réactions enzymatiques en cascade dans des vésicules multi-compartiments. (a) Étapes du mécanisme. (b-d) Schémas et images en fluorescence et transmission des vésicules multi-compartiments. [56]

Cependant, les différents passages d'un compartiment à l'autre peuvent se faire dans les deux sens, induisant une perte de réactifs au cours du temps mais compensée par la production enzymatique. Par ailleurs, une diminution du signal de fluorescence a été observée au cours du temps pour trois raisons : d'une part, à cause du phénomène de photoblanchiment qui conduit à la destruction

irréversible de la capacité de la molécule à revenir dans le cycle de fluorescence en cas d'exposition prolongée à la lumière ; ensuite, la resorufine étant capable de passer les membranes lipidiques, elle va diffuser soit dans un autre compartiment, soit vers le milieu extérieur ; enfin, les auteurs évoquent la possibilité d'une suroxydation par H_2O_2 de la resorufine conduisant à la formation de la resazurine, peu fluorescente (rendement quantique de 0,11 contre 0,41 pour la resorufine en solution aqueuse à pH 10 [57]). D'autres hypothèses font référence à une éventuelle dimérisation de la resorufine entraînant une extinction totale de la fluorescence [58].

Cette technique présente donc l'avantage de pouvoir séparer les différentes étapes d'une réaction multi-étapes sans avoir à travailler de façon séquentielle, cela ouvre la possibilité de réactions plus complexes telles que des synthèses organiques multi-étapes. Cependant, la séparation entre compartiments repose notamment sur les propriétés de perméabilité des membranes autorisant ou non le passage d'un compartiment à un autre. L'ajout de pores α -hémolysine dans chacune des membranes induirait une communication entre chacun des compartiments pour des molécules inférieures à 1,5 nm. Le système perdrait alors son intérêt principal qu'est la séparation entre compartiments. Ainsi, l'utilisation de ce microréacteur se limite seulement à certaines molécules.

La formation de ce type de microréacteurs multi-compartiments a été optimisée pour gagner en monodispersité et en reproductibilité. Deng et al. ont récemment, et pour la première fois, mis au point une technique de microfluidique utilisant le phénomène de démouillage, couramment employé dans la préparation des polymersomes, pour former ces microréacteurs multi-compartiments [59]. Ils ont formé des liposomes unilamellaires monodisperses comptant entre un et quatre compartiments (Figure 17). Ils ont également intégré des nanopores à la membrane, grâce à l' α -hémolysine (décrite précédemment) et à la melittine (pores de 1 à 3 nm ou 3,5 à 4,5 nm) pour démontrer l'unilamellarité de leurs systèmes. L'encapsulation de calcéine (623 g.mol⁻¹) dans un compartiment d'un liposome double-compartiment et de rhodamine B dextran isothiocyanate (70 000 g.mol⁻¹) et de pores α -hémolysine dans le second compartiment, a permis de mettre en évidence que la membrane interne entre deux compartiments est bien une bicouche (Figure 18). Ce paramètre classe donc ces systèmes comme utilisables pour l'étude de la communication entre deux cellules biomimétiques.

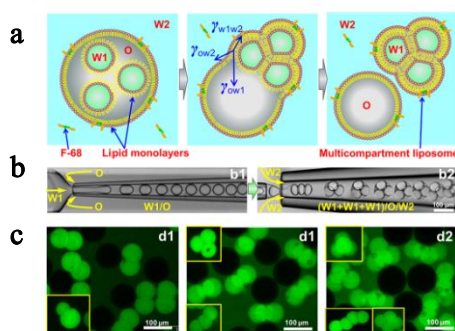


Figure 17 Liposomes multi-compartiments monodisperses. (a) Représentation schématique de la formation d'un liposome triple-compartiment par auto-assemblage assisté par des tensio-actifs (phénomène de démouillage). (b) Formation de liposomes triple-compartiments par voie microfluidique. (c) Images confocales de liposomes avec deux, trois ou quatre compartiments ainsi que leurs différentes conformations. [59]

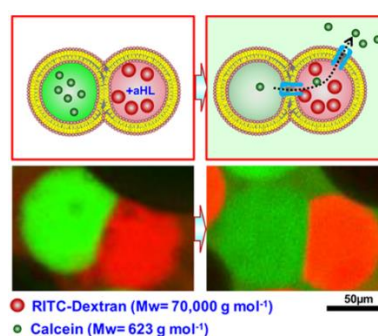


Figure 18 Représentation schématique et images confocales de l'insertion de pores α -hémolysine dans un des compartiments d'un liposome double. Observation de molécules fluorescentes (calcéine et rhodamine B dextran isothiocyanate (RITC-Dextran)). La calcéine est suffisamment petite pour passer par les pores tandis que la RITC-Dextran reste confinée. [59]

c. Capsules microgels

En 2008, De Geest *et al.* ont été les premiers à mettre au point un système présentant non seulement une structure proche de celle d'une cellule, avec des compartiments pouvant être associés à des organelles, mais également un « cytosquelette » robuste pouvant résister mécaniquement et chimiquement aux attaques environnementales [60], [61]. Ces systèmes sont destinés à une application thérapeutique dans le but d'être implantés pour une libération temporellement contrôlée de cellules productrices d'insuline ou de cellules souches, ou encore pour la libération lente d'antigènes et d'un vaccin, permettant ainsi de limiter les multiples injections souvent nécessaires pour obtenir une réponse immunitaire [55].

Ces systèmes sont formés par une capsule (diamètre supérieur à 100 μm) possédant un cœur gel réticulé et une écorce polymère semi-perméable. À l'intérieur se trouvent des microcapsules mesurant environ 3 μm de diamètre, composées d'un cœur gel réticulé sensible à l'eau, et d'une écorce polymère semi-perméable (Figure 19). Dans les deux cas, l'écorce est obtenue par un dépôt couche par couche (*Layer by Layer* ou LbL) à partir de l'alternance de polymères chargés positivement (poly-L-arginine) et de polymères chargés négativement (sulfate de dextran).

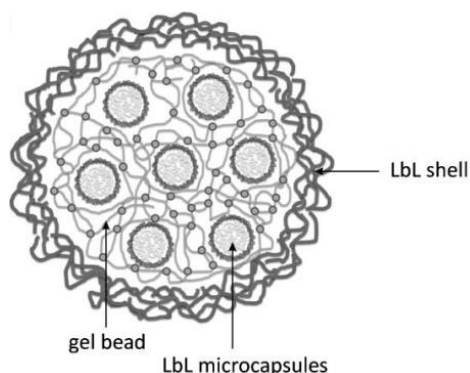


Figure 19 Représentation schématique d'une capsule ($> 100 \mu\text{m}$) chargée avec un gel et des microcapsules (3 μm). Les points de réticulation sont marqués par de petits cercles [60].

En milieu aqueux, les points de réticulation du microgel à l'intérieur des microcapsules sont hydrolysés, entraînant le gonflement du gel et la rupture de la capsule. Lorsque le contenu des microcapsules est libéré, la pression osmotique augmente à l'intérieur de la capsule principale. Le gel gonfle alors pour équilibrer la pression osmotique et ce gonflement conduit à la rupture de la capsule. Le contenu est donc alors libéré dans le milieu extérieur. Il est décrit que le temps de dégradation peut être ajusté en fonction du taux de réticulation du gel au départ.

Par ailleurs, ce modèle de capsule multi-compartiments a été repris dans le but d'étudier une réaction enzymatique produisant du méthanol à partir de dioxyde de carbone mettant en jeu trois déshydrogénases (formiate, formaldéhyde et alcool déshydrogénases) [61]. Les trois enzymes sont encapsulées de manière indépendante dans les microcapsules. La conversion du CO_2 est obtenue en mélangeant une solution de NADH (Nicotinamide adénine dinucléotide) avec une solution contenant les capsules, sous flux de CO_2 pendant 8h à 5 hPa (5 mbars). La réaction enzymatique commence par une réduction du dioxyde de carbone (+IV) en ion formiate (HCO_2^- ; +II), catalysée par la formiate déshydrogénase. L'ion formiate est ensuite réduit en formaldéhyde (CH_2O ; 0) par la formaldéhyde déshydrogénase et enfin la réduction du formaldéhyde en méthanol (CH_3OH ; -I) via l'alcool déshydrogénase. Le NADH est ici le donneur d'électrons dans chacune des trois réactions successives.

Avec ce microréacteur, Jiang *et al.* ont mis en évidence que la production enzymatique est nettement améliorée quand les trois enzymes sont isolées les unes des autres (3 fois plus de méthanol produit qu'en solution où les trois enzymes sont libres). En effet, les différentes interactions possibles entre les enzymes, les réactifs ou les intermédiaires réactionnels sont limités, améliorant ainsi les activités enzymatiques dans chacune des étapes.

Finalement, il existe une multitude de systèmes pouvant être associés à des microréacteurs biomimétiques, voire des cellules artificielles. Les polymersomes présentent l'avantage de pouvoir mimer les compartiments d'une cellule avec le développement de la technologie « Polymersomes In Polymersome » (PiP), mais les études de réactions enzymatiques dans de tels systèmes sont encore limitées par un contrôle précis du déclenchement de la réaction. Les vésicules lipidiques multi-compartiments présentent l'avantage de pouvoir séparer les différentes étapes d'une réaction multi-étapes sans avoir à travailler de façon séquentielle, bien que le contrôle de la diffusion entre compartiments puisse parfois limiter l'utilisation de ces systèmes. Les capsules microgels sont structurellement parlant, plus proches d'une cellule que les vésicules multi-compartiments, puisqu'elles possèdent, comme pour les PiP, des petits compartiments dispersés dans un plus grand compartiment. Cependant, les capsules microgels s'éloignent drastiquement des cellules de par leur composition chimique, limitant la comparaison avec des vraies productions enzymatiques réalisées *in vivo*.

Les vésicules unilamellaires géantes sont des systèmes attractifs pour l'étude des réactions enzymatiques puisque leur taille est comparable à celle des cellules eucaryotes mais aussi parce que leur composition lipidique peut être modulée pour en faire des systèmes chimiquement proches des cellules. Ce système modèle nous servira de base pour l'étude de deux réactions enzymatiques, en parallèle d'un travail réalisé sur le système PiPs par nos collaborateurs (projet ANR NOSynthCell) : la première concernera la conversion oxydante du glucose par la glucose oxydase, suivie de la formation d'une molécule fluorescente grâce à la catalyse de l'Amplex Red par la peroxydase ; la seconde mettra en jeu une enzyme de la famille des NO-synthases, seules sources de monoxyde d'azote chez les mammifères.

II. Réactivités enzymatiques au sein de microréacteurs biomimétiques

La réaction enzymatique mettant en jeu l'Amplex Red (AR) et la peroxydase de raifort (HRP) est très largement utilisée pour sonder le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est le produit final des oxydases, en particulier de la glucose oxydase (GOX). La conversion du glucose par la GOX est une réaction modèle des biocapteurs et donc des microréacteurs biomimétiques, nous la mettrons aussi en œuvre avant de s'intéresser à des réactions plus complexes mises en jeu par les NO-synthases.

1. La glucose oxydase et la peroxydase de raifort : mécanismes réactionnels et cinétiques

Des protocoles détaillés pour l'emploi des réactions enzymatiques mettant en jeu le glucose et la GOX, ou l'AR et la HRP, sont donnés dans la littérature, y compris ceux des kits de détection prêts à l'emploi. Cependant, les résultats de ces réactions nécessitent d'être interprétés avec une grande précaution car la formation de produits secondaires et des inhibitions de la réaction peuvent avoir lieu [62], [63]. Le mécanisme général de la réaction en cascade est représenté sur la figure ci-dessous (Figure 20) :

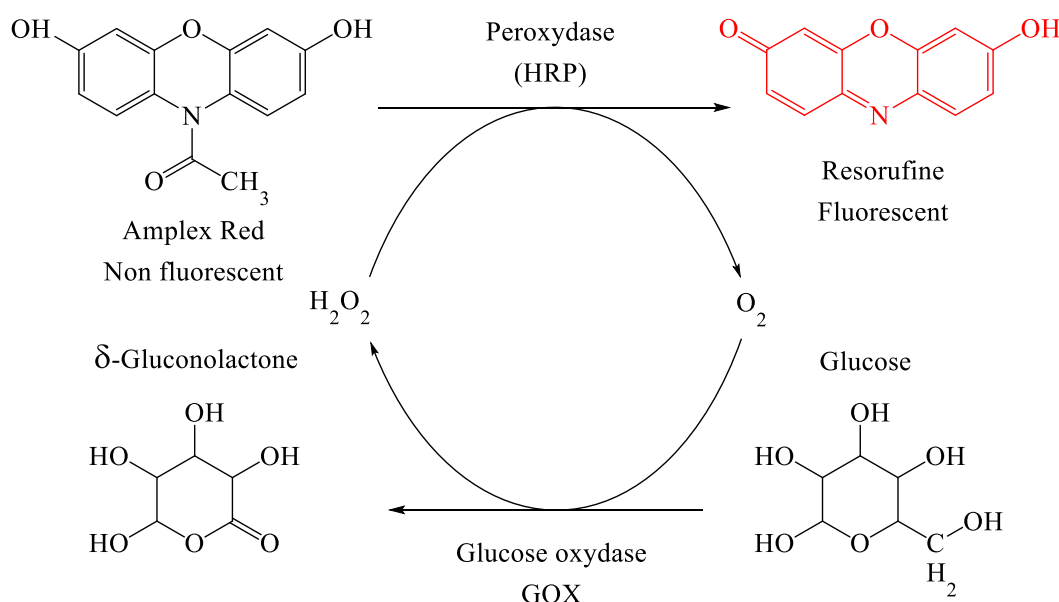


Figure 20 Mécanisme général de la réaction enzymatique en cascade mettant en jeu d'une part, le glucose et la glucose oxydase, et d'autre part, l'Amplex Red et la peroxydase de raifort (HRP).

a. Le protocole basé sur la glucose oxydase pour la détection du glucose

La glucose oxydase (GOX) a été découverte en 1928 par D. Müller [64]. Quelques paramètres physicochimiques de l'enzyme ont par la suite été établis : la masse molaire de la GOX est donnée entre 150 et 160 kDa [65] pour un diamètre de 8 nm environ [65], [66] ; cette enzyme est stable pour un pH compris entre 2 et 8 avec un maximum de stabilité à pH 5 [67], [68]. La glucose oxydase se compose de deux sous-unités identiques d'environ 80 kDa (structure homodimérique), portant chacune un cofacteur flavine adénine dinucléotide (FAD) [69] lié de manière non covalente et jouant le

rôle de donneur d'électrons dans la réaction catalytique [70] . Aujourd'hui, la principale application liée à l'utilisation de cette enzyme concerne les biocapteurs sensibles au glucose (diabète).

i. Mécanisme réactionnel

La glucose oxydase d'*Aspergillus niger* transforme le D-glucose en D- δ -gluconolactone et peroxyde d'hydrogène selon un mécanisme en deux étapes, dit mécanisme ping pong Bi Bi [71]. Dans ce type de mécanisme, un produit est relargué avant que tous les substrats ne soient fixés et le passage par des états intermédiaires impliquant la formation de complexes [Enzyme-Substrat] et [Enzyme-Produit] est observé ([ES] et [EP]) [72] (Figure 21).

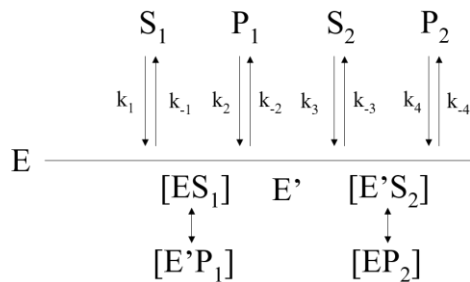


Figure 21 Mécanisme ping pong Bi Bi. E = enzyme, S_n = substrat, P_n = produit, les crochets symbolisent la formation d'un complexe enzyme-substrat ou enzyme-produit. [72]

La fixation du glucose à la GOX forme rapidement un complexe [ES] provoquant l'expulsion d'une molécule d'eau et d'un proton du site actif, suivi d'un transfert concerté d'électrons et de protons du groupement C1-hydroxyle du glucose vers le groupement His516 de la GOX, en passant par le FAD. Cette première demi-réaction correspond à une réduction du FAD et conduit à la formation du δ -gluconolactone (Figure 22) [72]. Si le pH est supérieur à 8, la gluconolactone peut être hydrolysée en acide gluconique et les cinétiques de réaction seront alors modifiées [73][74].

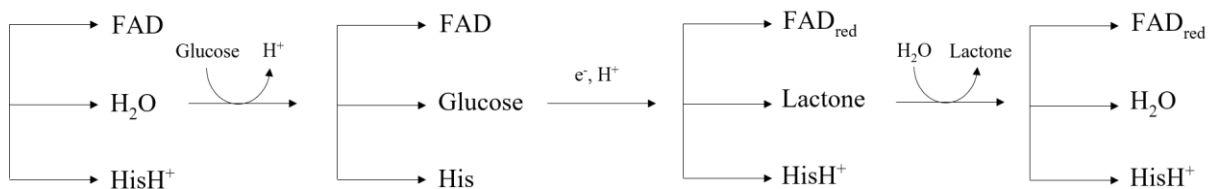


Figure 22 Schéma de la demi-réaction de réduction de la glucose oxydase entraînant la production du δ -gluconolactone (pH 5 ; His = His516). Lors de cette étape l'enzyme et le substrat sont compléxés. [72]

La seconde demi-réaction est une étape oxydante dont le mécanisme dépend fortement du substrat. Ici, c'est le mécanisme mettant en jeu l'oxygène moléculaire comme substrat qui sera décrit. Une étude basée sur un marquage radioactif a mis en évidence que c'est bien l'oxygène moléculaire et non l'eau qui agit comme substrat à cette étape [73]. Dans le cas du substrat oxygène, deux transferts distincts d'un seul électron se produisent et la forme réduite de FAD (FAD_{red} ou $FADH_2$) est oxydée par O_2 , entraînant la libération du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et un retour à la forme FAD de départ. L'étape cinétiquement déterminante du mécanisme correspond au transfert du premier électron, au cours de laquelle un complexe $[E(FADH_2, H_2O)]$ est oxydé en $[E(FADH^\bullet, O_2^{\bullet-})]$. Le FAD est alors sous forme semi-quinone (FAD_{sq}). Le complexe obtenu est décrit comme relativement stable

[70], [75], [76]. Le second transfert d'électron conduit à la formation du complexe $[E(FAD, H_2O)]$ et à la libération d' H_2O_2 (Figure 23) [72].

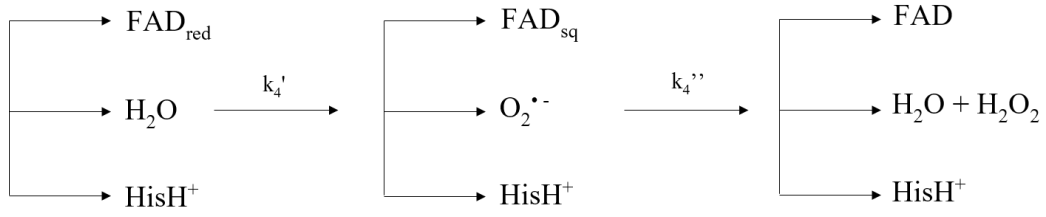


Figure 23 Schéma de la demi-réaction d'oxydation de la glucose oxydase générant la formation de peroxyde d'hydrogène. Lors de cette étape l'enzyme et le substrat sont complexés. [72]

ii. Cinétique enzymatique

La cinétique à l'état stationnaire de l'oxydation du glucose par la glucose oxydase obéit au mécanisme ping pong Bi Bi décrit par la Figure 21 et s'exprime selon :

$$\frac{[GOX]_0}{v_0} = \frac{1}{V_1} + \frac{K_{FAD}}{V_1} \frac{1}{[FAD]} + \frac{K_{FAD\ red}}{V_1} \frac{1}{[FAD_{red}]} \quad (7)$$

$[GOX]_0$ représente la concentration initiale en enzyme (mol.L^{-1}), K_{FAD} et $K_{FAD\ red}$ sont les constantes de Michaelis des formes oxydée et réduite de l'enzyme respectivement (mol.L^{-1}), et V_1 est la constante catalytique (s^{-1}).

La constante catalytique V_1 s'exprime selon (voir Figure 21 pour la numérotation des constantes) :

$$V_1 = \frac{k_2 k_4}{k_2 + k_4} \quad (8)$$

et :

$$\frac{V_1}{K_{FAD}} = k_1 \left(\frac{k_{-2}}{k_{-1} + k_{-2}} \right) \quad (9)$$

$$\frac{V_1}{K_{FAD\ red}} = k_3 \left(\frac{k_{-4}}{k_{-3} + k_{-4}} \right) \quad (10)$$

Dans le cas où les substrats sont le glucose et l'oxygène, les transferts d'électrons et de protons sont considérés comme irréversibles d'où :

$$k_{-1} \approx k_{-2} \approx k_{-3} \approx k_{-4} \approx 0 \quad (11)$$

Ainsi [70], [71] :

$$\frac{V_1}{K_{FAD}} = k_1 \quad (12)$$

$$\frac{V_1}{K_{FAD\ red}} = k_3 \quad (13)$$

L'étape cinétiquement déterminante du mécanisme réactionnel de la glucose oxydase est le premier transfert d'électrons ayant lieu lors de l'étape d'oxydation. Ce transfert conduit à la formation d'un complexe relativement stable $[E(FADH^{\bullet}, O_2^{\bullet-})]$ [70], [75], [76]. La demi-réaction d'oxydation comprend deux transferts d'électrons (Figure 23) dont les constantes de vitesse ont été établis à $k_4' = 1,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $k_4'' = 1 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à $\text{pH} < 6,9$ [74]. Lorsque le pH est supérieur au pK_a de l'histidine les constantes de vitesse sont modifiées mais seule la constante du premier transfert d'électron est aujourd'hui reportée ($k_4' = 3,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) [77].

La réaction de conversion du glucose en peroxyde d'hydrogène catalysée par la glucose oxydase est largement utilisée et différents substrats tels que l'oxygène ou des quinones sont reportés. Le mécanisme réactionnel comprend deux demi-étapes, la première est une réduction de la coenzyme flavine adenine dinucléotide (FAD), libérant la gluconolactone puis, la forme réduite de FAD (FAD_{red}) est oxydée, conduisant à la production du peroxyde d'hydrogène.

Bien que de nombreux substrats de la glucose oxydase aient été identifiés, le D-glucose est le meilleur en termes de production catalytique. Par ailleurs, de nombreux médiateurs redox peuvent être utilisés, notamment dans l'application de biocapteurs au glucose utilisant la glucose oxydase.

b. Le test Amplex Red pour la détection du peroxyde d'hydrogène

Bien que largement utilisé en routine, le test « Amplex Red » pour la détection du peroxyde d'hydrogène (ou du glucose lorsqu'il est couplé au test glucose/glucose oxydase), nécessite de prendre un certain nombre de précautions quant à l'interprétation des résultats qu'il fournit. En effet, la complexité du mécanisme réactionnel oblige les utilisateurs de ce test à maîtriser parfaitement les paramètres influençant le résultat de ce test, à savoir, la production de l'espèce fluorescente resorufine [62].

i. Mécanisme réactionnel

La peroxydase de raifort ou *horseradish peroxidase* (HRP) est une enzyme monomérique, d'environ 44 kDa, issue de racines d'*Armoracia rusticana* et comptabilisant au moins sept isoenzymes d'activités similaires [78]. De nombreux articles traitent notamment de l'isoenzyme C, mais ce n'est qu'à partir de la fin des années 90 que la HRP a pu être cristallisée et que les intermédiaires réactionnels ont pu être identifiés avec une bonne résolution [63].

La HRP permet la catalyse de l'oxydation de différents substrats dont l'Amplex Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine). La catalyse est activée en présence de peroxyde d'hydrogène, par une oxydation rapide à deux électrons ($k = 9 \cdot 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) du fer hémique de la HRP, Fe^{III} à l'état initial, vers un complexe oxoferryl $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O}$ avec un radical cation délocalisé sur la porphyrine, aussi nommé radical cation porphyrine et noté $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O}^{\bullet+}$ (*Compound 1*) (Figure 24). L'Amplex Red fournit ensuite, un électron et un proton, réduisant le *Compound 1* en *Compound 2*, $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{OH}^+$, puis, le transfert d'un second électron et d'un second proton permet le retour à l'état initial Fe^{III} (Figure 24). Cela conduit alors à une dernière étape, dont le mécanisme est indépendant de l'enzyme, à savoir ; à une réaction de dismutation entre deux radicaux Amplex Red entraînant la libération stœchiométrique d'une molécule de resorufine et d'une molécule d'Amplex Red [63] (Figure 25).

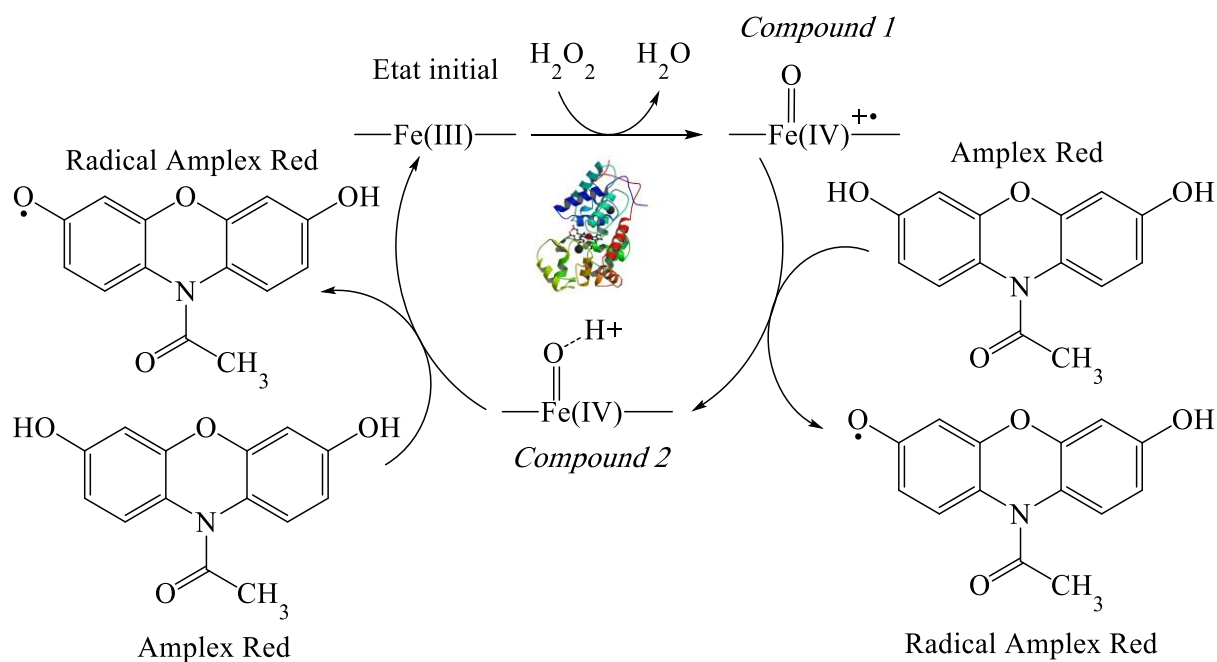


Figure 24 Mécanisme général de l'oxydation de l'Amplex Red par H_2O_2 , catalysée par la peroxydase et conduisant à la formation des deux radicaux Amplex Red.

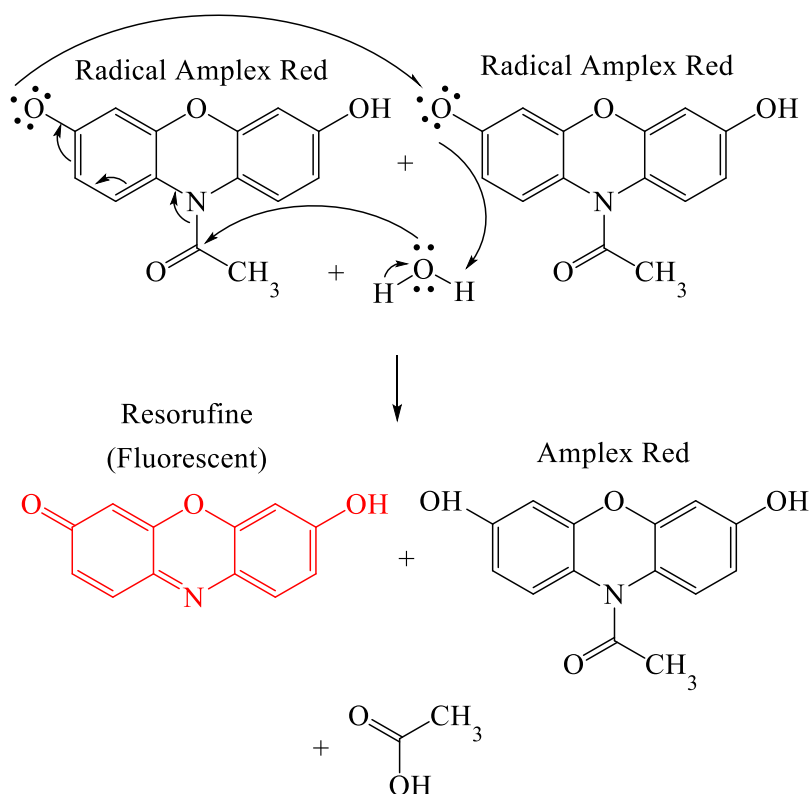


Figure 25 Mécanisme détaillé de la réaction de dismutation entre deux radicaux Amplex Red conduisant à la formation d'une molécule de resorufine et à la régénération d'une molécule d'Amplex Red

Ce mécanisme a été mis en évidence grâce à l'analyse des différents états d'oxydation du Fer hémique de la HRP par la caractérisation de la bande de Soret en spectroscopie UV [79] puis, ulté-

rieurement, des autres bandes caractéristiques des structures hémiques telles que les bandes de transferts de charge, α et β [80]. Cependant, l'analyse quantitative du peroxyde d'hydrogène *via* cette réaction n'est pas aussi simple qu'il n'y paraît.

ii. Réactions secondaires et analyse quantitative

La détection du peroxyde d'hydrogène est d'un intérêt biologique majeur puisqu'il est impliqué dans de nombreux processus biologiques tels que la modulation-signalisation redox ou le stress oxydant. La détection et la quantification de cette espèce réactive de l'oxygène est donc nécessaire. Le test Amplex Red est sensible et *a priori* simple à mettre en œuvre puisqu'il est basé sur une analyse en fluorescence. Cependant, plusieurs phénomènes venant perturber l'analyse des résultats ont été mis en évidence [62], [58].

Tout d'abord, le substrat Amplex Red est photosensible et peut être oxydé soit par la lumière, soit par des ions métalliques non spécifiques [63], [58]. Gorris *et al.* ont montré que l'ajout d'EDTA ne permettait pas de limiter ce problème [63]. Par ailleurs, la solubilité de l'Amplex Red en milieu aqueux est également à prendre en compte, sa limite de solubilité étant de 300 μM à pH 7,4 [58]. Il est aussi reporté que la stabilité de l'Amplex Red diminue fortement à pH $> 8,3$ [62].

Gorris *et al.* se sont intéressés à l'effet de confinement sur cette réaction enzymatique par une étude en micropuits (50 μL) de molécule unique. Il en résulte une diminution des vitesses de réaction de presque dix fois en milieu confiné par rapport à la réaction en solution dans des conditions usuelles. Selon eux, ce mécanisme ne dépend pas d'une cinétique de type Michaelis Menten à cause de la dernière étape. En effet, la réaction de dismutation ayant lieu en fin de mécanisme est une réaction indépendante de l'enzyme et suit donc une autre cinétique.

Ensuite, Towne *et al.* ont étudié l'influence du pH sur la cinétique et sur l'intensité de la fluorescence en fin de réaction [62]. Les trois phénomènes décrits sont l'inhibition du substrat, l'inactivation de l'enzyme et une transformation du produit fluorescent en un produit moins, voire non fluorescent. Le pH et la concentration en tampon sont deux éléments qui influencent drastiquement l'intensité de fluorescence obtenue. D'une part, parce que la forme protonée de la resorufine est très peu fluorescente, ainsi la fluorescence augmente à partir de pH 6,2 et se stabilise à pH 7,7 (Figure 26). En fonction du solvant utilisé, le pKa de la resorufine est compris entre 5,5 et 6,5 [62], [81].

Par ailleurs, une fois formée, la resorufine peut également être un substrat de la peroxydase, pouvant entraîner une diminution de la fluorescence. Une étude a montré qu'un suivi quantitatif de la concentration en peroxyde d'hydrogène est possible en suivant la décroissance de la fluorescence [82].

L'inhibition du substrat et la désactivation de l'enzyme HRP peuvent se produire quand la concentration en peroxyde d'hydrogène est élevée ($> 100 \mu\text{M}$). En effet, la forte affinité de ce dernier pour le site catalytique de la HRP a été évaluée à $K_m = 1,55 \mu\text{M}$ en présence d'Amplex Red comme substrat [83]. Quand la concentration en peroxyde d'hydrogène est supérieure à quatre fois la valeur de K_m (environ 6 μM), le site catalytique est saturé et cela entraîne une inhibition, voire une désactivation de la HRP [84], [85].

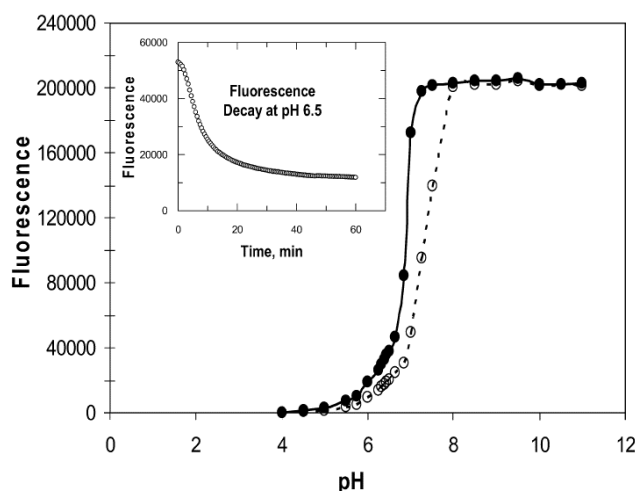


Figure 26 Détermination du pK_a de la resorufine par spectroscopie de fluorescence. Les tampons utilisés sont : acétate de sodium (pH 4,0), phosphate de sodium (pH 4,5 - 7,5), Tris-HCl (pH 8,0), Tris/bicarbonate de sodium (pH 8,5 - 9,0), bicarbonate de sodium (pH 9,5) et diéthanolamine (pH 9,5 - 11,0). La fluorescence est enregistrée à $t = 0$ (cercles pleins) et à $t = 60$ min (cercles vides). D'après [62].

Enfin, une diminution spontanée de la fluorescence dépendant de la concentration du tampon et de la concentration en resorufine a été observée. Une transformation de la resorufine en un produit moins fluorescent est évoquée pour expliquer ce changement de fluorescence. Une réaction de dé-N-acétylation (perte du groupement $-OCH_3OH$ sur le N de la molécule) et de polymérisation conduirait à une modification du pK_a apparent sans pour autant influencer l'asymptote observée à $pH > 7,5$ (Figure 27). La seconde hypothèse évoquée serait une oxydation spontanée de la resorufine en resazurine moins fluorescente [62], [58]. Finalement, en fonction du temps d'incubation et si les mesures de fluorescence ne sont effectuées qu'en mesure simple à la fin du temps d'incubation, la valeur d'intensité obtenue sera plus élevée pour un temps d'incubation plus court (Figure 27).

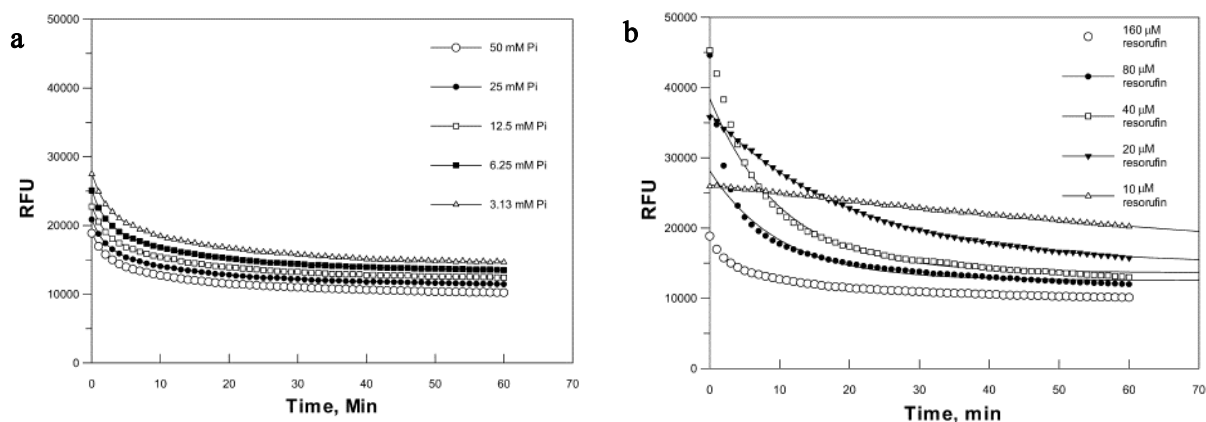


Figure 27 Suivi de la diminution spontanée de la fluorescence de solutions de resorufine en fonction de la concentration en tampon (phosphates) (a) ou de la concentration en resorufine (b). D'après [62].

Un mécanisme particulier avec une première étape oxydante (deux oxydations successives) catalysée par la peroxydase, suivie d'une réaction de dismutation indépendante de l'enzyme entraîne une certaine complexité dans l'analyse cinétique de cette réaction. Par ailleurs, des phénomènes liés à des changements d'intensité de fluorescence tels que l'inhibition du substrat, l'inactivation de l'enzyme ou la réactivité du produit de la réaction, oblige à prendre des précautions quant à l'analyse de résultats quantitatifs.

2. Le monoxyde d'azote et les NO-Synthases

a. Rôles du monoxyde d'azote

Le premier rôle physiologique du monoxyde d'azote (NO[•]) a été mis en évidence au cours des décennies 1970-80, en particulier par l'équipe de F. Murad, en tant que médiateur de la signalisation cellulaire au cours de la vasodilatation. En effet, le caractère hydrophobe de NO[•] lui permet aisément une diffusion au travers de membranes biologiques [86]. Le prix Nobel de Médecine 1998 a été décerné aux travaux de R. I. Furchgott, L. J. Ignarro et F. Murad sur le rôle du NO[•] dans les systèmes cardiovasculaires [87].

On sait maintenant que le monoxyde d'azote intervient dans de nombreux processus physiologiques. Ses effets peuvent s'avérer antagonistes : de façon positive, NO[•] est impliqué dans des phénomènes de vasodilatation [88]–[90] et de neurotransmission [91]. Quant aux effets délétères, une trop grande quantité de NO[•] entraîne des effets cytotoxiques [92] et de stress oxydant [88] pouvant conduire au développement de maladies neurodégénératives [88], [90] ou de cancers [88], [93]. Les différentes conséquences de la présence du NO[•] au sein de l'organisme ainsi que ses modes d'action sont résumés ici en fonction des tissus touchés (Tableau 2).

Localisation	Mode d'action	Effet physiologique	Ref
Endothélium vasculaire	Interaction avec la guanylate cyclase et activation de la protéine kinase G	Vasodilatation - Régulation de la pression artérielle	[92]
	Inhibition des capsases 3 et 8	Propriétés anti-apoptotiques	[94]
	Régulation des flux de Ca ²⁺ par nitrosation de diverses protéines	Homéostasie vasculaire	[95]
Endothélium cardiaque	Régulation des flux de Ca ²⁺ par nitrosation de diverses protéines	Homéostasie cardiaque	[95]
Muscle Cardiaque	Régulation des flux de Ca ²⁺ par inhibition des canaux ioniques	Contraction du myocarde	[89]
Muscles lisses	Interaction avec la guanylate cyclase et activation de la protéine kinase G	Vasodilatation	[88]–[90]
Muscles squelettiques	Interaction avec la guanylate cyclase et activation de la protéine kinase G	Contraction musculaire	[96]
Neurones	Interaction avec la guanylate cyclase et activation de la protéine kinase G	Neurotransmission et plasticité synaptique	[91]
Bactéries	Blocage de la respiration cellulaire	Stress oxydant	[88]
Macrophage	Inhibition des organismes pathogènes	Réponse immunitaire	[97]–[99]

Tableau 2 Effets physiologiques du monoxyde d'azote en fonction de sa localisation et de sa voie de signalisation.

	eNOS	nNOS	iNOS
Masse molaire	131 kDa	161 kDa	133 kDa
Localisation principale	Endothélium	Neurone Muscle squelettique	Macrophage Muscle lisse
Expression	Constitutive	Constitutive	Inductible
Régulation de l'activité	Ca ²⁺ dépendante	Ca ²⁺ dépendante	Ca ²⁺ indépendante
Stabilité dimère [111]	iNOS < nNOS < eNOS		
Vitesse de transfert d'électron [112]–[114]	eNOS < iNOS < nNOS		
Efficacité catalytique (min ⁻¹ par dimère) [115], [116]	28	256	390

Tableau 3 Caractéristiques des trois isoformes de NOS de mammifère. [117]

Pour que l'enzyme soit active, elle doit être sous forme d'homodimère (Figure 29 a et b), c'est-à-dire qu'il faut que deux unités enzymatiques s'apparient, ce qui est rendu possible par la tétrahydrobioptérine (BH₄) [118]. Les NO-synthases possèdent deux domaines fonctionnels, le domaine oxygénase (N-terminal) et le domaine réductase (C-terminal) reliés par un peptide où se fixe la protéine calmoduline (Figure 29 b et c). La calmoduline permet l'activation de la protéine en présence de calcium [119], [120], [121].

Le domaine réductase est le siège du transfert d'électron. Il contient le co-substrat nicotinamide diphosphate réduit (NADPH) qui fournit les électrons. Ceux-ci sont ensuite transférés à la flavine adénine dinucléotide (FAD) puis à la flavine mononucléotide (FMN). Le mouvement du FMN lui permet d'être réduit par le FAD. Le FMN transfère ensuite cet électron au domaine oxygénase grâce à la calmoduline qui lui permet de changer de conformation [119], [122]. L'amplitude de déplacement du FMN dans le domaine réductase contrôle la vitesse du transfert d'électrons [122]. Globalement, le transfert électronique au sein du domaine réductase, puis vers le domaine oxygénase, est l'étape cinétiquement déterminante du mécanisme [123]. La production de monoxyde d'azote se fait par oxydation du substrat L-arginine via un mécanisme en deux étapes qui sera détaillé dans le paragraphe suivant.

Le domaine oxygénase contient le site catalytique consistant en un fer hémique (Figure 30), ainsi que les sites de fixation pour l'hème et le cofacteur BH₄ [97]. Le site de fixation du substrat se situe dans l'environnement distal de l'hème qui est conservé pour les trois isoformes de la NOS, en dehors d'un résidu qui diffère pour eNOS [124]. La fixation du cofacteur BH₄ est stabilisée par des liaisons hydrogènes et par interaction π - π avec des résidus aromatiques [119], [125]. Le cofacteur BH₄ est indispensable à l'activité de l'enzyme car c'est lui qui permet la formation et la stabilisation de la structure homodimérique [126], [127]. La présence d'un atome de zinc entre les deux monomères assure également la stabilité de l'homodimère bien que sa présence ne soit pas indispensable. Cependant cet atome est nécessaire pour un bon repliement de la protéine [128].

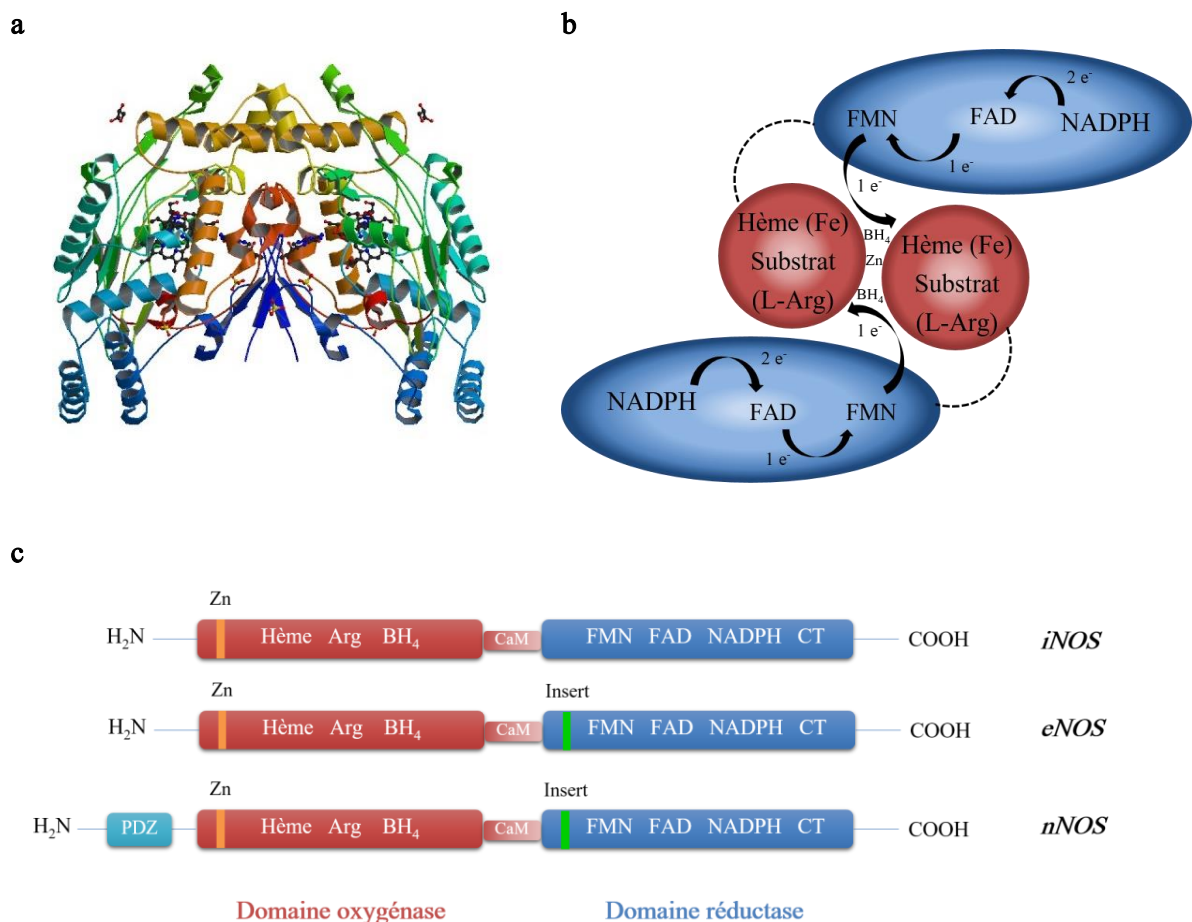


Figure 29 (a) Structure cristallisée de l'homodimère du domaine oxygénase d'iNOS. (b) Représentation schématique du transfert d'électrons du domaine réductase (bleu) d'un monomère vers le domaine oxygénase (rouge) du second monomère, d'après Stuehr et al. [129] (c) Représentation schématique de la structure des trois isoformes de NOS de mammifères.

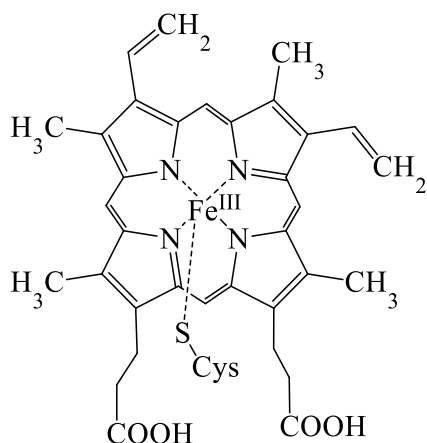


Figure 30 Formule chimique de l'hème des NO-synthases avec liaison au résidu cystéine assurant la fixation de l'hème au domaine oxygénase.

Les informations structurales décrites ont en partie été obtenues lorsque les domaines oxygénase et réductase ont été cristallisés. Cependant, l'enzyme entière n'a jamais pu être cristallisée à ce jour et une incertitude persiste quant à l'orientation de chacun des monomères dans la structure homodimérique, notamment au sujet d'une interaction entre les domaines réductases de chaque monomère [129], [130]. En plus, d'un doute sur la structure, la communauté scientifique ne s'accorde pas

complètement sur les mécanismes réactionnels des NO-synthases qui seront discutés dans le paragraphe qui suit.

c. Controverse autour des mécanismes réactionnels des NO-Synthases

L'oxydation du substrat L-arginine par les NO-synthases implique un mécanisme en deux étapes : la première étape correspond à l'hydroxylation de l'arginine en N^ω-hydroxyarginine, elle-même oxydée en L-citrulline et monoxyde d'azote dans la seconde étape (Figure 31).

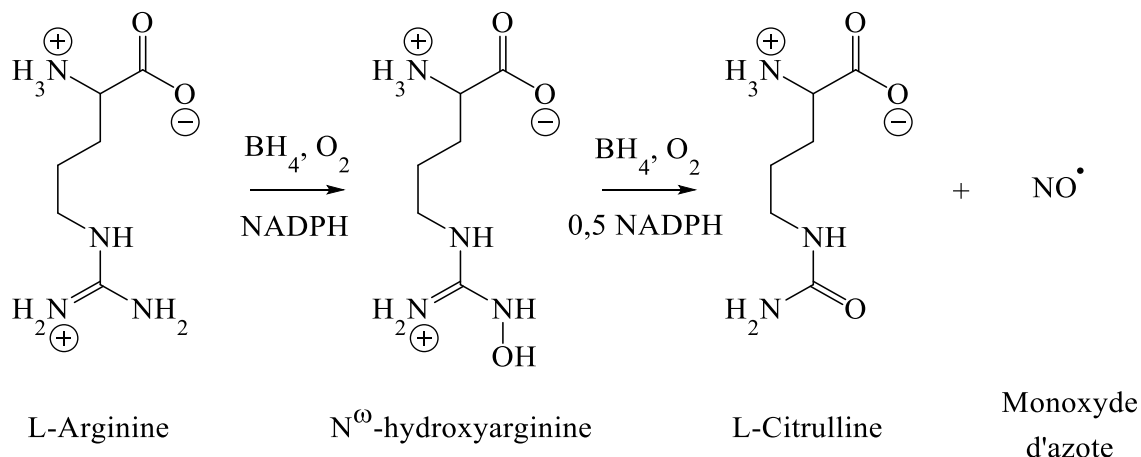


Figure 31 Mécanisme en deux étapes de la conversion oxydante de la L-arginine en L-citrulline et monoxyde d'azote catalysée par les NO-Synthases

i. Etape 1 : hydroxylation de l'arginine

Les NO-synthases, tout comme les cytochromes P450, possèdent un fer hémique lié à un groupement thiol et leur mécanisme réactionnel a naturellement été associé à celui des P450 [131]. Ces deux types de protéines catalysent l'oxydation à deux électrons d'un substrat faisant intervenir le donneur NADPH [132]. Pour que la catalyse soit possible, le cofacteur BH₄ doit être à l'interface entre les deux monomères de NOS, il joue alors un rôle structural [126], [127].

A l'état initial, le Fe hémique est au degré d'oxydation +III et il existe un équilibre entre les formes bas spin (BS, spin 1/2) et haut spin (HS, spin 5/2) issus de l'éclatement du champ cristallin octaédrique des orbitales 3d du Fe (Figure 32). Dans la forme bas spin, le remplissage des orbitales ne respectent pas la règle de Hund et les électrons s'apparient dans les orbitales t_{2g}. Dans ce cas, l'énergie d'appariement des électrons dans une même orbitale est plus faible que l'énergie d'éclatement du champ cristallin Δ₀. De manière générale, dans le cas d'un octaèdre régulier, les orbitales t_{2g} qui correspondent aux orbitales d_{xy}, d_{yz} et d_{xz} sont stabilisées car elles pointent entre les ligands. D'autre part, les orbitales e_g, c'est-à-dire les orbitales d_{x²-y²} et d_{z²}, sont orientées vers les ligands, elles sont déstabilisées par répulsion électrostatique entre les électrons de l'orbitale et le ligand. L'énergie des orbitales t_{2g} est donc plus faible que celle des orbitales e_g.

En présence du cofacteur BH₄, il y a formation de l'homodimère, stabilisé par un réseau de liaisons hydrogène. La poche de l'hème se referme, créant un environnement peu polaire : il y a départ de la molécule d'eau, laissant alors un Fe^{III} pentacoordonné (cinq ligands seulement). Le départ d'un

ligand entraîne une diminution de la répulsion électrostatique entre orbitales e_g et ligands, l'énergie du champ cristallin diminue et la forme HS est privilégiée car moins énergétique. Il y a levée de dégénérescence des niveaux, et le remplissage des orbitales suit la règle de Hund. Toutes les orbitales 3d sont occupées par un électron (Figure 32 b). Le déplacement de cet équilibre BS/HS dépend de l'isoforme de NOS considéré et est privilégiée pour iNOS [133].

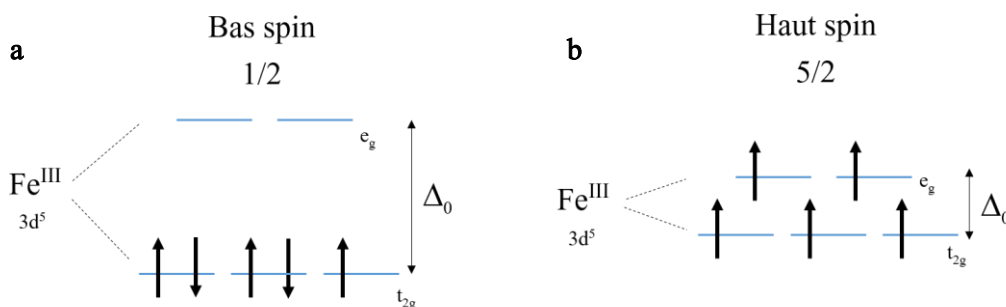


Figure 32 Représentation de l'éclatement de l'orbitale 3d du Fe^{III} selon la théorie du champ cristallin pour un octaèdre régulier. (a) Cas d'un champ fort, bas spin. (b) Cas d'un champ faible, haut spin.

Lorsque l'enzyme est dans la forme HS, la catalyse devient possible et il y a réduction du Fe^{III} en Fe^{II} par apport d'un électron fourni par le NADPH *via* le domaine réductase. Une molécule d'oxygène O₂ se fixe alors au Fe^{II}, formant ainsi le complexe Fe^{II}O₂ [134] ou son équivalent Fe^{III}O₂[•] [119][135]. Ce complexe est très peu stable et risquerait de s'auto-oxyder sans le transfert rapide d'un électron conduisant à la formation du complexe peroxo Fe^{III}-OO[•] [136]–[139]. Cet électron est fourni par le cofacteur BH₄ qui joue maintenant un rôle redox [140]. Cette dualité quant au double rôle structural et redox du BH₄ a longtemps fait débat mais est aujourd'hui démontré [110], [133], [139].

La suite du mécanisme est toujours sujet à discussion car aucun des intermédiaires réactionnels n'a pu être identifié à ce jour. Deux réactions de protonation successives interviendraient avec tout d'abord la formation du complexe hydroperoxo Fe^{III}OOH puis de l'intermédiaire ferrique dihydroperoxo Fe^{III}OOH₂⁺ conduisant finalement à la formation du complexe oxoferryl Fe^{IV}O par rupture homolytique de la liaison O-O [127], [141]. Enfin, le substrat arginine serait oxydé, comme pour les P450, par le Fe^{IV}O, entraînant la formation de l'intermédiaire N^ω-hydroxyarginine (NOHA) et la régénération du Fe^{III} initial (Figure 33).

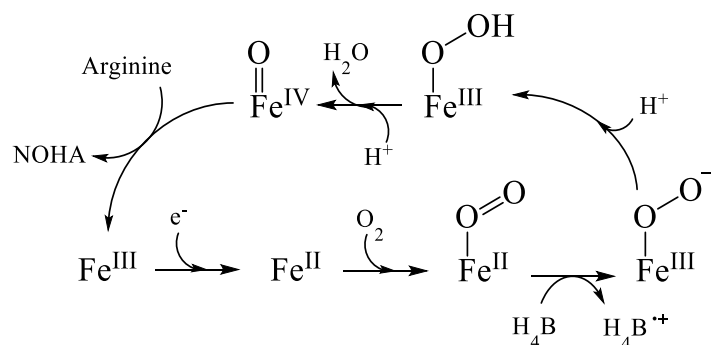


Figure 33 Modèle proposé pour le mécanisme réactionnel d'hydroxylation de l'arginine par les NO-Synthases.

Les deux réactions de protonation intervenant en fin de mécanisme font l'objet d'hypothèses quant à l'origine de ces protons. En effet, aucun résidu d'acide aminé donneur de proton n'est présent dans l'environnement de l'hème. Une première hypothèse évoque que ces protons pourraient venir du cofacteur BH_4 , cependant à cette étape du mécanisme, il est sous la forme $\text{BH}_4^{+\bullet}$ et il est donc peu probable qu'il soit la source de protons [142] ; bien qu'il soit par ailleurs évoqué la possibilité d'un cation BH_5^+ [141]. La seconde hypothèse serait que les protons sont fournis par les groupements guanidinium de l'arginine qui pointent vers l'hème [143]. Enfin la troisième hypothèse fait état d'un transfert de protons du complexe hydroperoxo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ au complexe oxoferryl $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O}$ grâce aux molécules d'eau situées dans l'environnement distal de l'hème [141], [144].

La régénération du cofacteur BH_4 se fait par transfert d'un électron fourni par le NADPH et stocké transitoirement sur le FMN $^{\bullet}$ [134], [145].

ii. Etape 2 : oxydation du N^{Ω} -hydroxyarginine (NOHA)

Dans la seconde étape, le NOHA est oxydé en L-citrulline entraînant la libération du $\text{NO}^{\bullet}$. Le début du mécanisme est similaire à celui décrit pour la première étape : le Fe^{III} est réduit en Fe^{II} suite au transfert d'un électron fourni par le NADPH du domaine réductase vers le domaine oxygénase. Une molécule d'oxygène est ensuite fixée formant le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ (ou $\text{Fe}^{\text{III}}\text{O}_2^{\bullet}$). La suite du mécanisme reste encore bien incertaine mais des modèles de transferts d'électrons et de protons ont pu être proposés.

D'une part, le cofacteur BH_4 peut donner un électron pour former le complexe ferrique peroxo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OO}^{\bullet}$, de manière analogue au mécanisme de la première étape [127], [141]. L'apport d'un proton permet la formation du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$. Ensuite, le NOHA est décrit comme potentiel donneur d'électron. Il réagirait avec le complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ pour former un intermédiaire tétraédrique dont le réarrangement permettrait la formation d'un complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$, réoxydé ensuite par le radical $\text{BH}_4^{\bullet+}$ en $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ et conduisant à la production de citrulline et de monoxyde d'azote [127], [141] (Figure 34). On parle de recombinaison géminée [132], [146], [147]. Le Fe^{III} initial serait alors régénéré [110], [119]. L'oxydation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ en $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ qui permet la régénération du cofacteur BH_4 est une étape essentielle pour éviter la formation d'anion nitroxyde NO^- au lieu de $\text{NO}^{\bullet}$ en fin de mécanisme.

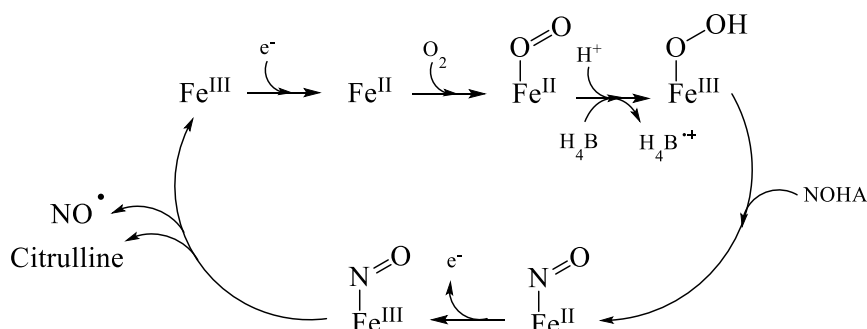


Figure 34 Modèle proposé pour l'oxydation du NOHA par les NO-synthases.

Aujourd'hui, les deux seuls intermédiaires ayant été identifiés dans la seconde étape du mécanisme sont les complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ et $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$. Tous les autres intermédiaires proposés sont toujours discutés et il existe d'autres mécanismes basés sur des calculs de modélisation moléculaire qui s'éloignent fortement de ce qui est explicité ici [127], [141].

Cependant, selon l'isoforme de NOS et ses paramètres cinétiques intrinsèques, le complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ ne va pas forcément suivre le mécanisme conduisant à la production du monoxyde d'azote. En effet, un second cycle réactionnel, dit cycle futile, a été démontré et conduit à la formation de l'anion nitrosyle NO^- par réduction de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ en $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}$ par un électron venant du domaine réductase [113], [148].

En dehors du cycle futile, viennent s'ajouter les réactions dues au découplage, induisant une perturbation de l'activité de la NO-synthase. Le phénomène de découplage correspond à une perte de synchronisation des activités du domaine réductase et du domaine oxygénase. Le découplage conduit à la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (RNOs). Ce phénomène peut intervenir à travers divers processus. Tout d'abord, en cas d'absence de cofacteur biophtérine BH_4 ou dans le cas où la biophtérine est inactive d'un point de vue redox (dihydrobiophtérine BH_2), l'auto-oxydation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ mène à la production de superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$, connu pour être une source de stress oxydant [110], [133], [149]. Par ailleurs, en cas de production simultanée des radicaux hautement réactifs $\text{NO}^\cdot$ et $\text{O}_2^{\cdot-}$, ces derniers se combinent pour former du peroxynitrite ONOO^- , fortement cytotoxique. Les effets d'une telle production ont été décrits au paragraphe II.2.a.

Les trois isoformes de NO-synthases présentent une structure commune bien qu'elles soient localisées dans différentes zones de l'organisme. Les NOS s'expriment différemment et ont des effets physiologiques parfois paradoxaux, alternant entre bénéfiques et néfastes pour l'organisme. Le mécanisme général compte deux étapes avec l'hydroxylation de l'arginine puis l'oxydation de l'intermédiaire N^ω -hydroxyarginine (NOHA) mais les transferts d'électrons et de protons, ainsi que leurs sources, sont toujours sujet à débat.

En tant qu'unique source de monoxyde d'azote, les NO-synthases sont à l'origine de phénomènes physiologiques essentiels. La compréhension de leurs mécanismes réactionnels complexes apparaît donc comme de grande importance. L'identification des intermédiaires réactionnels, étape nécessaire pour la validation des mécanismes, se heurte à de nombreuses limitations techniques, puisque ces espèces très réactives possèdent des temps de demi-vie incompatibles avec la majorité des méthodes analytiques.

3. Méthodes de détection des ROS et RNS

Au cours des processus biologiques, notamment aérobie, différentes espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont formées. Ces ROS sont formées lors de la respiration mitochondriale, mais aussi par d'autres systèmes enzymatiques (NADPH oxydase, cyclooxygénase ...) au cours de processus redox de signalisation cellulaire ou bien d'attaque oxydante. Les dérives incontrôlées de ces processus conduisent au stress oxydant et à des conséquences néfastes pour les organismes à long terme. Les espèces réactives de l'azote (RNS) sont une famille parente des ROS puisque leurs voies de formation et leurs réactivités sont intrinsèquement liées. Le monoxyde d'azote est l'espèce centrale des RNS et ses dérivés sont également impliqués dans des processus physiopathologiques divers pouvant être, comme nous venons de le voir, bénéfiques et/ou néfastes aux organismes.

L'élaboration de techniques capables de mesurer de telles espèces est un challenge à cause de leur réactivité chimique et biochimique souvent élevée (temps de vie compris entre la microseconde et la minute). Cependant plusieurs familles de techniques ont été mises au point et parmi elles, les spectroscopies basées sur des sondes fluorescentes sensibles et sélectives, ou encore les capteurs électrochimiques paraissent les plus intéressants.

a. Méthodes luminescentes

i. Détection de H_2O_2

Le peroxyde d'hydrogène est considéré comme relativement stable en comparaison des autres ROS/RNS (temps de vie de l'ordre de la minute). Une accumulation de H_2O_2 au sein d'un organisme conduit à des dommages et processus pathologiques dont le vieillissement prématuré, le développement de maladies comme certains cancers [150] ou de maladies neuro-dégénératives [151]. La détection précise de cette espèce en milieu cellulaire est donc nécessaire pour une analyse quantitative et un suivi temporel et spatial de sa distribution au sein de l'organisme. De multiples sondes fluorescentes ont été proposées [152]. Une première sonde, la 2',7'-dichlorofluorescéine (Figure 35), est largement utilisée pour la détection du peroxyde d'hydrogène en milieu intracellulaire mais se heurte à quelques limitations telles que la formation d'autres ROS/RNS ou une photo-oxydation assez facile [153].

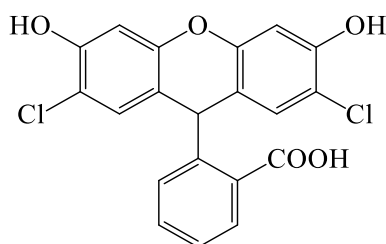


Figure 35 Structure de la 2',7'-dichlorofluorescéine

D'autres sondes, à base de fonctions boronates, ont ensuite été synthétisées pour une détection *in vitro* et *in vivo*. Elles permettent l'hydrolyse de H_2O_2 en conditions légèrement alcalines, génèrent des phénols et la libération d'un groupement fluorescent (coumarine (ex. Figure 36), nitroaniline, fluorescéine) [154], [155]. Des sondes sont aussi préparées à partir d'un polymère conjugué et d'une sonde boronate. La détection de H_2O_2 est basée sur des modifications de liaisons électrostatiques du

polymère après hydrolyse du groupement boronate entraînant un effet de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) entre les deux molécules (donneur-accepteur d'énergie), et une augmentation de fluorescence [156]. Au total, plus d'une quinzaine de sondes basées sur la réactivité du groupement boronate en présence de peroxyde d'hydrogène ont été reportées [152].

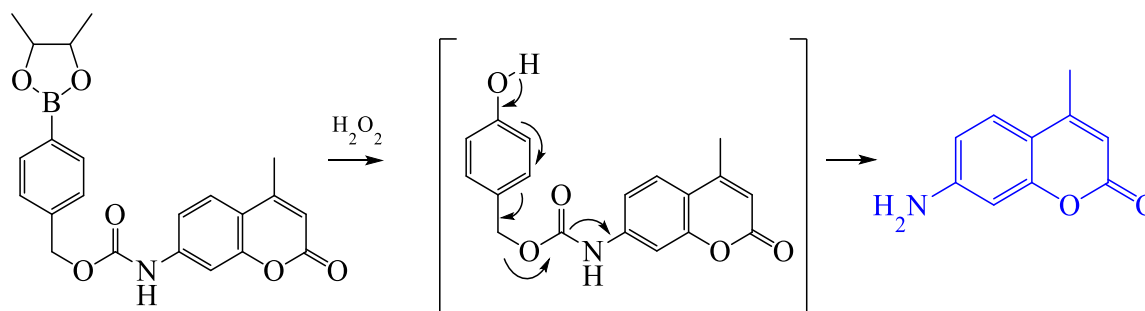


Figure 36 Mécanisme réactionnel de la détection du peroxyde d'hydrogène avec une sonde boronate libérant une aminocoumarine fluorescente.

Par ailleurs, il existe des sondes basées sur des sulfonates, des disulfonates, la triphénylphosphine ou la naphthalimide qui permettent la détection du peroxyde d'hydrogène. Cependant, la détection par les sondes citées jusque-là entraîne une réaction irréversible. Il existe d'autres molécules pouvant être oxydées par H_2O_2 puis réduites par ajout d'un réducteur. Cela permet une détection répétée du peroxyde d'hydrogène et il est reporté qu'il n'y a pas de diminution de la vitesse de réaction après au moins dix cycles d'oxydation et réduction [157]. Cette sonde est d'un intérêt particulier pour imager les cycles redox réversibles des cellules.

Il existe également des sondes qui permettent la détection en suivant la perte de fluorescence au lieu de l'augmentation. C'est le cas de complexes ferriques conjugués à un polymère (PPESO3 : polyphénylène éthynylène possédant des groupements latéraux sulfonates) qui passe d'un état d'oxydation +II à +III en présence de peroxyde d'hydrogène, induisant une extinction de fluorescence. La limite de détection est donnée à $0,21 \mu M$ d' H_2O_2 (Figure 37) [158].

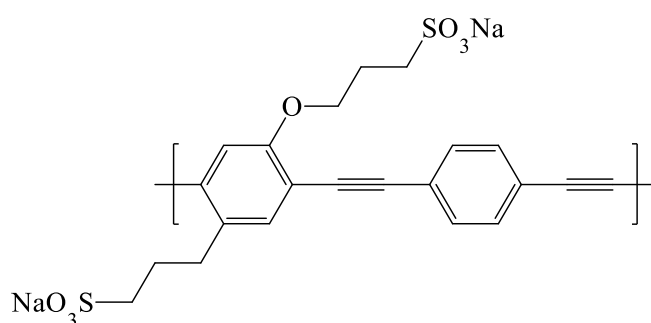


Figure 37 Structure du polymère PPESO3, ligand d'un complexe $Fe(II)$ en absence de peroxyde d'hydrogène qui est fluorescent et ligand d'un complexe $Fe(III)$ en présence de peroxyde d'hydrogène qui n'est pas fluorescent.

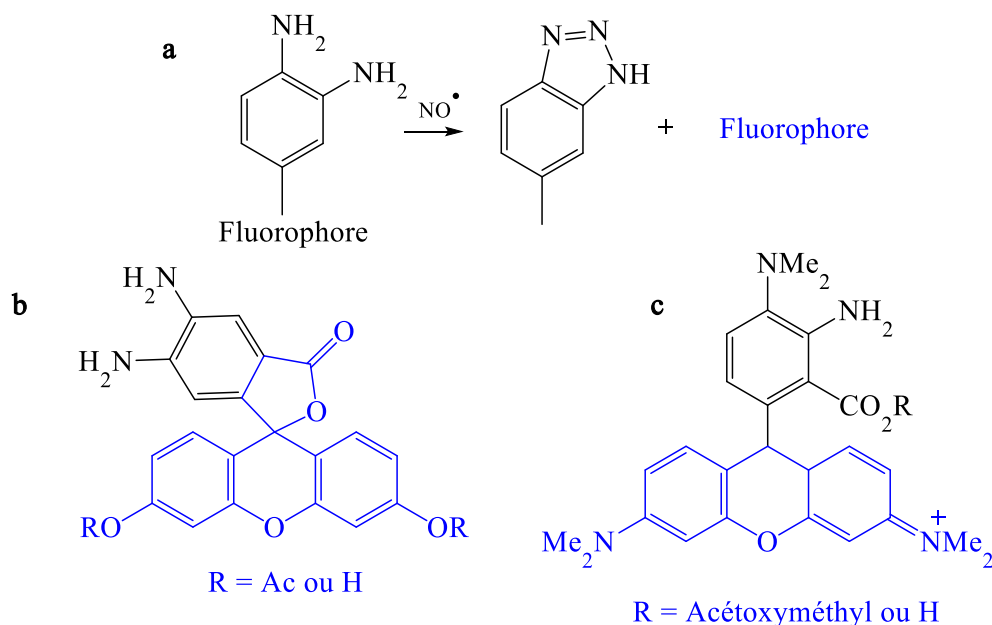
Enfin, des capteurs à base de nanoparticules ont été développés [159], [160]. Un premier capteur est basé sur la réactivité du peroxyde d'hydrogène avec des groupements peroxalates décorant une nanoparticule luminescente d'or et provoquant la formation de dioxétanedione, ce qui permet un échange d'électron libérant la fluorescence de la nanoparticule luminescente [159]. Dans le second

système, des nanoparticules fluorescentes d'or sont décorées par des groupements acide mercaptoundecanoïque et en présence de peroxyde d'hydrogène, ces groupements sont oxydés ; le mécanisme d'échange d'électrons n'ayant plus lieu, la fluorescence des particules luminescentes diminue [160].

ii. Détection de NO[•]

Comme explicité dans le paragraphe II.2.a., le monoxyde d'azote est impliqué dans de nombreux processus biologiques bénéfiques ou délétères. Aux vues des conséquences de la présence de cette espèce sur la santé, de nombreuses stratégies ont été développées afin de la détecter.

Nagano et Lippard ont synthétisé des sondes dont le mécanisme est basé sur un transfert d'électrons photo-induit (PET) d'un donneur d'électrons *o*-phenylène-diamine vers un fluorophore (Figure 38 a). Ce transfert a pour conséquence une diminution du rendement quantique du fluorophore. Une réaction de nitrosation du groupement donneur par NO[•] en présence d'oxygène entraîne la formation d'un triazole, le transfert d'électrons photo-induit n'a plus lieu et l'extinction de fluorescence devient moins efficace, ce qui se traduit par une augmentation de fluorescence [161]. Les premières sondes de ce type sont les diaminofluorescéines (DAF) développées à la fin des années 90 (Figure 38 b) [162], [163]. Ces premières sondes permettent une exacerbation de la fluorescence de plus de deux ordres de grandeur et la limite de détection du monoxyde d'azote est reportée à 5 nM. Néanmoins, le premier inconvénient constaté avec ces sondes est une forte dépendance en pH sur l'intensité de fluorescence, suite à la réaction avec le monoxyde d'azote. Des modifications ont alors été apportées pour pallier aux différentes contraintes de ces sondes et les diaminorhodamines (DAR) ont alors été proposées (Figure 38 c) [164]. Après réaction avec NO[•], le rendement quantique augmente d'un facteur 840 et la limite de détection est de 7 nM. La dépendance en pH n'est plus observée pour un pH supérieur à 4.



La détection du monoxyde d'azote au niveau cellulaire nécessite de prendre en compte la réactivité de cette espèce et donc son faible temps de vie. Des sondes modifiées avec des groupements hydrophiles (acétoxyméthyl-) offrent une meilleure perméabilité cellulaire et un confinement de la fluorescence à l'intérieur de la cellule après réaction avec le monoxyde d'azote, ce qui rend possible une observation à long terme [165]. Une autre sonde de type *o*-phenylène-diamine a été associée avec un groupement fluorescent de type BODIPY (borodipyrométhène). Les sondes BODIPY absorbent dans l'ultraviolet et possèdent un fort rendement quantique de fluorescence. Cette association *o*-phenylène-diamine - BODIPY permet de s'affranchir d'une dépendance en pH sur une gamme de 3 à 13 et a été utilisée pour la détection du monoxyde d'azote *in vivo* et *in vitro* [165], [166].

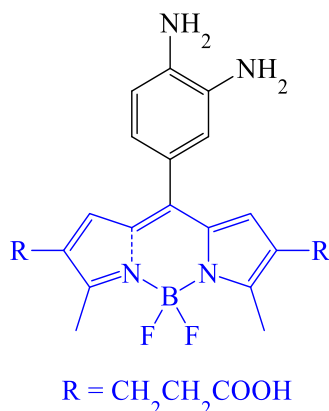


Figure 39 Structure chimique d'une sonde à base de BODIPY pour la détection du NO[•].

Ensuite, Lippard *et al.* ont développé de nouvelles sondes à partir de complexes de métaux de transition. Une extinction de fluorescence est induite par la coordination d'un fluorophore avec le métal mais en présence de NO[•], la réduction du métal entraîne la dissociation du complexe métal-fluorophore et la fluorescence augmente [167], [168]. Des complexes à base de différents métaux (cobalt, ruthénium, rhodium) sont décrits dans la littérature, cependant ils ne sont pas solubles dans l'eau et possèdent une réactivité lente, leur utilisation en conditions physiologiques et, *a fortiori in vivo*, est inenvisageable. De plus, ils ne présentent qu'une faible sélectivité au monoxyde d'azote et ne sont pas suffisamment sensibles (50-100 μM). Finalement, des sondes à base de cuivre ont été mises au point pour des études en milieu aqueux [169]. Comme pour les complexes cités précédemment, la stratégie est d'éteindre la fluorescence lorsque le fluorophore est complexé par un cuivre II. En présence de NO[•], le Cu(II) paramagnétique est réduit en Cu(I) diamagnétique, libérant le fluorophore à condition d'être en milieu tamponné à pH 9.0. Avec cette première sonde, il n'est donc toujours pas possible de travailler en conditions physiologiques. Ensuite, une autre classe de sonde à base de complexe cuivré a été développée. Le principe reste le même mais en présence de NO[•], s'ajoute à la réduction du Cu(II) en Cu(I), une nitrosation du fluorophore [170]. Plus tard, Lippard *et al.* ont réussi à mettre au point une sonde basée sur un complexe Cu-fluorescéine fonctionnant selon la même stratégie mais en conditions physiologiques [171], [172], [173]. La fluorescence augmente d'un facteur 16, après 5 minutes d'incubation en présence de monoxyde d'azote à pH 7,0. La limite de détection est de 5 nM ce qui est significativement meilleur que pour toute autre sonde basée sur un complexe métal-fluorophore, et cette sonde est également bien plus spécifique du NO[•]. Cependant, cette sonde a tendance à diffuser rapidement en dehors des cellules et la détection *ex vivo* ou *in vivo* reste

donc complexe. Pour améliorer la rétention cellulaire de la sonde, des groupements de type dextran ou ester peuvent être greffés sans modifier la réactivité de la sonde ni sa fluorescence.

Par ailleurs, des nanotubes de carbone mono-paroi (SWNT = *single-walled nanotube*) peuvent servir de capteurs pour la détection du NO[•] *in vivo* [174]. Ces SWNT émettent un signal de fluorescence dans le proche infrarouge ce qui permet une détection dans des tissus profonds. En présence de NO[•], la fluorescence des nanotubes est éteinte de manière réversible. Un transfert d'électron a lieu entre la bande de valence du nanotube et l'orbitale inoccupée la plus basse (LUMO) du NO[•]. Ce système permet une détection en temps réel du monoxyde d'azote de façon spécifique par rapport aux autres ROS et RNS et a déjà été utilisé pour la détection du NO[•] produit par la NO-Synthase (iNOS) dans des macrophages.

Enfin, un nano-capteur fluorescent a été mis au point à partir de la technologie des *quantum dots* (QD) qui sont des nano-cristaux semi-conducteurs. Ces matériaux offrent de meilleures performances en termes d'intensité de fluorescence émise et de stabilité que les autres sondes organiques et inorganiques décrites précédemment. Des complexes tris(dithiocarbamato)-Fe(III) sont associés à un nano-cristal de CdSe-ZnS et, en présence de monoxyde d'azote, ce complexe réagit *via* un transfert d'électron entraînant une substitution du ligand pour conduire à l'obtention d'un bis(dithiocarbamato)-Fe(I) [175]. En l'absence de NO[•], une faible fluorescence est observée dû à la présence du complexe au niveau du nano-cristal mais, en présence de NO[•] et après transfert d'électrons, la fluorescence du nano-cristal est exaltée. Il est reporté que cette sonde est spécifique du NO[•] et la limite de détection se situe autour de 3 µM.

iii. Détection de O₂^{•-}

Le radical anion superoxyde est une autre espèce très réactive, qui réagit avec les centres hémiques des protéines, se dismute en peroxyde d'hydrogène pour former ensuite des radicaux hydroxyle, ou réagit avec le monoxyde d'azote pour former du peroxynitrite. Comme pour les autres ROS, une accumulation de superoxyde dans l'organisme conduit au développement des diverses pathologies [176]. Quelques-unes des sondes courantes pour la détection du superoxyde sont reportées ici.

Le 2-hydroxyéthidium est utilisé pour la détection de O₂^{•-} en milieu intracellulaire et permet de sonder des productions de superoxyde de l'ordre de 0,3 pmol.mg⁻¹ d'échantillon (Figure 40). La fluorescence de cette molécule s'exprime selon deux voies dépendantes de la présence ou non de superoxyde. D'une part, elle s'auto-oxyde et est fluorescente à 510 nm ; d'autre part, en présence de superoxyde, la sonde est oxydée entraînant la libération d'un groupement hydroxyle et la molécule résultante absorbe à 396 nm. Une déconvolution des deux signaux d'émission permet de discriminer la production de superoxyde [177], [178].

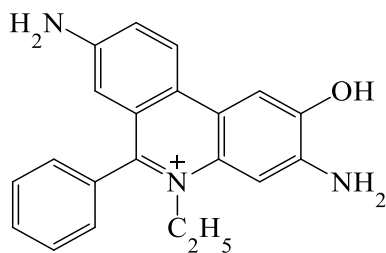


Figure 40 Structure chimique du 2-hydroxyéthidium utilisée pour la détection du superoxyde.

D'autres sondes basées sur des pyridyl benzothiazolines permettent la formation d'un composé fluorescent avec une bonne sélectivité vis-à-vis du superoxyde par rapport à d'autres ROS/RNS incluant le peroxyde d'hydrogène, le monoxyde d'azote ou le peroxynitrite avec une limite de détection à 1,7 nM (Figure 41) [179], [180].

