



HAL
open science

Étude de l'exocytose vésiculaire par détection couplée électrochimie-microscopie de fluorescence

Justine Pandard

► **To cite this version:**

Justine Pandard. Étude de l'exocytose vésiculaire par détection couplée électrochimie-microscopie de fluorescence. Autre. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT : 2020SORUS175 . tel-03331929

HAL Id: tel-03331929

<https://theses.hal.science/tel-03331929>

Submitted on 2 Sep 2021

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.

Sorbonne Université

Ecole Doctorale de Chimie Physique et Analytique de Paris Centre

ED388

UMR 8640 : *Laboratoire P.A.S.T.E.U.R / Groupe « Chimie Physique et Biologie de la Matière Vivante »*

Etude de l'Exocytose Vésiculaire par Détection Couplée Electrochimie - Microscopie de Fluorescence

Par Justine PANDARD

Thèse de doctorat de Physico-Chimie Analytique

Dirigée par Manon GUILLE - COLLIGNON

Présentée et soutenue le 19 Juin 2020

Devant un jury composé de :

Mme Sabine SZUNERITS, Professeur des Universités	Rapporteur
M. Stéphane MARINESCO, Chargé de Recherches CNRS	Rapporteur
M. Emmanuel MAISONHAUTE, Professeur des Universités	Examineur
Mme Manon GUILLE-COLLIGNON, Maître de Conférences	Directrice de Thèse
M. Frédéric LEMAITRE, Maître de Conférences	Co-Encadrant (Invité)

« Je suis de ceux qui pensent que la Science est d'une grande beauté.
Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien, mais il
est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent
comme des contes de fées »

Marie Curie

A ma grand-mère, Nadine

Remerciements

Les travaux de recherche présentés au sein de ce manuscrit ont été réalisés au sein du laboratoire P.A.S.T.E.U.R du département de Chimie de l'École Normale Supérieure. A ce titre, je tiens à remercier chaleureusement Anne Boutin, Rodolphe Vuilleumier et Ludovic Jullien pour m'avoir accueillie au sein de leurs différentes équipes.

Je tiens à remercier Mme Sabine Szunerits et M. Stéphane Marinesco pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et M. Emmanuel Maisonhaute pour avoir accepté de prendre part à l'évaluation de cette thèse. Je les remercie chaleureusement pour leurs retours très enrichissants sur mon manuscrit et mes travaux de recherche.

Je remercie mes encadrants de thèse, Manon Guille-Collignon et Frédéric Lemaître, pour m'avoir permis de mener à bien ces trois années de doctorat sur ce sujet de l'exocytose vésiculaire qui me plaisait tant. Merci également de m'avoir donné l'opportunité de présenter mes travaux de recherche lors de congrès nationaux.

Je tiens à remercier très chaleureusement Laurence Grimaud, tout d'abord pour la synthèse des différents FFNs présentés au sein de ce manuscrit, mais également pour son soutien, sa gentillesse, sa disponibilité, et pour avoir fait de son équipe une grande famille, à laquelle j'ai eu la chance d'appartenir quelque peu durant ces trois années. J'en suis convaincue, cette expérience de thèse n'aurait pas été si enrichissante si je n'avais pas fait partie du bureau E019-E021 pendant presque deux années et demie. Merci pour tout.

Merci également à Maxime Vitale, pour son aide, sa bonne humeur et sa bienveillance lors de ma dernière année de doctorat

Mille mercis à Marie-Aude Plamont, pour toute l'expertise apportée en Biologie, pour ta confiance, ton soutien et pour ton aide précieuse concernant la culture de cellules. Merci pour ces longues discussions dans le laboratoire P2 du LBT ; discussions rythmées de fous rires, chacune sous son PSM : finalement la culture cellulaire avec toi ; ça va beaucoup me manquer !

Un immense Merci à Eric Aït –Yahatène. Merci pour ton enthousiasme, ta rigueur scientifique, ton dynamisme, ton infinie patience et ton humour. Merci de toujours trouver des solutions à nos problèmes expérimentaux; de toujours te dépasser pour que l'on puisse travailler dans des conditions expérimentales exemplaires. Merci de m'avoir aidée à développer un dispositif d'ITO novateur et adapté à notre projet.

Je remercie également chaleureusement Jérôme Delacotte, pour son expertise sur le TIRFM, pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Un grand Merci à Eric Labbé et Olivier Buriez, toujours prêts à répondre à mes questions d'Electrochimie Moléculaire avec beaucoup de bienveillance. Merci pour votre bonne humeur, vos pistes de réflexions et votre expertise scientifique. Et Merci Eric pour ton infinie patience et ton aide précieuse concernant la détermination du nombre d'électrons.

Remerciements

Merci à Thomas le Saux, pour sa disponibilité et son expertise concernant la spectroscopie de Fluorescence. Merci également à Dina Ebene pour son implication et son enthousiasme durant sa période de stage ; ça a été un réel plaisir de t'avoir au laboratoire.

Many thanks to my dearest Lihui. (I will switch in English for you and Nana) for your support, your kindness, the fun we shared together in the old cell culture room and the knowledge you deliver to me about exocytosis. I really appreciate your help and our long discussion about exocytotic process. I will continue in English to tell my gratitude to Na Pan for all the batches of FFNs you synthesize for my project, for your smile, your kindness and all the great moments we shared together.

Merci à Pierre-Adrien, PA, Papaye, M. le directeur : mon voisin de bureau pendant deux années et demie. Merci pour tout ce que tu m'as apporté : tes précieux conseils, ton expertise scientifique, ta pédagogie, ta bienveillance et ton humour. Merci de m'avoir fait rire les jours de moral bien bas, et merci de m'avoir permis de prendre du recul les jours d'expériences peu fructueuses.

Un énorme Merci à Léna, pour ton soutien, ta confiance, pour ces discussions fantasques sur les algues, sur les rouages de la psychologie humaine et pour avoir partagé toute ta créativité, que tu fais rayonner aussi bien dans tes projets de recherche qu'au sein de tes réalisations personnelles.

Merci à Adnan, pour ta bienveillance, ton calme, ton soutien et ta bonne humeur. Merci pour avoir partagé avec moi ton expérience de thèse et également les playlists de Disney le vendredi soir au laboratoire (Tout le monde devrait essayer de tracer des voltammogrammes sur un air de « *Hakuna Matata* » au moins une fois dans sa vie !).

Je tiens à remercier Thomas et Fatma, qui m'ont accueilli dans leur bureau pour toute la phase rédactionnelle de mon doctorat ; merci pour votre bonne humeur, votre gentillesse et pour vos petites attentions au quotidien.

Merci également à Alexander Oleinick, pour ton infinie gentillesse et tes précieux conseils concernant la rédaction de la thèse.

Je tiens également à remercier Christian Amatore, pour sa gentillesse et pour avoir partagé sa passion de l'Electrochimie et sa culture scientifique au travers de discussions très enrichissantes.

Merci à Aurélien, Antoine et Jules de faire rayonner autant de bonne humeur dans ce couloir du rez-de-chaussée du département de Chimie. Un de mes plus grand regret pendant ce doctorat aura sûrement été de ne pas avoir partagé le même laboratoire que vous !

Merci à, Caro, Aude, Amandine, Vincent, Teo, Khaoula, Kiew pour toutes ces discussions et ces bons moments partagés autour d'un café ou d'une partie de tarot. (Mention spéciale a Vincent pour ces longs après-midis passés au TIRFM à s'émerveiller devant les images de fluorescence et Merci à Caro pour son soutien).

Je tiens également à remercier Baptiste, Indira, Luca et Aude pour m'avoir accueillie avec tant de gentillesse et de bienveillance lors de mon arrivée au laboratoire en stage de Master.

Merci à tous les stagiaires que j'ai pu croiser, Laurélia, Annie, Alexandre, Emile, Louis, Vincent, Damien, pour votre dynamisme, votre enthousiasme et votre bonne humeur.

Je tiens également à remercier l'ensemble de l'équipe « *Chimie Physique et Biologie de la Matière Vivante* », pour leur accueil chaleureux et pour leur infinie gentillesse ; je pense notamment à Mary, Luca, Audrey, Alison, Emmanuelle, Isabelle, Arnaud, Zoher, Raja, Agnès, Hela, Fanny...

Je remercie très chaleureusement Anne Hallopé, Delphine Rolland, Nathalie Etienne et Ari Seitsonen pour leur gentillesse et leur aide précieuse concernant les tâches administratives et informatiques.

Enfin, je tiens à remercier l'ensemble du département de Chimie de l'ENS, pour votre bonne humeur et pour cette passion de la science qui vous anime.

Je remercie chaleureusement mes différentes équipes d'enseignement avec qui j'ai eu grand plaisir à travailler durant ces trois années ; je pense notamment à Ludo, Nassera, Maria, Isabelle, Claire, Emmanuel, Laurent, Gabriel et Floricia. Merci à tous les étudiants de Licence que je retrouvais avec plaisir à chaque créneau de TP.

Je tiens également à remercier toutes les personnes extérieures au laboratoire, qui m'ont épaulées et soutenues durant ces trois années de thèse.

Un immense Merci à Marie, Mathilde et Lucas, qui sont toujours derrière moi, quoi que j'entreprenne depuis plus de neuf années maintenant. Merci de toujours m'épauler dans mes projets et de me soutenir avec autant de gentillesse et de bienveillance. Merci à Lucie pour ton expertise, ton soutien et ton aide quel que soit le domaine.

A Alice, Pauline et Gabriel, je tiens à témoigner toute ma reconnaissance pour vos conseils, votre aide précieuse et votre gentillesse.

Une thèse est l'aboutissement d'un cursus d'études rythmé de différentes périodes de stage et à ce titre, je souhaite également remercier tous mes encadrants, qui m'ont toujours encouragée, fait partager leur amour de la Science et poussée à suivre mon souhait d'effectuer un doctorat en Electrochimie.

Merci à Philippe Hapiot, Yann Leroux, Hubert Girault, Stéphane Arbault, Heron Vrabel, Véronique Amstutz, Emmanuel Suraniti, Nicolas Mano et Vasilica Badets.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à Célia Lemmer, pour son soutien sans failles depuis ma première année de classe préparatoire. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir toujours encouragée quel que soit le projet que j'entreprenais.

Enfin, je tiens à remercier ma famille sans qui l'aboutissement de ce doctorat n'aurait pas été possible. Merci à mes parents et ma petite sœur pour m'avoir toujours soutenue et épaulée dans chaque étape de ma vie et dans celle de mes études. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir redonné confiance quand elle venait à me manquer.

Merci à la famille Roland, qui suit mes aventures et péripéties à distance : Merci pour votre soutien. Merci à mes grands-parents maternels et paternels, de m'avoir toujours épaulée et soutenue. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir toujours tirée vers le haut.

A l'écriture de ces remerciements, j'ai une pensée particulière pour ma grand-mère Nadine, à qui je dédie ces travaux de thèse.

Table des matières

<u>Table des matières</u>	9
<u>Liste des abréviations</u>	15
<u>Introduction générale</u>	19
<u>Chapitre I : Présentation de la thématique de Recherche et état de l'Art</u>	25
1) <u>Généralités sur le phénomène d'exocytose vésiculaire</u>	25
1.1) <u>La synapse chimique</u>	26
1.2) <u>Nature des vésicules d'exocytose</u>	27
1.3) <u>Les complexes SNAREs</u>	29
1.4) <u>Les différents modes de fusion</u>	30
2) <u>Techniques analytiques employées pour l'étude du phénomène d'exocytose</u>	32
2.1) <u>La détection électrophysiologique : le patch-clamp</u>	32
2.1.1) <u>Configurations expérimentales</u>	33
2.1.2) <u>Apport du patch-clamp pour l'étude de l'exocytose vésiculaire</u>	34
2.2) <u>La détection électrochimique: ampérométrie sur ultramicroélectrodes</u>	35
2.2.1) <u>Généralités : les ultramicroélectrodes (UMEs)</u>	35
2.2.2) <u>Géométrie des UMEs</u>	36
2.2.3) <u>Propriétés et avantages des ultramicroélectrodes en électrochimie : sensibilité accrue et chute ohmique négligeable</u>	37
2.2.4) <u>Les ultramicroélectrodes pour l'étude de l'exocytose vésiculaire</u>	39
2.2.5) <u>L'ampérométrie sur ultramicroélectrodes</u>	40
2.3) <u>La Microscopie de Fluorescence</u>	44
2.4) <u>La Microscopie de Fluorescence par Réflexion Totale Interne (TIRFM)</u>	45
2.4.1) <u>Principes généraux</u>	45
2.4.2) <u>Configuration expérimentale utilisée au laboratoire</u>	47
3) <u>Les modèles cellulaires utilisés pour le suivi de l'exocytose</u>	49
3.1) <u>Les cellules chromaffines</u>	50
3.2) <u>Les cellules PC12</u>	50
3.3) <u>Les cellules BON</u>	50
4) <u>La méthodologie couplée</u>	53
4.1) <u>La combinaison Patch- clamp - Ampérométrie</u>	53
4.2) <u>La combinaison Patch -Clamp -TIRFM</u>	54
4.3) <u>La détection couplée Ampérométrie-TIRFM</u>	55
4.3.1) <u>Les différentes configurations expérimentales utilisées pour la détection couplée Ampérométrie-TIRFM</u>	55

5) <u>Les sondes optiques utilisées pour l'investigation de l'exocytose vésiculaire</u>	58
5.1) <u>Les marqueurs neuronaux fluorescents</u>	58
5.2) <u>β-bloquant fluorescents</u>	60
5.3) <u>Les adduits fluorescents</u>	61
5.4) <u>Les Faux Neurotransmetteurs Fluorescents (FFNs), des candidats à privilégier pour l'imagerie optique</u>	64
5.4.1) <u>FFNs dont l'émission de fluorescence dépend du pH</u>	66
5.4.2) <u>Bilan</u>	67
5.5) <u>Etude de l'exocytose par détection couplée Electrochimie-Microscopie de Fluorescence : FFN102 au laboratoire</u>	68
5.5.1) <u>Historique</u>	68
5.5.2) <u>Conclusion</u>	70
Chapitre II : Recherche d'une structure moléculaire adaptée pour l'étude de l'exocytose vésiculaire par détection couplée Electrochimie-Microscopie de Fluorescence	73
1) <u>FFN21</u>	74
1.1) <u>Propriétés optiques</u>	74
1.2) <u>Comportement électrochimique</u>	76
1.3) <u>Test d'internalisation vésiculaire</u>	77
1.4) <u>Bilan</u>	77
2) <u>FFN132</u>	77
2.1) <u>Détermination du potentiel d'oxydation de la molécule FFN132</u>	78
2.2) <u>Propriétés optiques de la molécule FFN132</u>	79
2.3) <u>Bilan</u>	79
3) <u>FFN42</u>	80
3.1) <u>Comportement électrochimique</u>	81
3.1.1) <u>Détermination du potentiel d'oxydation sur différents matériaux d'électrode</u>	81
3.1.2) <u>Passivation de la surface de l'électrode</u>	83
3.1.3) <u>Mécanisme d'oxydation du composé FFN42</u>	85
3.1.4) <u>Etude de l'influence du pH de la solution</u>	88
3.1.5) <u>Influence de la vitesse de balayage</u>	92
3.1.6) <u>Bilan</u>	94
3.2) <u>Propriétés optiques de la sonde FFN42</u>	94
3.2.1) <u>Spectres d'absorption UV-vis et d'émission de fluorescence</u>	94
3.2.2) <u>Fluorescence dépendante du pH</u>	96
3.2.3) <u>Détermination du coefficient d'extinction molaire, du rendement quantique et de la brillance</u>	97
3.2.4) <u>Détermination des pKas</u>	100
3.3) <u>Tests d'internalisation vésiculaire</u>	101
3.3.1) <u>Expériences menées sur cellules BON N13</u>	101

3.3.2) <u>Expériences menées sur cellules PC12</u>	103
3.4) <u>Toxicité cellulaire</u>	104
3.5) <u>Bilan</u>	105
4) <u>FFN145</u>	106
4.1) <u>Comportement électrochimique</u>	107
4.2) <u>Propriétés optiques de FFN145</u>	108
4.3) <u>Bilan</u>	108
5) <u>FFN122</u>	109
5.1) <u>Détermination du potentiel d'oxydation</u>	109
5.2) <u>Propriétés optiques</u>	110
5.3) <u>Test d'internalisation vésiculaire</u>	111
5.4) <u>Bilan</u>	112
6) <u>Conclusion</u>	112
<u>Chapitre III: Etude de la libération par exocytose de la sonde FFN42 par Ampérométrie et Microscopie de Fluorescence par Réflexion Totale Interne sur cellules BON N13</u>	117
1) <u>Détection ampérométrique sur fibre de carbone</u>	117
1.1) <u>Stimulation de l'exocytose par une solution d'ionomycine</u>	118
1.2) <u>Stimulation de l'exocytose par une solution de potassium/calcium</u>	124
2) <u>Détection de l'exocytose vésiculaire par microscopie TIRF</u>	124
2.1) <u>Visualisation des vésicules de sécrétion</u>	124
2.2) <u>Observation de la sécrétion cellulaire par microscopie TIRF</u>	126
2.2.1) <u>Le flash « soudain »</u>	127
2.2.2) <u>Le flash « normal »</u>	129
3) <u>Bilan</u>	131
<u>Chapitre IV: Elaboration d'un dispositif d'ITO pour l'étude de l'exocytose par détection couplée Electrochimie-Microscopie de Fluorescence</u>	133
1) <u>L'ITO (Oxyde d'Indium dopé à l'étain)</u>	134
2) <u>Dispositifs précédemment élaborés au laboratoire</u>	135
3) <u>Procédé de fabrication des nouveaux dispositifs d'ITO</u>	137
3.1) <u>La lithographie</u>	137
3.2) <u>L'étape de dépôt par « sputtering »</u>	140
3.2.1) <u>L'ITO</u>	140
3.2.2) <u>Le platine</u>	141
3.2.3) <u>L'électrode de référence Ag/AgCl</u>	141
3.3) <u>Le recuit de l'ITO</u>	142

3.4) <u>La réalisation des contacts électriques et la délimitation de la surface active des électrodes</u>	144
4) <u>Caractérisation du nouveau dispositif</u>	145
4.1) <u>Caractérisation du dépôt d'ITO par AFM</u>	145
4.2) <u>Caractérisation physico-chimique des nouveaux dispositifs</u>	147
4.2.1) <u>Propriétés optiques</u>	147
4.2.2) <u>Propriétés électriques</u>	148
4.3) <u>Etude du bruit électrochimique généré par le laser à 405 nm</u>	149
4.4) <u>Etude de la stabilité des microsystèmes d'ITO</u>	152
4.5) <u>Croissance des cellules sur les nouveaux dispositifs</u>	153
4.6) <u>Expériences de TIRFM</u>	154
5) <u>Conclusion</u>	156
<u>Conclusion générale et perspectives</u>	159
<u>Partie Expérimentale</u>	165
1) <u>Voies de synthèse des différents FFNs</u>	165
1.1) <u>Première voie de synthèse</u>	165
1.1.1) <u>Mécanisme de cyclisation</u>	166
1.2) <u>Seconde voie de synthèse</u>	166
1.2.1) <u>Mécanisme de cyclisation</u>	167
2) <u>Protocoles de synthèse</u>	167
2.1) <u>NP11</u>	167
2.2) <u>NP12</u>	168
2.3) <u>FFN21</u>	168
2.4) <u>5-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-oxopentanoate de méthyle</u>	168
2.5) <u>FFN42</u>	169
2.6) <u>FFN122</u>	169
2.7) <u>FFN132</u>	170
2.8) <u>FFN145</u>	170
3) <u>Préparation des solutions tampons et de stimulation</u>	170
3.1) <u>Solution de PBS</u>	171
3.2) <u>Le tampon Locke x1</u>	171
3.3) <u>Solutions de stimulation</u>	172
3.3.1) <u>Ionomycine</u>	172
3.3.2) <u>K⁺/Ca²⁺</u>	173
3.4) <u>Solution de Collagène IV</u>	174
4) <u>La culture cellulaire</u>	175
4.1) <u>Culture des cellules BON N13</u>	175
4.1.1) <u>Composition du milieu de culture complet</u>	175
4.1.2) <u>L'étape de décongélation</u>	175

4.1.3) <i>La culture de routine</i>	176
4.1.4) <i>L'étape de passage</i>	176
4.1.5) <i>L'étape de congélation</i>	177
4.2) <i>La culture des cellules PC12</i>	177
4.2.1) <i>Composition du milieu de culture complet</i>	177
4.2.2) <i>Décongélation cellulaire</i>	177
4.2.3) <i>La culture de routine</i>	178
4.2.4) <i>Le passage</i>	178
4.3) <i>La préparation des échantillons cellulaires BON N13 et PC12</i>	178
4.3.1) <i>Le prétraitement des boîtes de Petri</i>	178
4.3.2) <i>L'ajout des cellules</i>	179
5) <u>La fabrication des ultramicroélectrodes en fibre de carbone (« Carbon Fiber Electrode » - CFE)</u>	179
5.1) <i>L'isolement de la fibre de carbone</i>	179
5.2) <i>L'électropolymérisation</i>	180
5.3) <i>Le polissage</i>	182
5.4) <i>Alternative à l'utilisation du mercure</i>	182
6) <u>La fabrication des dispositifs d'ITO</u>	183
6.1) <i>Puits de PDMS</i>	184
6.2) <i>Puits réalisés par impression 3D</i>	184
7) <u>Elaboration de l'électrode de référence Ag/AgCl</u>	185
8) <u>Expériences de spectroscopie</u>	185
8.1) <i>Absorption UV-vis</i>	185
8.2) <i>Mesures de fluorescence</i>	186
8.3) <i>Détermination des pKas</i>	186
9) <u>Mesures électrochimiques</u>	186
9.1) <i>Voltammétrie cyclique sur CFE</i>	186
9.2) <i>Détermination du nombre d'électrons</i>	186
10) <u>Expériences sur cellules</u>	187
10.1) <i>Test de toxicité cellulaire</i>	187
10.2) <i>Fabrication des capillaires de stimulation</i>	187
10.3) <i>Expériences de microscopie de fluorescence et de TIRFM</i>	188
10.4) <i>Détection ampérométrique</i>	189
<u>Références Bibliographiques</u>	193
<u>Liste des Figures</u>	211
<u>Liste des Tableaux</u>	220

Liste des abréviations

AFM: « *Atomic Force Microscopy* » (Microscopie à Force Atomique)

Ag/AgCl: Electrode Argent/Chlorure d'Argent

APP⁺: (4-(4-diméthylamino)phényl-1-méthylpyridinium

BDD: « *Boron Doped Diamond* » (Diamant Dopé au Bore)

CFE: « *Carbon Fiber Electrode* » (Electrode en Fibre de Carbone)

CHES: 2- (cyclohexylamino) éthanesulfonique

CNT: « *Carbon Nanotubes* » (Nanotubes de Carbone)

d-HT: 5,7 – dihydroxytryptamine

DLC: N: « *Nitrogen-Doped Diamond Like Carbon* »

DMSO : Diméthylsulfoxyde

ECS: Electrode au Calomel Saturé

EMCCD: « *Electron Multiplying Charge Coupled Device* »

ES: « *Exosensor* »

EtOH : Ethanol

FcMeOH: Ferrocène Méthanol

FBS: « *Fetal Bovine Serum* »

FFN: « *False Fluorescent Neurotransmitter* » (Faux Neurotransmetteur Fluorescent)

GFP: « *Green Fluorescent Protein* » (Protéine Fluorescente Verte)

HS: « *Horse Serum* »

ITO: « *Indium Tin Oxide* » (Oxyde d'Indium Dopé à l'Etain)

NA: « *Numerical Aperture* » (Ouverture Numérique)

NDA: naphthalène-2,3-dicarboxaldéhyde

NS: « *Neurosensor* »

OPA: orthophtalaldéhyde

PALM: « *Photoactivated Localization Microscopy* » (Microscopie par Localisation Photoactivée)

PBS: « *Phosphate Buffer Saline* » (Tampon Phosphate Salin)

PDMS : Polydiméthylsiloxane

PS: *Penicillin Streptomycin*

RDE: « *Rotating Disk Electrode* » (Electrode à Disque Tournant)

SERT: Transporteur de la sérotonine

SNAP: « *Synaptosomal Associated Protein* »

SNARE: « *Soluble N-ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Protein Receptor* »

STED : « *Stimulation–Emission-Depletion* » (Microscopie à Déplétion par Emission Stimulée)

STORM: « *Super Resolution Microscopy* » (Microscopie à Super Résolution)

TIRFM : « *Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy* » (Microscopie de Fluorescence par Réflexion Totale Interne)

UME : Ultramicroélectrode

UV-visible : Ultraviolet-visible

VAMP : « *Vesicle Associated Membrane Protein* »

VMAT : « *Vesicular Monoamine Transporter* » (Transporteur Vésiculaire de Monoamine)

Introduction générale

L'exocytose vésiculaire constitue un mécanisme fondamental impliqué au sein d'une multitude de processus de communication cellulaire tels que la neurotransmission ou la libération d'hormones dans le sang. Son principe repose sur la fusion d'organites cellulaires (également appelés vésicules ou granules de sécrétion), contenant des molécules dites « messagères » (neurotransmetteurs ou hormones), avec la membrane plasmique afin de libérer leur contenu au sein du milieu extracellulaire. En tant que mécanisme régulé au sein de nombreux phénomènes physiologiques, l'exocytose reste confrontée à de nombreux questionnements et constitue toujours à l'heure actuelle un axe d'étude et de recherche de premier ordre pour la communauté scientifique.

D'une part, les quantités de biomolécules actives disséminées au sein du milieu extracellulaire lors d'un événement exocytotique sont limitées à quelques milliers de molécules (de quelques femtomoles à quelques attomoles). D'autre part, ce mécanisme de sécrétion a lieu sur une très brève fraction de temps (allant de quelques à plusieurs centaines de millisecondes). Ces caractéristiques spécifiques nécessitent d'utiliser des techniques analytiques hautement sensibles et appropriées pour l'étude de ce processus. A ce titre, l'Ampérométrie sur ultramicroélectrode, le Patch-clamp ainsi que la Microscopie de Fluorescence par Réflexion Totale Interne (TIRFM) sont couramment employées dans le cadre de l'étude de la sécrétion cellulaire. Cependant, l'utilisation de ces techniques de façon isolée n'est pas suffisante pour étudier le phénomène exocytotique dans son intégralité, chacune d'entre elles possédant des limites intrinsèques ; une résolution spatiale trop faible pour l'ampérométrie et le patch-clamp, l'absence d'informations sur le contenu vésiculaire pour la technique de patch-clamp, et une résolution temporelle insuffisante pour la microscopie TIRF.

Avec pour objectif d'obtenir simultanément des résolutions spatiale et temporelle suffisantes pour l'étude exhaustive de l'exocytose, une détection couplée de ce mécanisme sur cellule unique a été mise en œuvre au sein du laboratoire P.A.S.T.E.U.R à l'ENS en 2011. Elle implique le couplage de l'ampérométrie sur ultramicroélectrode et du TIRFM à

l'aide de l'utilisation d'un matériau transparent et conducteur : l'ITO (Oxyde d'Indium dopé à l'Étain). Elle permet de suivre des événements d'exocytose dans leur intégralité : des déplacements de la vésicule sécrétrice au voisinage de la membrane jusqu'à sa fusion avec la membrane cellulaire et enfin la libération de son contenu au sein du milieu extracellulaire. Il est fondamental de noter que cette détection couplée nécessite la présence (et souvent l'internalisation au préalable) de sondes fluorescente et électroactive exogènes. Ce point soulève la question des structures et de propriétés indispensables de ces sondes.

Ce premier couplage « Ampérométrie–TIRFM » a été réalisé au laboratoire sur cellules BON (Doctorat Anne MEUNIER, 2008-2011) à l'aide de deux sondes indépendantes : la GFP (« *Green Fluorescent Protein* ») en tant que marqueur optique et la sérotonine en tant que sonde électrochimique. En pratique, la détection de l'exocytose vésiculaire par l'intermédiaire de ces sondes indépendantes a été limitée par l'apparition d'événements dits « orphelins » (pics ampérométriques découplés de signaux optiques fluorescents et inversement) liés en partie à l'absence de contrôle de chargement des deux sondes au sein des granules de sécrétion. Ainsi seulement 22% des événements d'exocytose détectés ont pu être obtenus sous forme de signaux couplés. La nécessité d'utiliser une sonde unique, à la fois électroactive et fluorescente s'est alors imposée.

Or il se trouve que depuis une dizaine d'années, des molécules fluorescentes (de type coumarine) appartenant à la famille des « Faux Neurotransmetteurs Fluorescents » (FFNs) ont montré leur faculté à être internalisées par les vésicules cellulaires (grâce à une ramification éthylamine sur leur structure reconnue par un transporteur vésiculaire de monoamine présent sur la membrane vésiculaire). Elles sont notamment utilisées pour l'étude de la neurotransmission ainsi que le marquage des neurones dopaminergiques par microscopie de fluorescence. Certaines d'entre elles, en raison d'un groupement hydroxyle sur leur structure, présentent des propriétés électrochimiques potentielles. Dans ce contexte, FFN102 a pu être identifié comme une sonde duale pour le suivi de l'exocytose et a été validée au laboratoire dans le cadre du couplage Ampérométrie-TIRFM sur microdispositifs d'ITO (Doctorat de Xiaoqing LIU, 2012-2016). Le suivi de l'exocytose grâce à cette sonde internalisée au sein de vésicules de sécrétion a donné lieu à une chute du nombre d'événements orphelins puisque le pourcentage d'événements couplés passe de

22 à 34%. Cependant, la longueur d'onde d'absorption de ce composé ($\lambda=371$ nm) reste assez éloignée de la longueur d'onde du laser utilisé au laboratoire pour les expériences de TIRFM (405 nm), ce qui ne permet pas d'accéder à une fluorescence optimale dans le cadre du suivi optique. De plus, l'oxydation de ce composé FFN102 se produit à des potentiels très anodiques, de l'ordre de 900 mV *vs* Ag/AgCl sur électrode d'ITO. Dans cette gamme de potentiel, la détection couplée est perturbée par les propriétés semi-conductrices de l'ITO générant l'apparition d'un photo-courant relatif à l'exposition du dispositif d'ITO au laser. Ceci entraîne l'apparition d'un saut de courant qui déplace la ligne de base et amplifie le bruit, ce qui défavorise la détection ampérométrique en diminuant le rapport signal sur bruit. Ces inconvénients significatifs limitent donc la portée de l'utilisation de FFN102 pour le couplage Ampérométrie-TIRFM pour l'investigation de l'exocytose. Les résultats obtenus grâce à l'utilisation de la molécule FFN102 montrent toutefois que l'utilisation des FFNs électroactifs comme sonde duale est pertinente, mais qu'il est néanmoins nécessaire d'adapter leur structure aux contraintes analytiques du couplage mis en place au laboratoire.