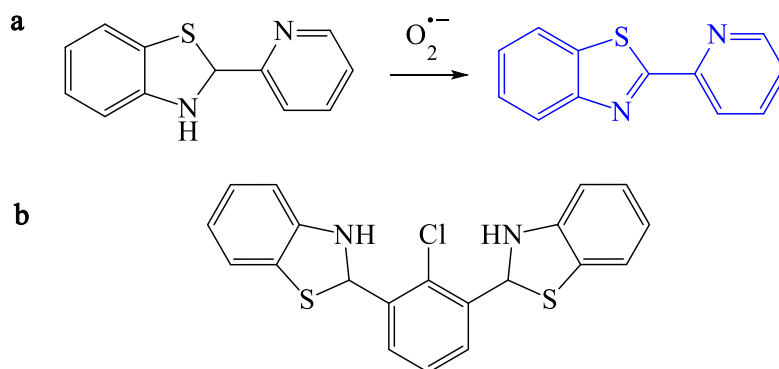


Figure 41 (a) Réaction type des sondes benzothiazoline avec le superoxyde.
(b) Exemple de structure : 2-chloro-1,3-dibenzothiazolinecyclohexène.

Maeda *et al.* ont développé des sondes sensibles au superoxyde mais agissant selon un processus non redox. Des groupements benzosulfonate sont coupés d'un système xanthine oxydase/hypoxanthine entraînant une exacerbation de fluorescence (Figure 42). Ces systèmes sont également très sélectifs du superoxyde par rapport à d'autres ROS/RNS [181], [182].

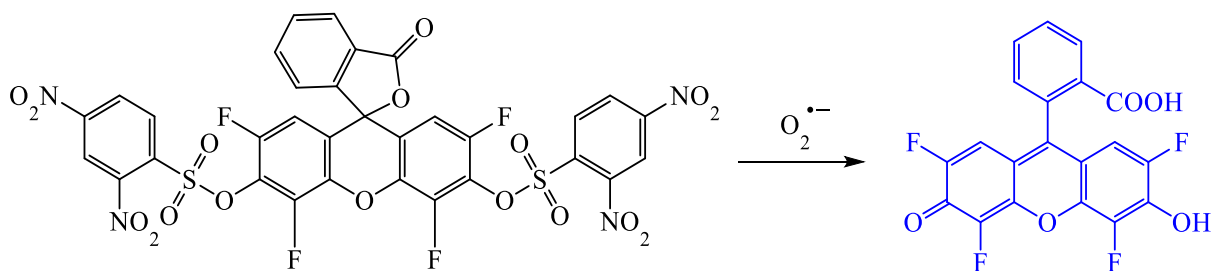


Figure 42 Réaction type d'une sonde benzosulfonate avec le superoxyde.

Un dérivé de la sonde chimiluminescente BODIPY a été synthétisé pour la détection de $O_2^{\bullet-}$. La formation puis décomposition de la dioxaténone génère un amide excité à l'état singulet dont le retour à l'état fondamental entraîne une émission de fluorescence [183].

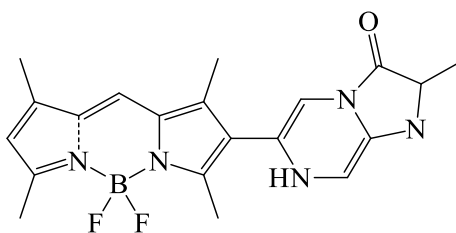


Figure 43 Structure chimique d'une sonde à base de BODIPY et sensible au superoxyde.

iv. Détection de ONOO^-

Le peroxynitrite est issu de la réaction du monoxyde d'azote avec le superoxyde ou bien du peroxyde d'hydrogène avec l'anion nitrite (en milieu acide). Il est hautement réactif, directement et indirectement par la formation des radicaux $\text{NO}_2^\bullet$ et $\text{OH}^\bullet$, et induit de nombreux dommages au sein de l'organisme conduisant au développement de pathologies (maladies neurodégénératives et cardiaques, diabète...) [184].

Trois différentes sondes spécifiques du peroxynitrite ont été synthétisées par Yang *et al.* [185]–[187]. La première agit grâce à la réactivité d'un groupement cétone lié à une dichlorofluorescéine par une liaison éther. En présence de ONOO^- la cétone est oxydée ce qui entraîne la rupture de la liaison éther et l'augmentation de la fluorescence (Figure 44) [185].

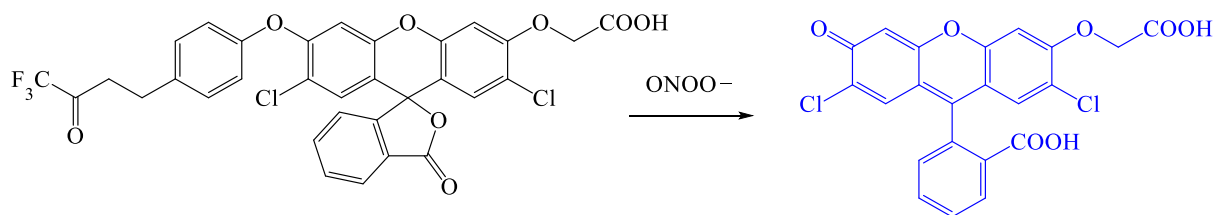


Figure 44 Réaction d'une sonde à base de dichlorofluorescéine avec le peroxynitrite.

Ensuite, une seconde sonde aussi basée sur une dichlorofluoresceine modifiée par une fonction aryl protégée par une cétone oxydable, offre une détection spécifique du ONOO^- avec une limite de détection de 50 nM [186]. Enfin, une autre sonde a été développée à partir du BODIPY dont la fluorescence n'apparaît qu'après oxydation spécifique du peroxynitrite (Figure 45) [187].

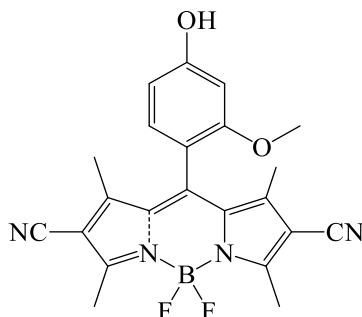


Figure 45 Exemple de structure d'une sonde à base de BODIPY et sensible au peroxynitrite.

En conclusion, il existe un grand nombre de sondes fluorescentes permettant la détection d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, mais pour nombre d'entre elles des inconvénients tels

qu'une dépendance en pH, une incompatibilité avec une étude en conditions physiologiques, une limite de détection trop faible ou encore un manque de sélectivité vis-à-vis d'une espèce sont rencontrés.

Par ailleurs, l'utilisation de telles sondes nécessitent une étude systématique pour sonder chaque espèce individuellement et éviter toute réaction secondaire ou phénomène de FRET. Cet aspect rend la tâche compliquée quand différentes espèces doivent être détectées simultanément, ce qui peut être le cas au cours des réactions des NO-Synthases.

Enfin, l'inconvénient principal réside avant tout dans l'obligation de synthétiser ces sondes qui, pour les plus récentes (donc souvent les plus performantes), ne sont pas encore disponibles commercialement.

b. Capteurs et méthodes électrochimiques

i. Principes généraux

L'électrochimie est une branche de la chimie qui étudie les réactions chimiques couplées à un échange d'énergie électrique, c'est-à-dire des réactions de transfert d'électrons entre deux ou plusieurs composés gazeux/solides/liquides ou dans les interfaces.

Les réactions mettant en jeu un transfert d'électrons sont les réactions d'oxydo-réduction. Lors d'une réaction d'oxydoréduction, un corps oxydant réagit avec un corps réducteur : on parle de couple redox, noté (Ox/Red).

L'élément qui capte un ou plusieurs électrons est l'oxydant (Ox_1) : l'oxydant est réduit pour donner le réducteur associé (Red_1), c'est une réaction de réduction (Equation 14).

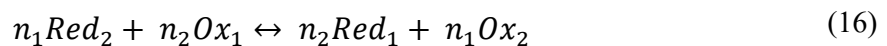


L'élément qui cède un ou plusieurs électrons est le réducteur (Red_2) : le réducteur est oxydé pour donner l'oxydant associé (Ox_2), c'est une réaction d'oxydation (Equation 15).



Avec $n_{i=1,2}$ le nombre d'électrons.

La réaction d'oxydoréduction est la somme de ces deux équations et fait donc intervenir deux couples redox (Equation 16) :



Une réaction d'oxydation ou de réduction s'accompagne toujours d'une modification du nombre d'oxydation (no) de l'élément en question. Le no caractérise la forme plus ou moins oxydée de l'espèce : plus le no est élevé, plus la forme est oxydée [188]. De plus, la variation du no est égale au nombre d'électrons mis en jeu. Par exemple pour le couple Cu^{2+}/Cu , dans la réaction $Cu \rightarrow$

$Cu^{2+} + 2e^{-}$, le nombre d'oxydation passe de 0 à +II pour l'élément cuivre (2 électrons mis en jeu). Cette augmentation traduit une oxydation du cuivre.

Lorsqu'une solution contient un couple redox tel que $Ox + ne^{-} \leftrightarrow Red$, celle-ci voit son potentiel prendre la valeur E défini par la loi de Nernst (à 25 °C) [184] (Equation 17) :

$$E = E^0 + \frac{0,058}{n} \log \frac{[Ox]_{sol}}{[Red]_{sol}} \quad (17)$$

Avec E^0 le potentiel normal apparent du couple redox, n le nombre d'électrons échangés, $[Ox]_{sol}$ et $[Red]_{sol}$ les concentrations de l'oxydant et du réducteur en solution.

Une électrode (en métal inattaquable par l'électrolyte) plongée dans cette solution contenant le couple redox voit son potentiel se mettre à l'équilibre ($E_{\acute{e}q}$), équivalent au potentiel exprimé précédemment (Equation 18) :

$$E_{\acute{e}q} = E^0 + \frac{0,058}{n} \log \frac{[Ox]_{sol}}{[Red]_{sol}} \quad (18)$$

Pour déterminer ce potentiel, une électrode de référence est nécessaire afin de mesurer un ΔE entre les deux électrodes : $\Delta E = E_{\acute{e}q} - E_{ref}$, avec E_{ref} le potentiel de l'électrode de référence, qui est constant quel que soit le milieu dans lequel elle est plongée. Pour produire une réaction électrochimique, il faut donc rendre le potentiel d'électrode différent du potentiel d'équilibre $E_{\acute{e}q}$, c'est-à-dire imposer une surtension (ou surpotentiel) $\eta = E - E_{\acute{e}q} \neq 0$. Sous l'effet de cette surtension, la composition de la solution est obligée d'évoluer et de se modifier au contact de l'électrode, conduisant à un nouvel état d'équilibre. Au contact de l'électrode, une réaction électrochimique va donc se produire entre l'oxydant et le réducteur qui sont présents à sa surface aux concentrations $[Ox]'_{sol}$ et $[Red]'_{sol}$. η est donc le facteur de production d'une réaction électrochimique. Deux cas sont possibles (Figure 46) [189]:

- si $\eta > 0$, soit $E > E_{\acute{e}q}$, une partie du réducteur s'oxyde suivant $Red - ne^{-} \leftrightarrow Ox$. Le rapport $\frac{[Ox]'_{sol}}{[Red]'_{sol}}$ augmente alors puisque $[Ox]'_{sol}$ croît. L'électrode constitue l'anode.
- si $\eta < 0$, soit $E < E_{\acute{e}q}$, une partie de l'oxydant se réduit suivant $Ox + ne^{-} \leftrightarrow Red$. Le rapport $\frac{[Ox]'_{sol}}{[Red]'_{sol}}$ diminue puisque $[Ox]'_{sol}$ décroît. L'électrode constitue la cathode.

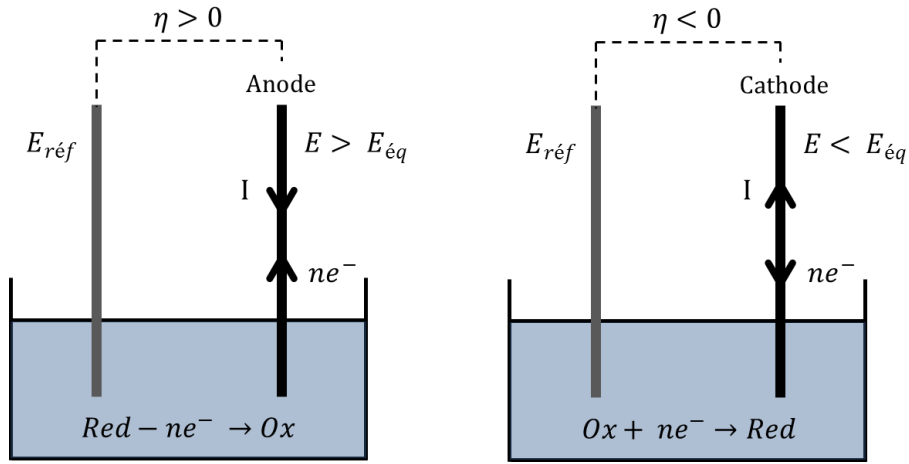


Figure 46 Sens de déplacement des électrons et donc du courant en fonction de la surtension η appliquée. Le sens du courant qui traverse l'électrode dépend du signe de η , autrement dit du potentiel appliqué à l'électrode. D'après [189].

Il existe deux types de transfert à l'électrode essentiels à la compréhension des phénomènes électrochimiques : le transfert électronique et le transfert de masse.

(1) Transfert électronique et loi de Butler-Volmer

La réaction électrochimique mise en jeu obéit à la loi de Faraday qui relie les quantités de matière de l'oxydant et du réducteur (n_{Ox} et n_{Red}) à la charge électrique Q transférée entre l'électrode et la solution. Cette loi s'exprime suivant l'équation suivante (Equation 19) :

$$n_{Ox} = n_{Red} = \frac{Q}{n\mathcal{F}} \quad (19)$$

Avec n le nombre d'électrons échangés dans la réaction $Ox + ne^- \leftrightarrow Red$, Q la charge (A.s ou C) et $\mathcal{F}$ la constante de Faraday (96484,56 C.mol⁻¹). Le courant électrique I (lié à la charge Q) induit par le transfert électronique entre l'oxydant (ou le réducteur) et l'interface électrochimique exprime la vitesse de la réaction qui s'exprime alors sous la forme (Equation 20) :

$$\frac{I}{n\mathcal{F}A} = \frac{j}{n\mathcal{F}} = k_a[Red]'_{sol} - k_c[Ox]'_{sol} \quad (20)$$

Avec I l'intensité du courant traversant l'électrode (ampère, A), A la surface de l'électrode (cm²), j la densité de courant (A.cm⁻²), k_a et k_c les constantes de vitesse caractéristiques des processus d'oxydation et de réduction respectivement (cm.s⁻¹).

La densité de courant j peut s'exprimer en fonction du paramètre η (et donc en fonction du potentiel appliqué) selon la loi de Butler-Volmer (Equation 21) [190] :

$$j = j_0 \left(\exp \frac{(1-\alpha)n\mathcal{F}}{RT} \eta - \exp \frac{-\alpha n\mathcal{F}}{RT} \eta \right) \quad (21)$$

Avec j_0 la densité de courant d'échange à l'équilibre et α le coefficient de transfert de charge ($0 < \alpha < 1$), R la constante des gaz parfaits (J.K⁻¹.mol⁻¹) et T la température (K).

Le paramètre j est aussi appelé densité de courant faradique car il est lié à la réaction électrochimique en elle-même. En effet, il existe un autre courant lié à la double couche électrochimique qui

se forme à l'interface électrode-solution (Figure 47). L'interface électrode-solution est par définition la double couche électrochimique.

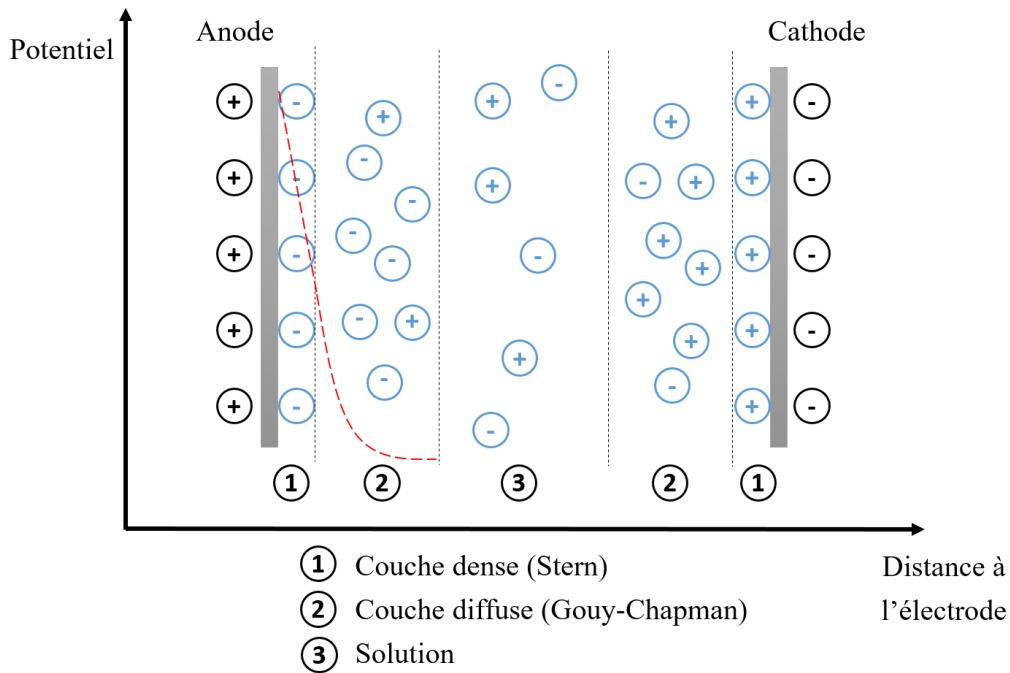


Figure 47 Représentation schématisée de la répartition des charges au sein d'une solution ionique lorsqu'un champ électrique est appliqué entre deux électrodes. Cette représentation est basée sur le modèle de la double couche électronique présentant (1) la couche dense de Stern où les ions de charges opposées à celle de l'électrode s'adsorbent et (2) la couche diffuse de Gouy-Chapman où sont présents une majorité de co-ions et quelques contre-ions répartis selon une distribution statistique de Boltzmann dans une zone située à proximité de la surface du métal (jusqu'à quelques dizaines de nm).

Dans le cas schématisé Figure 47, des ions hydratés sont adsorbés à la surface de l'électrode (anions à l'anode et cations à la cathode) et forment la couche dense de Stern. Ils peuvent s'approcher de l'électrode jusqu'à une distance minimale de l'ordre du rayon de l'ion hydraté (quelques Å). Les contre-ions (de charge opposée) vont interagir avec les ions adsorbés via des interactions électrostatiques pour former la couche diffuse de Gouy-Chapman. Ces deux couches forment la double couche électronique décrite par le modèle de Stern. Au-delà de la double couche, la solution est neutre. Il existe donc une différence de potentiels (ddp) ou potentiel diélectrique à l'interface électrode-solution qui évolue d'abord linéairement (Stern) puis de façon exponentielle (Gouy-Chapman) avec la distance à l'électrode.

Ce phénomène peut être décrit par une analogie électrique. En effet, le comportement électrique de la double couche peut être modélisé par un condensateur de capacité C branché en parallèle avec une résistance dite de transfert R_t ou de polarisation liée au processus faradique (Figure 48).

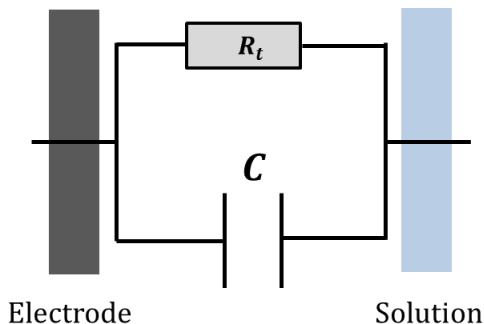


Figure 48 Analogie électrique d'une double couche électrochimique. C est la capacité de la double couche et R la résistance associée au processus faradique.

Lorsqu'un potentiel est appliqué à l'électrode de travail, il existe une réorganisation spontanée de la solution au niveau de l'électrode, indépendamment du processus faradique (lié à la réaction électrochimique d'intérêt). Cette réorganisation des charges (ions) dans la double couche électrochimique induit un courant capacitif i'_c qui s'exprime ainsi (Equation 22) [191] :

$$i'_c = \frac{\Delta E'}{R_{sol}} e^{-\frac{t}{R_{sol}C}} \quad (22)$$

Avec R_{sol} la résistance de la solution, $\Delta E'$ la différence de potentiel imposée. Ce courant capacitif dépend donc du potentiel appliqué à l'électrode. De plus, la capacité dépend de l'aire de l'électrode (typiquement un disque) soit $C = \pi r^2 C_s$ avec C_s la capacité surfacique. D'autre part, la double couche met un certain temps à se charger, défini par la constance de temps $\tau = R_{sol} \cdot C$. Cette constante de temps dépend donc de la taille de l'électrode.

Finalement, le courant total associé au processus électrochimique dans sa globalité est donné par (Equation 23) :

$$i = i_f + i'_c \quad (23)$$

Avec i_f le courant lié au processus faradique (réaction électrochimique).

(2) Transfert de masse et lois de Fick

Pour que la réaction électrochimique à l'électrode soit maintenue, il faut un apport continu de l'espèce redox mise en jeu. Pour cela, l'espèce présente en solution doit arriver à l'électrode, par transport. Il existe trois modes de transport de matière permettant d'alimenter le flux de l'espèce redox : la diffusion, la migration et la convection [189].

- La diffusion est due à un gradient de concentration induit par la réaction électrochimique et qui implique un déplacement des espèces chimiques.
- La migration correspond au mouvement des espèces chargées lorsqu'il existe un gradient de potentiel appliqué sur l'électrode. Ce mode de transport est minimisé lorsque l'électrolyte support est en large excès par rapport à l'espèce.
- La convection est un déplacement des espèces redox donc de la solution produit par une force mécanique (c'est le cas avec les électrodes tournantes par exemple).

Dans le cas du régime de diffusion pure, c'est-à-dire sans convection imposée dans la solution et avec une électrode fixe, la 1^{ère} équation de Fick permet de connaître le flux de l'espèce redox (concentration c), situé à une distance x de la surface (m) d'une électrode plane et de dimension infinie pour négliger les effets de bord (Equation 24) :

$$\Phi = -D \frac{\partial c(x)}{\partial x} \quad (24)$$

Avec Φ le flux de l'espèce redox ($\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), c sa concentration (mol.m^{-3}) et D le coefficient de diffusion ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$). A la surface de l'électrode, le flux de l'oxydant doit être égal au flux du réducteur (loi de conservation de la masse).

De plus, ce flux et donc la concentration de l'espèce redox sont directement liés à la densité de courant j exprimée dans l'équation de Butler-Volmer [189] (Equation 25) :

$$-D_{ox} \left(\frac{\partial [Ox]_{sol}}{\partial x} \right)_{x=0} = D_{Red} \left(\frac{\partial [Red]_{sol}}{\partial x} \right)_{x=0} = \frac{j}{nF}$$

La *seconde équation de Fick* permet de faire intervenir le paramètre temps. La variation temporelle de la concentration est liée à sa variation spatiale (Equation 26) :

$$\frac{\partial c(x)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (26)$$

Pour la résoudre, il faut connaître les conditions aux limites :

- A $t = 0$, $c_{Ox}(x, 0) = [Ox]_{sol}$ ou $c_{Red}(x, 0) = [Red]_{sol}$ car la réaction électrochimique n'a pas démarré.
- Quand un potentiel est imposé à l'électrode, la concentration de l'espèce à l'électrode $[Ox]_{sol}'$ devient différente de $[Ox]_{sol}$: par exemple, elle augmente si l'oxydant est créé par la réaction électrochimique. De plus, loin de l'électrode (au-delà de la couche de diffusion), la composition de la solution n'est pas modifiée, donc $c_{Ox}(\infty, t > 0) = [Ox]_{sol}$.

Après résolution des équations de Fick et en combinant les différents résultats, le courant $i(t)$ s'exprime finalement en fonction de la concentration et du temps selon l'équation de Cottrell (dans le cas $Red - ne^- \rightarrow Ox$) [189], [192] (Equation 27) :

$$i_f(t) = \frac{nFAD_{Red}[Red]_{sol}}{\sqrt{\pi D_{Red}t}} > 0 \quad (27)$$

Avec D_{Red} le coefficient de diffusion du réducteur. Selon une convention internationale, ce courant est positif : il s'agit en effet d'une réaction d'oxydation, dans laquelle le réducteur est consommé pour former l'oxydant : le courant est dit « courant d'oxydation ». Dans le cas inverse (réaction de réduction), le courant serait négatif (dit « courant de réduction »).

Dans le cas des électrodes planes, l'épaisseur de la couche de diffusion est très faible devant les dimensions de l'électrode et est donnée par $\delta = \sqrt{\pi D t}$ (avec $D = D_{red}$ ou D_{ox} suivant le cas). Elle est directement proportionnelle à $t^{1/2}$, donc son épaisseur augmente avec le temps.

En fonction de la forme de l'électrode considérée, l'expression du courant donnée ci-dessus sera différente car il faut reconsidérer le système de coordonnées utilisé pour écrire le Laplacien dans la seconde équation de Fick [191].

ii. Electrodes et phénomènes de diffusion

Différentes surfaces d'électrodes telles que le platine, le carbone ou l'or peuvent être utilisées et seront plus ou moins adaptées en fonction de l'espèce à sonder, de par les interactions chimiques et catalytiques existant entre surface et nature de l'espèce réactive. Par ailleurs, la taille de l'électrode, qu'elle soit macro- (millimétrique), micro- ou ultramicroélectrode (UME : $< 25 \mu m$ de diamètre) est également à prendre en compte en fonction du système utilisé. En effet, l'électrolyse d'une espèce à l'interface entre la solution et la surface de l'électrode dépend du transport de matière et donc de la

diffusion de l'espèce électroactive ; ainsi, en fonction de la taille et de la forme de l'électrode, la couche de diffusion sera différente (Figure 49) [193], de même que la réponse électrochimique.

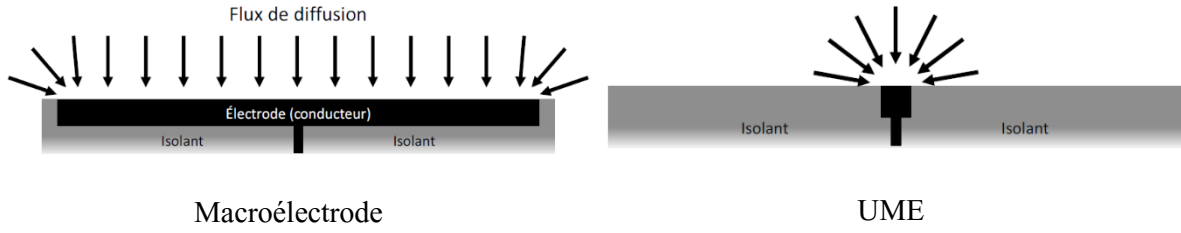


Figure 49 Représentation schématique du flux de diffusion d'une espèce à l'interface électrode/solution pour des électrodes disques plan de tailles différentes (millimétrique à gauche, micrométrique à droite). [193]

Dans le cas de la détection des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, ce sont les ultra-micro-électrodes qui sont le plus souvent utilisées, d'une part puisque leurs dimensions physiques sont compatibles avec une utilisation dans des environnements micrométriques (cellules, tissus) contrairement aux macro-électrodes qui sont trop encombrantes pour ce type d'utilisation. De plus, sa dimension est voisine de celle de la couche de diffusion (quelques dizaines de microns), donc une UME est une électrode qui peut présenter un régime de diffusion sphérique dans des conditions électrochimiques usuelles. L'établissement de ce régime sphérique devient indépendant du temps ce qui offre aux UMEs l'obtention de courants stationnaires en chronoampérométrie, sans avoir recours à un système sous agitation (convection forcée). Pour des électrodes millimétriques, le temps nécessaire à l'établissement du régime sphérique de diffusion et les dimensions de cette couche sont trop élevés. Le phénomène de convection n'est alors plus négligeable dans cette gamme de temps/distance et l'interprétation des signaux en diffusion pure (sans agitation) est plus difficile.

Pour une UME de forme disque (diffusion hémisphérique), l'intensité du courant faradique i_f (C) en condition quasi-stationnaire s'exprime selon (Equation 28) :

$$i_f = \frac{n\mathcal{F}AD_iC_i}{\delta} = \frac{4n\mathcal{F}AD_iC_i}{\pi r_0} = 4n\mathcal{F}D_iC_ir_0 \quad (28)$$

Avec :

n : nombre d'électrons transférés lors de l'électrolyse

$\mathcal{F}$: constante de Faraday (= 96485 C.mol⁻¹)

A : aire de l'électrode (m²)

D_i : coefficient de diffusion de l'espèce électroactive (m².s⁻¹)

C_i : concentration initiale de l'espèce électroactive (mol.L⁻¹)

δ : épaisseur de la couche de diffusion (m)

r_0 : rayon de l'électrode (m)

Cette équation montre que, en conditions de diffusion pure, le courant donne accès à la concentration de l'espèce oxydée ou réduite, les autres paramètres étant constants et connus.

D'autre part, les UMEs ont l'avantage d'offrir une faible capacitance interfaciale et peuvent être utilisées dans des milieux très résistifs (milieux peu polaires, faibles en solutés conducteurs). D'autre part, dans le cas des UMEs, i_f est proportionnel au rayon de l'électrode et i'_c est proportionnel

à la surface de l'électrode, donc plus le diamètre de l'électrode est petit, plus le rapport i_f/i'_c sera élevé.

Pour les différentes raisons exposées dans ce paragraphe, ce sont les UMEs qui ont été choisies pour réaliser toutes les analyses électrochimiques présentées dans ce manuscrit.

iii. Electroanalyse de ROS et RNS

L'électrochimie faradique est basée sur l'électrolyse d'une espèce électroactive. Différentes méthodes électrochimiques sont disponibles en fonction de l'information recherchée. Parmi elles, les méthodes ampérométriques permettent de suivre au cours du temps l'électrolyse (oxydation ou réduction) d'une espèce à un potentiel fixé. L'électrolyse d'une espèce à la surface de l'électrode de travail entraîne un courant faradique (Tableau 4). En suivant l'intensité du courant en fonction du temps, il est possible de détecter de manière qualitative et quantitative (loi de Faraday) les espèces présentes en solution, à condition bien évidemment qu'elles soient électroactives et que le potentiel appliqué soit suffisant. En effet, en chronoampérométrie, à partir du moment où un potentiel est appliqué, toutes les espèces dont le potentiel d'oxydation est inférieur seront oxydées (et inversement, toutes les espèces dont le potentiel de réduction est supérieur seront réduites). Par exemple, sur la Figure 50 [194] illustrant les potentiels d'oxydation des principaux ROS et RNS sur un même type d'électrode (carbone recouvert de noir de platine), si un potentiel de 400 mV vs. ECSS (électrode de référence au calomel saturé en sodium), alors les espèces $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 et $ONOO^-$ seront oxydées si elles sont présentes en solution. En 2006, Amatore *et al.* [194] ont mesuré des flux de divers ROS et RNS simultanément en effectuant des analyses chronoampérométriques à différents potentiels d'oxydation. Ils ont appliqué ensuite un algorithme permettant la déconvolution des signaux et ont calculé alors la concentration de chacune des ROS-RNS libérées par une cellule unique.

✓	$E(O_2/O_2^{\bullet-})$	-0.33 V vs. NHE
✓	$E(H_2O_2/O_2)$	-0.15 V vs. NHE
✓	$E(ONOO^{\bullet}/ONOO^-)$	+0.20 V vs. NHE
✓	$E(HNO/NO^{\bullet})$	+0.44 V vs. NHE
✓	$E(NO_2^{\bullet}/NO_2^-)$	+0.99 V vs. NHE
✓	$E(NO^+/NO^{\bullet})$	+1.21 V vs. NHE
✗	$E(NO_3^{\bullet}/NO_3^-)$	+2.50 V vs. NHE
✗	$E(NO_2^+/NO_2^{\bullet})$	+1.56 V vs. NHE

Tableau 4 Potentiels d'équilibre des principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote et leurs couples redox associés. Les deux derniers couples sont annotés d'une croix rouge signifiant que ces espèces ne sont pas détectables en milieu aqueux à cause de la réduction et de l'oxydation de l'eau à -1.2 V et +1.5 V respectivement.

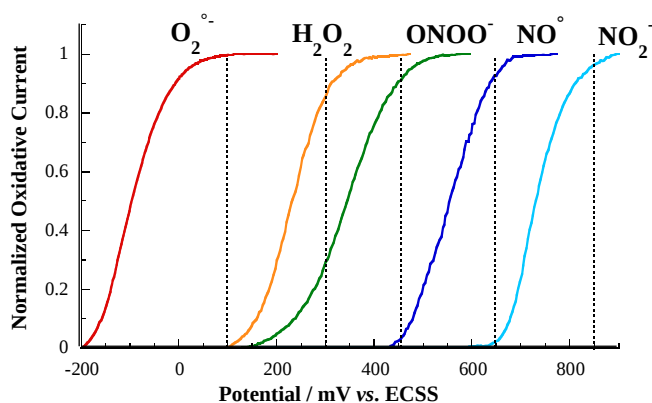


Figure 50 Vagues d'oxydation de ROS et RNS obtenues en voltamétrie cyclique sur ultra-micro-électrode à fibre de carbone platinée et mettant en évidence expérimentalement les différents potentiels d'oxydation de ces espèces. [194]

D'une part, la différence d'intensité de courant entre 850 et 650 mV correspond à la contribution de $NO_2^{\bullet-}$. Ensuite, la différence d'intensité de courant entre 650 et 450 mV correspond à la

contribution de $\text{NO}^\bullet$. Et enfin, les intensités de courant à 450 et 300 mV correspondent à la contribution de H_2O_2 et ONOO^- . Ceci se traduit par un système de quatre équations à quatre inconnues, qui peut être résolu grâce aux données de la Figure 51.

$$\begin{cases} I_{850 \text{ mV}} = I_{\text{H}_2\text{O}_2} + I_{\text{ONOO}^-} + I_{\text{NO}} + I_{\text{NO}_2^-} \\ I_{650 \text{ mV}} = I_{\text{H}_2\text{O}_2} + I_{\text{ONOO}^-} + I_{\text{NO}} \\ I_{450 \text{ mV}} = a \cdot I_{\text{H}_2\text{O}_2} + b \cdot I_{\text{ONOO}^-} \\ I_{300 \text{ mV}} = c \cdot I_{\text{H}_2\text{O}_2} + d \cdot I_{\text{ONOO}^-} \end{cases} \quad (29)$$

Avec : a, b, c et d correspondant à des facteurs de pondération

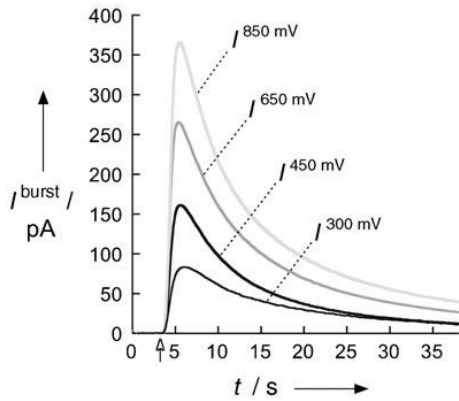
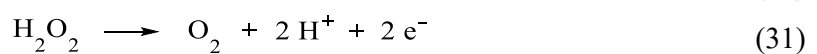
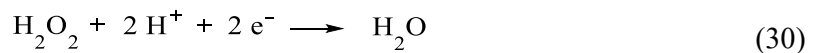


Figure 51 Intensités des courants détectés par chronoampérométrie à différents potentiels d'oxydation (+300 mV, +450 mV, +650 mV et +850 mV vs. ECSS) sur des cellules uniques (macrophages). La flèche représente le moment où la dépolarisation de la membrane est déclenchée, entraînant la libération des ROS et RNS. Chaque courbe correspond à la moyenne de la réponse de 60 à 80 macrophages différents. [194]

iv. Détection de H_2O_2

Le peroxyde d'hydrogène est l'espèce la plus stable parmi les ROS ce qui en fait une des principales sources de stress oxydant. Il peut être oxydé ou réduit par voie électrochimique (Equations 30 et 31). L'électro-oxydation de H_2O_2 a largement été étudiée sur diverses surfaces d'électrodes et la sensibilité varie grandement d'un type de surface à un autre. Notamment, il est bien connu que l'oxydation d' H_2O_2 sur électrode de carbone est assez difficile mais qu'à l'inverse, le platine offre une bien meilleure détection grâce à un effet catalytique sur l'oxydation d' H_2O_2 . Les surfaces de Pt sont disponibles sous diverses formes ou structures cristallines (polycristalline, monocristalline, nanoparticules, etc...) [195]–[197] dont le noir de platine qui est électrodéposé et conduit à la cristallisation d'une nanostructure poreuse de Pt de très grande surface spécifique permettant une détection très sensible du peroxyde d'hydrogène (jusqu'à quelques nanomolaires). Cette structure platinée peut être déposée sur des surfaces de carbone ou de platine également de tailles et formes multiples [198], [199], [200].



Bien que cette technique de modification de surface soit connue depuis une trentaine d'années, ce n'est seulement que récemment que Badets *et al.* ont pu déchiffrer le mécanisme catalytique du noir de Pt lors de l'oxydation d' H_2O_2 en tampon phosphate (PBS 10 mM, pH 7,4) [200]. Ils ont

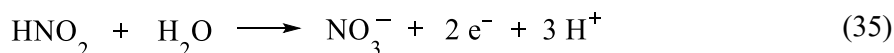
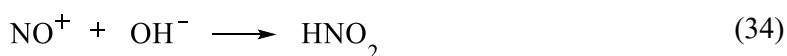
mis en évidence la présence de deux procédés d'oxydation correspondant à l'adsorption des phosphates suivie de l'adsorption d' H_2O_2 . Ils ont démontré que la présence d'oxydes de Pt (PtO_2), pouvant être renforcée après un traitement de l'électrode au plasma à oxygène, joue un rôle prépondérant dans la thermodynamique et la cinétique de plusieurs réactions anodiques (H_2O_2 , O_2^- , hydroquinone).

v. Détection du $\text{NO}^\bullet$

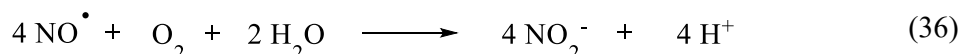
Le monoxyde d'azote peut être détecté par électrochimie par réduction (Equation 32) ou par oxydation (Equation 33) mais peu d'études sont consacrées à l'électroréduction de celui-ci à cause, d'une part, de la forte réactivité de l'anion nitrosyl NO^- en présence d'oxygène et d'autre part à cause de l'interférence de la réduction du O_2 moléculaire en condition aérobie.



C'est donc l'oxydation du $\text{NO}^\bullet$ qui est privilégiée pour l'électrodétection et le potentiel appliqué, en fonction de la surface d'électrode, est compris entre 0,6 et 1 V vs. Ag/AgCl en solution aqueuse à pH 7,4. Un mécanisme d'oxydation du monoxyde d'azote impliquant le transfert de trois électrons a été proposé (Equations 33 à 35) [198], [201], [202]. La première étape consiste à transférer un électron de $\text{NO}^\bullet$ vers l'électrode entraînant la formation de l'ion nitrosonium NO^+ . Ce dernier est un acide de Lewis fort et est converti en nitrites NO_2^- (ou HNO_2) en présence d'hydroxyde (OH^-). Enfin, les ions nitrites peuvent être oxydés en nitrate (NO_3^-) *via* un transfert de deux électrons.



Néanmoins, il est important de noter qu'en condition aérobie, le monoxyde d'azote réagit rapidement avec l'oxygène moléculaire pour former des ions nitrites selon la réaction suivante :



Une seconde difficulté s'ajoute à celle de l'instabilité du monoxyde d'azote en présence d'oxygène. Comme expliqué au paragraphe précédent (II.3.b.i), lorsque le potentiel d'oxydation du $\text{NO}^\bullet$ est appliqué (650 mV vs. Ag/AgCl), toutes les espèces dont le potentiel d'oxydation est inférieur à celui-ci seront également oxydées [194]. Si ces espèces sont présentes en solution en début d'expérience, alors le courant faradique résultant de leur oxydation contribuera au courant de base (expérience de chronoampérométrie à potentiel constant). Ceci a pour effet d'augmenter le rapport signal/bruit et donc de limiter la détection de faibles concentrations en $\text{NO}^\bullet$. Par ailleurs, si des espèces oxydables à un potentiel ≤ 650 mV sont générées en même temps que $\text{NO}^\bullet$, les courants faradiques issus de leurs oxydations interfèrera avec celui du monoxyde d'azote. Ces espèces sont désignées dans la littérature comme analytes interférents. Parmi eux sont notamment reportés NO_2^- , H_2O_2 , l'acide ascorbique, l'acide urique, la dopamine ou encore la sérotonine qui posent problème lors de la détection du $\text{NO}^\bullet$ en milieu biologique. Ainsi, un grand intérêt a été porté au développement de capteurs dont la surface d'électrode a été modifiée dans le but de les rendre plus sélectifs et plus sensibles au $\text{NO}^\bullet$ [201], [203].

Les premières études portent sur le développement de capteurs à base de membranes. Shibuki a développé en 1990 une première électrode pour la mesure directe du NO[•] en se basant sur une adaptation de l'électrode de Clark utilisée pour la mesure de l'oxygène [204] mais un manque de reproductibilité des résultats, attribué à plusieurs paramètres expérimentaux, a été constaté, de même qu'un temps de réponse trop long. Néanmoins, ce système a permis de poser la stratégie de départ et ont suivi d'autres électrodes modifiées par un film polymère. L'idée de déposer plusieurs films de propriétés différentes permettant ainsi d'augmenter la sélectivité de l'électrode a ensuite été proposée. Néanmoins, cette stratégie implique également une diminution de la sensibilité des électrodes. Différents systèmes ont été développés avec tout d'abord, l'idée de Malinski et Taha (1992) de modifier des électrodes à base de fibres de carbone par électrodéposition d'un film de porphyrine recouvert lui-même d'une membrane de Nafion (ionomère perfluorosulfoné) [205]. Les porphyrines de nickel, de même que les phthalocyanine de nickel se composent d'un complexe métallique permettant de catalyser l'oxydation du NO[•] par électrochimie [205]. Caro *et al.* ont mené une étude sur le mécanisme d'action de ces complexes dans la détection du NO[•] et il semble que ce dernier se lie simplement au métal, facilitant ainsi le transfert d'électrons de l'électrode vers le monoxyde d'azote [206]. Par ailleurs, le dépôt d'une membrane de Nafion (polymère chargé négativement à pH neutre) rend les électrodes relativement imperméables à l'interfèrent NO₂⁻ (ou à tout autre anion) par répulsion électrostatique. Ce polymère a été utilisé par l'équipe de Bedioui *et al.* qui a mis au point une première génération d'ultra-microélectrodes (surface = or), adaptées à une détection au sein de systèmes biologiques grâce à leur taille (< 25 µm de diamètre), et insensibles aux nitrites [207]. Malgré le fait que cette membrane ne permette pas la « filtration » d'espèces cationiques ou neutres [208], la combinaison de ces deux couches permet, d'une part, de diminuer la surtension (déplacement du potentiel d'oxydation du NO[•] vers des valeurs plus basses) grâce à l'effet catalytique du complexe et d'autre part, d'augmenter la sélectivité grâce au dépôt de la membrane de Nafion.

D'autres capteurs ont alors été développés en couplant les propriétés des différentes couches déposées, toujours en vue d'améliorer la sensibilité et la sélectivité des électrodes vis-à-vis du NO[•]. Une partie de ces systèmes sont résumés dans le Tableau 5 [203].

Dans l'ensemble, le paramètre principal influençant la sensibilité du film pour le monoxyde d'azote concerne les interactions hydrophobes qui permettent alors le passage de cette petite molécule hydrophobe qu'est NO[•] à travers la membrane pour qu'elle soit détectée à la surface de l'électrode.

Type de capteur	Dimensions (diamètre/longueur)	Domaine de linéarité (mM)	Sensibilité au NO [•] (nA.mM ⁻¹)	Ref
Fibre Au/Nafion	25 mm/0,5–1 mm	10-100	0,8	[207]
Fibre C/Nafion/o-PD	8 mm/0,8 mm	0,02-0,2	9,6	[209]
Fibre C/ Nafion/(m-PD+resorcinol)	8 mm/0,8 mm	0,04-0,2	4,9	[209]
Disque Au/NiTHMPP/Nafion	12,5 mm	46-100	0,16	[207]
Fibre C/NiTHMPP/Nafion	8 mm/1 mm	0,01-0,05	6.10 ⁻³	[210]
Fibre C/ NiTHMPP/Nafion	8 mm/0,8 mm	0,04-0,2	14,5	[209]
Fibre C/NiTHMPP/Nafion/o-PD	8 mm/0,8 mm	0,04-0,2	11,3	[209]
Fibre C/NiTSPc/Nafion	8 mm/1 mm	0,01-0,3	3,6.10 ⁻⁴	[211]
Fibre C/NiTSPc/Nafion	8 mm/1 mm	0,1-0,5	11,1	[212]
Disque Pt-Ir/NiTSPc/Nafion	250 mm	2-10	0,12	[213]
Disque SPCE/NiTSPC/Nafion	1 mm	0,4-1,2	103	[214]
Disque C/NiTSPc/Nafion	1 mm	0,1-3,6	2,93	[215]
Disque Pt-Ir/NiTSPc/Nafion/o-PD	250 mm	0,6-2,5	60	[216]
Réseau disques Au/polyeugénol/polyphénol	110 disques de 50 µm chacun	0,1-6	0,56	[217]

Tableau 5 Exemples de capteurs électrochimiques pour la détection du NO[•] résumant leurs dimensions, domaine de linéarité et sensibilité. o-PD : ortho-phénylènediamine. mPD : meta-phénylènediamine. NiMTHMPP : tétrahydroxyl-methoxyphényl porphyrine de nickel. NiTSPc : ion phtalocyanine tétrasulfonate nickelate II. Pt/Ir : alliage à 90% de platine et 10% d'iridium. SPCE : électrode de carbone imprimée par sérigraphie. D'après [203].

En conclusion, tous les capteurs développés présentent des propriétés différentes permettant diverses utilisations en fonction de la taille et de la géométrie du système d'étude, de même qu'en fonction des besoins en sensibilité exigés.

c. Autres techniques d'analyses

i. Résonance paramagnétique électronique

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est une technique de spectroscopie permettant la détection d'espèces paramagnétiques telles que les radicaux libres. Par analogie avec la résonance magnétique nucléaire où les spins nucléaires sont excités sous champ magnétique, en RPE ce sont les spins électroniques qui sont excités par une onde électromagnétique, entraînant l'absorption d'un quantum d'énergie. Le retour à l'état fondamental de ces spins se traduit par réémission de l'énergie absorbée et informe sur la présence d'électrons non appariés dans un échantillon.

Cette technique est largement utilisée pour la détection de ROS et RNS (surtout radicalaires) mais présente cependant encore de nombreux inconvénients. Parmi eux, une sensibilité limitée (de l'ordre de 100 nM) et souvent un temps de vie des ROS/RNS trop court pour permettre une analyse cinétique pertinente [218]. De façon à piéger ces espèces réactives, des composés à fonction nitro ou nitroso, dits *spins traps*, existent et permettent la formation de radicaux nitroxyde plus stables que le radical de base [219], [220].

Par ailleurs, d'autres techniques existent pour piéger des espèces instables comme le *stopped-flow* ou le *rapid freeze quench*. Dans un premier temps, le *stopped-flow* permet un mélange rapide (ms) de deux solutions et une analyse en spectroscopie permet la détermination de changements, résolus cinétiquement, de composition de la solution. De manière complémentaire, la technique de

freeze quench permet l'étude de cinétiques complètes ou de piéger des intermédiaires réactionnels par un extrême refroidissement de la solution (-130°C). Couplées à la RPE, ces techniques permettent l'étude de protéines ou d'enzymes possédant un centre réactionnel métallique, tels que les NOS.

ii. Au-delà des ROS et RNS...

Différentes techniques spectroscopiques peuvent apporter d'autres informations quant à l'étude de métallo-enzymes par analyse des états énergétiques du centre réactionnel. Notamment, les spectroscopies Raman et infrarouge peuvent être combinées pour déterminer la structure et l'environnement du centre réactionnel de la protéine [221]. En effet, bien que ces deux techniques soient basées sur l'étude des modes vibrationnels d'une molécule, elles fournissent des informations complémentaires puisque certains modes ne sont actifs que dans l'une ou l'autre des techniques.

Il existe de nombreuses techniques de détection des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote telles que la spectroscopie ou microscopie de fluorescence, l'électrochimie ou la résonance paramagnétique électronique. Cependant, face à la multiplicité des signaux pouvant résulter de la complexité de certains systèmes, comme l'étude des mécanismes réactionnels des NO-Synthases, le couplage entre diverses techniques s'avère indispensable.

III. Objectifs du projet de thèse

Dans le but d'apporter de nouveaux éléments à l'analyse de différentes réactions enzymatiques, le projet de cette thèse porte sur le développement d'un microréacteur biomimétique pour l'analyse *in situ* des produits de ces activités grâce au couplage de l'électrochimie et de la microscopie de fluorescence.

L'intérêt de la technique développée ici est notamment la caractérisation d'enzymes produisant des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, qui sont, pour la plupart, instables. Dans un système micrométrique où une analyse *in situ* directe peut être réalisée, le temps de vie de ces espèces est en adéquation avec leur temps de diffusion et de détection. Une activité et une cinétique enzymatique peuvent alors être déterminées, *a priori*, de façon quantitative.

Le projet présenté ici s'articule autour de trois principaux axes qui constitueront les trois prochains chapitres de ce manuscrit, avec, tout d'abord, l'obtention d'un microréacteur biomimétique, puis la modification du milieu interne pour le déclenchement contrôlé de la réaction enzymatique et enfin, la détection des espèces produites.

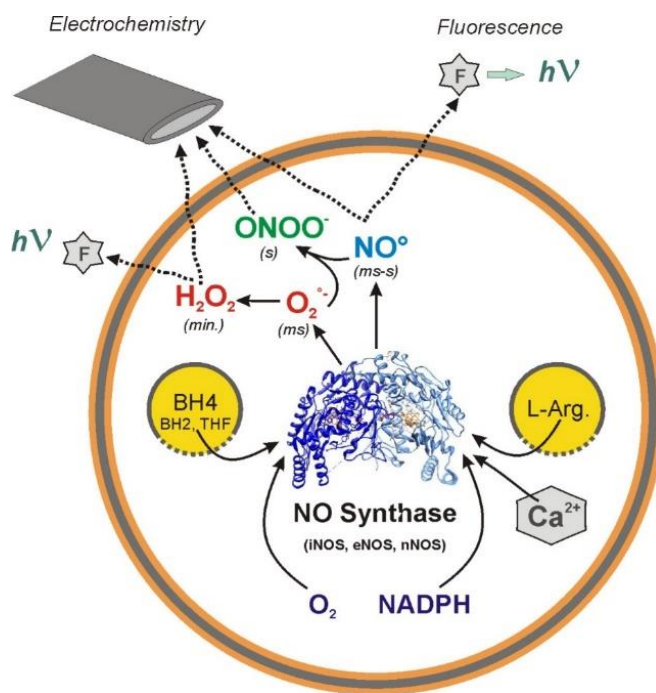


Figure 52 Représentation schématique résumant le projet présenté dans ce manuscrit.

Dans la première partie, nous nous intéresserons aux vésicules unilamellaires géantes (GUVs) en tant que microréacteurs biomimétiques et aux différentes techniques utilisées pour les former. Tout d'abord, nous nous intéresserons principalement à la technique la plus couramment utilisée pour l'obtention des GUVs, c'est-à-dire l'électroformation. Nous insisterons sur le protocole de formation en conditions physiologiques de différentes compositions de membrane. Ensuite, nous verrons que d'autres techniques, ne nécessitant pas l'utilisation d'un champ électrique, peuvent être utilisées pour obtenir des GUVs en tampon physiologique. L'une d'entre elles permet l'obtention de vésicules connectées à un réservoir de lipides, qui s'avèrera d'une grande utilité pour le développement de la technique suivante.

Dans une seconde partie, nous mettrons en place des moyens de modifier le milieu interne du microréacteur dans le but de déclencher la réaction enzymatique de façon contrôlée. Dans un premier temps, l'encapsulation d'espèces au sein du microréacteur au cours de sa formation sera réalisée. Ensuite, l'apport de réactifs au sein de la GUV sera contrôlé par microinjection assistée par électroporation. Les propriétés de perméabilité des membranes seront également exploitées pour fournir un apport continu de réactifs au sein du microréacteur. Enfin, une élégante technique de micromanipulation nous permettra de former un réseau de vésicules connectées par des nanotubes de lipides, dont les propriétés thermodynamiques pourront permettre un déclenchement quasi-instantané de la réaction.

Enfin, dans la dernière partie, nous chercherons à détecter *in situ* différentes espèces produites par des réactions enzymatiques. En fonction des espèces que l'on voudra analyser, nous opterons pour l'électrochimie et/ou la microscopie de fluorescence. L'analyse par électrochimie permet de sonder des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote telles que le monoxyde d'azote NO[•] ou le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, ainsi que les nitrites NO₂⁻. L'utilisation d'ultramicroélectrodes de 10 µm de diamètre nous permettra une analyse *in situ* d'une grande précision et ce, pour des gammes de concentrations allant du nanomolaire au millimolaire. La production de peroxyde d'hydrogène peut également être suivie par microscopie de fluorescence grâce à la sonde Amplex Red.

Chapitre 2 : Formation d'un microréacteur biomimétique

Chapitre 2 : Formation d'un microréacteur biomimétique

Le chapitre 2 de ce manuscrit se concentre sur la formation des structures qui serviront par la suite de microréacteurs biomimétiques pour l'étude d'activités enzymatiques. Comme introduit dans le chapitre 1, ce sont des vésicules unilamellaires géantes (GUVs) phospholipidiques qui joueront ce rôle car elles représentent un modèle simple de « cellules » synthétiques. Historiquement, une des premières méthodes de préparation des vésicules géantes a été décrite par Reeves et Dowden en 1969 [222]. Le gonflement des GUVs est obtenu par hydratation douce d'un film de lipides. Une quinzaine d'années plus tard, l'électroformation de GUVs a été mise au point par Angelova et Dimitrov, qui ont alors appliqué un champ électrique dans le milieu pour obtenir un meilleur rendement de liposomes unilamellaires [223]. Cette technique est devenue par la suite une méthode de choix pour la préparation des GUVs et a été peu à peu adaptée à différents milieux d'hydratation.

Le premier challenge d'un système biomimétique est de se placer en conditions physiologiques, en particulier quant à la physico-chimie du milieu environnant. Bien que de nombreuses techniques existent pour la formation de liposomes géants, la plupart ont été établies en conditions aqueuses de faible force ionique. Dans ce manuscrit, trois techniques sont comparées pour la formation des GUVs en conditions physiologiques : l'électroformation, l'hydratation de gel polymère et enfin la déshydratation-réhydratation.

I. L'électroformation

1. Principe

Les premiers essais de formation de liposomes géants unilamellaires avaient pour principe d'hydrater, de façon contrôlée, un film de lipides déposé sur une surface solide. Ce film est obtenu par exemple après séchage d'une solution de lécithine de jaune d'œuf (Egg PC) dispersée dans un mélange chloroforme/méthanol [222]. Le papier de Reeves et Dowden a décrit le protocole de formation des vésicules de façon très détaillée car, déjà, la précision de chaque détail expérimental avait été déterminée comme essentielle à la réussite de l'obtention des GUVs. Si un de ces détails n'est pas respecté, le risque principal est d'aboutir à la formation de vésicules multilamellaires (MLVs). Ils décrivent alors quelques aspects thermodynamiques et notifient que si des MLVs ont été formées par hydratation douce, il ne sera pas possible de convertir ces MLVs en GUVs, puisque cela implique de rompre la structure en oignon des MLVs. Ceci nécessitant beaucoup d'énergie, cette conversion de MLVs en GUVs est donc thermodynamiquement défavorable. Dans le cas d'un apport énergétique extérieur tel que la sonication, les MLVs rompent mais cela conduit uniquement à la formation de SUVs nanométriques et non à la formation de GUVs micrométriques. Cette méthode s'est montrée notamment adaptée pour des membranes composées de lipides chargés [224] et doit être réalisée à une température supérieure à la température de transition T_m (passage d'un état gel à un état fluide) des lipides utilisés. L'optimisation du protocole a, par la suite, permis l'emploi de lipides zwitterioniques à condition que le milieu de réhydratation contiennent des monosaccharides non électrolytiques (glucose, sucrose ou fructose) [224]. La présence de ces molécules neutres crée une différence osmotique, augmente l'espace entre deux bicouches et permet ainsi aux molécules d'eau de pénétrer plus facilement au cours du gonflement. Bien que des protocoles utilisant la réhydratation douce soient décrits pour des milieux de force ionique plus élevée (environ 150 mM), la présence de monosaccharides ou de lipides chargés est indispensable à l'obtention de GUVs [224].

L'électroformation, mise au point pour la première fois par Angelova et Dimitrov en 1986 permet la formation de vésicules avec des lipides neutres et repose sur les mêmes principes biophysiques que l'hydratation douce, mais assistée par une onde électrique [223]. Cette technique consiste à appliquer un champ électrique aux bornes de deux électrodes recouvertes d'un film de phospholipides et connectées entre elles par une solution aqueuse permettant l'hydratation et le gonflement des liposomes. Les trois étapes de l'électroformation sont décrites sur la Figure 53 [225]. Il s'agit, tout d'abord, de faire un dépôt sur une électrode à partir d'une solution de phospholipides dispersés dans un solvant organique, le plus souvent du chloroforme ou un mélange chloroforme-méthanol. Le méthanol étant plus hydrophile que le chloroforme, le choix du solvant dépend alors de la structure des lipides et de l'hydrophobicité du substrat employé [226]. Les électrodes utilisées pour l'électroformation sont de plusieurs types : d'une part, des lames de verre recouvertes par un dépôt semi-conducteur d'oxydes d'indium et d'étain (ITO ; $\text{In}_2\text{O}_3 \text{ SnO}_2$), ou d'autre part, des fils ou lamelles de platine (voir paragraphe I.2.a.i). L'ITO présente comme inconvénient une oxydation prématurée des phospholipides et une instabilité mécanique sous champ élevé, mais a l'avantage d'être semi-transparent et facilite donc des observations *in situ* en microscopie. La seconde étape consiste à évaporer le solvant organique par séchage, ce qui conduit à la formation d'un film de lipides. Dans la dernière étape, il s'agit d'ajouter la solution d'hydratation et à appliquer un champ électrique alternatif entre les deux électrodes séparées par cette solution, formant ainsi la chambre d'électroformation.

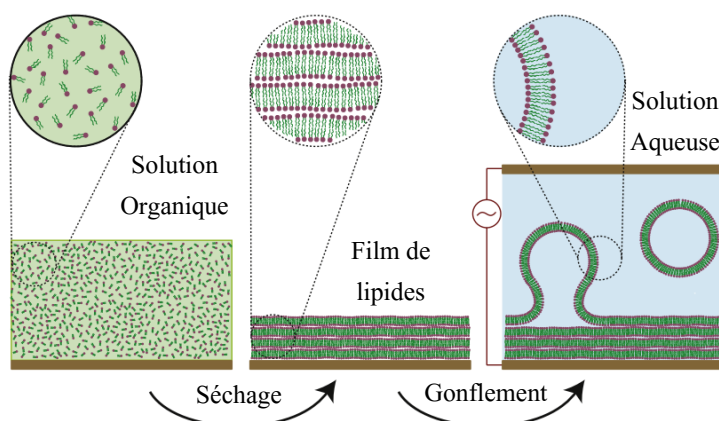


Figure 53 Représentation schématisée des trois étapes principales de l'électroformation: tout d'abord la dissolution des phospholipides dans un solvant organique volatil ; puis l'évaporation du solvant et la formation d'un film ordonné de lipides sur la surface de l'électrode ; et enfin, le gonflement du film avec une solution aqueuse sous champ électrique alternatif conduisant à la formation de GUVs. Adaptée de [225].

Les vésicules obtenues par électroformation gonflent à partir du film de lipides et restent souvent attachées à ce film par une connexion lipidique ou un « pied », ce qui peut être considéré comme gênant ou au contraire comme un avantage. En effet, dans le cas d'expérience de micromanipulation et microinjection, l'immobilisation des vésicules à la surface de l'électrode grâce à cette connexion apparaît comme un net avantage [227]. Ces aspects seront développés dans le chapitre 3 de ce manuscrit.

L'électroformation décrite par Angelova et Dimitrov s'est imposée comme technique de choix pour la formation de GUVs grâce à sa simplicité de mise en œuvre, mais elle se limitait initialement à des milieux de faible force ionique. Le protocole d'électroformation devait être appliqué

dans l'eau ou dans une solution de sucrose et consiste à appliquer un champ électrique alternatif de 670 V.m^{-1} à une fréquence de 10 Hz pendant une dizaine de minutes. Cela conduit à la formation d'un grand nombre de GUVs sur toute la surface de l'électrode (Figure 54). Les vésicules peuvent ensuite être détachées du film, récupérées et transférées dans un milieu de même force osmotique. La formation de vésicules en milieu sucrose permet, après transfert dans une solution de glucose, de les faire sédimenter grâce à une différence de densité ($d_{\text{sucrose}} = 1,59$ et $d_{\text{glucose}} = 1,54$) et de faciliter leur observation en microscopie grâce à une différence d'indice de réfraction (Figure 55).

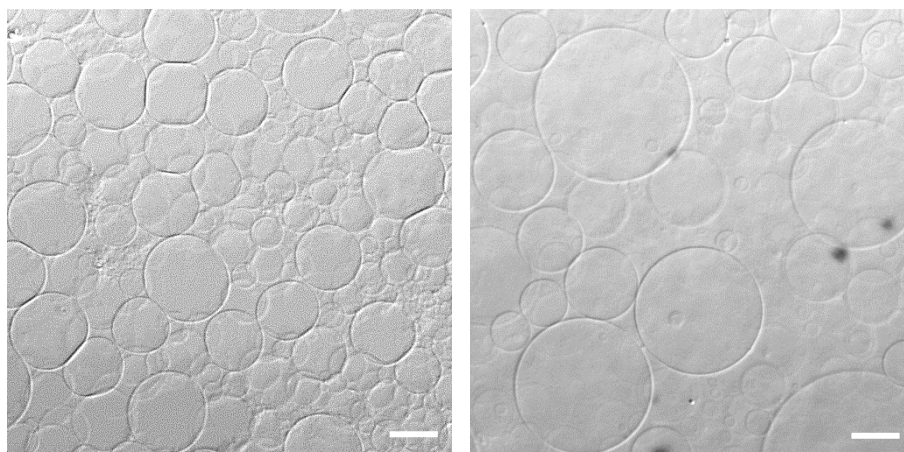


Figure 54 Images obtenues par microscopie confocale de GUVs électroformées dans H_2O sur lames recouvertes d'ITO. Illumination en contraste interférentiel. Bar d'échelle = $25 \mu\text{m}$.

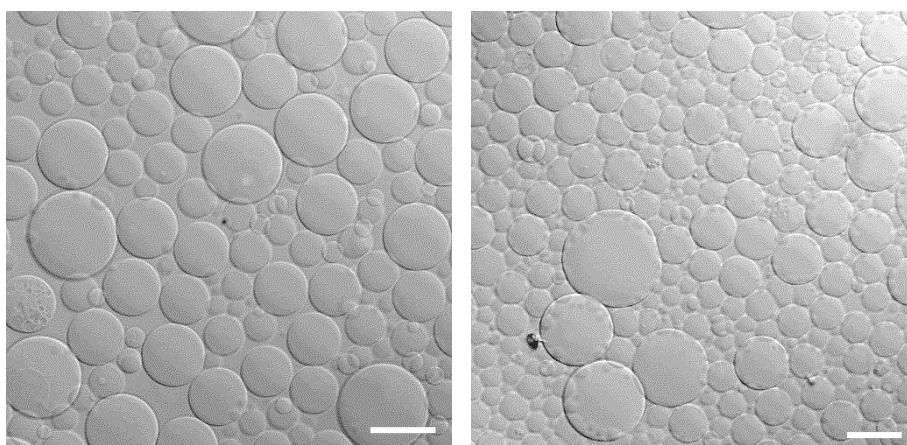


Figure 55 Images obtenues par microscopie confocale de GUVs électroformées dans une solution de sucrose (200 mM) puis transférées et sédimentées dans du glucose (200 mM). Illumination en contraste interférentiel. Bar d'échelle = $50 \mu\text{m}$.

Cependant, dans le but d'utiliser les liposomes géants comme structure de base pour des cellules artificielles, des équipes, dont la nôtre, ont ensuite travaillé au développement d'un protocole en conditions physiologiques pour se rapprocher au plus près d'un système biomimétique.

2. Electroformation en conditions physiologiques

Notre équipe s'est inspirée des quelques protocoles déjà disponibles dans la littérature et les a adaptés afin d'obtenir un protocole unique permettant l'obtention de GUVs en tampon phosphate salin (PBS) à pH 7,4 applicable sur tout support d'électrode et pour différentes compositions de membrane.

a. Conditions expérimentales

i. Supports d'électrodes

Les deux principaux supports d'électrodes utilisés en électroformation sont des lames de microscopie recouverte d'un dépôt d'ITO ou des fils (ou lamelles) de platine. Dans le cas d'une configuration avec des lames d'ITO, les deux côtés conducteurs de deux lames sont positionnés l'un en face de l'autre et sont séparés par un élément en téflon. L'ensemble sert de chambre d'électroformation. Chaque lame est connectée à un fil, lui-même connecté au générateur électrique (Figure 56). Le champ électrique est donc appliqué de manière longitudinale au plan d'observation des vésicules et les électrodes étant transparentes, l'observation peut se faire directement au travers (Figure 57).

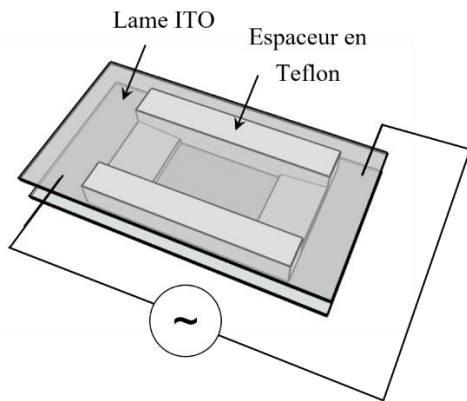


Figure 56 Représentation schématique de la chambre d'électroformation utilisant des lames recouvertes d'un dépôt d'ITO comme support d'électrode.

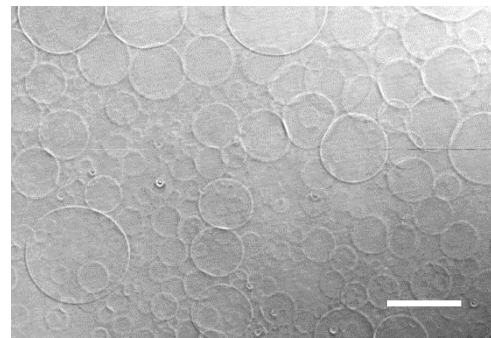


Figure 57 Image de microscopie confocale de GUVs électroformées sur lame ITO. Illumination en contraste interdifférentiel. Bar d'échelle = 50 μm .

Dans la seconde configuration, des fils (ou lamelles) de platine sont positionnées de façon parallèle dans un support en téflon, lui-même fixé sur une lame de microscopie (Figure 58). Le champ électrique est alors appliqué de manière transversale au plan d'observation des vésicules et celles-ci ne sont plus observées par le dessus ou dessous mais par le côté (Figure 59). Cette configuration a l'avantage de permettre le suivi de l'évolution du film de lipides et les différents états transitoires des vésicules jusqu'à ce qu'elles atteignent leurs structure et taille finales. La première observation correspond au gonflement du film de lipides, suivi par la formation de petites vésicules qui finissent par fusionner entre elles jusqu'à former une vésicule géante. Nos observations sont en accord avec les phénomènes décrits dans la littérature [228].

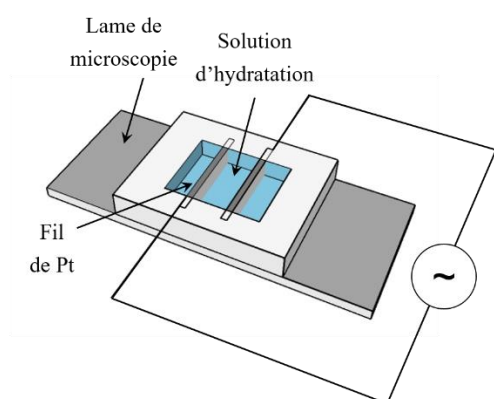


Figure 58 Représentation schématique de la chambre d'électroformation utilisant des fils (ou lamelles) de platine comme support d'électrode.

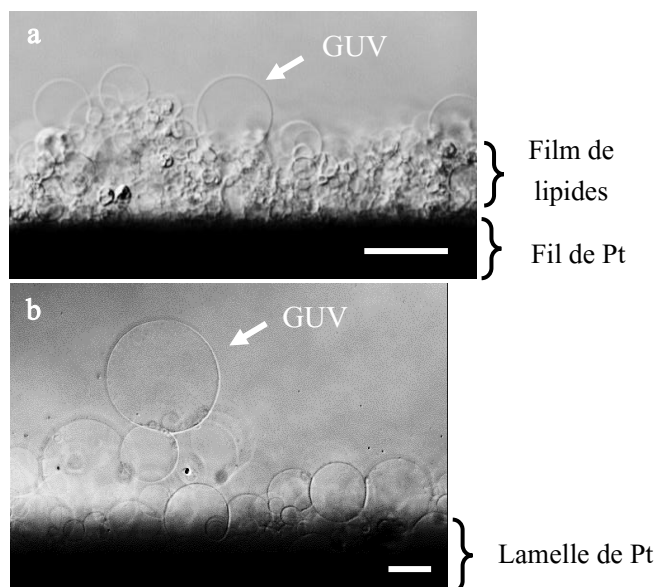
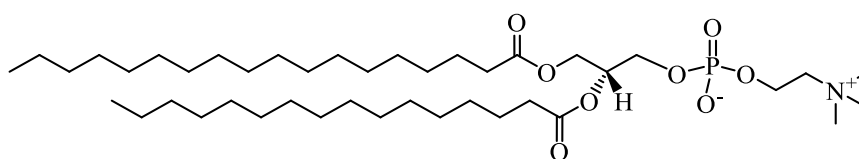


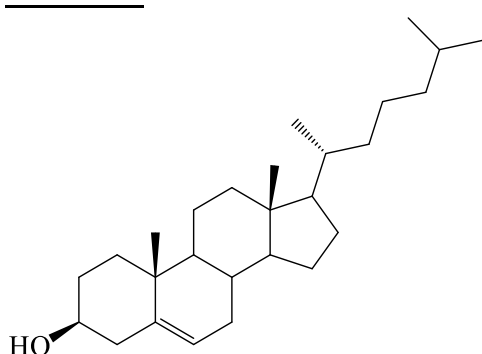
Figure 59 Images obtenues par microscopie confocale de GUVs électroformées sur fils de platine (a) et sur lamelles de platine (b). Illumination en contraste interférentiel. Bar d'échelle = 50 μm .

ii. Compositions de membrane

Les lipides composant la membrane des GUVs électroformées en milieu physiologique ont été choisis sur les conseils de Dimova *et al.*, avec d'une part, un extrait naturel issu du jaune d'œuf (communément dénommé Egg PC) composé d'un mélange de L- α -phosphatidylcholines dont les longueurs de chaîne et le nombre d'insaturations varient ; et d'autre part du cholestérol. Ce mélange de phospholipides se rapproche de la composition naturelle des membranes cellulaires puisqu'elles comptent environ 30 mol.% de phosphatidylcholine. De plus, l'addition de cholestérol en proportions variables allant de 0 à 60 mol.% permet de moduler la rigidité (fluidité) de la membrane. Enfin, un fluorophore conjugué à un phospholipide (DiD) peut être ajouté (0,1 mol.%) pour marquer la membrane et réaliser des observations en microscopie de fluorescence (Figure 60).

Phosphatidylcholine de jaune d'œuf (Egg PC)

x:y	wt. %
14:0	0,2%
16:0	32,7%
16:1	1,1%
18:0	12,3%
18:1	32,0%
18:2	17,1%
20:2	0,2%
20:3	0,3%
20:4	2,7%
22:6	0,4%
Inconnu	1,0%

CholestérolDiD

1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tétraméthylindodi-carbocyanine perchlorate

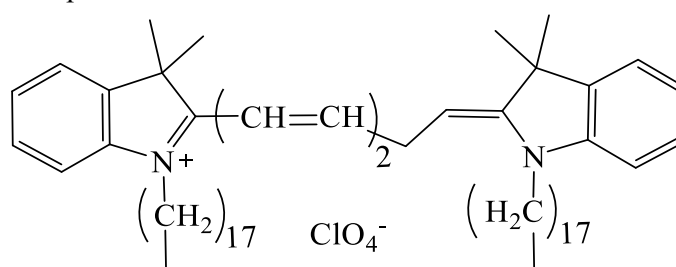


Figure 60 Lipides utilisés en proportions variables lors des expériences d'électroformation en tampon PBS. La structure de la phosphatidylcholine correspond à la 1-octadécanoyl-2-hexadécanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (SPPC – 16:0-14:0). La composition reportée en pourcentage massique est celle donnée par le fournisseur (Avanti Polar, 840051). La notation x:y signifie qu'il y a x atomes de carbone dans la chaîne et y insaturation(s). Le cholestérol est ajouté à l'Egg PC en proportions variables allant de 0 à 60 mol.%. Le marqueur fluorescent DiD est ajouté à hauteur de 0,1 mol.%.

b. Mise en place du protocole

Le premier protocole d'électroformation dans un milieu de force ionique élevée, mis au point par l'équipe de Pott et Méléard [229] et transmis à l'équipe de Bagatolli, a été décrit dans la littérature en 2007 [230]. Un autre protocole avait été décrit deux ans plus tôt mais l'électroformation n'était pas faite directement en solution saline [231]. Les vésicules avaient d'abord été électroformées sur des lames d'ITO avec une solution de glycérol. Une solution saline (KCl 2 M) était ensuite infusée dans la chambre d'électroformation et le glycérol était alors lentement remplacé par cette solution à l'aide d'une pompe péristaltique. L'échange des molécules de glycérol et des ions à l'intérieur des GUVs était suivi par microscopie grâce à une différence d'indice de réfraction entre les deux solutions.

Dans le cas du protocole décrit par Bagatolli *et al.* [230], la tension et la fréquence du champ électrique ont été modifiées pour rendre possible le gonflement direct de liposomes en solution saline (HEPES 25mM, NaCl 150mM - pH 7,2). La fréquence du champ électrique alternatif est maintenant fixée à 500 Hz au lieu des 10 Hz utilisés pour le protocole de formation dans les milieux de faible

force ionique. Quant à l'amplitude du champ électrique, trois étapes sont nécessaires : une première étape à 35 V.m^{-1} pendant 5 min, puis à 313 V.m^{-1} pendant 20 min et enfin à 870 V.m^{-1} pendant 90 min. Ce protocole est adapté de celui de Pott *et al.* qui ne publie le sien pourtant qu'un an après [229]. La fréquence reste fixée à 500 Hz mais l'amplitude des champs électriques appliqués, de même que le support d'électrode sont différents (fils de platine pour Pott et lames ITO pour Bagatolli). Dans leur papier, Pott *et al.* ont décrit l'importance d'une séquence dans laquelle l'amplitude du champ électrique doit être croissante au cours du temps. La première phase où l'amplitude augmente permet le gonflement du film de lipides et des premières vésicules commencent à apparaître. Une seconde phase de croissance où les premières petites vésicules fusionnent pour en former de plus grosses est ensuite nécessaire (Figure 61).

Le mécanisme permettant le gonflement de GUVs sous champs électrique alternatif n'a pas encore été entièrement élucidé, mais il est clair que les deux processus moteurs de cette technique sont les forces osmotiques et électrostatiques [223], [232], [233]. D'autres forces, tantôt attractives, tantôt répulsives entre deux bicouches, telles que les interactions de Van der Waals, les forces d'ondulation d'Helfrich [234] ou la pression dynamique de résistance aux mouvements sont cependant reportées mais ne dominent probablement pas le processus [232]. Ces différentes forces sont liées aux interactions entre dipôles, aux forces de viscosité ou d'inertie ou encore à des effets de perméabilité des membranes. L'effet des interactions électrostatiques entre le champ électrique et les bicouches commence par de premières observations. Angelova et Dimitrov ont montré en 1987 que les vésicules en croissance vibrent en résonance avec la fréquence du champ électrique appliqué [235] ; puis un an plus tard, ils ont mis en évidence que l'électroformation à partir de lipides chargés n'est efficace que sur l'électrode de même charge que les lipides. De plus, ils évoquent que dans le cas de lipides zwitterioniques, les contre-ions sont attirés vers l'électrode et se placent dans la double couche de Stern ; la redistribution des contre-ions de lipides zwitterioniques a donc un effet significatif sur le processus de formation des vésicules [232]. A partir de ces observations, la théorie de l'électroosmose a été proposée [233], [236]. Le champ électrique serait alors responsable d'une agitation mécanique douce permettant d'assister les phénomènes d'osmoses déjà explicités, et donc la formation, puis fusion et détachement des vésicules. Ce mouvement d'électroosmose est décrit comme perpendiculaire au film de lipides [236] (Figure 61 a).

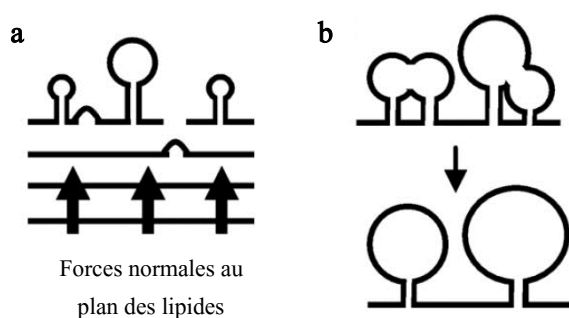


Figure 61 Représentation schématique illustrant les étapes de la formation de vésicules géantes. (a) Croissance des petites vésicules par pénétration de molécules d'eau entre deux bicouches de lipides. Le flux contrôlé par électro-osmose est dirigé de façon normale au plan des lipides [232], [236]. (b) Fusion des premiers liposomes due à l'encombrement et à des forces mécaniques, conduisant à la formation des GUVs. Adaptée de [257].

Le Tableau 6 résume les différents protocoles issus de la littérature qui sont comparés à celui mis en place au cours de ce projet. La procédure expérimentale complète est décrite en détails en annexe de ce manuscrit (Annexe II.1).

	Séquence électrique	Conditions expérimentales	Ref
Pott <i>et al.</i>	- 50-1300 V.m⁻¹, 500 Hz, 30 min - 1300 V.m⁻¹, 500 Hz, 90 min - 1300 V.m⁻¹, 500-50 Hz, 30-60 min	- Lipides : SOPC - Electrodes : fils de Pt - Milieu : tampon Tris 10 mM pH 7,4 + NaCl 100-250 mM	[229]
Bagatolli <i>et al.</i>	- 35V.m⁻¹, 500 Hz, 5 min - 313 V.m⁻¹, 500 Hz, 20 min - 870 V.m⁻¹, 500 Hz, 90 min	- Lipides : DOPC : DPPC (3:2) ou DOPC : DPPC : CHS (4:4:2) - Electrodes : lames d'ITO - Milieu : tampon Tris 10 mM pH 7,4 + NaCl 100-250 mM	[230]
Pavlic <i>et al.</i>	- 250-333 V.m⁻¹, 10 Hz, 5 min - 500-667 V.m⁻¹, 10 Hz, 5 min - 750-1000 V.m⁻¹, 10 Hz, 135 min	- Lipides : SOPC - Electrodes : fils de Pt - Milieu : tampon phosphates 10 mM pH 7,4 + NaCl 137 mM + KCl 3 mM	[237]
Lefrançois <i>et al.</i>	- 260 V.m⁻¹, 500 Hz, 5 min - 670 V.m⁻¹, 500 Hz, 5 min - 1000 V.m⁻¹, 500 Hz, 15 min - 1330 V.m⁻¹, 500 Hz, 30 min - 1670 V.m⁻¹, 500 Hz, 8h	- Lipides : Egg PC ou Egg PC : CHS (différents ratio) - Electrodes : fils et lames de Pt et lames ITO - Milieu : tampon phosphates 10 mM pH 7,4 + NaCl 137 mM + KCl 3 mM	[238]

Tableau 6 Résumé des différents protocoles d'électroformation en milieu de force ionique élevée disponibles dans la littérature

La séquence électrique établie permet l'électroformation de GUVs à la fois sur lames ITO et sur électrodes de platine dans un tampon phosphate pH 7,4 de force ionique équivalente aux conditions physiologiques (150 mM de sels monovalents au total, soit 300 mOsm). Cette séquence a été optimisée à partir des séquences existantes et comprend une phase d'environ 1 heure durant laquelle l'amplitude du champ électrique augmente régulièrement, puis une phase de gonflement à amplitude fixée à 1670 V.m⁻¹ durant 8 à 10h. Sur la Figure 62 sont présentées les images réalisées en microscopie confocale des vésicules électroformées sur des lames d'ITO pour des compositions variables d'Egg PC et de cholestérol.

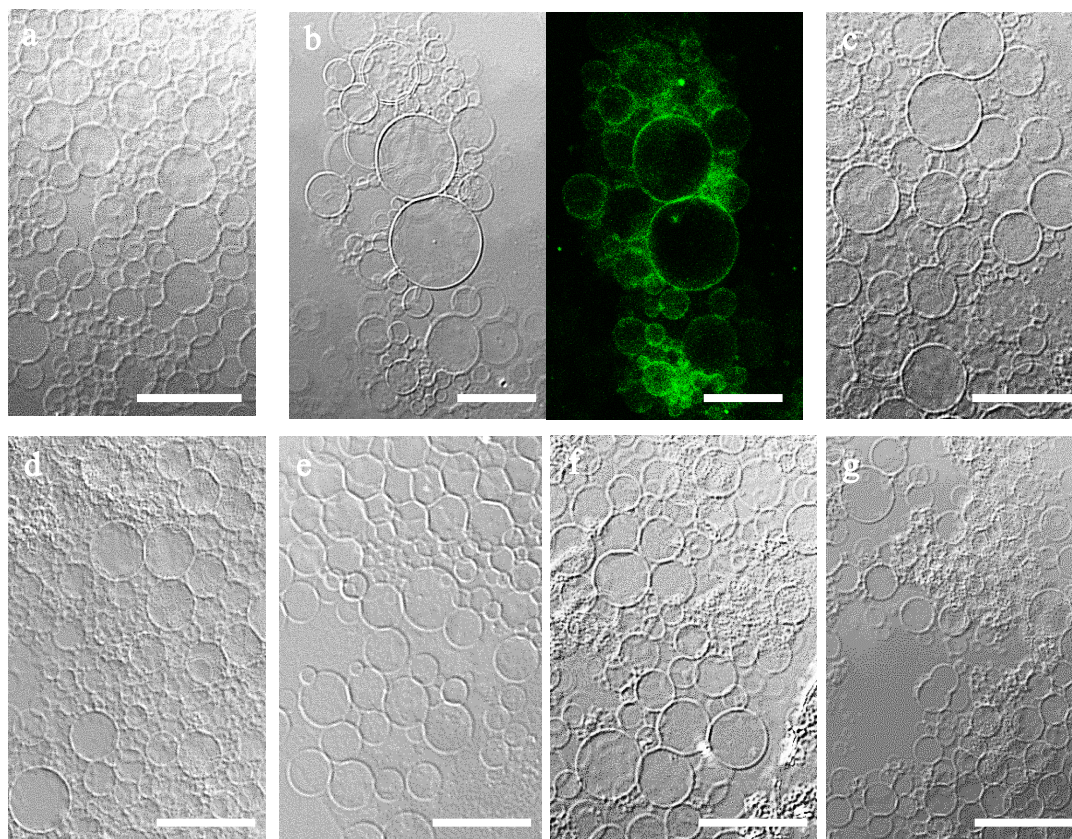


Figure 62 Images obtenues par microscopie confocale de GUVs électroformées sur lames d'ITO pour des compositions variables en Egg PC : cholestérol. (a) Egg PC seul. (b) Ratio 9:1, illumination en contraste interdifférentiel à gauche et fluorescence émise à droite. (c) Ratio 4:1. (d) Ratio 7:3. (e) Ratio 3:2. (f) Ratio 1:1. (g) Ratio 2:3. Bar d'échelle = 50 μm .

Les vésicules obtenues ont un diamètre compris entre 10 et 100 μm . La polydispersité des tailles est un phénomène inhérent à l'électroformation. Les vésicules les plus volumineuses sont situées le plus loin de la surface de l'électrode, c'est-à-dire au-dessus du film de lipides. Ceci se comprend facilement puisque lorsque les molécules d'eau commencent à s'intercaler entre les bicouches compactes de phospholipides, ce sont d'abord les premières couches du film qui commencent à se détacher. Peu à peu les molécules d'eau pénètrent le film de lipides plus en profondeur, créant un gradient de tailles des vésicules dans l'épaisseur du film de lipides.

Par ailleurs, nous avons montré que ce protocole permet l'électroformation des GUVs contenant jusqu'à 60 mol.% de cholestérol. Cette observation est en accord avec la limite de solubilité de ce dernier dans la phosphatidylcholine reportée à 66 mol.% [239]. Au-delà, le cholestérol précipite et forme des cristaux de cholestérol monohydraté pur (Figure 63). Bien que quelques vésicules soient visibles, elles sont peu nombreuses et de diamètres inférieurs à 20 μm .



Figure 63 Image obtenue par microscopie confocale mettant en évidence la formation de cristaux de cholestérol après électroformation d'un mélange de lipides contenant 30 mol.% d'Egg PC et 70 mol.% de cholestérol. Cette observation est en accord avec la limite de solubilité du cholestérol dans la phosphatidylcholine de 66 mol.% [239]. Illumination en contraste interdifférentiel. Bar d'échelle = 50 μm

En parallèle de nos travaux, d'autres équipes ont également développé d'autres protocoles d'électroformation en solution de force ionique élevée. C'est notamment le cas de M. Breton *et al.* qui ont établi un protocole d'électroformation sur lames d'ITO (distance inter-électrode = 1,5 mm) et en tampon PBS contenant du sucrose (sucrose 240 mM, NaCl 1 mM, $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 1 mM, pH 7,4) [240]. Trois lipides sont utilisés : le DOPC (a), le DLPC (b) (1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine) et le DHAPC (c) (1,2-Didocosaheptaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). L'amplitude du champ électrique a été adaptée pour chaque lipid. Leur protocole est présenté sur la Figure 64 :

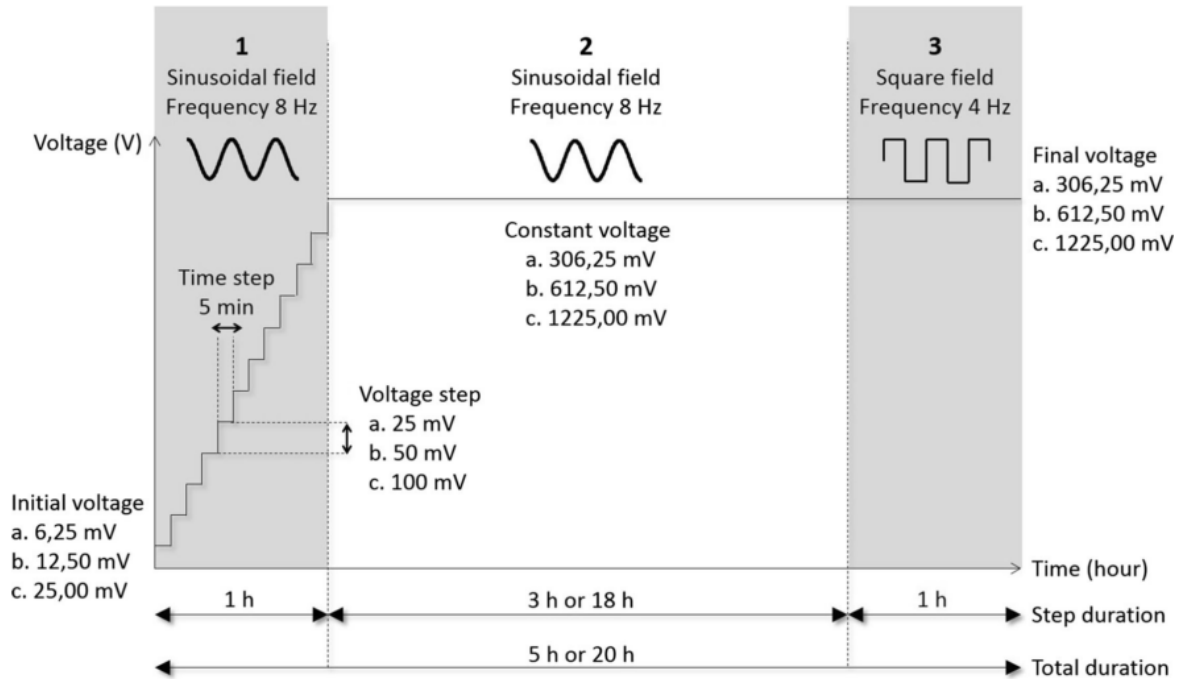


Figure 64 Représentation schématique du protocole d'électroformation en conditions salines proposé par Breton et al. [240].

La seconde étape du protocole a été effectuée pour deux durées différentes (3 h ou 18 h) car cette étude se concentre sur l'effet du champ électrique sur l'oxydation des phospholipides. Les auteurs ont mis en évidence que l'exposition des lipides à un champ électrique trop intense ou pendant un trop prolongé conduisait à leur oxydation ayant pour principal effet de réduire le diamètre des vésicules (entre 25 et 40% de lipides oxydés) voire de les faire éclater (> 40% de lipides oxydés).

Par ailleurs, Q. Li *et al.* ont mis au point un protocole d'électroformation sur lame d'ITO avec du DOPC et en PBS (KH_2PO_4 5 mM, Na_2HPO_4 5 mM, NaCl 150 mM, pH = 7,4) au cours duquel le champ électrique est fixé à 833 V.m^{-1} , 1 kHz pendant 2h à 45°C . Ils ont obtenu un grand nombre de vésicules géantes, à 95% unilamellaires. Ils se sont également intéressés à l'influence de quatre paramètres sur la formation des vésicules géantes pour différentes compositions de lipides et en solution saline (NaCl) : l'amplitude du champ électrique alternatif, la fréquence du champ, la concentration en NaCl et la température. Tout d'abord, il est reporté que lorsque l'amplitude du champ électrique est augmentée, il faut également augmenter la fréquence de celui-ci pour obtenir des vésicules (Figure 65).

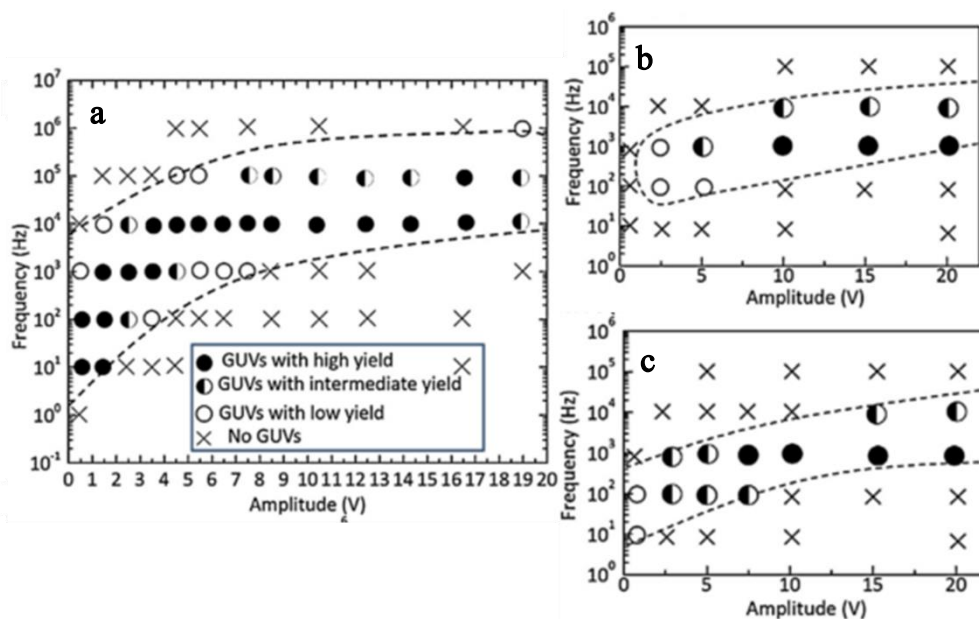


Figure 65 Diagrammes de phase de la fréquence en fonction de l'amplitude du champ électrique appliqué au cours de l'électroformation de GUVs dans NaCl 100 mM pour trois lipides : (a) DOPC, (b) DMPC, (c) DOPS. Les régions avec les croix représentent des zones où aucune vésicule n'a été formée tandis que les zones avec les cercles représentent les domaines où des GUVs ont été formées avec des rendements variables. La température est fixée à 45°C. [241].

Le champ électrique entre les deux électrodes a été simulé pour le protocole classique d'électroformation (5V, 10 Hz, pour une distance inter-électrode de 3 mm). Les auteurs expliquent qu'un champ électrique intense induit la formation d'une double couche électronique (couche de Stern) au niveau de l'électrode ce qui expliquerait pourquoi il est difficile de former des vésicules avec des lipides chargés dans ces conditions. Leur explication est cohérente avec les observations et hypothèses qu'Angelova et Dimitrov avaient formulées 30 ans plus tôt. Cependant, quand la fréquence du champ est élevée, des perturbations de la couche conduisent à une diminution de l'intensité locale du champ électrique à la surface de l'électrode [242]. Par ailleurs, à l'interface entre le film de lipides et la solution d'hydratation (NaCl 100 mM dans ce cas), le champ électrique provoquerait des fluctuations à l'origine de la formation des vésicules (électroosmose). Ces fluctuations seraient dues à une tension de surface négative et à la différence de potentiels appliquée entre les deux électrodes et sont, en première approximation, proportionnelles au carré de l'amplitude du champ électrique et inversement proportionnelles au carré de la fréquence du champ, à l'interface lipides/solution [243]. Ainsi, quand la fréquence augmente, les fluctuations de la membrane diminuent, ce qui, d'après les auteurs, expliquerait pourquoi aucune vésicule ne soit formée au-delà d'une certaine fréquence (Figure 65).

Ensuite, c'est l'effet de la concentration en sels dans la solution d'hydratation qui est discuté. Ils ont mis en évidence qu'il existe une concentration en sels optimales permettant la formation de vésicules avec un diamètre maximal pour trois compositions de lipides (Figure 66). Les auteurs expliquent qu'il existerait une compétition entre une perturbation de la séparation des bicouches de phospholipides à cause d'un effet d'écrantage électrostatique en présence de sels [244] et une action synergétique entre les électrolytes qui augmenteraient la conductivité et les effets du champ électrique (tension de surface négative et différence de potentiels).

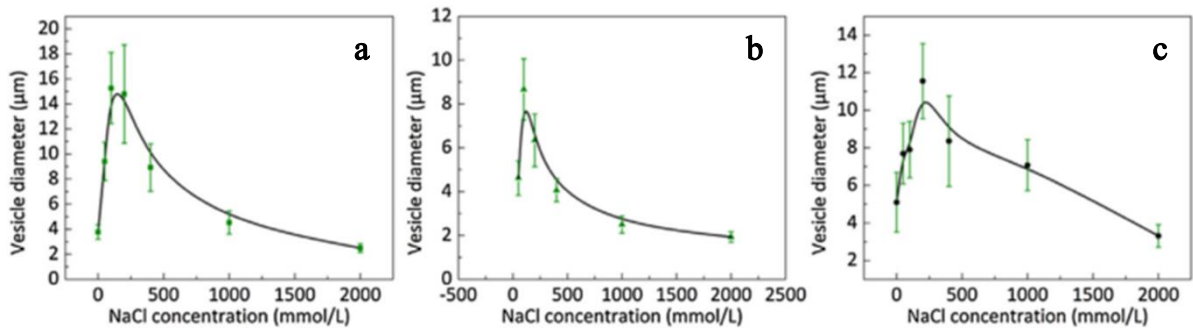


Figure 66 Evolution du diamètre de GUVs formées à partir de (a) DOPC, (b) DMPC (1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine) et (c) DOPS (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine) en fonction de la concentration en NaCl. L'amplitude du champ électrique alternative est fixée à 2,5 V (a,b) ou 10 V (c) et la fréquence à 1 kHz pour la formation des GUVs. $T = 45^{\circ}\text{C}$. [241].

Enfin, le protocole d'électroformation développé par Li *et al.* est en accord avec la théorie sur la fluidité des membranes en fonction de la température. Ils ont observé que le diamètre des GUVs formées augmente avec la température ; observation justifiée par une diminution du module de rigidité de la membrane la rendant plus fluide, et facilitant donc le mouvement des lipides lors de l'électroformation [245].

c. Limitations

L'encapsulation de molécules au sein des GUVs au cours de leur électroformation est possible mais reste cependant limitée à de petites molécules ou des enzymes à de faibles concentrations. En effet, au cours du gonflement, les molécules d'eau s'intercalent entre deux bicouches lipidiques mais l'espace nécessaire à la diffusion de plus grosses molécules est difficilement atteint. C'est pourquoi, bien qu'étant une technique efficace, l'électroformation est très sensible au milieu d'hydratation utilisé et le succès de l'expérience n'est pas garanti en cas de modification de la composition.

Nous avons cherché à encapsuler l'enzyme NO-Synthase inductible (domaine oxygénase, 42 kDa [111]) au cours de l'électroformation et avons montré que la concentration est limitée à seulement 5 μM (Figure 67 a). Au-delà, quasiment aucune vésicule n'est obtenue (Figure 67 b) : l'enzyme pourrait venir se placer entre deux feuillettes bloquant ensuite le passage des molécules d'eau [227].

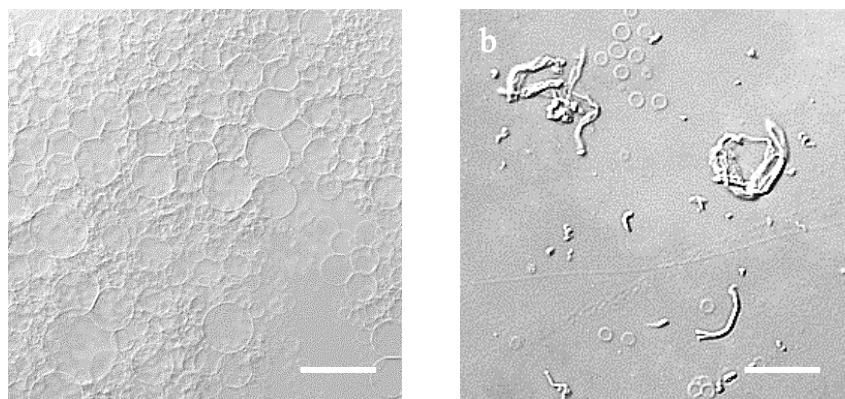


Figure 67 Images obtenues par microscopie confocale de GUVs électroformées en tampon phosphates 10 mM pH 7,4 contenant la iNOS oxygénase (iNOSoxy, 42 kDa) à deux concentrations : (a) iNOSoxy 5 μM ou (b) iNOSoxy 10 μM. Illumination en contraste interférentiel.

La distance entre les deux électrodes est également limitée. En effet, nous avons mis en évidence que la distance entre les deux électrodes ne pouvait pas être inférieure à 2 mm lorsque l'hydratation est faite en tampon physiologique. L'idée de réduire la distance entre les deux électrodes a été émise dans le but de réduire le volume de la chambre d'électroformation, et donc les quantités des constituants (lipides, sondes, enzymes...). Après formation, récupération et transfert, les GUVs obtenues en conditions salines ne peuvent pas profiter d'une sédimentation par différence de densité comme utilisé grâce au sucrose et au glucose (voir paragraphe I.1 et Figure 55) et sont soumises aux seuls mouvements de convection. Ainsi, le dépôt d'un faible volume de solution concentrée en GUVs sur un substrat modifié pour immobiliser les vésicules permettrait d'augmenter la probabilité de rencontre entre une vésicule et le substrat. Habituellement, dans tous les protocoles d'électroformation, la distance entre les deux électrodes (lames d'ITO ou platine) est fixée à 2 ou 3 mm sans que cette distance ne soit justifiée. Cependant, si la distance entre ces deux électrodes est réduite, alors le volume de la solution d'hydratation sera moindre. De plus, en augmentant la surface de dépôt du film de lipides, la concentration en vésicules dans la solution sera d'autant plus élevée (Figure 68). Nous avons constaté qu'une distance limite de 2 mm entre les deux électrodes est nécessaire pour obtenir des GUVs pour les compositions de lipides utilisées et seulement dans le cas d'une électroformation en PBS (pH 7,4). Dans le cas d'un gonflement dans l'eau ou dans une solution de sucrose, cette limitation n'est pas rencontrée et il est possible de réduire la distance inter-électrode à 0,5 mm. Dans le cas d'une solution saline, une hypothèse liée à l'impossibilité de former des vortex dus au champ électrique est envisageable lorsque les deux électrodes sont trop proches, sans qu'une investigation plus précise n'ait été effectuée au cours des recherches effectuées pendant cette thèse. Néanmoins, quelques éléments intéressants pouvant expliquer ce phénomène sont reportés dans la littérature.

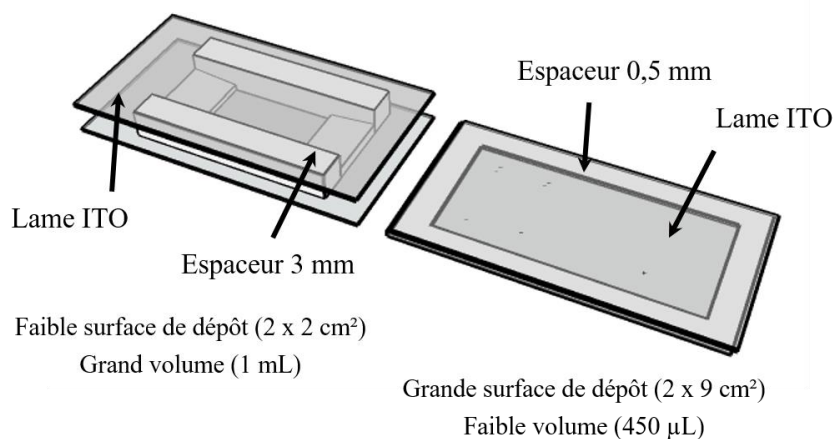


Figure 68 Représentation schématique des deux chambres d'électroformation mettant en évidence la différence de volume de solution d'hydratation à utiliser et la surface disponible pour le dépôt de lipides.

Tout d'abord, l'application d'un champ électrique entre deux électrodes séparées par une solution contenant des ions induit une modification de la conductivité par rapport à un milieu ne contenant pas d'ions (eau pure ou sucrose). La formation d'une double couche ionique au niveau de l'électrode est un phénomène bien connu lorsqu'une solution est polarisée par l'application d'une différence de potentiels (voir Chapitre 1, paragraphe 3.b.i).

Ce modèle de la double couche est valable pour des champs électriques continus ou alternatifs de faible fréquence. Dans le domaine de l'étude des flux induits par l'électroosmose, il est fait état de

phénomènes électrocinétiques non linéaires sous champ électrique alternatif induisant des flux et la formation de vortex au sein de solutions salines (*Alternative Current Electro Osmosis*= ACEO) [246]. Le mouvement de particules micrométriques a été observé de manière localisée au sein de solutions ioniques soumises à un champ électrique, ce qui a pour effet d'entraîner leur ségrégation : des flux microfluidiques sont décrits. Ces observations ont permis le développement d'une théorie complexe mais sont, pour la majorité, basées sur un système d'électrodes coplanaires (Figure 69) [247]–[251], ce qui diffère de la configuration utilisée dans le cas de l'électroformation.

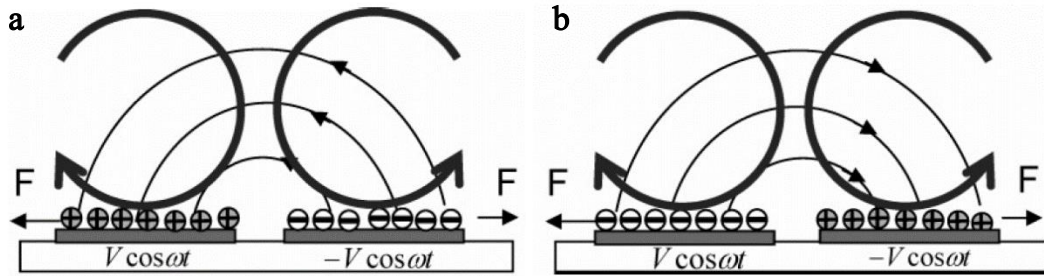


Figure 69 Electroosmose sous champ électrique alternatif généré par la charge d'une paire d'électrodes coplanaires. Mouvement de flux et charges induites à la surface de l'électrode pendant (a) la demi-période où la cathode est à gauche et l'anode à droite et (b) la demi-période où les polarités des électrodes sont inversées. [251].

Cependant, certaines études se sont intéressées au phénomène d'ACEO entre deux électrodes planes parallèles asymétriques (c'est-à-dire avec une électrode plus petite que l'autre) (Figure 70 b) [252]–[254]. Au-delà de la configuration des électrodes, ce qui est important pour former des flux au sein d'une solution ionique par ACEO est que la composante tangentielle du champ électrique doit être en phase avec la polarisation : la force de Maxwell tangentielle induite et le flux conduisent à la formation de deux vortex de taille équivalente tournant dans des sens opposés à la surface des électrodes (Figure 70) [247], [251], [252].

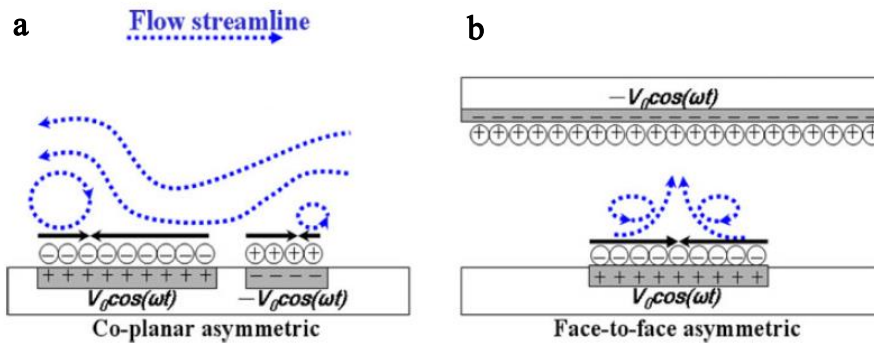


Figure 70 Electroosmose sous champ électrique alternatif généré par la charge (a) d'une paire d'électrodes coplanaires asymétriques et (b) d'une paire d'électrodes planes asymétriques en parallèle. Le mouvement du flux et les vortex formés sont schématisés par des flèches en pointillés bleus. D'après [252].

La description des phénomènes physiques liés à l'ACEO se base sur un modèle RC (résistance-condensateur) dans lequel la double couche électronique est décrite comme le condensateur alors que la solution est vue comme une résistance au champ électrique (voir Chapitre 1, paragraphe 3.b.i).

Le paramètre de fréquence du champ alternatif influence le flux obtenu par ACEO. D'une part, si la fréquence est trop élevée, la cinétique de diffusion des ions au sein de la solution n'est pas suffisamment rapide pour permettre une réorganisation des charges à chaque changement de polarité

et la double couche électronique ne peut pas être formée ; autrement dit, l'impédance électrique du condensateur est faible et c'est la résistance au sein de la solution qui domine. D'autre part, si la fréquence est trop faible, l'impédance du condensateur est élevée c'est-à-dire que la double couche électrique écrante le champ électrique ce qui empêche la formation du champ électrique tangentiel et aucun flux n'est observé. Cette description est en bon accord avec l'étude en fréquence proposée par Li *et al.* sur l'électroformation (Figure 65).

Pour générer des flux par ACEO, il est décrit que la fréquence doit être proche de l'inverse de la constante de temps d'un circuit RC ($1/RC$ avec R = résistance et C = capacitance), c'est-à-dire proche de la fréquence de relaxation de la double couche [246], [252], [254]. Une fréquence optimale (f_{opt}) est donnée dans les travaux de Chiou *et al.* par :

$$f_{opt} = \frac{1}{2\pi} \frac{\sigma \lambda_d}{\varepsilon L} \quad (37)$$

où σ ($S.m^{-1}$) est la conductivité du milieu, ε ($F.m^{-1}$) est la permittivité du milieu, λ_d (m) est l'épaisseur de la double couche et L (m) est l'épaisseur de la couche de solution [254]. Cette expression relie alors la fréquence optimale à la distance inter-électrode : ainsi quand cette distance diminue, la fréquence nécessaire pour générer des vortex augmente. Dans le cas présenté sur la Figure 68, la distance initiale est de 3 mm et passe à 0,5 mm, ce qui signifie que la fréquence optimale augmente d'un facteur 6. Le calcul de la fréquence optimale peut être estimé dans une première approximation à environ 1,2 kHz dans le cas d'une distance inter-électrode de 3 mm et à environ 7,2 kHz pour 0,5 mm de distance (calculée à partir de $\sigma = 15,5 \text{ mS.cm}^{-1}$, $\varepsilon = 6,9.10^{-10} \text{ F.m}^{-1}$ et $\lambda_d = 10 \text{ nm}$).

Dans notre cas, la théorie de l'ACEO pourrait éventuellement s'appliquer à cause de la géométrie de notre chambre d'électroformation. En effet, la chambre utilisant un espaceur de 3 mm possède une asymétrie telle que montrée sur la Figure 70 où les électrodes sont en parallèle mais où une surface d'électrode est plus petite que l'autre. Ceci induirait alors une modification des lignes de champ et la formation de vortex facilitant ainsi l'électroformation. Lorsque la distance inter-électrode est fixée à 0,5 mm, la chambre d'électroformation ne possède pas cette asymétrie donc aucun vortex ne peut être formé. De plus, quand la distance diminue, la fréquence doit être augmentée pour générer un effet d'électroosmose suffisant pour permettre d'écranter l'effet de la double couche électronique, or les essais réalisés jusqu'à présent ont été effectués à la fréquence fixe de 500 Hz quelle que soit la distance inter-électrode. Ainsi, dans le futur, il serait intéressant de faire des essais d'électroformation en appliquant le protocole mis au point au laboratoire mais en créant une asymétrie de surface entre deux électrodes distantes de 0,5 mm ou alors en augmentant la fréquence du champ électrique alternatif.

Par ailleurs, un autre des problèmes de l'électroformation souvent reporté est lié à l'oxydation des lipides au cours de l'électroformation. Le champ électrique alternatif impose d'appliquer des potentiels relativement élevés pouvant oxyder les lipides notamment au niveau des insaturations [255], [240]. L'équipe de Mir *et al.* a mis en évidence des phénomènes de peroxydation des phospholipides. Ils insistent notamment sur l'importance du choix des lipides pour l'utilisation de l'électroformation et ont démontré que plus il y a d'insaturations sur les chaînes carbonées des phospholipides, plus ces derniers seront sujets à ces phénomènes d'oxydation [240]. De plus, l'oxydation d'une insaturation entraîne la formation d'un radical pouvant se propager et créer une réaction de proche en proche sur

les chaînes voisines [256]. Cependant, au-delà de 25% d'oxydation des lipides, les vésicules commencent à changer de formes et à partir de 40%, elles éclatent [240]. Le report de ces observations permet la garantie d'un taux de peroxydation inférieur à 25% dans le cas où aucune déformation n'est observée.

Enfin, le dernier inconvénient lié à notre protocole d'électroformation de vésicules en conditions physiologiques est le temps. En effet, bien que le protocole mis au point soit simple et permette d'obtenir un grand nombre de vésicules, il nécessite une dizaine d'heures de préparation, ce qui n'autorise que peu d'expériences par jour.

La synthèse de microréacteurs biomimétiques par électroformation a été optimisée pour produire des vésicules unilamellaires géantes avec un haut rendement et ce, sur différents supports d'électrodes. Cependant, quelques limitations, en plus de celles évoquées jusqu'ici, subsistent quant à l'exploitation des vésicules électroformées, telles que, la présence d'une protrusion au pied de la vésicule qui reste partiellement ouverte vers la solution extravésiculaire, de même que l'impossibilité de transférer suffisamment de GUVs. D'autres techniques de formation des GUVs ont alors été étudiées.

II. Hydratation sur gel de poly(acétate de vinyle)

1. Introduction

La formation de vésicules unilamellaires géantes par hydratation de film a d'abord été développée par hydratation d'un film d'agarose [257]. L'avantage de cette technique réside en premier lieu dans sa simplicité de mise en œuvre, ainsi que dans l'indifférence de la force ionique de la solution d'hydratation utilisée. Cette technique consiste à hydrater un film hybride d'agarose et de lipides et permet la formation de GUVs en 1h. Cependant, quelques inconvénients subsistent, d'où le développement de l'hydratation sur gel poly(acétate de vinyle) (PVA) [258]. En effet, les lipides sont intimement mélangés au gel d'agarose sur toute son épaisseur ce qui a pour effet de diminuer le rendement de formation des vésicules par rapport à l'électroformation. De plus, des traces d'agarose sont observées dans et sur la membrane des vésicules obtenues. Une étude a montré que ces vésicules présentent des propriétés particulières de perméabilité dues à la présence d'agarose [259]. Notamment, des expériences d'électroporation ont été menées et ont révélé un temps de relaxation dynamique plus important en présence d'agarose. Il est également décrit la possibilité de purifier les vésicules de l'agarose par chauffage à 70°C pendant 2h.

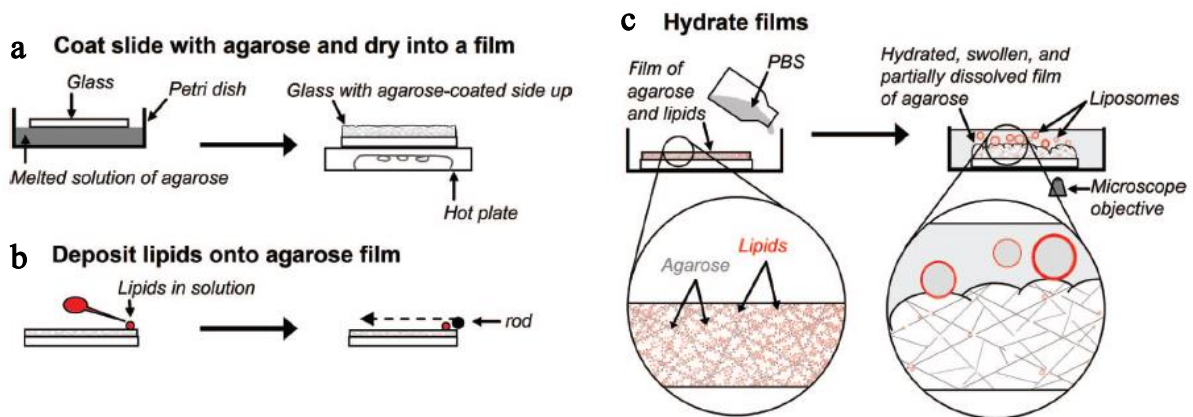


Figure 71 Représentation schématique du protocole de formation de liposomes par hydratation d'un film hybride d'agarose et de lipides. (a) Formation du film d'agarose. (b) Dépôt des lipides sur le film d'agarose. (c) Hydratation du film hybride agarose-lipides et formation de liposomes. [257]

Plus tard, l'équipe de Marques a mis au point le procédé d'hydratation sur gel de PVA qui a l'avantage d'éviter une contamination de la membrane par le gel [258]. Nous avons reproduit cette technique pour former des GUVs en conditions physiologiques.

2. Dynamique du gel

L'hydratation sur gel de PVA consiste à hydrater un film sec de phospholipides déposé sur un gel de PVA préalablement séché. Le PVA utilisé doit être entièrement hydrolysé et de forte masse molaire ($M > 100.10^3 \text{ g.mol}^{-1}$). Quant au mécanisme de gonflement des vésicules, il est décrit que la solution d'hydratation pénètre entre les bicouches comme c'est le cas pour la technique d'hydratation douce mais la présence du PVA diminue drastiquement le temps nécessaire pour l'obtention de GUVs car les molécules d'eau peuvent également pénétrer le gel de PVA et hydrater le film de lipides également par le bas (Figure 72). Les deux modes de transport de l'eau lors de l'hydratation sur un substrat classique (verre) sont la pénétration entre deux bicouches ou *via* le film de lipides. Lorsque l'hydratation est obtenue sur gel de PVA, celui-ci absorbe l'eau à cause du fort gradient de potentiel chimique présent entre la solution et le gel sec [258].

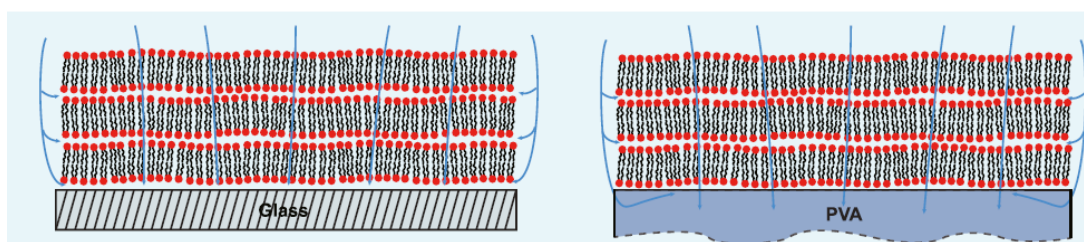


Figure 72 Représentation schématique des voies de pénétration des molécules d'eau au sein du film de lipides sur du verre et sur un gel poly(acétate de vinyle) (PVA). [258]

Par ailleurs, pour un temps de préparation équivalent à l'hydratation sur gel d'agarose, cette technique permet la formation d'un plus grand nombre de vésicules du fait de l'absence de mélange entre le gel et les lipides. Cette propriété a été mise en évidence par gonflement de GUVs sur un gel PVA modifié de manière covalente avec un fluorophore (DTAF : dichlorotriazinyl aminofluorescéine). Après formation des vésicules, aucune trace de fluorescence n'a été observée au niveau de la membrane ou à l'intérieur des GUVs. Ce comportement particulier est lié à la faible capacité du PVA ($M > 100.10^3 \text{ g.mol}^{-1}$) à se dissoudre dans un milieu aqueux par rapport à d'autres gels physiques [260], [261].

Dans le cas de leur étude, Marques et al. ont formé des GUVs à partir de différents lipides synthétiques zwitterioniques (DOPC, DPPC : Dipalmitoylphosphatidylcholine), anioniques (DOPG : 1,2-di-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) ; DOPS : 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine) ou encore cationiques (DOTAP : N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium). Toujours dans l'idée de synthétiser un microréacteur biomimétique dont la composition de la membrane soit proche de celle d'une cellule, nous avons choisi d'appliquer ce protocole d'hydratation avec l'extrait naturel (Egg PC) et la solution d'hydratation reste le tampon phosphate (10 mM pH 7,4) déjà utilisé lors des expériences d'électroformation. La formation de GUVs à partir d'un mélange Egg PC cholestérol à 4:1 en présence d'un lipide fluorescent (DiD) est illustrée sur la Figure 73.

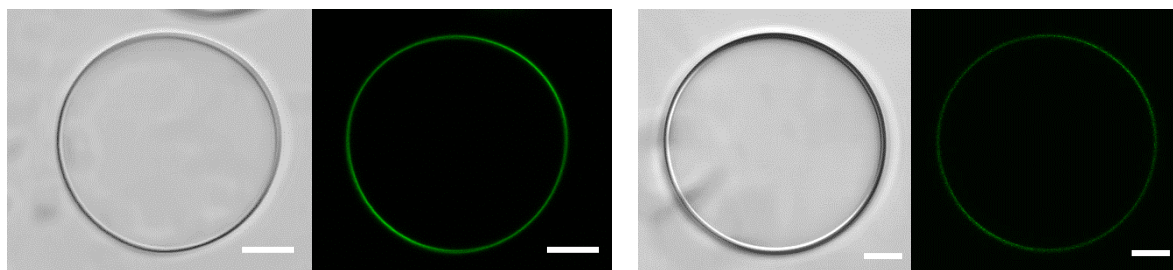


Figure 73 Images de microscopie confocale des GUVs formées par réhydratation de film PVA. La membrane est composée d'un mélange Egg PC : cholestérol (4:1) et est marquée avec un lipide fluorescent (DiD) (0,1 mol.%). Illumination en contraste interférentiel à gauche et en fluorescence à droite. Bar d'échelle = 10 μ m.

Comme lors de l'électroformation, le gonflement des GUVs commencent par la formation de petites vésicules qui fusionnent pour en former de plus grandes (Figure 74). De plus, un fort ancrage de la vésicule sur le gel est constaté et des défauts à ce niveau sont souvent observés (Figure 74 b). Ce dernier point empêche fortement le transfert des vésicules sur un autre support.

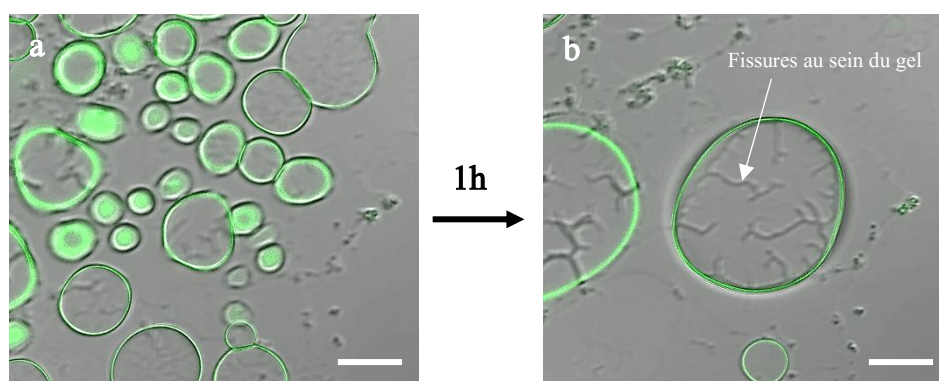


Figure 74 Images de microscopie confocale illustrant l'évolution des vésicules au cours de la formation de GUVs par hydratation de gel PVA. (a) $t = 2$ min après hydratation. (b) $t = 60$ min après hydratation. Superposition des canaux d'illumination en contraste interférentiel et en fluorescence. Bar d'échelle = 50 μ m.

Dans la suite de l'exploitation de ce type de vésicules, nous avons été rapidement confrontés à des problèmes de comportement des GUVs à la microinjection, limitant fortement leur spectre d'utilisation. C'est pourquoi nous avons finalement choisi de développer une troisième technique de formation de vésicules géantes basée sur la déshydratation-réhydratation de petites vésicules multilamelaires.

III. Réhydratation de vésicules multilamellaires

1. Introduction

La dernière technique de formation de GUVs présentée dans cette partie est celle qui nous a permis d'obtenir des vésicules avec les propriétés les plus intéressantes pour la suite du projet. Elle est basée sur la réhydratation d'un film de lipides obtenu par séchage d'une solution de petites vésicules unilamellaires (SUVs). Cette méthode est basée sur le protocole décrit pour la première fois par Criado et Keller en 1987 [262]. Elle a ensuite été optimisée par l'équipe d'Orwar et permet le gonflement de vésicules unilamellaires géantes jumelées à des vésicules multilamellaires [263].

2. Gonflement de vésicules unilamellaires géantes sur un réservoir de lipides

a. Composition et propriétés des lipides

Le protocole décrit ci-après est détaillé dans la littérature et est applicable en l'état pour une composition de lipides donnée [264]. Il s'agit d'un mélange de lipides extraits du soja (SoyBean polar Lipids extract, SBL) (Figure 75). Cet extrait est solubilisé à 10 mg.mL^{-1} dans du chloroforme puis ce dernier est condensé à l'aide d'un évaporateur rotatif jusqu'à élimination de toute trace de solvant, c'est-à-dire pendant 3 à 5h (Figure 76). Un tampon phosphate (Trizma base 5 mM, K_3PO_4 30 mM, KH_2PO_4 30 mM, MgSO_4 1 mM, EDTA 0,5 mM, pH 7,4) est ajouté et la solution est placée à 4°C pendant 12h. Une réhydratation douce permet alors la formation de vésicules dont la taille n'est pas contrôlée. Du glycérol à 1 vol.% est ajouté puis la solution est placée dans un bain à ultrasons pendant 5 à 10 minutes. La solution passe de claire à turbide. Ce mélange est ensuite aliquoté, placé à -20°C et peut être conservé pendant 6 mois [264]. Les références des produits sont données en Annexe I.1.

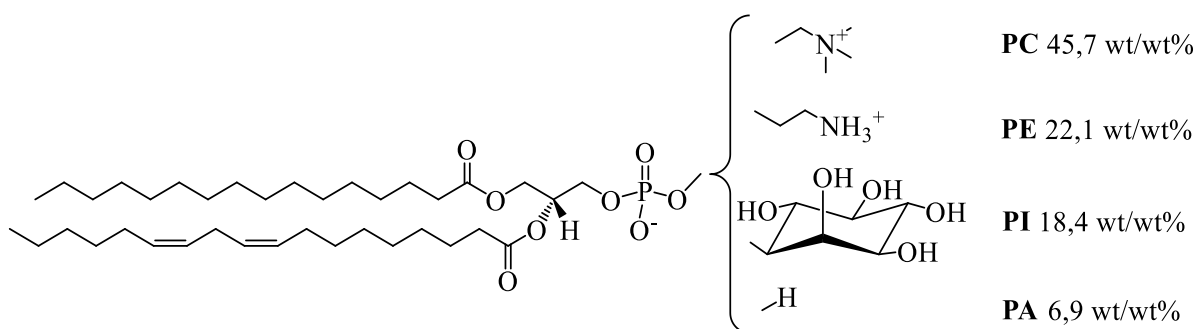


Figure 75 Structure générale et composition des différents lipides présents dans l'extrait polaire de soja (données du fournisseur). 6,9 wt/wt% de l'extrait ne sont pas identifiés. La longueur des chaînes hydrocarbures et le nombre d'insaturations sont variables. PC = phosphatidylcholine ; PE = phosphatidyléthanolamine ; PI = phosphatidylinositol ; PA = acide phosphatidique.

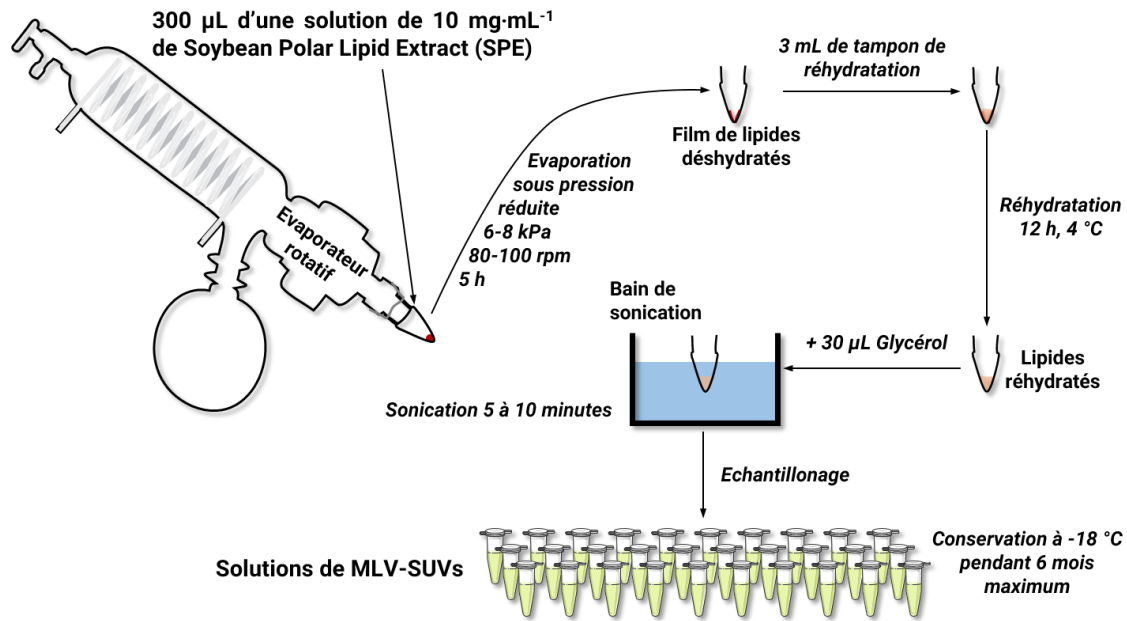


Figure 76 Représentation schématique du protocole de fabrication de la suspension de départ (solution de SUVs) pour la formation de GUVs par déshydratation-réhydratation.

Bien que ne contenant pas de cholestérol, cette composition naturelle de plusieurs phospholipides tend à se rapprocher au plus près de la composition des membranes cellulaires. Cependant, il est important de noter que l'utilisation de compositions en lipides complexes pour la formation des vésicules entraîne également des modifications des propriétés physico-chimiques des membranes, qu'il est nécessaire de prendre en compte dans l'interprétation des résultats. En effet, chacun de ces lipides possède une température de transition T_m différente ainsi qu'un rayon de courbure variable. Le rayon de courbure d'un lipide est défini par le facteur de forme de celui-ci. Le facteur de forme P peut être décrit comme une fonction de la surface de la tête polaire a_0 (m²), du volume des chaînes hydrocarbures v (m³) et de la longueur effective maximale des queues hydrophobes de la molécule l_c (m). Il s'exprime selon :

$$P = \frac{v}{a_0 l_c} \quad (38)$$

Trois rayons de courbure sont alors définis en fonction de la valeur de ce facteur de forme : quand $P < 1$, le rayon de courbure est positif ; quand $P = 1$, le rayon de courbure est nul et quand $P > 1$, le rayon de courbure est négatif. La Figure 77 décrit les différentes géométries associées aux différentes gammes de facteurs de formes [265].

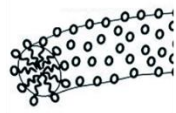
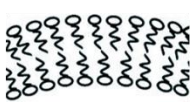
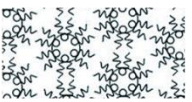
Facteur de forme P	Courbure des lipides	Forme des auto-assemblages
$< 1/3$	Cône 	Micelles sphériques 
$1/3 - 1/2$	Cône tronqué 	Micelles cylindriques 
$1/2 - 1$	Cône tronqué 	Bicouche flexible, vésicule 
1	Cylindre 	Bicouche planaire 
> 1	Cône tronqué inverse 	Micelles inverses 

Figure 77 Géométries de lipides et formes des auto-assemblages associés en fonction de la valeur du facteur de forme P. Adaptée de [265].

La formation de vésicules sphériques à partir d'un tel mélange impose une courbure positive aux lipides du feuillet externe et négative aux lipides du feuillet interne [266] (Figure 78).

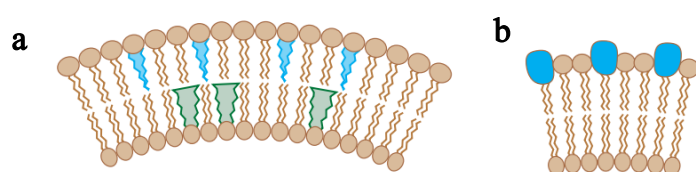


Figure 78 Mécanisme de déformation d'une membrane phospholipidique. Le rayon de courbure de la membrane peut être influencé par la composition (a) des chaînes hydrocarbures et (b) des groupements polaires. D'après [266].

Dans le cas des GUVs, l'effet du rayon de courbure des lipides est moins important que dans le cas de petites vésicules [267] (Figure 79) mais rappelons que le procédé utilisé pour la formation des vésicules géantes passent par la formation de SUVs. L'organisation des lipides au sein de la membrane en domaines où certains lipides seraient ségrégués est donc une hypothèse envisageable. Cependant, cet aspect n'a jamais été étudié au cours du projet.

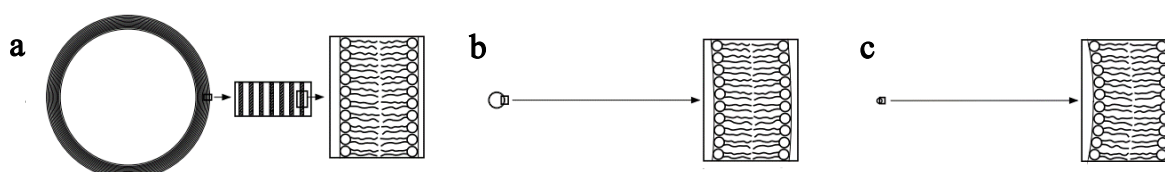


Figure 79 Représentation schématique des tailles comparées de différents types de vésicules : (a) géante multilamellaire, (b) large unilamellaire et (c) petite unilamellaire. Un zoom au niveau de la membrane illustre la courbure générale de celle-ci pour chacune des tailles de vésicules. Adaptée de [267].

Des études ont montré que la ségrégation de lipides en domaine existe en présence de certaines protéines, notamment les flippases (protéines permettant le passage d'un phospholipide d'un feuillet à l'autre) [266] ou de la toxine cholérique [268]–[270], mais la communauté scientifique ne s'accorde pas quant à l'effet réel du rayon de courbure des lipides sur cette dispersion. Certains évoquent que l'entropie domine sur l'effet énergétique de la courbure des lipides [270], [271] alors que, par ailleurs, d'autres démontrent qu'un comportement coopératif des lipides est suffisant pour compenser l'entropie [269]. De nombreuses publications traitent de la ségrégation lipidique dans des compositions mixtes. Le mécanisme proposé est lié aux différentes températures de transition des lipides et entraîne une organisation des lipides en phases liquide ordonnée (L_o) ou liquide désordonnée (L_d) [268]. En fonction de l'état physique de la membrane, celle-ci adopte différentes capacités à se courber et il en résulte la coexistence de domaines au sein d'une même membrane [272], [273]. Ces effets sont particulièrement étudiés dans le but de comprendre les mécanismes de transport des lipides et des protéines au niveau des membranes cellulaires. De nombreux phénomènes de déformation membranaire ont été mis en évidence tels que les effets de bourgeonnement de la membrane (*membrane budding*) [273], [274] (Figure 80 a, b) ou encore les radeaux lipidiques (*lipid rafts*) [275] (Figure 80 c, Figure 81) pouvant être à l'origine de phénomènes de fusion ou fission de la membrane [276]. Finalement, la question de savoir quel phénomène induit l'autre n'est pas évident et est toujours sujet à débat. D'une part, la ségrégation des lipides en domaines s'expliquerait d'abord par l'apparition de phases due à des températures de transition différentes. Ces phases permettraient à la membrane d'adopter différentes courbures et de créer des zones propices aux phénomènes de fusion ou fission. D'autre part, certains défendent le point de vue d'une ségrégation induite directement par la courbure de la membrane avec une composition lipidique proche d'une ligne de transition de phase [270].

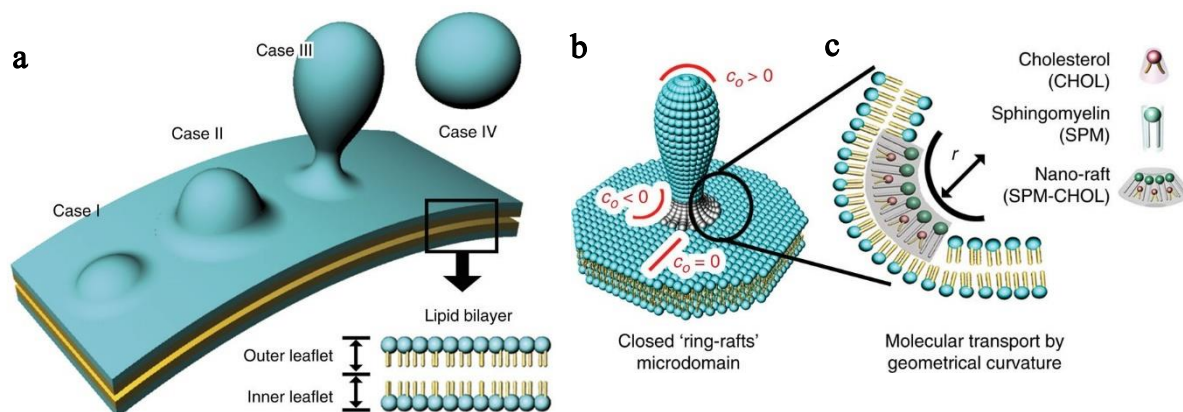


Figure 80 Représentation schématique de la fission d'une membrane par bourgeonnement (budding) et formation d'un radeau lipidique. (a) Etapes clés du bourgeonnement conduisant à la fission de la membrane. (b) Mise en évidence de la formation d'un radeau lipidique circulaire autour de la zone de bourgeonnement dû à une forte modification du rayon de courbure de la membrane. (c) Zoom sur la zone du radeau lipidique formé, majoritairement composé de cholestérol et de sphingomyéline sur le feuillet extravésiculaire (rayon de courbure négatif). D'après [351].

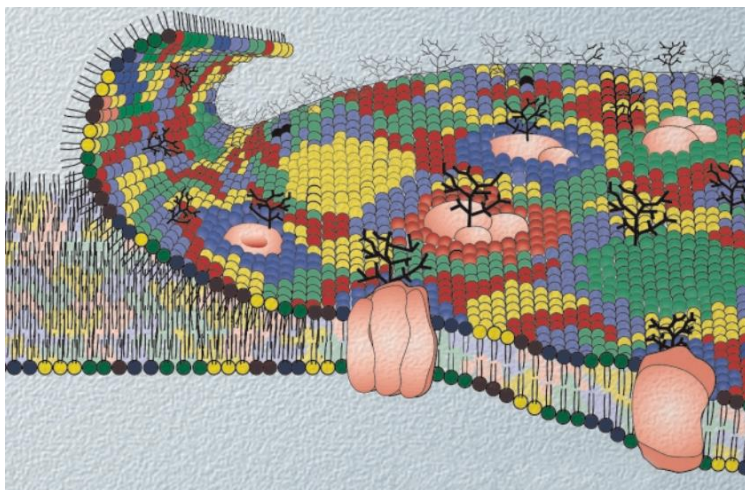


Figure 81 Représentation schématisée de l'hétérogénéité des membranes biologiques. Les différentes espèces lipidiques sont représentées par des couleurs différentes. D'après [352].

Bien que ces effets aient été mis en évidence dans des conditions bien particulières en termes de composition membranaire (présence de cholestérol notamment) et température, il n'est pas exclu qu'une telle ségrégation apparaisse au sein des membranes des liposomes géants obtenus par déshydratation-réhydratation dans les conditions présentées dans ce manuscrit, en particulier lors des expériences de microinjection qui seront décrites dans le Chapitre 3.

b. Gonflement de vésicules

Le gonflement des vésicules est obtenu par déshydratation puis réhydratation en milieu tamponné de la suspension de SUVs obtenue à partir de l'extrait naturel de soja (Figure 76). Contrairement aux protocoles usuels de déshydratation-réhydratation, il s'agit à cette étape d'évaporer l'eau contenue dans la suspension aqueuse et non un solvant organique. Puisque cette solution de SUVs a été préparée dans un tampon, des cristaux de sels sont alors piégés dans le film de lipides au moment de la déshydratation. Un énorme gradient osmotique est alors créé au moment de la réhydratation. Les molécules d'eau diffusent entre les bicouches pour compenser ce déséquilibre osmotique, permettant la séparation des bicouches et la formation des vésicules géantes. La solution de réhydratation est le tampon utilisé pour toutes les techniques employées jusqu'à présent (tampon phosphate à pH 7,4 à 150 mM de sels au total, soit 300 mOsm ; détail de la composition donné en Annexe I.1). Ce protocole permet de former un grand nombre de vésicules en peu de temps puisqu'après réhydratation, seulement une dizaine de minutes sont nécessaires pour obtenir un grand nombre de GUVs souvent jumelées à de plus petits réservoirs de lipides (Figure 82).

Ce protocole de formation de liposomes géants a été à l'origine adapté de la méthode développée par Criado et Keller en 1987 [262], puis a été optimisé par Orwar et al. [263]. Le premier avantage de cette technique réside dans la faible quantité de lipides nécessaire à la préparation de plusieurs centaines de vésicules. Ensuite, ces vésicules ont été jugées unilamellaires par deux techniques : d'une part, par microscopie confocale laser à balayage par addition d'un fluorophore dans la membrane (N-3-Triethylammoniumpropyl-4-(4-(dibutylamino)-styryl)pyridinium dibromide = FM 1-43). Cette méthode permet de déterminer la lamellarité des vésicules par l'analyse unidimensionnelle du plan équatorial d'une vésicule. D'autre part, l'analyse en microscopie électronique à balayage de vésicules immobilisées dans un gel a confirmé l'unilamellarité des vésicules [263].

La majorité des vésicules formées sont connectées par des nanotubes soit au réservoir de lipides, soit à d'autres GUVs (Figure 82 a, b, Figure 83) et d'autres vésicules sont libres (Figure 82 c, d). Après une quinzaine de minutes de stabilisation, une partie des vésicules connectées par des nanotubes ont fusionné entre elles pour minimiser l'énergie libre créée au niveau du nanotube (Figure 83) [277]. En effet, comme dans le cas d'une SUV par rapport à une GUV, il existe une importante différence de courbure de la membrane au niveau du nanotube par rapport à la vésicule. L'énergie de surface d'une structure tubulaire est proportionnelle à la longueur du tube et inversement proportionnelle au rayon du tube, c'est pourquoi en deçà d'une certaine distance entre deux vésicules connectées par un nanotube, celui-ci se rétracte entraînant la fusion des deux compartiments par minimisation de l'énergie de surface [277] (Figure 84).

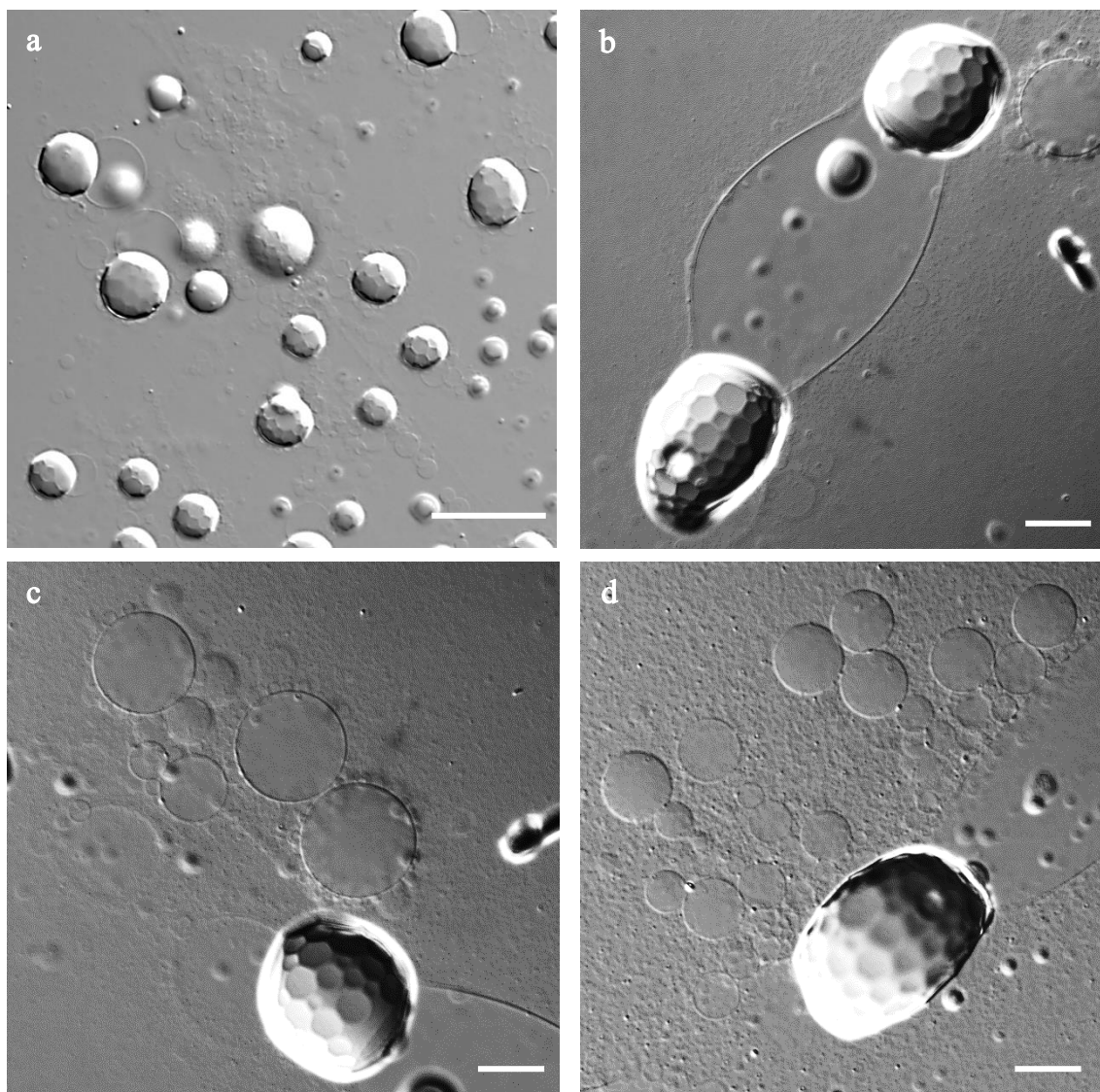


Figure 82 Images obtenues par microscopie à contraste interférentiel de GUVs formées par réhydratation d'une suspension de SUVs en tampon physiologique (PBS).
Bar d'échelle = 50 μ m.

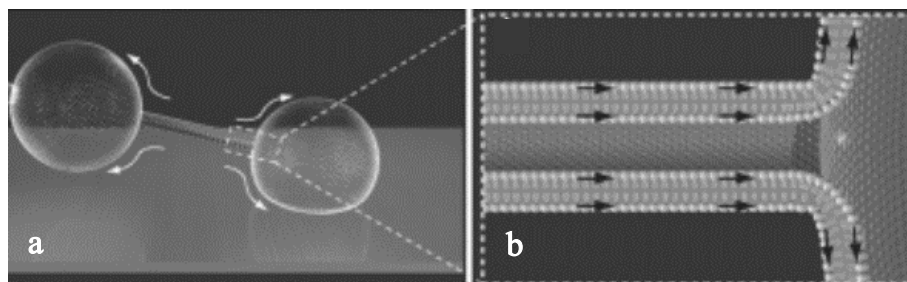


Figure 83 Représentation schématique de deux vésicules connectées par un nanotube (a) et zoom au niveau du nanotube. Le diamètre du nanotube est de l'ordre de 100-400 nm. Adaptée de [277].

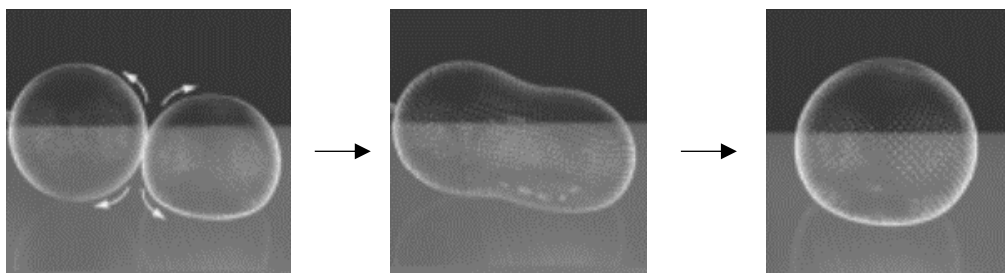


Figure 84 Représentation schématique de la fusion de deux vésicules connectées par un nanotube et induite par minimisation d'énergie de surface. Adaptée de [277].

c. Exploitation de ce type de vésicules

Après formation des vésicules et stabilisation du système, les GUVs sont transférées et immobilisées sur un substrat. Cette étape présente l'avantage majeur de disperser les vésicules sur une plus large surface et rend l'exploitation d'une vésicule unique bien plus aisée (Figure 85). Par ailleurs, la légère turbulence issue de la récupération de la solution permet de rompre les nanotubes inter-vésicules restants. Ceci permet de s'assurer de la stabilité des vésicules après transfert.

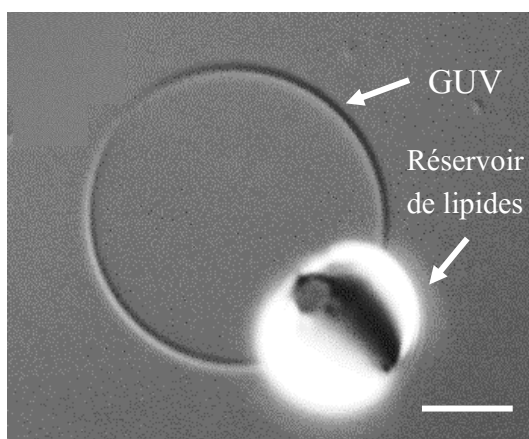


Figure 85 Image obtenue par microscopie à contraste interférentiel d'une GUV formée par réhydratation d'une suspension de SUVs et transférée sur une lame modifiée avec une résine SU-8. Bar d'échelle = 10 μ m

Cependant, cette étape peut également conduire à la rupture des vésicules si les turbulences sont trop importantes. Il est donc nécessaire de prendre un maximum de précautions. La récupération de la solution contenant les vésicules se fait à l'aide d'une seringue en plastique de 1 mL équipée d'une aiguille de section 1,1 mm et de 1 cm de longueur. La large section et faible longueur de l'aiguille limite les effets de turbulence et l'utilisation d'une seringue de 1 mL permet de limiter la dépression dans le corps de celle-ci lorsque la solution est aspirée et ce, à nouveau, dans le but de prévenir la rupture des vésicules. La solution est ensuite lentement expulsée sur une lame traitée pour permettre l'immobilisation des vésicules.

Le détail du protocole de traitement de surface est donné en annexe (Annexe II.4.b). Brièvement, il s'agit de faire un dépôt à partir d'une résine photosensible SU-8. Ce dépôt permet une adhérence des vésicules au substrat, sans pour autant entraîner leur déformation, et garantit leur stabilité. Un traitement de surface à partir d'une solution de poly-L-lysine est possible mais la stabilité des vésicules est moins bonne sur ces substrats. Plusieurs concentrations en poly-L-lysine ont été testées (0,001 vol.% à 0,1 vol.%) mais aucune des surfaces testées n'est aussi performante que le substrat SU-8 [278]. Ceci peut être dû au caractère plutôt hydrophobe de la résine SU-8 qui offre une faible adhésion des GUVs tandis que la poly-L-lysine porte des groupements amino hydrophiles chargés positivement (NH_3^+). Dans le cas de la poly-L-lysine, des interactions électrostatiques permettent l'adhésion mais il est délicat de déterminer le protocole optimal pour que ces interactions soient à la fois suffisantes pour permettre l'immobilisation sans pour autant déstabiliser les vésicules.

La solution contenant les vésicules est déposée sur la lame modifiée avec la résine. A cette étape, la présence du réservoir de lipides accroché à la vésicule apparaît comme un net avantage puisqu'il permet la sédimentation des vésicules en une quinzaine de minutes. Cette étape de transfert des vésicules posait un réel problème avec les GUVs formées à partir des techniques présentées dans les deux paragraphes précédents. En effet, dans notre cas, les milieux intra- et extravésiculaire sont les mêmes (tampon phosphate) et la sédimentation par différence de densités (sucrose *vs.* glucose) n'est pas permise. C'est maintenant la densité du réservoir de lipides qui permet la sédimentation.

Enfin, dans la suite de l'exploitation des vésicules (Chapitre 3), le réservoir de lipides sera à nouveau d'un grand intérêt. L'injection de solutions (réactifs, enzymes...) à l'intérieur du microréacteur entraîne une augmentation de la tension de membrane, mais celle-ci est équilibrée grâce aux lipides du réservoir. La fluidité et le dynamisme de ces systèmes permettent aux lipides de diffuser du réservoir vers la membrane afin de moduler la tension, garantissant ainsi une grande stabilité des vésicules.

La formation de microréacteurs biomimétiques par trois techniques a été présentée. Un protocole d'électroformation a été optimisé pour produire des vésicules unilamellaires géantes avec un haut rendement sur différents supports d'électrodes et en tampon physiologique. Cependant la présence d'une protrusion au pied de la vésicule et l'impossibilité d'immobiliser les GUVs ne nous ont pas permis d'utiliser ces liposomes obtenus par électroformation. Une première méthode de réhydratation sur film de poly(acétate de vinyle) a été testée mais n'a pas permis une exploitation satisfaisante des vésicules formées. Enfin, une méthode basée sur la déshydratation-réhydratation d'une suspension de SUVs nous a permis de former et d'isoler un microréacteur biomimétique dont la stabilité membranaire est assurée grâce à la présence d'un réservoir de lipides.

Chapitre 3 : Modification du milieu interne et déclenchement contrôlé de la réaction enzymatique

Chapitre 3 : Modification du milieu interne et déclenchement contrôlé de la réaction enzymatique

La biologie synthétique œuvre pour une meilleure compréhension des phénomènes naturels du vivant en se plaçant dans des environnements simplifiés. Mimer la biologie implique le développement de technologies capables de jouer le rôle de certaines fonctions cellulaires. L'étude d'une réaction au sein d'une cellule artificielle nécessite de pouvoir contrôler les espèces présentes au sein du réacteur. Diverses techniques d'encapsulation d'espèces par différentes approches sont disponibles : l'incorporation d'une partie de la solution environnante au cours de la formation des vésicules, la fusion entre vésicules de compositions différentes, et la microinjection.

I. Encapsulation d'espèces au cours de la formation des vésicules

1. Introduction

Nous nous sommes d'abord intéressés à la possibilité d'encapsuler des espèces au cours de la formation des vésicules. En effet, bien que certaines limitations déjà présentées dans le chapitre 2 existent, nous avons montré qu'il était possible de former des vésicules en milieu physiologique (150 mM de sels), indiquant la possibilité d'encapsuler des ions de faible rayon hydrodynamique. Le défi est maintenant d'encapsuler, au cours de l'hydratation, des espèces plus volumineuses et de contrôler leurs concentrations.

Méthodologiquement parlant, former des vésicules dans un milieu contenant les espèces à encapsuler implique également de pouvoir changer le milieu extra-vésiculaire après formation des GUVs, de façon à ce que les réactifs soient présents dans le microréacteur uniquement. Ce changement se fera grâce à une chambre équipée de canaux d'entrée et de sortie connectés à une pompe péristaltique (Figure 86).

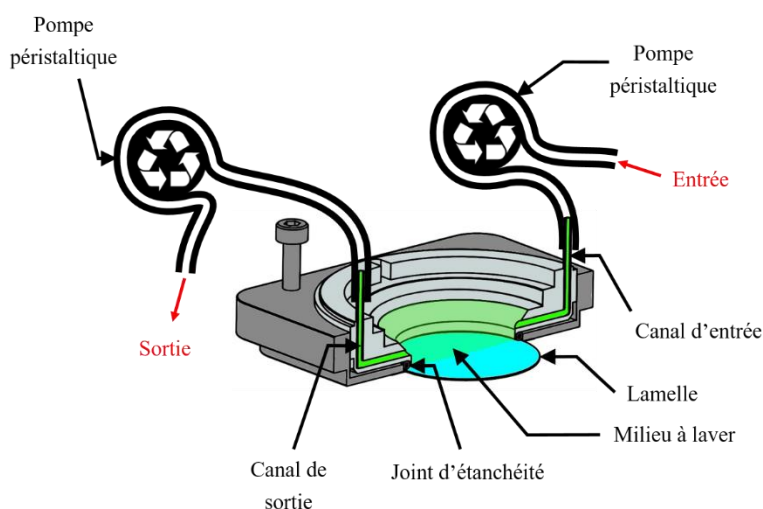


Figure 86 Représentation schématique d'une chambre d'observation équipée avec des canaux d'entrée et de sortie pour le changement du milieu extravésiculaire (chambre Ludin type I développée par Life Imaging Services).

Des espèces de différentes natures et tailles ont pu être encapsulées directement au cours de l'électroformation. Les résultats obtenus sont présentés dans les paragraphes suivants.

2. Encapsulation au cours de l'électroformation

a. Fluorophores

i. Calcéine

La calcéine (acide 2,2',2'',2'''-[(3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[2-benzofuran-1,9'-xanthene]-2',7'-diyl)bis(méthylènenitrilo)]tetraacétique - $\lambda_{\text{exc.}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 515 \text{ nm}$; $\Phi_{\text{PBS 10 mM, pH 7,3}} = 0,75$ [279]) est un fluorophore largement employé pour l'étude des propriétés de perméabilité des membranes ou de libération contrôlée en fonction des additifs présents (ADN, antibiotiques, etc...) ou des conditions expérimentales (température, pH, force ionique, etc...) [280]–[282] (Figure 87). Cette molécule porte quatre groupements acide carboxylique (hydrolysés à pH 7,4) et deux groupements hydroxyle. Dans les conditions de pH utilisées ici, les fonctions acides sont sous forme déprotonées ($\text{pK}_{\text{a}1}=2,1$, $\text{pK}_{\text{a}2}=2,9$, $\text{pK}_{\text{a}3}=4,2$, $\text{pK}_{\text{a}4}=5,5$), cette molécule est donc chargée négativement et est fortement polaire.

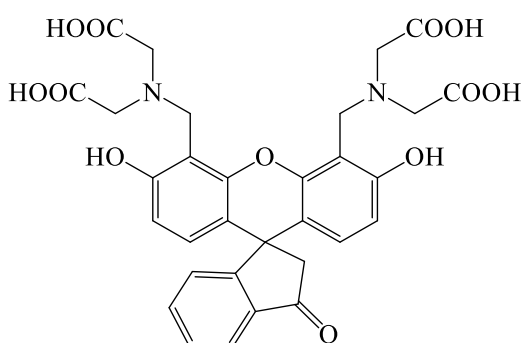


Figure 87 Structure chimique semi-développée de la calcéine.

$\text{pK}_{\text{a}1}=2,1$
 $\text{pK}_{\text{a}2}=2,9$
 $\text{pK}_{\text{a}3}=4,2$
 $\text{pK}_{\text{a}4}=5,5$
 $\text{pK}_{\text{a}5}=10,8$
 $\text{pK}_{\text{a}6}=11,7$.

Des vésicules ont été électroformées sur lames d'ITO en conditions physiologiques suivant le protocole décrit au chapitre 2 avec 0,1 mM de calcéine ajoutée dans la solution d'hydratation. La membrane est composée d'Egg PC : cholestérol (4:1). La première observation à noter est que la présence de la calcéine à cette concentration ne perturbe pas le processus de gonflement des GUVs par électroformation. A cette étape, la fluorescence est homogène dans toute la chambre d'observation et l'on ne distingue pas les vésicules en fluorescence. Lorsque le milieu extérieur est lavé à l'aide d'une pompe péristaltique pendant 1 min (débit de $1,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, volume de la chambre de $250 \mu\text{L}$), la fluorescence est alors visible seulement au niveau des GUVs (Figure 88 a). Cependant, quelques minutes après lavage, une perte de fluorescence localisée est observée pour certaines vésicules (Figure 88 b et c). La cinétique de décroissance de l'intensité de fluorescence n'est pas la même pour toutes les vésicules et pour une partie d'entre elles, la calcéine reste encapsulée.

L'hypothèse proposée pour expliquer ce phénomène est liée à la protrusion existant au pied de la vésicule. Au chapitre 2, cet aspect a été présenté comme un des principaux inconvénients des GUVs électroformées. Ce phénomène est inhérent à la réhydratation d'un film de lipides avec ou non l'application d'un champ électrique. Ici les vésicules ne sont pas récupérées et transférées mais sont directement observées à travers l'électrode (lame d'ITO). Ainsi, toute vésicule dont l'évolution de la croissance est stoppée avant qu'elle ne soit complètement close présentera ce type de protrusion et sera sujette à la fuite des espèces encapsulées.

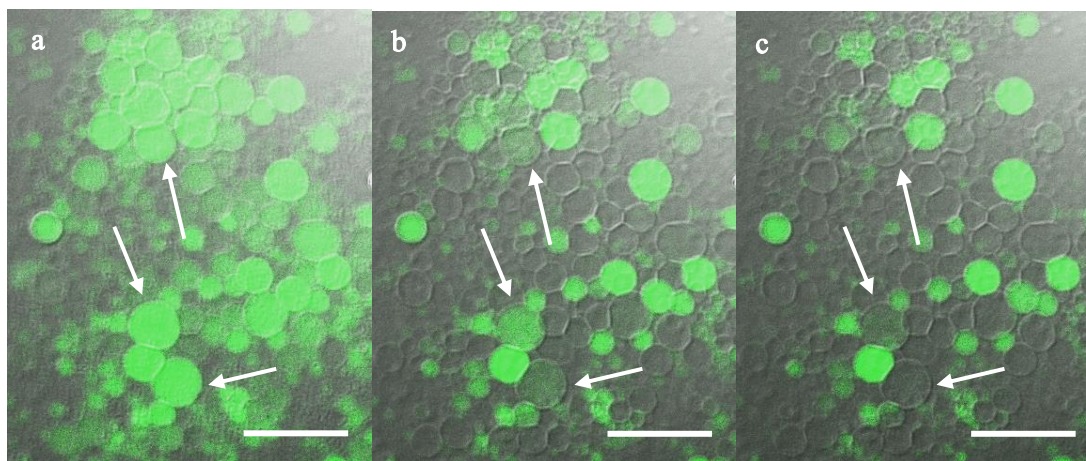


Figure 88 Images obtenues par microscopie confocale illustrant le suivi de la fuite d'une solution de calcéine incorporée dans des GUVs après lavage du milieu extérieur. Des GUVs ont été électroformées en {PBS 10 mM + calcéine 0,1 mM}. Après formation, le milieu extravésiculaire est échangé contre du PBS pur. Après lavage (débit = 1,2 mL.min⁻¹), l'intensité de fluorescence au niveau des vésicules est enregistrée à (a) t = 0, (b) 5 min et (c) 11 min. Quelques GUVs pour lesquelles l'intensité de fluorescence diminue au cours du temps sont désignées par des flèches. Superposition des canaux d'illumination en contraste de phase interférentiel et de fluorescence. Barre d'échelle = 50 μm.