L'objectif principal de ce projet de doctorat réside dans l'étude de sondes alternatives à FFN102 afin de pallier les inconvénients de ce premier FFN. Les structures considérées conservent la base structurale de FFN102 (notamment la structure coumarine responsable des propriétés optiques et également la ramification éthylamine primaire, essentielle pour le passage du FFN du cytoplasme cellulaire vers les vésicules de sécrétion) en ajoutant à cette dernière des groupements électrodonneurs dans le but de modifier la longueur d'excitation mais aussi et surtout d'abaisser significativement le potentiel d'oxydation du composé vers des valeurs moins anodiques. Le manuscrit suivant, qui expose le développement de ces sondes alternatives, est organisé en quatre chapitres.

Au sein du **Chapitre I**, le rôle de l'exocytose dans les processus de biologie cellulaire est explicité, ainsi que ses particularités et son mode de fonctionnement. Les différentes techniques analytiques couramment utilisées pour le suivi du phénomène exocytotique sont également décrites et leurs avantages et limitations sont discutés. Les différentes méthodes de couplage sont également exposées et une attention particulière est apportée au couplage Ampérométrie-TIRFM. Ce chapitre répertorie également l'état de l'art de la recherche dans le domaine des sondes utilisées pour l'imagerie cellulaire, avec en particulier la famille des

« Faux Neurotransmetteurs Fluorescents » (FFNs) électroactifs, qui, en raison de leurs propriétés structurales, possèdent des caractéristiques intéressantes pour l'étude du phénomène exocytotique par électrochimie et microscopie de fluorescence.

Dans le **Chapitre II**, sont étudiées les cinq molécules développées pour être potentiellement intéressantes durant cette thèse pour l'étude de l'exocytose vésiculaire par détection couplée Ampérométrie-TIRFM. Leurs caractéristiques optiques, électrochimiques ainsi que leur faculté d'internalisation vésiculaire ont été analysées. Une attention particulière a été portée sur la molécule FFN42, qui semble posséder toutes les caractéristiques requises pour l'étude du phénomène exocytotique à l'échelle de la cellule unique.

Le **Chapitre III** est dévolu à l'étude de la libération par exocytose de la molécule FFN42 par ampérométrie sur ultramicroélectrode en fibre de carbone et TIRFM séparément. Les pics ampérométriques ainsi que les signaux optiques obtenus par TIRFM sont étudiés et leurs caractéristiques comparées à celles rapportées dans la littérature et celles obtenues pour les précédentes molécules utilisées au laboratoire pour le suivi exocytotique.

Le **Chapitre IV** est quant à lui consacré à la conception d'un nouveau dispositif d'ITO pour la détection couplée. Le matériau d'ITO est pour la première fois déposé au laboratoire par pulvérisation cathodique sur des lamelles de verre ayant préalablement subi un traitement de lithographie optique permettant d'obtenir le design des électrodes souhaité. Réutilisable, ce dispositif possède des caractéristiques optiques et électrochimiques adaptées à l'étude par détection couplée, et permettra vraisemblablement, grâce à son utilisation de façon conjointe à l'internalisation de la sonde FFN42 au sein de vésicules sécrétrices, de s'affranchir du photo-courant observé pour l'utilisation de FFN102 et préjudiciable pour les expériences couplées.

Chapitre I: Présentation de la thématique de Recherche et état de l'Art

1) Généralités sur le phénomène d'exocytose vésiculaire

L'exocytose vésiculaire constitue le processus par lequel les cellules eucaryotes sécrètent des biomolécules messagères au sein du milieu extracellulaire. Ce mécanisme est à la base de nombreux phénomènes physiologiques tels que la communication intracellulaire dans le système nerveux, la défense immunitaire ou encore la régulation hormonale¹. Ne pouvant directement traverser la membrane cellulaire, les molécules à libérer (hormones, neurotransmetteurs) sont initialement contenues dans des vésicules de sécrétion². Après une stimulation adaptée, ces dernières fusionnent avec la membrane plasmique de la cellule puis déversent leur contenu dans le milieu extracellulaire. En pratique, plusieurs étapes distinctes ont lieu. Dans un premier temps, la vésicule de sécrétion (ou granule) s'arrime à la membrane cellulaire. Cette étape entraîne la formation d'un pore de fusion à travers lequel les molécules commencent à diffuser vers l'extérieur de la cellule³. Selon les cas (type de modèle cellulaire, nature de la stimulation, composition du milieu extracellulaire...), le pore de fusion peut subir une expansion et conduire à une libération plus conséquente.

Chez les cellules eucaryotes, en fonction des différents mécanismes de libération, l'exocytose vésiculaire peut être différenciée en deux catégories. On distingue l'exocytose constitutive déclenchée par un stimulus non externe et l'exocytose régulée induite par des ions (notamment Ca^{2+})⁴. L'exocytose constitutive est un processus constant et continu qui se produit dans tous les types de cellules. Elle décrit une voie de libération non sélective de la cargaison intravésiculaire vers l'extérieur de la cellule, immédiatement après la synthèse intracellulaire. Sa présence est d'une importance primordiale pour le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique et de plusieurs fonctions cellulaires de base. Au contraire, la libération régulée ne se produit « à la demande » que pour certaines cellules sécrétrices spécialisées afin de répondre à des tâches physiologiques spécifiques, telles que la neurotransmission, la respiration, la digestion, la reproduction et la réponse immunitaire⁵. C'est ce processus d'exocytose régulée qui sera étudié et décrit au sein de ce travail et qui correspond par ailleurs à celui majoritairement étudié par la communauté scientifique⁶.

1.1) La synapse chimique

La communication cellulaire est assurée par deux grands systèmes au sein de l'organisme : le système hormonal et le système nerveux. Lors de la transmission hormonale, les glandes endocrines libèrent des hormones dans le sang. Ces dernières sont alors transportées et agissent sur des organes cibles à distance. Lors de la transmission nerveuse, la libération de molécules messagers, les neurotransmetteurs, est localisée au niveau des synapses.

Il existe deux catégories de synapses :

- les synapses électriques : elles sont constituées d'un élément (ou neurone) émetteur et d'un élément récepteur en contact. L'information de nature électrique est alors transmise de manière continue. Ce type de synapses constitue un mode de communication minoritaire par rapport aux synapses chimiques.
- les synapses chimiques : elles sont également constituées d'un élément émetteur (appelé terminaison pré-synaptique) et d'un élément récepteur (la terminaison post-synaptique) mais les deux extrémités de ces éléments sont séparées de quelques dizaines de nanomètres par un espace appelé : fente synaptique.

Un neurone est constitué d'un corps cellulaire et de deux types de prolongements : les axones et les dendrites (**Figure I.1**). Au niveau de sa terminaison, l'axone contient des vésicules synaptiques contenant des neurotransmetteurs. Lors du processus de neurotransmission, l'influx nerveux atteint la terminaison pré-synaptique du premier neurone et déclenche la libération de neurotransmetteurs qui servent de relais en traversant la fente synaptique. En se liant aux récepteurs post-synaptiques du neurone récepteur, les biomolécules libérées activent ces récepteurs et transmettent le message qui est à nouveau codé sous forme de signal électrique le long de l'axone. L'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire est responsable de la fusion vésiculaire avec la membrane cellulaire de la terminaison pré-synaptique. L'information est donc transmise grâce à la libération de quelques milliers à quelques millions de molécules (au maximum) dans la fente synaptique dans un délai temporel très court, qui varie en fonction du modèle cellulaire, mais sur une durée inférieure à la milliseconde.

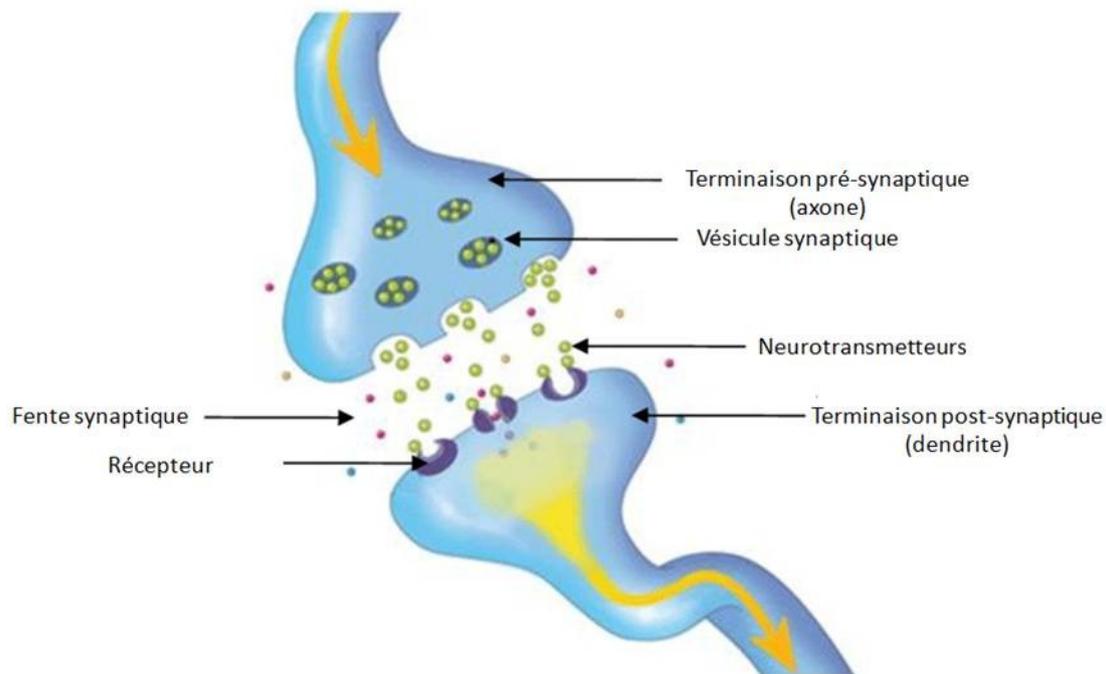


Figure I.1 : La synapse chimique

(Image adaptée de <https://lecorpshumain.fr/categories/fonctionnement-du-corps/la-transmission-de-linflux-nerveux>)

La fiabilité de la communication cellulaire repose sur une reconnaissance de l'information chimique avec un rapport signal sur bruit élevé. En effet, même si la quantité de molécules libérées est très faible (de quelques femtomoles à quelques attomoles), ces espèces sont émises dans un volume très restreint (quelques picolitres). Cet effet de confinement correspond alors à des concentrations locales dont les variations sont suffisamment importantes pour permettre la détection/reconnaissance du signal par le récepteur.

1.2) Nature des vésicules d'exocytose

Lors du processus d'exocytose, les messagers biochimiques sont initialement internalisés par des vésicules sécrétrices situées dans le cytoplasme de la cellule émettrice. Il est nécessaire à ce stade de distinguer deux types de vésicules en fonction des modèles cellulaires étudiés : ceux contenant un milieu fluide comme dans les neurones (les vésicules synaptiques, $r \sim 20 \text{ nm}$)⁷ et ceux dits « *dense core* » dans les cellules chromaffines ($r \sim 150 \text{ nm}$)⁵ par exemple. Les vésicules « *dense core* » sont ainsi nommées car elles contiennent une

matrice qui apparaît dense aux électrons. Cette matrice extrêmement compacte est constituée d'un polymère anionique de nature protéique : la chromogranine. Ce polymère permet, dans les conditions acides intravésiculaires ($\text{pH} \sim 5,5$), de stocker une concentration importante en neurotransmetteurs ($\sim 0,5 \text{ mol L}^{-1}$)⁸ par le biais d'interactions attractives avec le polymère^{5,9,10}. En effet, la structure des neurotransmetteurs les plus courants (**Figure I.2**) présente une fonction amine dont le pK_a (~ 9) impose son existence sous la forme d'un cation ammonium qui facilite les interactions électrostatiques avec les terminaisons carboxylates du polymère. La présence de groupements hydroxyles ($-\text{OH}$) facilite également la formation de liaisons hydrogènes.

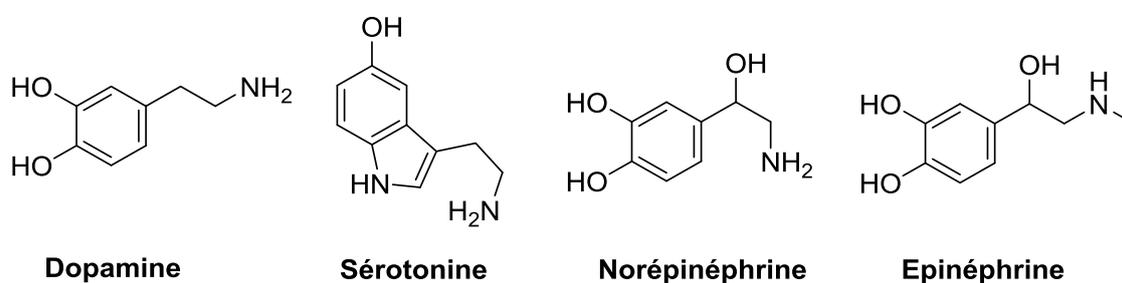


Figure I.2 : Structures moléculaires de différents neurotransmetteurs endogènes

A l'aide d'une stimulation physiologique appropriée (telle qu'une entrée de Ca^{2+} ou l'augmentation de sa concentration cytoplasmique), la vésicule disponible est transportée à travers le cytoplasme vers la membrane cellulaire via le cytosquelette et le réseau actinique. Une fois la vésicule proche de la membrane plasmique, un nouveau processus est mis en place afin de permettre à la membrane cellulaire et à la membrane vésiculaire d'entrer en contact et de fusionner. Les deux membranes sont constituées d'une double couche lipidique chargée négativement au niveau des têtes polaires des phospholipides qui les constituent. Ces membranes vésiculaire et plasmique ont donc tendance à se repousser via une interaction électrostatique répulsive. L'intervention des complexes « SNAREs »^{11,12} (pour « *Soluble N-ethylmaleimide Sensitive Factor Attachment Protein Receptor* ») va donc permettre aux deux membranes de fusionner (**Figure I.3**, étape 1.). Un pore de fusion nanométrique entre ces deux membranes est ensuite formé (**Figure I.3**, étape 2.). Durant cette étape, les échanges de messagers/neurotransmetteurs cationiques de la matrice avec de petits cations monovalents (Na^+ , H_3O^+) du milieu extracellulaire, conduisent à un gonflement de la

matrice polyélectrolytique à cause de la déstructuration locale des interactions attractives neurotransmetteurs-polymère (**Figure I.3**, étape 3).¹³

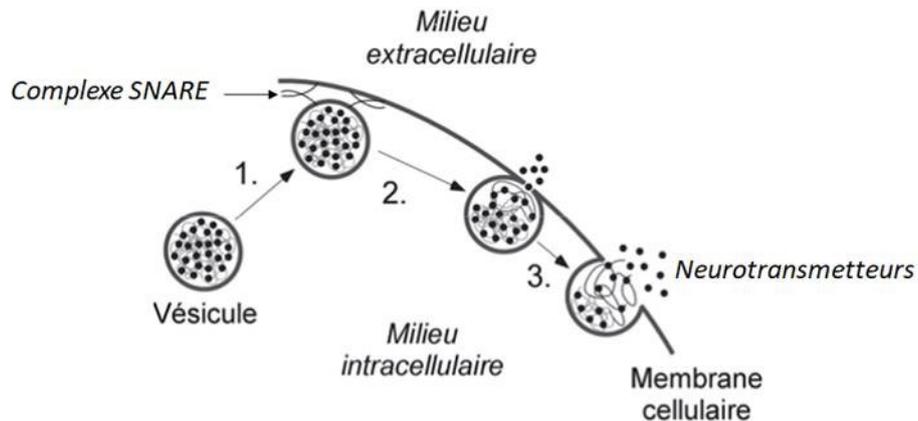


Figure I.3 : Schématisation du processus d'exocytose vésiculaire¹⁴

1.3) Les complexes SNAREs

Avant leur fusion avec la membrane cellulaire, les vésicules sécrétrices doivent d'abord être ancrées à cette dernière à travers un assemblage protéique appelé SNAREs^{15,16}, mentionné précédemment. Parmi ces protéines, on distingue deux catégories, les v-SNAREs (v pour « *vesicle* »), qui s'incorporent aux membranes vésiculaires pendant le bourgeonnement de ces dernières et les t-SNAREs (t pour « *target* »), qui elles sont localisées dans la membrane plasmique cellulaire. Les SNAREs les mieux caractérisées interviennent dans l'amorçage des vésicules synaptiques à la membrane pré-synaptique lors de la libération des neurotransmetteurs¹⁷. Dans ce cas, la membrane plasmique de la cellule nerveuse contient deux t-SNAREs : la syntaxine et SNAP 25 (« *Synaptosomal Associated Protein* ») alors que la membrane vésiculaire ne contient qu'un seul v-SNARE, la synaptobrevine (ou VAMP « *Vesicle Associated Membrane Protein* ») (**Figure I.4**).