Bien que certaines vésicules soient fermées et utilisables en tant que microréacteur, la discrimination de celles-ci n'est possible qu'en présence d'un fluorophore au moment de la formation des vésicules. En effet, la connexion résiduelle entre une GUV et le film de lipides correspond à un nanotube de lipides de seulement quelques centaines de nanomètres de diamètre. Cela est difficilement observable en microscopie optique, notamment à la surface du film de lipides. Dans le cas de l'utilisation de vésicules électroformées, il faudra donc trouver un moyen de localiser les espèces par fluorescence afin de pouvoir sélectionner une vésicule adaptée à l'étude (voir paragraphe I.2.b.ii).

ii. Resorufine

La resorufine a également été encapsulée. Cette molécule est le produit d'une des réactions enzymatiques étudiées au cours de cette thèse (voir Chapitre 1), à savoir la conversion oxydante de l'Amplex Red par le peroxyde d'hydrogène et catalysée par la peroxydase de raifort (HRP) (Figure 89).

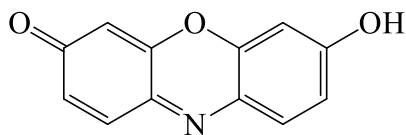


Figure 89 Structure chimique de la resorufine.

Différentes valeurs de pK_a sont données dans la littérature pour la resorufine en fonction du solvant utilisé. Cette molécule étant peu soluble dans les milieux aqueux à faible pH, une solubilisation dans du DMSO est souvent recommandée avant une dilution dans un milieu aqueux ($pH < 8,5$). Puisque notre étude est basée sur des conditions physiologiques, il était nécessaire d'établir le pK_a de cette molécule dans un tampon, cela dans le but de garantir les interprétations des résultats qui suivront. Pour se faire, des solutions de resorufine sont caractérisées à différents pH par spectroscopie UV-visible. La resorufine est solubilisée dans un tampon universel, dit de Britton Robinson [283]. Une gamme de pH est établie et chaque solution est analysée. Le détail de la technique est explicité

en annexe (Annexe II.5). Nous avons déterminé un pK_a de 5,9, signifiant qu'à pH 7,4 la resorufine est dans un état déprotoné.

Tout comme pour la calcéine, la resorufine a été ajoutée à 0,1 mM dans la solution d'hydratation avant application du champ électrique. Cette expérience a été faite dans l'eau en utilisant le protocole d'électroformation adapté (2V, 10Hz). Après une heure sous champ électrique alternatif, de nombreuses vésicules ont été formées (Figure 90 a). L'intensité de fluorescence dans le plan des vésicules (microscopie confocale) est homogène dans la chambre, démontrant l'efficacité de l'encapsulation (Figure 90 b). Le lavage du milieu extérieur n'a pas été fait sur ce système.

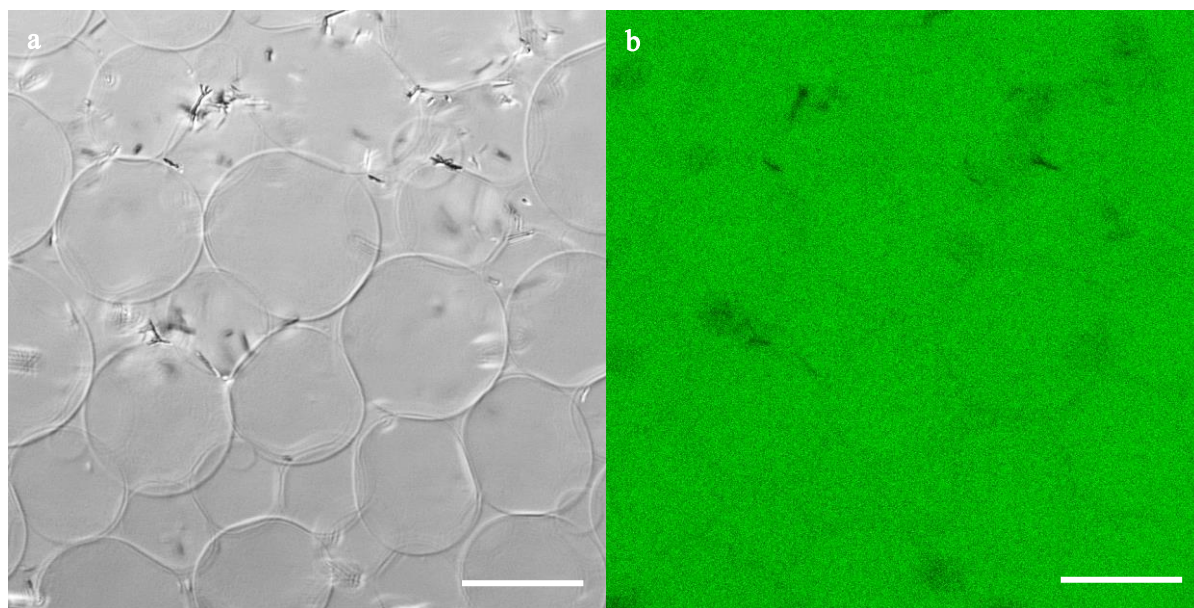


Figure 90 Images obtenues par microscopie confocale des GUVs électroformées en présence de resorufine (0,1 mM). (a) Illumination en contraste de phase interférentiel. (b) Illumination en fluorescence. Barre d'échelle = 50 μ m.

b. Systèmes enzymatiques

i. Amplex Red et peroxydase

L'encapsulation directe des réactifs couplée aux propriétés de perméabilité des membranes doit permettre, *a priori*, de réaliser la réaction d'oxydation de l'Amplex Red en présence de peroxyde d'hydrogène et de l'enzyme HRP. L'idée est d'encapsuler l'Amplex Red et la HRP au cours de l'électroformation (Figure 91 a), puis de récupérer, transférer et immobiliser les vésicules (Figure 91 b, Figure 92 a) dans le but d'avoir uniquement des vésicules fermées (pas de protrusion car les GUVs ne sont plus attachées au film de lipides).

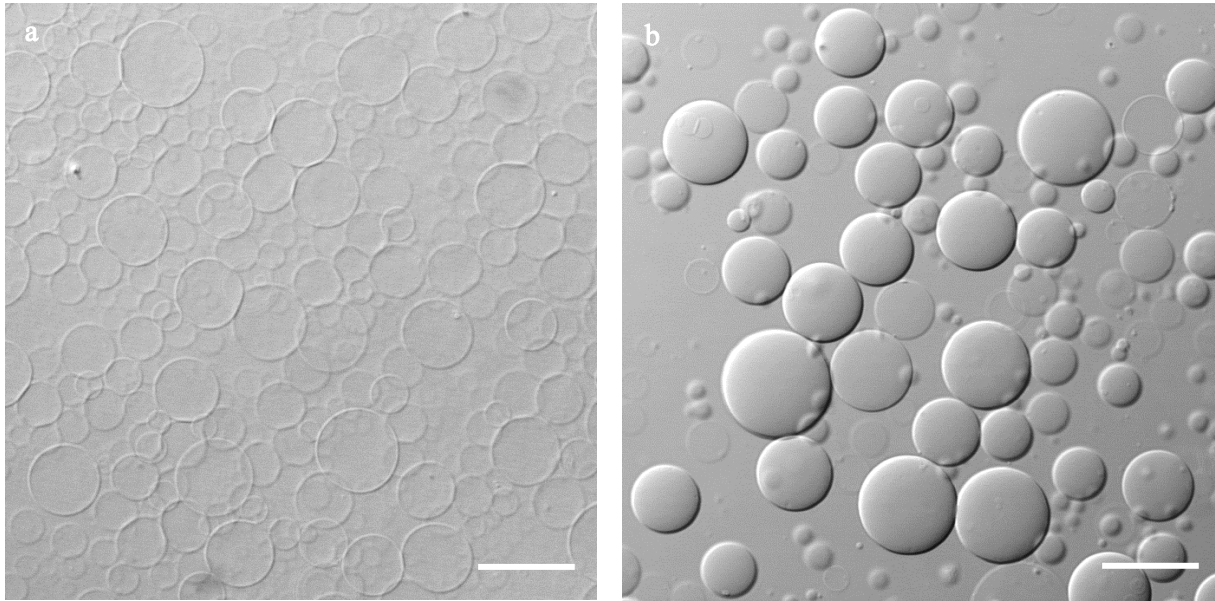


Figure 91 Images obtenues par microscopie confocale illuminée en contraste de phase interférentiel. (a) GUVs électroformées dans un milieu {Amplex Red + HRP + Sucrose}. (b) GUVs transférées et sédimentées grâce à l'ajout de glucose dans le milieu extravésiculaire. Le changement de contraste est dû à la différence d'indice de réfraction entre le glucose et le sucrose. Bar d'échelle = 50 µm.

Ensuite, il s'agit de laver le milieu extérieur pour que les réactifs soient isolés dans les micro-réacteurs (Figure 92 b). Enfin, le peroxyde d'hydrogène est ajouté dans le milieu extravésiculaire. Cette molécule est *a priori* capable de diffuser à travers la membrane phospholipidique, entraînant alors le déclenchement de la réaction enzymatique et la production *in situ* de resorufine (Figure 92 c).

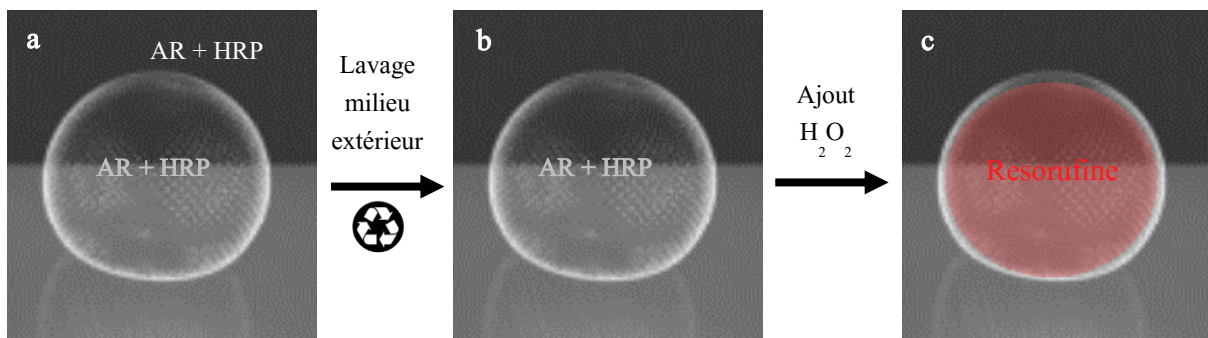


Figure 92 Représentation schématique du protocole utilisé pour déclencher la réaction enzymatique. (a) Après formation, les vésicules sont transférées, sédimentent et s'immobilisent. L'Amplex Red (AR) et la HRP sont présents dans les milieux intra- et extravésiculaires. (b) Après lavage avec une pompe péristaltique, l'AR et la HRP sont isolés à l'intérieur de la vésicule. (c) L'ajout puis la diffusion du peroxyde d'hydrogène dans la GUV déclenche la réaction enzymatique et conduit à la formation de resorufine fluorescente.

La resorufine étant fluorescente, un suivi de l'augmentation de fluorescence permet la visualisation qualitative de la réaction enzymatique (Figure 93). Cependant, cette augmentation de fluorescence n'a pas été observée de façon localisée au sein des vésicules mais dans tout le volume. Des hypothèses ont alors été émises quant à la perméabilité des membranes vis-à-vis des espèces encapsulées : la membrane est-elle perméable, à l'échelle de temps de nos expériences (typiquement quelques minutes) à l'Amplex Red ? à la HRP ? à la resorufine ? Ces aspects seront discutés dans le paragraphe III et au Chapitre 4.

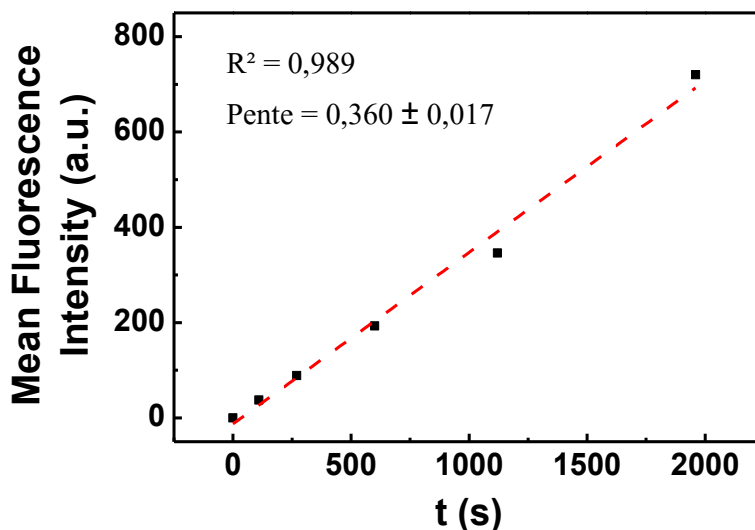


Figure 93 Suivi cinétique de la production de resorufine par la conversion oxydante de l'Amplex Red par le peroxyde d'hydrogène catalysée par la HRP. Ces données ont été extraites par analyse des images obtenues en microscopie confocale. L'intensité de fluorescence correspond à la moyenne du signal sur toute l'image.

ii. NO-Synthase inductible (domaine oxygénase)

La seconde réaction enzymatique étudiée au cours du projet présenté ici concerne la NO-Synthase. Nous nous sommes intéressés à l'encapsulation directe de cette enzyme au cours de l'électroformation et dans un premier temps, notamment au domaine oxygénase de la NO-Synthase inductible (iNOSoxy) (42 kDa [111]). Ce choix est justifié dans le cadre d'une étude préliminaire simplement dans le but de ne pas consommer l'enzyme entière qui demande un fastidieux travail de production (voir Annexe II.6.a).

Une des limitations de l'électroformation présentée au Chapitre 2 concernait l'encapsulation de macromolécules. Comme expliqué précédemment, nous avons mis en évidence que la concentration maximale en iNOSoxy pouvant être présente dans le milieu d'hydratation sans perturber l'électroformation est de 5 μ M. Cependant, ceci ne signifie pas pour autant que l'enzyme soit encapsulée et il s'agit maintenant de pouvoir localiser l'enzyme. Bien que la NO-Synthase soit une protéine cytosolique, cette étape est également nécessaire pour discriminer les vésicules closes des vésicules possédant une protrusion ouverte ce qui est indispensable pour la suite de l'étude en microréacteur (voir I.2.a.i).

Ceci peut être réalisé par couplage entre un fluorophore portant un atome de nickel (Ni-NTA-Atto, λ_{exc} . 501 nm et λ_{em} . 523 nm en PBS) et l'étiquette polyhistidine (HisTag) de la protéine utilisée

en amont lors de sa purification. Cette étiquette HisTag est fixée de manière covalente au N-terminal du domaine oxygénase lors de l'expression de l'enzyme et comporte plusieurs groupements histidine. Une liaison métallique s'établit entre le Ni lié au fluorophore et les cycles imidazole des histidines (Figure 94).

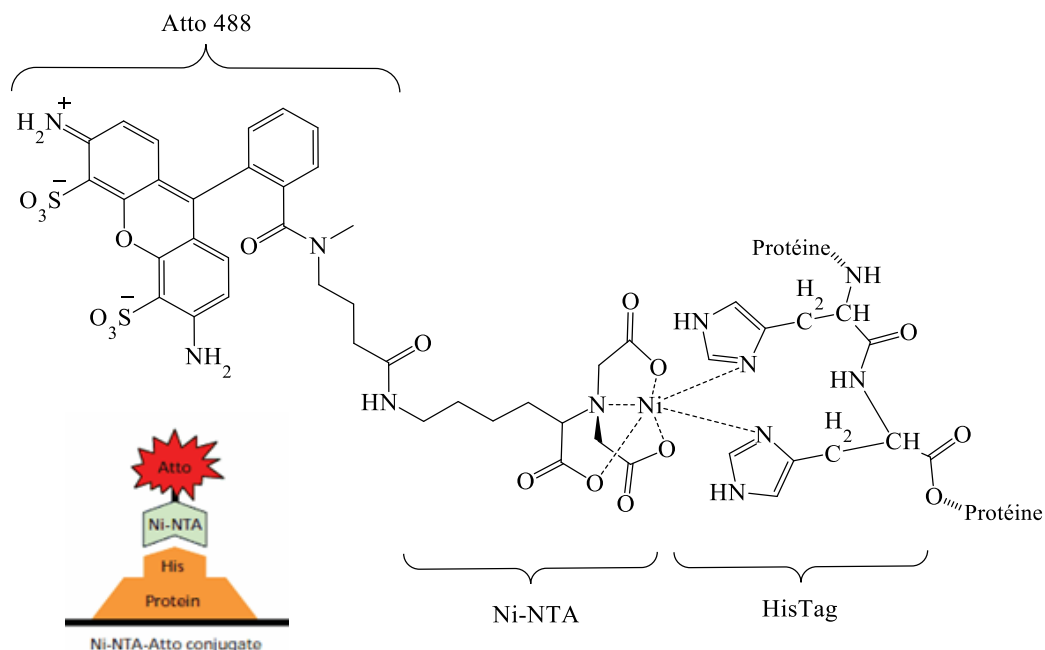


Figure 94 Structure chimique et représentation schématique du complexe Ni-NTA-Atto 488 – HisTag ($\lambda_{exc.} = 501 \text{ nm} - \lambda_{em.} = 523 \text{ nm}$) utilisé pour marquer des protéines.

L'enzyme a été conditionnée en présence de Ni-NTA-Atto 488 (2:1 respectivement) puis ajoutée au tampon PBS utilisé pour l'électroformation en conditions physiologiques de façon à atteindre une concentration de $1 \mu\text{M}$ (pas de perturbation de l'électroformation). Les vésicules sont formées selon le protocole établi au laboratoire (voir Chapitre 2). Après gonflement, le milieu extérieur est lavé à l'aide d'une pompe péristaltique sans que les vésicules ne soient transférées (Figure 95). Après lavage, la fluorescence semble répartie de façon homogène au niveau des lipides (film et membrane) mais n'est pas concentrée dans le milieu intravésiculaire comme attendu (Figure 97). Une analyse dans le plan longitudinale (z) permet de visualiser l'absence de fluorescence dans le volume puis son augmentation dans le plan des lipides (Figure 96).

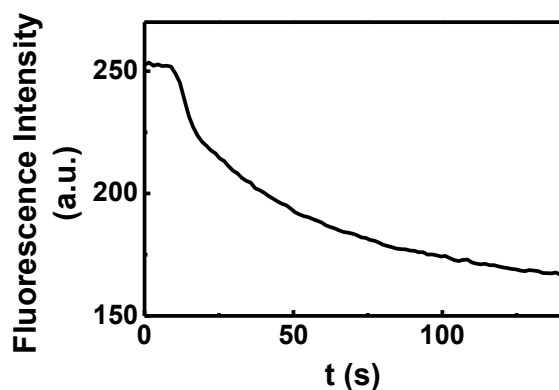


Figure 95 Suivi de la perte de fluorescence de Ni-NTA-Atto 488 au cours du lavage du milieu extra-vésiculaire. Les données sont obtenues par analyse des images obtenues par microscopie confocale enregistrées dans le plan médian des vésicules.

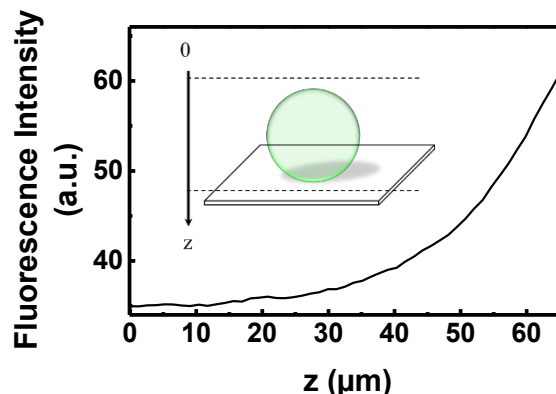


Figure 96 Variations de la fluorescence dans le plan longitudinale (z). Les données sont extraites des images enregistrées par microscopie confocale avec un pas de $1,3 \mu\text{m}$ et un déplacement du volume ($z = 0$) vers les lipides ($z > 0$).

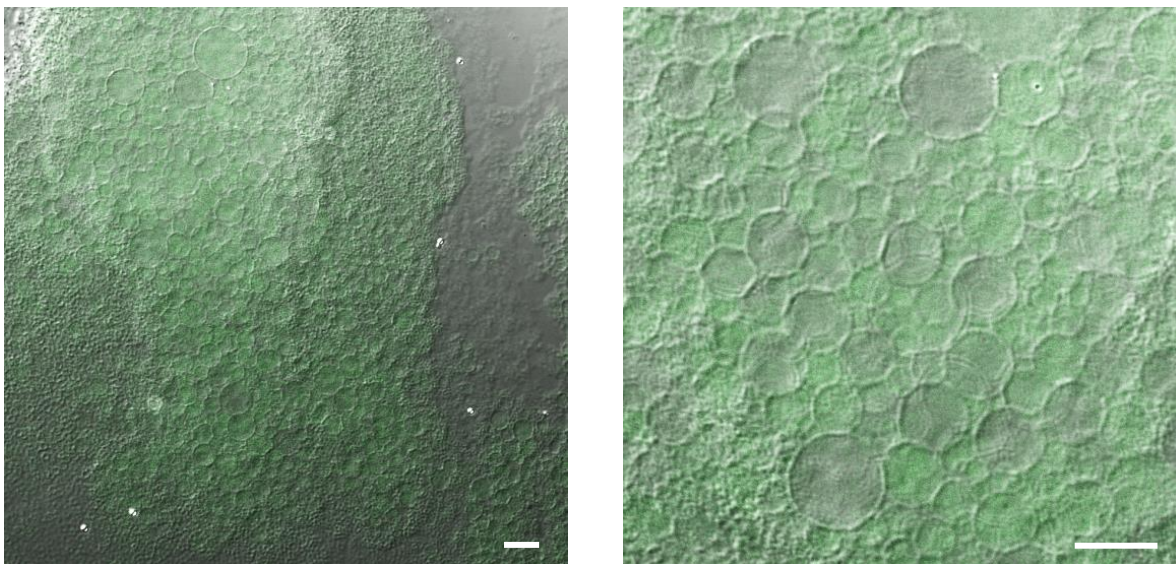


Figure 97 Images obtenues par microscopie confocale de GUVs électroformées en milieu PBS contenant $1\ \mu\text{M}$ d'iNOSoxy conditionnée avec $0,5\ \mu\text{M}$ de Ni-NTA-Atto 488, après lavage du milieu extérieur. La fluorescence se concentre au niveau des lipides sans pouvoir visualiser une quelconque encapsulation. Bar d'échelle = $25\ \mu\text{m}$.

Une interaction entre le fluorophore Ni-NTA-Atto et les lipides est envisagée. Pour vérifier cette hypothèse, la même expérience est réalisée avec le tag-fluorescent seul en l'absence d'iNOSoxy. A nouveau, après lavage, le signal de fluorescence se concentre uniquement au niveau des lipides. Cette observation confirme l'hypothèse qu'une interaction entre le fluorophore et les lipides est privilégiée. En effet, la liaison métal-ligand entre le nickel et les cycles imidazole des HisTag de la protéine peut se dissocier si un groupement possède une constante de complexation plus forte avec le Ni. De manière générale, la liaison entre un métal et un ligand est privilégiée pour le ligand qui permet une augmentation de l'entropie, terme dépendant de la concentration des espèces. Ici, la concentration en lipides est difficile à estimer puisqu'ils forment un film d'épaisseur non contrôlée et il est difficile de donner de réelles conclusions mécanistiques à ces observations phénoménologiques. Cependant, aux vues de ces résultats, il apparaît difficile de localiser, d'une part, l'enzyme, et donc de vérifier l'efficacité de l'encapsulation, et d'autre part, de mettre en évidence les vésicules closes pour l'étude en microréacteur.

Le contrôle de l'activité de l'enzyme a quand même été réalisé pour s'assurer que l'enzyme reste fonctionnelle après application du protocole d'électroformation.

c. Effet du champ électrique sur l'activité enzymatique

Les champs électriques alternatifs appliqués au cours de l'électroformation sont de l'ordre de 250 à $1700\ \text{V.m}^{-1}$ et peuvent être responsables de la dénaturation de l'enzyme (perte de la conformation fonctionnelle) conduisant à une diminution, voire une perte d'activité. La conformation de la protéine peut être analysée directement par spectroscopie UV-visible (Figure 98) et l'activité peut être quantifiée par le test de Griess (Figure 99).

En spectrométrie UV-visible, une bande caractéristique des structures hémiques, la bande de Soret, permet de déterminer l'état d'oxydation du Fe et la nature des ligands associés. Dans le cas de la NO-Synthase, les différentes longueurs d'onde associées au sixième ligand du Fe sont données dans le Tableau 7. Avant application de la séquence électrique d'électroformation, la protéine est sous

forme homodimérique, le BH_4 jouant son rôle structural (voir Chapitre 1) et la longueur d'onde du pic de Soret correspond bien au ligand BH_4 (395 nm) (Figure 98). Après application du champ, on remarque le déplacement de cette bande d'absorption spécifique montrant que l'enzyme est dénaturée. Elle n'est plus dans la conformation lui permettant d'être active. Le champ électrique appliqué peut être responsable de cette dégradation mais les conditions expérimentales peuvent également être en cause. En effet, nous avons vu dans le Chapitre 2 que le protocole d'électroformation en milieu PBS nécessite d'appliquer un champ électrique pendant une dizaine d'heures au total, l'enzyme restant pendant ce temps à température ambiante. Ainsi, une dégradation due à une température trop élevée est aussi une hypothèse à prendre en compte pour expliquer ce résultat.

Ligands	H_2O	Imidazole	BH_4	DTT
Longueur d'onde (nm)	417	426	395	350 + 470

Tableau 7 Longueurs d'onde de la bande de Soret de la NO-Synthase inducible en fonction du sixième ligand associé au fer hémique de la protéine.

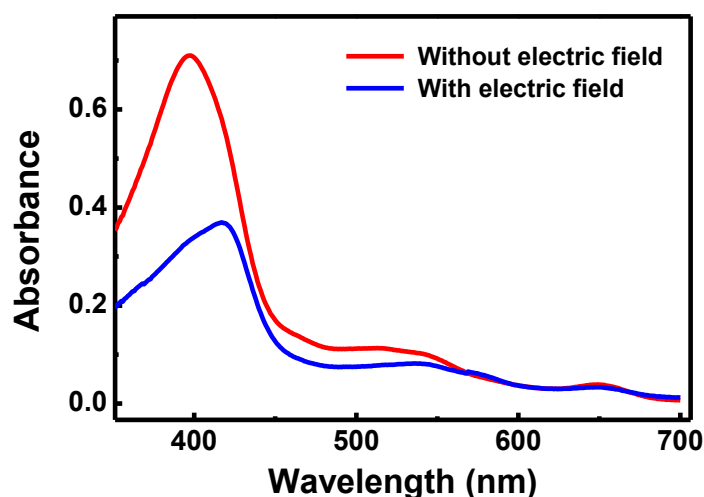


Figure 98 Spectres d'absorbance d'une solution contenant iNOSoxy à 5 μM , BH_4 à 20 μM et L-Arginine à 20 μM . En rouge, la solution n'a pas subi la séquence électrique appliquée lors de l'électroformation. En bleu, la même solution ayant subi la séquence électrique.

Le détail du protocole du test de Griess est donné en annexe (Annexe II.6.b). Brièvement, ce test d'activité permet d'évaluer l'activité de l'enzyme en mesurant la production de nitrites en fonction de la concentration en cofacteur tetrahydrobioptérine (BH_4) et en présence de N^ω -hydroxyarginine (NOHA). Le NOHA est oxydé par iNOSoxy en présence de H_2O_2 menant à la formation des ions nitroxydes $\text{NO}^\cdot$. En présence d'oxygène les ions nitroxydes sont convertis en ions nitrites NO_2^- et nitrates NO_3^- . L'ajout du réactif de Griess (mélange de sulfanilamide et de N-(1-naphtyl)-éthylènediamine) entraîne la formation d'un composé diazo coloré ($\lambda = 548 \text{ nm}$) après réaction avec les nitrites [284]. La mesure de l'absorbance à 548 nm permet de remonter à une valeur de production de nitrites. Une régression hyperbolique de la courbe obtenue permet de calculer trois paramètres cinétiques : la constante de dissociation apparente, K_d ; la vitesse initiale de l'enzyme, V_0 et la vitesse maximale de formation des nitrites V_{max} . A nouveau, le test met en évidence une diminution de l'activité de l'enzyme suite à une exposition à la séquence électrique d'électroformation.

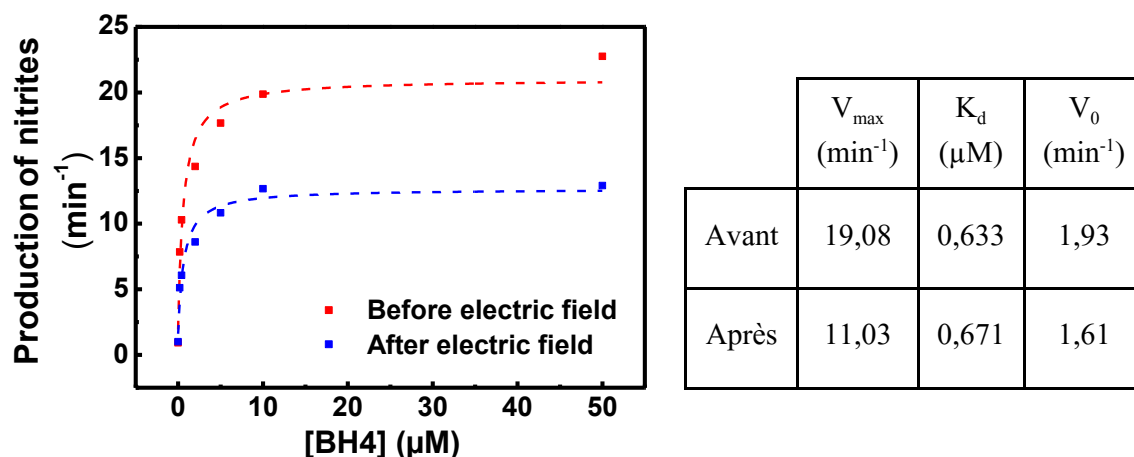


Figure 99 Détermination de l'activité enzymatique d'iNOSoxy (10 μM) par le test de Griess. L'absorbance à 548 nm du composé diazo formé au cours du test est mesurée. En rouge, la solution n'a pas encore subi la séquence électrique appliquée lors de l'électroformation. En bleu, la même solution après avoir subi la séquence électrique.

Cette série d'études contrôles a mis en évidence que les vésicules électroformées n'étaient pas adaptées aux conditions recherchées pour la poursuite de l'étude. La présence de protrusions au pied de certaines vésicules, et donc la possibilité d'une fuite de leur milieu interne, et l'impossibilité de localiser l'enzyme empêchent de travailler dans un environnement contrôlé : l'encapsulation est-elle effective ? quelle vésicule choisir pour l'étude de la réaction enzymatique ?

Par ailleurs, nous avons été confrontés à des problèmes liés à la perméabilité des membranes des vésicules : il peut y avoir diffusion de la resorufine, de l'Amplex Red voire de la HRP. Enfin, le protocole d'électroformation n'autorise l'utilisation que de très faibles concentrations en enzyme et, de toute façon, conduit à sa dénaturation, notamment dans le cas de la NO-Synthase.

Face à trop d'incompatibilités du système, ce sont finalement les vésicules formées à partir de la déshydratation-réhydratation d'une suspension de SUVs qui seront exploitées pour le reste des études présentées par la suite.

II. Microinjection de vésicules unilamellaires géantes

1. Introduction

La microinjection est une méthode de modification du milieu interne d'un compartiment micrométrique, tel qu'une cellule vivante ou une vésicule. Cette technique a été mise au point au début du XX^{ème} siècle par M. A. Barber, a pris son essor à partir des années 70 et est aujourd'hui largement employée en routine, notamment pour des expériences de transgénèse [285]. Cela demande obligatoirement que le compartiment soit clos et qu'il puisse subir des variations de volume. Cette modification du milieu interne des vésicules est envisageable pour des vésicules formées aussi bien par électroformation que par déshydratation-réhydratation. L'avantage de ces dernières est qu'elles sont plus facilement transférables et immobilisables que celles électroformées. De plus, cette technique est particulièrement adaptée aux liposomes formés par déshydratation-réhydratation dont la tension de membrane sera régulée par le transfert de lipides du réservoir vers la membrane. Bien que nous ayons mené quelques expériences de microinjection sur des GUVs électroformées, le faible taux de succès de celles-ci ne représente pas un résultat significatif et ne seront donc pas présentées.

Par ailleurs, les observations du paragraphe I.2.b.i liées à la perméabilité des membranes des liposomes électroformés doivent être prises en compte dans le système GUV avec réservoir. La composition de la membrane des deux systèmes est différente mais il sera utile de contrôler les propriétés de perméabilité des liposomes avec réservoir pour la suite de l'étude. Ces résultats seront présentés dans le paragraphe III.

La microinjection classique consiste à utiliser un micro-capillaire en verre borosilicate. Ce capillaire est façonné de manière à former une pointe de diamètre variable en fonction de l'application, on parlera de micropipette (voir Annexe II.2 pour le protocole de fabrication). Dans le cas de l'injection de liposomes unilamellaires, un diamètre de moins d'un micromètre (200-250 nm) est optimal pour garantir l'efficacité de la microinjection tout en limitant la fuite de la solution en dehors du capillaire (Figure 100) [263]. Les volumes injectés sont de l'ordre du femtolitre et sont régulés en temps et en pression par un système pressurisé à air (voir Annexe I.2).

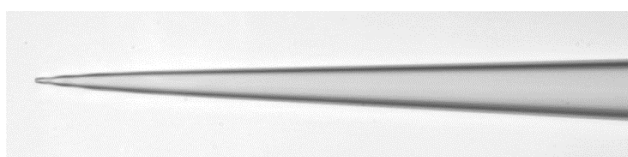


Figure 100 Image obtenue par microscopie optique (x 400) d'un capillaire étiré (micropipette) utilisable pour la microinjection.

La microinjection est une technique de routine largement utilisée sur cellules dans le cas d'expériences de transgénèse ou d'électrophysiologie [285]. Une différence principale existe cependant entre ces expériences et la microinjection de GUVs : le cytosquelette qui assure une certaine rigidité à la paroi cellulaire. Ce détail a toute son importance puisqu'il permet une pénétration aisée du capillaire d'injection dans les cellules. Dans le cas des liposomes unilamellaires, aucune structure interne ne supporte la géométrie de la GUV, la membrane est fine et élastique ce qui rend la microinjection très difficile. L'image d'un doigt pressant un ballon de baudruche illustre très bien l'effet du contact entre la pointe d'un capillaire et la membrane d'une vésicule. Dans ce cas, le paramètre essentiel est la géométrie de la pipette qui doit être la plus fine possible (diamètre externe ~ 200 nm, diamètre interne ~ 100 nm). Ceci entraîne des difficultés d'observation et de contrôle du positionnement en microscopie optique, de même qu'une fragilité évidente de la pipette. Le principal inconvénient lié à

l'utilisation de capillaires aussi fins est qu'ils sont limités à l'injection d'objets (molécules) plus fins que le diamètre interne de la pointe de la pipette, donc parfaitement dissous dans la solution interne pour prévenir toute obstruction.

Dans le cas des essais de microinjection classique menés au cours de cette thèse, la contrainte mécanique n'était pas suffisante pour permettre l'injection d'une solution au sein des liposomes. Différentes géométries des pipettes ainsi que des traitements de surface du verre ont été testés mais sans différence notable. Nous avons donc implanté au laboratoire la technique d'électro-microinjection déjà décrite dans la littérature [263], [286].

2. Electro-microinjection de vésicules avec réservoir

Une bicouche lipidique exposée à un champ électrique agit comme un condensateur de capacité C (F), de constante diélectrique ϵ_m (~ 3), de surface de membrane A et d'épaisseur diélectrique de membrane h_e (dépendant de l'épaisseur de membrane ~ 3 -5 nm) [287] :

$$C = \frac{\epsilon_m \epsilon_0 A}{h_e} \quad (39)$$

La constante diélectrique décrit la polarisabilité de la membrane. Un champ électrique appliqué à travers une membrane change la distribution des charges au sein des deux feuilletts induisant un potentiel transmembranaire. En fonction de la force du champ électrique, la membrane est déstabilisée et des pores (< 1 nm) sont formés [288]. La stabilité des pores dépend de leur taille, ainsi, en deçà d'un certain diamètre, les pores se referment rapidement car l'énergie nécessaire à leur maintien est trop coûteuse. A l'inverse, si le potentiel du champ électrique est suffisamment élevé et/ou appliqué pendant un temps suffisant, les pores peuvent s'étendre, conduisant à une rupture irréversible de la membrane [289], [290].

L'électro-microinjection est donc basée sur la théorie de l'électro-perméabilisation et consiste à utiliser une micropipette équipée d'une électrode pour injecter une solution tout en appliquant des impulsions électriques (*pulses*) de courte durée grâce à un générateur (Figure 101). Un second fil de platine est placé dans le milieu environnant comme contre électrode. L'amplitude du champ électrique des impulsions est de 10 - 40 V.cm⁻¹ appliqué pendant 20 ms.

La pipette est placée en contact avec la membrane de manière à appliquer une légère contrainte mécanique (Figure 102 a). Un *pulse* électrique déstabilise la membrane et il y a création d'un pore localisé au niveau de la pointe de la pipette. Du fait de la légère pression mécanique appliquée sur la membrane, la pénétration de la pipette dans la vésicule est immédiate lorsque l'impulsion électrique est envoyée. Dès lors que le *pulse* est terminé, le pore se referme autour du capillaire et la vésicule regagne sa forme sphérique (Figure 102 b).

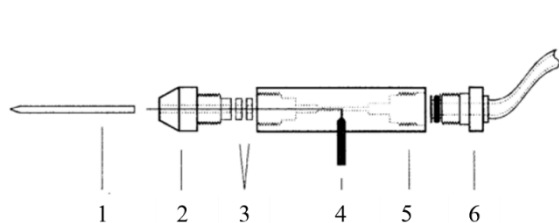


Figure 101 Représentation schématique du système de maintien du capillaire de microinjection (1) servant à la fois d'interface entre le système d'injection (6) et le générateur d'impulsions électriques (4). Le corps du système de maintien (5) est fabriqué en Plexiglas. Il est équipé d'un fil de platine (4) servant d'électrode pour l'électroporation. Ce fil est connecté à une alimentation. Le capillaire de microinjection (1) est fermement maintenu en place par deux joints (3) sécurisés par une vis en Delrin (2). D'après [263].

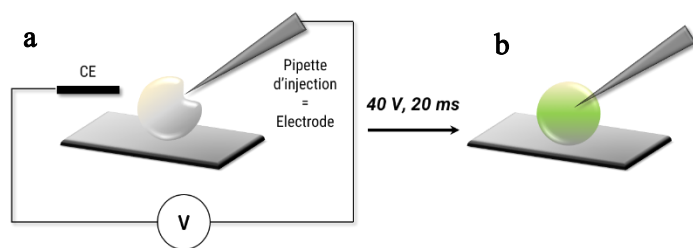


Figure 102 Représentation schématique d'une expérience d'électro-microinjection. (a) La pipette est mise au contact de la membrane avec une légère pression. (b) Une impulsion électrique permet la pénétration de la pipette dans la vésicule qui retrouve sa forme sphérique. [263]

Une pression est ensuite appliquée vers la solution contenue dans la pipette grâce au système pressurisé d'injection (Figure 103). La présence du réservoir de lipides permet, à cette étape, de compenser la tension de membrane induite par l'injection d'une solution dans un volume « fini ». Ici, la vésicule gonfle avec l'injection, le matériel nécessaire à l'augmentation de quantité de membrane étant fourni par le réservoir de lipides.

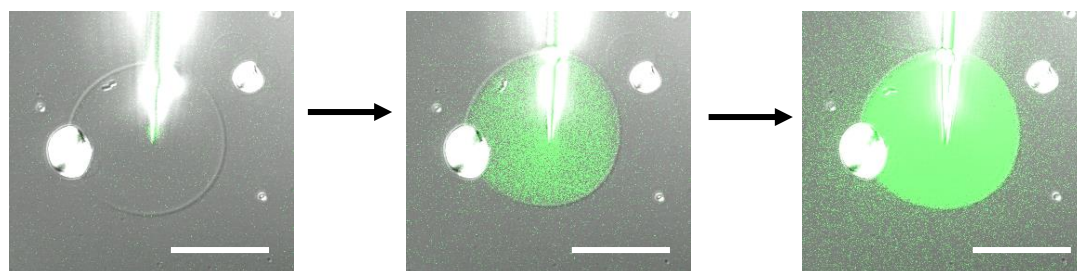


Figure 103 Electro-microinjection (35 s) d'une solution de fluorescéine dans une GUV formée par déshydratation-réhydratation. Images de microscopie confocale. Superposition des canaux d'illumination en contraste de phase interdifférentiel et en fluorescence. Bar d'échelle = 50 μm .

L'électro-microinjection nous permet d'encapsuler un grand nombre d'espèces, y compris des macromolécules et des particules colloïdales (à condition que la taille des objets soit en accord avec le diamètre de la pipette). En combinant la microinjection et l'électroporation, nous avons pu injecter de petites molécules telles que la fluorescéine, la calcéine, l'Amplex Red ou la resorufine ; ou des macromolécules comme la glucose oxydase, la peroxydase de raifort (HRP) ou encore la NO-synthase inductible. Par ailleurs, des particules de polystyrène fluorescentes ont également pu être encapsulées (Figure 104).

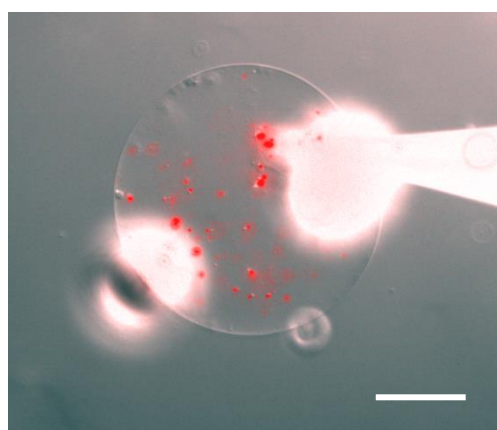


Figure 104 Electro-microinjection de particules de polystyrène (diamètre = 100 nm) fonctionnalisées avec un fluorophore (Nile Red) dans une GUV formée par déshydratation-réhydratation. Image obtenue par microscopie plein champ. Superposition des signaux d'illumination en contraste de phase interdifférentiel et en fluorescence. Bar d'échelle = 25 μm .

Un autre avantage de l'électro-microinjection est son caractère non invasif puisque les amplitudes de champ électrique et le temps des impulsions utilisées permettent aux pores membranaires de se refermer. De plus, les pipettes utilisées peuvent être plus larges (de l'ordre du μm) ne limitant plus l'utilisation des macromolécules qui risqueraient d'obstruer le capillaire d'injection [263]. Enfin, bien qu'il soit difficile de contrôler le volume injecté au cours de l'expérience, il est aisé de déterminer

celui-ci *a posteriori* par analyse des images en mesurant la différence de diamètre de la vésicule avant et après injection. La stabilité de toutes les vésicules n'est pas totalement équivalente mais le diamètre d'une vésicule peut augmenter jusqu'à dix fois sans que la vésicule n'éclate.

Finalement, l'électro-microinjection permet la modification du milieu interne des vésicules de manière contrôlée. Le rendement de cette technique d'injection est de près de 100% et ce pour tous types de molécules ou particules colloïdales (seulement si taille < diamètre de la pipette).

Après addition d'une espèce dans une GUV, nous nous sommes intéressés à la stabilité de ces systèmes et notamment aux propriétés de perméabilité de leurs membranes.

III. Perméabilité des vésicules

1. Observations et hypothèses

Plusieurs éléments nous ont poussés à étudier la perméabilité des membranes des GUVs avec réservoir :

- (1) Tout d'abord, parce que nous avons mis en évidence la diffusion d'espèces vers le milieu extérieur lors des expériences d'encapsulation directe (voir paragraphe I). En effet, des liposomes géants avaient été électroformés en présence d'Amplex Red et de peroxydase. Les vésicules avaient été transférées dans une autre solution de manière à ne pas être dans une configuration où la protrusion au pied de la GUV soit une source de fuite vers le milieu extérieur. Le milieu extérieur avait été lavé avec une pompe péristaltique pour isoler l'enzyme et son substrat dans les microréacteurs. L'ajout de peroxyde d'hydrogène devait, en théorie, provoquer une augmentation localisée de la fluorescence au sein des vésicules. *A contrario*, nous avons observé une augmentation de la fluorescence dans l'ensemble du volume. Nous n'avons alors pas pu conclure sur l'origine réelle de ce phénomène.
- (2) D'autre part, une perte de fluorescence des sondes a été observée après leur injection au sein du micro-compartiment. Notamment, la calcéine et la fluorescéine ont été injectées mais leur signal de fluorescence décroît rapidement dans les minutes suivant l'injection (Figure 105).

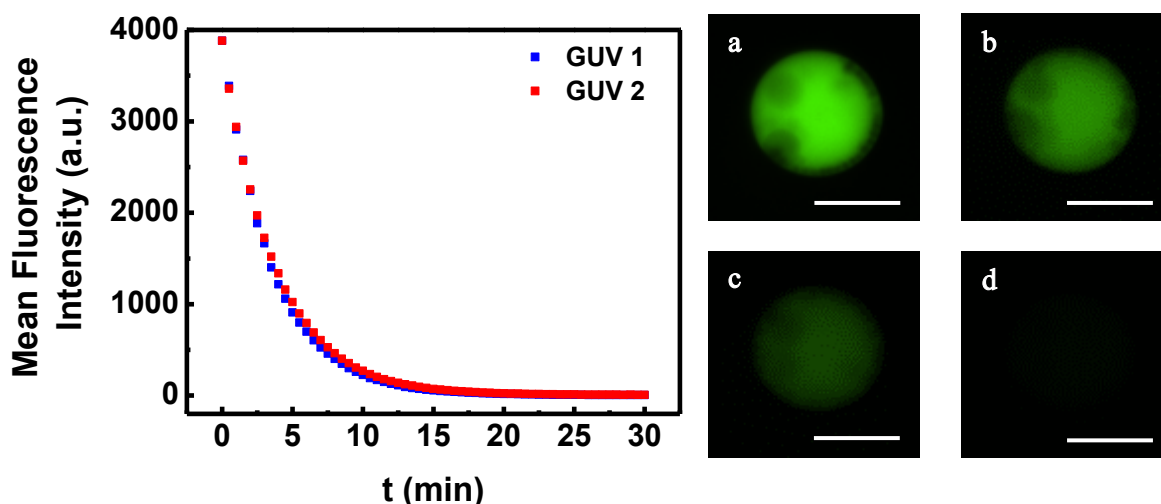


Figure 105 Suivi de la décroissance de fluorescence au sein de deux GUVs différentes. Chacune des vésicules a été injectée avec une solution de calcéine (100 μ M). Les images ont été obtenues par microscopie plein champ. Le signal de fluorescence a été extrait des images au niveau du centre de la GUV et a été normalisé pour chacune des deux vésicules. A droite, quatre images enregistrées à des temps différents après l'injection de la GUV 1. (a) $t = 1$ min. (b) $t = 5$ min. (c) $t = 10$ min. (d) $t = 25$ min. Bar d'échelle = 50 μ m.

Une grande reproductibilité du profil de décroissance du signal a été observé sur différentes vésicules, différentes expériences et ce aussi bien avec la fluorescéine que la calcéine, malgré les différences de structure et donc de charge de ces molécules à pH 7,4.

A partir de ces observations, nous avons formulé plusieurs hypothèses pour tenter d'expliquer ce phénomène :

- a. Le photoblanchiment ; une exposition trop longue à la source de lumière peut entraîner une diminution de la fluorescence jusqu'à son extinction totale et permanente. Ce phénomène est causé par la rupture de liaisons modifiant la structure du fluorophore entraînant le passage irréversible d'un photon excité de l'état singulet à l'état triplé *via* une conversion intersystème. Ceci constitue la première hypothèse expliquant la perte de fluorescence au cours du temps.
- b. Des changements osmotiques ; toutes les expériences de manipulation de GUVs présentées dans ce manuscrit sont réalisées en « réacteur ouvert ». En effet, que ce soit pour des vésicules électroformées ou déshydratées-réhydratées, l'exploitation de celles-ci nécessite que la solution soit exposée à l'air ambiant pour permettre l'accès du micromanipulateur. De plus, les dimensions de tels systèmes impliquent de travailler dans de faibles volumes (le plus souvent 1 mL). Ainsi, l'interface air/solution est très grande par rapport au volume de solution entraînant une rapide évaporation de l'eau au cours de l'expérience. Le milieu extravésiculaire se concentre alors en sels de façon significative conduisant à une différence de pression osmotique entre l'intérieur et l'extérieur des liposomes. On parle alors d'hypotonie des vésicules et d'hyperosmolarité du milieu externe. L'eau contenue dans les vésicules s'échappent pour diluer le milieu externe et qu'il revienne à l'équilibre osmotique. La tension de membrane diminue alors fortement et les vésicules se détendent. L'hypothèse serait que les molécules fluorescentes diffusent avec les molécules d'eau à travers la membrane au moment du rééquilibre.
- c. L'oxydation des phospholipides souvent reportée lors des expériences d'électroformation est évitée dans le cas des vésicules formées par déshydratation-réhydratation. Cependant, bien que les champs électriques appliqués lors de l'électro-microinjection soient de faible durée (20 ms), l'hypothèse d'une éventuelle oxydation des phospholipides de la membrane est prise en compte. Les impulsions électriques peuvent également être responsables de la formation de pores permanents, ce qui serait une source directe de fuite des espèces vers le milieu extravésiculaire. Le principe de l'électroporation irréversible est d'ailleurs aujourd'hui largement développé en médecine pour le traitement de certaines pathologies [289], [290].
- d. La membrane des vésicules jumelées à un réservoir de lipides est composée d'un mélange de lipides naturels ce qui implique la forte probabilité de domaines lipidiques (*rafts*) au sein de la membrane. Dans cette hypothèse, les lipides de la membrane à l'interface avec le réservoir présenteraient plutôt une courbure négative (voir Chapitre 2, paragraphe III.2.a). De plus, toujours dans l'idée de la présence de domaines, si l'on prend en compte les différentes températures de transition des lipides de la membrane, on peut également faire l'hypothèse que certaines zones de la membrane soient plus fluides et d'autres plus rigides. La fluidité étant un paramètre clé dans les phénomènes de diffusion de molécules à travers une membrane phospholipidique, on peut alors penser que la diffusion sera privilégiée dans les zones fluides.

- e. La présence du réservoir de lipides connecté aux vésicules est décrite comme garantissant la stabilité des vésicules lors de la microinjection. Le réservoir fournit le matériel (lipides additionnels) nécessaire à la membrane pour pouvoir équilibrer sa tension. Cependant, bien qu'il soit évident que la vésicule grossisse au cours de la microinjection pour compenser le volume injecté, l'hypothèse que la cinétique de migration des lipides du réservoir vers la membrane soit limitante est envisagée. En effet, les volumes injectés sont de l'ordre du pico- au nanolitre, impliquant, selon la vésicule, que le rayon de celle-ci double quelques secondes après l'injection signifiant que le volume est multiplié par 8 et la surface par 4 quasi-instantanément. Si l'on considère de manière approximative que l'aire par tête polaire d'un phospholipide est de $60 \text{ \AA}^2$ [291], alors pour un liposome passant de $25 \text{ }\mu\text{m}$ de diamètre ($2.10^{11} \text{ \AA}^2$ soit $6,5.10^9$ molécules pour les deux feuillets) à $50 \text{ }\mu\text{m}$ de diamètre ($8.10^{11} \text{ \AA}^2$ soit $2,6.10^{10}$ molécules pour les deux feuillets), le nombre de lipides mobilisés est de l'ordre de 2.10^{10} molécules (1.10^{10} pour chaque feuillet) ! Dans ce cas, l'idée que le dynamisme moléculaire soit trop lent pour compenser efficacement la tension de membrane créée lors de l'injection est envisageable. Ainsi, la théorie des pores transitoires peut être appliquée à de tels systèmes (voir Chapitre 1, paragraphe I.2).

Dans le but de comprendre quel(s) mécanisme(s) expliquerai(en)t les premières observations de perte de signal de fluorescence, nous avons effectué plusieurs expériences contrôles permettant l'éviction de certaines des hypothèses explicitées ci-dessus.

2. Contrôles et conclusions

a. Photoblanchiment

Pour contrôler si la décroissance du signal de la calcéine est due au photoblanchiment, une solution de calcéine ($100\ \mu\text{M}$) a été irradiée dans les mêmes conditions que lors de l'expérience avec les GUVs (exposition pendant 100 ms, toutes les 30 s pendant 1h). Quelques microlitres de solution ont été placés entre lame et lamelle de sorte que seul un faible volume soit irradié. Cet aspect est important sur cette expérience en particulier, puisqu'il s'agit de microscopie plein champ et non confocale. L'épifluorescence a été utilisée ici uniquement dans le but de comparer ce résultat avec celui présenté en Figure 105. Le signal de fluorescence obtenu est légèrement bruité mais ne décroît que très faiblement au cours de l'analyse (Figure 106). Ceci confirme que les observations faites précédemment ne sont pas dues au phénomène de photoblanchiment.

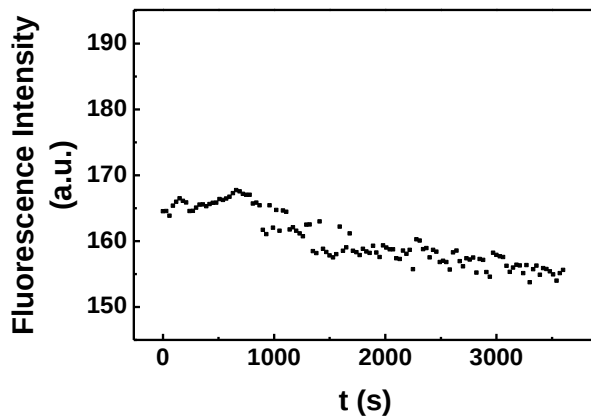


Figure 106 Suivi du signal de fluorescence d'une solution de calcéine ($100\ \mu\text{M}$). Les images ont été obtenues par microscopie plein champ. Le signal de fluorescence a été extrait de la moyenne du signal sur chaque image.

b. Déséquilibre osmotique

L'hypothèse liée au déséquilibre osmotique a rapidement été écartée puisqu'il suffit d'ajouter régulièrement quelques microlitres d'eau à la solution échantillon pour compenser la perte due à l'évaporation. Typiquement, il est conseillé de rajouter $100\ \mu\text{L}$ toutes les heures. En respectant scrupuleusement cette règle, tout déséquilibre osmotique est évité et les vésicules restent stables (diamètre, aspect et régularité de la membrane...) pendant toute la durée de l'expérience. Cependant, un inconvénient subsiste et réside dans la turbulence que crée l'ajout d'une solution dans l'environnement des vésicules. En effet, bien que les vésicules soient immobilisées sur un substrat, la contrainte apportée au moment de l'ajout de l'eau est suffisamment importante pour les détacher. Après deux à trois ajouts, il commence à être fastidieux de trouver un microréacteur exploitable pour la poursuite de l'expérience. Dans ce cas, il est préférable de préparer une nouvelle solution de vésicules. Globalement, en incluant les différentes étapes de séchage, réhydratation, transfert et sédimentation, une quarantaine de minutes sont nécessaires pour obtenir une solution de vésicules fraîchement préparées. Le temps de préparation reste très raisonnable pour permettre un grand nombre d'essais sur une journée.

c. Pores permanents dus à l'électroporation

Tout d'abord, dans l'éventualité où des pores seraient présents dans la membrane, nous avons tenté d'estimer leur taille en injectant une macromolécule de forte masse molaire. Il s'agit d'un polymère, le Dextran, marqué avec une molécule fluorescente (la fluorescéine-isothiocyanate ou FITC) et

dont la masse molaire moyenne est d'environ 70 kDa (Dextran-FITC). Cette molécule possède un rayon hydrodynamique (R_h) de 6,0 nm [292]. Après microinjection, le suivi de la fluorescence à l'intérieur de la vésicule est assuré par microscopie plein champ à raison d'une image enregistrée toutes les 10 secondes pendant 1h (Figure 107). Le signal de fluorescence décroît au cours du temps, montrant que les molécules de Dextran FITC encapsulées sortent de la vésicule. Dans l'hypothèse où des pores existent au sein de la membrane, cela signifie qu'ils doivent faire au moins 12 nm de diamètre. Néanmoins, la présence de pores d'une telle taille semble difficilement envisageable et cette valeur peut être discutée.

D'une part, le rayon hydrodynamique de 6 nm est donné par le fournisseur sans spécification particulière du solvant. Or les conditions de solvation sont primordiales pour l'établissement du rayon hydrodynamique d'un polymère en solution.

D'autre part, le modèle selon lequel un polymère en solution adopte une conformation en « pelote statistique » est très général et des études ont mis en évidence que le Dextran adopterait plutôt une conformation ellipsoïdale lorsqu'il est en solution [293]–[295]. En 1997, Ladokhin *et al.* ont extrapolé les premières données à ce sujet et ont estimé que la longueur du petit axe serait de 2 nm, quelle que soit la masse molaire du Dextran, et que le grand axe mesurerait 44 nm pour un Dextran 70 kDa. Ils ajoutent qu'un pore de 2,5 à 3 nm suffirait pour permettre un passage lent du polymère qui, de plus, serait assisté par des mouvements de reptation [294]. Bien que de nombreuses liaisons hydrogène limitent l'élongation du polymère, le gradient de concentration entre l'intérieur et l'extérieur de la membrane pourrait favoriser la diffusion du polymère et les mouvements de reptation.

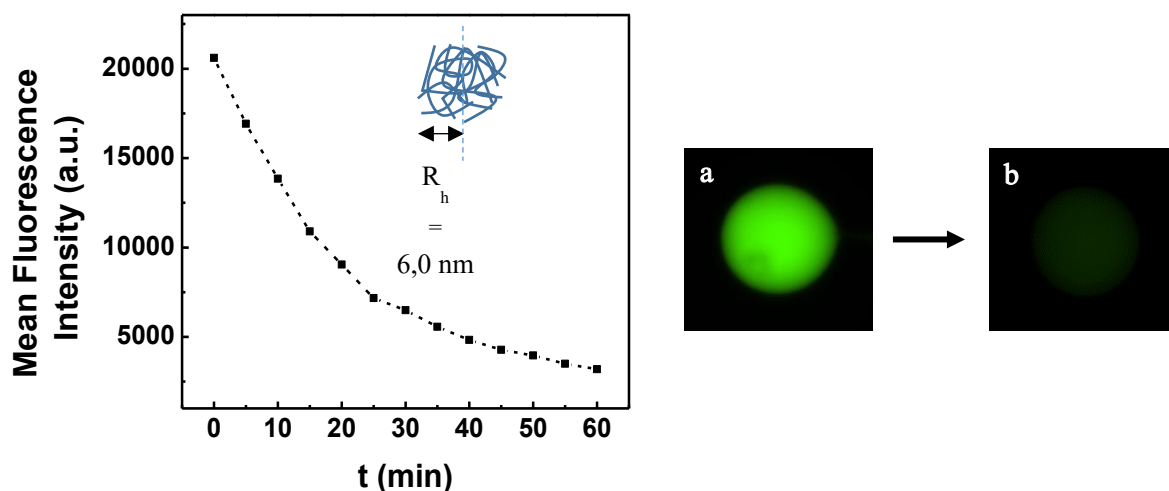


Figure 107 Suivi de la décroissance de fluorescence au sein d'une GUV électro-injectée avec une solution de Dextran FITC 70 kDa (2,5 mg/mL). Les images ont été obtenues par microscopie plein champ. Le signal de fluorescence a été extrait des images au niveau du centre de la GUV. Un schéma de type pelote statistique de polymère représentant une molécule de Dextran de rayon hydrodynamique 6,0 nm est superposée au graphique [292]. A droite, deux images enregistrées après l'injection en début et fin d'expérience. (a) $t = 1 \text{ min}$. (b) $t = 60 \text{ min}$. L'échantillon est illuminé pendant 100 ms toutes les 10 s pendant 1h, ce qui équivaut à un temps total d'exposition de 36 s. Sur le graphique ne sont présentées que les données extraites toutes les 5 minutes.

L'hypothèse de la présence de pores permanents dus à l'oxydation des phospholipides après application d'impulsions électriques ne peut pas être réfutée par cette expérience. Néanmoins, la diffusion du Dextran FITC 70 kDa apporte une indication en termes d'estimation de la taille des pores éventuels, qu'ils soient permanents ou seulement transitoires à environ 3 nm de diamètre.

d. Domaines lipidiques

La présence de domaines lipidiques au sein de la membrane ne peut pas être mise en évidence facilement. Cependant, si domaines il y a, ceux-ci sont dus à la complexité du mélange naturel utilisé (voir Chapitre 2, paragraphe III). En modifiant la composition de la membrane par un mélange plus simple, nous pourrions alors comparer s'il y a une différence de comportement quant à la perte de fluorescence observée.

Néanmoins, le protocole de formation des GUVs par déshydratation-réhydratation est limité en termes de composition. Modifier cette dernière implique de modifier le protocole, notamment la première partie qui consiste à former une suspension de SUVs. Plusieurs essais d'adaptation du protocole pour une autre composition lipidique ont été réalisés au laboratoire, sans succès. En effet, quand il s'agit de former des vésicules, chaque détail expérimental a une influence sur le résultat et la mise au point de protocole de ce type se fait de manière empirique. Ceci nécessite un fastidieux travail d'investigation systématique. Ce point n'étant pas le cœur des travaux de ce projet, nous avons choisi d'étudier le paramètre « composition de membrane » avec des vésicules électroformées.

Quatre compositions de membrane sont comparées et reportées dans le Tableau 8. L'Egg PC a été choisi comme base puisque c'est le mélange de lipides avec lequel toutes les expériences d'électroformation ont été menées jusqu'à présents. Le choix d'ajouter 20 mol.% de cholestérol se justifie car ce ratio permet de rigidifier légèrement la membrane et donc de potentiellement influencer les propriétés de perméabilité des GUVs.

Lipides		Egg PC	SPE	CHS
Pourcentages molaires	1.	100	-	-
	2.	80	-	20
	3.	-	100	-
	4.	-	80	20

Tableau 8 Compositions des membranes des GUVs électroformées en conditions physiologiques utilisées pour le contrôle de perméabilité. Egg PC = extrait naturel de phosphatidylcholine issu de jaune d'œuf. SPE = extrait naturel de graines de soja. CHS = cholestérol.

Les vésicules sont électroformées en tampon PBS (même tampon qu'utilisé pour les GUVs avec réservoir) avec le protocole mis en place au laboratoire et décrit dans le Chapitre 2. Après formation des vésicules, une solution de Dextran FITC (70 kDa) est ajoutée au milieu et le signal de fluorescence est suivi en microscopie confocale. Nous analysons ici la vitesse de pénétration-diffusion vers le milieu intravésiculaire. Puisque les vésicules sont obtenues par électroformation et sont exploitées directement sur l'électrode (lame d'ITO), il faut garder à l'esprit la présence de la protrusion au pied des vésicules électroformées. Celle-ci peut être une porte d'entrée pour les molécules de Dextran vers le milieu intravésiculaire, de même qu'elle était, par ailleurs, une source de fuite des espèces vers l'extérieur (voir paragraphe I.2.a.i). Néanmoins, il est envisageable que les cinétiques de diffusion du Dextran 70 kDa par cette protrusion soient plus rapides que celles nécessaires à la diffusion par la membrane pour des raisons stériques.

Quelques-unes des vésicules analysées sont présentées sur les Figure 108 à Figure 111.

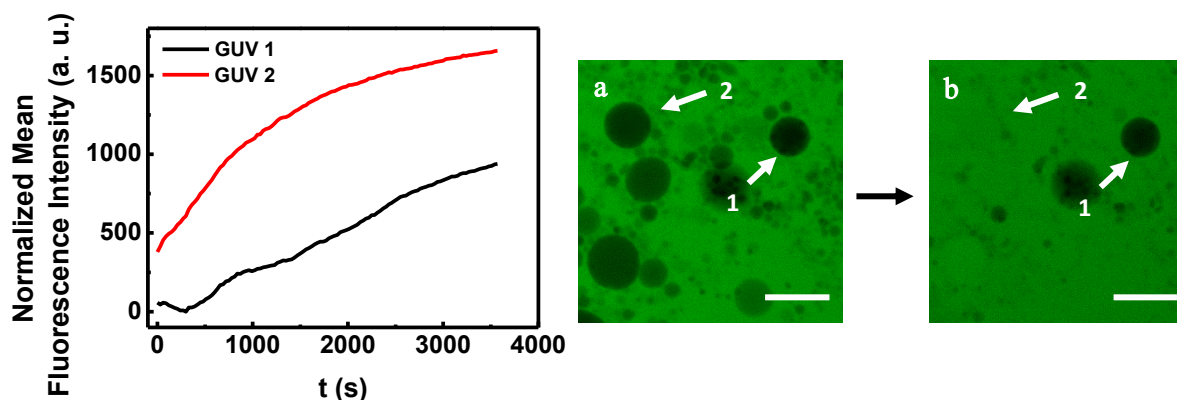


Figure 108 1. **Egg PC 100 mol.%**

Suivi de l'augmentation de fluorescence au sein de GUVs électroformées par diffusion d'une solution de Dextran FITC 70 kDa ([Glucose] = 1,7 mM final – [FITC] = 7 μM final). Les images ont été obtenues en microscopie confocale. Le signal de fluorescence a été extrait des images au niveau du centre des GUVs. A droite, deux images enregistrées après addition de la solution à (a) t = 0. (b) t = 1h. L'échantillon est illuminé toutes les 30 s pendant 1h. Bar d'échelle = 50 μm.

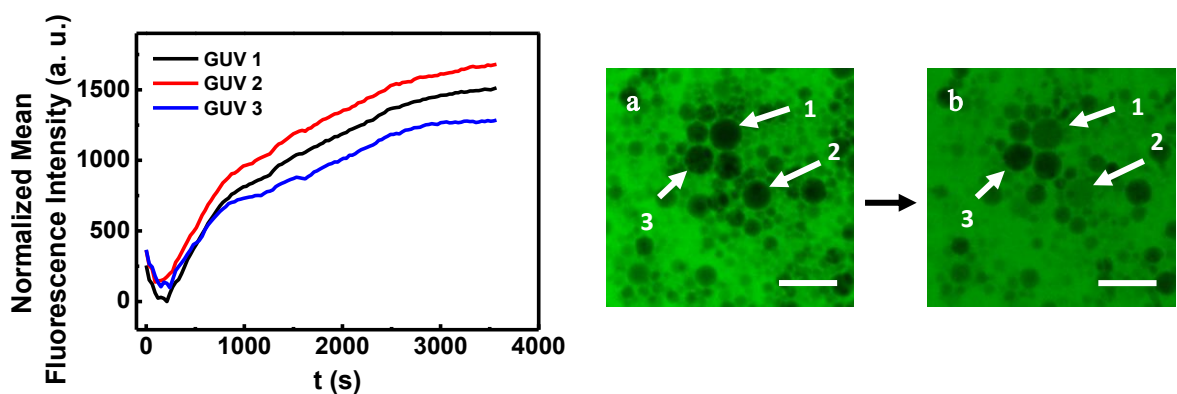


Figure 109 2. **Egg PC 80 mol.% - CHS 20 mol.%**

Suivi de l'augmentation de fluorescence au sein de GUVs électroformées par diffusion d'une solution de Dextran FITC 70 kDa ([Glucose] = 1,7 mM final – [FITC] = 7 μM final). Les images ont été obtenues en microscopie confocale. Le signal de fluorescence a été extrait des images au niveau du centre des GUVs. A droite, deux images enregistrées après addition de la solution à (a) t = 0. (b) t = 1h. L'échantillon est illuminé toutes les 30 s pendant 1h. Bar d'échelle = 50 μm.

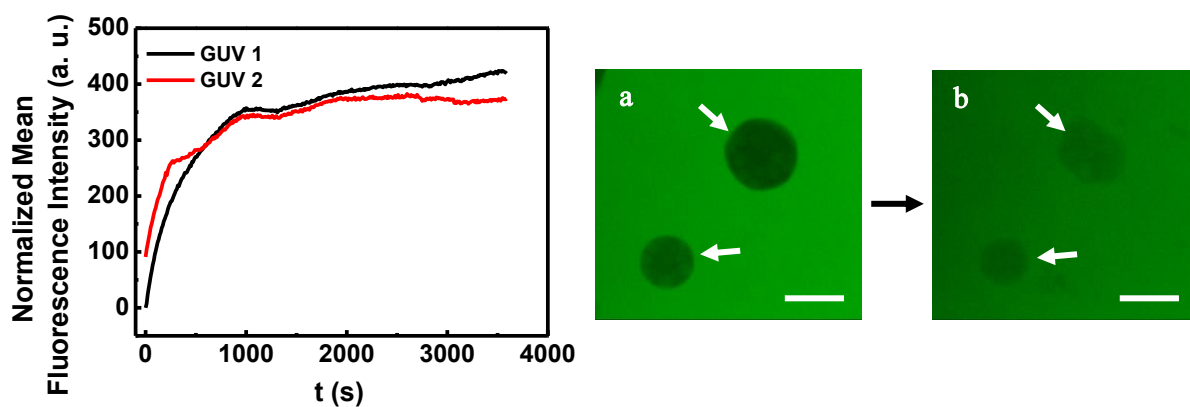


Figure 110 3. **SPE 100 mol.%**

Suivi de l'augmentation de fluorescence au sein de GUVs électroformées par diffusion d'une solution de Dextran FITC 70 kDa ([Glucose] = 3,8 mM final – [FITC] = 15 μM final). Les images ont été obtenues en microscopie confocale. Le signal de fluorescence a été extrait des images au niveau du centre des GUVs. A droite, deux images enregistrées après addition de la solution à (a) t = 0. (b) t = 1h. L'échantillon est illuminé toutes les 10 s pendant 1h. Bar d'échelle = 50 μm.

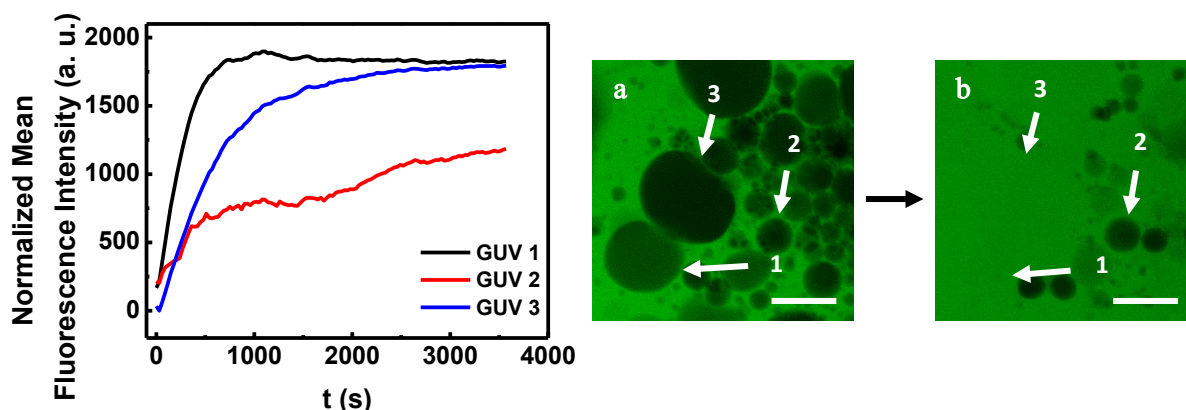


Figure 111 4. *SPE 80 mol.% - CHS 20 mol.%*

Suivi de l'augmentation de fluorescence au sein de GUVs électroformées par diffusion d'une solution de Dextran FITC 70 kDa ([Glucose] = 1,7 mM final – [FITC] = 7 μ M final). Les images ont été obtenues en microscopie confocale. Le signal de fluorescence a été extrait des images au niveau du centre des GUVs. A droite, deux images enregistrées après addition de la solution à (a) $t = 0$. (b) $t = 1$ h. L'échantillon est illuminé toutes les 30 s pendant 1h. Bar d'échelle = 50 μ m.

Pour chaque composition de lipides, une inhomogénéité en termes de cinétique de diffusion est constatée mais une tendance est observée avec une cinétique plus lente pour les deux compositions à base d'Egg PC. Par ailleurs, l'effet de la présence du cholestérol (20 mol.%) n'est pas évident à partir des analyses de ces images. Finalement, entre les deux mélanges (Egg PC et SPE), il semble bien qu'il ait une influence de la composition de la membrane sur la diffusion du Dextran FITC 70 kDa. Celui-ci étant chargé négativement à pH 7,4 (déprotonation du groupement FITC) [296], cet effet pourrait être d'origine électrostatique. En effet, la phosphatidylcholine (seul lipide présent dans Egg PC mais avec différentes longueurs de chaînes et nombre d'insaturations) est un phospholipide zwitterionique donc globalement neutre. Dans la composition plus complexe du mélange SPE (voir Chapitre 2, paragraphe III.2.a), la phosphatidylcholine représente près de 50 wt/wt%. Cependant, environ 25 wt/wt% des phospholipides de ce mélange sont chargés négativement (phosphatidylinositol et acide phosphatidique). Cela peut donc changer à la fois leurs interactions entre eux au sein de la membrane formée, ainsi qu'avec les molécules externes cherchant à diffuser à travers.

Plusieurs hypothèses basées sur la présence de domaines lipidiques peuvent être proposées :

- (1) Un effet de répulsion électrostatique entre les lipides anioniques permettrait d'augmenter le volume entre les têtes polaires des lipides. De plus, selon la théorie de Debye-Hückel, la répartition des ions du milieu extravésiculaire se trouvant dans l'environnement proche de la membrane ne sera pas la même au niveau des phospholipides anioniques conduisant à une concentration en charges positives. Les molécules de Dextran FITC (chargées négativement à pH 7,4) pourraient alors avoir tendance à s'accumuler dans cet environnement par attraction électrostatique. Ainsi, en considérant un effet synergétique entre la répulsion inter-lipides (têtes) et une attraction entre les molécules de Dextran FITC et la couche dense de Stern proches des lipides, alors il est envisageable que la diffusion à travers la membrane soit favorisée.
- (2) A l'inverse, il y a un fort effet de répulsion électrostatique entre les têtes des phospholipides anioniques et les molécules de Dextran FITC et la diffusion n'est possible qu'au niveau des domaines formés de lipides zwitterioniques.
- (3) La formation des rafts lipidiques conduit à la formation de domaines plus fluides permettant alors la diffusion des molécules de Dextran FITC.

Par ailleurs, un dernier test a été effectué pour contrôler si l'homogénéité des cinétiques de diffusion est due à des vésicules avec ou sans protrusion. Pour cela, des vésicules (SPE 100 mol.%) obtenues par électroformation en tampon phosphate ont été détachées, elles sont alors soumises uniquement aux mouvements de convection existants au sein de la solution. Une solution de calcéine (5 μM final) a été ensuite ajoutée à cette solution. Dans cette configuration, il n'est pas possible de suivre le signal de fluorescence d'une GUV en particulier puisqu'elles sont en mouvement permanent. L'idée est d'enregistrer des images dans un plan donné de la solution puis d'analyser toutes vésicules passant dans le champ, poussées par la convection. Une analyse statistique sur plusieurs centaines d'images a mis en évidence que, pour environ 60% des vésicules observées (dans l'approximation où chaque vésicule n'est observée qu'une seule fois), le signal de fluorescence dans le milieu intravésiculaire augmente mais que 30% d'entre elles semblent « imperméables » à la calcéine contrairement à ce qui avait été observé précédemment (Figure 105). La différence réside très certainement dans la statistique. Ici un grand nombre de vésicules ont été analysées sur un même échantillon alors que les observations faites jusqu'à alors sont observées sur 4 à 5 vésicules par échantillon. Finalement, l'in-homogénéité des cinétiques de diffusion semble intrinsèque à un comportant inhomogène des vésicules.

e. Pores transitoires et complément sur l'oxydation des lipides

La présence de pores transitoires dans la membrane, générés par l'existence d'une tension de membrane, se fonde sur l'hypothèse que la cinétique de migration des lipides du réservoir vers la membrane soit limitante est envisagée. Ainsi, un contrôle simple peut être mis en place de la même manière que sur les expériences de contraste négatif décrites dans le paragraphe précédent. Ici, le signal de fluorescence d'une vésicule formée par déshydratation-réhydratation est suivi. Les vésicules gonflent en tampon phosphate grâce au gradient osmotique créé lors de l'hydratation. Elles sont ensuite récupérées puis transférées et immobilisées sur un substrat. Enfin, une solution de Dextran FITC 70 kDa est ajoutée au milieu extravésiculaire. Dans cette configuration, aucun champ électrique n'est appliqué et la membrane n'a subi aucune microinjection. Cette expérience permet donc de faire un double contrôle : (1) pas de tension mécanique donc pas de pores transitoires et (2) absence d'impulsions électriques donc pas d'oxydation des phospholipides. Le signal de fluorescence au niveau de la vésicule est suivi par microscopie confocale (Figure 112).

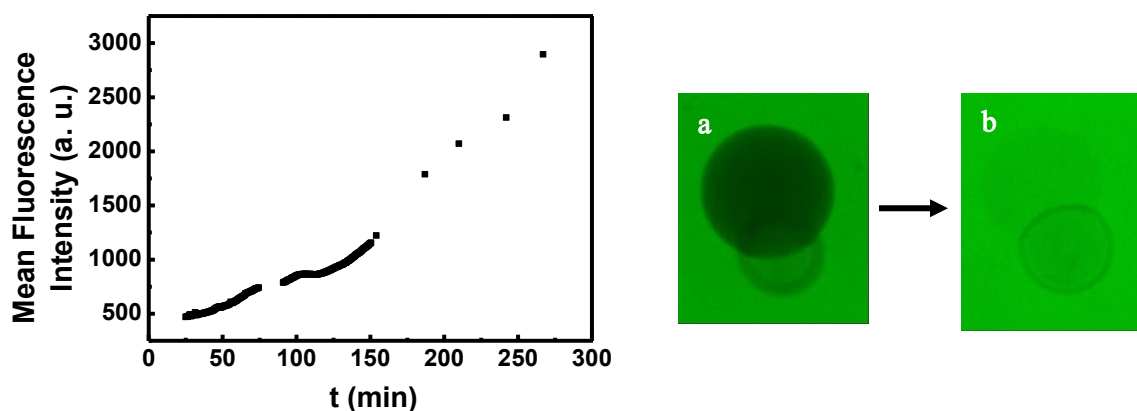


Figure 112 . SPE 100 mol.%

Suivi de l'augmentation de fluorescence au sein d'une GUV avec réservoir par diffusion d'une solution de Dextran FITC 70 kDa ([Glucose] = 1,7 mM final – [FITC] = 7 μM final). Les images ont été obtenues en microscopie confocale. Le signal de fluorescence a été extrait des images au niveau du centre de la GUV. A droite, deux images enregistrées après addition de la solution à (a) $t = 0$. (b) $t = 4,5\text{h}$.

Comme sur les essais effectués avec les GUVs électroformées, nous observons une augmentation de la fluorescence dans la vésicule indiquant que le polymère diffuse progressivement de l'extérieur vers l'intérieur du liposome. Cependant sur la Figure 112, le signal de fluorescence est enregistré pendant plus de 4h. Ainsi si la cinétique de diffusion observée ici est comparée avec celles obtenues pour les vésicules électroformées, il en résulte que celle des GUVs avec réservoir semble *a priori* plus lente. Mais il est difficile de tirer des conclusions générales puisque nous venons justement de définir l'inhomogénéité du comportement des vésicules vis-à-vis de la diffusion des espèces.

Néanmoins, l'équipe à l'origine du développement des liposomes avec réservoir de lipides ont réalisé des études d'encapsulation allant jusqu'à l'étude de réactions enzymatiques dans ces systèmes sans qu'il ne soit jamais fait état d'une fuite dans les proportions où nous l'avons constaté (les GUVs que nous avons utilisés sont identiques en termes de composition et nous sommes équipés avec le même matériel que cette équipe) [277], [297], [298].

Les propriétés de perméabilité des membranes ont été étudiées en microscopie de fluorescence pour tenter de comprendre les mécanismes mis en jeu dans la diffusion des espèces entre l'intérieur et l'extérieur des vésicules unilamellaires phospholipidiques. Cette étude montre qu'il n'y a pas formation de pores permanents après application des impulsions électriques. Nous avons également mis en évidence que les GUVs formées avec les lipides SPE présentent une cinétique de diffusion plus rapide vis-à-vis du Dextran FITC 70 kDa par rapport à celles formées à partir d'Egg PC. Cependant, un comportement inhomogène des vésicules a aussi été observé en regard des cinétiques de diffusion. Chaque vésicule peut avoir un comportement différent et le choix d'une vésicule en particulier, qui pourrait servir de microréacteur, ne peut être fait.

Finalement, après ces nombreux contrôles, nous n'avons pas pu déterminer exactement quel mécanisme permet la diffusion d'espèces (de poids moléculaires et de charges variés) au niveau des vésicules. La réponse est d'ailleurs probablement multiple et tient compte de plusieurs des paramètres évoqués.

IV. Contrôle du déclenchement de la réaction enzymatique

L'objet de ce chapitre est la modification du milieu interne du microréacteur. Les paragraphes précédents reprennent les différentes approches que nous avons mis en place pour répondre aux exigences du système. Nous avons vu que celui-ci est complexe mais l'étude d'une réaction enzymatique telle que le projet le propose se doit d'être réalisée de façon contrôlée. Ainsi, en parallèle de ce qui a été présenté, l'idée de déclencher la réaction enzymatique de façon contrôlée par la formation d'un réseau de vésicules connectées par des nanotubes de phospholipides (*Nanotube Vesicles Network* = NVN) a été développée. Des résultats préliminaires ont été obtenus mais la perméabilité des vésicules s'est avérée ne pas être en adéquation avec ce système, c'est pourquoi nous avons ensuite pris le parti d'utiliser sur ces propriétés particulières de perméabilité en les couplant avec la microinjection.

1. Formation d'un réseau de vésicules connectées par des nanotubes : principe

Les réseaux de vésicules connectées par des nanotubes (NVN) ont été notamment développés par l'équipe d'O. Orwar au début des années 2000 [277], [299]–[303]. La formation de NVN est basée sur les vésicules jumelées avec un réservoir de lipides et la technologie de l'électro-microinjection présentée au paragraphe II.2. L'observation de l'existence de nanotubes lipidiques remonte aux années 70 avec les travaux de W. Helfrich sur la mécanique et la biophysique des membranes qui seront rapidement suivi par d'autres [304]–[307]. E. Evans explique en 1994 que la formation d'un nanotube à partir d'une vésicule ne peut être réalisé qu'à la condition que la tension de membrane le permette ; la vésicule, dite vésicule mère, doit alors posséder un excès de membrane [307]. Ceci peut être obtenu dans le cas où les vésicules ont subi un déséquilibre osmotique par déshydratation du milieu extravésiculaire. Pour tendre vers un retour à l'équilibre osmotique, l'eau contenue dans les vésicules s'échappe vers l'extérieur, celles-ci sont moins gonflées et deviennent plus souples, offrant alors un excès de membrane. Cet effet peut également être apporté par le réservoir de lipides qui agira naturellement comme une source capable de nourrir la membrane du nanotube en formation [303]. La seconde condition physique nécessaire à la formation d'un nanotube est l'application d'une force localisée sur un point en surface de la vésicule et d'énergie suffisante pour tirer un nanotube, c'est-à-dire pour modifier considérablement le rayon de courbure des lipides ; la micromanipulation répond à cette exigence. Cette force est donnée par l'Equation 40 [303]:

$$f = 2\pi\sqrt{2\sigma\kappa_C} \quad (40)$$

où σ représente la tension de membrane (N.m^{-1}) et κ_C est le module d'élasticité (N.m). Quant au rayon R_t du nanotube (m), il dépend uniquement de la tension de membrane et de l'énergie de courbure (module d'élasticité) :

$$R_t = \sqrt{\frac{\kappa_C}{2\sigma}} \quad (26)$$

Il existe plusieurs techniques de formation de NVN et parmi elles, nous nous intéresserons au NVN obtenu par inflation d'une vésicule. Il s'agit de pénétrer une GUV formée par déshydratation-réhydratation par électro-microinjection (Figure 113 a) comme décrit au paragraphe II.2. Ensuite, la pipette est retirée de la vésicule mère entraînant la formation d'un nanotube (Figure 113 b-c). Une vésicule fille est créée au bout du nanotube par injection d'une solution dans le nanotube au niveau

de la pointe de la pipette (Figure 113 d). La nouvelle vésicule est ensuite immobilisée sur un substrat (lame de verre recouverte d'une résine époxy de type SU-8, voir protocole détaillé en Annexe II.4.b) (Figure 113 e). Enfin, la micropipette est retirée de la vésicule par application d'impulsions électriques cathodiques (Figure 113 f). Ces étapes constituent la base de la formation des réseaux de vésicules.

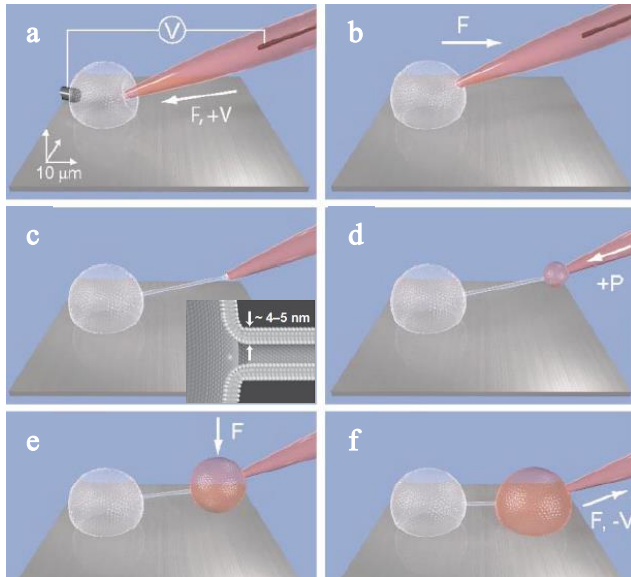


Figure 113 Représentation schématisée des différentes étapes de la formation d'un réseau de deux vésicules connectées par un nanotube utilisant la technique d'inflation de vésicules. (a) La membrane de la vésicule est pénétrée par association d'une force mécanique (F) et d'impulsions électriques anodiques ($+V$). (b-c) Un nanotube est formé quand la pipette est retirée de la vésicule mère. La membrane du nanotube est la même que celle de la vésicule, c'est-à-dire, une bicouche de phospholipides d'environ 5 nm d'épaisseur. (d) Une vésicule fille est créée au bout du nanotube par injection d'une solution dans le nanotube au niveau de la pointe de la pipette. (e) La nouvelle vésicule peut être immobilisée sur un substrat (lame de verre recouverte d'une résine photosensible SU-8) en appliquant une légère force axiale (F) par translation de la pipette. (f) La micropipette est hottée de la vésicule par translation transversale de la pipette (F) et application d'impulsion électriques cathodiques ($-V$).

Dans la suite du protocole de formation de NVN, il s'agit de répéter les mêmes étapes pour former de multiples vésicules filles. Néanmoins, plusieurs géométries de NVN existent et sont plus ou moins complexes. En effet, la première possibilité est de répéter les étapes de la Figure 113 et un réseau de vésicules filles toutes connectées à la vésicule mère peut être ainsi obtenu. Par ailleurs, il est également possible, après formation de la première vésicule fille et immobilisation, de poursuivre la formation d'une seconde vésicule fille de manière analogue aux étapes b à e. La vésicule mère continue de fournir les lipides nécessaires pour la création de cette vésicule même *via* l'intermédiaire de la première vésicule fille.

Dans le cadre de notre projet, l'idée de base était d'utiliser cette technologie pour déclencher la réaction enzymatique de manière contrôlée. Dans le cas de l'étude de la NO-Synthase, une première vésicule fille pourrait être formée avec l'enzyme et les cofacteurs lui permettant d'être dans sa conformation active (BH_4 , L-Arginine, calmoduline) (Figure 114 a-c). La GUV serait ensuite déposée sur le substrat SU-8 puis la pipette serait retirée. Une seconde vésicule est formée mais, cette fois, avec le substrat (NADPH) (Figure 114 d). Le système est alors dans une configuration où deux vésicules filles sont connectées à la vésicule mère et une des vésicules est toujours connectée à la pointe de la pipette. Cette dernière est alors déplacée de sorte que les deux nanotubes se réarrangent sous l'effet de la minimisation de l'énergie libre du système (Figure 114 e-f). En effet, du fait la continuité de la membrane, les propriétés d'auto-assemblage constituent alors un outil fascinant. Comme mentionné précédemment, l'énergie de surface est répartie de façon inhomogène sur l'ensemble du réseau, cette différence étant liée aux rayons de courbure des lipides dans la membrane, très important pour le nanotube mais très faible voire nul pour la GUV. L'énergie libre d'un nanotube de lipide est si élevée que celui-ci ne peut pas exister naturellement s'il n'est pas attaché entre deux points. En cas de détachement, le nanotube se rétracte et se réincorpore à la vésicule. De manière analogue, lorsque nos deux vésicules filles sont connectées à la même vésicule mère, et qu'une des vésicules est déplacée, vient un moment où les deux nanotubes se rencontrent. Ils vont alors se réarranger de façon à

former une jonction à trois voies (*three-way junctions*) avec un angle de 120° entre les trois voies (Figure 114 e, Figure 115), ceci constituant la configuration de moindre énergie. La vésicule fille continue d'être déplacée jusqu'à ce que les nanotubes se soient réarrangés pour former une connexion directe entre les deux vésicules filles, l'une contenant l'enzyme et l'autre le substrat (Figure 114 f). La dernière étape consiste simplement à rapprocher les deux vésicules filles (Figure 114 g). Au-delà d'une certaine distance, les deux vésicules filles fusionnent et les réactifs sont mis en présence les uns des autres quasi-instantanément : la réaction enzymatique est initiée (Figure 114 h).

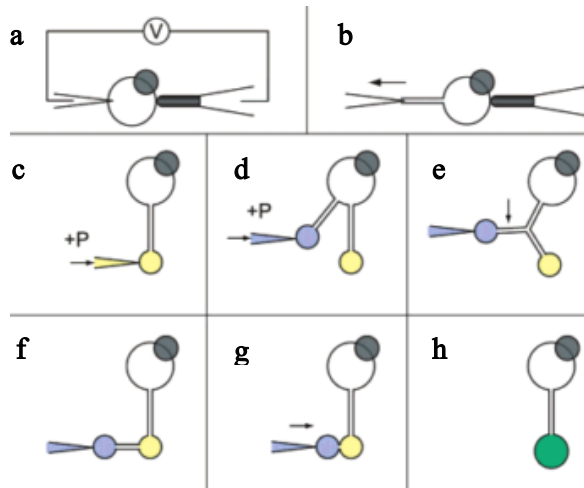


Figure 114 Représentation schématisée de la technique basée sur la formation de NVN pour contrôler le déclenchement d'une réaction enzymatique. (a) Au départ une vésicule jumelée à un réservoir de lipide est électroporée avec une micropipette. (b) Un nanotube est étiré de la vésicule mère. (c) Une première vésicule fille est formée sur la pointe de la pipette puis est immobilisée sur un substrat et la pipette est retirée. Elle est injectée avec une solution contenant l'enzyme. (d) Une seconde vésicule fille est formée avec une solution contenant le substrat de l'enzyme. (e) La seconde vésicule fille est déplacée, le nanotube se réarrange par minimisation spontanée d'énergie de surface en jonction à trois voies. (f) La seconde vésicule est déplacée de façon à obtenir une connexion directe entre les deux vésicules filles. (g) En déplaçant la seconde vésicule fille, le nanotube est consommé par les vésicules, diminuant ainsi l'énergie élastique de la totalité de la membrane. (h) Après une certaine distance, la membrane se réarrange et les deux vésicules filles fusionnent pour ne former qu'une seule vésicule sphérique. Les réactifs sont en présence les uns des autres : la réaction enzymatique est déclenchée. [277]

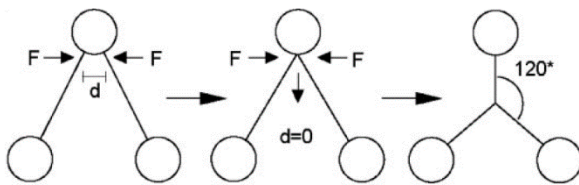


Figure 115 Représentation schématisée de l'auto-assemblage des nanotubes dans un réseau de trois vésicules. Quand deux nanotubes émanant d'une vésicule centrale dans un réseau en V se rejoignent, il y a coalescence et formation d'une jonction à trois voies qui se positionne aux coordonnées correspondant à un arrangement de moindre énergie. [303].

Le développement des réseaux de vésicules connectées par des nanotubes a ouvert de nouvelles voies pour l'étude du transport de matière dans les nanotubes. Globalement, dans le cas du réseau utilisé ici, on peut considérer comme négligeable la diffusion d'espèces dans le nanotube étant donnée la faible probabilité qu'une molécule atteigne l'entrée du nanotube. En effet, le diamètre de celui-ci n'étant que de quelques dizaines à centaines de nanomètres, il est statistiquement difficile qu'une molécule diluée dans le volume total de la vésicule atteigne le nanotube. Ainsi, le temps nécessaire au transport par simple diffusion est très long (ordre de l'heure) en comparaison des temps nécessaires à cette expérience (5 à 10 minutes) [264]. Les recherches portant sur le transport de matière au sein des nanotubes s'appuient sur des stimulations mécaniques des vésicules pour forcer la convection et le passage des molécules vers la seule sortie disponible, à savoir le nanotube [264], [303], [308]. Par ailleurs, A.S. Cans *et al.* ont utilisé les possibilités offertes par les NVN pour simuler des phénomènes d'exocytose vésiculaire [309], [310].

2. Déclenchement réactionnel contrôlé par minimisation d'énergie libre

Cette technique a été mise en place au laboratoire et nous a permis de former les réseaux nécessaires pour déclencher une réaction enzymatique (Figure 116).

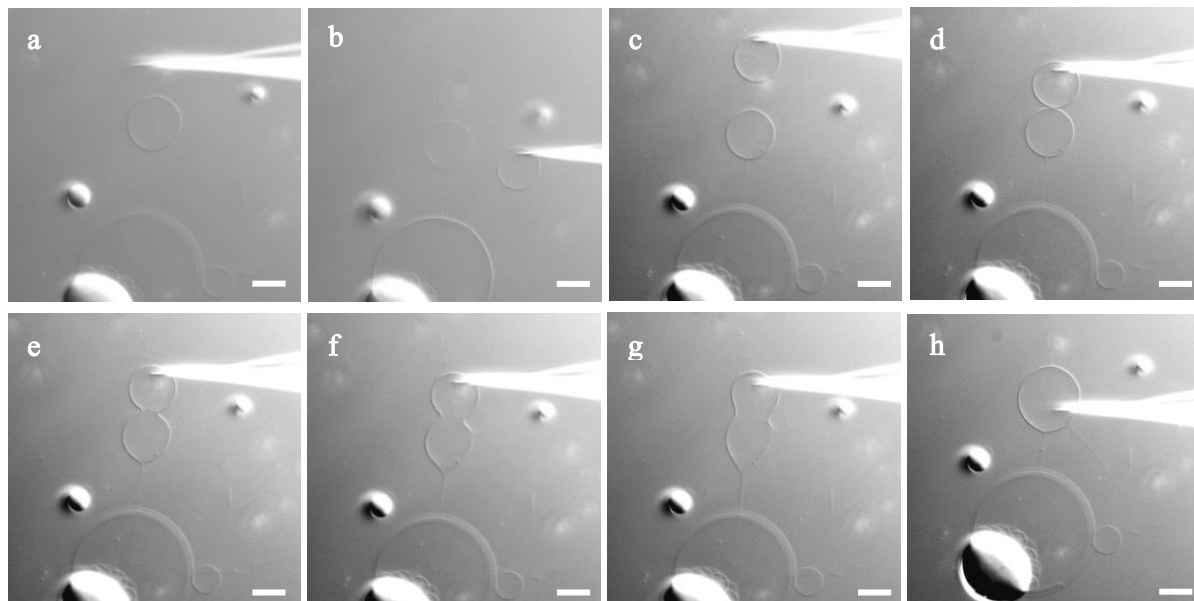


Figure 116 Formation d'un NVN et fusion de deux vésicules filles pour le déclenchement de la réaction enzymatique. (a) La première vésicule fille a été formée et immobilisée sur la résine SU-8. Le focus est fait sur la vésicule fille. (b) Une seconde vésicule a été formée sur la pointe de la pipette et les trois vésicules forment un réseau en V avec la vésicule mère au centre de ce réseau. Le focus est fait sur la vésicule mère et la deuxième vésicule fille. (c) La deuxième vésicule a été déplacée de sorte que le nanotube s'auto-assemble et permette une connexion directe entre les deux vésicules filles. (d) Les deux vésicules sont mises en contact. (e-g) Les deux vésicules fusionnent. (h) Une vésicule sphérique est issue de la fusion des deux vésicules filles. Images de microscopie plein champ illuminées en contraste de phase interférentiel. Bar d'échelle = 10 μ m

Cependant, les propriétés de perméabilité des membranes mises en évidence au paragraphe III nous ont obligés à repenser notre stratégie. En effet, bien que le temps nécessaire à la formation du réseau ne soit que de quelques minutes, ce temps est suffisant pour perdre le contrôle sur les concentrations en espèces présentes dans les vésicules. Si les concentrations ne sont plus connues, alors l'analyse quantitative des espèces produites ne devient plus possible.

En conclusion de ce troisième chapitre, face à la complexité des phénomènes mis en jeu dans les systèmes de vésicules développés (électroformées ou réhydratées), nous avons dû adapter nos stratégies de modification du milieu interne du microréacteur pour rester dans des conditions contrôlées. D'une part, l'encapsulation directe au cours de l'électroformation s'est montrée limitante à cause de la protrusion existante au pied de la vésicule, de même qu'à cause de la dénaturation de l'enzyme NO-synthase au cours de la formation des vésicules. Ensuite, l'électro-microinjection et la formation d'un réseau de vésicules pour un déclenchement contrôlé de la réaction semblait être une approche prometteuse, mais des problèmes de contrôle des concentrations des espèces se sont posés, dus aux propriétés de perméabilité des membranes.

Finalement, la stratégie qui sera adoptée pour la suite de l'étude consistera à conserver les vésicules jumelées au réservoir de lipides, de même que l'électro-microinjection mais nous allons maintenant jouer avec les propriétés de perméabilité des membranes afin d'adapter les conditions expérimentales au système.

Chapitre 4 : Couplage entre électrochimie et microscopie de fluorescence pour la détection des espèces produites

Chapitre 4 : Couplage entre électrochimie et microscopie de fluorescence pour la détection des espèces produites

En chimie analytique, l'électrochimie intègre une gamme de techniques permettant la caractérisation d'un grand nombre de systèmes, à condition que l'espèce sondée soit électroactive. Les deux principales techniques pour l'analyse de réactions faradiques sont la voltamétrie cyclique et la chronoampérométrie. En voltamétrie cyclique, des variations de potentiels, linéaires ou par incréments, sont appliquées et c'est la quantité de courant traversant l'électrode qui est suivie en fonction du potentiel. Cette technique permet d'étudier à quel potentiel une réaction redox a lieu au sein d'une solution. En chronoampérométrie, le potentiel est fixé à une certaine valeur (potentiel d'oxydation ou de réduction de l'espèce étudiée, souvent déterminé en amont par voltamétrie cyclique) et le courant est suivi au cours du temps. Les variations de courant au cours du temps informent sur la dynamique des réactions redox. De plus, le courant est relié aux concentrations des espèces électrolysées et ces techniques permettent donc de faire des études quantitatives.

Par ailleurs, la microscopie optique permet l'observation d'objets en lumière blanche, en fond noir et par stimulation de sa luminescence, notamment par fluorescence. Les systèmes de détection sont multiples et permettent l'obtention d'images plus ou moins résolues. Typiquement, la résolution minimale des microscopes optiques est de l'ordre de la longueur d'onde, c'est-à-dire de quelques centaines de nanomètres (échelle submicrométrique).

De manière générale, en chimie analytique, l'avantage de coupler plusieurs techniques de caractérisation réside dans leur complémentarité. Dans ce projet, l'association de l'électrochimie et de la microscopie optique présente l'intérêt de combiner la sensibilité de l'électrochimie (détection de concentrations nano- à micromolaires) avec la résolution spatiale de la microscopie [57]. En particulier, la résolution de la microscopie optique est en accord avec celle des microréacteurs utilisés et de l'échelle des processus de diffusion (μm). Les premiers travaux de couplage entre l'électrochimie et la microscopie de fluorescence plein champ datent des années 90 avec les études menées par Engstrom *et al.* qui ont imagé, au niveau de l'électrode, des réactions mettant en jeu des transferts de protons (réduction de l'eau et de l'oxygène, formation d'oxydes) grâce à une sonde fluorescente sensible au pH (fluorescéine) [311]–[313]. À partir de 2002, Unwin *et al.* ont couplé l'électrochimie et la microscopie confocale à balayage (EC-CLSM) et ils ont montré que cette technique était quantitative dans une étude dans laquelle la fluorescéine réagit sous l'effet d'un transfert de protons généré lors de la réduction de la benzoquinone en hydroquinone [314] ou lors de la réduction de l'eau ou de l'oxygène [315].

Ces travaux pionniers reposent sur la réactivité électrochimique d'une sonde redox, conduisant à un transfert de proton impliqué dans la réactivité ou l'équilibre acido-basique d'une espèce fluorescente. Cependant, il est aussi possible de générer la fluorescence par oxydation ou réduction directe d'une espèce fluorogénique, on parle alors d'électrofluorochromisme. Aujourd'hui un grand nombre d'études sont basées sur ces phénomènes [57], [316]–[321]. Au cours de notre étude de la réaction bienzymatique d'oxydation du glucose catalysée par la glucose oxydase (GOX), suivie de l'oxydation de l'Amplex Red (AR) catalysée par la peroxydase, nous avons mis en évidence le caractère électrofluorogénique de l'Amplex Red [322] ; ces travaux seront présentés dans la première partie de ce chapitre.

Cette réaction a ensuite été étudiée en microréacteur biomimétique. Tout d'abord, c'est l'ensemble de la réaction bienzymatique qui a été caractérisée en microscopie confocale grâce à la production du fluorophore, la resorufine, ce qui a permis de mettre en évidence les propriétés de perméabilité des vésicules vis-à-vis des espèces étudiées. Ensuite, la première partie de la réaction mettant en jeu la GOX a été analysée par électrochimie *in situ* sur ultramicroélectrodes à fibre de carbone. En plus de l'avantage qu'offre la taille de ces électrodes par rapport au système étudié (micrométrique), l'intérêt particulier des UME (voir Chapitre 1) est lié à l'établissement de régimes de diffusion sphérique à des échelles de temps de l'ordre de la seconde, permettant de détecter un courant stationnaire en chronoampérométrie.

Enfin, nous avons étudié les activités enzymatiques des NO-Synthases. Des résultats préliminaires relatifs à la détection du monoxyde d'azote et des nitrites ont mis en évidence des possibilités d'analyses très intéressantes mais aussi un certain nombre de blocages méthodologiques pour l'étude de ce type d'oxygénases en solution et à l'échelle d'un microréacteur (GUV).

I. Etude de l'oxydation directe de l'Amplex Red en resorufine

Dans l'idée de caractériser l'activité de la réaction bienzymatique glucose/GOX/AR/HRP, il nous a fallu commencer par une étude préliminaire en solution permettant la caractérisation des propriétés redox des espèces du système par électrochimie.

Avant de s'intéresser aux réactifs, commençons par expliciter quelques caractéristiques du produit final : la resorufine (RS). C'est une sonde absorbant dans le visible, fluorogénique et sensible au pH. Son pK_a a été déterminé à 5,95 par spectroscopie UV-visible pour différentes valeurs de pH en tampons de Britton-Robinson (voir détails en Annexe II.5) ; ce résultat est en accord avec les valeurs de pK_a reportées et obtenues dans divers solvants (entre 5,7 et 6,8) [323], [324]. Après solubilisation, cette molécule présente une coloration rose avec un maximum d'absorption à 572 nm pour un coefficient d'extinction molaire de $56 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ($\text{pH} > 7,5$) [325]. C'est également une espèce fluorescente dont le maximum d'émission se trouve à 583 nm pour un rendement quantique équivalent à $\Phi = 0,81$ dans l'eau à pH 8,5 [326]. En termes de propriétés redox, la RS présente un groupement iminoquinone électroactif (Figure 117). Une réduction réversible à deux électrons conduit à la formation de la dihydroresorufine (DH), forme qui ne présente pas de propriété photochimique particulière. Ainsi, la resorufine présente un caractère fluorogénique puisque sa fluorescence peut être contrôlée par réduction chimique ou électrochimique à la surface d'une électrode. De plus, puisque cette réaction est réversible, la fluorescence est contrôlée en fonction de l'état redox de l'espèce : la forme oxydée (RS) allume la fluorescence tandis que la forme réduite (DH) l'éteint. Cependant, la dihydroresorufine n'est pas stable et s'oxyde spontanément en resorufine en présence d'oxygène. Les propriétés fluorogéniques de la resorufine étant très intéressantes, une forme protégée de la DH a été synthétisée pour permettre l'utilisation des propriétés de la RS en condition aérées : il s'agit de l'Amplex Red (AR).

L'AR (*N*-acetyl-3,7-dihydrophenoxazine) est une sonde moléculaire largement utilisée en biochimie. Cette molécule porte un groupement acétyl sur l'azote du cycle 1,4-oxazine de la dihydroresorufine, ce qui équivaut donc à une forme protégée de celle-ci et lui permet d'être stable en

présence d'oxygène (Figure 117). L'AR est aujourd'hui commercialisé, souvent sous forme de kit, et sert de test de routine pour la détection d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS et RNS), catalysée par des enzymes (peroxydases, oxygénases, hydrogénases) [327]–[329].

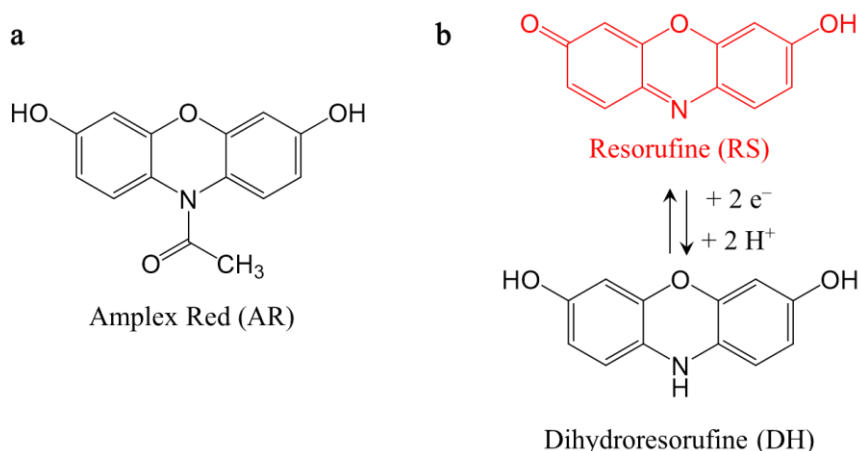


Figure 117 (a) Structure chimique de l'Amplex Red (AR). (b) Réduction électrochimique de la resorufine (RS) en dihydroresorufine (DH).

Cependant, comme déjà explicité dans le Chapitre 1 (paragraphe II.1.b.ii), ces tests doivent être conduits dans des conditions spécifiques pour garantir une analyse quantitative. En effet, l'instabilité à la lumière de l'AR est une des principales sources d'erreur. Celui-ci est facilement photo-oxydable et il est donc impératif de le solubiliser seulement juste avant l'expérience et de toujours travailler dans des conditions de faible luminosité. Par ailleurs, des interférences entre l'AR et d'autres réactifs entraînent une diminution de la précision et de la sensibilité des tests basés sur la réactivité de l'AR.

L'AR et la RS sont faiblement solubles en solution aqueuse à pH 7,4 et il est nécessaire de les solubiliser dans du DMSO. Des solutions stocks concentrées sont préparées puis diluées à la concentration souhaitée en tampon PBS pH 7,4 (phosphates 10 mM, NaCl 138 mM, KCl 2,7 mM).

Cette étude couple d'une part, l'électrochimie qui permet de sonder les propriétés redox des espèces ; ici, c'est l'électrode qui assure le transfert d'électrons à la place d'une enzyme, et d'autre part, la spectroscopie et la microscopie de fluorescence permettent de visualiser la formation ou consommation de la resorufine sous contrôle électrochimique.

La première partie de l'étude a mis en évidence une oxydation directe de l'AR par électrochimie, puis nous avons identifié le produit issu de cette oxydation par spectroélectrochimie et complété la caractérisation en imageant la surface de l'électrode par microscopie confocale sous contrôle électrochimique. Ces résultats ont été publiés en 2016 [322].

1. Mise en évidence d'une oxydation directe de l'Amplex Red par voltamétrie cyclique

Une étude par voltamétrie cyclique a été réalisée sur macroélectrode de platine (diamètre 1,7 mm) avec des solutions tamponnées (PBS 10 mM, pH 7,4) d'Amplex Red (AR) et de resorufine (RS) à $2,5 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹. La vitesse de balayage a été tout d'abord fixée à 0,05 V.s⁻¹ et trois gammes de potentiels ont été étudiées (toutes les valeurs de potentiels sont exprimées par rapport à l'électrode de référence Ag/AgCl).

Sur la Figure 118 a, le balayage en potentiel est effectué de 0 V à - 0,85 V. On observe pour la resorufine une vague de réduction ($I < 0$) dont le potentiel de pic est proche de - 0,5 V, puis sur le balayage retour, une vague d'oxydation ($I > 0$) à - 0,25 V. Ce couple de vagues correspond à un système électrochimique réversible de transition de la resorufine à la dihydroresorufine ($RS \leftrightarrow DH$) impliquant le transfert de deux électrons et deux protons (Figure 117 b). Le voltampérogramme de l'AR ne présente qu'un épaulement à environ - 0,65 V correspondant à une réduction qui semble irréversible bien qu'un large épaulement soit observé en oxydation à environ + 0,5 V. Aucun courant faradique n'est clairement identifié ce qui semble montrer que la resorufine ne soit pas formée par électrochimie dans ces conditions expérimentales. Ce résultat n'est pas en accord avec l'étude de Gajovic-Eichelmann *et al.* [330] mais, leurs résultats avaient été obtenu dans un tampon différent et à pH 5. Dans ces conditions, le pH est inférieur au pK_a de la RS (5,95) ce qui modifie ses propriétés de solubilité en solution aqueuse et donc probablement les cinétiques de transfert d'électrons. De plus, les réactions redox étudiées ici mettent en jeu un transfert de protons. Ainsi, le potentiel du couple sera décalé, d'après le principe de Le Châtelier et selon l'équation de Nernst, puisqu'il y a génération de protons :

$$E_{pH\ 5} = E^0 - \frac{0,06}{n} \log \frac{[DH]}{[RS]} \quad (41)$$

$$E_{pH\ 7,4} = E^0 - \frac{0,06}{n} \log \frac{[DH]}{[RS^-][H^+]} \quad (42)$$

Par ailleurs, le pK_a de l'AR étant donné à 8,5 [331], celui-ci conserve les mêmes propriétés de solubilité dans notre étude et celle proposée par Gajovic-Eichelmann [330] et le potentiel d'oxydation n'est pas influencé par la génération de protons. On note que la formation de protons lors des réactions redox de la RS ne doit pas influencer le pH de la solution puisque, d'une part, seule une faible quantité de RS est oxydée, les réactions électrochimiques n'ayant lieu qu'à la surface de l'électrode, et d'autre part, du fait de l'effet de la capacité du PBS.

Sur la Figure 118 b, le potentiel est balayé de 0 V à + 0,55 V. Ici, la courbe de la RS ne présente aucune vague, alors que l'AR est oxydé de façon irréversible à + 0,40 V.

Enfin, sur la Figure 118 c, le balayage commence à 0 V, passe par - 0,90 V puis remonte à + 0,60 V. A nouveau le système $RS \leftrightarrow DH$ est observé de manière réversible sur le voltampérogramme de la RS. Par ailleurs, sur le signal de l'AR, le pic d'oxydation déjà mis en évidence sur la Figure 118 b est à nouveau visualisé. De plus, un système réversible est observé aux mêmes potentiels que le vague de réduction de la RS et d'oxydation de la DH. Ces deux vagues n'apparaissent pas au premier balayage mais seulement à partir du second montrant leur dépendance avec l'oxydation de l'AR.

L'hypothèse émise est que l'AR est d'abord oxydé en RS à + 0,40 V puis que la RS électrogénérée, peut être réduite en DH, elle-même électrogénérée puis oxydée en RS de manière réversible, d'où l'apparition des vagues à - 0,50 V (RS → DH) et - 0,25 V (DH → RS) à partir du second balayage.

Ensuite, dans le but de déterminer si la cinétique du processus électrochimique dépend plutôt de la diffusion ou de l'adsorption, des voltampérogrammes ont été enregistrés pour différentes vitesses de balayage. Une relation linéaire entre le courant du pic anodique (vague d'oxydation) de l'AR et la racine carrée de la vitesse de balayage est mise en évidence, démontrant alors que le mécanisme redox est sous contrôle diffusionnel. Le coefficient de diffusion de l'AR peut être déterminé à partir des données de la Figure 118 d. Le calcul, basé sur l'équation de Randles-Ševcik, prend en compte la pente de la droite et est fait dans l'hypothèse d'une réaction redox à deux électrons suivie d'une réaction chimique de dismutation [331]. Le coefficient de diffusion est calculé à $4,8 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et apparaît légèrement plus élevé que celui de la resorufine, reporté dans la littérature à $1,9 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [57].

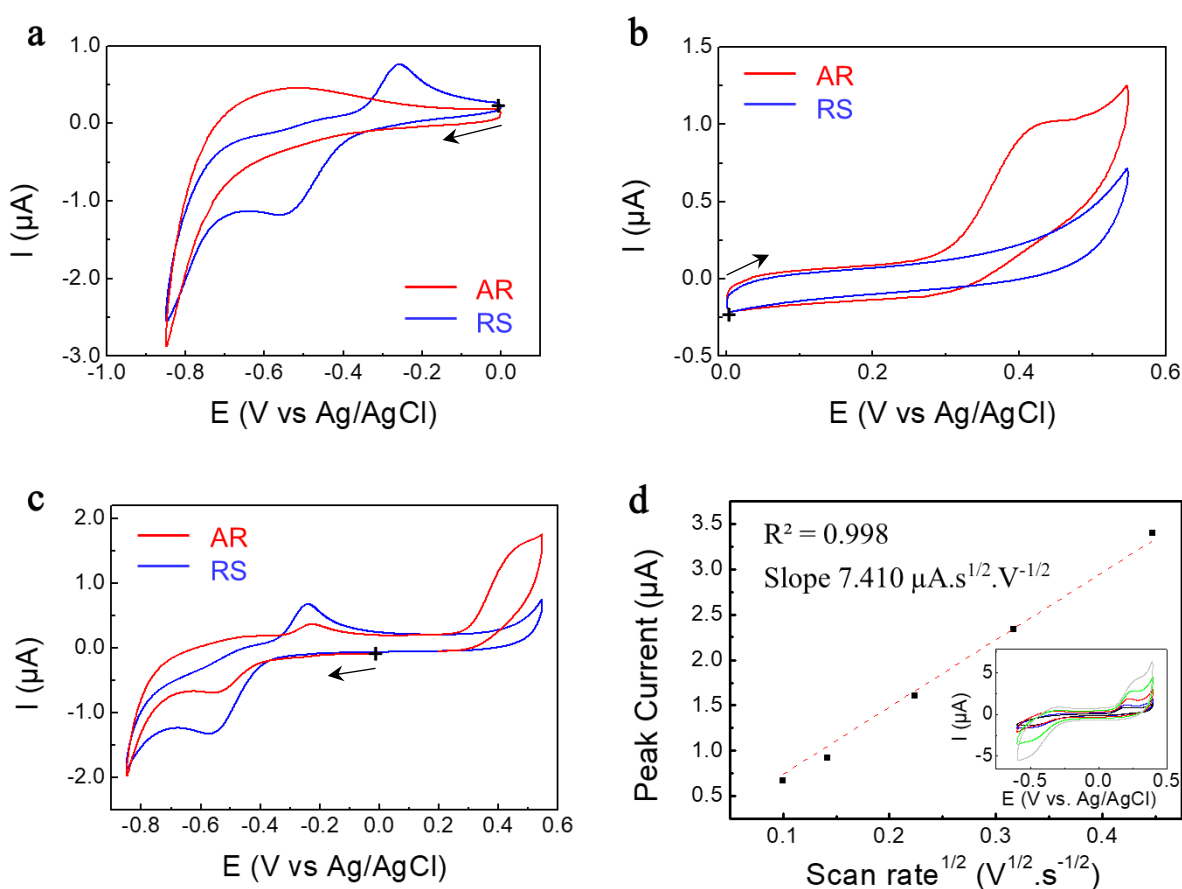


Figure 118 (a-c) Analyses par voltamétrie cyclique d'une solution d'Amplex Red (AR, rouge) et de resorufine (RS, bleu) enregistrés sur macroélectrode de platine en tampon phosphate (pH 7,4). La concentration est fixée à $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pour les deux solutions. La vitesse de balayage est de $0,05 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$. (d) Relation linéaire entre le courant de pic anodique de l'AR et la racine carrée de la vitesse de balayage. Les voltampérogrammes enregistrés aux différentes vitesses de balayage ($0,01$ à $0,2 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$) sont insérés.

En conclusion, nous avons mis en évidence par voie électrochimique l'oxydation irréversible de l'Amplex Red. Un système réversible apparaît seulement après cette oxydation. Celui-ci semble correspondre au couple redox RS/DH mais la simple analyse des données de voltamétrie cyclique n'est pas suffisante. Une caractérisation des produits issus de ces réactions redox est nécessaire pour

confirmer cette hypothèse. Ceci sera réalisé par spectroélectrochimie et microscopie confocale à balayage couplée à la chronoampérométrie.

2. Caractérisation du produit issu de l'oxydation de l'Amplex Red par spectroélectrochimie

La spectroélectrochimie consiste à réaliser une expérience d'électrochimie dans une cellule de spectroscopie et à enregistrer les signaux photochimiques *in situ*. Les électrodes sont placées dans la cuvette : l'électrode de travail, positionnée en face de la fenêtre optique du spectrophotomètre, correspond à une grille de Pt dont la maille permet le passage du faisceau lumineux sans gêne pour la mesure ; la contre-électrode consiste en un fil de Pt ; et un fil d'Ag/AgCl sert d'électrode de référence. Les expériences sont faites avec une solution d'Amplex Red solubilisé dans du DMSO (solution stock à 10^{-2} M) puis diluée à 10^{-4} M en tampon PBS (pH 7,4).

Un suivi de l'absorbance (Figure 119 a-b) et de la fluorescence (Figure 119 c-d) au cours du temps (un spectre par minute) est enregistré au potentiel d'oxydation de + 0,5 V (Figure 119 a, c) puis au potentiel de réduction de - 0,8 V (Figure 119 b, d) pendant au moins 10 minutes. La densité optique est collectée entre 400 et 650 nm et l'émission de fluorescence entre 550 et 750 nm pour une longueur d'onde d'excitation fixée à 530 nm.

Il en résulte une augmentation immédiate de l'absorbance s'exprimant par une coloration rose de la solution complétée d'une augmentation de la fluorescence lorsque le potentiel de + 0,5 V est appliqué. La signature spectrale du composé formé montre d'abord un épaulement à ~ 530 nm puis un maximum d'absorption centré à ~ 570 nm correspondant à la signature de la RS. Après une dizaine de minutes, il n'y a plus d'évolution de l'absorbance qui atteint un maximum à environ 0,6. La quantité de RS en solution est calculée à environ 10^{-4} M ($\epsilon = 56 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, longueur du trajet optique = 1 mm) indiquant que la totalité de l'AR a été oxydée. En fluorescence, le maximum du pic d'émission est centré à ~ 590 nm et un épaulement est situé à ~ 640 nm. De même, après une dizaine de minutes, plus aucun changement d'intensité de fluorescence n'est observé. Les signaux d'absorption et d'émission de fluorescence correspondent à ceux de la resorufine reportés dans la littérature [325]. Ceci met donc en évidence l'oxydation directe par électrochimie de l'AR en RS.

Ensuite, le potentiel est fixé à - 0,8 V entraînant une diminution de signaux d'absorbance et de fluorescence. Ceci confirme bien la conversion de la RS en DH qui ne possède pas de propriétés photochimiques particulières.

Enfin, si l'expérience est poursuivie et qu'à nouveau le potentiel d'oxydation est appliqué, une nouvelle augmentation des signaux d'absorbance et de fluorescence est observée. En effet, le système RS/DH étant réversible, il est alors possible de reformer la RS par oxydation, non plus de l'AR mais de la DH.

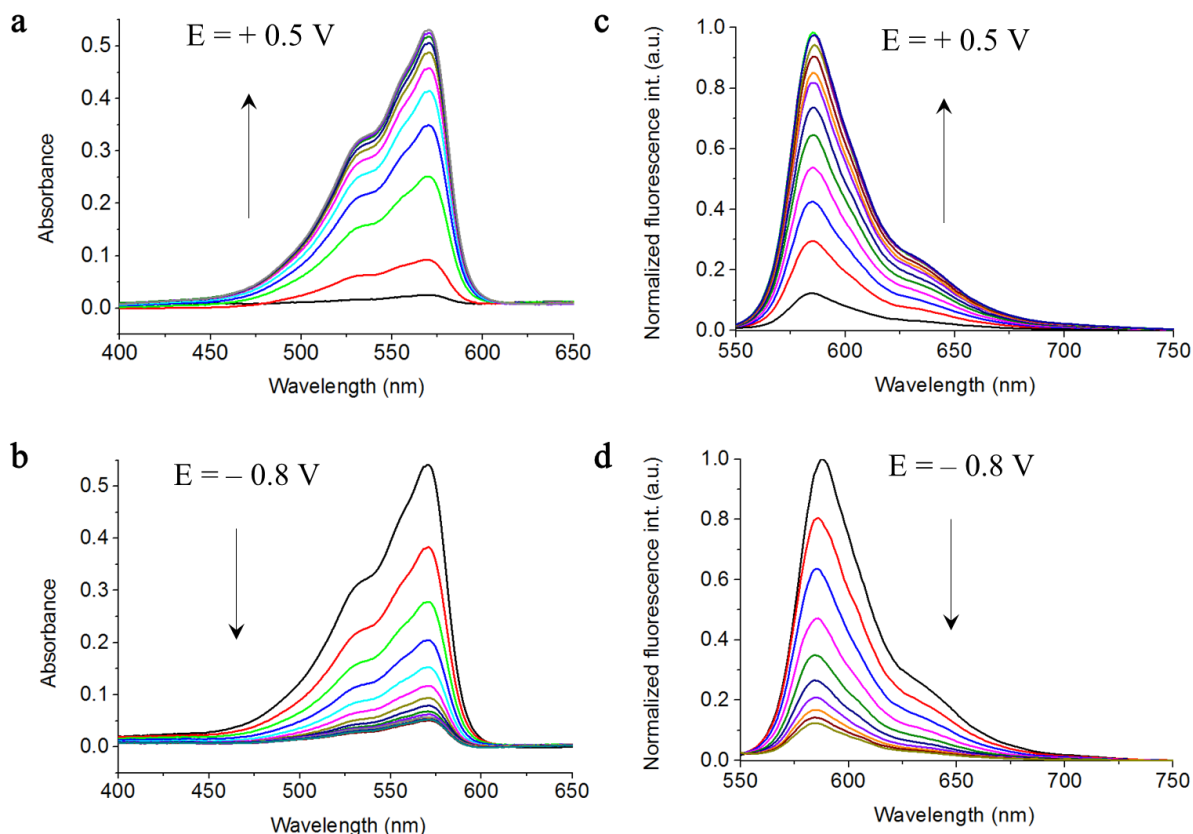


Figure 119 Evolution au cours du temps des signaux de spectroscopie d'absorption (a-b) et (c-d) de fluorescence d'une solution d'Amplex Red (AR) (10^{-4} mol.L $^{-1}$) enregistrés au cours d'expérience d'oxydation ou réduction. L'oxydation de l'AR est réalisée à +0,5 V vs. Ag/AgCl pendant au moins 10 min (a-c) puis la réduction est réalisée à -0,8 V vs. Ag/AgCl dans les mêmes conditions (b, d). Les spectres d'émission sont enregistrés pour une longueur d'onde d'excitation fixée à 530 nm (c-d).

Cette expérience confirme l'hypothèse émise après les expériences de voltamétrie cyclique : l'AR est bien oxydé directement en RS par électrochimie sans nécessité d'une étape de réduction en amont. Cette oxydation entraîne une coloration de la solution et l'émission d'un signal de fluorescence (lorsque la solution est excitée à la longueur d'onde *ad hoc*) faisant donc de l'AR une espèce électrochromo- et électrofluorogénique. De plus, le calcul de la quantité de RS formée après oxydation de l'AR grâce à la densité optique met en évidence le caractère quantitatif de la conversion de l'AR en RS.

Par ailleurs, le système réversible observé en voltamétrie correspond bien au couple RS/DH. Après formation de la RS par oxydation de l'AR, celle-ci est réduite en DH à - 0,8 V, conduisant à la disparition de la coloration de la solution et du signal d'émission de fluorescence. La réversibilité de ce système a été caractérisée en spectroélectrochimie et est observée en microscopie confocale à la surface de l'électrode dans le paragraphe suivant.

3. Imagerie *in situ* de la formation de la resorufine à la surface de l'électrode par microscopie confocale

En complément des expériences de spectroélectrochimie qui prouve la génération de la RS par oxydation directe de l'AR grâce à la caractérisation des signaux d'absorbance et de fluorescence, nous avons fait l'observation *in situ* de cette réaction en observant la surface de l'électrode par microscopie confocale à balayage laser.

Pour cette expérience, nous avons fabriqué une cellule d'électrochimie hermétique permettant le passage d'un flux d'azote et la présence des trois électrodes (électrode de travail : macroélectrode de Pt, disque de diamètre 1,7 mm – électrode de référence : fil d'Ag/AgCl – contre-électrode : fil de Pt). Cette cellule, dont le fond est constitué d'une lamelle de verre d'épaisseur 0,17 mm est adaptée à la microscopie inverse (Figure 120). Un laser de longueur d'onde 514 nm est utilisé comme source lumineuse pour la microscopie et permet l'excitation de la RS. Cette étude est faite en condition anaérobie à partir d'une solution d'AR de concentration $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

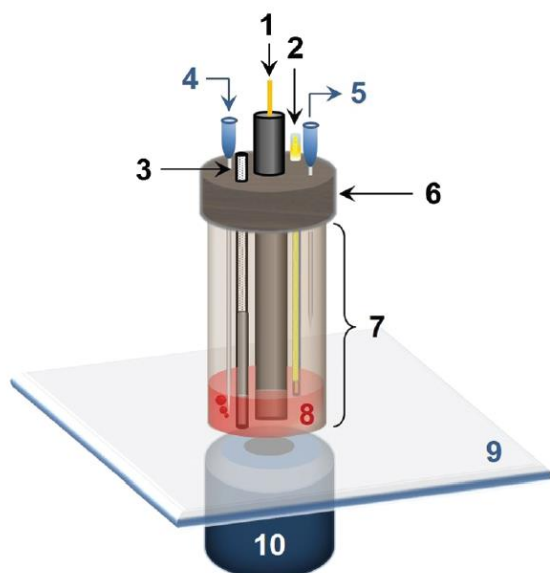


Figure 120 Schéma de la cellule d'électrochimie fabriquée pour l'enregistrement *in situ* des images de microscopie de fluorescence sous contrôle électrochimique. (1) Electrode de travail : macroélectrode de platine (diamètre = 1,7 mm). (2-3) Electrodes de référence : fil d'Ag/AgCl – Contre-électrode : fil de Pt. (4-5) Aiguilles pour passage d'un flux d'azote. (6) Bouchon de la cellule (7) Cellule en plastique. (8) Solution. (9) Lamelle de verre. (10) Objectif du microscope.

Une série d'images est enregistrée au niveau de la surface de l'électrode au cours d'une expérience de chronoampérométrie à double saut de potentiels (Figure 121 a-b). Les potentiels de - 0,7 V pendant 20 s puis + 0,5 V pendant 20 s sont appliqués de manière séquentielle (Figure 121 a). Les images de microscopie confocale permettant l'observation alternative de la génération puis de la disparition de la fluorescence sont enregistrées au cours des 20 s d'application de chaque potentiel à $t = 3, 10$ et 18 s (Figure 121 b).

La séquence commence par l'application d'un potentiel de - 0,7 V et aucun signal de fluorescence n'est observé puis le passage au potentiel de + 0,5 V conduit à la formation de RS par oxydation de l'AR directement observable par l'apparition d'un fort signal d'émission de fluorescence (Figure 121 b). L'intensité de fluorescence correspondante apparaît de façon progressive jusqu'au prochain saut de potentiel permettant la réduction de la RS fluorescente vers la DH non fluorescente : le signal diminue alors progressivement à la surface de l'électrode. Le retour au potentiel anodique de + 0,5 V

entraîne, comme attendu, l'apparition d'un signal de fluorescence identique à celui obtenu lors du premier saut au potentiel d'oxydation.

De plus, notre microscope confocal étant équipé d'un sélecteur de longueur d'onde en émission, nous avons réalisé une expérience en balayage de longueurs d'onde. Ainsi, une série d'images est enregistrée sur une faible gamme de longueurs d'onde d'émission (bande passante = 10 nm) alors que la longueur d'onde d'excitation est fixée à 488 nm et le potentiel de l'électrode à + 0,5 V. L'intensité de fluorescence sur chaque gamme d'émission de 10 nm est ensuite extraite des images dans une région d'intérêt (ROI) correspondant à la surface de l'électrode. Le spectre d'émission peut alors être construit indirectement à partir de ces images (Figure 121 c). Le maximum d'émission se situe à ~ 590 nm et un épaulement est observé à ~ 640 nm, ce qui est caractéristique de la signature spectrale de la RS. Ce résultat est en complet accord avec ceux obtenus en spectroélectrochimie.

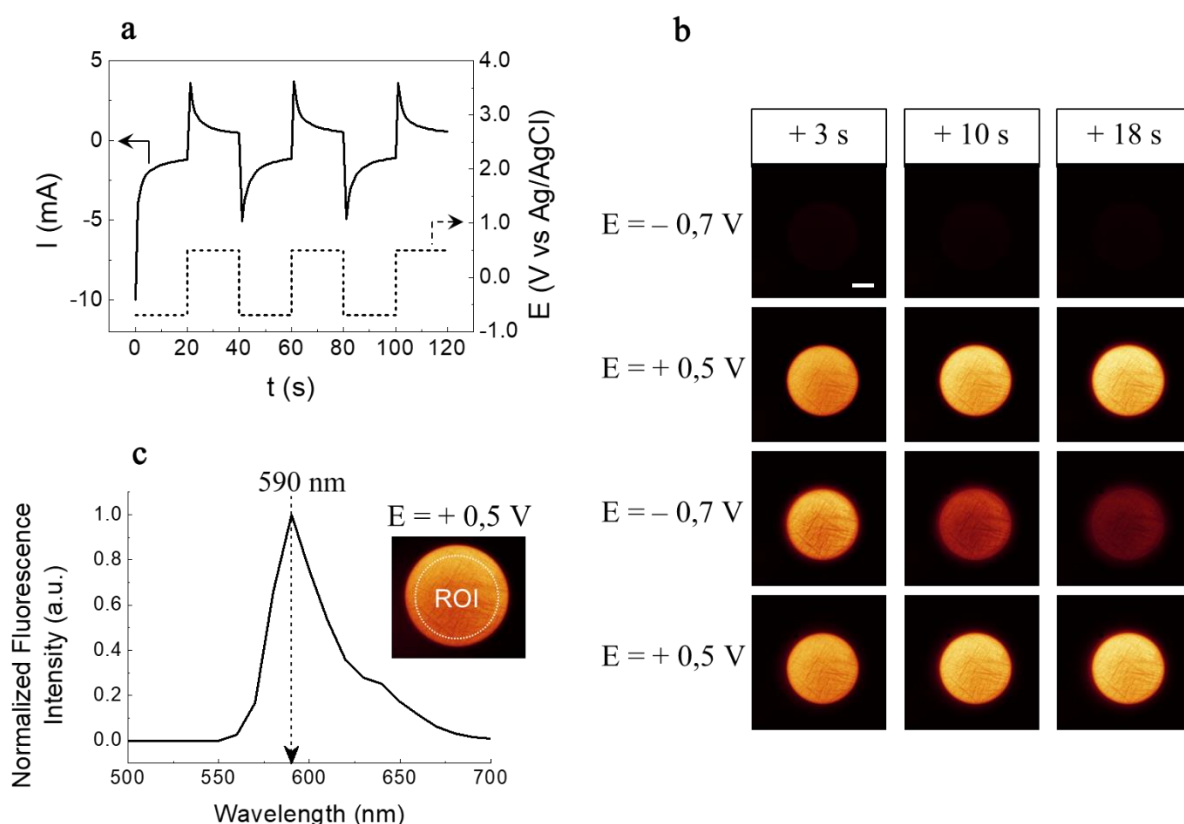


Figure 121 (a) Chronoampérométrie (trait plein) à double saut de potentiels (pointillés). Les potentiels de réduction (- 0,7 V vs. Ag/AgCl) et d'oxydation (+ 0,5 V vs. Ag/AgCl) de l'AR sont imposés alternativement toutes les 20 s. (b) Images de microscopie confocale focalisées à la surface de l'électrode (macroélectrode de Pt) et enregistrées au cours de l'expérience de chronoampérométrie à double saut de potentiels. A chaque changement de potentiel, trois images sont enregistrées à 3, 10 et 18 s après application du potentiel. (c) Spectre d'émission de fluorescence construit à partir d'une série d'images enregistrées pour une gamme de longueurs d'onde d'émission ayant une bande passante de 10 nm et pour une longueur d'onde d'excitation fixée à 488 nm et lorsque le potentiel d'oxydation de l'AR est imposé (+ 0,5 V vs. Ag/AgCl). La zone de l'image sélectionnée (ROI = region of interest) pour extraire les données d'intensité de fluorescence correspond uniquement à la surface de l'électrode. Barre d'échelle = 500 μ m.

La microscopie *in situ* couplée à l'électrochimie s'avère être une technique puissante dans la détermination de mécanismes redox impliquant des espèces fluorogéniques puisqu'elle fournit des informations à la fois chimiques et spatiales sur la réactivité électrochimique. De plus, l'établissement d'une couche de diffusion stationnaire permet un enregistrement rapide des variations du signal de fluorescence à la surface de l'électrode. L'avantage, par rapport à la spectroélectrochimie, réside dans

la rapidité de la caractérisation puisque l'analyse directe des images permet d'obtenir une information spectrale sur la molécule fluorescente générée sans qu'une électrolyse quantitative de la solution soit nécessaire.

En conclusion de cette étude, nous avons mis en évidence le caractère électrofluorogénique de l'Amplex Red en solution aqueuse à pH 7,4 par couplage *in situ* entre l'électrochimie, la spectroscopie et la microscopie confocale. La comparaison croisée entre ces trois techniques permet l'étude simultanée des processus faradiques et de fluorescence, révélant ici la formation de resorufine sous polarisation anodique de la surface d'électrode.

Dans la suite de notre étude, il s'agit maintenant de s'intéresser à la caractérisation du système bienzymatique (Glucose-GOX/AR-HRP) dans un microréacteur biomimétique, à savoir les vésicules unilamellaires géantes. Ces premiers résultats obtenus en solution nous indiquent le caractère électroactif de l'AR et de la RS de même que leurs signatures électrochimiques. Ces propriétés sont importantes à connaître dans le but de coupler éventuellement les méthodes électrochimiques et optiques sur le même microréacteur.

II. Détection *in situ* du peroxyde d'hydrogène produit par la réaction enzymatique de la glucose oxydase au sein d'une vésicule unilamellaire géante

Le projet a pour but la caractérisation d'activités enzymatiques au sein d'un microréacteur biomimétique. La réaction bienzymatique glucose-GOX/AR-HRP est largement utilisée en biochimie et en partie caractérisée. Cette réaction nous a donc servi de réaction modèle pour la seconde étude mettant en jeu les NO-Synthases dont les mécanismes réactionnels sont bien plus complexes.

Dans cette partie, nous nous intéressons d'abord à la caractérisation de la réaction bienzymatique dans les vésicules en microscopie de fluorescence. Cependant, comme présenté dans le Chapitre 3, les propriétés de perméabilité des membranes ont rapidement été un paramètre limitant. L'idée a donc ensuite été de se servir de ces propriétés de perméabilité pour qu'elles ne soient plus un inconvénient mais au contraire un atout. La caractérisation de la première partie de la réaction a alors pu être effectuée de manière contrôlée au sein d'une GUV en couplant l'électrochimie pour l'analyse et la microscopie pour l'observation.

1. La réaction modèle bienzymatique dans une vésicule : la perméabilité comme limitation majeure

Pour mémoire, la réaction modèle étudiée dans cette partie correspond à une cascade catalysée par deux enzymes : la glucose oxydase (GOX) et la peroxydase de raifort (HRP). Le substrat de la première réaction, le glucose, est oxydé en δ -gluconolactone entraînant la libération d'une molécule de peroxyde d'hydrogène. Ce dernier permet ensuite l'oxydation de l'Amplex Red, catalysée par la HRP et conduit à la formation de l'espèce fluorescente resorufine (Figure 122). Les mécanismes et les cinétiques liés à cette réaction ont été présentés plus en détails au Chapitre 1 (paragraphe II.1).

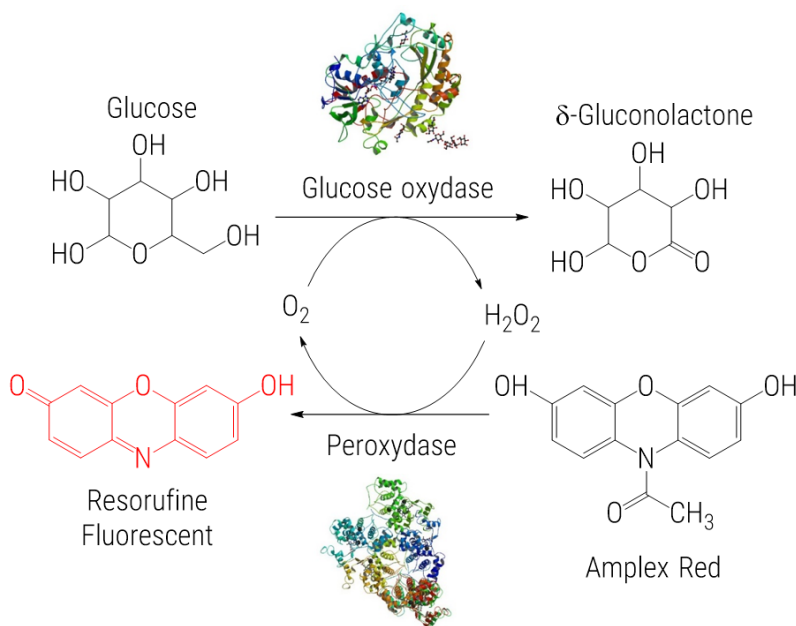


Figure 122 Mécanisme réactionnel de la réaction bienzymatique étudiée comme modèle au sein d'un microréacteur biomimétique

a. Etude cinétique préliminaire par spectrophotométrie

En amont de l'analyse des activités enzymatiques au sein d'une GUV, il est important de réaliser une étude cinétique en solution dans le but de déterminer les concentrations en réactifs qui seront adaptées. En effet, dans cette partie de l'étude nous nous intéressons à la production de la RS dont la détection est assurée par microscopie de fluorescence. Les réactifs sont microinjectés dans la vésicule mais il est nécessaire de contrôler les paramètres cinétiques pour contrôler l'efficacité de la réaction et de son analyse. Ainsi, le but ici est d'atteindre rapidement un état stationnaire (à l'échelle de la minute) de façon à quantifier les variations de fluorescence après microinjection des réactifs.

Par ailleurs, puisque la réaction est bienzymatique, deux cinétiques sont à prendre en compte. Notre étude étant basée sur la production du peroxyde d'hydrogène, l'étape cinétiquement déterminante est donc la première étape : la seconde réaction doit donc être plus rapide que la première.

Dans un premier temps, la production de resorufine via l'oxydation de l'AR catalysée par la HRP a été caractérisée en spectroscopie de fluorescence (Figure 123 a). La cinétique enzymatique est suivie en enregistrant l'émission de fluorescence de la RS ($\lambda_{exc.} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{émi.} = 587 \text{ nm}$). Les concentrations en AR et HRP ont été fixées à $50 \mu\text{M}$ et $0,4 \text{ U.mL}^{-1}$, respectivement. Ces concentrations ont été établies comme optimales pour atteindre une cinétique de production stationnaire rapidement et dépendante de la concentration en peroxyde d'hydrogène.

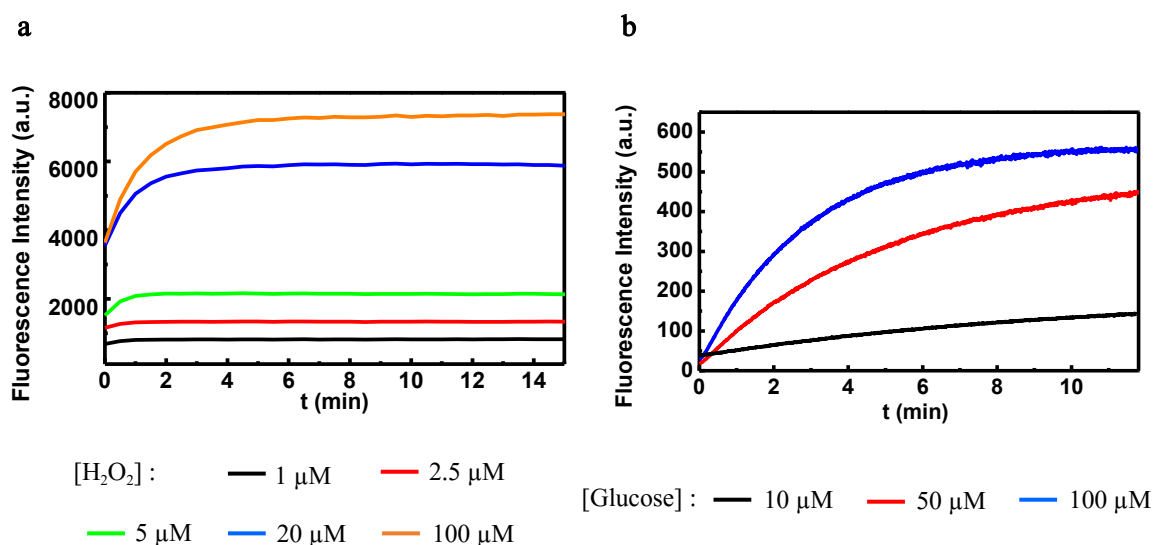


Figure 123 Suivi cinétique de la production de resorufine par spectrophotométrie de fluorescence. (a) La RS est produite par la conversion oxydante de l'AR ($50 \mu\text{M}$) catalysée par la HRP ($0,4 \text{ U.mL}^{-1}$). Différentes concentrations en peroxyde d'hydrogène sont étudiées. Signaux enregistrés sur un spectrophotomètre à plaque avec $\lambda_{exc.} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{émi.} = 587 \text{ nm}$. (b) La resorufine est produite à partir de la réaction bienzymatique convertissant d'abord le glucose en gluconolactone et peroxyde d'hydrogène, lui-même impliqué dans l'oxydation de l'AR ($50 \mu\text{M}$). La première réaction est catalysée par la GOX (1 U.mL^{-1}) et la seconde par la HRP ($0,4 \text{ U.mL}^{-1}$). Différentes concentrations de glucose sont testées. Signaux enregistrés sur un spectrophotomètre à cuve avec $\lambda_{exc.} = 500 \text{ nm}$, $\lambda_{émi.} = 660 \text{ nm}$.

Dans ces conditions, pour une concentration en H_2O_2 inférieure à $5 \mu\text{M}$, le plateau marquant la vitesse maximale du profil cinétique est atteint en moins d'une minute. Au-delà de $5 \mu\text{M}$ en H_2O_2 , 3 à 4 minutes sont nécessaires pour atteindre le plateau. Par ailleurs, nous avons évalué la concentration maximale en H_2O_2 pouvant être utilisée dans ces conditions à $100 \mu\text{M}$. Au-delà de cette concentration, des réactions secondaires peuvent se produire, entraînant alors une diminution de l'intensité

de fluorescence. L'origine de ces effets a déjà été discutée dans le Chapitre 1 (paragraphe II.1). Brièvement, la resorufine peut être oxydée en présence d'une trop forte concentration en H_2O_2 , conduisant à la formation de la resazurine, qui est très peu fluorescente par rapport à la resorufine ($\Phi_{\text{resorufine}} = 0,41$, $\Phi_{\text{resazurine}} = 0,11$) [57]. De plus, une inhibition voire une désactivation de l'enzyme et du substrat sont reportées si la concentration en peroxyde d'hydrogène est supérieure à $100 \mu\text{M}$ [83]–[85]. Nos observations sont donc en bon accord avec la littérature.

Sur cette base, nous avons ensuite déterminé les concentrations optimales à utiliser en glucose et glucose oxydase. A nouveau, c'est le signal d'émission de fluorescence de la resorufine qui est suivi au cours du temps (Figure 123 b). Les concentrations en AR et HRP restent inchangées et différentes concentrations en GOX ont été testées et ce, pour différentes concentrations en substrat (glucose). Les concentrations optimales en GOX sont déterminées entre 1 et $2,5 \text{ U.mL}^{-1}$ pour des concentrations en glucose inférieures à $100 \mu\text{M}$. En effet, au-delà, la production de peroxyde d'hydrogène issue de la première étape du mécanisme, est trop importante et des réactions secondaires interviennent, faisant alors diminuer le signal de fluorescence, comme expliqué ci-dessus.

Cette analyse préliminaire en solution homogène permet donc de fixer les concentrations des réactifs pour la suite de l'étude en vésicule :

- [Glucose] < $100 \mu\text{M}$
- [GOX] = 1 à $2,5 \text{ U.mL}^{-1}$
- [AR] = $50 \mu\text{M}$
- [HRP] = $0,4 \text{ U.mL}^{-1}$.

b. Calibration

L'étude de la réaction bienzymatique sera finalement caractérisée par la quantification de la production de resorufine. Pour pouvoir établir une relation entre l'intensité de fluorescence et une quantité de RS, un étalonnage doit être réalisé.

Ainsi, des solutions de RS ont été préparées à partir d'un mélange d'AR, de HRP et d' H_2O_2 . L'intensité d'émission de fluorescence de la RS a été extraite à partir d'images de ces solutions enregistrées en microscopie confocale. La microscopie confocale présente l'avantage de ne sonder qu'une épaisseur bien définie de la solution, ainsi, en établissant une relation entre l'intensité de fluorescence émise pour un volume précis et la quantité de peroxyde d'hydrogène, il nous sera alors possible de caractériser quantitativement la production de H_2O_2 au sein d'une vésicule. Cependant, il est évident que la courbe d'étalonnage établie n'est exploitable qu'à condition que l'expérience en vésicule soit réalisée exactement dans les mêmes conditions expérimentales (puissance et intensité du laser d'excitation, nombre d'images accumulées, etc...). Ces paramètres ont été optimisés de façon à pouvoir sonder une gamme de concentrations en peroxyde d'hydrogène comprise entre 1 (limite de détection) et $35 \mu\text{M}$ (limite de saturation du détecteur).

La courbe d'étalonnage a été établie avec les concentrations en AR et HRP établies comme optimales, c'est-à-dire, $50 \mu\text{M}$ et $0,4 \text{ U.mL}^{-1}$ respectivement. Le mélange des trois réactifs est incubé exactement 10 minutes puis une image du volume de la solution est enregistrée. L'acquisition des images est obtenue en excitant la solution à 514 nm avec un laser argon. L'intensité de fluorescence

émise entre 524 et 650 nm est moyennée sur l'ensemble de chaque image. Pour chaque concentration en H_2O_2 , la mesure est réalisée sur trois mélanges puis les résultats de ces trois essais sont moyennés. L'ensemble des intensités de fluorescence moyennées pour chaque concentration permettent d'obtenir la courbe d'étalonnage (Figure 124).

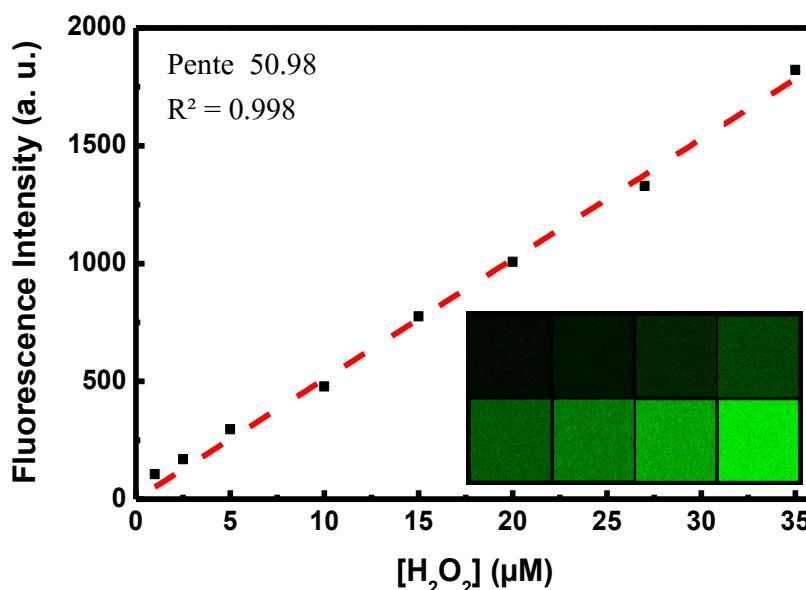


Figure 124 Courbe d'étalonnage reliant la fluorescence émise par la resorufine produite en fonction de la quantité de peroxyde d'hydrogène initiale. La resorufine est formée par oxydation de l'AR (50 μM) catalysée par la HRP (0,4 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$). Les images sont enregistrées, après 10 minutes d'incubation, en microscopie confocale dans le volume de la solution en excitant à 514 nm avec un laser argon (puissance du laser Ar : 20%, intensité : 13%, gain du photomultiplicateur : 800V, ouverture du pinhole : 106,12 μm). Chaque mesure a été réalisée trois fois. L'intensité de fluorescence émise par la resorufine est moyennée sur l'ensemble de l'image (voir insert).

L'intensité de fluorescence est linéaire par rapport à la concentration en peroxyde d'hydrogène avec un coefficient de corrélation de 0,998 et une pente de 50,98 a.u. par μM de peroxyde d'hydrogène. Cette relation doit donc permettre de quantifier la production de peroxyde d'hydrogène par l'oxydation du glucose catalysée par la GOX lors des expériences en vésicules. Cependant, les propriétés de perméabilité des membranes (fuite du fluorophore RS notamment) des vésicules ne nous ont pas permis de faire une étude quantitative équivalente à celle en solution imagée en microscopie confocale.

c. Microinjection en vésicule

Les propriétés de perméabilité des vésicules ont déjà été discutées au Chapitre 3 mais des résultats complémentaires sont présentés ici, notamment liés à l'encapsulation de macromolécules que sont les enzymes.

Au Chapitre 3, aucune conclusion n'avait pu être formulée quant aux espèces diffusant à travers la membrane. Ici, différentes expériences ont été menées afin de déterminer quels réactifs et/ou produits de la réaction bienzymatique peuvent traverser les membranes phospholipidiques des vésicules utilisées. Ces expériences ont été réalisées avec des vésicules jumelées au réservoir de lipides dont la membrane est composée du mélange naturel de lipides extraits de graines de soja (voir Chapitre 2, paragraphe III.2.a).

La première expérience consiste à faire gonfler les vésicules avec une solution de tampon PBS à pH 7,4 contenant le glucose (100 μM). Un mélange contenant la GOX (1 U.mL^{-1} final), la HRP (0,4 U.mL^{-1} final) et l'AR (50 μM final) est ensuite injecté dans la vésicule par électro-microinjection (Figure 125). Une augmentation du signal de fluorescence au sein de la GUV est observée rapidement après injection. Dès que l'injection est arrêtée, le signal de fluorescence diminue en quelques dizaines de secondes jusqu'à un retour au niveau basal. Plusieurs injections successives montrent la reproductibilité de la mesure (Figure 126). Cette première expérience met tout d'abord en évidence la perméabilité de vésicules vis-à-vis de la resorufine, mais pas uniquement.

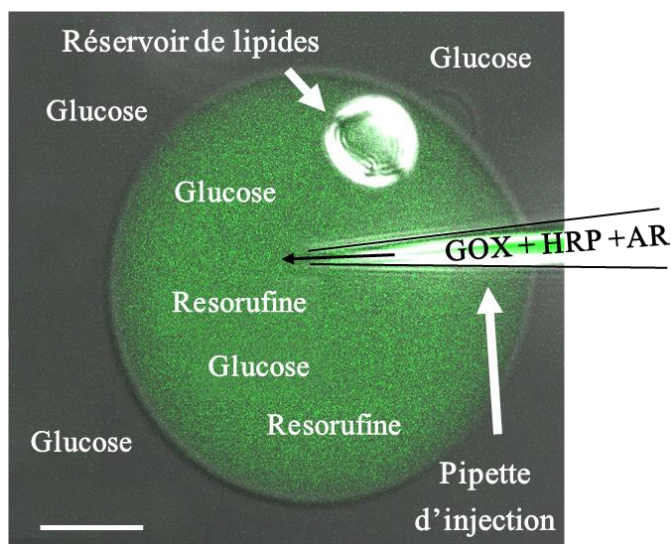


Figure 125 Microinjection d'un mélange de GOX (1 U.mL^{-1} final), HRP (0,4 U.mL^{-1} final) et AR (50 μM final) dans une GUV ayant été formée dans une solution tamponnée (pH 7,4) de glucose (100 μM). Après injection du mélange, la molécule fluorescente RS est produite et visualisée en microscopie confocale. Bar d'échelle = 25 μm .

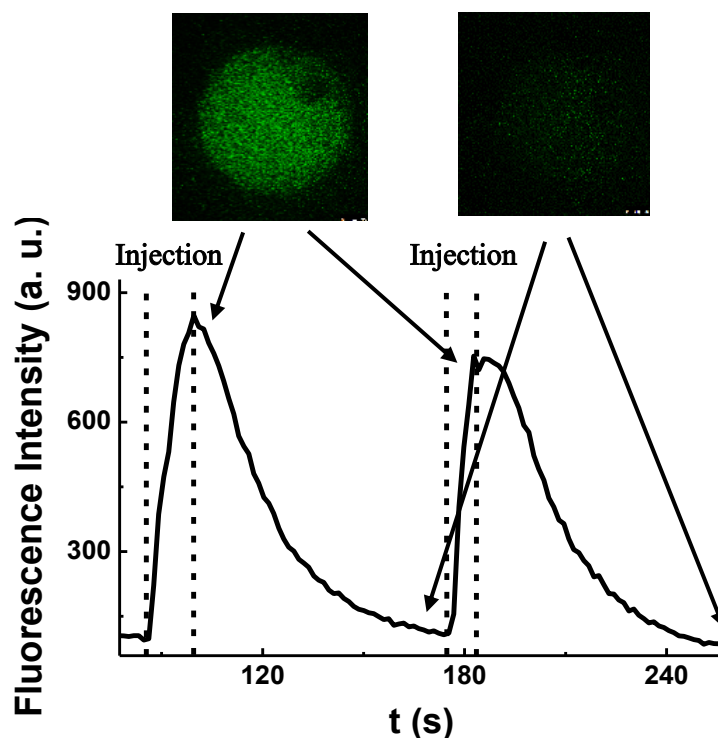


Figure 126 Suivi du signal de fluorescence au sein d'une GUV formée dans une solution tamponnée (pH 7,4) de glucose (100 μM) après deux injections successives du mélange GOX (1 U.mL^{-1} final), HRP (0,4 U.mL^{-1} final) et AR (50 μM final). $\lambda_{\text{exc.}} = 514 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{émi.}} = 550\text{-}700 \text{ nm}$; puissance laser argon : 20%, intensité : 30%. Les lignes en pointillés symbolisent la période d'injection.

Par ailleurs, en considérant la diffusion de chaque espèce entre l'intérieur et l'extérieur de la GUV, une modélisation du profil de fluorescence peut être proposée. En effet, il est possible de calculer théoriquement la vitesse de consommation du glucose à partir de la définition de l'unité d'activité de la GOX. Une unité d'activité correspond à la conversion de 10^{-6} mol de glucose par minute (à pH 5,1 et 30°C) soit $1,7 \cdot 10^{-8} \text{ mol.s}^{-1}$. La GOX est injectée dans la vésicule à 1 U.mL^{-1} dans un volume de 2,6 nL, ce qui équivaut une vitesse de conversion de $4,3 \cdot 10^{-14} \text{ mol.s}^{-1}$ (dans l'approximation de la définition de l'unité enzymatique). Dans l'hypothèse où le glucose serait confiné dans la GUV, il faudrait alors seulement 6 s pour consommer les $2,6 \cdot 10^{-13}$ moles de glucose encapsulées (solution de glucose à 100 μM pour un volume de 2,6 nL). Ainsi, après la première injection, la totalité du glucose encapsulé lors de la formation des vésicules serait convertie. Or, après diffusion de la resorufine produite après la première injection, le signal de fluorescence augmente à nouveau après la seconde injection démontrant donc que la réaction n'est pas limitée par le substrat glucose et donc que le glucose diffuse à travers la membrane. En effet, si on considère maintenant la quantité totale de glucose en solution (milieu intra- et extravésiculaire), alors il faudrait plus de 300 h pour consommer la totalité du substrat (100 μM dans un volume total de 500 μL de solution équivalent à $5 \cdot 10^{-8} \text{ mol}$). Ce calcul est une approximation faite en ne prenant pas en compte la cinétique nécessaire à la diffusion des molécules de glucose dans le microréacteur mais valide la conclusion d'une forte perméabilité des vésicules vis-à-vis du glucose.

Ainsi, il reste à discriminer quelle(s) espèce(s) parmi l'AR, la HRP et/ou la GOX diffuse(nt) à travers la membrane.

Avant de répondre à cette interrogation, discutons de nos observations en les mettant en perspective avec d'autres expériences décrites dans la littérature. Faure et Oléa se sont intéressées à l'encapsulation de la GOX et du glucose dans des vésicules uni- et multi-lamellaires [332], [333]. D'une part, ils ont démontré que la fuite de la GOX encapsulée dans des MLVs de type « oignon » est très faible puisque l'encapsulation reste stable pendant plus de 45 jours. Au-delà, la GOX commence à être relarguée mais ce phénomène est attribué à la déstabilisation des vésicules. Après 60 jours, le système est totalement déstabilisé, les vésicules étant des systèmes métastables par nature [332]. Par ailleurs, la fuite du glucose a été étudiée dans des MLVs et des SUVs (75% PC, 20% sodium octadécyl sulfate, 5% Brij 30) [333]. Le glucose a été encapsulé dans les vésicules placées dans une solution de peroxydase et d'ABTS (acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique = sonde colorimétrique pour la détection du H_2O_2). La fuite du glucose vers le milieu extérieur entraîne une augmentation de l'absorbance au cours du temps. Les vitesses de réaction obtenues expérimentalement ont été confrontées à un modèle mathématique que les auteurs ont adapté d'une précédente étude [334]. Bien que les vésicules soient multilamellaires, les observations faites par Faure et Oléa sont en adéquation avec nos résultats. En parallèle de cette étude, Yoshimoto *et al.* ont obtenu des résultats similaires avec des MLVs formées à partir de POPC (100%).

En ce qui concerne la perméabilité des membranes à la resorufine, nos résultats ne sont pas en accord avec l'analyse de Piwonski *et al.* qui ont reporté que la RS ne traverse pas les membranes phospholipidiques (LUVs : Egg PC:PE biotinylé, ratio molaire 498:1, tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,5) à cause de la charge qu'elle porte à pH 7,4 ; alors que par ailleurs, les membranes seraient perméables à l'AR [335], [336]. Cependant, une autre étude menée avec des vésicules multi-compartiments dont la membrane est composée de DOPC pur en milieu PBS (50 mM, pH 7,4) a montré la

perméabilité de ces membranes vis-à-vis de la RS [337]. A nouveau, différents résultats s'opposent quant aux propriétés de perméabilité des liposomes, notamment en fonction de la composition de la membrane et des conditions expérimentales.

Nous avons ensuite effectué un dernier test dans le but de discriminer si l'AR, la HRP et/ou la GOX diffusent à travers la membrane de nos GUVs. Les vésicules sont formées dans une solution tamponnée (PBS pH 7,4) contenant du glucose (50 μM) et de l'AR (50 μM). Un mélange de GOX (5 U.mL^{-1} final) et HRP (0,4 U.mL^{-1} final) diluées dans le même tampon est injecté dans le milieu intravésiculaire. Le signal de fluorescence d'émission de la RS au niveau de la GUV est représenté sur la Figure 127. Une augmentation du signal est visualisée durant la première minute d'enregistrement puis une stabilisation indique qu'un état stationnaire est atteint.