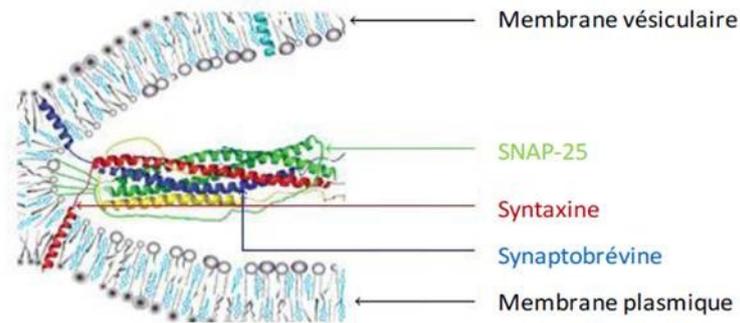


Figure I.4 : Complexe SNARE (image adaptée de ¹⁸)

Lorsqu'une vésicule de sécrétion s'approche de la membrane cellulaire, ces trois protéines interagissent les unes avec les autres pour former un complexe SNARE composé de quatre motifs hélicoïdaux en spirale au niveau de la zone de fusion membranaire. Le resserrement progressif du complexe génère alors de l'énergie grâce aux interactions protéines-lipides et protéines-protéines. Cette énergie permet de s'affranchir du problème naturel de répulsions électrostatiques entre la membrane plasmique et les membranes vésiculaires; cette énergie agit comme une force motrice pour amener les deux membranes à se rapprocher le plus possible, entraînant par la suite leur fusion¹⁹ et la création d'un pore de fusion.

1.4) Les différents modes de fusion

Si les premières étapes du mécanisme sont bien identifiées, le devenir de la vésicule une fois le pore de fusion formé, et plus encore les facteurs qui le régulent, font encore débat à l'heure actuelle²⁰⁻²².

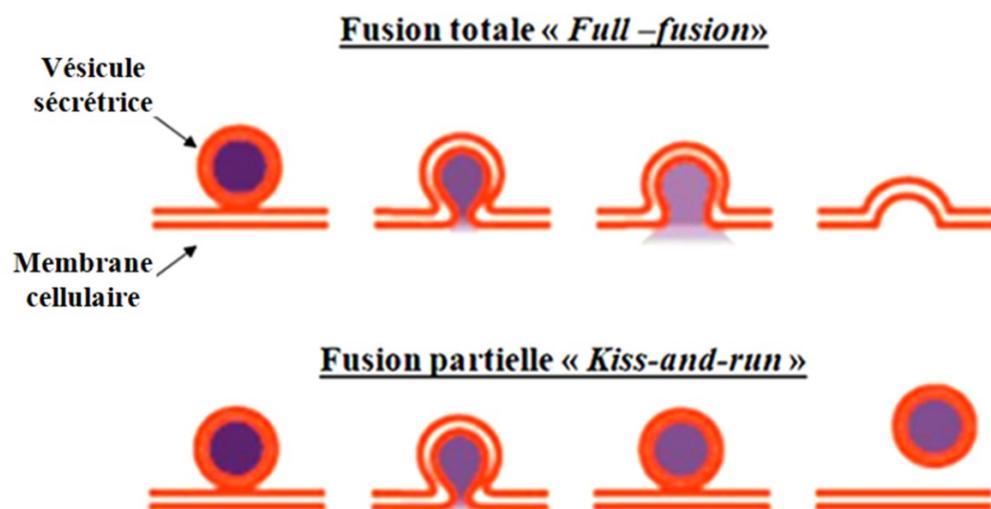


Figure I.5 : Deux catégories de fusion membranaire (image adaptée de²³)

Deux visions principales du mode de fusion s'appuient sur le stade d'évolution du pore formé lors de la fusion membranaire. Dans un premier cas, la fusion évolue vers une ouverture totale du fait du gonflement du gel matriciel qui fait exploser le pore. Ce mode dit de « *Full fusion* »²⁴ induit la fusion complète de la membrane vésiculaire avec la membrane cellulaire après libération du contenu vésiculaire (Figure I.5). Dans un second cas, des processus dynamiques ou des contrôles protéiques peuvent provoquer sa refermeture et un mode de fusion dit « *Kiss and run* »^{25,26}. Contrairement à la fusion totale, lors du phénomène de « *Kiss-and-run* », la vésicule fusionne mais celle-ci s'arrête au stade d'ouverture du pore, puis ce dernier se referme, empêchant une intégration complète à la membrane cellulaire, conservant une partie des composants intravésiculaires. Dans les modèles neuronaux au contenu intravésiculaire fluide, ceci permet une diffusion rapide des espèces, le contenu en concentration étant bien plus faible que pour les « *dense core* ». Entre ces deux modes, on peut distinguer d'autres mécanismes intermédiaires qui recouvrent une échelle de « fusion partielle », soit avec des sous-catégories du « *Kiss-and-run* » (« *Kiss-and-stay* » ou « *Kiss-and-hold* »²⁷ pendant lequel le pore de fusion reste stable plus longtemps avant de finir par se refermer²⁸) soit avec un blocage de l'angle d'ouverture de la vésicule après explosion du pore mais avant la stade de l'ouverture totale²⁹. La question sous-jacente est alors de savoir si, indépendamment ou non du degré d'ouverture et de la fusion de la

membrane vésiculaire dans la membrane cellulaire, le contenu vésiculaire est totalement libéré ou non à ce stade « bloqué »^{23,30-32}.

Les questions mécanistiques de l'exocytose (stabilité du pore de fusion, refermeture de la vésicule en cours d'expansion...) et de ses possibles facteurs de régulation (SNAREs, température, pH, courbure de membrane, nature du sécrétagogue¹ ou encore la composition ionique extracellulaire) soulèvent le problème méthodologique de son étude. Il existe en effet un autre enjeu tout au moins aussi important et lié à la mise en place de techniques d'analyse qui soient à même d'étudier ce processus biologique. Ces techniques doivent respecter certaines contraintes en relation avec l'échelle de temps des événements exocytotiques (qui est de quelques ms pour les vésicules neuronales et de l'ordre de 100 ms pour les vésicules « *dense-core* »³³), la dimension des vésicules de sécrétion (dont le rayon est en général également inférieur à 150 nm pour la plupart des modèles⁵) ainsi que la nécessité de **travailler sur cellule unique en temps réel**.

2) Techniques analytiques employées pour l'étude du phénomène d'exocytose

Au cours des dernières décennies, le développement de méthodes analytiques pour l'analyse de l'exocytose vésiculaire a principalement reposé sur deux grandes familles de techniques, à savoir les techniques électriques³⁴ et optiques³⁵. Dans cette section, nous allons nous focaliser sur la description et la comparaison de trois méthodes analytiques. Tout d'abord, les techniques dites « électriques », comprenant le « *patch-clamp* » et l'ampérométrie sur ultramicroélectrodes seront décrites, puis, pour ce qui est de l'optique, la Microscopie de Fluorescence par Réflexion Totale Interne (« *Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy* » : TIRFM) sera présentée.

2.1) La détection électrophysiologique : le patch-clamp

La technique du « patch-clamp » a été introduite par Erwin NEHER et Bert SAKMANN en 1976 (détenteurs du prix Nobel de médecine de 1991) pour l'étude électrophysiologique des canaux ioniques³⁶. Son principe consiste à isoler électriquement un morceau de

¹ Substance de nature chimique et/ou biologique déclenchant ou augmentant la sécrétion cellulaire

membrane cellulaire ("*patch*") et à lui imposer une différence de potentiel ("*clamp*") afin de mesurer le courant généré par les flux d'ions. Cette méthode analytique appartient aux méthodes impédimétriques et permet de comprendre comment les canaux ioniques modifient le potentiel transmembranaire et par extension, de quelle façon ces derniers entrent en jeu concernant certaines activités cellulaires telles que l'exocytose vésiculaire. Toutefois, la technique du « patch-clamp » peut donner lieu à une autre analyse de l'exocytose vésiculaire en partant du principe que chaque événement exocytotique augmente la surface cellulaire³⁷. Dans ce contexte, la membrane cellulaire se comporte comme un condensateur dont la capacité est proportionnelle à la surface cellulaire. L'insertion de la membrane vésiculaire à la membrane cellulaire pendant l'exocytose entraîne en théorie une augmentation de la capacité de la membrane; à l'inverse, l'endocytose³⁷ (processus par lequel les cellules internalisent au sein de leur cytoplasme diverses substances présentes dans le milieu environnant) entraîne une diminution de la capacité membranaire. En pratique, cette capacité est déterminée par l'analyse du courant recueilli et la mise en place d'un schéma électrique équivalent. Dans ce cadre, il est également possible d'accéder à la conductance du pore de fusion^{38,39}.

2.1.1) Configurations expérimentales

La mise en place expérimentale du patch-clamp demeure assez délicate. En pratique, une micropipette de verre d'un diamètre de l'ordre de quelques micromètres est placée en contact avec la membrane cellulaire. Le capillaire de verre est ensuite scellé à la membrane en imposant une dépression au sein de ce dernier. La résistance de la jonction « cellule/pipette » augmente alors jusqu'au gigaohm (« *gigaseal* ») et isole électriquement le fragment de la membrane contenu dans la pipette. Cette configuration, appelée cellule attachée permet l'enregistrement de l'activité de seulement quelques canaux ioniques contenus dans la partie de membrane isolée et attachée à la micropipette de verre. La mesure de courant après application de la différence de potentiel entre une électrode à l'intérieur de la pipette et une électrode dans le milieu extracellulaire permet de déduire la conductance des canaux membranaires, ainsi que leur sélectivité ionique. Par extension, il est ainsi possible d'accéder aux variations de « capacitance » de la membrane cellulaire. Il existe à ce jour quatre configurations pour les mesures de patch-clamp (**Figure I.6**).

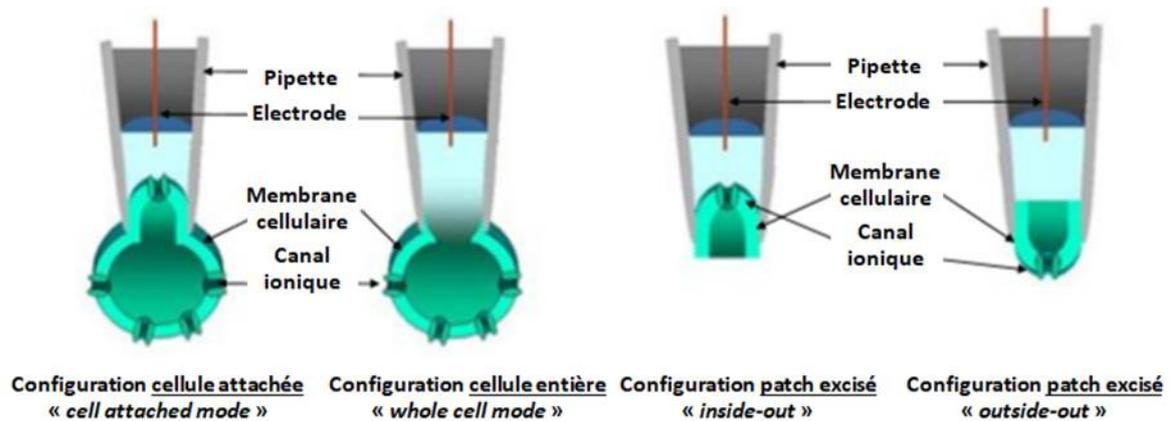


Figure I.6 : Les différentes configurations de patch-clamp (image adaptée de <http://research.nki.nl/jalinklab/Homepage%20Phys&ImgGrp%20Patchclamp.htm>)

La configuration cellule entière est une configuration dérivée du mode cellule attachée. Une fois le « *giga-seal* » obtenu, une aspiration plus forte est appliquée pour ouvrir la membrane cellulaire et assurer le contact entre la totalité de la cellule et la pipette. Cette méthode est généralement utilisée pour accéder aux informations électriques de la totalité de la cellule.

La configuration patch excisé s'obtient en séparant la cellule de la pipette, soit à partir de la configuration cellule attachée, soit à partir de la configuration cellule entière. Dans le premier cas, le morceau de membrane reste fixé à la pipette et sa face intracellulaire est dirigée vers l'extérieur. Cette configuration est appelée « *inside-out* ». Dans le second cas, la configuration « *outside-out* » est obtenue de la configuration cellule entière en éloignant la pipette du patch de membrane. Ceci provoque l'incision de la membrane qui, en se rabattant, referme l'orifice de la pipette en orientant sa face extracellulaire vers l'extérieur. Avec ces deux dernières configurations, l'expérimentateur a accès au fonctionnement des canaux membranaires depuis le cytoplasme ou le milieu cellulaire, mais sur un simple morceau de membrane, ce qui réduit le rapport signal/bruit.

2.1.2) Apport du patch-clamp pour l'étude de l'exocytose vésiculaire

Le patch-clamp a pu apporter de nombreux renseignements concernant la sécrétion cellulaire, en particulier sur le rôle du calcium dans la régulation de la fusion⁶. De plus, les mesures d'impédance réalisées à partir d'échantillons membranaires peuvent être utilisées afin de suivre la formation et l'expansion du pore de fusion membranaire³⁷. Couplée à

l'ampérométrie (couplage analytique qui sera décrit en partie 4.2 de ce chapitre), cette technique a également permis la mise en évidence du pore de fusion, l'observation de sa dynamique et la détermination de sa taille⁴⁰ (quelques nanomètres). De plus, même si cela est hors du champ de ce travail, le suivi de la capacité est également adapté à l'étude de l'endocytose^{37,41}.

Bien que les mesures par patch-clamp permettent de déduire les changements de capacité correspondant à l'ensemble des événements se produisant sur la surface totale de la cellule, les principales limitations de cette méthodologie sont liées à l'absence d'informations concernant le contenu vésiculaire libéré et sur la localisation des événements exocytotiques. Par ailleurs, il ne s'agit pas d'une technique analytique dite « directe », puisqu'elle nécessite un traitement du signal brut obtenu lors de l'analyse. Or ce traitement de données est basé sur une représentation simple d'un circuit électrique équivalent et ne peut donc être appliqué qu'à des modèles cellulaires présentant un seul compartiment membranaire (telles que les cellules endocrines ou chromaffines⁴²). Enfin, cette technique ne permet pas de toujours différencier nettement les modifications de capacitance dues à l'exocytose ou à l'endocytose si les deux phénomènes se produisent simultanément³⁷.

Ainsi, au-delà du stress mécanique que cette technique impose à la cellule, le patch-clamp ne permet pas d'étudier un événement dans sa globalité, d'où la nécessité de le coupler, à une seconde technique analytique (à l'ampérométrie ou à la microscopie de fluorescence, comme nous l'étudierons au sein de la partie 4.2 de ce chapitre).

2.2) La détection électrochimique: ampérométrie sur ultramicroélectrodes

2.2.1) Généralités : les ultramicroélectrodes (UMEs)

Les ultramicroélectrodes (UMEs) peuvent être définies comme des électrodes dont au moins une dimension se situe dans la gamme des micromètres⁴³. L'un des principaux avantages des ultramicroélectrodes est, dans les conditions électroanalytiques usuelles, d'obtenir un régime de diffusion stationnaire de façon très rapide (de l'ordre de la milliseconde) sans qu'il soit nécessaire de travailler en régime de convection forcée⁴⁴. Ce phénomène intervient lorsque la diffusion radiale ne peut plus être négligée devant la diffusion plane. On obtient alors un régime de diffusion sphérique (ou hémisphérique en fonction de la géométrie de l'électrode) et convergent (**Figure I.7**).

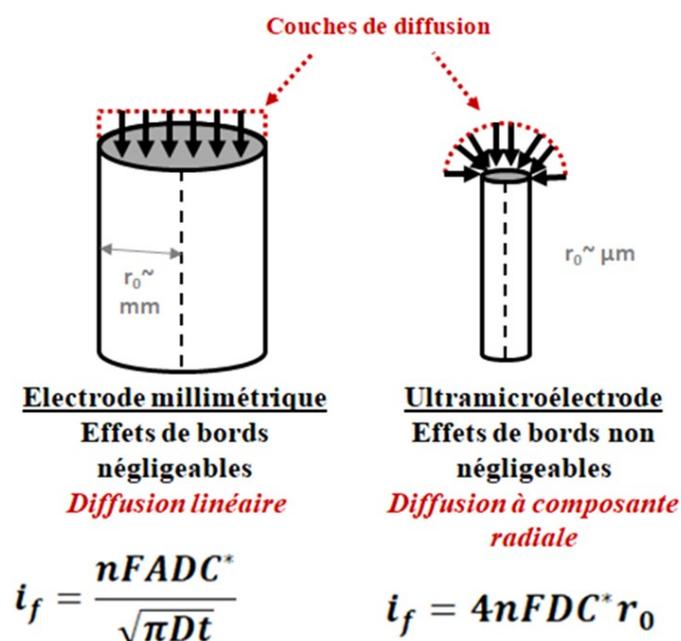


Figure I.7 : Régimes de diffusion pour une électrode millimétrique et une ultramicroélectrode

L'épaisseur de la couche de diffusion (zone au voisinage de l'électrode où a lieu la diffusion des espèces électroactives) est alors constante et de l'ordre de la dimension de l'électrode.

2.2.2) Géométrie des UMEs

Il existe à ce jour de nombreuses configurations géométriques pour les ultramicroélectrodes. Les plus communément rencontrées sont les UMEs à disque, cylindrique ou de type réseau ou bande (**Figure I.8**)⁴⁵. Le temps de réponse (durée nécessaire à l'électrode pour mesurer une variation de courant faradique en solution) reste faible, de l'ordre de la milliseconde⁴⁴. L'utilisation de ces différentes géométries tient souvent à la facilité de leur fabrication. Puisqu'il s'agit de la géométrie la plus courante pour la détection de l'exocytose, nous allons décrire avec un peu plus de détails les propriétés des UMEs de type disque.

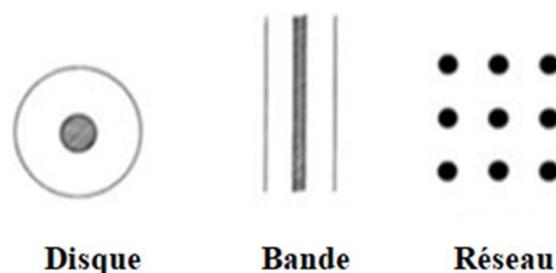


Figure I.8 : Exemple de différentes géométries d'UMEs (image adaptée de⁴³)

2.2.3) Propriétés et avantages des ultramicroélectrodes en électrochimie : sensibilité accrue et chute ohmique négligeable

Lorsqu'un transfert de charge a lieu à l'interface « électrode/solution », les substances électroactives présentes en solution au voisinage de l'électrode sont rapidement appauvries, générant un gradient de concentration entre l'interface et le cœur de la solution. Ceci provoque un transport de masse régi par la diffusion (la présence d'un électrolyte support en solution permet de négliger les phénomènes de migration). En ce qui concerne les électrodes millimétriques, le transport de masse est dominé par la diffusion linéaire à la surface de l'électrode et l'épaisseur de la couche de diffusion micrométrique reste plus faible que la dimension de l'électrode⁴⁶.

Lorsque la taille de l'électrode devient de l'ordre d'une dizaine de micromètres, c'est-à-dire comparable à l'épaisseur de la couche de diffusion, la diffusion linéaire s'additionne à une composante radiale jusque-là négligée. La diffusion devient alors sphérique pour des temps « longs » ($t > (r_0)^2 / D \sim \text{ms}$, où r_0 est le rayon de l'électrode disque et D le coefficient de diffusion de l'espèce électroactive en solution)⁴⁷.

Ce régime convergent correspond à un régime stationnaire avec une couche de diffusion constante (quelques r_0). Dans le cas d'une expérience de chronoampérométrie (le potentiel de travail E est constant et suffisant pour réaliser le transfert électronique avec un régime de diffusion limitant), le courant faradique est donc stationnaire et de la forme $i_f = 4nFDC^*r_0$ (F = constante de Faraday ; C^* = concentration en espèces électroactives au sein de la solution)⁴⁸. Le courant ainsi obtenu avec une UME est directement proportionnel à la concentration en espèces électroactives et ne subit aucune distorsion

temporelle comme c'est le cas avec l'utilisation d'une électrode millimétrique (équation de Cottrell : $i_f = \frac{nFADC^*}{\sqrt{\pi Dt}}$, Figure I.7).

En comparaison des électrodes millimétriques, les UMEs présentent d'autres avantages en électroanalyse, notamment pour ce qui est de la chute ohmique, du temps de réponse court (de l'ordre de la milliseconde) et de la sensibilité^{43,49}. Ainsi, le potentiel de l'électrode de travail est contrôlé à la chute ohmique « $R \cdot i_f$ » près (avec R = résistance résiduelle de l'électrolyte et i_f : courant faradique relatif à la réaction électrochimique en solution). Ce problème majeur est partiellement résolu en électrochimie par l'utilisation d'un montage à trois électrodes (travail/auxiliaire/référence) et l'ajout en solution d'un électrolyte support indifférent. Il reste toutefois une résistance résiduelle dite « non compensée » qui est proportionnelle à $1/r_0$. Pour une électrode millimétrique, la dépendance du courant faradique en r_0^2 (loi de Cottrell) montre que la chute ohmique dépend également de r_0 . Lorsque l'électrode employée est une UME, la chute ohmique ne dépend plus de r_0 ($i_f \propto r_0$). La chute ohmique diminue avec la dimension pour les électrodes millimétriques et devient constante et minimale avec une électrode micrométrique si on laisse le temps au régime stationnaire de s'établir. Par ailleurs, lorsque la taille d'une électrode est micrométrique ou inférieure, le rapport signal sur bruit est amélioré. Le « bruit » capacitif (résultant de la formation de la double couche électrochimique) correspond à un courant parasite qui, en voltammétrie cyclique, dépend de la taille de l'électrode (c.-à-d. à $(r_0)^2$), tandis que le signal faradique est un courant proportionnel au rayon de l'électrode r_0 . Le rapport signal/bruit dépend donc de $1/r_0$ dans ce cas. En chronoampérométrie, le même phénomène génère un courant capacitif dont la constante de temps RC est directement proportionnelle à r_0 . Travailler avec une électrode de faible dimension permet donc de rapidement pouvoir s'affranchir de la composante capacitive et à nouveau de favoriser le rapport signal/bruit. Si on ajoute à ces propriétés analytiques intrinsèques le fait que les cellules vivantes sont globalement de dimension micrométrique, on en déduit que les UMEs représentent un outil tout à fait approprié pour des mesures fines et en temps réel d'espèces d'intérêt biologique à l'échelle unicellulaire.

2.2.4) Les ultramicroélectrodes pour l'étude de l'exocytose vésiculaire

En raison de la petite taille des vésicules de sécrétion cellulaire ainsi que de la quantité relativement faible de molécules libérées lors d'un événement exocytotique, les techniques analytiques d'investigation directes de la libération par exocytose doivent respecter certaines caractéristiques analytiques : un bon rapport « signal/bruit » (ce qui est le cas pour les UMEs comme cela a été explicité dans la partie 2.2.3) ainsi qu'une résolution temporelle élevée. C'est pourquoi les méthodes électrochimiques basées sur l'utilisation d'ultramicroélectrodes sont devenues des techniques courantes pour l'étude de la sécrétion par l'exocytose vésiculaire⁴⁸. L'étude d'une cellule vivante constitue un phénomène dynamique, c'est-à-dire que les quantités libérées dans son environnement varient au cours du temps. Ceci pose la question de l'utilisation de la technique analytique adaptée. La voltammétrie cyclique est une technique électrochimique qui consiste à faire varier le potentiel de l'électrode de travail et de mesurer le courant électrique généré. Il s'agit de la technique la plus performante puisqu'elle associe l'identification de la substance détectée (morphologie du voltammogramme) à la concentration d'espèces détectée (intensité des pics). Elle est paradoxalement peu employée car elle nécessite pour détecter un événement de 100 ms, d'acquérir plusieurs voltammogrammes à haute vitesse de balayage (FSCV = « *Fast Scan Cyclic Voltametry* » – 400 V.s⁻¹) ce qui présente de nombreuses difficultés en matière de traitement du signal^{50,51}. Inversement, la chronoampérométrie (imposition du potentiel de travail **E** qui correspond dans ce cas à une constante supérieure à **E°**(Ox/Red) pour détecter l'oxydation de Red) est moins sélective, mais plus simple à mettre en œuvre expérimentalement. Si l'électrode est micrométrique, le courant faradique recueilli reflète uniquement d'éventuelles variations de la concentration en espèces émises au cours du temps.

Il est à noter que les UMEs présentent un avantage pratique indirect lié à la chute ohmique (partie 2.2.3). Cette dernière est en effet diminuée par rapport à une électrode millimétrique classique. Sachant que les courants impliquant une UME sont faibles (de l'ordre de quelques picoampères au nanoampères), on peut donc s'affranchir de l'électrode auxiliaire tout en conservant une chute ohmique acceptable et sans dérive du potentiel si l'électrode de référence est stable. Cette particularité facilite grandement la manipulation sur cellules en

laissant davantage d'espace pour placer le capillaire de stimulation ou encore l'électrode de référence.

La plupart des analyses électrochimiques répertoriées dans ce manuscrit ont été réalisées sur ultramicroélectrodes en fibre de carbone. Nous verrons plus tard que d'autres matériaux peuvent être utilisés comme notamment l'ITO (oxyde d'indium dopé à l'étain)^{52,53}.

2.2.5) L'ampérométrie sur ultramicroélectrodes

Dans le cadre de l'étude du mécanisme d'exocytose, l'utilisation de la chronoampérométrie permet de détecter la libération des neurotransmetteurs par une cellule isolée via leur oxydation à la surface de l'électrode.

Dans ce contexte, il faut rappeler que la quantité et le flux de neurotransmetteurs libérés lors de ce mécanisme sont faibles (quelques milliers de molécules par ms, soit donc des grandeurs de l'ordre de la femtomole à l'attomole), ce qui met en évidence deux impératifs analytiques majeurs. Premièrement, il est nécessaire que le signal électrique soit suffisamment intense pour permettre sa détection. Deuxièmement, les molécules libérées doivent pouvoir diffuser au capteur sans perte, en d'autres termes, il est nécessaire que le taux de collecte par l'électrode soit quantitatif. Ces conditions sont remplies si la distance « électrode/cellule » est égale ou inférieure au rayon de l'électrode⁵⁴. Dans ce cas, la couche de diffusion de l'UME interfère avec la zone de libération, ce qui conduit à une efficacité de collecte du signal proche de 100 %. Parallèlement, les faibles quantités de matières libérées durant un évènement exocytotique sont émises dans un volume limité (picolitre au femtolitre), générant alors des concentrations (ou variations de concentrations) suffisantes (de l'ordre du millimolaire) pour conduire à un courant détectable (5-200 pA) sur un potentiostat bas courant. On remarquera que la configuration utilisée (**Figure I.9**) s'inspire de celle de la synapse chimique.

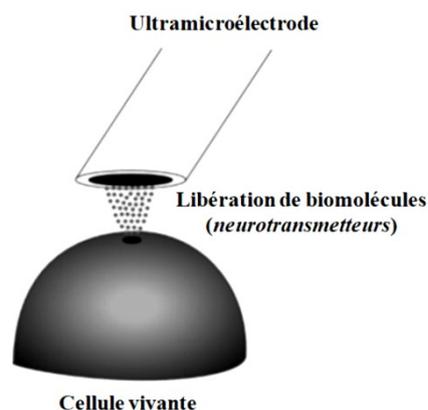


Figure I.9 : Configuration de détection de l'exocytose sur cellule vivante à l'aide d'une UME en fibre de carbone (Image adapté de ¹⁴)

En pratique, à l'aide de micromanipulateurs, il est possible d'atteindre une distance de l'ordre de 100 nm entre l'électrode et la cellule. L'analyse ampérométrique de l'exocytose donne lieu à l'acquisition d'un chronoampérogramme qui correspond en effet à une suite de **pics** dits **ampérométriques**. Ces derniers représentent chacun un événement d'exocytose par une vésicule de sécrétion avec la membrane cellulaire⁵⁵. L'exemple le plus courant est la détection de catécholamines par une cellule chromaffine⁵⁶ ou une cellule BON⁵⁷, au moyen d'une UME de carbone (diamètre 10 μm ; $E_w = +650 \text{ mV vs Ag/AgCl}$). La **Figure I.10** ci-dessous présente un chronoampérogramme typique des pics ampérométriques obtenus.