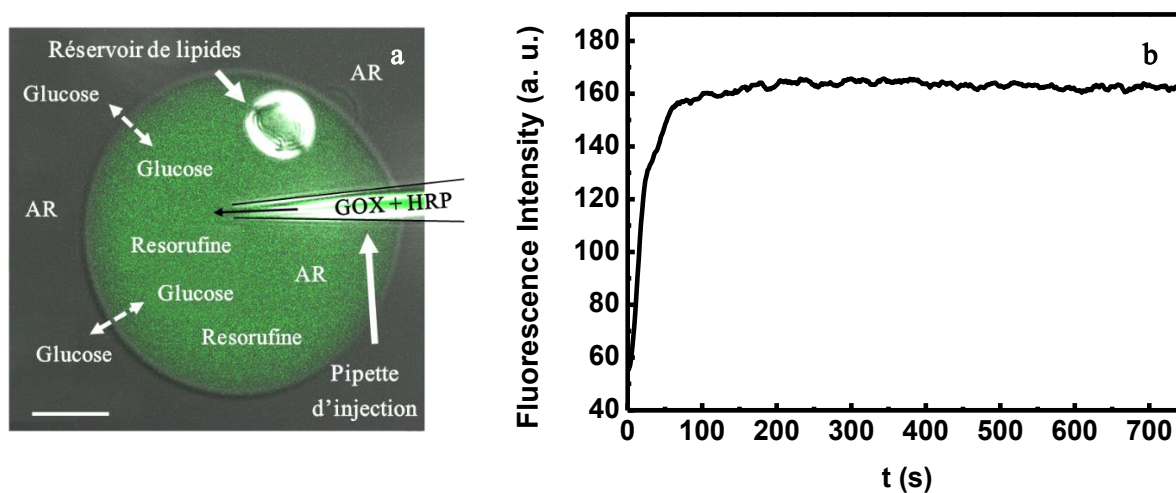


Figure 127 (a) Représentation schématisée de l'expérience. (b) Suivi du signal de fluorescence au sein d'une GUV formée dans une solution tamponnée (pH 7,4) de glucose (50 μM) et AR (50 μM) après injection du mélange GOX (2,5 U.mL^{-1} final) et HRP (0,4 U.mL^{-1} final). $\lambda_{\text{exc.}} = 514 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{émi.}} = 550\text{-}700 \text{ nm}$; puissance laser argon : 20%, intensité : 30%. Signal lissé avec une moyenne mobile à 20 points ($t_{\text{réponse}} = 3 \text{ s}$).

Ce résultat est la preuve, d'une part, que les enzymes restent confinées au sein de la vésicule après électro-microinjection puisque la réaction bienzymatique perdure ; et d'autre part, que l'AR diffuse également à travers la membrane, puisque la réaction de génération de la RS est entretenue. En effet, dans le cas où l'on considère la membrane comme perméable au glucose et à l'AR mais imperméable aux enzymes, l'apport en substrats est continu par diffusion de ceux-ci du milieu extravésiculaire. De plus, le fait que les enzymes soient isolées dans le microréacteur assure une production enzymatique continue : si les enzymes diffusaient vers l'extérieur de la GUV alors le signal de fluorescence devrait diminuer, suite à la diffusion de la RS. Et enfin, bien que la resorufine puisse diffuser vers l'extérieur, dans le cas où la cinétique de diffusion de celle-ci est plus lente que la cinétique de production enzymatique, alors un signal de fluorescence au sein de la GUV sera observé. Ici, le plateau observé (Figure 127) correspond à un équilibre entre diffusion et production de la RS. En complément de cette analyse qualitative et de manière analogue aux calculs de cinétique de conversion utilisés pour le glucose, le temps nécessaire pour consommer l'AR peut être déterminé. Dans le cas de la HRP, l'unité d'activité est définie comme la quantité de HRP qui formera 1,0 mg de purpurogalline à partir du pyrogallol en 20 secondes (à pH 6,0 et à 20 ° C). Ici c'est l'AR qui est converti et non le pyrogallol mais nous ferons l'approximation que cette définition de l'unité d'activité est du même ordre de grandeur pour l'AR : 1 mg de pyrogallol est converti en 20 s ce qui

équivalait à 5 mg en 1 min soit $4.10^{-5} \text{ mol.min}^{-1}$ ($M_{\text{pyrogallol}} = 126,11 \text{ g.mol}^{-1}$). La concentration en HRP est de $0,4 \text{ U.mL}^{-1}$ pour un volume injecté de 46 nL soit $1,84.10^{-7} \text{ U}$ *in situ*, ce qui équivalait à une cinétique de conversion de $16.10^{-6} \text{ mol.min}^{-1}$ ou encore $6,7.10^{-7} \text{ mol.s}^{-1}$. Dans le cas où l'AR serait confiné dans la vésicule, seulement 0,2 s suffirait pour consommer les $2,3.10^{-14} \text{ mol}$ encapsulées ($50 \text{ }\mu\text{M}$ d'AR dans un volume de 46 nL). Alors que dans le cas où l'AR peut diffuser de l'extérieur vers l'intérieur, il faudrait environ 10 h pour consommer la totalité de celui-ci ($50 \text{ }\mu\text{M}$ dans 500 μL).

Finale^{ment}, ces expériences apportent de nouveaux résultats qualitatifs liés à la perméabilité de nos systèmes vésiculaires. Nous avons mis en évidence que les enzymes ne diffusent pas vers le milieu extérieur alors que la membrane est perméable au glucose, à l'AR et à la RS. Des effets d'ordre stérique pourraient expliquer ce comportement. En effet, les enzymes sont des macromolécules de quelques nanomètres de diamètre hydrodynamique (HRP : 6 nm [338], GOX : 8,6 nm [65]) tandis que le glucose, l'AR et la RS sont de plus petites molécules dont le diamètre est proche du nanomètre [56]. Cependant, comme précédemment discuté dans le Chapitre 1 et le Chapitre 3, les paramètres intervenant dans les propriétés de perméabilité des membranes sont nombreux et il serait réducteur de ne prendre en compte qu'un simple effet stérique pour justifier les phénomènes observés. De plus, en comparaison des expériences menées avec le Dextran FITC 70 kDa, la conformation des enzymes n'est pas aussi modulable et aucun mouvement de reptation ne peut faciliter leur diffusion vers l'extérieur.

Ces résultats nous permettent maintenant de mieux appréhender le système et le but du prochain paragraphe est de quantifier par électrochimie la production de peroxyde d'hydrogène issue de la première étape de la réaction bienzymatique en nous servant de ces propriétés particulières de la membrane.

2. Combiner propriétés de perméabilité et analyse quantitative du système glucose-GOX

L'analyse quantitative de la production de peroxyde d'hydrogène catalysée par la GOX et issue de l'oxydation du glucose a été réalisée par électrochimie *via* des expériences de chronoampérométrie. Le peroxyde d'hydrogène est une espèce électroactive (degré d'oxydation +I de l'oxygène) pouvant être détecté via sa réduction ou son oxydation. Cette seconde voie est la plus souvent choisie pour ne pas interférer avec la réduction de l'oxygène. L'oxydation est efficace sur électrode de platine à un potentiel généralement proche de + 0,6 V *vs.* Ag/AgCl. Sur surface platinée, une catalyse de l'oxydation est obtenue et permet d'abaisser la valeur du potentiel de détection (potentiel de plateau) à + 0,35 V *vs.* Ag/AgCl.

Pour réaliser la détection électrochimique au niveau d'une GUV, des ultramicroélectrodes (UME) à base de fibre de carbone ont été fabriquées au laboratoire d'après un protocole décrit dans la littérature [339]. Le détail des étapes de fabrication est explicité en annexe (Annexe II.3). Brièvement, il s'agit de sceller une fibre de carbone (diamètre = 10 μm) dans un capillaire en verre (diamètre = 1 mm) de façon à ce qu'une partie de la fibre dépasse de la zone de scellement entre la fibre et le capillaire en verre. La fibre de carbone est constituée d'un assemblage de particules de carbone graphite qui représentent un vaste réseau de liaisons π délocalisables assurant le transfert d'électrons tout au long de la fibre. Cette fibre possède donc des propriétés conductrices : elle servira d'électrode de travail lors des expériences présentées ci-après. La partie de la fibre qui est à l'extérieur du capillaire est d'abord entièrement isolée par électrodéposition d'un polymère (polyoxyphénylène). L'extrémité de la fibre est ensuite micro-polie avec un angle de 45° ce qui a pour effet de retirer le polymère de la zone polie et de mettre à jour un disque de carbone conducteur uniquement au niveau de la pointe de l'électrode (Figure 128). Enfin, du noir de Pt est électro-déposé sur la surface de l'électrode dans le but d'augmenter la surface spécifique de celle-ci et donc de gagner en sensibilité lors de la détection (Figure 129). Cependant, le dépôt d'une trop grande quantité de noir de Pt provoque la diminution du rapport signal/bruit en faisant augmenter le courant capacitif au détriment d'une bonne résolution du courant faradique. De précédentes études réalisées au laboratoire ont établi que le dépôt optimal pour la détection de concentrations micro- à nano-molaires devait correspondre à une charge de 0,1 μC par μm^2 de surface d'électrode [340].

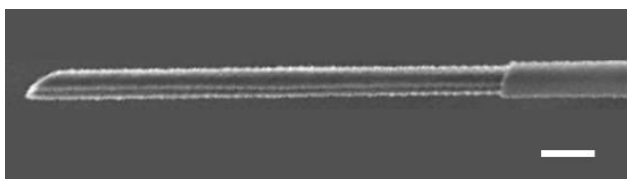


Figure 128 UME à fibre de carbone polie à 45° observée en microscopie électronique. Bar d'échelle = 20 μm .

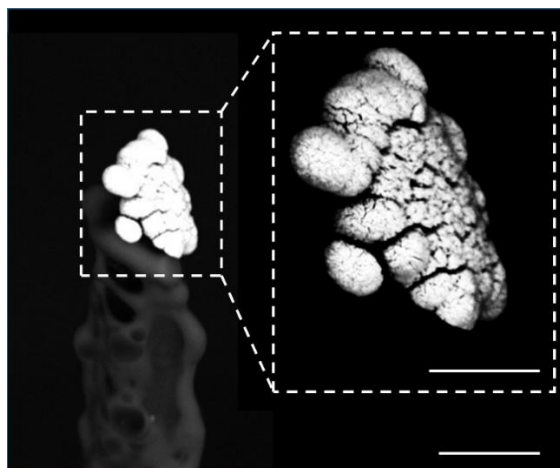


Figure 129 UME à fibre de carbone platinée observée par microscopie optique à balayage. La longueur de la fibre est isolée par un polymère tandis que la pointe est polie à 45° puis recouverte d'un dépôt de noir de Pt. Ce dépôt présente une structure poreuse offrant une grande surface spécifique. Bar d'échelle = 10 μm , insert : 5 μm .

Les résultats présentés et discutés dans ce paragraphe portent sur la quantification de la production de H_2O_2 par voie enzymatique. Le système a d'abord été étalonné dans le but de fixer ses limites de détection et de comparer son comportement en diffusion pure ou sous convection, c'est-à-dire face à un flux de peroxyde d'hydrogène. Ensuite, la réaction enzymatique en microréacteur a été caractérisée par électrochimie et les résultats expérimentaux ont été confrontés à une modélisation. De réels flux d' H_2O_2 produits au sein d'une vésicule par une réaction enzymatique ont pu être quantifiés.

a. Etalonnage du système de détection vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène

i. En solution

Dans un premier temps, dans le but de déterminer un domaine de linéarité entre la concentration en peroxyde d'hydrogène et le courant détecté, une expérience de chronoampérométrie à + 0,35 V *vs.* Ag/AgCl a été réalisée en solution avec une ultra-microélectrode à fibre de carbone platinée. Le protocole consiste à démarrer l'expérience en tampon (PBS 10 mM, pH 7,4) ce qui permet d'évaluer le courant de fond et le bruit électrique liée à l'électrode. Sur des électrodes platinées, la surface spécifique est très élevée et le temps nécessaire à la stabilisation du courant de ces surfaces (utilisées dans toutes les expériences présentées dans la suite) est compris entre 20 min et 1h. Ensuite, l'expérience peut commencer.

L'étalonnage du système se fait par ajouts successifs d'une solution stock de peroxyde d'hydrogène préparée juste avant l'expérience. A chaque injection correspond une concentration finale en H_2O_2 connue. La solution est placée sous agitation constante au cours de la mesure pour assurer une bonne homogénéisation. La gamme de courants détectés étant de l'ordre du pA au nA, les mesures sont effectuées dans une cage de Faraday et le potentiostat est équipé d'un module bas courant (résolution de l'ordre de 0,5 pA en fonction de la résolution temporelle choisie). Ces deux précautions sont nécessaires et permettent de filtrer un maximum de signaux parasites issus de l'environnement extérieur.

La gamme de concentrations établie pour la calibration en solution est comprise entre 50 nM et 30 μM . A chaque ajout, l'intensité du courant augmente et reste stable après ajout (Figure 130). Le profil du courant adopte alors une forme en marches d'escalier. En effet, sur une surface d'électrode

aussi petite par rapport au volume total de la solution (6 mL), seule une très faible quantité de H_2O_2 est oxydée, et la concentration ne diminue pas au cours du temps assurant la stabilité du niveau de courant. Le zoom aux faibles concentrations présenté sur la Figure 130 nous permet d'établir que la limite minimale de détection des UME utilisées se trouve autour de 500 nM. En deçà, le rapport signal/bruit ne nous permet pas distinguer un changement de courant significatif lors des ajouts d' H_2O_2 .

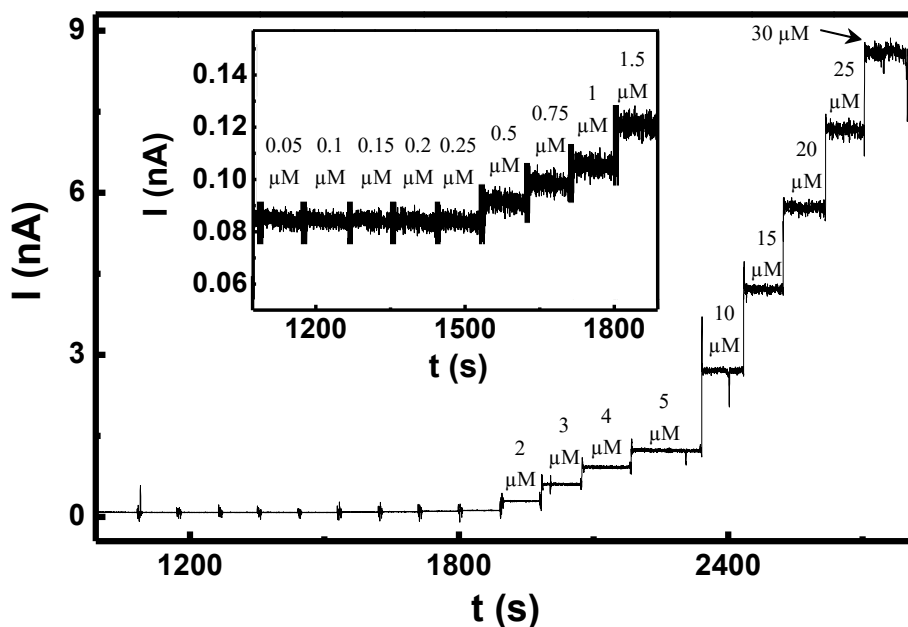


Figure 130 Chronoampérométrie enregistrée à +0,35 V vs. Ag/AgCl avec une UME à fibre de carbone (10 μm de diamètre) platinée (10 μC) lors d'ajouts successifs d'une solution d' H_2O_2 dans le PBS (10 mM, pH 7,4) sous agitation constante. Insert : zoom sur la gamme de concentrations 0,05 à 1,5 μM .

Pour établir la droite d'étalonnage, la valeur de l'intensité du courant de chaque palier (af-franchi du courant de base) est moyennée et est mise en rapport avec la concentration en H_2O_2 correspondante (Figure 131). Le domaine de linéarité est respecté sur la gamme de concentration étudiée ($R^2 = 0,998$) et la pente de la courbe d'étalonnage est établie à $0,29 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$.

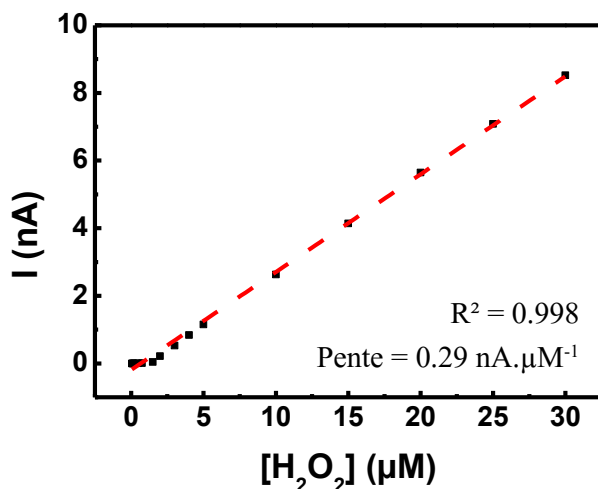


Figure 131 Courbe d'étalonnage tracée à partir des mesures de l'intensité moyenne du courant obtenues par chronoampérométrie lors d'ajouts successifs d' H_2O_2 .

Ce premier étalonnage nous a permis de définir la limite de détection de nos ultramicroélectrodes en régime de diffusion. De plus, nous avons pu évaluer la rapidité du système en termes de

réponse en courant après injection de même que la linéarité du signal de 0,5 à 30 μM de peroxyde d'hydrogène.

ii. Sous flux

Dans un second temps, un étalonnage sous flux a été réalisé. Pour cela, des solutions d' H_2O_2 sont préparées (gamme de concentration : 0,1 à 1 mM) en tampon PBS (10 mM, pH 7,4) et de la fluorescéine est ajoutée (60 μM). Cette expérience est réalisée sous contrôle microscopique et la fluorescéine permet de visualiser le flux fourni par la microinjection de solutions d' H_2O_2 (Figure 132).

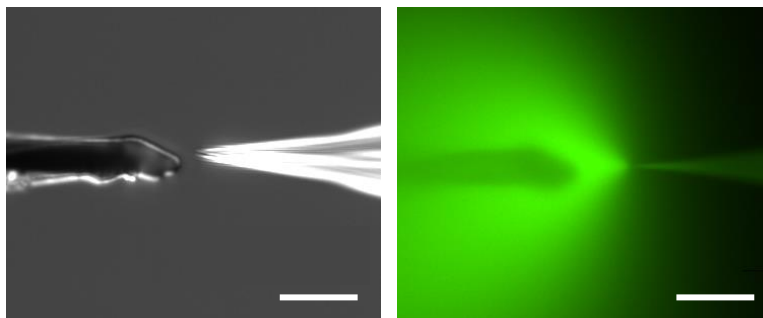


Figure 132 Flux d' H_2O_2 et fluorescéine (60 μM) injecté face à une UME fibre de carbone platinée. La fluorescéine est ajoutée pour visualiser le flux. Images obtenues par microscopie plein champ. Bar d'échelle = 25 μm .

Comme précédemment, cet étalonnage est obtenu par chronoampérométrie à + 0,35 V vs. Ag/AgCl pour la détection du peroxyde d'hydrogène, cependant un contrôle a d'abord été effectué à un potentiel plus élevé (+ 0,9 V) par injection d'une solution de fluorescéine pour vérifier que celle-ci n'interfère pas avec la mesure (Figure 133).

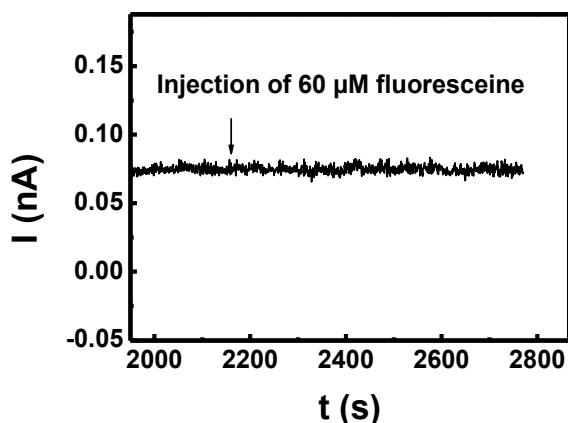


Figure 133 Chronoampérométrie enregistrée à + 0,9 V vs. Ag/AgCl avec une UME fibre de carbone (10 μm de diamètre) platinée (10 μC). L'injection continue d'une solution de fluorescéine à 60 μM (diluée dans le PBS 10 mM, pH 7,4) n'entraîne pas de modification du signal.

Lorsqu'un flux continu de fluorescéine est envoyé sur l'électrode, aucune modification du signal de courant n'est observée, démontrant alors la transparence de cette espèce lors de la mesure chronoampérométrique.

Ensuite, l'expérience d'étalonnage commence par la polarisation de l'électrode dans le tampon pur pendant une vingtaine de minutes puis chaque solution est injectée devant l'électrode avec une forte pression d'injection. La pression d'injection doit être calibrée de façon à négliger la dilution établie lors l'injection de la solution dans le volume, autrement dit, de façon à ce que la concentration du flux détecté corresponde à la concentration de la solution dans la pipette d'injection. Pour se faire,

la pression d'injection est augmentée de façon progressive jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'augmentation de courant : lorsque le courant est stable même lorsque la pression augmente, la valeur de cette dernière est déterminée comme optimale. Cette étape est dépendante de la micropipette d'injection et doit être renouvelée pour chaque solution de peroxyde d'hydrogène. Chaque solution est injectée pendant 20 secondes à quatre reprises, dans le but de s'assurer de la reproductibilité de la mesure (Figure 134). Le profil du signal de variation de courant adopte une forme en crêteaux. En effet, à chaque injection, une réaction anodique se produit à la surface de l'électrode mais dès que le flux est arrêté, le peroxyde d'hydrogène se dilue aussitôt dans le volume par convection (500 μL total pour un volume injecté de l'ordre du nL), entraînant un retour au courant de base. La concentration en peroxyde d'hydrogène accumulé en fin d'expérience est considérée comme négligeable puisque la ligne de base du courant en début et en fin d'expérience n'a pas évolué (20 pA).

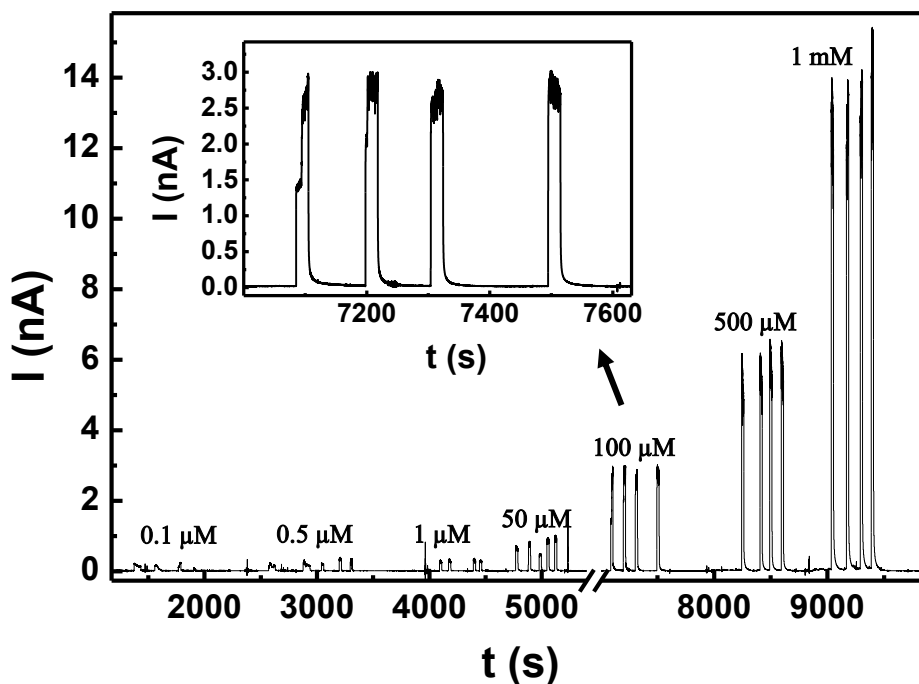


Figure 134 Chronoampérométrie enregistrée à +0,35 V vs. Ag/AgCl avec une UME fibre de carbone (10 μm de diamètre) platinée (10 μC) lors d'injections successives de solutions d' H_2O_2 à différentes concentrations (diluées dans PBS 10 mM, pH 7,4). Superposition : zoom sur les 4 injections de 20 s d'une solution d' H_2O_2 à 100 μM .

Le profil obtenu en chronoampérométrie confirme la rapidité de la réponse de l'électrode puisque l'intensité du courant augmente instantanément lorsqu'un flux est envoyé sur l'électrode, de même qu'il décroît immédiatement après arrêt du flux jusqu'à un niveau de courant légèrement supérieur à celui de la ligne de base. Le courant redescend ensuite plus lentement jusqu'à celui du courant de fond, ce qui met en évidence la diffusion du H_2O_2 présent dans l'environnement proche de la surface de l'électrode.

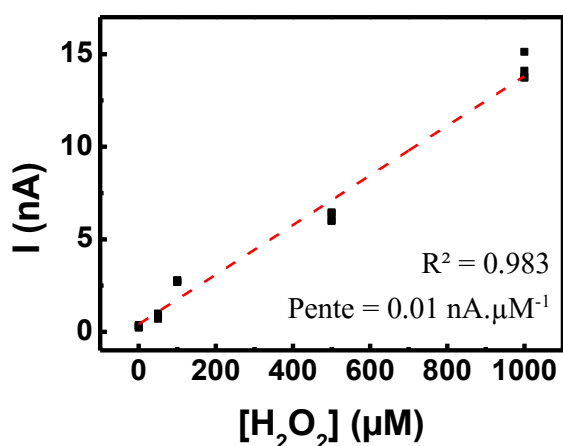


Figure 135 Courbe d'étalonnage tracée à partir des mesures de l'intensité moyenne du courant de plateau obtenues par chronoampérométrie (+ 0,35 V). Les variations de concentrations sont réalisées par microinjection devant l'UME.

Pour établir la droite d'étalonnage, la valeur de l'intensité du courant de chaque palier est moyennée sur les 20 s de l'injection et est associée à la concentration en H_2O_2 correspondante (Figure 135). A nouveau, bien que légèrement moins bonne que pour l'étalonnage en solution, la linéarité est respectée ($R^2 = 0,983$). Cette différence est due à une légère instabilité du flux. En effet, les pressions sont de l'ordre de quelques bars (1 à 3 bars) et s'appliquent sur un fluide s'échappant par une ouverture de 1 à 2 μm (diamètre d'ouverture de la pointe de la micropipette), induisant une instabilité relative du flux. D'autre part, dans ces conditions, l'injecteur utilisé s'approche de ses limites en termes de pression, conduisant à de légères variations de pression au cours de l'injection.

Ensuite, la pente de la courbe d'étalonnage est établie à $0,01 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ce qui est 20 fois moins que pour l'étalonnage en solution. Cette baisse, *a priori*, de sensibilité est en fait liée à la différence de régime entre les deux expériences. En effet, dans le cas du premier étalonnage en solution, l'expérience est réalisée sous agitation constante induisant des mouvements de convection homogènes au sein de l'ensemble de la solution ; de ce fait, l'épaisseur de la couche de diffusion due à l'oxydation de H_2O_2 à la surface de l'électrode est stable. Par ailleurs, en ce qui concerne l'étalonnage sous flux, la convection détermine le transport de matière et donc le niveau de courant. De plus, la solution est projetée directement sur l'électrode ce qui induit une forte turbulence locale : la couche de diffusion est quasi-inexistante et il est raisonnable de penser que la cinétique de convection des molécules de peroxyde d'hydrogène est supérieure à la cinétique du transfert d'électrons permettant l'oxydation. Ainsi, cette droite d'étalonnage ne reflète pas les concentrations réelles utilisées d' H_2O_2 mais la réponse de nos électrodes sous flux de solution.

b. Production de peroxyde d'hydrogène par le système glucose/GOX dans un microréacteur et détection électrochimique in situ

Dans cette dernière partie du paragraphe, les résultats présentés concernent la détection du peroxyde d'hydrogène, d'abord directement injecté dans une vésicule et ensuite, généré par la conversion du glucose par la glucose oxydase au sein d'un liposome géant.

i. Injection d' H_2O_2

Une première étude a été réalisée en injectant directement du peroxyde d'hydrogène au sein d'une vésicule et le suivi de la diffusion du milieu intravésiculaire vers le milieu extravésiculaire est

analysé par chronoampérométrie (+ 0,35 V vs. Ag/AgCl). La démarche à suivre pour ce type d'expérience se déroule comme suit : les vésicules sont d'abord formées en tampon PBS (10 mM, pH 7,4) et une quinzaine de minutes après leur gonflement, elles sont récupérées et transférées sur une lame en verre recouverte de résine SU-8 directement disposée sur le microscope (Figure 136). Les électrodes sont ensuite positionnées dans la solution : d'une part, une UME à fibre de carbone platinée (10 μm diamètre, charge de platination = 10 μC) sert d'électrode de travail pour l'électrochimie et un fil d'argent recouvert d'un dépôt de chlorure d'argent sert à la fois d'électrode de référence et de contre électrode (la quantité d'espèce produite à la contre électrode étant négligeable dans le cas des UME, un système à 2 électrodes peut être utilisé ici). D'autre part, la pipette de microinjection est équipée d'un fil de Pt (250 μm de diamètre) servant d'électrode pour l'électroporation et un fil de platine dans la solution sert de contre électrode. L'UME et la pipette d'injection sont toutes les deux contrôlées par deux micromanipulateurs leur permettant un déplacement de précision (le détail des équipements utilisés est donné en Annexe I.2).

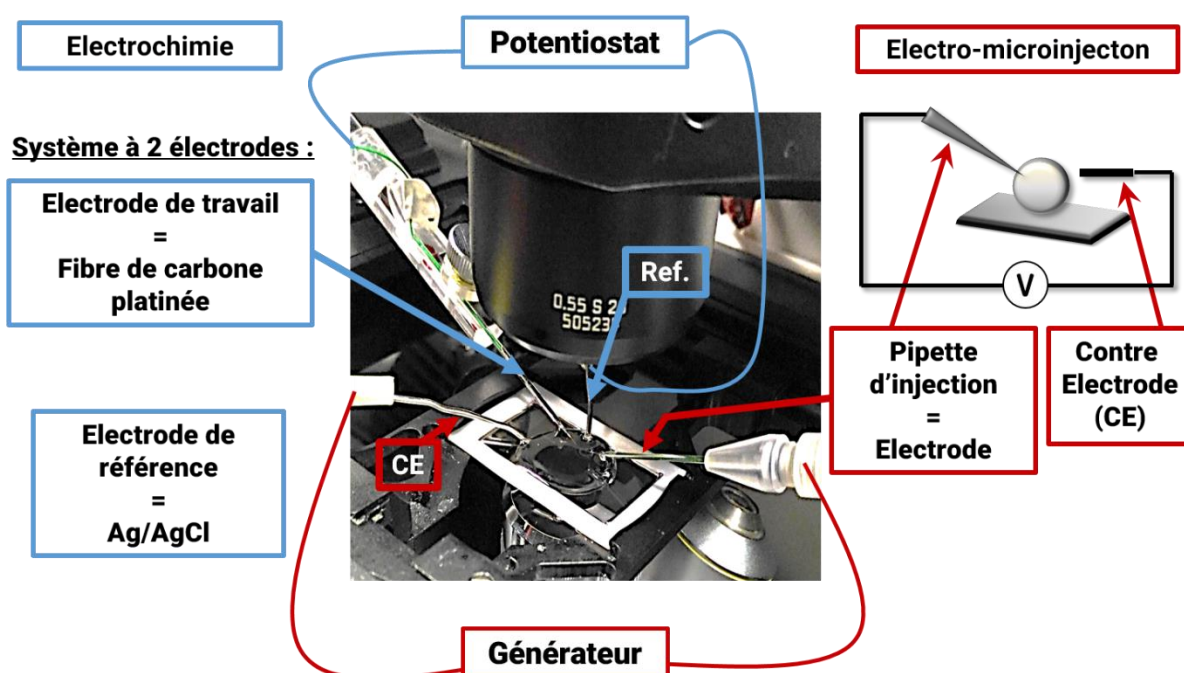


Figure 136 Représentation du montage utilisé lors des expériences de microinjection au sein de vésicules géantes et de détection électrochimique simultanée d'espèces diffusant vers le milieu extravésiculaire. La solution contenant les vésicules est déposée sur une lame modifiée avec une résine SU-8 positionnée sur la platine d'un microscope inversé. Quatre électrodes sont positionnées au sein de cette solution : un système à 2 électrodes reliées à un potentiostat est utilisé pour la détection électrochimique (électrode de travail = UME fibre de carbone platinée – Référence = contre électrode = fil d'Ag/AgCl) et les 2 autres électrodes sont des fils de platine utilisés pour électroporer la membrane des vésicules lors de la microinjection, l'un étant placé dans la micropipette (250 μm de diamètre) et l'autre est placé directement dans la solution.

L'UME est positionnée dans la solution puis le potentiel de + 0,35 V est appliqué jusqu'à stabilisation du courant. En parallèle, les vésicules ont le temps de sédimenter et s'immobilisent sur la résine. Il s'agit ensuite de sélectionner une GUV de façon à ce que le réservoir ne gêne ni lors de la microinjection ni lors de la détection, puis, un mélange d' H_2O_2 (2,5 mM) et de fluorescéine (60 μM) est microinjecté dans le liposome choisi (Figure 137 a).

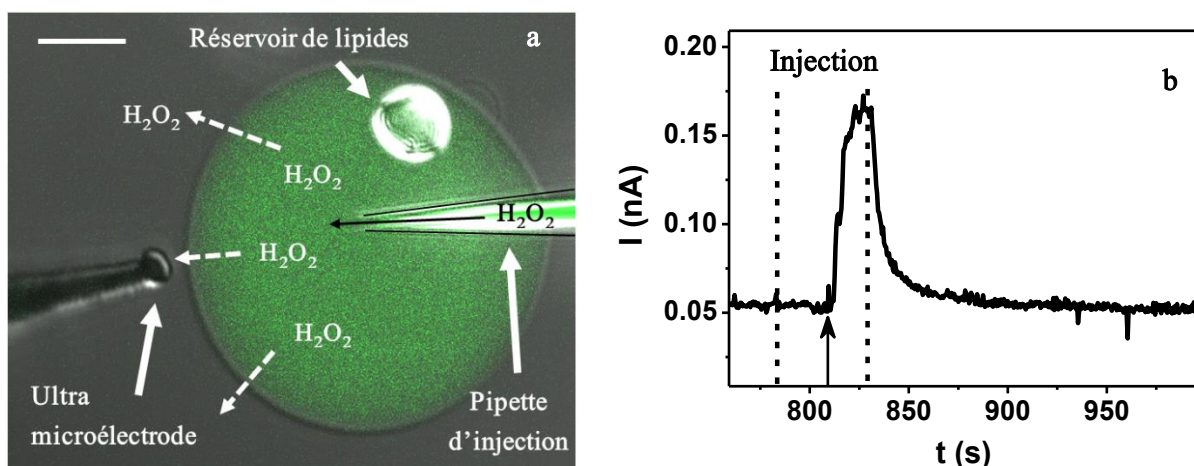


Figure 137 Electro-microinjection de peroxyde d'hydrogène (2,5 mM solubilisé dans PBS 10 mM, pH 7,4) au sein d'une GUV (a) et détection simultanée par chronoampérométrie à + 0,35 V vs. Ag/AgCl (b) avec une UME fibre de carbone platinée positionnée au voisinage de la membrane. (a) La solution injectée contient 60 μ M de fluorescéine pour faciliter la visualisation de la microinjection. Image obtenue par microscopie confocale. Superposition des images en contraste de phase interférentiel et de fluorescence. Bar d'échelle = 25 μ m. (b) Les lignes en pointillés symbolisent le temps de l'injection et la flèche symbolise le moment où l'électrode est placée au voisinage de la membrane.

Ici, l'injection dure 50 s mais l'électrode n'est positionnée au voisinage de la membrane qu'après le début de l'injection, ce qui explique les quelques secondes de latence entre le début de l'injection et la variation de courant observée sur la Figure 137 b. Lorsque l'injection est terminée, l'intensité du signal électrochimique diminue jusqu'à un retour à la ligne de base. Le profil de décroissance du courant post-injection est spécifique d'un profil de diffusion, signifiant alors que le peroxyde d'hydrogène injecté au sein de la vésicule diffuse vers le milieu extérieur. Néanmoins, ce profil se compose de plusieurs composantes qui rendent le signal difficile à interpréter. D'abord, à l'intérieur de la vésicule, un mouvement de convection issu du flux d'injection contrôle le transport des espèces ; ensuite, la diffusion d' H_2O_2 au sein de la membrane dépend du coefficient de partition de cette espèce pour cette membrane ; puis, la diffusion d' H_2O_2 depuis l'extérieur de la membrane jusqu'à l'électrode ; et enfin, le gradient de concentration créé lors de l'oxydation de l'espèce à la surface de l'électrode induit la formation d'une couche de diffusion. Une simulation de ces effets pourrait nous permettre d'aller plus loin dans l'interprétation de ce signal de diffusion.

ii. Production enzymatique de H_2O_2

Dans un second temps, le peroxyde d'hydrogène détecté par électrochimie est directement issu de la réaction enzymatique Glucose/GOX. Ici, les vésicules sont formées dans une solution de glucose (1 mM) dans le PBS (10 mM, pH 7,4), elles sont récupérées, transférées et immobilisées sur une lame modifiée avec une résine SU-8. En parallèle de la sédimentation des GUVs, le potentiel de + 0,35 V est appliqué entre l'UME à fibre de carbone platinée (10 μ m de diamètre, 10 μ C) et un fil d'Ag/AgCl servant de référence et de contre électrode. Après polarisation de l'électrode, une solution de GOX (134 pL à 2,5 U.mL⁻¹, soit 3,36.10⁻⁷ U) est injectée au sein du microréacteur conduisant au déclenchement de la réaction enzymatique. Le peroxyde d'hydrogène est produit au sein de la vésicule puis diffuse à travers la membrane et est détecté à la surface de l'électrode placée au voisinage de la membrane (Figure 138).

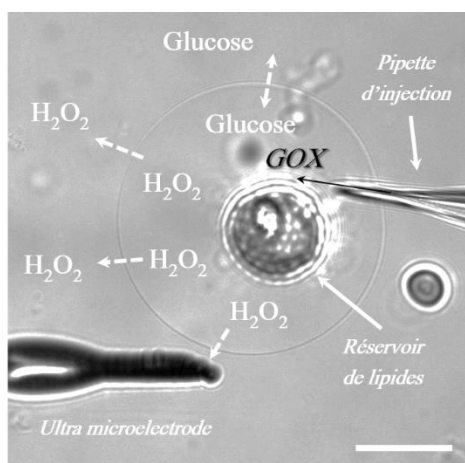


Figure 138 Electro-microinjection d'une solution de GOX (2,5 U.mL⁻¹ solubilisée dans PBS 10 mM, pH 7,4) au sein d'une GUV formée dans une solution de glucose-PBS (1 mM et 10 mM, pH 7,4 respectivement). Le peroxyde d'hydrogène est formé au sein de la GUV, diffuse vers l'extérieur et est détecté à la surface de l'UME. Bar d'échelle = 25 μm.

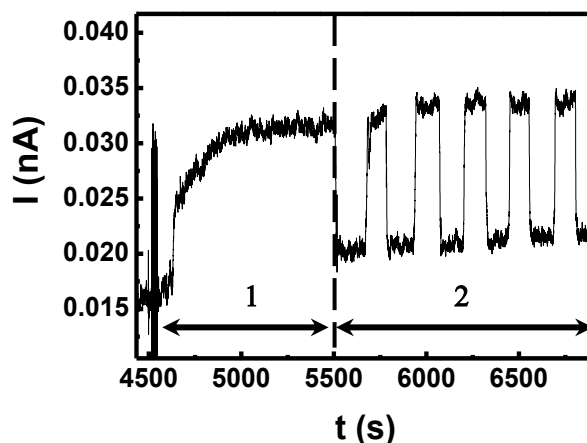


Figure 139 Détection par chronoampérométrie à + 0,35 V vs. Ag/AgCl d'H₂O₂ produit par la réaction enzymatique Glucose/GOX. Une UME fibre de carbone platinée (10 μm de diamètre, 10 μC) est positionnée au voisinage de la membrane juste après électro-microinjection de la GOX dans la GUV (1). Après 1500 s, l'UME est déplacée à environ 100 μm de la membrane pendant 1 min puis repositionnée au voisinage de la membrane. Cette opération est répétée 6 fois (2).

La production de peroxyde d'hydrogène est suivie par chronoampérométrie dès que la réaction est déclenchée par injection de la GOX (Figure 139). Comme démontré au paragraphe précédent, le glucose peut diffuser à travers la membrane ce qui permet un apport constant en substrat au sein du microréacteur tandis que l'enzyme reste confinée dans le milieu intravésiculaire. Cela signifie qu'après injection de la GOX dans le liposome, une production continue d'H₂O₂ est attendue, et ce, *a priori*, jusqu'à épuisement du substrat. Dans les conditions de l'expérience et en se basant sur l'activité de la GOX, nous avons modélisé la courbe théorique de production du peroxyde d'hydrogène en considérant le volume total de solution et la concentration en glucose (1 mM dans 500 μL, soit 5.10⁻⁷ mol au total) et nous avons pu estimer la vitesse de production à 5,6.10⁻¹⁵ mol.s⁻¹ (Figure 140 a). Ainsi, il apparaît que plusieurs milliers d'heures seraient nécessaires pour consommer la totalité du glucose. Néanmoins, ce calcul est simplifié et ne prend pas en compte la vitesse de diffusion du glucose dans la solution et à travers la membrane. Ainsi, il est raisonnable de penser que l'approximation sur la vitesse de production proposée ici est estimée à la hausse par rapport à la vitesse réelle, le temps nécessaire pour consommer la totalité du substrat étant estimé à la baisse.

A partir du signal de chronoampérométrie, on observe le profil de la cinétique enzymatique avec une augmentation progressive du courant jusqu'à un plateau marquant l'état stationnaire de la production enzymatique (Figure 139 zone 1). Au plateau, l'enzyme produit du peroxyde d'hydrogène à une vitesse constante : cette vitesse est conditionnée par la cinétique d'apport du substrat au sein du microréacteur, et donc de la cinétique de diffusion du glucose du milieu extravésiculaire vers le milieu intravésiculaire. A partir du signal dans la zone 1 de la Figure 139, il est possible de calculer la charge à partir de l'intégration de la courbe et, par suite, de déterminer la quantité de peroxyde d'hydrogène détecté grâce à la loi de Faraday :

$$n = \frac{Q}{z \cdot \mathcal{F}} = \frac{\int_0^t I_t \cdot dt}{z \cdot \mathcal{F}} \quad (43)$$

Où n est la quantité d'espèce électrolysée (mol), Q est la charge (C), z est le nombre d'électrons échangés, $\mathcal{F}$ est la constante de Faraday ($96\,485\text{ C.mol}^{-1}$) et I_t est le courant (A). Ainsi, il est possible de calculer la quantité de peroxyde d'hydrogène oxydée à la surface de l'électrode à chaque moment de la mesure (Figure 140 b). A partir de cette donnée, la vitesse de la réaction peut être obtenue en faisant une régression linéaire de la courbe $n_{\text{H}_2\text{O}_2} = f(t)$ et est estimée à $6,6.10^{-17}\text{ mol.s}^{-1}$. Cette valeur est bien inférieure à la vitesse simulée présentée sur la Figure 140 a. Cependant, la quantité de peroxyde d'hydrogène réellement oxydée est sous-estimée par rapport à la quantité réelle produite puisque la réaction anodique n'a lieu qu'à la surface de l'électrode mais le H_2O_2 produit diffuse dans l'ensemble du volume. Ici la surface de l'électrode ne représente que 2% de la surface totale de la vésicule. Ainsi pour estimer quelle quantité de peroxyde d'hydrogène est réellement produite par la réaction enzymatique, il faut multiplier la quantité d'espèce oxydée par le facteur de collecte ($\times 50$) (Figure 140 c). Dans ce cas, la valeur de la vitesse de production est de $3,3.10^{-15}\text{ mol.s}^{-1}$ ce qui correspond à 60% de la valeur théorique calculée sur la modélisation ($5,6.10^{-15}\text{ mol.s}^{-1}$). Les écarts obtenus entre l'expérience et la modélisation peuvent être liés aux approximations faites dans le calcul de la vitesse théorique qui est sur-estimée puisque nous ne prenons pas en compte la vitesse réelle de diffusion du glucose vers le milieu intravésiculaire. A nouveau, il serait intéressant de pouvoir simuler ces effets pour pouvoir calculer une vitesse de production d' H_2O_2 plus précisément.

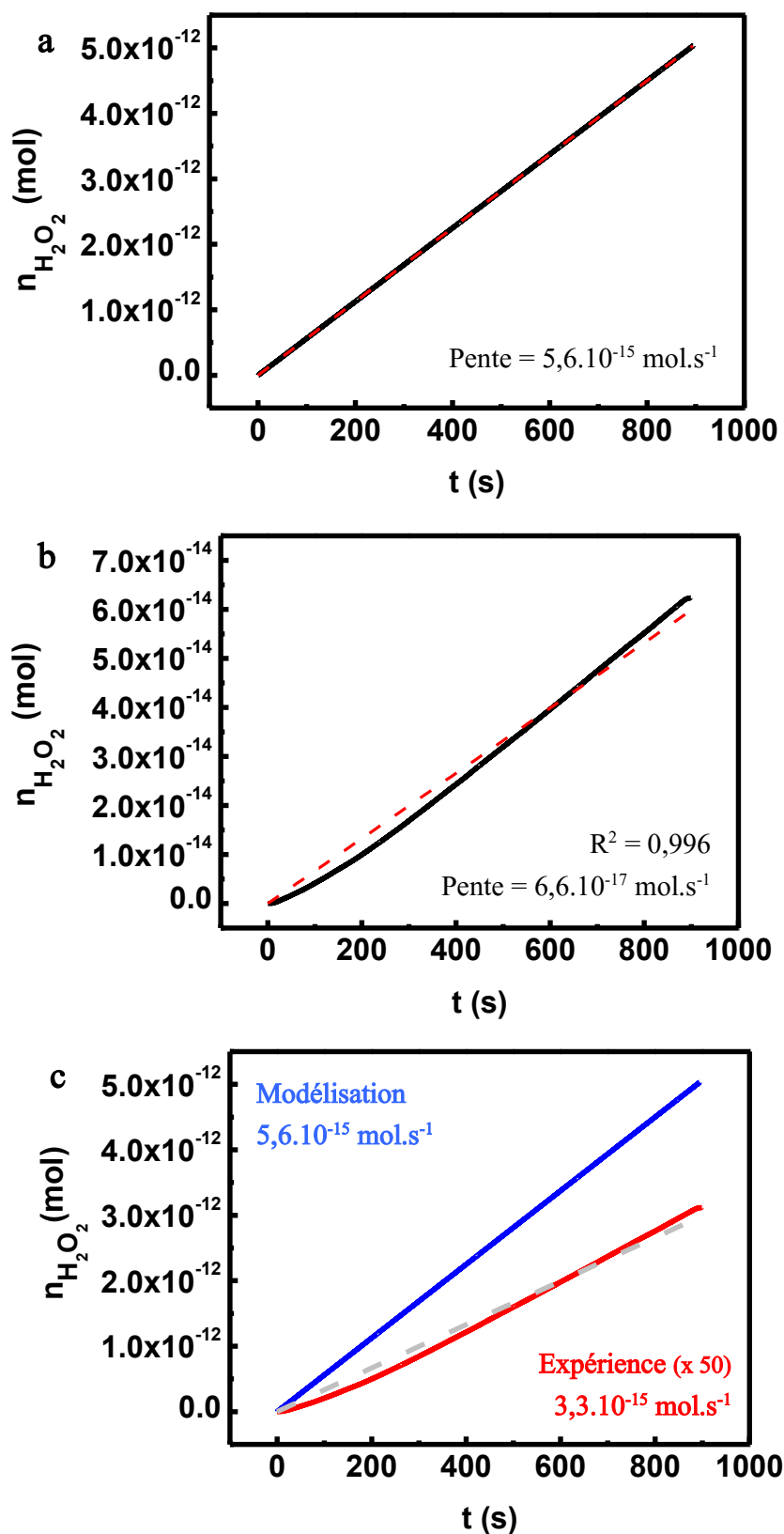


Figure 140 (a) Modélisation de la quantité de peroxyde d'hydrogène produite par l'oxydation du glucose catalysée par la GOX ($3,36 \cdot 10^{-7}$ U) au sein de la vésicule. Cette courbe ne prend en compte les cinétiques de diffusion du glucose du milieu extravésiculaire vers le milieu intravésiculaire. (b) Quantité de peroxyde d'hydrogène oxydée à la surface de l'électrode au cours du temps calculé à partir de l'intégration du signal de chronoampérométrie. (c) Superposition de la modélisation et de la courbe déterminée à partir des données expérimentales (multipliées par 50 pour tenir compte du facteur de collecte) pour estimer la quantité totale d' H_2O_2 produite et non seulement la quantité oxydée.

Par ailleurs, dans la zone 2 de la Figure 139, l'électrode est éloignée d'environ 100 μm puis repositionnée au voisinage de la membrane de manière périodique conduisant au profil en créneau du signal de chronoampérométrie. Lorsque l'électrode est éloignée de la vésicule, c'est-à-dire de la source de peroxyde d'hydrogène, le courant diminue instantanément. De plus, puisque dans cette partie de l'expérience, la production enzymatique est continue et que la cinétique de production est stationnaire alors l'intensité du courant détecté à chaque retour à la position initiale de l'électrode est constante. Néanmoins, une légère augmentation globale du signal est à attribuer à la formation d'un gradient de concentration en peroxyde d'hydrogène qui s'établit autour du microréacteur au cours du temps.

Enfin, une étude de la sensibilité *in situ* des UME en considérant la distance entre l'électrode et la membrane de la vésicule a été réalisée. La détection par chronoampérométrie de l'expérience décrite dans ce paragraphe est poursuivie avec le même microréacteur contenant la glucose oxydase : la Figure 141 (a) fait suite à la Figure 139. De la même façon que représentée sur la zone 2 de la Figure 139, ici l'électrode est éloignée puis rapprochée de la membrane à des distances contrôlées. Ainsi, une relation entre l'intensité du courant et la distance entre l'UME et la membrane de la GUV peut être établie (Figure 141 b), elle correspond à une perte de $0,90 \text{ pA} \cdot \mu\text{m}^{-1}$. Ici, le maximum d'intensité de courant est de 34 pA et la ligne de base se situe à 21,5 pA ce qui signifie que le signal maximal (lorsque l'électrode est au plus proche de la membrane) est de 12,5 pA. Ainsi une perte de $0,90 \text{ pA} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ représente une perte d'environ 7,5% du signal par μm . Ce dernier résultat permet de mettre en évidence la sensibilité de la mesure et l'importante influence de la position de l'électrode par rapport à la membrane. En effet, le flux d' H_2O_2 sortant de la GUV est immédiatement dilué dans le volume extérieur, ce qui a pour effet d'influencer drastiquement sur la mesure du courant détecté. Cet effet de dilution est un argument supplémentaire pouvant justifier le léger écart entre les cinétiques calculées à partir d'une modélisation et de l'intégration du signal d'électrochimie. L'UME devant être placée au plus proche de la membrane mais néanmoins ne doit pas la toucher pour éviter toute pollution de sa surface par les lipides, il est donc nécessaire de la positionner à quelques micromètres de la membrane.

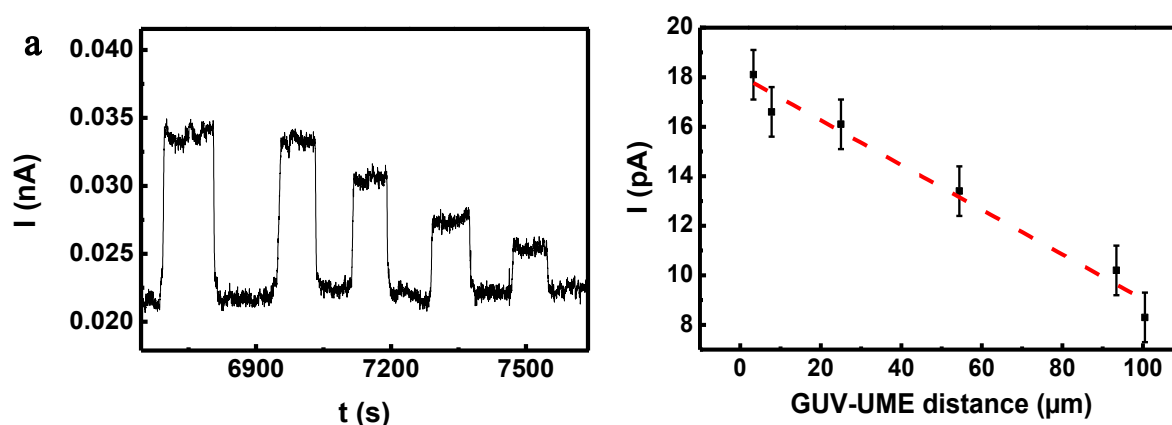


Figure 141 Détection à distances variables entre l'UME et la membrane du H_2O_2 produit par la réaction enzymatique Glucose-GOX au sein d'une GUV. (a) Chronoampérométrie à +0,35 V vs. Ag/AgCl. (b) Intensité du courant stationnaire en fonction de la distance entre l'UME et la membrane de la GUV.

Au vu de ce dernier résultat, les 3 μm qui séparent l'électrode et la membrane au cours de la mesure (zone 1 de la Figure 139) suffisent à entraîner une chute d'environ 20% du signal : dans ces

conditions, il est raisonnable de penser que cet effet de distance est partiellement responsable de l'écart entre la modélisation et l'expérience de la Figure 140 c. A cela s'ajoute les approximations faites sur le calcul de la courbe de modélisation précédemment discutées.

En conclusion de ce paragraphe, l'activité enzymatique de la glucose oxydase a pu être étudiée par électrochimie. La réaction a pu être confinée au sein d'un microréacteur biomimétique malgré les contraintes imposées par les propriétés de perméabilité particulières des vésicules.

De réels flux d'espèces produites ont pu être détectés et quantifiés par chronoampérométrie grâce à l'utilisation d'ultra-microélectrodes. Une quantité de peroxyde d'hydrogène de l'ordre de la femtomole (10^{-15} mol) a pu être détectée. Cette sensibilité est liée aux dimensions dans lesquelles les espèces sont détectées : les volumes étant de l'ordre du fL, de très faibles quantités peuvent être sondées.

Ensuite, l'effet de la distance entre la membrane et la surface de l'électrode sur la sensibilité a été mis en évidence. La position de l'électrode par rapport au flux (ici la GUV) doit être parfaitement contrôlée en vue d'analyses quantitatives.

Enfin, une étude de la cinétique enzymatique obtenue expérimentalement a été confrontée à une simulation. En tenant compte des quelques approximations utilisées et de l'influence de la distance UME-GUV sur la mesure, les résultats obtenus sont en très bon accord avec la théorie.

III. Mise en place de la détection du NO[•] et du NO₂⁻ : vers la caractérisation des activités des NO-Synthases

La dernière partie de ce chapitre est consacrée à la présentation de résultats préliminaires en vue de l'étude des activités enzymatiques des NO-Synthases en microréacteur. Ces enzymes sont les seules responsables de la production de monoxyde d'azote chez les mammifères et présentent un grand intérêt du point de vue de la recherche biomédicale puisqu'elles sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques importants (vasodilatation, neurotransmission...). Les mécanismes réactionnels des NO-Synthases proposés à ce jour ont été présentés au Chapitre 1, ainsi que leurs structures et fonctions. Rappelons brièvement que ces enzymes sont suspectées de ne pas produire seulement du NO[•] mais également d'autres espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS et RNS) tels que le superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, le peroxynitrite ou encore les nitrites.

L'ambition du projet est de pouvoir caractériser par électrochimie les signaux de ces différentes espèces de manière simultanée dans le but de caractériser et possiblement quantifier différentes activités des NO-Synthases *in cellulo*. Dans un premier temps, et de manière analogue avec ce qui a été fait pour la réaction modèle Glucose/GOX, il s'agira de calibrer le système vis-à-vis des espèces d'intérêt puis de détecter ces espèces après encapsulation au sein d'un microréacteur. Les prochains paragraphes seront dédiés à la présentation de ces premiers résultats.

1. Calibration du système de détection vis-à-vis du NO[•] et du NO₂⁻

Tout d'abord, une expérience de voltamétrie cyclique a été réalisée dans une solution de NO[•] dégazée, dans le but d'établir les valeurs exactes des potentiels d'oxydation du NO[•] et du NO₂⁻ avec les UME à fibre de carbone platinée qui sont utilisées tout au long des expériences présentées dans ce manuscrit (Figure 142). Cette expérience est conduite dans une solution anaérobie de NO[•] à 180 µM dissout dans du PBS. Une solution stock saturée a été préparée en faisant buller un flux de NO[•] (gaz) dans un tampon phosphate préalablement dégazé (protocole détaillé en Annexe II.7). La concentration de la solution stock est déterminée par le test oxyhémoglobine (protocole décrit en Annexe II.8). Brièvement, l'oxyhémoglobine est une protéine possédant un fer hémique ayant une affinité pour le monoxyde d'azote. Lorsque du NO[•] est présent, le degré d'oxydation du fer hémique est modifié, induisant une modification de la signature spectrale de l'oxyhémoglobine. Un suivi par spectroscopie UV-visible permet le calcul de la concentration en NO[•] de la solution dosée.

L'expérience de voltamétrie cyclique est effectuée entre + 0,1 et + 0,9 V *vs.* Ag/AgCl à la vitesse de 0,02 V.s⁻¹. Sur le premier cycle, deux vagues d'oxydation sont observées : d'abord la vague du NO[•] dont le potentiel de demi-vague se situe à environ + 0,55 V *vs.* Ag/AgCl, suivie de la vague d'oxydation du NO₂⁻, de potentiel de demi-vague égale à + 0,72 V *vs.* Ag/AgCl. L'insert de la Figure 142 montre l'évolution des différents cycles au cours du temps : au fur et à mesure des analyses, la vague du NO[•] diminue au profit d'une augmentation de celle du NO₂⁻. Cette évolution est mise en évidence sur la Figure 142 sur laquelle la courbe noire correspond à la vague d'oxydation du cycle 1 et la courbe rouge à celle du cycle 22. Avec la surface d'électrode utilisée (UME à fibre de carbone platinée), la vague anodique du NO[•] atteint un potentiel de semi-plateau à + 0,62 V *vs.* Ag/AgCl et

celle du NO_2^- à +0,85 V vs. Ag/AgCl. Dans la suite des expériences de chronoampérométrie présentées, le potentiel utilisé pour la détection seule du NO^* sera donc fixé à +0,65 V vs. Ag/AgCl et celui d'une combinaison du NO^* et du NO_2^- à +0,9 V vs. Ag/AgCl.

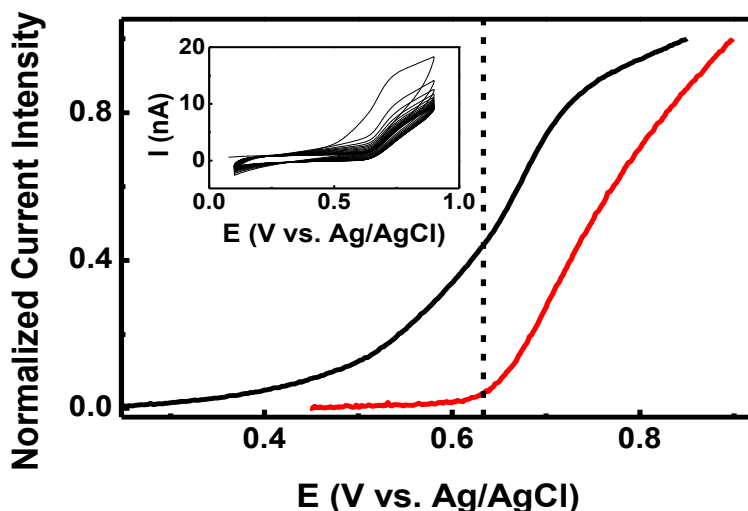


Figure 142 Voltamétrie cyclique enregistrée entre +0,1 V et +0,9 V vs. Ag/AgCl à une vitesse de balayage de 0,02 V.s⁻¹ dans une solution de NO dans le PBS (180 μM et 10 mM, respectivement ; pH 7,4) dégazée. Courbe noire = cycle 1. Courbe rouge = cycle 22. Insert : ensemble des 22 cycles de l'expérience.

a. En solution : NO^*

Comme précédemment réalisée avec le peroxyde d'hydrogène et dans le but de déterminer une relation entre la concentration en NO^* et le courant détecté, une expérience de calibration par chronoampérométrie à +0,65 V vs. Ag/AgCl a été mise en œuvre, toujours avec une UME à fibre de carbone platinée. Cette expérience consiste à effectuer des ajouts successifs d'une solution de NO^* dans le PBS et à suivre l'évolution du courant en fonction des ajouts.

Après un temps suffisant de polarisation de l'électrode, le monoxyde d'azote est injecté dans une cellule électrochimique hermétique préalablement conditionnée avec un flux d'azote pour éliminer l'oxygène. Des seringues Hamilton « gas tight » (hermétiques) préalablement purgées par de l'azote sont utilisées lors des prélèvements de solution stock et des injections. Tous les flacons contenant la solution stock saturée et les solutions stocks intermédiaires (issues de la dilution de la solution saturée), de même que la cellule électrochimique sont équipés d'un septum garantissant l'herméticité du système lors des prélèvements. De plus, un flux d'azote est envoyé à la surface de la solution tout au long de l'expérience de manière à laisser une légère surpression d'azote qui compense des fuites possibles lors des injections de NO^* .

Comme pour l'étalonnage du peroxyde d'hydrogène, un profil en marche d'escalier est attendu, chaque ajout entraînant une augmentation de concentration (stable sur UME) et donc une augmentation du courant. L'expérience est également effectuée sous agitation constante.

Le profil obtenu est différent de celui attendu : une augmentation de courant est bien observée à chaque ajout mais le signal diminue rapidement juste après (Figure 143). Cette chute post-ajout est la marque d'une instabilité du système de détection du NO^* .

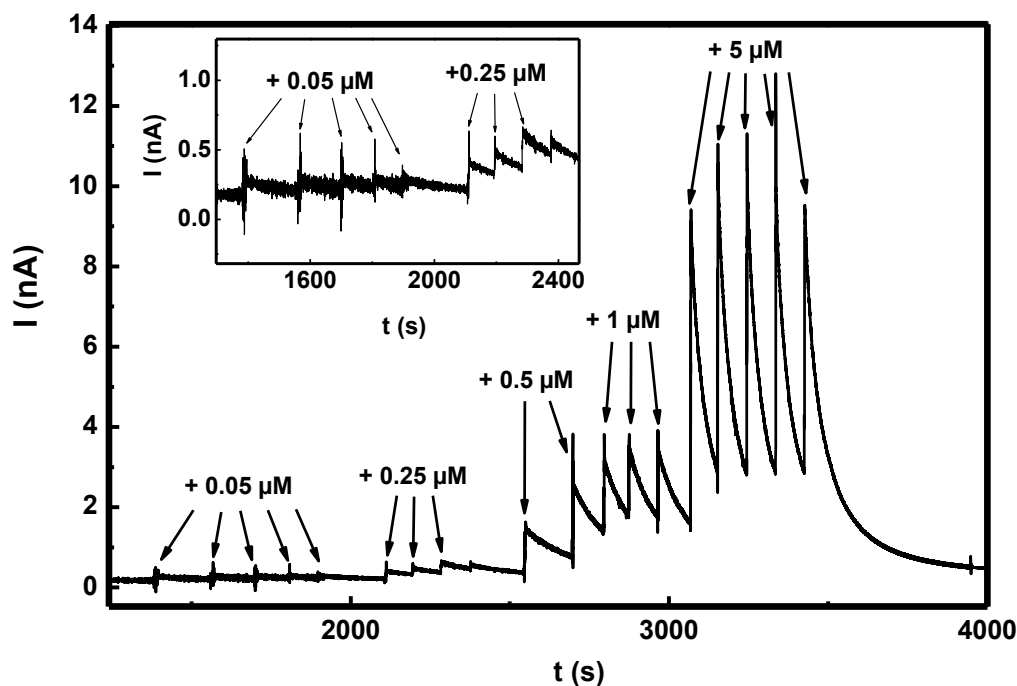


Figure 143 Chronoampérométrie enregistrée à +0,65 V vs. Ag/AgCl avec une UME à fibre de carbone (10 µm de diamètre) platinée (10 µC) lors d'ajouts successifs d'une solution de NO• (PBS 10 mM, pH 7,4, condition anaérobie). Insert : zoom sur les premiers ajouts à $\Delta C = 0,05$ et $0,25$ µM.

Différentes hypothèses ont été émises quant à l'origine de l'instabilité observée :

- (1) De l'oxygène arrive malgré tout à rentrer dans la cellule électrochimique : malgré les conditions anaérobies et le flux d'azote, un éventuel manque d'herméticité à l'oxygène de la cellule est envisageable. Si des traces d'oxygène pénètrent dans la cellule, le flux d'azote pourrait ne pas être suffisant puisque la densité de l'oxygène est légèrement plus élevée que celle de l'azote. Nous avons donc reproduit cette expérience en remplaçant l'azote par de l'argon dans la majorité des étapes du protocole mais le même profil a été obtenu.
- (2) Le noir de platine recouvrant la surface de l'électrode contient souvent des oxydes (PtO_2) [200] qui pourraient éventuellement être responsables d'une réaction avec le NO• ou encore passiver l'électrode. L'expérience a donc été reproduite avec une UME fibre de carbone non platinée et dont la longueur de la fibre n'a pas été isolée (dans le but de pouvoir détecter suffisamment de courant d'oxydation). Bien que présentant une sensibilité de détection plus faible, et une cinétique plus lente, le profil décroissant en chronoampérométrie est à nouveau observé.
- (3) Bien que les solutions soient préparées avec de l'eau milliQ, d'éventuelles traces de cuivre dans la solution pourrait agir comme un catalyseur et réagir avec le NO•. L'ajout d'EDTA n'a pas eu d'effet sur le profil cinétique des chronoampérogrammes.
- (4) Le saut de courant observé à chaque addition de NO• n'est pas dû à ce dernier mais à des variations du courant capacitif, dues par exemple à de faibles variations ioniques de la solution ajoutée (espèces additionnelles au NO• lors de sa solubilisation dans le PBS). Un contrôle a été effectué en ajoutant la même solution de NO• préalablement aérée pendant une dizaine

d'heures : dans ce cas, tout le NO^* a été converti en NO_2^- . L'ajout de cette solution n'a provoqué aucun changement du signal de courant (pour $E = + 0,65 \text{ V vs. Ag/AgCl}$) ce qui va à l'encontre de l'hypothèse.

Ces observations ne sont pas en accord avec les résultats proposés dans la littérature par Lantoin et al. où des calibrations de ce type ont été réalisées en conditions anaérobie mais également aérobie (PBS, pH 7,4) [210]. Les électrodes utilisées dans cet article étaient des électrodes à fibre de carbone modifiées avec des membranes polymères (polymère porphyrine de Ni et Nafion) (voir Chapitre 1, paragraphe II. 3.b) et le signal électrochimique était obtenu par ampérométrie à impulsions différentielles (*Differential Pulse Amperometry*, DPA). Pour l'ensemble des conditions testées, une très bonne linéarité avait été obtenue entre l'intensité du courant et la concentration en monoxyde d'azote.

Après ces différents contrôles, nous n'avons pas été en mesure de déterminer exactement l'origine de l'instabilité du signal. Néanmoins, on observe que la chute du courant après ajout devient de plus en plus brutale avec les ajouts, indiquant que la cinétique de la perte de signal serait d'ordre 2. Ainsi, l'hypothèse la plus probable est liée à la présence d'une espèce qui conduit à la consommation du NO^* .

Dans l'hypothèse où cette espèce serait l'oxygène, un traitement des données est proposé en annexe (Annexe IV) dans le but de calculer la concentration résiduelle en oxygène dans la solution à partir des cinétiques de décroissance du courant de la Figure 143. Nous avons estimé la concentration en oxygène dans la solution à environ $5,7 \mu\text{M}$, ce qui est près de 45 fois inférieur à la valeur de la concentration en oxygène d'une solution aérée ($0,25 \text{ mM}$). Malgré les approximations faites pour réaliser ce calcul, si l'oxygène est réellement à l'origine de la déstabilisation du courant, il semblerait alors que quelques micromolaires suffisent pour entraîner une décomposition du NO^* suffisamment rapide par rapport à nos temps d'analyses.

b. En solution : NO_2^-

Ensuite, de manière analogue, une courbe d'étalonnage a été réalisée à partir d'ajouts successifs de solutions de nitrite. L'expérience de chronoampérométrie est effectuée au potentiel de $+ 0,85 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ et le profil en marches d'escalier attendu est bien obtenu (Figure 144 a). La gamme en NO_2^- testée est comprise entre $0,05$ et $30 \mu\text{M}$ et la sensibilité de l'électrode est estimée à $100 \text{ pA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ avec une bonne linéarité (Figure 144 b). Pour le peroxyde d'hydrogène, la sensibilité avait été établie à presque 300 pA par μM , ce qui est trois fois plus élevé que pour le nitrite. Cette différence de réactivité est due à la surface d'électrode. En effet, nous avons discuté au Chapitre 1 de l'affinité particulière du platine pour H_2O_2 ce qui facilite cinétiquement et thermodynamiquement son oxydation.

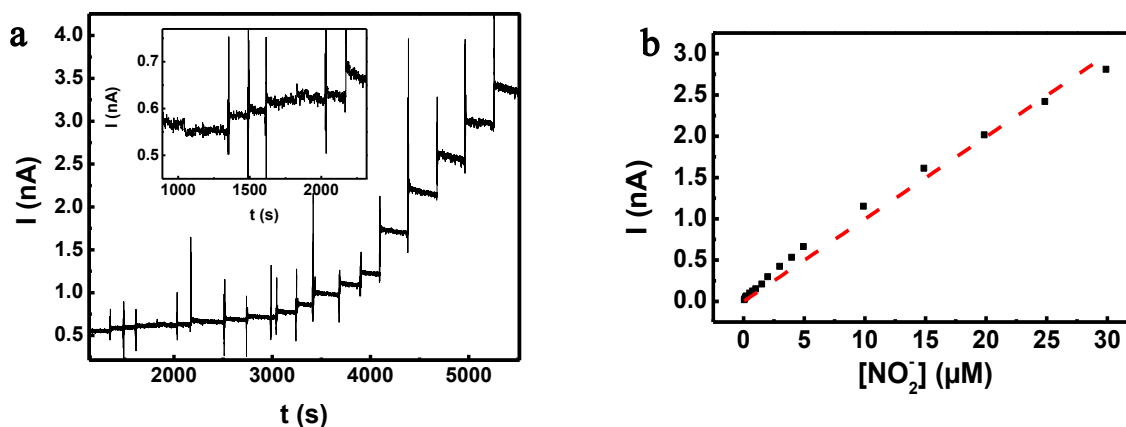


Figure 144 Chronoampérométrie enregistrée à + 0,85 V vs. Ag/AgCl avec une UME fibre de carbone (10 μm de diamètre) platinée (10 μC) lors d'ajouts successifs d'une solution de NO_2^- (PBS 10 mM, pH 7,4). Insert : zoom sur les premiers ajouts à $C = 0,05 - 0,01 - 0,15 - 0,20 \mu\text{M}$.

L'étalonnage *in vitro* des UME platinées pour le monoxyde d'azote a mis en évidence une instabilité du courant ne nous permettant pas d'établir une calibration précise de notre approche de détection.

Nous avons donc par la suite décidé d'utiliser des composés chimiques donneurs de NO^+ (NONOates) qui ont la propriété d'être instable à pH neutre ou acide et de se décomposer pour libérer du monoxyde d'azote en solution. Ces composés permettent d'assurer une production continue de NO^+ au cours d'une période de temps donnée.

2. Microinjection de produits et substrats de l'activité NO-Synthase dans un liposome géant

a. Généralités sur les NONOates

Les NONOates sont des composés dits « donneurs » de NO'. Ils sont formés d'un groupement amine fonctionnel, un groupement de liaison NO⁻, et un groupement nitrosyle terminal. Ils se décomposent selon un processus dépendant du pH et de la température d'après une cinétique d'ordre 1. Il existe un grand nombre de NONOates possédant des cinétiques de décomposition différentes, en fonction du groupement amine fonctionnalisé, et c'est ici le DEA-NONOate qui a été étudié (Figure 145). Le fournisseur indique que le temps de demi-vie du DEA-NONOates est de 16 min à 25°C et à pH 7,4 [341].

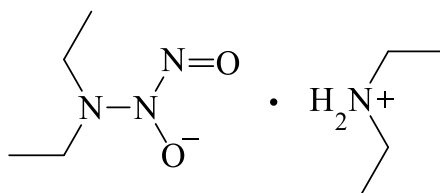


Figure 145 Structure chimique du DEA-NONOate.

Un suivi par spectroscopie UV-visible a été réalisé et permet de calculer la constante de vitesse associée au NONOate utilisé (Figure 146). L'évolution de l'absorbance à 250 nm permet de calculer la concentration en NONOates au cours du temps ($\epsilon_{\text{DEA}} = 8\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). La cinétique étant de premier ordre, la constante de vitesse est déterminée en traçant la courbe :

$$\ln \frac{[\text{DEA} - \text{NONOate}]_t}{[\text{DEA} - \text{NONOate}]_0} = f(t)$$

Le coefficient directeur de la droite obtenue correspond à $-k$, k étant la constante de vitesse de la réaction de décomposition du NONOate étudié. La valeur de k a été déterminée à 25°C en tampon PBS (10 mM, pH 7,4) :

$$k_{\text{DEA-NONOate}} = 6,8 \cdot 10^{-4} \pm 4 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$$

La valeur de la constante de vitesse obtenue est en accord avec celles données dans la littérature [342]–[344].

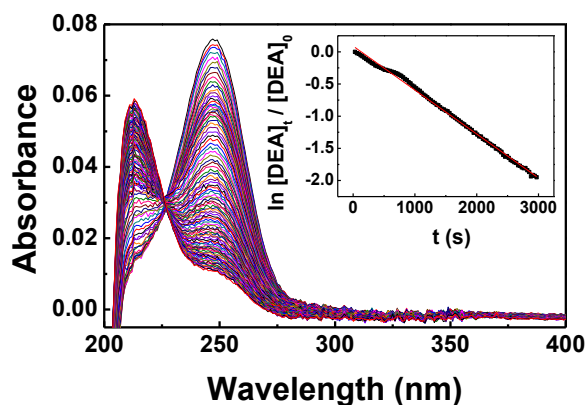


Figure 146 Suivi de la décomposition du DEA-NONOates (10 μM) à $T = 25^\circ\text{C}$ et pH 7,4 (PBS 10 mM) en spectroscopie UV-visible (acquisition d'un spectre toutes les 30 s). Insert : détermination de la constante de vitesse de la réaction de décomposition en suivant une loi de cinétique d'ordre 1 ($R^2 = 0,997$).

b. Détection de NO^* et NO_2^- injectés au sein d'une GUV

Etant donnée l'importante instabilité des solutions de NO^* , nous avons choisi d'injecter des solutions de DEA-NONOate. En effet, en utilisant les NONOates comme source de NO^* , une « production » régulière est assurée. Néanmoins, il ne faut pas oublier qu'en milieu aérobie, le monoxyde d'azote est sensible à l'oxygène, ce qui conduit *in fine* à la formation de nitrites en solution. La décomposition des NONOates entraîne donc une production de NO^* et de NO_2^- que l'on peut « décomposer » par des mesures comparatives aux potentiels de +0,65 V et +0,9 V vs. Ag/AgCl.

i. NO_2^-

Dans un premier temps, un test de perméabilité des membranes vis-à-vis du NO_2^- a été effectué par électro-microinjection d'une solution de NO_2^- à 1 mM au sein d'une vésicule. Bien que les membranes phospholipidiques soient théoriquement peu perméables aux espèces chargées, les propriétés de perméabilité particulières des membranes des vésicules à base du mélange SPE nous ont conduits à réévaluer leur comportement vis-à-vis des nitrites.

La détection du NO_2^- est assurée par chronoampérométrie à +0,9 V vs. Ag/AgCl (Figure 147). L'électrode est placée à 5 μm de la membrane et un flux continu de solution de nitrite est injecté au sein d'une GUV. Une injection prolongée entraîne logiquement le gonflement de la vésicule, jusqu'à une limite où elle peut éclater. Ceci a été obtenu en faisant augmenter le diamètre d'une vésicule par presque 4 (diamètre initial = 30 μm), ce qui signifie que son volume a été multiplié par près de 60. Le profil de chronoampérométrie montre une légère augmentation du courant entre le moment de l'injection et l'éclatement de la GUV, suivie d'une augmentation brutale du signal quand la vésicule éclate.

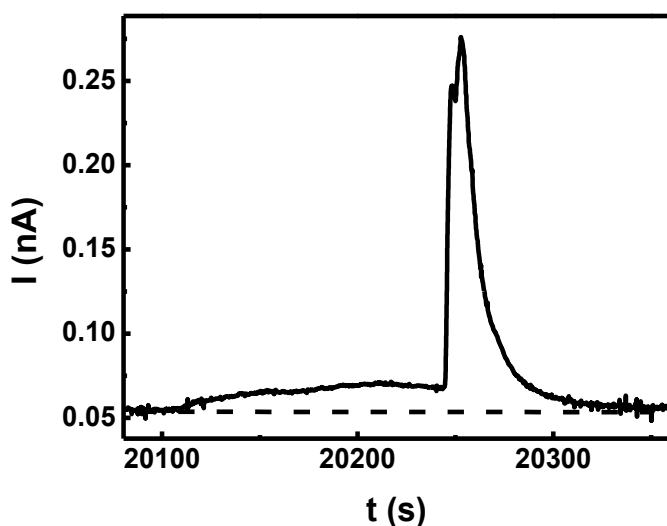


Figure 147 Chronoampérométrie enregistrée à +0,9 V vs. Ag/AgCl avec une UME à fibre de carbone (10 μm de diamètre) platinée (10 μC). Détection au voisinage de la membrane d'une GUV électro-microinjectée avec une solution de NO_2^- à 1 mM.

Ce résultat montre qualitativement que la diffusion vers l'extérieur des nitrites est faible et donc que la perméabilité de la membrane pour cet ion est limitée. En effet, lorsque la vésicule éclate, le flux de nitrite sortant est environ 10 fois supérieur (variation de courant de l'ordre de 200 pA) au flux de diffusion pur (variation de courant de 20 pA) à travers la membrane.

Ces données ne peuvent être exploitées plus en avant d'un point de vue quantitatif mais elles permettent d'établir qualitativement que la membrane est peu perméable au NO_2^- . Cependant, cette espèce risquerait d'interférer avec les mesures dans l'éventualité d'une production enzymatique de plusieurs espèces par la NO-Synthase.

ii. DEA-NONOate

L'expérience présentée ici a eu pour but d'observer la diffusion de flux de NO^* , provenant de la décomposition du DEA-NONOate, à travers la membrane vésiculaire. Le DEA-NONOate est solubilisé en PBS de sorte qu'il commence à se décomposer avant d'être injecté au sein de la vésicule. Le temps avant injection est difficilement contrôlable et il n'a pas été possible, dans cette expérience de preuve de principe, de connaître exactement la concentration de NO^* formée. Néanmoins, l'analyse par chronoampérométrie à + 0,65 V (Figure 148) montre qu'un flux d'espèce est détecté, qui ne peut être ni celui des nitrites ni du groupement diéthylamine du DEA-NONOate à ce potentiel. La variation de courant est faible, de l'ordre de 10-15 pA mais soutenue pendant chaque injection.

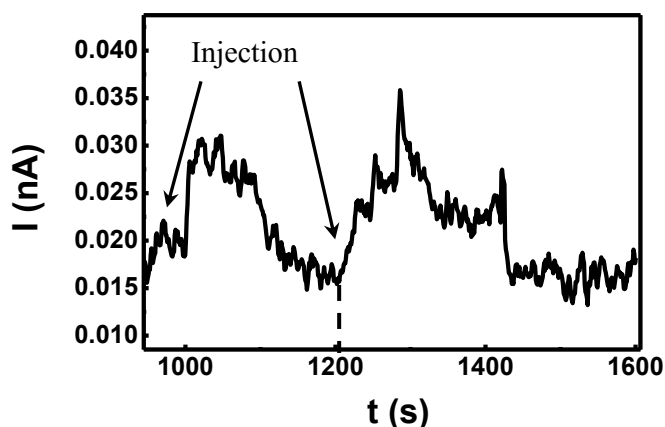


Figure 148 Chronoampérométries réalisées avec une UME à fibre de carbone (7 μm) platinée (5 μC) positionnée au voisinage de la membrane d'une GUV injectée avec une solution de DEA-NONOate (1,5 mM final). $E = + 0,65 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl .

Cette étude préliminaire met en évidence que des flux de NO^* peuvent effectivement être détectés à l'extérieur de la vésicule lorsque celui-ci est encapsulé à l'intérieur.

iii. Interférents possibles à l'analyse de la NO-Synthase *in situ*

Dans le but final de caractériser les activités enzymatiques des NO-Synthases, les vésicules ont pour fonction première de confiner l'enzyme mais également ses substrats, cofacteurs et espèces intermédiaires, tout en laissant diffuser le NO^* , voire d'autres petites molécules de type RNS à travers la membrane. Néanmoins, ayant observé une perméabilité assez importante des microréacteurs développés au cours de ce projet, il est probable que certains des réactifs et des espèces intermédiaires des NOS puissent aussi diffuser vers le milieu extravésiculaire, et donc interférer avec la détection par électrochimie.

Ainsi, un contrôle préliminaire a été effectué avec l'espèce intermédiaire N^{O} -hydroxyarginine (NOHA) issue de l'oxydation du substrat L-Arginine par la NO-Synthase, de même qu'avec le cofacteur BH_4 , essentiel au repliement de l'enzyme (voir Chapitre 1, paragraphe II.2). Ces espèces (deux solutions distinctes) ont été injectées en face d'une UME à fibre de carbone platinée polarisée à + 0,9

V vs. Ag/AgCl (potentiel de détection simultanée de $\text{NO}^{\cdot}$ et $\text{NO}_2^{\cdot-}$) et leurs réponses électrochimiques ont été suivies par chronoampérométrie (Figure 149).

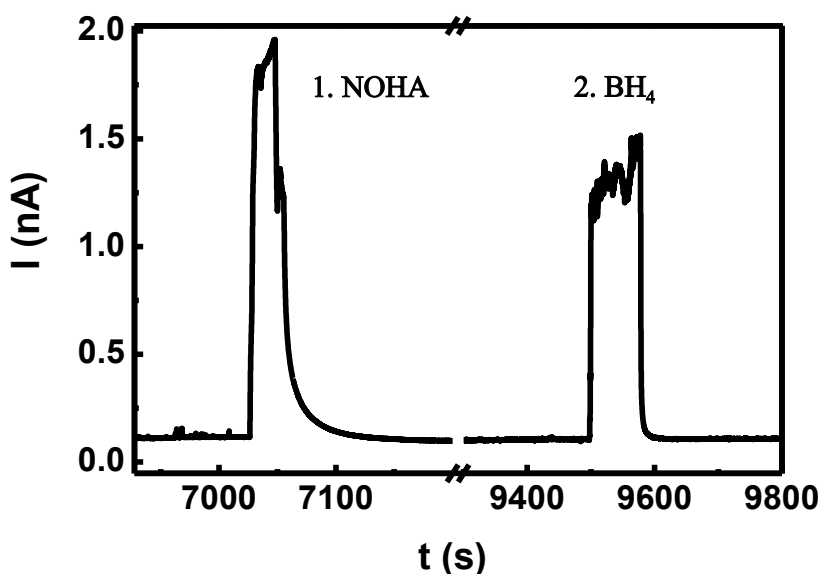


Figure 149 Chronoampérométrie enregistrée à +0,9 V vs. Ag/AgCl avec une UME fibre de carbone ($10\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre) platinée ($10\text{ }\mu\text{C}$). Deux injections sont réalisées en face de l'électrode : 1. NOHA 5 mM et 2. BH_4 0,4 mM.

A la vue de ces résultats, il apparaît clair que ces espèces s'oxydent électrochimiquement et risquent d'interférer avec le signal des espèces d'intérêt. Cela demandera donc dans une étape ultérieure de vérifier leur capacité de diffusion à travers les membranes et de définir, si aux concentrations utiles pour l'étude de la NO-Synthase, les variations de courant induites seraient rédhibitoires.

La détection de la production enzymatique des NO-Synthases au sein des microréacteurs biomimétiques mis au point au cours de ce projet est un réel défi, puisque cela implique de concilier les propriétés de perméabilité complexes des vésicules avec une enzyme dont certains substrats et cofacteurs sont électroactifs (BH_4 , NADPH). A cela, s'ajoute les nombreux ROS et RNS qui peuvent être produits par la NOS.

Une première approche pour limiter l'influence des interférents consisterait à utiliser des électrodes modifiées avec une ou plusieurs membranes sélectives, ce qui permettrait de rendre notre système de détection plus spécifique du monoxyde d'azote. Notamment, le dépôt d'une membrane polymère mixte de type polyeugénol-polyphénol semble prometteur pour limiter l'impact des interférents sur le signal de détection électrochimique [203].

En conclusion de ce dernier chapitre, la microscopie *in situ* couplée à l'électrochimie nous a permis d'étudier les mécanismes redox d'espèces fluorogéniques tels que l'Amplex Red et la resorufine, mis en jeu dans la détection du peroxyde d'hydrogène. Nous avons ainsi mis en évidence des procédés faradiques issus de l'oxydation directe de l'Amplex Red et conduisant à la formation de la resorufine, identifiée par spectroélectrochimie et microscopie de fluorescence.

Ensuite, une réaction enzymatique modèle mettant en jeu la glucose oxydase a été caractérisée au sein d'un microréacteur biomimétique. Les conditions expérimentales ont pu être adaptées aux propriétés des vésicules dans le but de réaliser une quantification de la production enzymatique d' H_2O_2 par électrochimie. Nous avons également montré la sensibilité et la résolution cinétique de telles mesures effectuées au niveau de la membrane vésiculaire de façon non destructrice. Malgré les contraintes méthodologiques fortes, nous avons réussi à obtenir une bonne corrélation entre nos résultats expérimentaux et une modélisation théorique de la production enzymatique.

Enfin, nous avons commencé à mettre en place la détection du monoxyde d'azote et des nitrites au niveau d'une seule vésicule. Des contraintes expérimentales encore plus fortes ont freiné la caractérisation et la calibration de nos systèmes avec les enzymes NO-Synthases. En particulier, la forte perméabilité des membranes limite l'isolement des réactifs au sein du microréacteur et nous avons confirmé que ces espèces sont source d'interférences avec la mesure des produits enzymatiques. Pour finaliser cette partie du projet, il serait nécessaire de développer des électrodes, toujours de type UME, parfaitement sélectives au monoxyde d'azote en regard des substrats et produits électroactifs afin de pouvoir étudier dans des conditions uniques les activités enzymatiques des NO-Synthases.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Le projet présenté dans ce manuscrit a associé plusieurs partenaires (ANR NOSynthCell) au cours de ces trois années de travaux de thèse avec, pour objectif principal, le développement d'une stratégie *bottom-up* pour l'étude d'activités enzymatiques en conditions biomimétiques. Dans le but commun de caractériser les activités des NO-Synthases pour une meilleure compréhension de leurs mécanismes, notre laboratoire s'est concentré sur le développement de vésicules unilamellaires géantes pouvant servir de microréacteurs tandis que nos partenaires travaillent à la construction d'architecture PiP (*Polymersomes in Polymersome*).

Les enzymes NO-Synthases sont d'un intérêt biologique majeur puisqu'elles représentent l'unique source de monoxyde d'azote chez les mammifères. Néanmoins, les chemins réactionnels complexes empruntés lors des transferts de protons et d'électrons, et, conduisant *in fine* à la production de NO[•], ne sont pas encore totalement élucidés. En plus de la complexité intrinsèque du mécanisme, la forte réactivité des espèces produites (ROS et RNS) limite fortement leurs possibilités d'analyses.

L'innovation apportée par notre stratégie consistait à caractériser des activités enzymatiques à des échelles auxquelles cette réactivité n'est plus limitante.

Le présent travail avait donc pour objectifs de mettre en place une approche biomimétique et de développer un système d'étude à l'échelle micrométrique. De plus, il a fallu mettre au point des techniques d'analyses physico-chimiques permettant de détecter et de quantifier des espèces chimiques réactives (ROS et RNS) aux mêmes échelles.

Pour atteindre ces ambitions, notre méthodologie a été de développer ces différents éléments en parallèle, pour, ensuite, aboutir à la construction d'un outil complet et performant.

La formation de vésicules unilamellaires géantes en milieu physiologique fut le premier élément à mettre en place. Ainsi, le développement d'un nouveau protocole d'électroformation en tampon salin (300 mOsm, pH 7,4) fut le point de départ de notre étude. Néanmoins, quand des vésicules ont pu être obtenues de manière reproductible, nous nous sommes heurtés à plusieurs verrous méthodologiques lors de la suite du développement de notre stratégie. En effet, l'apport des réactifs au sein de GUVs électroformées, par encapsulation ou par microinjection n'a pas pu être réalisé de façon satisfaisante.

Deux nouvelles techniques de formation des liposomes géants, basées sur une technique de déshydratation puis réhydratation d'un film de lipides ont ensuite été mises en place. La première technique fut simple à maîtriser mais, de manière analogue aux GUVs électroformées, nous ne sommes pas parvenus à exploiter ces systèmes dans le cadre de notre étude. En revanche, la dernière technique, bien que complexe à mettre en œuvre au départ, présentait de nombreux avantages pour la suite, notamment le fait que ces vésicules géantes soient jumelées à un réservoir de lipides.

Ce compartiment pouvant servir d'hôte à des réactions enzymatiques, nous avons ensuite travaillé à la modification interne des vésicules et au déclenchement contrôlé de la réaction. La microinjection constitua notre première approche mais ne s'avéra pas être efficace sur des structures aussi souples que les liposomes. Nous avons alors implanté au laboratoire l'électro-microinjection qui consiste à assister le flux d'injection d'impulsions électriques qui créent un pore transitoire local dans la membrane de la vésicule. Cette technique nous avait permis d'apporter des espèces au sein d'une GUV de manière contrôlée.

Néanmoins, nos systèmes vésiculaires se sont montrés plus complexes qu'attendus au départ. Ainsi, ces contraintes nous ont conduits à étudier plus en détails les propriétés de nos vésicules, notamment en termes de perméabilité. Des hypothèses furent établies et, pour la plupart, furent réfutées lors d'expériences de contrôle. Nous avons alors conclu que les propriétés de perméabilité de ces vésicules étaient probablement liées à leur composition variée en phospholipides induisant la formation éventuelle de domaines lipidiques au sein de la membrane. Nous avons évoqué une possible synergie entre des zones où les lipides sont plus fluides et des zones où les lipides chargés seraient ségrégués.

Dans le futur, le développement d'un protocole de formation des vésicules jumelées avec un réservoir mais de compositions de membranes plus simples, avec un(des) lipide(s) synthétique(s), permettrait de vérifier nos hypothèses. De plus, dans le cas où de telles vésicules seraient imperméables, le déclenchement contrôlé de la réaction pourrait être réalisé grâce à la formation d'un réseau de vésicules connectées par des nanotubes.

Dans la suite de nos travaux, nous avons su tenir compte de la complexité de nos microréacteurs lors de la caractérisation d'une première réaction modèle mettant en jeu la glucose oxydase (GOX) et la peroxydase de raifort (HRP). Ce système bienzymatique conduit à la formation d'une espèce fluorescente (resorufine) et des premiers résultats de suivi de fluorescence obtenus par microscopie confocale nous ont permis d'établir que les deux enzymes (GOX et HRP) restaient confinées dans le microréacteur mais que les substrats (glucose et Amplex Red) et les produits (peroxyde d'hydrogène et resorufine) pouvaient diffuser à travers la membrane.

Dans un second temps, la réaction glucose-GOX fut caractérisée par électrochimie avec des ultramicroélectrodes à fibre de carbone en prenant en compte ces nouvelles informations relatives aux propriétés de perméabilité des vésicules. La production de peroxyde d'hydrogène par la conversion du glucose a été analysée par chronoampérométrie et l'analyse de nos données a permis de quantifier une réelle production enzymatique en très bon accord avec la théorie. Notre système vésiculaire nous a donc permis de caractériser une première activité enzymatique.

Pour aller plus loin dans l'analyse, il serait intéressant de pouvoir simuler de façon plus précise le transport du peroxyde d'hydrogène en prenant en compte les phénomènes de convection, de partition et de diffusion. De plus, différentes concentrations en substrat et/ou en enzyme permettrait de compléter cette étude sur l'activité de la glucose oxydase.

Ensuite, toujours en tenant compte des propriétés des vésicules, notre stratégie pour l'étude quantitative des activités des NO-Synthases fut adaptée dans l'idée que seule l'enzyme reste confinée dans le microréacteur. Ainsi, il fut nécessaire de contrôler, dans un premier temps, si les espèces nécessaires à la production enzymatique étaient électroactives. Nos premiers résultats expérimentaux ont montré que ces espèces risqueraient fortement d'interférer avec la détection des espèces produites.

Dans cette perspective, il serait nécessaire, par la suite, de modifier nos ultramicroélectrodes avec une membrane leur permettant une meilleure sélectivité au monoxyde d'azote. Les activités des NO-Synthases pourraient alors être caractérisées en fonction de l'isoforme et des quantités de substrats. Enfin, un couplage entre une détection par électrochimie et par photochimie (utilisation d'une sonde spécifique pour des observations in situ en microscopie de fluorescence par exemple) permettrait de sonder la production de différents ROS et RNS.

Annexes

Annexes

I. Matériels

1. Produits chimiques

Les références des produits données dans le tableau ci-dessous correspondent aux produits cités dans les protocoles généraux du manuscrit et les protocoles détaillés qui suivent dans ces annexes.

Produit	Fournisseur	Référence
PBS (mélange de sels prêt à l'emploi) Pour préparation d'un litre de solution à : 3,9 mM NaH ₂ PO ₄ 6,1 mM Na ₂ HPO ₄ 2,7 mM KCl 138 mM NaCl	Sigma	P5368
Trizmabase	Sigma	T1503
K ₃ PO ₄	ABCR	AB355011
KH ₂ PO ₄	Acros Organics	205925000
MgSO ₄ , 7H ₂ O	Sigma	13142
EDTA	Sigma	E6758
Lipides : - Egg PC - SPE - Cholestérol	Avanti Polar Lipids (Interchim) Avanti Polar Lipids (Interchim) Sigma	840051 541602 C8667
Chloroforme	Sigma	25693
SU-8 2002	Microchem (Chimie Tech Services)	SU8-2002
Poly-L-Lysine 150 000 – 300 000 Mw	Sigma	P4832
Dextran FITC 70 kDa	Sigma	FD70S
Fluorescéine	Sigma	F6377
Calcéine	Life Technologies (ThermoFisher)	C481
DiD	Invitrogen (ThermoFisher)	D307
Resorufine	Invitrogen	<i>Plus disponible</i>
Amplex Red	Invitrogen (ThermoFisher)	A22188
HRP	Invitrogen (Thermo Fisher)	A22188
DMSO	Invitrogen (ThermoFisher)	A22188
Glucose	Sigma	G8270
GOX (10 kU)	Sigma	G7141
H ₂ O ₂	Fluka Analytics	95294
NO [•]	Messer	-
NO ₂ ⁻	Sigma	237213

DEA-NONOate	Cayman Chemical (Interchim)	82100
Hémoglobine	Sigma	H2500
Dithionite de sodium	Sigma	157953
NED	Sigma	222488
Sulfanilamide	Sigma	S9251
L-Arginine	Fluka	<i>Plus disponible</i>
(6R)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterine dihydrochloride (BH ₄)	Schirks	11-212
N ^ω -hydroxyarginine, monoacétate (NOHA)	Enzo Life Science	ALX-106-004
DL-dithiothreitol	Sigma	43819
BSA (<i>bovine albumine serum</i>)	Sigma	A7030
Superoxyde dismutase (SOD) (30 kU)	Sigma	S5639
Glycérol	Sigma	G5516
Acide chloroplatinique	Sigma	262587
Ethylene glycol butyl éther	Sigma	537551
Allylamine	Sigma	145831
Allylphénol	Sigma	A34805
Méthanol	Sigma	34860

2. Appareils

Appareil	Marque	Modèle
Microscope confocal (Objectifs : 20x 115066242, 5x 115066224)	Leica	TCS SP5 II
Microscope plein champ inversé (Objectif : 20x 115066242)	Leica	STP-6000
Microscope plein champs droit (Objectif : 20x 11506503)	Leica	DM6000 B
Micromanipulateur	ThorLabs	PCS-5200
Etireuse laser	Sutter	P-2000
Etireuse à spire	Narishige	PC-100
Micropolisseuse (Disque de polissage : porosité 1 μm)	WPI	48000
Générateur (électroporation)	Digitimer	DS2A-MkII
Générateur (électrodéposition)	ELC	AL942
Potentiostat (CA, CV)	Biologic	VSP-300
Potentiostat (spectroélectrochimie)	Metrohm	μ AutoLab
Injecteur	Eppendorf	FemtoJet
Pompe péristaltique	Gilson	MiniPuls 3
Plasma Cleaner	Harrick Plasma	PDC-002
Spin coater	SPS	Spin 150
Système d'exposition UV	Kloe	UV Kub
Spectrophotomètre UV-visible (cuvette)	Varian	Cary 100
Spectrophotomètre Fluo (cuvette)	Varian	Cary Eclipse
Spectrophotomètre Fluo (avec lecteur de plaques)	Molecular Devices	Spectra Max M2e
Système d'aspiration (pour fabrication des UME)	Integra	VacuSafe

3. Autres

Désignation	Marque	Référence
Lame ITO (résistivité = 15-25 Ω/sq)	Sigma	636916
Capillaire en verre borosilicate avec filament (O.D = 1 mm ; I.D = 0,75 mm)	WPI	TW100F-4
Fibre de carbone (diamètre 10 μm)	Cytec Engineered Materials	Thornel P-55S
Poudre de carbone	<i>Inconnue</i>	<i>Inconnue</i>
Fil d'argent (diamètre 1 mm) (Électrode de référence)	GoodFellow	AG005160
Fil de platine (diamètre 1 mm) (Contre-électrode)	GoodFellow	PT005155
Fil de platine (diamètre 0,25 mm) (Électroporation)	GoodFellow	PT005140
Colonne de filtration PD-10 Sephadex G-25	GE Healthcare	17085101

II. Méthodes

1. Electroformation

a. Préparation des solutions de lipides

Egg PC : solution stock à 3 mg.mL^{-1} ($= 4 \text{ mM}$, $M = 770,12 \text{ g.mol}^{-1}$) :

Solubiliser $m_{\text{EggPC}} = 0,3 \text{ mg}$ dans $100 \text{ }\mu\text{L}$ de chloroforme.

Cholestérol (CHS) : solution stock à $1,5 \text{ mg/mL}$ ($= 4 \text{ mM}$, $M = 386,65 \text{ g.mol}^{-1}$)

Solubiliser $m_{\text{CHS}} = 0,75 \text{ mg}$ dans $500 \text{ }\mu\text{L}$ de chloroforme.

A partir des solutions stock, les différents mélanges de lipides sont préparés en fonction du ratio EggPC:CHS souhaité.

Toutes les solutions doivent être préparées sous hotte, conservées dans des flacons en verre équipés de septum en Téflon (pas de plastique avec le chloroforme !), et stockées à -20°C pendant 1 à 2 mois. Pour renforcer l'herméticité des flacons, le bouchon de chaque flacon est entouré d'un ruban Téflon puis d'une bande de Parafilm.

Remarque : utiliser une seringue Hamilton pour la préparation des solutions (à rincer 15 fois au minimum avec du chloroforme après chaque utilisation).

b. Dépôt et séchage

La solution de lipides est déposée sous forme de film à la surface d'une ou des électrodes à l'aide d'une seringue Hamilton ($10 \text{ }\mu\text{L}$).

Lame ITO : la zone de dépôt correspondant à la chambre d'électroformation est repérée avec un feutre sur la face non conductrice de la lame. Sur la face conductrice de la lame, le biseau de l'aiguille est positionné sur la surface de l'électrode puis la solution de lipides est déposée lentement par petits mouvements circulaires en veillant à ne faire qu'un seul passage pour éviter de déposer une épaisseur de lipides trop importante. Ce type de dépôt est dit « rock and roll ». La vitesse de déplacement de l'aiguille doit être adaptée au volume de solution à déposer.

Surface (cm^2)	Volume de solution à déposer (μL)
2	3
9	10
0,8	1

Tableau 9 Volume de solution à déposer en fonction de la surface de dépôt.

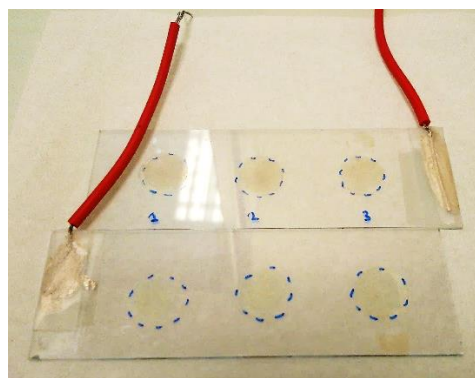


Figure 150 Films de lipides déposés sur 2 lames ITO (surface de dépôt = $6 \times 0,8 \text{ cm}^2$).

Fils de platine : le biseau de l'aiguille est positionné sur le fil et le dépôt ($1,5 \text{ }\mu\text{L}$ par fil) est réalisé en un seul passage. La vitesse de déplacement de l'aiguille est adaptée en fonction du volume déposé.

Le dépôt doit être uniforme et il faut notamment veiller à ne pas mettre trop de solution aux extrémités des fils.

Séchage : placer les électrodes sous vide pendant au moins 1 heure pour évaporer le chloroforme.

Remarque : rincer la seringue Hamilton 15 fois au minimum avec du chloroforme après chaque utilisation.

c. Montage pour l'électroformation

Lames ITO : un espaceur doit être immobilisé entre les deux lames et 3 protocoles ont été suivis en fonction des chambres utilisées :

- (1) *Espaceur rectangulaire Téflon 3 mm* : découper quatre rubans de Parafilm et les positionner sur une des lames autour de la zone de dépôt, placer l'espaceur sur le cadre de Parafilm puis faire fondre le Parafilm en plaçant la lame sur une plaque chauffante (environ 40°C). Dès que le Parafilm commence à fondre, appuyer fermement sur l'espaceur et retirer immédiatement la lame de la plaque chauffante. La seconde lame est positionnée sur le dessus de l'espaceur avec de la graisse pour permettre d'ôter facilement la lame pour les expériences de microinjection *in situ*. L'ensemble est maintenu avec des pinces pendant l'électroformation.
- (2) *Espaceur rectangulaire Téflon 0,5 mm* : un trait fin de graisse est dessiné tout autour de la zone de dépôt sur les deux lames et l'espaceur est placé entre les deux lames. L'ensemble est maintenu avec des pinces pendant l'électroformation.
- (3) *Espaceur circulaire PDMS 3 mm* : l'espaceur est directement positionné sans ajout de graisse, le PDMS garantissant l'imperméabilité de la chambre. L'ensemble est maintenu avec des pinces pendant l'électroformation.

Remplissage de la chambre : injecter lentement la solution d'hydratation dans la chambre à l'aide d'une seringue classique équipée d'un filtre nylon (0,25 µm) et d'une aiguille (section 0,45 mm pour les espaceurs Téflon 0,5 mm et PDMS 3 mm). Pour l'espaceur en PDMS, celui-ci peut être piqué directement avec une aiguille (attention : mettre une seconde aiguille pour l'évacuation de l'air).

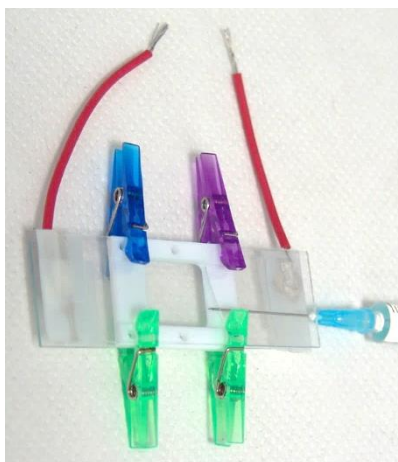


Figure 151 Chambre d'électroformation lames ITO avec espaceur Téflon 3 mm.

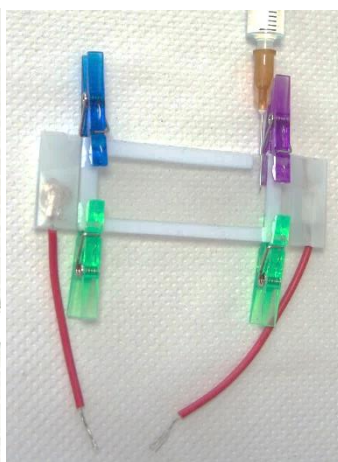


Figure 152 Chambre d'électroformation lames ITO avec espaceur Téflon 0,5 mm.

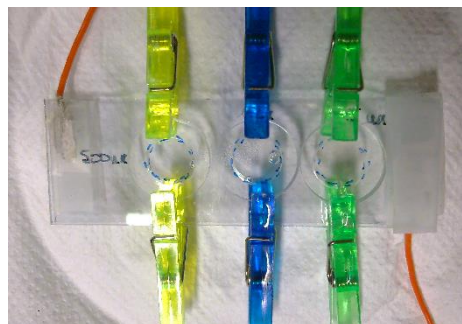


Figure 153 Chambre d'électroformation lames ITO avec espaceur PDMS 3 mm.

Fils de Pt : remplir directement la chambre en immergeant les fils.



Figure 154 Chambre d'électroformation fils de Pt. Distance entre les fils = 3 mm.

Remarques :

- pour éviter l'évaporation du PBS pendant la nuit, il faut mettre un cristalliseur au-dessus de la chambre ITO qui sera placée sur un sopalin imbibé d'eau ; et il faut placer une lamelle sur la chambre fils de Pt
- les premières gouttes de solution qui passent par le filtre à l'étape de remplissage de l'électrode doivent être jetées

2. Fabrication des micropipettes

Allumer l'étireuse laser (P-2000, Sutter) 30 min avant utilisation.

Mettre le capillaire dans le rail prévu à cet effet et bloquer le dans les mâchoires de façon à ce que le milieu du capillaire soit positionné en face du point d'irradiation laser (Figure 156).

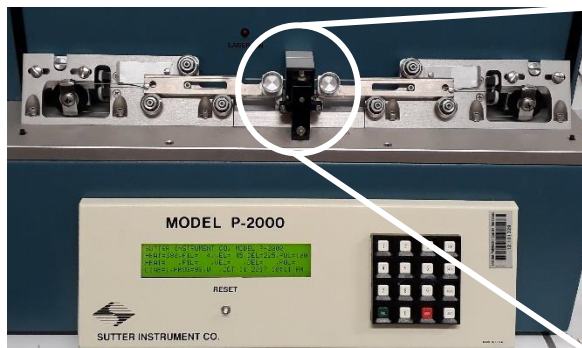


Figure 155 Etireuse laser Sutter P-2000.



Figure 156 Zoom sur les mâchoires et le capillaire qui est centré dans la zone d'irradiation laser.

Fermer le capot et lancer le programme d'étirage choisi. Sur l'étireuse laser P-2000, cinq paramètres peuvent être programmés [345] :

- Heat (0 à 999) : correspond à la puissance du laser et donc à la quantité d'énergie fournit au verre.
- Filament (0 à 15) : correspond au schéma de balayage du rayon laser qui fournit la chaleur au verre. L'étireuse P-2000 est préprogrammée avec 16 schémas qui définissent chacun la hauteur et la vitesse de balayage du faisceau et la distribution de chaleur le long de la hauteur de balayage.
- Velocity (0 à 255) : correspond à la vitesse à laquelle les mâchoires (qui maintiennent le capillaire) doivent bouger au cours de la phase de pré-étirage. Cette vitesse est dépendante de la viscosité du verre utilisé et la viscosité est elle-même dépendante de la température du verre. La vitesse est donc une manière indirecte de mesurer la température du verre.
- Delay (0 à 255) : contrôle la durée de l'étirage de manière relative à la désactivation du laser.
- Pull (0 à 255) : contrôle la force de l'étirage.

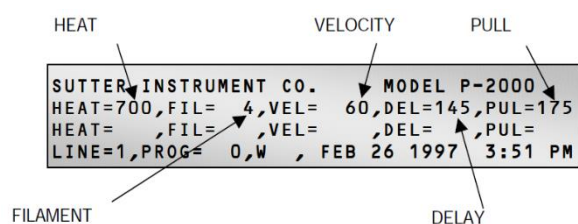


Figure 157 Ecran de contrôle de l'étireuse laser P-2000 (Sutter).

Le programme de base est établi à :

Heat = 380 – Filament = 4 – Velocity = 45 – Delay = 225 – Pull = 100.

Ce programme permet d'obtenir des pipettes longues et fines (diamètre externe < 2 µm).

Néanmoins, la sensibilité de l'étireuse, notamment à la température de la pièce, oblige à modifier certains des paramètres.

Pour obtenir les pipettes souhaitées, il faut faire varier un paramètre après l'autre en se référant au guide proposé par le fabricant [346], [347]:

Paramètre	Augmenter	Diminuer
Heat	- Diamètre de la pointe plus petit - Longueur de la pointe plus grande - Résistance plus élevée	- Diamètre de la pointe plus large - Longueur de la pointe plus courte - Résistance plus faible
Velocity	- Diamètre de la pointe plus petit	- Diamètre de la pointe plus large
Delay	- Longueur de la pointe plus courte	- Longueur de la pointe plus grande
Pull	- Diamètre de la pointe plus petit - Longueur de la pointe plus grande	- Diamètre de la pointe plus large - Longueur de la pointe plus courte

Tableau 10 Influence de la modification des paramètres de l'étireuse laser sur la morphologie de la pointe de la pipette.

3. Fabrication des UMEs

- (1) Insertion de la fibre de carbone dans un capillaire : choisir une fibre aussi longue que le capillaire (diamètre externe = 1 mm) puis aspirer la fibre à l'intérieur du capillaire grâce au système d'aspiration VacuSafe (Integra)



Figure 158 Fibre de carbone (10 μm de diamètre) insérée dans un capillaire en verre (diamètre externe = 1 mm).

- (2) Étirage du capillaire : placer la totalité des poids disponible sur l'étireuse à spire Narishige (PC-100) et étirer à *Heat level* = 80. Veiller à positionner le centre du capillaire au niveau de la spire pour obtenir deux demi-capillaires de longueurs similaires. Après étirage, la fibre est scellée aux deux extrémités étirées du capillaire (Figure 159). Couper délicatement la fibre qui connecte encore les deux demi-capillaires avec des ciseaux. La longueur de la fibre qui dépasse du capillaire peut être ajustée à façon en la coupant à la longueur souhaitée.

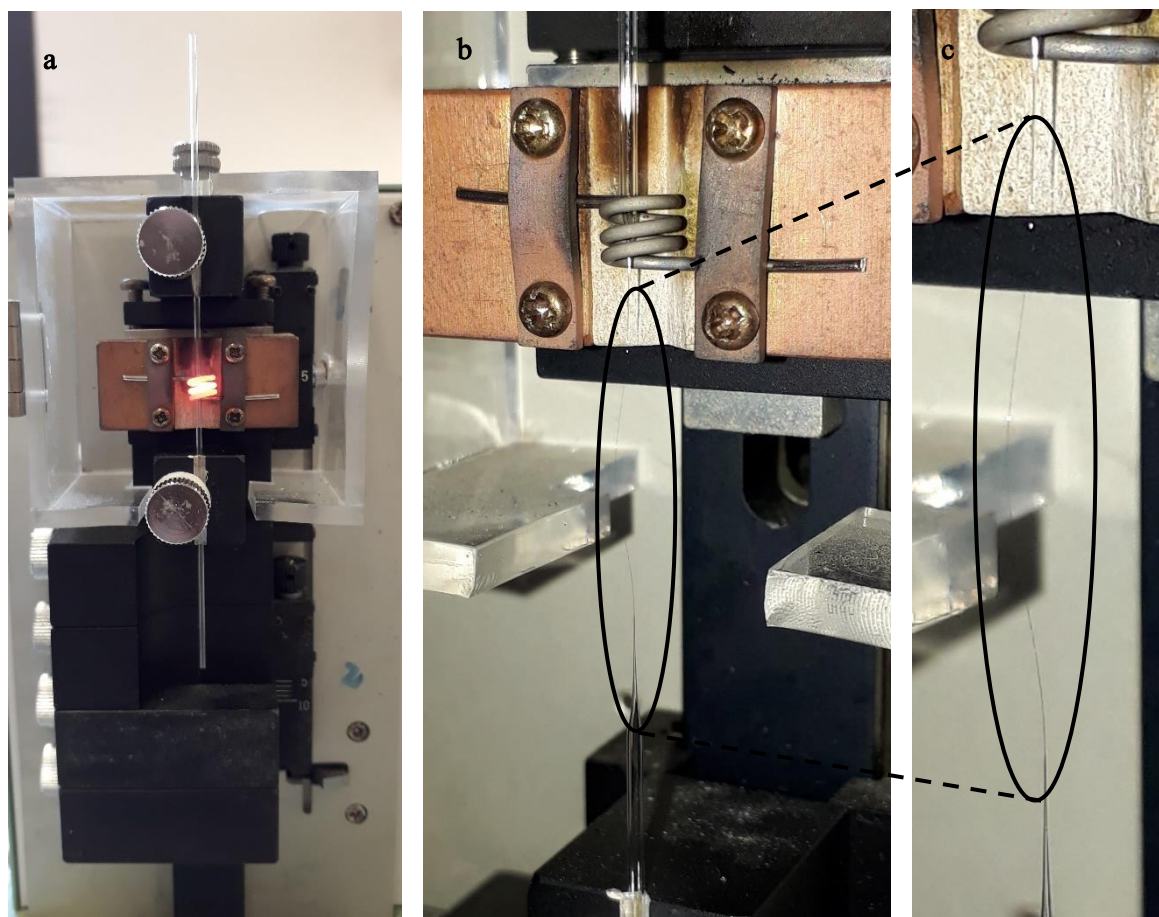


Figure 159 (a) Etirage du capillaire qui contient la fibre de carbone. (b) Après étirage du capillaire, les deux extrémités sont connectées par la fibre de carbone. (c) Zoom sur la fibre de carbone reliant les deux extrémités du capillaire étiré.

- (3) Mise en place des connexions : remplir le capillaire avec de la poudre de carbone en tapotant l'extrémité ouverte du capillaire dans de la poudre de carbone et pousser régulièrement la poudre vers l'intérieur à l'aide d'un fil de connexion (monofilament, diamètre 0,5 mm). La poudre se tasse petit à petit dans la pointe du capillaire. Quand le capillaire est rempli, insérer le fil de connexion de manière permanente. Mettre un point de colle époxy sur l'extrémité du capillaire pour éviter que le fil ne s'en aille au cours des expériences.



Figure 160 Ultramicroelectrode fibre de carbone dont la connexion entre la fibre et le fil est faite avec de la poudre de carbone.



Figure 161 Zoom sur la pointe du capillaire mettant en évidence la fibre de carbone qui dépasse. La pointe en verre est étirée de façon à sceller l'électrode.

- (4) Isolation de la fibre de carbone : se fait par électrodéposition de polyoxophénylène. Préparer la solution comme suit : sous la hotte, mélanger 50 mL d'eau milliQ et 50 mL de méthanol ; puis ajouter 0,23 M d'allylphénol, 0,4 M d'allylamine et 0,23 M d'éthylène glycol butyl éther (respecter l'ordre d'ajout des composés). Rapidement mettre les électrodes dans la solution et appliquer un champ électrique de + 4 V pendant 3 min à l'aide d'un générateur de courant continu (utiliser un fil de Pt comme contre électrode). Après 3 min, retirer rapidement les électrodes de la solution et rincer abondamment à l'eau milliQ. Placer les électrodes à 150°C pendant 3h. Après refroidissement des électrodes, contrôler l'isolation en voltamétrie cyclique (ferrocène diméthanol 1 mM, PBS 10 mM par exemple).

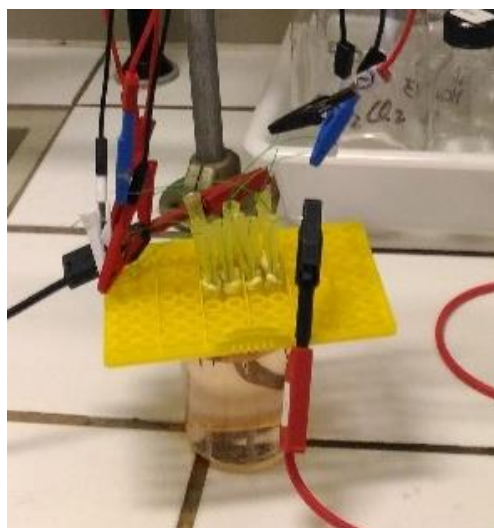


Figure 162 Electrodéposition de polyoxyphénylène sur 10 UME branchées en série.
E = + 4 V, 3 min.

- (5) Polissage : afin d'obtenir un disque de carbone, la pointe de la fibre est micropoliée sur un disque de porosité 1 μm (avec un angle de 45° le plus souvent) pendant une dizaine de minutes. Le polissage est contrôlé en voltamétrie cyclique (ferrocène diméthanol 1 mM, PBS 10 mM par exemple).
- (6) Platination : diluer 1 mL de solution d'acide chloroplatinique dans 6,33 mL de PBS et ajouter 1 à 2 mg d'acétate de plomb (inhibiteur de grains). Le dépôt du noir de platine se fait au potentiel de $-0,06\text{ V}$ vs. Ag/AgCl (NaCl 3 M) en chronoampérométrie. La charge est fixée en fonction de la taille de l'électrode de façon à atteindre $0,1\text{ }\mu\text{C}\cdot\mu\text{m}^{-2}$. Pour des disques de 10 μm de diamètre, la charge est fixée à 10 μC . Le profil de la charge doit être similaire à celui de la Figure 163 :

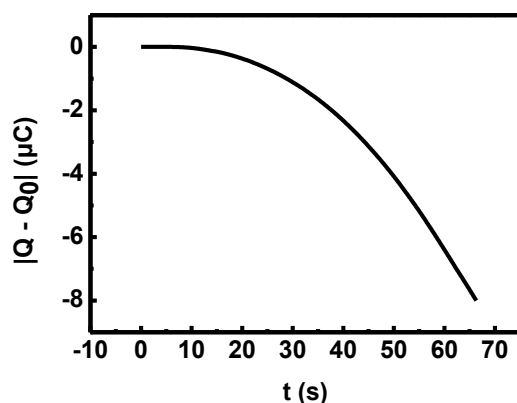


Figure 163 Profil de chronoampérométrie d'une expérience de platination d'une UME fibre de carbone (disque de 10 μm de diamètre).

Le dépôt de noir de platine est contrôlé par microscopie électronique à balayage et voltamétrie cyclique (ferrocène diméthanol 1 mM, PBS 10 mM par exemple).

Remarques :

- après platination, les électrodes doivent être conservées dans de l'eau milliQ
- le dépôt de noir de Pt étant très fragile, un contrôle systématique des électrodes en voltamétrie cyclique doit être fait avant chaque expérience

4. Préparation des lames pour immobilisation des GUVs

a. Poly-L-lysine

Préparer une solution de poly-L-lysine ($150\text{--}300\cdot 10^3\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) à 0,01 wt/v%.

Faire tremper la lame dans la solution de poly-L-lysine 0,01 wt/v% pendant 30 min.

Récupérer la lame, puis la solution de poly-L-lysine.

Faire tremper rapidement la lame dans un bain d'eau milliQ, récupérer la lame, jeter l'eau. Répéter 2 fois.

Remarque : le résidu de la lysine est une amine primaire chargée positivement à pH neutre. La lame est alors très hydrophile et risque de se polluer rapidement. Il faut donc préparer la lame juste avant le transfert des vésicules.

b. SU-8 2002

Nettoyer les lames à l'éthanol, puis à l'eau milliQ. Sécher à l'air comprimé.

Nettoyer ensuite les lames au plasma à oxygène (*Plasma Cleaner*) pendant 10 min.

Le reste de la procédure a été réalisé en salle blanche :

- (1) Dépôt de la résine : positionner la lame dans le *spin coater* et verser la résine sur l'ensemble de la lame. Démarrer le *spin coating* avec une rampe de 500 rpm en 5 s puis 1000 rpm pendant 1 min.
- (2) Pre-séchage : placer la lame sur une plaque chauffante préalablement chauffée à 95°C. Faire sécher pendant 5 min.
- (3) Irradiation : placer la lame dans l'UV Kub et irradier pendant 8 s à 100% (40 mW.cm⁻²)
- (4) Post-séchage : placer la lame sur une plaque chauffante préalablement chauffée à 95°C. Faire sécher pendant 5 min.

5. Détermination du pK_a de la resorufine avec le tampon universel de Britton Robinson

a. Préparation du tampon universel de Britton Robinson

Recette du tampon universel de Britton Robinson :

- 0,04 M de H_3BO_3 ($M = 61,83 \text{ g.mol}^{-1}$, $pK_a = 2,12 - 7,21 - 12,67$)
- 0,04 M de H_3PO_4 ($M = 98 \text{ g.mol}^{-1}$, $pK_a = 9,24 - 12,4 - 13,3$)
- 0,04 M de CH_3COOH ($M = 60,05 \text{ g.mol}^{-1}$, $pK_a = 4,76$)

Préparer 300 mL de tampon.

Préparer entre 15 et 20 flacons contenant 10 mL de tampon.

Ajuster le pH de chacun des flacons avec une solution de NaOH à 0,2 M de manière à obtenir une gamme de pH allant de 2,5 à 11,0 environ :

$V_{NaOH\ 0,2\ M} (mL)$	1,75	2,50	3,50	3,75	4,00	4,25	4,50	4,75	5,25	5,75	6,00	6,25	6,50	6,75	7,25	7,75	8,50
pH	2,85	4,09	4,96	5,20	5,40	6,00	6,36	6,47	6,88	7,36	7,76	8,16	8,47	8,71	9,13	9,58	10,83

b. Spectroscopie

Préparer une solution stock de resorufine à 2 mM dans du DMSO.

Diluer la solution stock à 25 μM pour chaque pH. Après dilution, chacune des solutions contient 1,25 v/v% de DMSO.

Mesurer l'absorbance de chacune des solutions (Figure 164) puis tracer la courbe de l'absorbance à 571 nm (maximum d'absorbance) en fonction du pH. La méthode de la double tangente donne directement accès au pK_a de la resorufine, à savoir 5,95 (Figure 165).

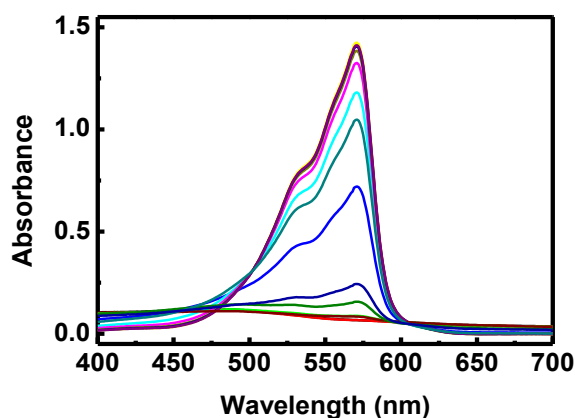


Figure 164 Spectres d'absorbance de la resorufine diluée à 25 μM en tampon de Britton Robinson à différents pH.

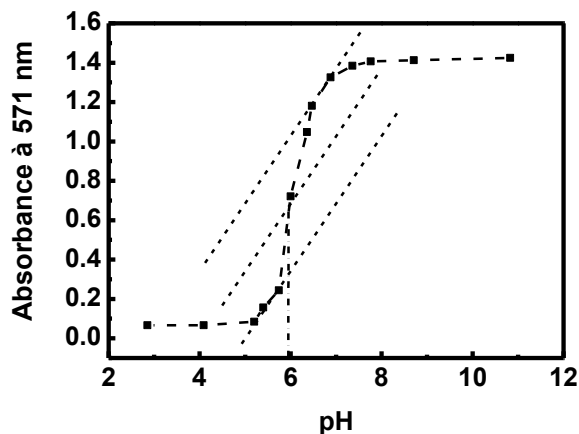


Figure 165 Evolution de l'absorbance à 571 nm de la resorufine (25 μM) en fonction du pH du tampon de Britton Robinson

6. Caractérisation de la NO-Synthase

a. Conformation et concentration

La NO-Synthase est fournie par le Laboratoire Stress Oxydant et Détoxication (LSOD, IBITECS, CEA Saclay, Gif-surYvette). La bactérie *E. coli* est transfectée avec un vecteur d'expression conduisant à la production de la NOS. Différents vecteurs sont utilisés pour la production des différents isoformes (iNOS, eNOS ou nNOS) et des domaines terminaux (iNOSoxy par exemple). La protéine est ensuite récupérée et purifiée, puis stockée à -80°C . Ce protocole a été mis au point dans le laboratoire de D. J. Stuhler [136], [348].

Avant utilisation, la signature spectrale de l'enzyme est caractérisée par spectroscopie UV-visible pour déterminer sa conformation et sa concentration (Figure 166).

La NO-Synthase étant une protéine qui possède un groupement hémique, la signature spectrale est caractérisée par l'observation d'un pic de Soret vers 400 nm. Le maximum de ce pic informe sur la conformation de l'enzyme : à 417 nm, la protéine est sous forme d'homodimère et le 6^{ème} ligand du Fe de l'hème est H_2O . L'ajout de BH_4 entraîne une modification de la structure et l'enzyme adopte sa conformation fonctionnelle dimérique : le pic de Soret se situe à 395 nm.

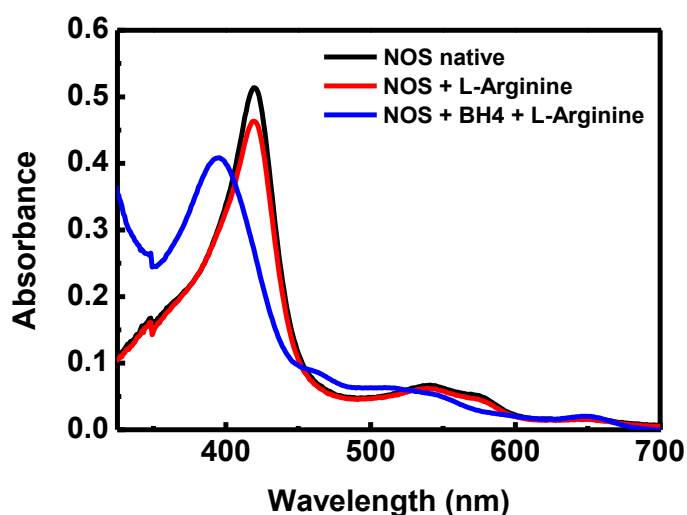


Figure 166 Caractérisation de la conformation de la NO-synthase (iNOSoxy) par spectroscopie UV-visible. Enzyme diluée par 60.

Le maximum d'absorbance du pic de Soret permet de calculer la concentration en enzyme quand celle-ci est conditionnée avec L-Arginine et BH_4 : le coefficient d'extinction molaire à 395 nm est de $70\,000\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Le calcul de la concentration en enzyme doit être fait systématiquement.

b. *Activité (test de Griess)*

L'activité de la NO-synthase est mesurée par réaction de l'enzyme avec H_2O_2 , en présence de l'intermédiaire réactionnel N^{ω} -hydroxy-L-arginine (NOHA). H_2O_2 fournit les électrons et les atomes d'oxygène nécessaires pour la réaction d'oxydation de NOHA [118] Cette réaction mène à la formation d'un équivalent citrulline et d'un équivalent NO^- qui réagit ensuite avec son milieu pour former un mélange de nitrite (NO_2^-) et de nitrate (NO_3^-). Le réactif de Griess réagit avec les nitrites formés, et permet donc, indirectement, la mesure du NO^+ produit par les NO-synthases.

(1) Préparation des solutions stocks :

- **DTT** (DL-dithiothéitol) 3 mL à 1,5 M : $m = 694 \text{ mg}$ ($M = 154,25 \text{ g.mol}^{-1}$)
Ajouter 3 mL d'eau distillée
Agiter pour mélanger et dissoudre au vortex - Aliquoter dans eppendorf 50 μL
Stockage : - 20°C
 - **NOHA** (L-hydroxy arginine acétate) 5 mL à 10 mM : $m = 12,5 \text{ mg}$ ($M = 250 \text{ g.mol}^{-1}$)
Agiter pour mélanger et dissoudre au vortex - Aliquoter dans eppendorf 50 μL
Stockage : - 20°C
- BH₄** ((6R)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-bioptérine dihydrochloride) :
- 1^{ère} dilution : 5 mL à 20 mM : $m = 31,4 \text{ mg}$ ($M = 314,2 \text{ g.mol}^{-1}$)
Ajouter 5 mL d'eau + 100 μL de DTT à 1,5 M (au final à 30 mM)
Agiter pour mélanger et dissoudre au vortex - Aliquoter dans eppendorf 100 μL
Stockage : - 20°C
 - 2^{ème} dilution : 10 mL à 2 mM : diluer la solution à 20 mM par 10 (1 mL)
Ajouter 9 mL d'eau + 20 μL de DTT à 1,5 M (au final à 3 mM)
Agiter pour mélanger et dissoudre au vortex - Aliquoter dans eppendorf 100 μL
Stockage : - 20°C
 - **BSA** (Bovine Albumine Serum) : 50 mL à 15 mg.mL^{-1} : $m = 750 \text{ mg}$
Ajouter 50 mL eau - Agiter à la main - Aliquoter dans eppendorf 1 mL
Stockage : - 20°C
 - **NED** (n-ethylenediamine dihydrochloride) : 50 mL à 1 g.L^{-1} : $m = 50 \text{ mg}$
Agiter pour mélanger et dissoudre au vortex - Protéger de la lumière
Stockage : 4°C
 - **Sulfanilamide** : 50 mL à 10 g.L^{-1} : $m = 500 \text{ mg}$
Dissoudre dans 48,611 mL eau milliQ + 1,389 mL HCl 36%
Attention : toujours mettre acide dans eau, préparation sous hotte
Agiter pour mélanger et dissoudre au vortex - Protéger de la lumière
Stockage : 4°C
 - **Nitrite de sodium** (NaNO_2) : 10 mL à 20 mM : $m = 0,0138 \text{ g}$
Stockage : 4°C

- **SOD** (superoxide dismutase) : 35 U. μL^{-1} :
Solubiliser la totalité du produit (35 kU) dans 1 mL d'eau milliQ
Agiter pour mélanger et dissoudre au vortex - Aliquoter dans eppendorf 25 μL
Stockage : - 20°C

(2) Préparation du tampon oxygénase (10 mL) :

- **PBS** (10 mM, pH 7,4) : 7 mL
- **Glycérol** : 1 ml ou 1,26 g
- **BSA** (0,1 mg.mL⁻¹) : 66,6 μL (solution stock 15 mg.mL⁻¹)
- **DTT** (1 mM) : 6,6 μL (solution stock 1,5 M)
- **SOD** (25 U.mL⁻¹) : 7,1 μL (solution stock 35 U. μL^{-1})
- **iNOS** (300 nM) : volume à prélever à déterminer à partir du résultat de l'analyse de l'absorbance du pic de Soret en spectroscopie UV-visible
- **PBS** (10 mM, pH 7,4) : **QSP à 10 mL**

Mélanger le tout à la main en renversant plusieurs fois le flacon (Attention : pas de vortex avec l'enzyme !). Mettre sur glace.

(3) Préparation du réactif de Griess : mélanger **NED** (1 g.L⁻¹) et **Sulfanilamide** (10 g.L⁻¹) à 1:1.

(4) Calibration du réactif de Griess : préparer la gamme étalon de NO₂⁻ d'après le tableau ci-dessous et enregistrer l'absorbance à 548 nm de chaque échantillon (Figure 167).

[NO ₂ ⁻] (μM)	V _{eau} (μL)	V _{nitrite} (μL)	[NO ₂ ⁻] _{stock}
1000	950	50	20 mM
500	975	25	20 mM
200	990	10	20 mM
100	995	5	20 mM
50	900	100	500 μM
20	960	40	500 μM
10	980	20	500 μM
5	990	10	500 μM
2	996	4	500 μM
1	990	10	100 μM
0,5	995	5	100 μM
0	1000	0	0

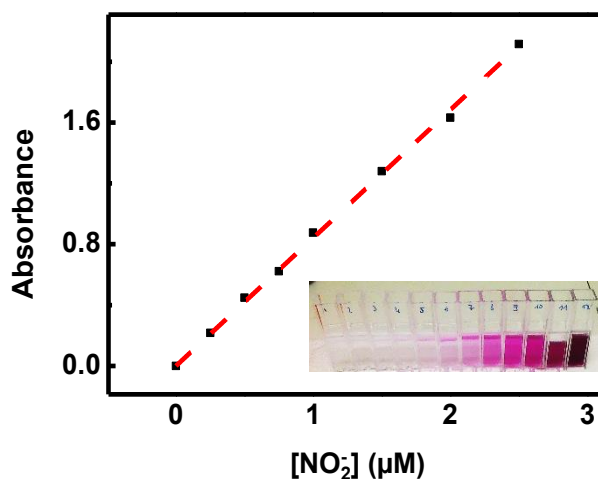


Figure 167 Courbe d'étalonnage pour le test de Griess.

(5) Test d'activité :

- Préparer :
 - H_2O_2 : 330 mM (soit 34 μL d' H_2O_2 à 9,8 M dans 966 μL d'eau). Agiter au vortex.
 - **Catalase** : 70 g.L^{-1} (soit 10 μL dans 990 μL d'eau). Agiter à la main.
 - BH_4 : 2 mM et 200 μM : diluer par 10 la solution à 2 mM + diluer par 10 celle à 200 μM
- Préparer les échantillons selon le tableau ci-dessous :

$[\text{BH}_4]$ (μM)	$V_{\text{tampon oxygénase}}$ (μL)	V_{eau} (μL)	$[\text{BH}_4]_{\text{stock}}$	$V_{\text{BH}_4 \text{ stock}}$ (μL)
0	300	50	0	0
0,2	300	45	20 μM	5
0,4	300	40	20 μM	10
2	300	45	200 μM	5
5	300	37,5	200 μM	12,5
10	300	25	200 μM	25
20	300	45	2 mM	5
50	300	37,5	2 mM	12,5
100	300	25	2 mM	25
200	300	45	20 mM	5
500	300	37,5	20 mM	12,5

- Incuber les échantillons à 30°C pendant 30 min
- Ajouter dans chaque échantillon 50 μL de NOHA (10 mM)
- Ajouter 50 μL de H_2O_2 (340 mM)

Bien mélanger par pompage

- Incuber les échantillons à 30°C pendant **10 min (mesurer précisément !)**
- Ajouter 50 μL de catalase

Mélanger par pompage

Le H_2O_2 n'ayant pas réagi avec l'enzyme est consommé par la catalase entraînant la formation de O_2 : apparition de bulles dans la solution

- Mélanger par pompage 500 μL d'échantillon et 500 μL de réactif de Griess dans une cuvette de spectroscopie. Répéter pour chaque échantillon.

Acquisition :

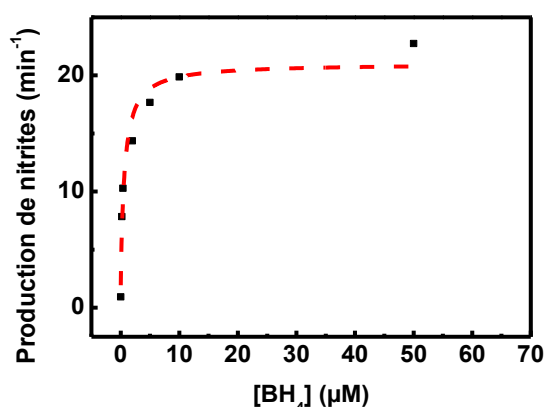
- Faire un blanc avec 1000 μL de réactif de Griess
- Faire la mesure de l'absorbance de chaque échantillon à **548 nm**
- Refaire la mesure de l'absorbance de chaque échantillon à **548 nm après 15 min** pour vérifier la stabilité du signal

Traitement des données :

- Transformer $A_{548 \text{ nm}}$ de chaque échantillon en $[\text{NO}_2^-]_{10 \text{ min}}$ en divisant les valeurs d'absorbance par la valeur de $\epsilon.l$ déterminé grâce à la calibration du réactif de Griess. Cette concentration en NO_2^- correspond à une quantité produite au cours des 10 min d'incubation.
- Diviser les valeurs de $[\text{NO}_2^-]_{10 \text{ min}}$ par 10 pour obtenir la concentration pour 1 min $[\text{NO}_2^-]_{1 \text{ min}}$.
- Diviser $[\text{NO}_2^-]_{1 \text{ min}}$ par $[\text{iNOS}] (= 300 \text{ nM})$ pour obtenir une production de nitrites (min^{-1}) (**Attention aux unités**)
- Appliquer une régression non linéaire de type hyperbolique décrivant la fonction :

$$y = \frac{P_1 x}{P_2 x} + P_3 \quad (\text{i})$$

Interprétation :



La production de nitrites par l'enzyme en fonction de la concentration en BH_4 est simulée par une courbe de saturation hyperbolique dont les paramètres caractérisent l'activité de la protéine :

V_{max} = vitesse maximale de formation des nitrites

K_d = constante de dissociation apparente

V_o = vitesse initiale

Ici :

$V_{\text{max}} = 19,1 \text{ min}^{-1}$, $K_d = 0,6 \text{ μM.min}^{-1}$, $V_o = 2 \text{ min}^{-1}$

Figure 168 Courbe de saturation hyperbolique obtenue par le test de Griess.

7. Préparation de solutions saturées en NO•

NO• est un gaz toxique, la bouteille doit donc impérativement être installée sous hotte et est connectée à une rampe à vide.

Les solutions sont préparées dans des flacons scellés équipés de septum contenant chacun 2 mL de PBS.

Purger la rampe à vide à l'azote pendant une vingtaine de minutes et anaérobiser les flacons contenant le PBS en parallèle.

Faire passer un flux de NO• d'abord à travers un bulleur (100 mL) équipé d'un fritté contenant une solution de KOH (0,1 M, 50 mL). Cette étape permet de piéger toutes impuretés de type oxydes d'azote, notamment NO₂ (gaz toxique, jaune). Le flux est ensuite injecté dans les flacons anaérobisés contenant le PBS.

Pour des flacons de 2 mL, 10 min suffisent pour saturer la solution en NO•.

8. Dosage du NO• par le test oxyhémoglobine

Le test oxyhémoglobine permet de déterminer la concentration en NO• dans des solutions ou de suivre une cinétique de production de NO• (par les donneurs de NO• par exemples = NONOates).

L'oxyhémoglobine (HbO₂) réagit avec le NO• pour former la méthémoglobine (MetHb) selon :



Ces deux composés ont des signatures spectrales différentes notamment parce que le degré d'oxydation du fer hémique est modifié après la réaction (HbO₂ : Fe^{II} et MetHb : Fe^{III}). Le suivi de la formation de la méthémoglobine est réalisé par spectroscopie UV-visible et la concentration en NO• est calculée à partir d'une différence d'absorbance [349].

a. Préparation de la solution d'oxyhémoglobine

Solubiliser 50 mg d'hémoglobine (MetHb) dans 1 mL de tampon PBS (100 mM, pH 7,4).

Ajouter environ 5 mg de dithionite de sodium pour réduire MetHb en HbO₂ : un changement de coloration doit être observé en deux temps avec un premier passage de rouge foncé/marron (MetHb) vers rouge foncé/violet (Hb) puis vers rouge clair (HbO₂) après quelques minutes.

Éliminer l'excès de dithionite par filtration sur colonne PD-10 SephadexTM G-25M selon le protocole suivant :

- (1) Enlever le bouchon du haut et vider la solution de conservation de la colonne. Couper la pointe en plastique en bas de la colonne.
- (2) Équilibrage de la colonne : Remplir la colonne avec le tampon PBS (0,1 M, pH 7,4) et faire passer environ 25 mL de tampon au total en rajoutant régulièrement. Jeter la solution de sortie de colonne.

- (3) Filtration de l'échantillon : Ajouter l'échantillon dans la colonne. Laisser l'échantillon pénétrer entièrement dans la colonne puis compléter avec du tampon de façon à ce que la somme des volumes d'échantillon et de tampon soit de 2,5 mL. Laisser la totalité de la solution pénétrer dans la colonne. La solution de sortie de colonne est jetée. L'échantillon doit être en tête de colonne.
- (4) Elution : Eluer avec 3,5 mL de tampon et récupérer les différentes fractions dans des eppendorfs (500 μ L) à raison d'environ 3 gouttes par eppendorf. Noter les fractions de tête, cœur et queue.

Les aliquots d'HbO₂ purifiée sont stockés à -20°C et doivent être protégés de la lumière.

La concentration en HbO₂ de chaque aliquot est différente et doit être contrôlée par spectrométrie. La bande de Soret doit se situer à 415 nm ($\epsilon = 131 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

b. Dosage par ajouts successifs

Le dosage est réalisé par spectroscopie UV-visible par ajouts successifs de NO[•] (de 0 à 20 μ L avec un pas de 2 μ L puis d'un ajout de 10 μ L) dans 1 mL d'HbO₂ à environ 10 μ M.

Enregistrer un spectre de 300 à 700 nm de la solution de départ (HbO₂) puis après chaque ajout de NO[•] (conversion progressive d'HbO₂ en MetHb) (Figure 169).

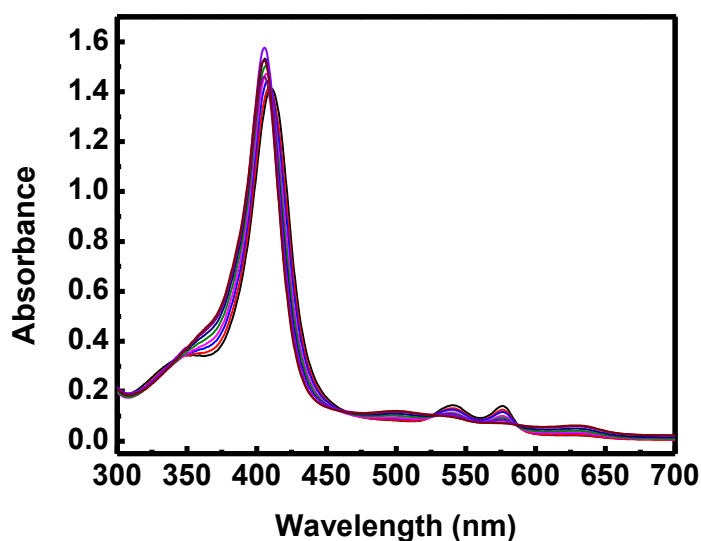


Figure 169. Dosage par ajouts successifs de NO[•] avec le test oxyhémoglobine. Suivi de la conversion de l'oxyhémoglobine en méthémoglobine au cours des ajouts par spectroscopie UV-visible.

Traitement des données :

- (1) Calculer $\Delta A = A_{401 \text{ nm}} - A_{421 \text{ nm}}$
- (2) Calculer $[\text{NO}]$ en divisant ΔA par $\Delta \varepsilon = 77 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- (3) Calculer le rapport $V_{\text{cumulé}} / V_{\text{total}}$ correspondant au facteur de dilution de la solution de $\text{NO}^{\bullet}$ dans le volume total de la cuvette à chaque ajout :

$$[\text{NO}]_{\text{initial}} \times V_{\text{cumulé}} = [\text{NO}]_{\text{final}} \times V_{\text{final}} \quad (\text{iii})$$

$V_{\text{ajouté}} (\mu\text{L})$	$V_{\text{cumulé}} (\mu\text{L})$	$V_{\text{cumulé}} / V_{\text{total}}$
-	0	0
2	2	0.001996008
2	4	0.003984064
2	6	0.005964215
2	8	0.007936508
2	10	0.00990099
2	12	0.011857708
2	14	0.013806706
2	16	0.015748031
2	18	0.017681729
2	20	0.019607843
10	30	0.029126214

- (4) Tracer la courbe $[\text{NO}]$ en fonction du facteur dilution (Figure 170)

La pente de la courbe correspond à $[\text{NO}]_{\text{initial}}$:

$$[\text{NO}]_{\text{initial}} = \frac{[\text{NO}]_{\text{final}} \times V_{\text{final}}}{V_{\text{cumulé}}} \quad (\text{iv})$$

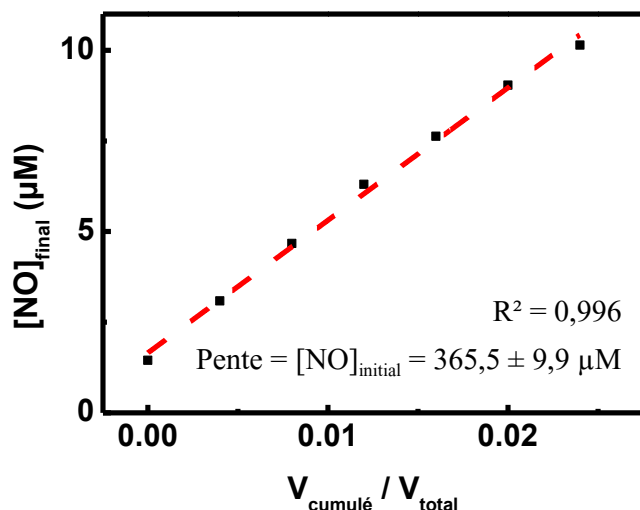


Figure 170 Détermination de la concentration en NO^* par le test oxyhémoglobine.

c. Suivi cinétique de production de NO^*

Un suivi cinétique de la production de NO^* peut être réalisé avec le test oxyhémoglobine.

Un exemple est donné pour la libération de NO^* par décomposition du PAPA-NONOates (donneurs de NO^*) :

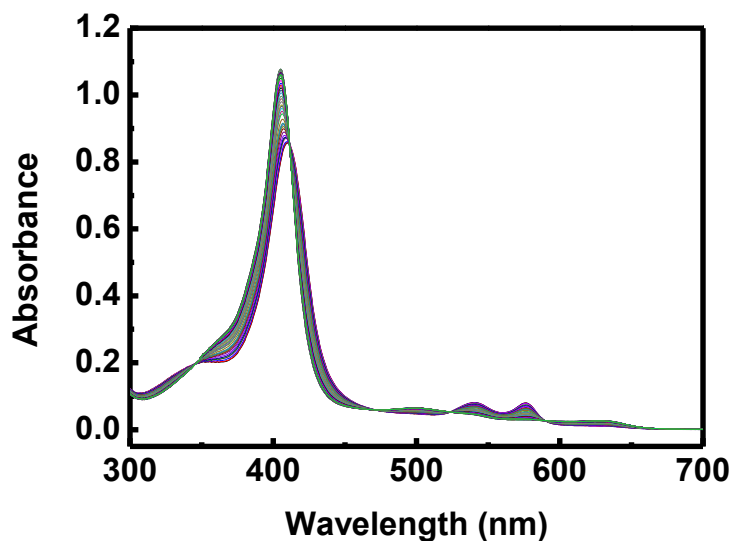


Figure 171 Suivi par spectroscopie UV-visible de la conversion de l'oxyhémoglobine en méthémoglobine due à la production de NO par le PAPA-NONOates ($10 \mu\text{M}$).

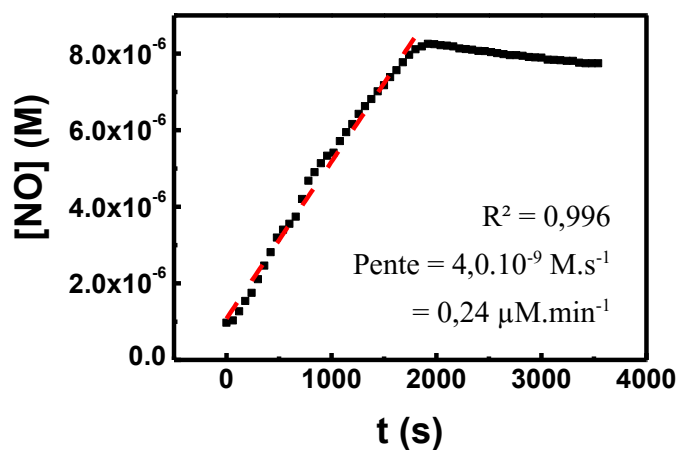


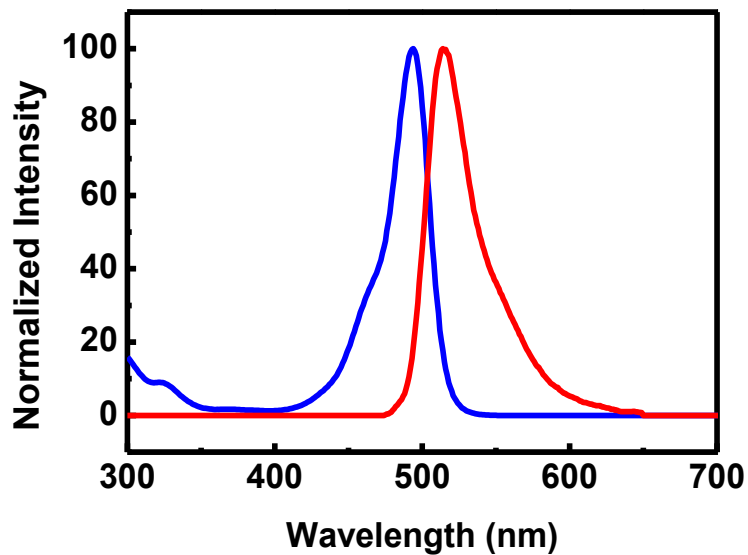
Figure 172 Cinétique de production du NO^* par le PAPA-NONOate ($10 \mu\text{M}$) déterminée à partir du test oxyhémoglobine.

III. Spectres de référence

Les spectres de référence donnés ci-dessous sont fournis par le logiciel *Fluorescence Spectra Viewer* disponible sur le site du fournisseur ThermoFisher à l'adresse :

<http://www.thermoFisher.com/fr/fr/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html#>

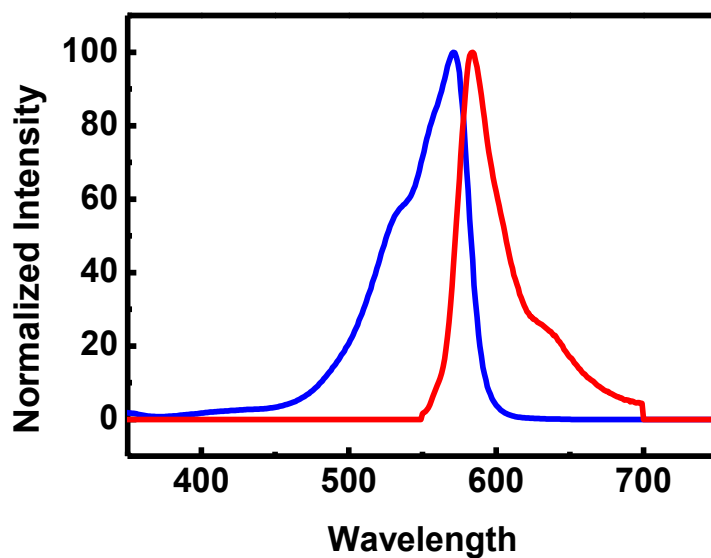
1. Calcéine



$$\lambda_{\text{excitation}} = 393 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{emission}} = 514 \text{ nm}$$

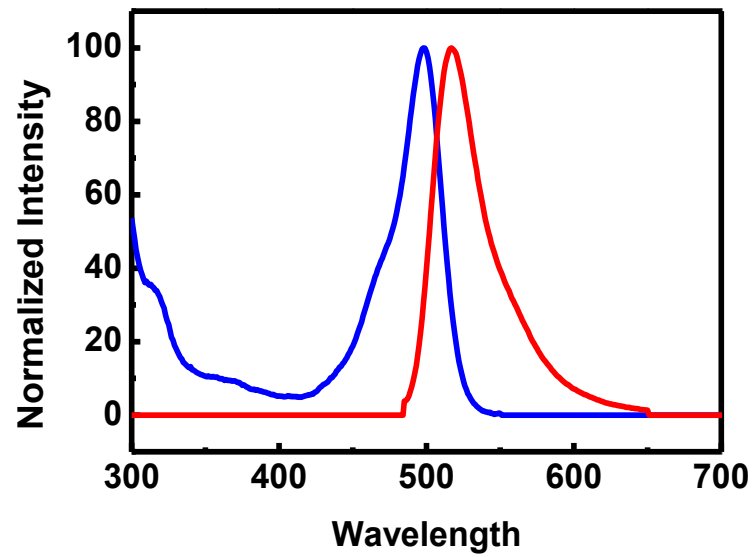
2. Resorufine



$$\lambda_{\text{excitation}} = 570 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{emission}} = 584 \text{ nm}$$

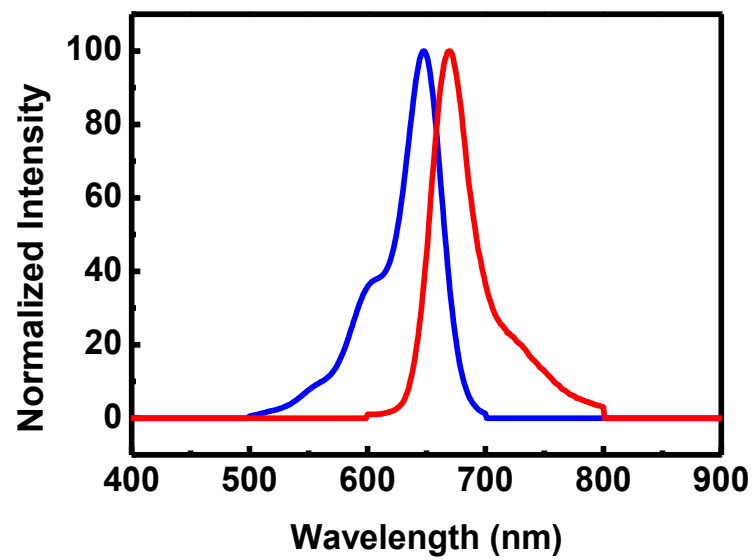
3. Fluoresceine



$$\lambda_{\text{excitation}} = 498 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{emission}} = 518 \text{ nm}$$

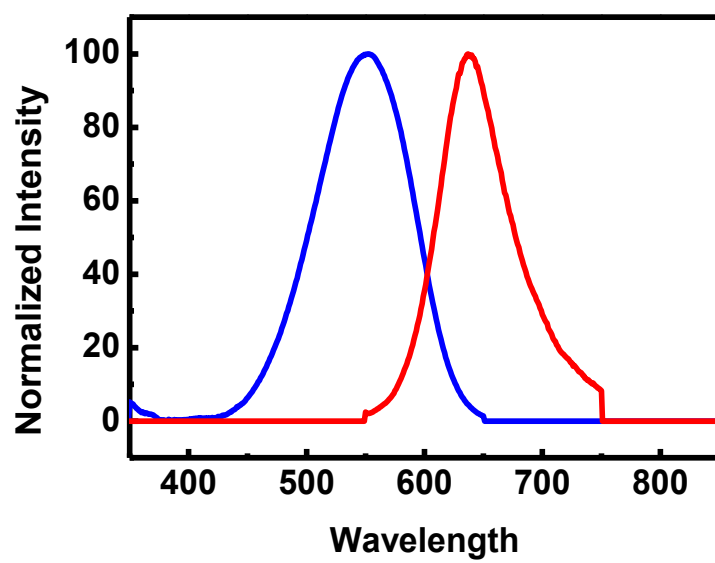
4. DiD



$$\lambda_{\text{excitation}} = 647 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{emission}} = 670 \text{ nm}$$

5. Nile Red



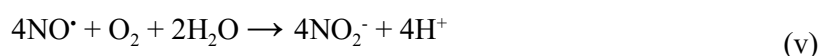
$$\lambda_{\text{excitation}} = 550 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{emission}} = 639 \text{ nm}$$

IV. Calibration en solution : l'hypothèse de la décomposition du NO[•] par O₂

Amatore *et al.* ont effectué une étude avec des UMEs fibre de carbone de 7 µm de diamètre, isolées sur la longueur selon un protocole similaire à celui employé dans notre cas, polies et platinées entre 30 et 90 µC [350]. Pour une UME platinée à 30 µC, la valeur de sensibilité a été donnée à 0,0089 nA.µM⁻¹.

A partir des données de l'expérience de calibration en solution pour le NO[•] réalisée par chronoampérométrie (Chapitre 4, Figure 143) et en faisant l'approximation que la sensibilité de l'électrode est d'environ 0,009 nA.µM⁻¹, il est possible de calculer une constante de vitesse associée à la dissociation du NO[•]. L'hypothèse prise en compte pour le calcul de la constante k est que l'instabilité du courant est liée à la présence d'oxygène au sein de la solution selon la réaction :



La cinétique de décomposition de cette réaction suit une loi d'ordre 2 :

$$v = 4k \cdot [\text{NO}]^2 \cdot [\text{O}_2] = k' \cdot [\text{NO}]^2 \quad (\text{vi})$$

Avec : $k' = 4k \cdot [\text{O}_2]$

La détermination de la constante k' peut être déterminée en traçant la fonction :

$$\frac{1}{[\text{NO}]_t} - \frac{1}{[\text{NO}]_0} = f(t) \quad (\text{vii})$$

Pour traiter les données, nous avons procédé comme suit :

- (1) Les intensités du courant (I_t) post-injection sont récupérées des données de la chronoampérométrie.
- (2) Les valeurs de I_t sont transformées en $[\text{NO}]_t$ en utilisant le coefficient donné dans la littérature de 0,009 nA.µM⁻¹ pour des UME très similaires. Il suffit ensuite de tracer la fonction de l'équation (vii) (Figure 173).

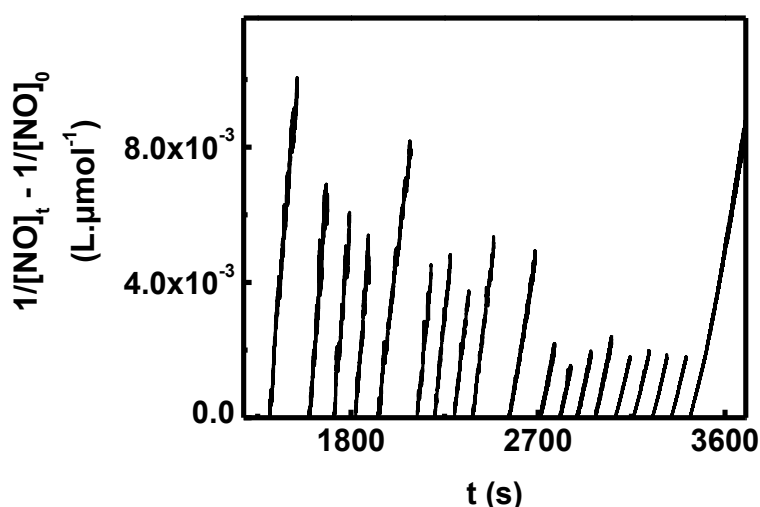


Figure 173 Détermination de la constante de vitesse partielle de décomposition du monoxyde d'azote pour chaque injection. La concentration en NO[•] est estimée à partir du courant issue de l'expérience de chronoampérométrie et d'une valeur de la sensibilité de l'électrode issue de la littérature (0,009 nA.µM⁻¹) [350].

La constante de vitesse k' correspond au coefficient directeur de chacune des droites qui ont été calculées indépendamment pour chaque injection. La valeur moyenne obtenue est :

$$k' = 45,2 \pm 19,4 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

A partir de cette valeur de constante partielle et de la valeur théorique de la constante globale de cette réaction reportée dans la littérature ($2.10^6 \text{ L}^2 \cdot \text{mol}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ [343], [344]), nous pouvons estimer la concentration en oxygène dans la solution à environ $5,7 \mu\text{M}$ ce qui est près de 45 fois inférieur à la valeur de la concentration en oxygène d'une solution aérée (0,25 mM).

Bien que ce raisonnement soit basé sur certaines approximations (sensibilité de l'électrode notamment), le traitement des données met en évidence une cinétique d'ordre 2 relative à la diminution du courant lors de l'expérience de calibration (Chapitre 4, Figure 143). De plus, ce phénomène, s'il est lié à la présence d'oxygène, ne nécessite que quelques micromolaires pour décomposer le monoxyde d'azote.

Bibliographie

Bibliographie

- [1] D. van Swaay and A. deMello, "Microfluidic methods for forming liposomes," *Lab Chip*, vol. 13, no. 5, pp. 752–767, 2013.
- [2] J. G. Voet and D. Voet, "Lipides et membranes," in *Biochimie*, 3ème Editi., De Boeck Supérieur, Ed. 2016, pp. 386–468.
- [3] R. D. Kornberg and H. M. McConnell, "Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes.," *Biochemistry*, vol. 10, no. 7, pp. 1111–1120, 1971.
- [4] O. G. Mouritsen, "Theoretical models of phospholipid phase transitions," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 57, pp. 179–194, 1991.
- [5] A. Blume, "A comparative study of the phase transitions of phospholipid bilayers and monolayers," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 557, no. 1, pp. 32–44, 1979.
- [6] M. K. Chaudhury and S. Ohki, "Correlation between membrane expansion and temperature-induced membrane fusion," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 642, pp. 365–374, 1981.
- [7] A. D. Bangham, M. M. Standish, and J. C. Watkins, "Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids.," *J. Mol. Biol.*, vol. 13, no. 1, pp. 238–252, 1965.
- [8] A. Bangham, "This Week 's Citation Classic," *This Week's Cit. Class.*, vol. 13, p. 14, 1989.
- [9] Y. Tahara and Y. Fujiyoshi, "A new method to measure bilayer thickness: Cryo-electron microscopy of frozen hydrated liposomes and image simulation," *Micron*, vol. 25, no. 2, pp. 141–149, 1994.
- [10] R. E. Pagano and J. N. Weinstein, "Interactions of Liposomes with Mammalian Cells," *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, vol. 7, pp. 435–468, 1978.
- [11] G. H. Hinkle, G. S. Born, W. V Kessler, and S. M. Shaw, "Preferential Localization of Radiolabeled Liposomes in Liver," *J. Pharma. Sci.*, vol. 67, no. 6, pp. 795–798, 1978.
- [12] N. van Rooijen and R. van Nieuwmegen, "Elimination of phagocytic cells in the spleen after intravenous injection of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. An enzyme-histochemical study," *Cell tissue Res.*, vol. 238, p. 355, 1984.
- [13] S. G. Correa, V. E. Rivero, N. Yranzo-Volonte, M. Romero-Piffiguer, M. E. Ferro, and C. M. Riera, "Effect of gangliosides in the autoimmune response induced by liposome-associated antigens.," *Autoimmunity*, vol. 15, no. 3, pp. 195–200, 2017.
- [14] A. L. Klibanov, K. Maruyama, V. P. Torchilin, and L. Huang, "Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes," *FEBS Lett.*, vol. 268, no. 1, pp. 235–237, 1990.
- [15] H. S. Kim and Y. S. Park, "Gene transfection by quantitatively reconstituted Sendai envelope proteins into liposomes," *Cancer Gene Ther.*, vol. 9, pp. 173–177, 2002.