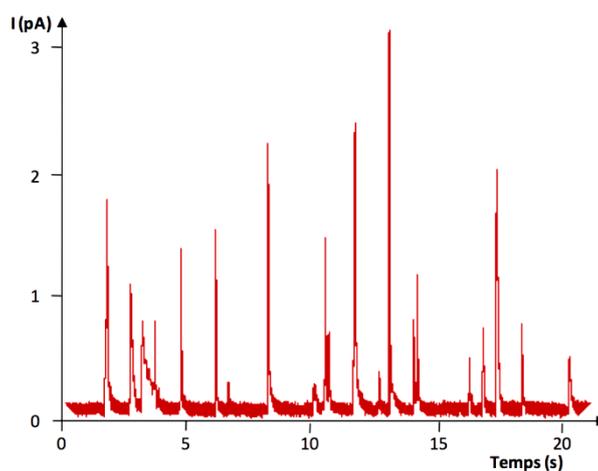


Figure I.10 : Exemple de signal obtenu par ampérométrie pour la détection de la cinétique de libération d'une vésicule de sécrétion de cellule BON³³

Le nombre de pics obtenu donne donc accès à la fréquence de sécrétion. La forme d'un pic isolé reflète quant à lui la cinétique de libération (courant maximum I_{\max} ; largeur à mi-hauteur $t_{1/2}$) des neurotransmetteurs pour un événement exocytotique donné. La montée du pic est directement liée à l'ouverture du pore de fusion (**Figure I.11**). La décroissance du courant, plus lente, correspond au phénomène de diffusion des espèces au sein du milieu extracellulaire, le pic dans sa globalité étant une convolution des deux phénomènes¹⁴. Dans certains cas, le pic ampérométrique est précédé d'un plateau ou d'une rampe de courant dit « pied de pic » (**Figure I.11**)⁵⁸. L'origine de ce pré-signal peut être attribuée à un pore de fusion stable avant la libération mais est aussi corrélée à la structure même de la vésicule⁵⁸⁻⁶⁰.

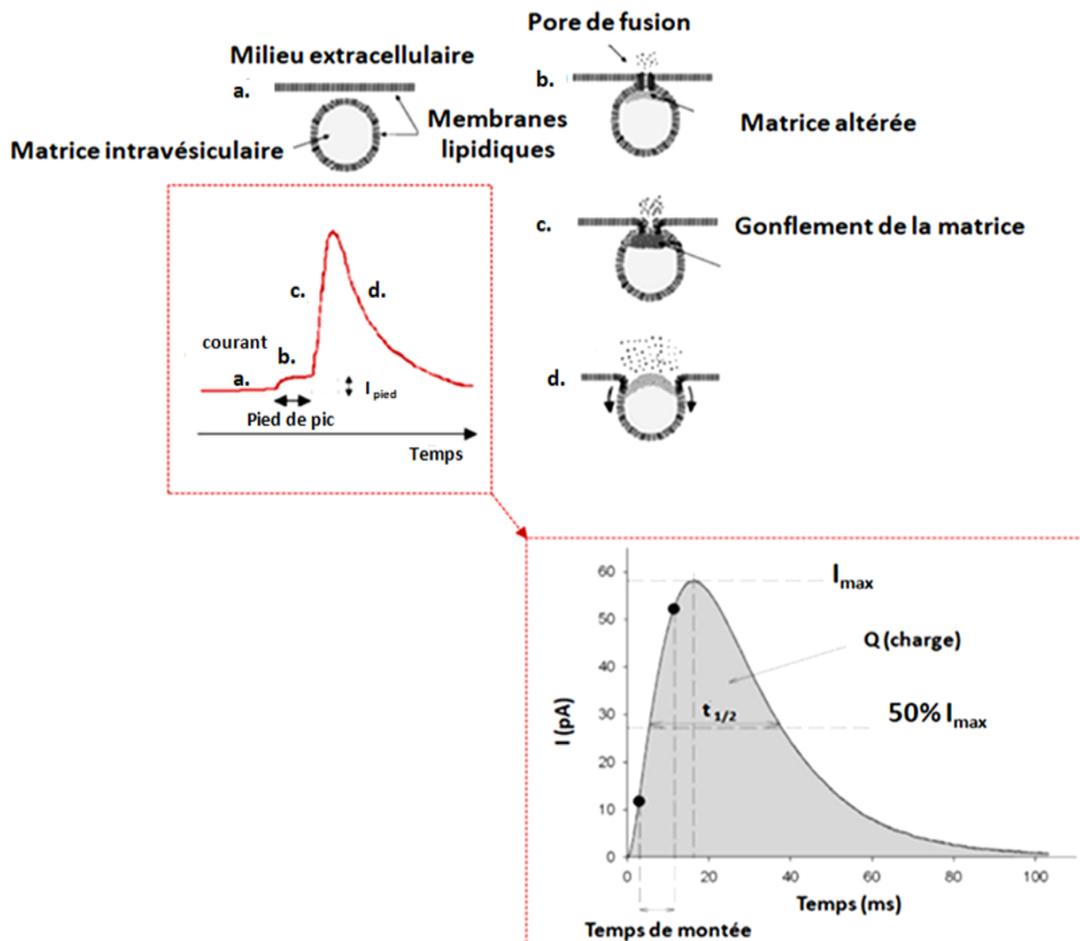


Figure I. 11 : Cinétique de libération du contenu intravésiculaire obtenu par chronoampérométrie^{14,59}

Enfin, l'ampérométrie permet de quantifier le nombre de neurotransmetteurs détectés par électrochimie. L'aire d'un pic correspond en effet formellement à la quantité d'électricité requise pour l'oxydation Q (C) qui est liée à la quantité de matière détectée N par la loi de Faraday :

$$Q = nFN$$

Où n = nombre d'électrons impliqués dans la réaction électrochimique en l'occurrence $n = 2$ pour les catécholamines ; F = constante de Faraday = 96 500 C.mol⁻¹).

On constate donc que les principaux avantages de l'ampérométrie sont son excellente résolution temporelle (\sim ms) compatible avec le suivi des événements d'exocytose en temps réel, sa sensibilité adaptée et sa capacité à extraire des informations quantitatives à l'échelle de la vésicule unique⁶¹. Ces avantages indéniables sont évidemment à nuancer par des inconvénients en lien avec la technique et la configuration expérimentale. Tout d'abord, toute la sécrétion n'est pas analysée mais uniquement la zone au voisinage de l'UME (le sommet ou la base en fonction de la position de l'électrode). Deuxièmement, si l'UME a une dimension voisine de celle de la cellule (\sim μ m), un événement de libération correspond à une surface active de l'électrode au maximum de la taille d'une vésicule sécrétrice après fusion, soit un disque de quelques centaines de nanomètres. En d'autres termes, le signal est proportionnel au rayon d'une vésicule quand le courant capacitif dépend de la surface totale de l'électrode. Ceci implique l'utilisation de potentiostats permettant de détecter de faibles courants faradiques sur une ligne de base capacitive non nulle.

Toutefois, la principale limitation de l'électrochimie pour le suivi de l'exocytose vésiculaire vient du fait que cette technique est « aveugle » à différents niveaux. En effet, elle ne permet pas notamment de visualiser le processus exocytotique en amont de la libération, que ce soit le déplacement de la vésicule au voisinage de la membrane cellulaire mais également la localisation exacte de la fusion-libération qui en électrochimie, la résolution spatiale en ampérométrie étant limitée à la taille de l'électrode collectrice. Afin d'obtenir des informations d'ordre spatial sur le phénomène d'exocytose, il existe une méthode d'analyse optique : **la Microscopie de Fluorescence par Réflexion Totale Interne**^{62,63}.

2.3) La Microscopie de Fluorescence

Le principe de la microscopie de fluorescence classique (ou épifluorescence) repose sur l'utilisation de composés fluorescents en tant que marqueurs spécifiques d'un phénomène ou d'une zone de l'espace. Ce type de microscopie est lié à la capacité que possèdent ces composés à émettre de la lumière après avoir absorbé des photons de plus haute énergie. Dans le contexte de l'exocytose, il est alors possible d'étudier et de visualiser les vésicules au sein du milieu intracellulaire ayant préalablement internalisé une quantité de molécules fluorescentes soit dans le milieu intravésiculaire, soit au sein de la membrane vésiculaire⁶⁴. La question majeure, au-delà de la nature de la sonde fluorescente, est le choix de la microscopie de fluorescence la plus appropriée. La microscopie deux photons⁶⁵ et la microscopie confocale^{66,67} ont rarement été impliquées dans la détection optique de l'exocytose. Leur utilisation reste en effet marginale en raison d'une résolution spatiale (400-800 nm de profondeur de champ) et temporelle (\sim s) qui permettent de visualiser les vésicules de sécrétion au sein du cytoplasme cellulaire, mais sans donner accès à la dynamique du système. D'autres techniques de microscopie à haute résolution sont à l'étude^{68,69} comme la microscopie à déplétion par émission stimulée (STED)⁷⁰⁻⁷³, la microscopie par localisation photoactivée (PALM)^{72,74-76} et la microscopie de reconstruction optique stochastique (STORM)⁷⁷. Ces techniques ont commencé à être adaptées aux investigations sur l'exocytose afin d'améliorer la résolution optique à la dimension nanométrique, la sensibilité ainsi que la vitesse d'enregistrement. Néanmoins, la microscopie TIRFM détient à l'heure actuelle une position prédominante pour le suivi de l'exocytose,^{78,79} en raison de ses caractéristiques spécifiques telles que son rapport signal/bruit élevé par rapport à l'épifluorescence, la réduction des photo-dommages cellulaires par illumination ciblée dans l'échantillon et un temps d'exposition réduit (dizaine de ms). Ses caractéristiques spécifiques (résolution spatiale, faible profondeur de champ...) seront détaillées dans le paragraphe suivant.

2.4) La Microscopie de Fluorescence par Réflexion Totale Interne (TIRFM)

2.4.1) Principes généraux

La microscopie TIRF est une technique optique développée par Daniel AXELROD au début des années 1980⁸⁰ et largement utilisée dans les applications de biologie cellulaire^{81,82}. Cette technique (**Figure I.12**) est particulière dans le sens où l'observation de l'échantillon est limitée à une zone de faible épaisseur (50-300 nm) grâce à un mode d'illumination particulier : la réflexion totale interne. Le principe de ce type de microscopie est de n'induire la fluorescence que sur une profondeur immédiatement adjacente à l'interface (support de l'échantillon) / (milieu environnant l'échantillon). L'excitation est due à une onde évanescente, générée uniquement quand la lumière incidente est totalement réfléchie à l'interface, ce qui ne se produit que pour un certain angle d'incidence dit « critique ». La valeur de cet angle se calcule par application de la loi de Snell-Descartes.

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$$

Avec n_1 l'indice de réfraction du premier milieu (celui du rayon d'incidence)

n_2 l'indice de réfraction du deuxième milieu (celui du rayon réfracté)

θ_1 l'angle d'incidence

θ_2 l'angle de réfraction pour laquelle les conditions de réflexion totale sont respectées.

En pratique, la lumière réfléchie pénètre sur une courte distance le milieu d'indice n_2 générant donc une onde évanescente si l'angle θ_1 est supérieur à l'angle critique et dont l'intensité diminue exponentiellement avec la distance à l'interface. Cette lumière va donc illuminer le milieu sur une profondeur de 50 à 300 nm. Dans le contexte de l'exocytose, cela permet l'excitation sélective des vésicules de sécrétion fluorescentes localisées à proximité de l'interface et également de la membrane cellulaire (**Figure I.12**)^{83,84}.

Dans le cadre de l'application de l'imagerie biologique cellulaire, en particulier l'analyse de la localisation et de la dynamique de molécules et des événements à proximité de la membrane plasmique, le TIRFM présente de nombreux avantages en comparaison de la microscopie à fluorescence traditionnelle basée sur l'épifluorescence⁸⁵. Tout d'abord, elle présente un meilleur rapport signal/bruit puisque toutes les vésicules fluorescentes de l'échantillon ne seront plus entièrement illuminées. La « partie supérieure » de la cellule (où

sont également localisées des vésicules fluorescentes) ne sera ainsi plus visualisée, permettant uniquement de visualiser les vésicules au voisinage du pôle basal (au-dessous) de la cellule.

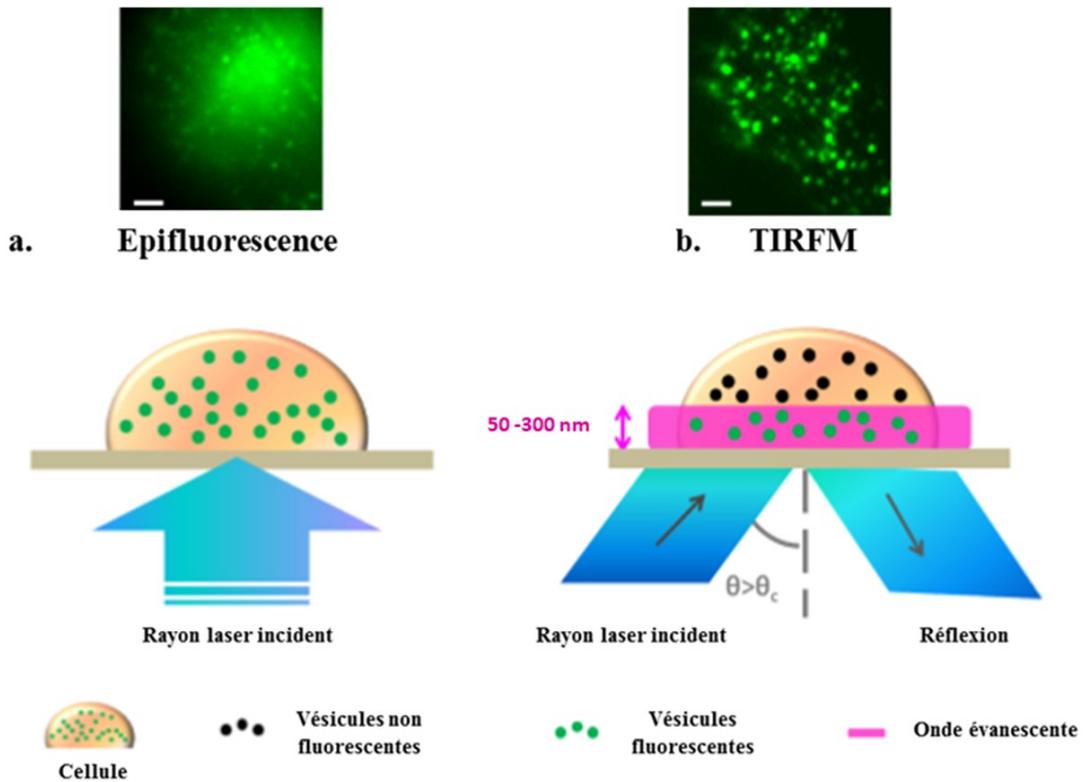


Figure I.12 : Comparaison des configurations pour l'épifluorescence (A) et le TIRFM (B) (Image adaptée de ⁸⁶ et ⁸⁷ ; échelle 2 μ m)

La microscopie de fluorescence par réflexion totale interne permet donc de localiser et de suivre les mouvements des vésicules proches de la membrane dans les trois dimensions de l'espace (suivi des trajectoires, mesure d'intensité de fluorescence). Le TIRFM a confirmé l'existence du pore de fusion et le passage de molécules à travers ce pore^{88,89}. Elle offre aussi et surtout la possibilité de localiser un événement d'exocytose sous la forme d'une variation de fluorescence. Dans la majeure partie des cas, il s'agit d'une diminution ou extinction de fluorescence liée à la diffusion (pendant environ 100 ms) de la sonde dans le milieu extracellulaire. Toutefois, il existe aussi des sondes optiques dont la fluorescence augmente avec le pH⁹⁰ (qui seront décrites plus en détails au sein de la section 5 de chapitre). Le passage de conditions intravésiculaires acides (pH 5,5) pour les cellules « *dense-core* » au pH de 7,4 pour le milieu extracellulaire induit une augmentation (« flash ») de

fluorescence qui précède l'extinction par diffusion. Cette exacerbation de fluorescence constitue un repère important pour ne pas confondre libération d'une vésicule et retour de cette dernière dans le cytoplasme. La **Figure I.13** présente un exemple de flash d'exocytose obtenu par microscopie TIRF, pour une cellule BON BC21, ayant préalablement internalisée la GFP (« *Green Fluorescent Protein* »).

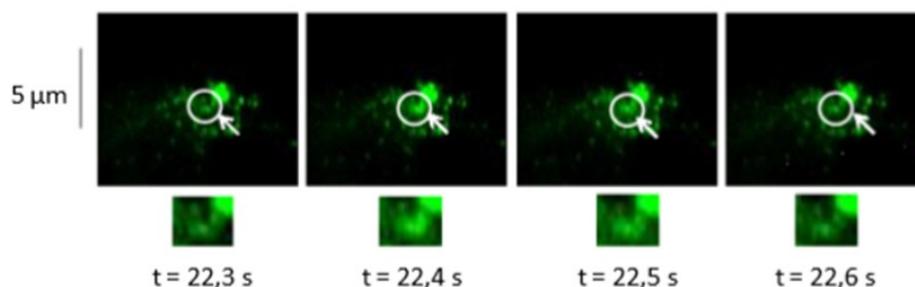


Figure I.13 : Exemple de flash de fluorescence obtenu sur cellules BON BC21 par microscopie TIRF (GFP : $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 509 \text{ nm}$)³³

2.4.2) Configuration expérimentale utilisée au laboratoire

Il existe deux configurations possibles pour la microscopie TIRF: l'une basée sur un prisme et l'autre sur un objectif. Pour ce qui est de la première méthode, un prisme est fixé à la surface de la lamelle afin de permettre l'obtention d'un angle critique lorsque le faisceau laser focalisé est introduit afin de générer la fluorescence des fluorophores présents au sein de l'échantillon biologique. L'échantillon est donc situé dans un espace étroit entre l'objectif et le prisme, ce qui rend difficile les manipulations sur l'échantillon cellulaire, telles que l'injection de milieu ou de sécrétagogue (substance de nature chimique et/ou biologique déclenchant la sécrétion), ainsi que les mesures physiologiques. C'est pourquoi nous employons au laboratoire un module TIRFM à objectif (**Figure I.14**), en utilisant un objectif à grande ouverture numérique (NA) pour réfracter simultanément la lumière incidente au-delà de l'angle critique et ainsi pouvoir collecter l'émission de fluorescence. Ce microscope peut être utilisé pour acquérir des images à fond clair, en épifluorescence et en TIRFM.

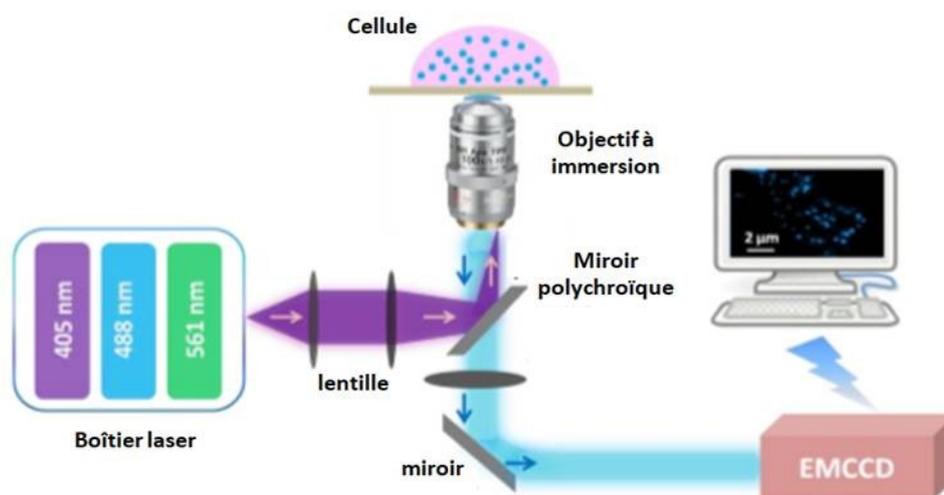


Figure I.14 : Montage de TIRFM utilisé au laboratoire (image adaptée de ⁸⁶)

En outre, le TIRFM présente une résolution spatiale adaptée à l'identification des comportements des vésicules fluorescentes en fonction du modèle cellulaire, tels que leurs déplacements, ou leur zone préférentielle de fusion⁹¹. Dans notre cas, la taille du pixel de la caméra avec l'objectif utilisé (objectif x100 à immersion à huile, 1.45NA, PlanApo, Zeiss) est d'environ 120 nm.

Cependant, la relativement faible résolution temporelle du TIRFM (dizaine de ms) au regard de celle de l'ampérométrie sur UME (sous la milliseconde) ne permet pas d'obtenir d'informations d'ordre cinétique ou quantitatif au sujet de l'événement d'exocytose (qui dure une centaine de ms⁸⁶ pour les cellules étudiées dans le cadre de ce projet de thèse). Il est à noter que l'un des grands avantages du TIRFM peut aussi être vu comme un inconvénient. En effet, l'augmentation du rapport signal/bruit vient d'une détection optique restreinte à la base de la cellule. En contrepartie (et comme en ampérométrie d'ailleurs), le reste des libérations exocytotiques (sommet et côtés de la cellule) n'est pas perçu. C'est d'ailleurs la question de la représentativité de cette détection à la base de la cellule qui est adressée par le couplage TIRFM/patch-clamp.

La description des trois techniques usuelles pour détecter l'exocytose en temps réel à l'échelle de la cellule unique montre que chacune présente des inconvénients et biais analytiques, ce qui suggère évidemment la nécessité de les combiner pour tirer profit de leurs avantages respectifs. Toutefois, avant d'aborder ce point, il est

important de présenter les modèles cellulaires les plus fréquemment utilisés pour mettre en évidence et décrire le phénomène d'exocytose avec ces trois méthodologies.

3) Les modèles cellulaires utilisés pour le suivi de l'exocytose

Dans le cadre de l'étude de la communication cellulaire et de la neurotransmission, le modèle le plus pertinent est évidemment le système neuronal et ses cellules primaires, à savoir les neurones. A ce titre, les neurones d'aplysie (et notamment leur corps neuronaux ou soma) sont utilisés afin de comprendre les fondements de la communication cellulaire^{92,93}. Une étude quantitative de la sécrétion de l'acétylcholine lors d'un évènement exocytotique a notamment pu être effectuée⁹⁴ sur soma d'aplysie, permettant ainsi d'obtenir des informations concernant la concentration extracellulaire d'acétylcholine libérée pendant un phénomène exocytotique, ainsi que le nombre de molécules libérées et la dynamique de libération de ce neurotransmetteur. Par ailleurs, des neurones dopaminergiques issus de tranches de cerveau de rat⁹⁵ ont également été utilisés comme modèle cellulaire pour des études ampérométriques au même titre que les neurones dopaminergiques de rétine de souris⁹⁶.

Cependant, les expériences mettant en œuvre des cellules neuronales demeurent confrontées à une série de restrictions expérimentales. Entre autres, les neurones primaires doivent être systématiquement isolés à partir de tissus nerveux frais⁹⁷. De plus, afin de garantir l'activité des neurones, l'étape d'isolement doit être effectuée en quelques minutes et leur culture ne peut être conservée que jusqu'à deux semaines, ce qui rend leur culture en routine fastidieuse à l'échelle du laboratoire. Par ailleurs, l'utilisation de neurones pour l'étude de la neurotransmission, pose également quelques problèmes d'ordre expérimental du fait de la taille réduite des vésicules neuronales (~ 20 nm de rayon)⁷ et également du fait de la faible concentration en neurotransmetteurs au sein de ces dernières (par comparaison avec les cellules « *dense-core* »).

D'autres modèles cellulaires sont ainsi mis en jeu pour pallier les inconvénients relatifs à l'utilisation de neurones. Si l'extension des résultats obtenus sur ces modèles aux neurones reste discutable, ceux-ci présentent de nombreux avantages en matière de culture cellulaire.

Les plus courants sont les cellules chromaffines, les cellules PC12, et les cellules BON (notamment utilisées au laboratoire).

3.1) Les cellules chromaffines

Les cellules chromaffines sont des cellules neuroendocrines que l'on retrouve principalement dans les glandes médullosurrénales et dans les ganglions du système nerveux sympathique chez les mammifères³⁴. La raison pour laquelle les cellules chromaffines surréaliennes ont été préférentiellement utilisées comme système modèle pour les investigations pluridisciplinaires sur les mécanismes de l'exocytose^{98,99} réside dans la taille relativement grande de leurs vésicules de sécrétion (rayon de 150 nm environ)¹⁰⁰, le caractère « *dense-core* » de leurs vésicules de sécrétion qui leur confèrent une concentration élevée en neurotransmetteurs intravésiculaires ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$)⁸ ainsi que leur réponse rapide aux stimuli externes. Toutefois, en tant que lignée cellulaire primaire, les cellules chromaffines doivent être fraîchement dérivées d'animaux de laboratoire (principalement de rats et de souris), ou d'abattoirs dans le cas de cellules chromaffines bovines.

3.2) Les cellules PC12

La lignée cellulaire PC12, établie en 1976 et dérivée d'une tumeur de la glande médullosurrénale de rat mâle (phéochromocytome), est également très utilisée pour l'étude de l'exocytose sur cellule unique car la prolifération et la différenciation de ces cellules sont bien connues et maîtrisées¹⁰¹⁻¹⁰³. Néanmoins, du fait de la dérive clonale, les différents sous-clones existants présentent quelques différences au niveau de leurs propriétés de sécrétion. En effet, certaines lignées ont conservé leur aptitude sécrétrice alors que d'autres ont perdu cette faculté. Ainsi, ces cellules, facilement maintenues en culture, nécessitent souvent un chargement en matériel électroactif (comme la dopamine) préalable aux manipulations électrochimiques afin de pouvoir étudier leur sécrétion¹⁰⁴. De plus, la taille de leurs vésicules de sécrétion demeure assez petite : de l'ordre de 80 à 100 nm de rayon, ce qui rend leur observation en microscopie moins aisée.

3.3) Les cellules BON

La lignée cellulaire BON (**Figure I.15**) est une lignée dérivée d'une tumeur carcinoïde humaine métastatique du pancréas et partage de nombreuses caractéristiques avec les

cellules entérochromaffines et chromaffines. Tout comme ces dernières, les cellules BON possèdent des vésicules sécrétrices de taille relativement grande (rayon de 100 à 150 nm) et sécrètent également une variété de molécules biochimiques (principalement la sérotonine) ainsi que des peptides au cours du processus d'exocytose^{105,106}.

Par ailleurs, les vésicules sécrétrices des cellules BON contiennent des protéines comme la « chromogranine A » enchevêtrées entre elles ainsi que plusieurs peptides régulateurs comme la pancréastanine ou la neurotensine, ce qui vaut aussi aux granules de sécrétion des cellules BON, l'appellation de vésicules «*dense-core*»^{107,108}.

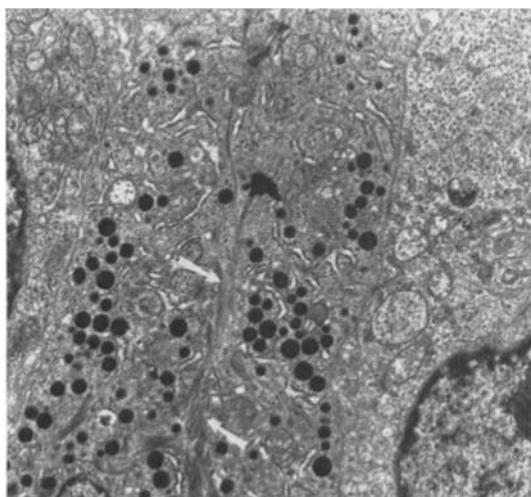


Figure I.15: Image en obtenue en microscopie électronique à balayage d'une tumeur BON montrant les granules de sécrétion « *dense-core* » (en noir ; grossissement x7100)¹⁰⁷

Deux clones des lignées cellulaires (appelés BC21 et N13) ont récemment été utilisés dans la recherche de l'exocytose^{88,89}. Les cellules BON BC21 expriment de manière stable le neuropeptide-Y marqué de protéine fluorescente verte (NPY-GFP) au sein des vésicules sécrétrices, ce qui en fait un modèle commode pour le suivi optique d'événements exocytotiques en TIRFM¹⁰⁹. Les cellules BON N13, transfectées avec un vecteur vide (le vecteur pcDNA3), ont la faculté de posséder des vésicules sécrétrices vides de neurotransmetteurs, constituant un modèle cellulaire approprié pour ce projet de doctorat⁸⁶. L'intérêt de ces clones est de limiter la variabilité cellulaire.

Il est à noter que ces deux clones ne contiennent pas de matériel électroactif intravésiculaire⁵⁷ et nécessitent un pré-chargement avec un neurotransmetteur électroactif en cas de détection électrochimique. Ce pré-chargement tire notamment profit du mécanisme de reconnaissance de la fonction monoamine du neurotransmetteur par une

protéine présente sur la membrane vésiculaire, appelée VMAT. Le terme VMAT (Transporteur Vésiculaire de Monoamine) désigne une glycoprotéine de transport acide, d'un poids moléculaire d'environ 70 kDa, intégrée à la membrane des vésicules synaptiques des neurones présynaptiques (**Figure I.16**)^{110,111}.