- [16] R. Leventis, T. Diacovo, and J. R. Silvius, “pH-dependent stability and fusion of liposomes combining protonatable double-chain amphiphiles with phosphatidylethanolamine.,” *Biochemistry*, vol. 26, no. May, pp. 3267–3276, 1987.
- [17] G. Redziniak, “Liposomes et peau: Passé, présent, futur,” *Pathol. Biol.*, vol. 51, no. 5, pp. 279–281, 2003.
- [18] D. W. Deamer and J. Bramhall, “Permeability of lipid bilayers to water and ionic solutes,” *Chem. Phys. Lipids*, vol. 40, no. 2–4, pp. 167–188, 1986.
- [19] S. Paula, A. G. Volkov, A. N. Van Hoek, T. H. Haines, and D. W. Deamer, “Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness,” *Biophys. J.*, vol. 70, no. 1, pp. 339–348, 1996.
- [20] I. Vorobyov, T. E. Olson, J. H. Kim, R. E. Koeppe, O. S. Andersen, and T. W. Allen, “Ion-induced defect permeation of lipid membranes,” *Biophys. J.*, vol. 106, no. 3, pp. 586–597, 2014.
- [21] S. Simon, T. McIntosh, and R. Latorre, “Influence of cholesterol on water penetration into bilayers,” *Science (80-.)*, vol. 216, no. 4541, pp. 65–67, 1982.
- [22] B. B. Issack and G. H. Peslherbe, “Effects of Cholesterol on the Thermodynamics and Kinetics of Passive Transport of Water through Lipid Membranes,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 119, no. 29, pp. 9391–9400, 2015.
- [23] R. F. Flewelling and W. L. Hubbell, “The membrane dipole potential in a total membrane potential model. Applications to hydrophobic ion interactions with membranes,” *Biophys. J.*, vol. 49, no. 2, pp. 541–552, 1986.
- [24] S. Paula, A. G. Volkov, and D. W. Deamer, “Permeation of Halide Anions through Phospholipid Bilayers Occurs by the Solubility-Diffusion Mechanism,” *Biophys. J.*, vol. 74, no. 1, pp. 319–327, 1998.
- [25] A. G. Volkov, S. Paula, and D. W. Deamer, “Two mechanisms of permeation of small neutral molecules and hydrated ions across phospholipid bilayers,” *Bioelectrochemistry Bioenerg.*, vol. 42, no. 2, pp. 153–160, 1997.
- [26] A. Parsegian, “Energy of an Ion crossing a Low Dielectric Membrane: Solutions to Four Relevant Electrostatic Problems,” *Nature*, vol. 223, pp. 844–846, 1969.
- [27] J. P. Dilger, S. G. McLaughlin, T. J. McIntosh, and S. a Simon, “The dielectric constant of phospholipid bilayers and the permeability of membranes to ions,” *Science*, vol. 206, no. 4423, pp. 1196–1198, 1979.
- [28] E. C. M. Tse, C. J. Barile, J. P. Gewargis, Y. Li, S. C. Zimmerman, and A. A. Gewirth, “Anion transport through lipids in a hybrid bilayer membrane,” *Anal. Chem.*, vol. 87, no. 4, pp. 2403–2409, 2015.
- [29] H. Hauser, D. Oldani, and M. C. Phillips, “Mechanism of ion escape from phosphatidylcholine and phosphatidylserine single bilayer vesicles.,” *Biochemistry*, vol. 12,

- no. 22, pp. 4507–17, 1973.
- [30] D. W. Deamer and J. W. Nichols, “Proton flux mechanisms in model and biological membranes,” *J. Membr. Biol.*, vol. 107, pp. 91–103, 1989.
 - [31] B. Ketterer, B. Neumcke, and P. Läuger, “Transport mechanism of hydrophobic ions through lipid bilayer membranes,” *J. Membr. Biol.*, vol. 5, no. 3, pp. 225–245, 1971.
 - [32] D. Papahadjopoulos, K. Jacobson, S. Nir, and I. Isac, “Phase transitions in phospholipid vesicles Fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol,” *BBA - Biomembr.*, vol. 311, no. 3, pp. 330–348, 1973.
 - [33] R. Lawaczeck, “On the permeability of water molecules across vesicular lipid bilayers,” *J. Membr. Biol.*, vol. 51, no. 3–4, pp. 229–261, 1979.
 - [34] E. M. El-Mashak and T. Y. Tsong, “Ion Selectivity of Temperature-Induced and Electric Field Induced Pores in Dipalmitoylphosphatidylcholine Vesicles,” *Biochemistry*, vol. 24, no. 12, pp. 2884–2888, 1985.
 - [35] A. Carruthers and D. L. Melchior, “Studies of the relationship between bilayer water permeability and bilayer physical state,” *Biochemistry*, vol. 22, pp. 5797–5807, 1983.
 - [36] E. J. Shimshick and H. M. McConnell, “Lateral phase separation in phospholipid membranes,” *Biochemistry*, vol. 12, no. 12, pp. 2351–2360, 1973.
 - [37] A. J. Verkleij, P. H. J. Ververgaert, L. L. M. Van Deenen, and P. F. Elbers, “Phase transitions of phospholipid bilayers and membranes of *Acholeplasma laidlawii* B visualized by freeze fracturing electron microscopy,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 288, pp. 326–332, 1972.
 - [38] L. Yang and J. T. Kindt, “Simulation study of the permeability of a model lipid membrane at the fluid-solid phase transition,” *Langmuir*, vol. 31, no. 7, pp. 2187–2195, 2015.
 - [39] M. I. Kanehisa and T. Y. Tsong, “Cluster model of lipid phase transitions with application to passive permeation of molecules and structure relaxations in lipid bilayers,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 100, no. 2, pp. 424–432, 1978.
 - [40] D. Marsh, A. Watts, and P. F. Knowles, “Evidence for phase boundary lipid. Permeability of Tempo-choline into dimyristoylphosphatidylcholine vesicles at the phase transition,” *Biochemistry*, vol. 15, no. 16, pp. 3570–3578, 1976.
 - [41] S. Doniach, “Thermodynamic fluctuations in phospholipid bilayers,” *J. Chem. Phys.*, vol. 68, no. 11, pp. 4912–4916, 1978.
 - [42] J. F. Nagle and H. L. Scott, “Lateral compressibility of lipid mono- and bilayers. Theory of membrane permeability,” *BBA - Biomembr.*, vol. 513, no. 2, pp. 236–243, 1978.
 - [43] J. E. Harkness and R. D. White, “An ultrasonic study of the thermotropic transition of dipalmitoyl phosphatidylcholine,” *BBA - Biomembr.*, vol. 552, no. 3, pp. 450–456, 1979.
 - [44] S. Mitaku, A. Ikegami, and A. Sakanishi, “Ultrasonic Studies of Lipid Bilayer. Phase

- Transition in Synthetic Phosphatidylcholine Liposomes,” *Biophys. Chem.*, vol. 8, pp. 295–304, 1978.
- [45] J. Bramhall, “Permeation of amphiphilic solutes across lipid bilayers,” in *The Pharmacological Effect of Lipids II*, American O., J. J. Kabara, Ed. 1985, pp. 43–50.
- [46] H. Träuble, “The movement of molecules across lipid membranes: A molecular theory,” *J. Membr. Biol.*, vol. 4, no. 1, pp. 193–208, 1971.
- [47] A. Seelig and J. Seelig, “The Dynamic structure of fatty acid chains in a phosphatidylcholine bilayer measured by deuterium magnetic resonance,” *Biochemistry*, vol. 13, no. 23, pp. 4839–4845, 1974.
- [48] P. G. Barton and F. D. Gunstone, “Hydrocarbon chain packing and molecular motion in phospholipid bilayers formed from unsaturated lecithins,” *J. Biol. Chem.*, vol. 250, no. 12, pp. 4470–4476, 1975.
- [49] J. de Gier, “Osmotic Properties in Liposomes,” in *Water Transport in Biological Membranes*, Vol. 1., G. Benga, Ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 1989.
- [50] E. A. Disalvo, O. A. Pinto, M. F. Martini, A. M. Bouchet, A. Hollmann, and M. A. Frías, “Functional role of water in membranes updated: A tribute to Träuble,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1848, no. 7, pp. 1552–1562, 2015.
- [51] E. Mabrouk, D. Cuvelier, M. Li, P. Nassoy, and L. P. Curie, “Les polymersomes, des vésicules robustes et stimulables pour la libération contrôlée des médicaments,” *Cnrs*, p. 26, 2009.
- [52] B. M. Discher, Y. Y. Won, D. S. Ege, J. C. Lee, F. S. Bates, D. E. Discher, and D. a Hammer, “Polymersomes: tough vesicles made from diblock copolymers,” *Science*, vol. 284, no. 5417, pp. 1143–1146, 1999.
- [53] A. Peyret, E. Ibarboure, A. Tron, L. Beauté, R. Rust, O. Sandre, N. D. McClenaghan, and S. Lecommandoux, “Polymersome Popping by Light-Induced Osmotic Shock under Temporal, Spatial, and Spectral Control,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 56, no. 6, pp. 1566–1570, 2017.
- [54] M. Marguet, L. Edembe, and S. Lecommandoux, “Polymersomes in polymersomes: Multiple loading and permeability control,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 51, no. 5, pp. 1173–1176, 2012.
- [55] M. Marguet, C. Bonduelle, and S. Lecommandoux, “Multicompartmentalized polymeric systems: towards biomimetic cellular structure and function,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 2, 2013.
- [56] Y. Elani, R. V Law, and O. Ces, “Vesicle-based artificial cells as chemical microreactors with spatially segregated reaction pathways,” *Nat. Commun.*, vol. 5, pp. 1–5, 2014.
- [57] T. Doneux, L. Bouffier, B. Goudeau, and S. Arbault, “Coupling Electrochemistry with Fluorescence Confocal Microscopy to Investigate Electrochemical Reactivity: A Case Study

- p>with the Resazurin-Resorufin Fluorogenic Couple,”
- Anal. Chem.*
- , vol. 88, no. 12, pp. 6292–6300, 2016.
- [58] M. Zhou, Z. Diwu, N. Panchuk-Voloshina, and R. P. Haugland, “A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases.,” *Anal. Biochem.*, vol. 253, no. 253, pp. 162–168, 1997.
- [59] N. N. Deng, M. Yelleswarapu, and W. T. S. Huck, “Monodisperse Uni- and Multicompartment Liposomes,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 138, no. 24, pp. 7584–7591, 2016.
- [60] B. G. De Geest, S. De Koker, K. Immesoete, J. Demeester, S. C. De Smedt, and W. E. Hennink, “Self-exploding beads releasing microcarriers,” *Adv. Mater.*, vol. 20, no. 19, pp. 3687–3691, 2008.
- [61] Y. Jiang, Q. Sun, L. Zhang, and Z. Jiang, “Capsules-in-bead scaffold: a rational architecture for spatially separated multienzyme cascade system,” *J. Mater. Chem.*, vol. 19, no. 47, p. 9068, 2009.
- [62] V. Towne, M. Will, B. Oswald, and Q. Zhao, “Complexities in horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of dihydroxyphenoxazine derivatives: Appropriate ranges for pH values and hydrogen peroxide concentrations in quantitative analysis,” *Anal. Biochem.*, vol. 334, pp. 290–296, 2004.
- [63] H. H. Gorris and D. R. Walt, “Mechanistic Aspects of Horseradish Peroxidase Elucidated through Single-Molecule Studies Mechanistic Aspects of Horseradish Peroxidase Elucidated through Single-Molecule Studies,” *Society*, no. 17, pp. 6277–6282, 2009.
- [64] R. Bentley, “Glucose oxidase,” in *The Enzymes*, P. D. Boyer, H. Lardy, and K. Myrback, Eds. 1963, p. Vol. 7.
- [65] S. Nakamura, S. Hayashi, and K. Koga, “Effect of periodate oxidation on the structure and properties of glucose oxidase,” *BBA - Enzymol.*, vol. 445, no. 2, pp. 294–308, 1976.
- [66] C. Bourdillon, J. P. Bourgeois, and D. Thomas, “Covalent linkage of glucose oxidase on modified glassy carbon electrodes. Kinetic phenomena,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 102, no. 3, pp. 4231–4235, 1980.
- [67] D. Keilin and E. F. Hartree, “Properties of glucose oxidase (notatin),” *Biochem. J.*, vol. 42, no. 2, pp. 221–229, 1948.
- [68] C. E. Coulthard, R. Michaelis, W. F. Short, and G. Sykes, “Notatin : an Anti-bacterial glucose-aerodehydrogenase from *Penicillium notatum* Westling,” *Nature*, vol. 150, no. 3813, pp. 634–635, 1942.
- [69] B. E. P. Swoboda and V. Massey, “Purification and Properties of the Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*,” *J. Biol. Chem.*, vol. 240, pp. 2209–2215, 1965.
- [70] Q. H. Gibson, B. E. P. Swoboda, and V. Massey, “Kinetics and Mechanism of Action of Glucose Oxidase,” *J Biol Chem*, vol. 239, no. 11, pp. 3927–3934, 1964.

- [71] H. J. Bright and D. J. T. Porter, "Flavoprotein oxidases," in *The Enzymes*, Academic P., New York, 1975, pp. 421–505.
- [72] V. Leskovac, S. Trivić, G. Wohlfahrt, J. Kandrač, and D. Peričin, "Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: The mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 37, no. 4, pp. 731–750, 2005.
- [73] R. Bentley and A. Neuberger, "The mechanism of the action of notatin," *Biochem. J.*, vol. 45, pp. 584–590, 1949.
- [74] T. W. Chan and T. C. Bruice, "One and Two Electron Transfer Reactions of Glucose Oxidase," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 99, no. 7, pp. 2387–2389, 1977.
- [75] J. P. Roth and J. P. Klinman, "Catalysis of electron transfer during activation of O₂ by the flavoprotein glucose oxidase," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 1, pp. 62–67, 2003.
- [76] G. Wohlfahrt, S. Trivic, J. Zeremski, D. Pericin, and V. Leskovac, "The chemical mechanism of action of glucose oxidase from *Aspergillus niger*," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 260, pp. 69–83, 2004.
- [77] B. A. Palfrey, D. P. Ballou, and V. Massey, "Oxygen activation by flavins and pterin," in *Active Oxygen in Biochemistry*, Blackie Ac., J. S. Valentine, C. S. Foote, A. Greenberg, and J. F. Liebman, Eds. Glasgow, 1995, pp. 37–83.
- [78] L. M. Shannon, E. Kay, and J. Y. Lew, "Peroxidase Isozymes from Horseradish Roots," *J. Biol. Chem.*, vol. 241, no. 9, pp. 2166–2172, 1966.
- [79] D. Keilin, F. R. S. Mann, and T. Mann, "On the Haematin Compound of Peroxidase," *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.*, vol. 122, pp. 119–133, 1937.
- [80] J. B. Wittenberg, R. W. Noble, B. A. Wittenberg, E. Antonini, M. Brunori, J. Wyman, and A. Einstein, "Studies on the Equilibria and Kinetics of the Reactions of Peroxidase with Ligands - II. The Reaction of Ferropoxidase with Oxygen," *J. Biol. Chem.*, vol. 242, no. 4, pp. 62–634, 1967.
- [81] D. Bruhwiler, N. Gfeller, and G. Calzaferri, "Resorufin in the channels of zeolite L," *J. Phys. Chem., B*, vol. 102, no. 98, pp. 2923–2929, 1998.
- [82] G. P. Brotea and R. J. Thibert, "Fluorometric determination of hydrogen peroxide using resorufin and peroxidase," *Microchem. J.*, vol. 37, no. 3, pp. 368–376, 1988.
- [83] G. H. Seong, J. Heo, and R. M. Crooks, "Measurement of Enzyme Kinetics Using a Continuous-Flow Microfluidic System," *Anal. Chem.*, vol. 75, pp. 3161–3167, 2003.
- [84] M. B. Arnao, M. Acosta, J. A. del Rio, and F. García-Cánovas, "Inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide and its protection by a reductant agent," *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.*, vol. 1038, no. 1, pp. 85–89, 1990.
- [85] M. B. Arnao, M. Acosta, J. A. del Rio, R. Varón, and F. García-Cánovas, "A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide," *Biochim. Biophys. Acta*

- (BBA)/*Protein Struct. Mol.*, vol. 1041, no. 1, pp. 43–47, 1990.
- [86] M. N. Möller, J. R. Lancaster, and A. Denicola, “Chapter 2 The Interaction of Reactive Oxygen and Nitrogen Species with Membranes,” *Curr. Top. Membr.*, vol. 61, no. April 2015, pp. 23–42, 2008.
 - [87] F. Murad, “Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling (Nobel lecture),” *Angew. Chemie International Ed.*, vol. 38, pp. 1856–1868, 1999.
 - [88] P. Pacher, J. S. Beckman, and L. Liaudet, “Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters,” *Physiol. Rev.*, vol. 75, no. 1, pp. 1–45, 1995.
 - [89] I. N. Mungrue, “nNOS at a glance: implications for brain and brawn,” *J. Cell Sci.*, vol. 117, no. 13, pp. 2627–2629, 2004.
 - [90] K. S. Christopherson and D. S. Bredt, “Nitric oxide in excitable tissues: Physiological roles and disease,” *J. Clin. Invest.*, vol. 100, no. 10, pp. 2424–2429, 1997.
 - [91] D. S. Bredt, P. M. Hwang, and S. H. Snyder, “Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide,” *Nature*, vol. 347, no. 6295, pp. 768–770, 1990.
 - [92] E. Clementi, “The contribution of Salvador Moncada to our understanding of the biology of nitric oxide,” *IUBMB Life*, vol. 55, no. 10–11, pp. 563–5, 2003.
 - [93] S. Korde Choudhari, M. Chaudhary, S. Bagde, A. R. Gadgil, and V. Joshi, “Nitric oxide and cancer: a review,” *World J. Surg. Oncol.*, vol. 11, no. 1, p. 118, 2013.
 - [94] J. S. Stamler, S. Lamas, and F. C. Fang, “Nitrosylation: The prototypic redox-based signaling mechanism,” *Cell*, vol. 106, no. 6, pp. 675–683, 2001.
 - [95] W. C. Sessa, “eNOS at a glance,” *J. Cell Sci.*, vol. 117, no. 12, pp. 2427–2429, 2004.
 - [96] L. Kobzik, M. B. Reid, D. S. Bredt, and J. S. Stamler, “Nitric oxide in skeletal muscle,” *Nature*, vol. 372, pp. 546–548, 1994.
 - [97] R. G. Knowles and S. Moncada, “Nitric oxide synthases in mammals,” *Biochem. J.*, vol. 298, pp. 249–58, 1994.
 - [98] M. A. Marletta, P. S. Yoon, R. Iyengar, C. D. Leaf, and J. S. Wishnok, “Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: Nitric oxide is an intermediate,” *Biochemistry*, vol. 27, no. 24, pp. 8706–8711, 1988.
 - [99] C. Nathan and M. U. Shiloh, “Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 97, no. 16, pp. 8841–8848, 2000.
 - [100] C. Szabó, “Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity,” *Toxicol. Lett.*, vol. 140–141, no. February, pp. 105–112, 2003.
 - [101] A. Brunel, “Etude du mécanisme d’activation de l’oxygène par les NO-Synthases,”

Université Paris-Sud, 2012.

- [102] D. S. Bredt, P. M. Hwang, C. E. Glatt, C. Lowenstein, R. R. Reed, and S. H. Snyder, "Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase," *Nature*, vol. 351, pp. 714–718, 1991.
- [103] Q. Xie, H. Cho, J. Calaycay, R. Mumford, K. Swiderek, T. Lee, A. Ding, T. Troso, and C. Nathan, "Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages," *Science (80-.)*, vol. 256, no. 5054, pp. 225–228, 1992.
- [104] P. A. Marsden, K. T. Schappert, H. S. Chen, M. Flowers, C. L. Sundell, J. N. Wilcox, S. Lamas, and T. Michel, "Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase," *FEBS Lett.*, vol. 307, no. 3, pp. 287–293, 1992.
- [105] G. E. Nilsson and V. Söderström, "Comparative aspects on nitric oxide in brain and its role as a cerebral vasodilator," *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.*, vol. 118, no. 4, pp. 949–958, 1997.
- [106] A. Martínez, "Nitric oxide synthase in invertebrates," *Histochem. J.*, vol. 27, no. 10, pp. 770–776, 1995.
- [107] G. Werner-Felmayer, G. Golderer, E. R. Werner, P. Gröbner, and H. Wachter, "Pteridine biosynthesis and nitric oxide synthase in *Physarum polycephalum*," *Biochem. J.*, vol. 304 (Pt 1), pp. 105–11, 1994.
- [108] Y. Chen and J. P. N. Rosazza, "A bacterial nitric oxide synthase from a *Nocardia* species," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 203, no. 2, pp. 1251–1258, 1994.
- [109] P. Ghafourifar and E. Cadenas, "Mitochondrial nitric oxide synthase," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 26, no. 4, pp. 190–195, 2005.
- [110] W. K. Alderton, C. E. Cooper, and R. G. Knowles, "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition," *Biochem. J.*, vol. 357, no. Pt 3, pp. 593–615, 2001.
- [111] K. Panda, R. J. Rosenfeld, S. Ghosh, A. L. Meade, E. D. Getzoff, and D. J. Stuehr, "Distinct dimer interaction and regulation in nitric-oxide synthase types I, II, and III," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 34, pp. 31020–31030, 2002.
- [112] H. M. Abu-Soud, K. Ichimori, A. Presta, and D. J. Stuehr, "Electron Transfer, Oxygen Binding, and Nitric Oxide Feedback Inhibition in Endothelial Nitric-oxide Synthase," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 23, pp. 17349–17357, 2000.
- [113] J. Santolini, S. Adak, C. M. L. Curran, and D. J. Stuehr, "A kinetic simulation model that describes catalysis and regulation in nitric-oxide synthase," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 2, pp. 1233–1243, 2001.
- [114] S. Adak, J. Santolini, S. Tikunova, Q. Wang, J. D. Johnson, and D. J. Stuehr, "Neuronal nitric-oxide synthase mutant (Ser-1412 to Asp) demonstrates surprising connections between heme reduction, NO complex formation, and catalysis," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 2, pp. 1244–1252, 2001.

- [115] I. Rodriguez-Crespo, N. C. Gerber, and P. R. O. De Montellano, "Endothelial Nitric-oxide Synthase," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 19, pp. 11462–11467, 1996.
- [116] C. Moali, J. L. Boucher, M. A. Sari, D. J. Stuehr, and D. Mansuy, "Substrate specificity of NO synthases: detailed comparison of L-arginine, homo-L-arginine, their N omega-hydroxy derivatives, and N omega-hydroxynor-L-arginine," *Biochemistry*, vol. 37, no. 98, pp. 10453–10460, 1998.
- [117] A. Maréchal, "Etude du cycle cytotoxique des NO-Synthases : production et activation du peroxyinitrite," Université Paris-Sud XI, 2007.
- [118] H. Li and T. L. Poulos, "Structure-function studies on nitric oxide synthases," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 99, no. 1, pp. 293–305, 2005.
- [119] D. J. Stuehr, "Mammalian nitric oxide synthases.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1411, no. 2–3, pp. 217–230, 1999.
- [120] D. S. Bredt and S. H. Snyder, "Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 87, no. 2, pp. 682–685, 1990.
- [121] C. Feng, "Mechanism of nitric oxide synthase regulation: Electron transfer and interdomain interactions," *Coord Chem Rev*, vol. 256, pp. 393–411, 2012.
- [122] C. Feng, L. Chen, W. Li, B. O. Elmore, W. Fan, and X. Sun, "Dissecting regulation mechanism of the FMN to heme interdomain electron transfer in nitric oxide synthases," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 1, pp. 1–29, 2015.
- [123] R. T. Miller, P. Martásek, T. Omura, and B. S. Siler Masters, "Rapid Kinetic Studies of Electron Transfer in the Three Isoforms of Nitric Oxide Synthase," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 265, no. 1, pp. 184–188, 1999.
- [124] T. O. Fischmann, a Hruza, X. D. Niu, J. D. Fossetta, C. a Lunn, E. Dolphin, a J. Prongay, P. Reichert, D. J. Lundell, S. K. Narula, and P. C. Weber, "Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation.," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 6, no. 3, pp. 233–242, 1999.
- [125] B. R. Crane, "The Structure of Nitric Oxide Synthase Oxygenase Domain and Inhibitor Complexes," *Science (80-.)*, vol. 278, pp. 425–431, 1997.
- [126] K. J. Baek, B. A. Thiel, S. Lucas, and D. J. Stuehr, "Macrophage nitric oxide synthase subunits: Purification, characterization, and role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into a dimeric enzyme," *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 28, pp. 21120–21129, 1993.
- [127] S. Daff, "NO synthase: Structures and mechanisms," *Nitric Oxide - Biol. Chem.*, vol. 23, no. 1, pp. 1–11, 2010.
- [128] M. L. Ludwig and M. A. Marletta, "A new decoration for nitric oxide synthase - A Zn(Cys)₄ site," *Structure*, vol. 7, no. 4, pp. 73–79, 1999.

- [129] U. Siddhanta, A. Presta, B. Fan, D. Wolan, D. L. Rousseau, and D. J. Stuehr, "Domain swapping in inducible nitric-oxide synthase: elektron transfer occurs between flavin and heme groups located on adjacent subunits in the dimer domain," *J Biol Chem.*, vol. 273, no. 30, pp. 18950–18958, 1998.
- [130] E. D. Garcin, C. M. Bruns, S. J. Lloyd, D. J. Hosfield, M. Tiso, R. Gachhui, D. J. Stuehr, J. A. Tainer, and E. D. Getzoff, "Structural basis for isozyme-specific regulation of electron transfer in nitric-oxide synthase," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 36, pp. 37918–37927, 2004.
- [131] M. Sono, M. P. Roach, E. D. Coulter, and J. H. Dawson, "Heme-Containing Oxygenases," *Chem. Rev.*, vol. 96, no. 7, pp. 2841–2888, 1996.
- [132] D. J. Stuehr, J. Santolini, Z. Q. Wang, C. C. Wei, and S. Adak, "Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 35, pp. 36167–36170, 2004.
- [133] A. Presta, U. Siddhanta, C. Wu, N. Sennequier, L. Huang, H. M. Abu-Soud, S. Erzurum, and D. J. Stuehr, "Comparative functioning of dihydro- and tetrahydropterins in supporting electron transfer, catalysis, and subunit dimerization in inducible nitric oxide synthase," *Biochemistry*, vol. 37, no. 1, pp. 298–310, 1998.
- [134] C. C. Wei, B. R. Crane, and D. J. Stuehr, "Tetrahydrobiopterin radical enzymology," *Chem. Rev.*, vol. 103, no. 6, pp. 2365–2383, 2003.
- [135] M. Couture, D. J. Stuehr, and D. L. Rousseau, "The ferrous dioxygen complex of the oxygenase domain of neuronal nitric- oxide synthase," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 5, pp. 3201–3205, 2000.
- [136] H. M. Abu-Soud, R. Gachhui, F. M. Raushel, and D. J. Stuehr, "The ferrous-dioxy complex of neuronal nitric oxide synthase.," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 28, pp. 17349–17353, 1997.
- [137] P. P. Schmidt, R. Lange, A. C. F. Gorren, E. R. Werner, B. Mayer, and K. K. Andersson, "Formation of a protonated trihydrobiopterin radical cation in the first reaction cycle of neuronal and endothelial nitric oxide synthase detected by electron paramagnetic resonance spectroscopy," *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 6, no. 2, pp. 151–158, 2001.
- [138] A. R. Hurshman and M. A. Marletta, "Reactions catalyzed by the heme domain of inducible nitric oxide synthase: Evidence for the involvement of tetrahydrobiopterin in electron transfer," *Biochemistry*, vol. 41, no. 10, pp. 3439–3456, 2002.
- [139] N. Bec, A. C. F. Gorren, C. Voelker, B. Mayer, and R. Lange, "Reaction of Neuronal Nitric-oxide Synthase with Oxygen at Low Temperature," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 22, pp. 13502–13508, 1998.
- [140] C. C. Wei, Z. Q. Wang, A. L. Meade, J. F. McDonald, and D. J. Stuehr, "Why do nitric oxide synthases use tetrahydrobiopterin?," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 91, no. 4, pp. 618–624, 2002.
- [141] J. Santolini, "The molecular mechanism of mammalian NO-synthases: A story of electrons and protons," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 105, no. 2, pp. 127–141, 2011.

- [142] S. Stoll, Y. Nejatjahromy, J. J. Woodward, A. Ozarowski, M. A. Marletta, and R. D. Britt, "Nitric oxide synthase stabilizes the tetrahydrobiopterin cofactor radical by controlling its protonation state," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 33, pp. 11812–11823, 2010.
- [143] B. R. Crane, A. S. Arvai, D. K. Ghosh, C. Q. Wu, E. D. Getzoff, D. J. Stuehr, and J. A. Tainer, "Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate.," *Science*, vol. 279, no. 5359, pp. 2121–2126, 1998.
- [144] N. I. Martin, J. J. Woodward, M. B. Winter, W. T. Beeson, and M. A. Marletta, "Design and synthesis of C5 methylated L-arginine analogues as active site probes for nitric oxide synthase," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 41, pp. 12563–12570, 2007.
- [145] A. R. Hurshman, C. Krebs, D. E. Edmondson, and M. A. Marletta, "Ability of Tetrahydrobiopterin Analogues to Support Catalysis by Inducible Nitric Oxide Synthase: Formation of a Pterin Radical is Required for Enzyme Activity," *Biochemistry*, vol. 42, no. 45, pp. 13287–13303, 2003.
- [146] C. C. Wei, Z. Q. Wang, C. Hemann, R. Hille, and D. J. Stuehr, "A Tetrahydrobiopterin Radical Forms and then Becomes Reduced during Nw-Hydroxyarginine Oxidation by Nitric-oxide Synthase," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 47, pp. 46668–46673, 2003.
- [147] M. Négrerie, V. Berka, M. H. Vos, U. Liebl, J.-C. Lambry, A.-L. Tsai, and J.-L. Martin, "Geminate recombination of nitric oxide to endothelial nitric-oxide synthase and mechanistic implications," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 35, pp. 24694–24702, 1999.
- [148] J. Santolini, A. L. Meade, and D. J. Stuehr, "Differences in Three Kinetic Parameters Underpin the Unique Catalytic Profiles of Nitric-oxide Synthases I, II, and III," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 52, pp. 48887–48898, 2001.
- [149] J. Vasquez-Vivar, N. Hogg, P. Martasek, H. Karoui, K. A. Pritchard, and B. Kalyanaraman, "Tetrahydrobiopterin-dependent Inhibition of Superoxide Generation from Neuronal Nitric Oxide Synthase," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 38, pp. 26736–26742, 1999.
- [150] H. Ohshima, M. Tatemichi, and T. Sawa, "Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 417, no. 1, pp. 3–11, 2003.
- [151] K. J. Barnham, C. L. Masters, and A. I. Bush, "Neurodegenerative diseases and oxidative stress," *Nat. Rev.*, vol. 3, pp. 205–214, 2004.
- [152] X. Chen, X. Tian, I. Shin, and J. Yoon, "Fluorescent and luminescent probes for detection of reactive oxygen and nitrogen species," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 40, no. 9, pp. 4783–4804, 2011.
- [153] S. L. Hempel, G. R. Buettner, Y. Q. O'Malley, D. A. Wessels, and D. M. Flaherty, "Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: Comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 27, no. 1–2, pp. 146–159, 1999.

- [154] L.-C. Lo and C.-Y. Chu, "Development of highly selective and sensitive probes for hydrogen.," *Chem. Commun. (Camb)*, no. 21, pp. 2728–2729, 2003.
- [155] M. C. Y. Chang, A. Pralle, E. Y. Isacoff, and C. J. Chang, "A selective, cell-permeable optical probe for hydrogen peroxide in living cells.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 47, pp. 15392–15393, 2004.
- [156] F. He, Y. Tang, M. Yu, S. Wang, Y. Li, and D. Zhu, "Fluorescence-amplifying detection of hydrogen peroxide with cationic conjugated polymers, and its application to glucose sensing," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 16, no. 1, pp. 91–94, 2006.
- [157] E. W. Miller, S. X. Bian, and C. J. Chang, "A Fluorescent Sensor for Imaging Reversible Redox Cycles in Living Cells," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, pp. 3458–3459, 2007.
- [158] T. Zhang, H. Fan, G. Liu, J. Jiang, J. Zhou, and Q. Jin, "Different effects of Fe²⁺ and Fe³⁺ on conjugated polymer PPESO₃: a novel platform for sensitive assays of hydrogen peroxide and glucose.," *Chem. Commun. (Camb)*, no. 42, pp. 5414–5416, 2008.
- [159] D. Lee, S. Khaja, J. C. Velasquez-Castano, M. Dasari, C. Sun, J. Petros, W. R. Taylor, and N. Murthy, "In vivo imaging of hydrogen peroxide with chemiluminescent nanoparticles.," *Nat. Mater.*, vol. 6, no. 10, pp. 765–769, 2007.
- [160] Y.-C. Shiang, C.-C. Huang, and H.-T. Chang, "Gold nanodot-based luminescent sensor for the detection of hydrogen peroxide and glucose.," *Chem. Commun. (Camb)*, no. 23, pp. 3437–3439, 2009.
- [161] M. H. Lim and S. J. Lippard, "Metal-based turn-on fluorescent probes for sensing nitric oxide," *Acc. Chem. Res.*, vol. 40, no. 1, pp. 41–51, 2007.
- [162] H. Kojima, N. Nakatsubo, K. Kikuchi, S. Kawahara, Y. Kirino, H. Nagoshi, Y. Hirata, and T. Nagano, "Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diamino fluoresceins.," *Anal. Chem.*, vol. 70, no. 13, pp. 2446–2453, 1998.
- [163] H. Kojima, Y. Urano, K. Kikuchi, T. Higuchi, Y. Hirata, and T. Nagano, "Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production," *Angew Chem Int Ed Engl*, vol. 38, no. 21, pp. 3209–3212, 1999.
- [164] H. Kojima, M. Hirotsu, N. Nakatsubo, K. Kikuchi, Y. Urano, T. Higuchi, Y. Hirata, and T. Nagano, "Bioimaging of Nitric Oxide with Fluorescent Indicators Based on the Rhodamine Chromophore," *Anal. Chem.*, vol. 73, no. 9, pp. 1967–1973, 2001.
- [165] S. Izumi, Y. Urano, K. Hanaoka, T. Terai, and T. Nagano, "A Simple and Effective Strategy To Increase the Sensitivity of Fluorescence Probes in Living Cells," *J Am Chem Soc*, vol. 131, no. 8, pp. 10189–10200, 2009.
- [166] K. J. Huang, H. Wang, M. Ma, X. Zhang, and H. S. Zhang, "Real-time imaging of nitric oxide production in living cells with 1,3,5,7-tetramethyl-2,6-dicarboxy-8-(3,4-diaminophenyl)-difluoroboradiazas-indacene by invert fluorescence microscope," *Nitric Oxide - Biol. Chem.*, vol. 16, no. 1, pp. 36–43, 2007.

- [167] K. J. Franz, N. Singh, and S. J. Lippard, "Metal-based NO sensing by selective ligand dissociation," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 39, no. 12, pp. 2120–2122, 2000.
- [168] S. A. Hilderbrand and S. J. Lippard, "Cobalt chemistry with mixed aminotroponimate salicylaldehyde ligands: Synthesis, characterization, and nitric oxide reactivity," *Inorg. Chem.*, vol. 43, no. 15, pp. 4674–4682, 2004.
- [169] M. H. Lim and S. J. Lippard, "Copper complexes for fluorescence-based NO detection in aqueous solution," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 35, pp. 12170–12171, 2005.
- [170] K. Tsuge, F. Derosa, M. D. Lim, and P. C. Ford, "Intramolecular Reductive Nitrosylation : Reaction of Nitric Oxide and a Copper (II) Complex of a Cyclam Derivative with Pendant Luminescent Chromophores," *J Am Chem Soc*, vol. 126, pp. 6564–6565, 2004.
- [171] M. H. Lim, B. a Wong, W. H. Pitcock, D. Mokshagundam, M. Baik, and S. J. Lippard, "Direct Nitric Oxide Detection In Aqueous Solution by Copper (II) Fluorescein Complexes," *J. Am. Chem. Soc.*, no. 128, pp. 14364–14373, 2006.
- [172] M. D. Pluth, M. R. Chan, L. E. McQuade, and S. J. Lippard, "Seminaphthofluorescein-Based Fluorescent Probes for Imaging Nitric Oxide in Live Cells," *Inorg. Chem.*, vol. 50, no. 19, pp. 9385–9392, 2011.
- [173] M. H. Lim, "Preparation of a copper-based fluorescent probe for nitric oxide and its use in mammalian cultured cells," *Nat. Protoc.*, vol. 2, no. 2, pp. 408–415, 2007.
- [174] J. H. Kim, D. A. Heller, H. Jin, P. W. Barone, C. Song, J. Zhang, L. J. Trudel, G. N. Wogan, S. R. Tannenbaum, and M. S. Strano, "The rational design of nitric oxide selectivity in single-walled carbon nanotube near-infrared fluorescence sensors for biological detection," *Nat. Chem.*, vol. 1, no. 6, pp. 473–481, 2009.
- [175] S. Wang, M. Y. Han, and D. Huang, "Nitric oxide switches on the photoluminescence of molecularly engineered quantum dots," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, no. 33, pp. 11692–11694, 2009.
- [176] J. M. McCord and R. S. Roy, "The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia," *J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 60, pp. 1346–1352, 1982.
- [177] C. D. Georgiou, I. Papapostolou, N. Patsoukis, T. Tsegenidis, and T. Sideris, "An ultrasensitive fluorescent assay for the in vivo quantification of superoxide radical in organisms," *Anal. Biochem.*, vol. 347, no. 1, pp. 144–151, 2005.
- [178] K. M. Robinson, M. S. Janes, M. Pehar, J. S. Monette, M. F. Ross, T. M. Hagen, M. P. Murphy, and J. S. Beckman, "Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 41, pp. 15038–15043, 2006.
- [179] J. J. Gao, K. H. Xu, B. Tang, L. L. Yin, G. W. Yang, and L. G. An, "Selective detection of superoxide anion radicals generated from macrophages by using a novel fluorescent probe," *FEBS J.*, vol. 274, no. 7, pp. 1725–1733, 2007.

- [180] B. Tang, L. Zhang, and L.-L. Zhang, "Study and application of flow injection spectrofluorimetry with a fluorescent probe of 2-(2-pyridil)-benzothiazoline for superoxide anion radicals.," *Anal. Biochem.*, vol. 326, no. 2, pp. 176–82, 2004.
- [181] H. Maeda, K. Yamamoto, I. Kohno, L. Hafsi, N. Itoh, S. Nakagawa, N. Kanagawa, K. Suzuki, and T. Uno, "Design of a practical fluorescent probe for superoxide based on protection-deprotection chemistry of fluoresceins with benzenesulfonyl protecting groups," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 13, no. 7, pp. 1946–1954, 2007.
- [182] H. Maeda, K. Yamamoto, Y. Nomura, I. Kohno, L. Hafsi, N. Ueda, S. Yoshida, M. Fukuda, Y. Fukuyasu, Y. Yamauchi, and N. Itoh, "A design of fluorescent probes for superoxide based on a nonredox mechanism," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 1, pp. 68–69, 2005.
- [183] M. Sekiya, K. Umezawa, A. Sato, D. Citterio, and K. Suzuki, "A novel luciferin-based bright chemiluminescent probe for the detection of reactive oxygen species.," *Chem. Commun. (Camb)*, pp. 3047–3049, 2009.
- [184] P. Pacher, J. S. Beckman, and L. Liaudet, "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease.," *Physiol. Rev.*, vol. 87, no. 1, pp. 315–424, 2007.
- [185] D. Yang, H.-L. L. Wang, Z.-N. N. Sun, N.-W. W. Chung, and J.-G. G. Shen, "A highly selective fluorescent probe for the detection and imaging of peroxynitrite in living cells," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 18, pp. 6004–6005, 2006.
- [186] T. Peng and D. Yang, "HKGreen-3: A rhodol-based fluorescent probe for peroxynitrite," *Org. Lett.*, vol. 12, no. 21, pp. 4932–4935, 2010.
- [187] Z.-N. Sun, H.-L. Wang, F.-Q. Liu, Y. Chen, P. K. H. Tam, and D. Yang, "BODIPY-based fluorescent probe for peroxynitrite detection and imaging in living cells.," *Org. Lett.*, vol. 11, no. 9, pp. 1887–1890, 2009.
- [188] A. Darchen, "Potentiels standards d'oxydoréduction - Déterminations et applications," *Tech. l'ingénieur*, 2011.
- [189] F. Bedioui, "Voltampérométrie. Théorie et mise en œuvre expérimentale," *Tech. l'ingénieur*, 1999.
- [190] F. Bedioui, "Voltampérométrie sur électrode solide - Introduction," *Tech. l'ingénieur*, 2008.
- [191] C. Lu, "Analyse microélectrochimique du stress oxydant à l'échelle de la cellule unique : application aux cellules cancéreuses du sein," Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012.
- [192] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, Second Edi. 2000.
- [193] D. Quinton, "Réseaux de multicapteurs électrochimiques pour la détection du monoxyde d'azote et de l'anion peroxynitrite en solution," Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011.
- [194] C. Amatore, S. Arbault, C. Bouton, K. Coffi, J. C. Drapier, H. Ghandour, and Y. Tong,

- “Monitoring in real time with a microelectrode the release of reactive oxygen and nitrogen species by a single macrophage stimulated by its membrane mechanical depolarization,” *ChemBioChem*, vol. 7, pp. 653–661, 2006.
- [195] S. Hrapovic, Y. Liu, K. B. Male, and J. H. T. Luong, “Electrochemical Biosensing Platforms Using Platinum Nanoparticles and Carbon Nanotubes,” *Anal. Chem.*, vol. 76, no. 4, pp. 1083–1088, 2004.
- [196] S. Guo, D. Wen, Y. Zhai, S. Dong, and E. Wang, “Platinum Nanoparticle Ensemble-on-Rapid Synthesis , and Used as New Sensing,” *ACS Nano*, vol. 4, no. 7, pp. 3959–3968, 2010.
- [197] M. Yang, Y. Yang, Y. Liu, G. Shen, and R. Yu, “Platinum nanoparticles-doped sol-gel/carbon nanotubes composite electrochemical sensors and biosensors,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 21, no. 7, pp. 1125–1131, 2006.
- [198] C. Amatore, S. Arbault, M. Guille, and F. De, “Electrochemical Monitoring of Single Cell Secretion : Vesicular Exocytosis and Oxidative Stress Electrochemical Monitoring of Single Cell Secretion : Vesicular Exocytosis and Oxidative Stress,” *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 7, pp. 2585–2621, 2008.
- [199] Y. Li, C. Sella, F. Lemaître, M. Guille Collignon, L. Thouin, and C. Amatore, “Highly Sensitive Platinum-Black Coated Platinum Electrodes for Electrochemical Detection of Hydrogen Peroxide and Nitrite in Microchannel,” *Electroanalysis*, vol. 25, no. 4, pp. 895–902, 2013.
- [200] V. Badets, J. Pandard, N. Sojic, and S. Arbault, “Deciphering the Platinized Surface Reactivity to Improve the Detection of Hydrogen Peroxide in Bioanalyses,” *ChemElectroChem*, vol. 3, no. 12, pp. 2288–2296, 2016.
- [201] F. Bedioui, D. Quinton, S. Griveau, and T. Nyokong, “Designing molecular materials and strategies for the electrochemical detection of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite in biological systems,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 12, no. 34, p. 9976, 2010.
- [202] A. Ciszewski and G. Milczarek, “Electrochemical detection of nitric oxide using polymer modified electrodes,” *Talanta*, vol. 61, no. 1, pp. 11–26, 2003.
- [203] F. Bedioui and S. Griveau, “Electrochemical Detection of Nitric Oxide: Assesment of Twenty Years of Strategies,” *Electroanalysis*, vol. 25, no. 3, pp. 587–600, 2013.
- [204] K. Shibuki, “An electrochemical microprobe for detecting nitric oxide release in brain tissue,” *Neurosci. Res.*, vol. 9, no. 1, pp. 69–76, 1990.
- [205] T. Malinski and Z. Taha, “Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor,” *Nature*, vol. 360, pp. 676–678, 1992.
- [206] C. A. Caro, J. H. Zagal, and F. Bedioui, “Electrocatalytic Activity of Substituted Metallophthalocyanines Adsorbed on Vitreous Carbon Electrode for Nitric Oxide Oxidation,” *J. Electrochem. Soc.*, vol. 150, no. 2, p. E95, 2003.

- [207] F. Bedioui, S. Trevin, and J. Devynck, "The use of gold electrodes oxide in aqueous solution in the electrochemical detection of nitric," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 377, pp. 295–298, 1994.
- [208] B. J. Privett, J. H. Shin, and M. H. Schoenfisch, "Electrochemical nitric oxide sensors for physiological measurements," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, no. 6, p. 1925, 2010.
- [209] M. Pontié, F. Bedioui, and J. Devynck, "New Composite Modified Carbon Microfibers for Sensitive and Selective Determination of Physiologically Relevant Concentrations of Nitric Oxide in Solution," *Electroanalysis*, vol. 11, no. 12, pp. 845–850, 1999.
- [210] F. Lantoine, S. Trévin, F. Bedioui, and J. Devynck, "Selective and sensitive electrochemical measurement of nitric oxide in aqueous solution : discussion and new results," *Electroanal. Chem.*, vol. 392, pp. 85–89, 1995.
- [211] F. Bedioui, S. Trevin, J. Devynck, F. Lantoine, A. Brunet, and M. A. Devynck, "Elaboration and use of nickel planar macrocyclic complex-based sensors for the direct electrochemical measurement of nitric oxide in biological media," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 12, no. 3, pp. 205–212, 1997.
- [212] M. Pontié, C. Gobin, T. Pauporté, F. Bedioui, and J. Devynck, "Electrochemical nitric oxide microsensors: Sensitivity and selectivity characterisation," *Anal. Chim. Acta*, vol. 411, no. 1–2, pp. 175–185, 2000.
- [213] N. P. Rodrigues, F. Bedioui, A. Deutsch, N. Zurgil, E. Afrimzon, Y. Shafran, and M. Deutsch, "Construction and use of an integrated electrochemical device for the detection of biologically relevant compounds released from non-adherent cells: Application for the electrochemical determination of nitric oxide produced by human U937 cells," *Electrochem. commun.*, vol. 8, no. 2, pp. 341–347, 2006.
- [214] S. Miserere, S. Ledru, N. Ruillé, S. Griveau, M. Boujtita, and F. Bedioui, "Biocompatible carbon-based screen-printed electrodes for the electrochemical detection of nitric oxide," *Electrochem. commun.*, vol. 8, no. 2, pp. 238–244, 2006.
- [215] N. Pereira-Rodrigues, N. Zurgil, S. C. Chang, J. R. Henderson, F. Bedioui, C. J. McNeil, and M. Deutsch, "Combined system for the simultaneous optical and electrochemical monitoring of intra- and extracellular NO produced by glioblastoma cells," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 9, pp. 2733–2738, 2005.
- [216] A. Besson-Bard, S. Griveau, F. Bedioui, and D. Wendehehenne, "Real-time electrochemical detection of extracellular nitric oxide in tobacco cells exposed to cryptogein, an elicitor of defence responses," *J. Exp. Bot.*, vol. 59, no. 12, pp. 3407–3414, 2008.
- [217] D. Quinton, A. Girard, L. T. Thi Kim, V. Raimbault, L. Griscom, F. Razan, S. Griveau, and F. Bedioui, "On-chip multi-electrochemical sensor array platform for simultaneous screening of nitric oxide and peroxynitrite," *Lab Chip*, vol. 11, no. 7, pp. 1342–1350, 2011.
- [218] H. Hong, J. Sun, and W. Cai, "Multimodality imaging of nitric oxide and nitric oxide synthases," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 47, no. 6, pp. 684–698, 2009.

- [219] N. Hogg, “Detection of nitric oxide by electron paramagnetic resonance spectroscopy,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 49, no. 2, pp. 122–129, 2010.
- [220] N. Khan and H. Swartz, “Measurements in vivo of parameters pertinent to ROS/RNS using EPR spectroscopy,” *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 234/235, pp. 341–357, 2002.
- [221] J. Santolini, M. Roman, D. J. Stuehr, and T. A. Mattioli, “Resonance Raman study of *Bacillus subtilis* NO synthase-like protein: Similarities and differences with mammalian NO synthases,” *Biochemistry*, vol. 45, no. 5, pp. 1480–1489, 2006.
- [222] J. P. Reeves and R. M. Dowben, “Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 73, no. 1, pp. 49–60, 1969.
- [223] M. I. Angelova and D. S. Dimitrov, “Liposome Electroformation,” *Faraday Discuss. Chem. SOC*, vol. 81, pp. 303–311, 1986.
- [224] K. Akashi, H. Miyata, H. Itoh, and K. Kinoshita, “Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope,” *Biophys. J.*, vol. 71, no. 6, pp. 3242–3250, 1996.
- [225] O. Mertins, N. P. Da Silveira, A. R. Pohlmann, A. P. Schröder, and C. M. Marques, “Electroformation of giant vesicles from an inverse phase precursor,” *Biophys. J.*, vol. 96, no. 7, pp. 2719–2726, 2009.
- [226] R. Dimova, S. Aranda, N. Bezlyepkina, V. Nikolov, K. a Riske, and R. Lipowsky, “A practical guide to giant vesicles. Probing the membrane nanoregime via optical microscopy,” *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 18, pp. S1151–S1176, 2006.
- [227] P. Walde, K. Cosentino, H. Engel, and P. Stano, “Giant Vesicles: Preparations and Applications,” *ChemBioChem*, vol. 11, pp. 848–865, 2010.
- [228] M. Angelova, S. Soleau, and P. Méléard, “Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications,” *Prog. Colloid Polym. Sci.*, vol. 89, no. 899, pp. 127–131, 1992.
- [229] T. Pott, H. Bouvrais, and P. Méléard, “Giant unilamellar vesicle formation under physiologically relevant conditions,” *Chem. Phys. Lipids*, vol. 154, pp. 115–119, 2008.
- [230] L.-R. Montes, A. Alonso, F. M. Goñi, and L. a Bagatolli, “Giant unilamellar vesicles electroformed from native membranes and organic lipid mixtures under physiological conditions,” *Biophys. J.*, vol. 93, no. November, pp. 3548–3554, 2007.
- [231] D. J. Estes and M. Mayer, “Giant liposomes in physiological buffer using electroformation in a flow chamber,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1712, no. 2, pp. 152–160, 2005.
- [232] M. Angelova and D. Dimitrov, “A mechanism of liposome electroformation,” *Prog. Colloid Polym. Sci.*, vol. 76, pp. 59–67, 1988.
- [233] T. J. Politano, V. E. Froude, B. Jing, and Y. Zhu, “AC-electric field dependent electroformation of giant lipid vesicles,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 79, no. 1,

- p. 75–82, 2010.
- [234] W. Helfrich, “Effect of thermal undulations on the rigidity of fluid membranes and interfaces,” *J. Phys.*, vol. 46, pp. 1263–1268, 1985.
 - [235] D. S. Dimitrov and M. I. Angelova, “Lipid swelling and liposome formation on solid surfaces in external electric fields,” *Prog. Colloid Polym. Sci.*, vol. 73, pp. 48–56, 1987.
 - [236] F. M. Menger and M. I. Angelova, “Giant Vesicles: Imitating the Cytological Processes of Cell Membranes,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 31, no. 12, p. 789, 1998.
 - [237] J. I. Pavlič, J. Genova, A. Zheliaskova, A. Iglič, and M. D. Mitov, “Electroformation of neutral and negatively charged phospholipid giant vesicles under physiological conditions,” *Comptes Rendus L’Academie Bulg. des Sci.*, vol. 63, no. 4, pp. 497–502, 2010.
 - [238] P. Lefrançois, H. Voldoire, A. Hamoud, B. Goudeau, and S. Arbault, “Electroformation of giant unilamellar vesicles in physiological buffer.” In Preparation
 - [239] J. Huang, J. T. Buboltz, and G. W. Feigenson, “Maximum solubility of cholesterol in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1417, no. 1, pp. 89–100, 1999.
 - [240] M. Breton, M. Amirkavei, and L. M. Mir, “Optimization of the Electroformation of Giant Unilamellar Vesicles (GUVs) with Unsaturated Phospholipids,” *J. Membr. Biol.*, vol. 248, no. 5, 2015.
 - [241] Q. Li, X. Wang, S. Ma, Y. Zhang, and X. Han, “Electroformation of giant unilamellar vesicles in saline solution,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 147, pp. 368–375, 2016.
 - [242] R. Hossain and K. Adamiak, “Dynamic properties of the electric double layer in electrolytes,” *J. Electrostat.*, vol. 71, no. 5, pp. 829–838, 2013.
 - [243] S. Lecuyer, G. Fragneto, and T. Charitat, “Effect of an electric field on a floating lipid bilayer: A neutron reflectivity study,” *Eur. Phys. J. E*, vol. 21, no. 2, pp. 153–159, 2006.
 - [244] Y. Yamashita, M. Oka, T. Tanaka, and M. Yamazaki, “A new method for the preparation of giant liposomes in high salt concentrations and growth of protein microcrystals in them,” *Biochim. Biophys.*, vol. 1561, no. 2, pp. 129–134, 2002.
 - [245] T. Shimanouchi, H. Umakoshi, and R. Kuboi, “Kinetic study on giant vesicle formation with electroformation method,” *Langmuir*, vol. 25, no. 9, pp. 4835–4840, 2009.
 - [246] M. Z. Bazant, “AC Electro-osmotic Flow,” *Encycl. Microfluid. Nanofluidics, Part I*, pp. 8–14, 2008.
 - [247] J. Wu, Y. Ben, and H. C. Chang, “Particle detection by electrical impedance spectroscopy with asymmetric-polarization AC electroosmotic trapping,” *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 1, no. 2, pp. 161–167, 2005.
 - [248] A. González, A. Ramos, N. G. Green, A. Castellanos, and H. Morgan, “Fluid flow induced by nonuniform ac electric fields in electrolytes on microelectrodes. II. A linear double-layer

- analysis,” *Phys. Rev. E*, vol. 61, no. 4, pp. 4019–4028, 2000.
- [249] N. G. Green, A. Ramos, A. González, H. Morgan, and A. Castellanos, “Fluid flow induced by nonuniform ac electric fields in electrolytes on microelectrodes. I. Experimental measurements,” *Phys. Rev. E*, vol. 61, no. 4, pp. 4011–4018, 2000.
- [250] N. G. Green, A. Ramos, A. Gonzalez, H. Morgan, and A. Castellanos, “Fluid flow induced by nonuniform ac electric fields in electrolytes on microelectrodes. III. Observation of streamlines and numerical simulation,” *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, vol. 66, no. 2, pp. 1–11, 2002.
- [251] J. Wu, Y. Ben, D. Battigelli, and H. C. Chang, “Long-range AC electroosmotic trapping and detection of bioparticles,” *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 44, no. 8, pp. 2815–2822, 2005.
- [252] J.-L. Chen, W.-H. Shih, and W.-H. Hsieh, “Three-dimensional non-linear AC electroosmotic flow induced by a face-to-face, asymmetric pair of planar electrodes,” *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 9, no. 2–3, pp. 579–584, 2010.
- [253] N. Islam, M. Lian, and J. Wu, “Enhancing microcantilever capability with integrated AC electroosmotic trapping,” *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 3, no. 3, pp. 369–375, 2007.
- [254] P. Y. Chiou, A. T. Ohta, A. Jamshidi, H. Y. Hsu, and M. C. Wu, “Light-actuated AC electroosmosis for nanoparticle manipulation,” *J. Microelectromechanical Syst.*, vol. 17, no. 3, pp. 525–531, 2008.
- [255] Y. Zhou, C. K. Berry, P. A. Storer, and R. M. Raphael, “Peroxidation of polyunsaturated phosphatidyl-choline lipids during electroformation,” *Biomaterials*, vol. 28, no. 6, pp. 1298–1306, 2007.
- [256] J. Garrec, A. Monari, X. Assfeld, L. M. Mir, and M. Tarek, “Lipid peroxidation in membranes: The peroxy radical does not ‘float,’” *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 5, no. 10, pp. 1653–1658, 2014.
- [257] K. S. Horger, D. J. Estes, R. Capone, and M. Mayer, “Films of Agarose Enable Rapid Formation of Giant Liposomes in Solutions of Physiologic Ionic Strength Films of Agarose Enable Rapid Formation of Giant Liposomes in Solutions of Physiologic Ionic Strength,” *J. Am. Chem. Soc.*, no. 26, pp. 2973–2982, 2009.
- [258] A. Weinberger, F. C. Tsai, G. H. Koenderink, T. F. Schmidt, R. Itri, W. Meier, T. Schmatko, A. Schröder, and C. Marques, “Gel-assisted formation of giant unilamellar vesicles,” *Biophys. J.*, vol. 105, no. July, pp. 154–164, 2013.
- [259] R. B. Lira, R. Dimova, and K. A. Riske, “Giant unilamellar vesicles formed by hybrid films of agarose and lipids display altered mechanical properties,” *Biophys. J.*, vol. 107, no. 7, pp. 1609–1619, 2014.
- [260] C. M. Hassan and N. a. Peppas, *Biopolymers · PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites*, vol. 153, no. 4. 2000.
- [261] N. A. Peppas, J. Z. Hilt, A. Khademhosseini, and R. Langer, “Hydrogels in biology and

- medicine: From molecular principles to bionanotechnology,” *Adv. Mater.*, vol. 18, no. 11, pp. 1345–1360, 2006.
- [262] M. Criado and B. U. Keller, “A membrane fusion strategy for single-channel recordings of membranes usually non-accessible to patch-clamp pipette electrodes,” *FEBS Lett.*, vol. 224, no. 1, pp. 172–176, 1987.
- [263] M. Karlsson, K. Nolkrantz, M. J. Davidson, a. Stromberg, F. Ryttsen, B. Akerman, and O. Orwar, “Electroinjection of colloid particles and biopolymers into single unilamellar liposomes and cells for bioanalytical applications,” *Anal. Chem.*, vol. 72, no. 23, pp. 5857–5862, 2000.
- [264] A. Jesorka, N. Stepanyants, H. Zhang, B. Ortmen, B. Hakonen, and O. Orwar, “Generation of phospholipid vesicle-nanotube networks and transport of molecules therein,” *Nat. Protoc.*, vol. 6, no. 6, pp. 791–805, 2011.
- [265] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and surface forces*, 3rd Editio. 2011.
- [266] H. T. McMahon and J. L. Gallop, “Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling,” *Nature*, vol. 438, no. 7068, pp. 590–596, 2005.
- [267] A. K  chler, M. Yoshimoto, S. Luginb  hl, F. Mavelli, and P. Walde, “Enzymatic reactions in confined environments,” *Nat. Nanotechnol.*, vol. 11, no. 5, pp. 409–420, 2016.
- [268] C. Dietrich, L. a Bagatolli, Z. N. Volovyk, N. L. Thompson, M. Levi, K. Jacobson, and E. Gratton, “Lipid rafts reconstituted in model membranes,” *Biophys. J.*, vol. 80, no. 3, pp. 1417–1428, 2001.
- [269] B. Surre, A. Callan-Jones, J.-B. Manneville, P. Nassoy, J.-F. Joanny, J. Prost, B. Goud, and P. Bassereau, “Curvature-driven lipid sorting needs proximity to a demixing point and is aided by proteins,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 14, pp. 5622–6, 2009.
- [270] A. Tian and T. Baumgart, “Sorting of lipids and proteins in membrane curvature gradients,” *Biophys. J.*, vol. 96, no. 7, pp. 2676–2688, 2009.
- [271] J. Derganc, “Curvature-driven lateral segregation of membrane constituents in Golgi cisternae,” *Phys. Biol.*, vol. 4, pp. 317–324, 2007.
- [272] T. Baumgart, S. T. Hess, and W. W. Webb, “Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension,” *Nature*, vol. 425, pp. 821–824, 2003.
- [273] F. J  licher and R. Lipowsky, “Domain-induced budding of vesicles,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 70, no. 19, pp. 2964–2967, 1993.
- [274] R. Lipowsky, “Domain-induced budding of fluid membranes,” *Biophys. J.*, vol. 64, no. 4, pp. 1133–1138, 1993.
- [275] K. Simons and E. Ikonen, “Functional rafts in cell membranes,” *Nature*, vol. 387, pp. 569–572, 1997.

- [276] A. Roux, D. Cuvelier, P. Nassoy, J. Prost, P. Bassereau, and B. Goud, “Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules.,” *EMBO J.*, vol. 24, no. 8, pp. 1537–45, 2005.
- [277] A. Karlsson, K. Sott, M. Markström, M. Davidson, Z. Konkoli, and O. Orwar, “Controlled initiation of enzymatic reactions in micrometer-sized biomimetic compartments,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 109, pp. 1609–1617, 2005.
- [278] J. Hurtig, M. Karlsson, and O. Orwar, “Topographie SU-8 substrates for immobilization of three-dimensional nanotube-vesicle networks,” *Langmuir*, vol. 20, no. 13, pp. 5637–5641, 2004.
- [279] X. F. Zhang, J. Zhang, and L. Liu, “Fluorescence properties of twenty fluorescein derivatives: Lifetime, quantum yield, absorption and emission spectra,” *J. Fluoresc.*, vol. 24, no. 3, pp. 819–826, 2014.
- [280] H. Patel, C. Tscheka, and H. Heerklotz, “Characterizing vesicle leakage by fluorescence lifetime measurements,” *Soft Matter*, vol. 5, no. 15, p. 2849, 2009.
- [281] T. M. Allen and L. G. Cleland, “Serum-induced leakage of liposome contents,” *BBA - Biomembr.*, vol. 597, no. 2, pp. 418–426, 1980.
- [282] B. Maherani, E. Arab-Tehrany, A. Kheiriloom, D. Geny, and M. Linder, “Calcein release behavior from liposomal bilayer; Influence of physicochemical/mechanical/structural properties of lipids,” *Biochimie*, vol. 95, no. 11, pp. 2018–2033, 2013.
- [283] H. T. S. Britton and A. R. Robinson, “CXC VIII - Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal,” *J. Chem. Soc.*, pp. 1456–1462, 1931.
- [284] P. Griess, “Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt ‘Ueber einige Azoverbindungen,’” *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft*, vol. 12, no. 1, pp. 426–428, 1879.
- [285] J. C. Lacal, J. Feramisco, and R. Perona, “Needle Microinjection: A Brief History,” in *Methods and Tools in Biosciences and Medicine - Microinjection*, J. C. Lacal, J. Feramisco, and R. Perona, Eds. 1999, pp. 9–15.
- [286] J. a Lundqvist, F. Sahlin, M. a Aberg, a Strömberg, P. S. Eriksson, and O. Orwar, “Altering the biochemical state of individual cultured cells and organelles with ultramicroelectrodes.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 18, pp. 10356–10360, 1998.
- [287] J. C. Weaver and Y. A. Chizmadzhev, “Theory of electroporation: A review,” *Bioelectrochemistry Bioenerg.*, vol. 41, no. 2, pp. 135–160, 1996.
- [288] R. W. Glaser, S. L. Leikin, L. V. Chernomordik, V. F. Pastushenko, and A. I. Sokirko, “Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 940, no. 2, pp. 275–287, 1988.
- [289] C. Jiang, R. V. Davalos, and J. C. Bischof, “A review of basic to clinical studies of irreversible electroporation therapy,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 62, no. 1, pp. 4–20,

- 2015.
- [290] B. Rubinsky, “Irreversible Electroporation in Medicine,” *Technol. Cancer Res. Treat.*, vol. 6, no. 4, pp. 255–259, 2007.
 - [291] E. Dufourc, “Structure et Dynamique des Lipides,” *Cours Master Chimie - Université de Bordeaux*, 2004. [Online]. Available: http://www.cbmn.u-bordeaux.fr/people/pdf/s_d_des_lipides.pdf.
 - [292] M. Kim, W. G. Chen, J. W. Kang, M. J. Glassman, K. Ribbeck, and B. D. Olsen, “Artificially Engineered Protein Hydrogels Adapted from the Nucleoporin Nsp1 for Selective Biomolecular Transport - Supporting Information,” *Adv. Mater.*, vol. 27, no. 28, pp. 4207–4212, 2015.
 - [293] M. P. Bohrer, W. M. Deen, C. R. Robertson, J. L. Troy, and B. M. Brenner, “Influence of molecular configuration on the passage of macromolecules across the glomerular capillary wall,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 74, no. 5, pp. 583–593, 1979.
 - [294] A. S. Ladokhin, M. E. Selsted, and S. H. White, “Sizing membrane pores in lipid vesicles by leakage of co-encapsulated markers: pore formation by melittin,” *Biophys. J.*, vol. 72, no. 4, pp. 1762–1766, 1997.
 - [295] O. S. Belokoneva, H. Satake, E. L. Mal’tseva, N. P. Pal’mina, E. Villegas, T. Nakajima, and G. Corzo, “Pore formation of phospholipid membranes by the action of two hemolytic arachnid peptides of different size,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1664, no. 2, pp. 182–188, 2004.
 - [296] A. Marchetti, E. Lelong, and P. Cosson, “A measure of endosomal pH by flow cytometry in Dictyostelium,” *BMC Res. Notes*, vol. 2, no. 1, p. 7, 2009.
 - [297] L. Lizana, B. Bauer, and O. Orwar, “Controlling the rates of biochemical reactions and signaling networks by shape and volume changes,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 11, pp. 4099–104, 2008.
 - [298] K. Sott, T. Lobovkina, L. Lizana, M. Tokarz, B. Bauer, Z. Konkoli, and O. Orwar, “Controlling enzymatic reactions by geometry in a biomimetic nanoscale network,” *Nano Lett.*, vol. 6, no. 2, pp. 209–214, 2006.
 - [299] A. Jesorka and O. Orwar, “Liposomes: technologies and analytical applications,” *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto. Calif.)*, vol. 1, pp. 801–832, 2008.
 - [300] M. Karlsson, K. Sott, M. Davidson, A. Cans, P. Linderholm, D. Chiu, and O. Orwar, “Formation of geometrically complex lipid nanotube-vesicle networks of higher-order topologies,” *P. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 99, no. 18, pp. 11573–11578, 2002.
 - [301] A. Karlsson, R. Karlsson, M. Karlsson, A. S. Cans, A. Strömberg, F. Ryttsen, and O. Orwar, “Network of nanotubes and containers,” *Nature*, vol. 409, no. January, pp. 150–152, 2001.
 - [302] M. Karlsson, K. Sott, A. S. Cans, A. Karlsson, R. Karlsson, and O. Orwar, “Micropipet-assisted formation of microscopic networks of unilamellar lipid bilayer nanotubes and

- containers,” *Langmuir*, vol. 17, no. 22, pp. 6754–6758, 2001.
- [303] M. Karlsson, M. Davidson, R. Karlsson, A. Karlsson, J. Bergenholtz, Z. Konkoli, A. Jesorka, T. Lobovkina, J. Hurtig, M. Voinova, and O. Orwar, “Biomimetic Nanoscale Reactors and Networks,” *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 55, no. 1, pp. 613–649, 2004.
- [304] R. M. Servuss, V. Harbich, and W. Helfrich, “Measurement of the curvature-elastic modulus of egg lecithin bilayers,” *BBA - Biomembr.*, vol. 436, no. 4, pp. 900–903, 1976.
- [305] R. E. Waugh, “Surface viscosity measurements from large bilayer vesicle tether formation. I. Analysis,” *Biophys. J.*, vol. 38, no. 1, pp. 19–27, 1982.
- [306] L. Bo and R. E. Waugh, “Determination of bilayer membrane bending stiffness by tether formation from giant, thin-walled vesicles,” *Biophys. J.*, vol. 55, no. 3, pp. 509–517, 1989.
- [307] E. Evans and A. Yeung, “Hidden dynamics in rapid changes of bilayer shape,” *Chem. Phys. Lipids*, vol. 73, no. 1–2, pp. 39–56, 1994.
- [308] R. Karlsson, M. Karlsson, A. Karlsson, A. S. Cans, J. Bergenholtz, B. Åkerman, A. G. Ewing, M. Voinova, and O. Orwar, “Moving-wall-driven flows in nanofluidic systems,” *Langmuir*, vol. 18, no. 11, pp. 4186–4190, 2002.
- [309] L. J. Mellander, M. E. Kurczyk, N. Najafinobar, J. Dunevall, A. G. Ewing, and A.-S. Cans, “Two modes of exocytosis in an artificial cell,” *Sci. Rep.*, vol. 4, no. 3847, pp. 1–7, 2014.
- [310] A.-S. Cans, N. Wittenberg, R. Karlsson, L. Sombers, M. Karlsson, O. Orwar, and A. Ewing, “Artificial cells: Unique insights into exocytosis using liposomes and lipid nanotubes,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 2, pp. 400–404, 2003.
- [311] R. C. Engstrom, S. Ghaffari, and H. Qu, “Fluorescence Imaging of Electrode-Solution Interfacial Processes,” *Anal. Chem.*, vol. 64, no. 21, pp. 2525–2529, 1992.
- [312] W. J. Bowyer, J. Xie, and R. C. Engstrom, “Fluorescence imaging of the heterogeneous reduction of oxygen,” *Anal. Chem.*, vol. 68, no. 13, pp. 2005–9, 1996.
- [313] J. E. Vitt and R. C. Engstrom, “Imaging of Oxygen Evolution and Oxide Formation Using Quinine Fluorescence,” *Anal. Chem.*, vol. 69, no. 6, pp. 1070–1076, 1997.
- [314] S. Cannan, I. Douglas Macklam, and P. R. Unwin, “Three-dimensional imaging of proton gradients at microelectrode surfaces using confocal laser scanning microscopy,” *Electrochem. commun.*, vol. 4, no. 11, pp. 886–892, 2002.
- [315] N. C. Rudd, S. Cannan, E. Bitziou, I. Ciani, A. L. Whitworth, and P. R. Unwin, “Fluorescence confocal laser scanning microscopy as a probe of pH gradients in electrode reactions and surface activity,” *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 19, pp. 6205–6217, 2005.
- [316] P. Audebert and F. Miomandre, “Electrofluorochromism: from molecular systems to set-up and display,” *Chem. Sci.*, vol. 4, p. 575, 2013.
- [317] C. Lei, D. Hu, and E. J. Ackerman, “Single-molecule fluorescence spectroelectrochemistry of cresyl violet,” *Chem. Commun.*, vol. 7345, no. 43, p. 5490, 2008.

- [318] J. R. Casanova-Moreno and D. Bizzotto, “What happens to the thiolates created by reductively desorbing SAMs? An in situ study using fluorescence microscopy and electrochemistry,” *Langmuir*, vol. 29, no. 6, pp. 2065–2074, 2013.
- [319] Z. L. Yu, J. Casanova-Moreno, I. Guryanov, F. Maran, and D. Bizzotto, “Influence of surface structure on single or mixed component self-assembled monolayers via in situ spectroelectrochemical fluorescence imaging of the complete stereographic triangle on a single crystal Au bead electrode,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 137, no. 1, pp. 276–288, 2015.
- [320] F. Miomandre, C. Allain, G. Clavier, J. F. Audibert, R. B. Pansu, P. Audebert, and F. Hartl, “Coupling thin layer electrochemistry with epifluorescence microscopy: An expedient way of investigating electrofluorochromism of organic dyes,” *Electrochem. commun.*, vol. 13, no. 6, pp. 574–577, 2011.
- [321] F. Miomandre, R. Meallet-Renault, J.-J. Vachon, R. B. Pansu, and P. Audebert, “Fluorescence microscopy coupled to electrochemistry: a powerful tool for the controlled electrochemical switch of fluorescent molecules,” *Chem. Commun.*, no. 16, p. 1913, 2008.
- [322] P. Lefrançois, V. S. R. Vajrала, I. B. Arredondo, B. Goudeau, T. Doneux, L. Bouffier, and S. Arbault, “Direct oxidative pathway from amplex red to resorufin revealed by in situ confocal imaging,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 18, no. 37, pp. 25817–25822, 2016.
- [323] A. G. Ryder, S. Power, and T. J. Glynn, “Fluorescence lifetime based pH sensing using Resorufin,” *Proceedings SPIE*, pp. 827–835, 2003.
- [324] S. Khazalpour and D. Nematollahi, “Electrochemical study of Alamar Blue (resazurin) in aqueous solutions and room-temperature ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate at a glassy carbon electrode,” *RSC Adv.*, vol. 4, no. 17, p. 8431, 2014.
- [325] C. Bueno, M. L. Villegas, S. G. Bertolotti, C. M. Previtali, M. G. Neumann, and M. V Encinas, “The excited-state interaction of resazurin and resorufin with amines in aqueous solutions. Photophysics and photochemical reactions,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 76, no. 4, pp. 385–390, 2002.
- [326] G. V Porcal, M. S. Altamirano, C. A. Glusko, S. G. Bertolotti, and C. M. Previtali, “Dyes and Pigments Photophysical properties of the phenoxazin dyes resazurin and resorufin in soybean lecithin microemulsions,” *Dye. Pigment.*, vol. 88, no. 3, pp. 240–246, 2011.
- [327] V. Mishin, J. P. Gray, D. E. Heck, D. L. Laskin, and J. D. Laskin, “Application of the Amplex red/horseradish peroxidase assay to measure hydrogen peroxide generation by recombinant microsomal enzymes,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 48, no. 11, pp. 1485–1491, 2010.
- [328] S. G. Rhee, T.-S. Chang, W. Jeong, and D. Kang, “Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells,” *Mol. Cells*, vol. 29, no. 6, pp. 539–549, 2010.
- [329] B. Kalyanaraman, V. Darley-USmar, K. J. A. Davies, P. A. Dennery, H. J. Forman, M. B. Grisham, G. E. Mann, K. Moore, L. J. Roberts, and H. Ischiropoulos, “Measuring reactive

- oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: Challenges and limitations,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 52, no. 1, pp. 1–6, 2012.
- [330] N. Gajovic-Eichelmann and F. F. Bier, “Novel electrochemical assay for H₂O₂ determination in aqueous solutions: A non time-critical method for H₂O₂ trace level detection,” *Electroanalysis*, vol. 17, pp. 1043–1050, 2005.
- [331] D. Debski, R. Smulik, J. Zielonka, B. Michałowski, M. Jakubowska, K. Debowska, J. Adamus, A. Marcinek, B. Kalyanaraman, and A. Sikora, “Mechanism of oxidative conversion of Amplex® Red to resorufin: Pulse radiolysis and enzymatic studies,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 95, pp. 323–332, 2016.
- [332] D. Olea and C. Faure, “Quantitative study of the encapsulation of glucose oxidase into multilamellar vesicles and its effect on enzyme activity Quantitative study of the encapsulation of glucose oxidase into multilamellar vesicles and its effect on enzyme activity,” *J. Chem. Phys.*, vol. 119, no. 12, pp. 6111–6118, 2003.
- [333] C. Faure, F. Nallet, D. Roux, M. T. Scott, F. Gauffre, D. Olea, and O. Lambert, “Modeling Leakage Kinetics from Multilamellar Vesicles for Membrane Permeability Determination : Application to Glucose,” *Biophys. J.*, vol. 91, pp. 4340–4349, 2006.
- [334] T. Sato, M. Kijima, Y. Shiga, and Y. Yonezawa, “Photochemically Controlled Ion Permeability of Liposomal Membranes Containing Amphiphilic Azobenzene,” *Langmuir*, vol. 7, pp. 2330–2335, 1991.
- [335] H. M. Piwonski, M. Goomanovsky, D. Bensimon, A. Horovitz, and G. Haran, “Allosteric inhibition of individual enzyme molecules trapped in lipid vesicles,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, pp. 1437–1443, 2012.
- [336] R. M. Sánchez-Martín, L. Alexander, and M. Bradley, “Multifunctionalized biocompatible microspheres for sensing,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1130, pp. 207–217, 2008.
- [337] Y. Elani, A. Gee, R. V. Law, and O. Ces, “Engineering multi-compartment vesicle networks,” *Chem. Sci.*, vol. 4, no. 8, p. 3332, 2013.
- [338] B. Fu, F. R. E. Curry, R. H. Adamson, and S. Weinbaum, “A model for interpreting the tracer labeling of interendothelial clefts,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 25, no. 2, pp. 375–397, 1997.
- [339] K. T. Kawagoe, J. a Jankowski, and R. M. Wightman, “Etched carbon-fiber electrodes as amperometric detectors of catecholamine secretion from isolated biological cells,” *Anal. Chem.*, vol. 63, no. 13, pp. 1589–1594, 1991.
- [340] S. Ben-Amor, E. Vanhove, F. Sékli Belaïdi, S. Charlot, D. Colin, M. Rigoulet, A. Devin, N. Sojic, J. Launay, P. Temple-Boyer, and S. Arbault, “Enhanced detection of hydrogen peroxide with platinized microelectrode arrays for analyses of mitochondria activities,” *Electrochim. Acta*, vol. 126, pp. 171–178, 2014.
- [341] “Cayman Chemical - DEA NONOate.” [Online]. Available:

- <https://www.caymanchem.com/product/82100>. [Accessed: 01-Oct-2017].
- [342] C. M. Maragos, D. A. Wink, T. M. Dunams, J. E. Saavedra, L. K. Keefer, D. Morley, A. A. Bove, A. Hoffman, L. Isaac, and J. A. Hrabie, “Complexes of ●NO with Nucleophiles as Agents for the Controlled Biological Release of Nitric Oxide. Vasorelaxant Effects,” *J. Med. Chem.*, vol. 34, no. 11, pp. 3242–3247, 1991.
- [343] A. Ramamurthi and R. S. Lewis, “Measurement and modeling of nitric oxide release rates for nitric oxide donors,” *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 10, no. 4, pp. 408–413, 1997.
- [344] S. Griveau, C. Dumézy, P. Goldner, and F. Bedioui, “Electrochemical analysis of the kinetics of nitric oxide release from two diazeniumdiolates in buffered aqueous solutions,” *Electrochem. commun.*, vol. 9, no. 10, pp. 2551–2556, 2007.
- [345] Sutter Instrument Company, “P-2000 Operation Manual,” 2010.
- [346] Sutter Instrument Company, “Pipette Cookbook.”
- [347] Sutter Instrument Company, “Tip Morphologies,” 2008.
- [348] D. K. Ghosh, C. Wu, E. Pitters, M. Moloney, E. R. Werner, B. Mayer, and D. J. Stuehr, “Characterization of the inducible nitric oxide synthase oxygenase domain identifies a 49 amino acid segment required for subunit dimerization and tetrahydrobiopterin interaction,” *Biochemistry*, vol. 36, no. 35, pp. 10609–10619, 1997.
- [349] M. E. Murphy and E. Noack, “Nitric Oxide Assay Using Hemoglobin Method,” *Methods Enzymol. - Catal. Oxyg. Radic. React.*, vol. 233, no. 24, pp. 240–250, 1994.
- [350] C. Amatore, S. Arbault, Y. Bouret, B. Cauli, M. Guille, A. Rancillac, and J. Rossier, “Nitric oxide release during evoked neuronal activity in cerebellum slices: Detection with platinized carbon-fiber microelectrodes,” *ChemPhysChem*, vol. 7, no. 1, pp. 181–187, 2006.
- [351] Y.-S. Ryu, I.-H. Lee, J.-H. Suh, S. C. Park, S. Oh, L. R. Jordan, N. J. Wittenberg, S.-H. Oh, N. L. Jeon, B. Lee, A. N. Parikh, and S.-D. Lee, “Reconstituting ring-rafts in bud-mimicking topography of model membranes,” *Nat. Commun.*, vol. 5, no. 4507, pp. 1–8, 2014.
- [352] M. Edidin, “Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 4, no. 5, pp. 414–418, 2003.