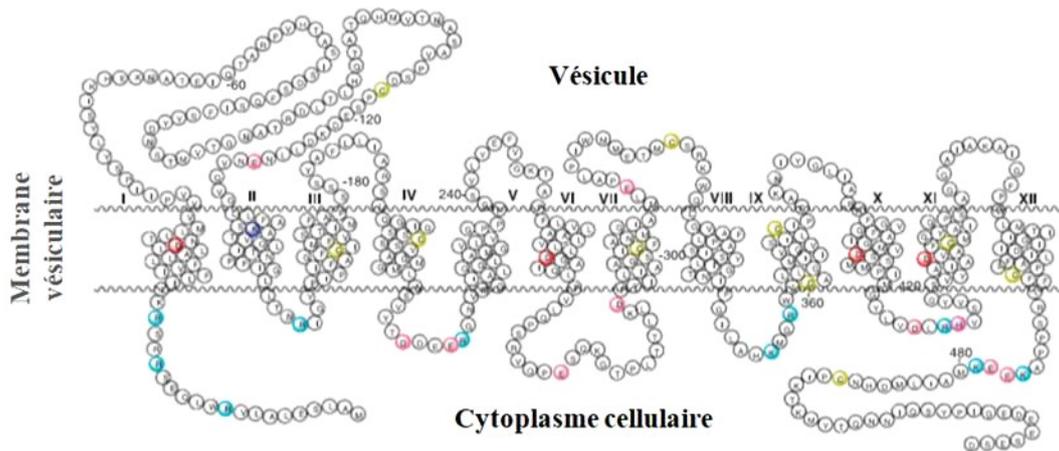


Figure I.16 : Structure secondaire supposée de VMAT2, adaptée de¹¹²

Cette protéine agit pour transporter les neurotransmetteurs monoamines, tels que la dopamine, la sérotonine, la norépinéphrine ou l'épinéphrine depuis le cytoplasme vers les vésicules sécrétrices^{113,114}. Ces dernières libèrent les neurotransmetteurs lors d'un phénomène d'exocytose ou de neurotransmission, en tant que messages chimiques aux neurones postsynaptiques. Ces transporteurs vésiculaires acheminent les monoamines du cytoplasme vers des vésicules de stockage à concentration élevée. Les vésicules de transport sont libérées dans l'espace entre les neurones, appelé fente synaptique, où elles transmettent un message chimique au neurone suivant/ à la cellule suivante.

Ces transporteurs vésiculaires de monoamines utilisent un gradient de proton généré par les V-ATPases (enzymes) afin d'alimenter l'importation de monoamines au sein des vésicules¹¹⁵. Il existe deux isoformes de transporteurs vésiculaires de monoamines exprimés chez l'Homme: VMAT1 et VMAT2¹¹⁶. Chez l'Homme, VMAT1 s'exprime principalement au sein des grandes vésicules à noyau dense du système nerveux périphérique. VMAT1 peut également être trouvé au sein des cellules neuroendocrines, en particulier les granules de cellules chromaffines et de cellules entérochromaffines que l'on retrouve en grande partie dans la médullaire des glandes surrénales. VMAT2 est exprimé au sein de diverses

cellules monoaminergiques du système nerveux central, telles que les cellules du système nerveux sympathique, les mastocytes et les cellules contenant de l'histamine dans l'intestin et le tube digestif.

4) La méthodologie couplée

Comme nous l'avons précédemment détaillé, si les étapes principales de la libération par exocytose sont bien connues et identifiées, certains aspects de ce processus demeurent incompris et de nombreuses interrogations subsistent et font l'objet de débats depuis les dix dernières années, en particulier, l'existence d'une libération sans explosion du pore (1. puis 2. **Figure I.3**) suivie d'une refermeture (« *Kiss and run* »)²³. Ceci renvoie aux questionnements sur les paramètres de stabilité du pore de fusion²⁰ et aux caractéristiques cinétiques des événements de fermeture qu'il faut donc identifier avec certitude. Une seconde question tient aux propriétés des zones spécifiques de libération. Ces « points chauds » (ou « *hotspots* »)^{117,118} ont été identifiés mais l'analyse de la dynamique de libération dans ces zones reste à établir. Ces interrogations impliquent un système complexe et ne sauraient être levées qu'avec une vision des événements de libération dans leur intégralité, en temps réel et à l'échelle de l'événement unique. A cet égard, les trois techniques analytiques de l'exocytose en temps réel et à l'échelle de la cellule unique (patch-clamp, ampérométrie et TIRFM) fournissent des informations sous des aspects différents et complémentaires. C'est parce que l'une semble pallier les inconvénients de l'autre (problème de résolution spatiale pour le patch-clamp et l'ampérométrie ; résolution temporelle limitée pour le TIRFM) que la mise en place de méthodologies dite « couplées » a été réalisée dans les dernières décennies.

4.1) La combinaison Patch-clamp – Ampérométrie

Un premier couplage possible est celui dit « patch-ampérométrie » et développé dans les années 1990^{119,120}. La combinaison du patch-clamp et de l'ampérométrie est obtenue en introduisant une ultramicroélectrode en fibre de carbone au sein de la pipette dédiée au patch-clamp sous la configuration « *inside-out* » (**Figure I.6**) (la libération se fait donc en direction de l'intérieur de la pipette vers l'UME). De cette façon, comme les contenus

vésiculaires sont sécrétés depuis l'espace intravésiculaire vers le milieu extracellulaire, les signaux électrophysiologiques (capacité électrique) et ampérométrique (courant d'oxydation) résultants peuvent être simultanément enregistrés au niveau d'une seule cellule et d'une seule vésicule sécrétrice. L'utilisation couplée de ces deux techniques a permis de corrélér conductance, capacité et pic ampérométrique pour montrer que le pied de pic correspond bien à une période stable du pore de fusion. Cette technique de patch-ampérométrie permet donc de conjuguer les informations de variations de surface et de courant. Cependant, cette combinaison présente de nouveaux inconvénients par rapport aux méthodes indépendantes. La nécessité de détecter des événements vésiculaires discrets sur les modèles cellulaires usuels (cellules chromaffines par exemple) impose de travailler avec un patch excisé et non une cellule entière. Par ailleurs, la distance électrode-membrane cellulaire n'est pas contrôlée car l'électrode est nécessairement placée en retrait à quelques micromètres dans le capillaire en verre, ce qui pose la question de l'éventuelle distorsion des signaux ampérométriques par diffusion. Enfin, dans le cadre d'interrogations nécessitant une excellente résolution spatiale, cette association n'est pas pertinente.

4.2) La combinaison Patch -Clamp -TIRFM

Il existe une unique combinaison analytique entre le patch-clamp et le TIRFM. Celle-ci a été mise en œuvre dans le but de vérifier si l'exocytose mesurée uniquement à la base de la cellule par microscopie de fluorescence à onde évanescence est représentative des sécrétions globales d'une seule cellule chromaffine¹²¹. Ce couplage permet d'enregistrer simultanément les modifications de capacité en cellule entière et les extinctions de fluorescence résultant du phénomène d'exocytose vésiculaire à la base de la cellule. La bonne corrélation entre augmentations de capacité et extinctions de fluorescence au cours du temps laisse à penser que le suivi TIRFM est bien représentatif du comportement de la cellule entière. A ce jour, ce mode de couplage n'a été élaboré que pour répondre à une question liée en réalité à la pertinence d'une technique par rapport à une autre et ne semble pas systématisé à d'autres questionnements sur l'exocytose.

4.3) La détection couplée Ampérométrie-TIRFM

A la lumière des paragraphes précédents, le couplage Ampérométrie - TIRFM apparaît comme le plus intuitif dans son concept puisqu'il associe deux outils complémentaires : le premier permet de détecter avant les événements de fusion puis leur localisation, le second la libération proprement dite. Il semble donc à même de contribuer aux questionnements sur la relation entre cinétique de libération et localisation de la sécrétion ou à la stabilité et l'évolution du pore de fusion. En plus des exemples déjà cités plus haut (points chauds, caractéristiques cinétiques des événements de fusion partielle...), le TIRFM peut être utilisé pour identifier l'exocytose composée (plusieurs événements consécutifs sur le même site) qui apparaîtront en ampérométrie sous la forme de pics successifs qui, hors TIRFM, auraient été perçus comme des libérations indépendantes provenant de deux ou plusieurs vésicules à des endroits différents de la membrane cellulaire.

4.3.1) Les différentes configurations expérimentales utilisées pour la détection couplée Ampérométrie-TIRFM

Ce couplage a été réalisé au laboratoire en 2011 dans le cadre du doctorat d'Anne MEUNIER³³. Il a consisté à abandonner la configuration expérimentale classique (ultramicroélectrode en fibre de carbone au sommet de la cellule) pour s'adapter à la microscopie à onde évanescente restreinte aux phénomènes se déroulant à la base de la cellule (**Figure I.17**). La combinaison Electrochimie - Microscopie de Fluorescence pour le suivi de l'exocytose vésiculaire requiert donc une surface d'électrode qui soit également optiquement transparente. Cette approche a été validée en utilisant des microdispositifs constitués d'électrodes à base d'TTO (oxyde d'indium dopé à l'étain), matériau conducteur et transparent.¹²²

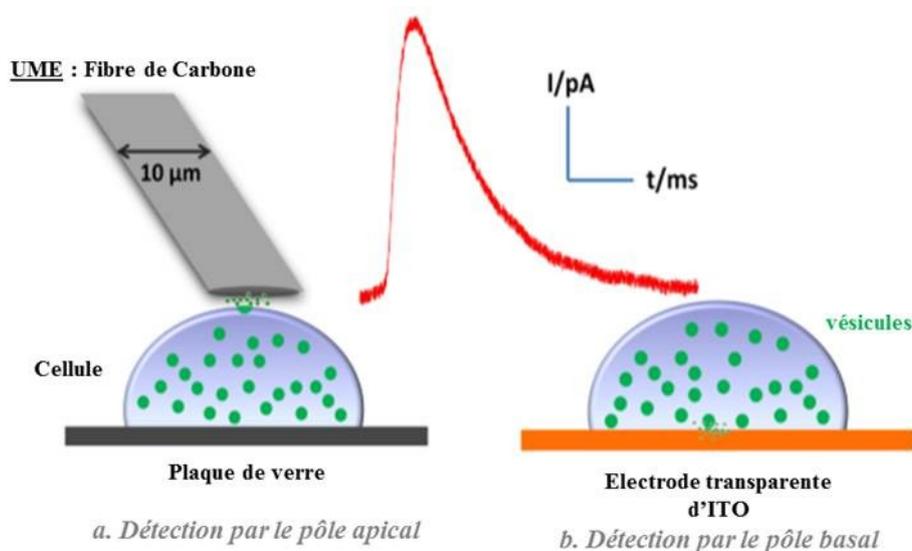


Figure I.17 : Les différentes configurations utilisées au laboratoire pour l'étude de l'exocytose⁸⁶

Cette nécessité de détecter par électrochimie à la base de la cellule pose en effet un problème majeur car une boîte de Petri centimétrique recouverte d'ITO et sur lequel seraient adhérentes les cellules isolées générerait un courant capacitif trop élevé pour distinguer les signaux faradiques, au-delà du problème de la mise en œuvre d'une telle boîte. C'est pourquoi un compromis est nécessaire et a été trouvé sous la forme d'un microdispositif composé de plusieurs électrodes de travail d'ITO indépendantes (quatre ou huit) sous forme de bandes, de micropuits ou encore de « *lollipop* » (ou sucettes), c'est-à-dire de fines bandes terminées par un disque^{53,123,124} (Figure I.18).

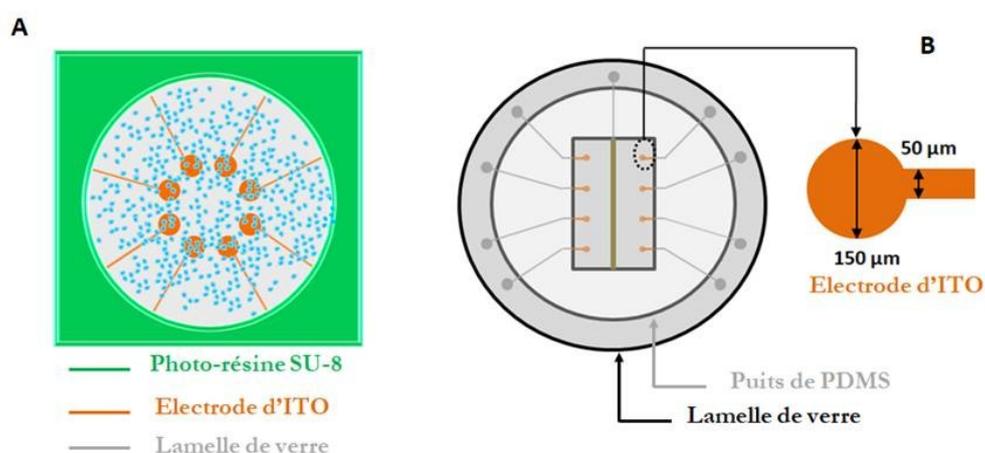


Figure I.18 : Exemples de dispositifs utilisés au laboratoire : A) Dispositifs en forme de « *lollipop* »⁸⁶ utilisés pour la thèse de Xiaoqing LIU. B) Dispositifs utilisés pendant ce projet de doctorat.

Brièvement, les microdispositifs sont fabriqués selon la procédure suivante. Après dépôt de l'ITO par pulvérisation cathodique, la surface active des électrodes est délimitée par photolithographie puis gravure chimique^{53,125}. Un puits centimétrique (en résine ou en PDMS) est ensuite collé sur l'ensemble pour permettre la culture cellulaire. Ce couplage a été validé pour la première fois au laboratoire sur cellules BON BC21 qui expriment la GFP et ont été préalablement chargées avec de la sérotonine pour la détection électrochimique (**Figure I.19**).^{33,53}.

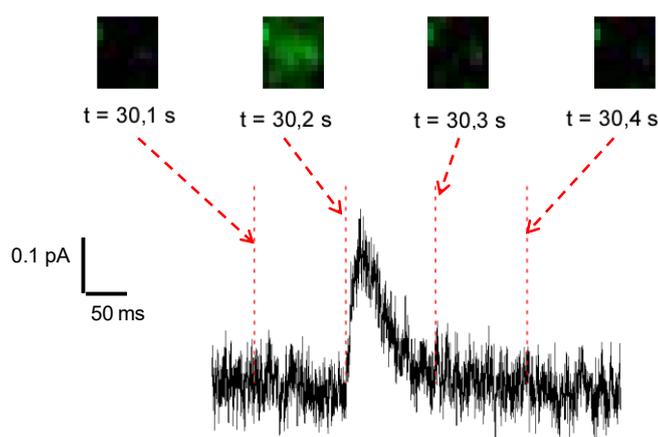


Figure I.19 : Exemple d'événement couplé Ampérométrie-TIRFM sur ITO avec une cellule BON BC21 (électrochimie : détection de sérotonine à $E = + 650 \text{ mV vs Ag/agCl}$; TIRFM : détection de GFP ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emi}} = 509 \text{ nm}$))¹²³

Cette validation analytique a été par ailleurs confirmée en 2012 par le groupe de K. GILLIS sur cellule chromaffine (détection électrochimique de catécholamines et détection optique d'acridine orange).¹²⁶

Quels que soient les deux couplages rapportés et le mode de calcul, un inconvénient majeur a été observé. En effet, un pourcentage conséquent d'événements dits « orphelins » (autrement dit l'apparition de pics ampérométriques découplés de signaux optiques fluorescents et inversement) a été quantifié. Par exemple, le pourcentage d'événements couplés s'élève à environ 20 % pour les travaux avec les cellules BON avec la GFP et la sérotonine^{123,124}

Au-delà de la résolution temporelle du TIRFM (qui ne peut détecter les événements plus rapides que sa fréquence d'acquisition) pouvant être à l'origine de certains événements

orphelins optiques ou de l'efficacité du chargement en sonde électroactive (causant l'apparition d'orphelins électrochimiques), ces résultats soulèvent la question de travailler avec des sondes optiques et électrochimiques indépendantes³³. En effet, la procédure d'internalisation indépendante des deux sondes conduit à l'absence de contrôle de chargement (en proportions relative et absolue) de ces dernières au sein des vésicules de sécrétion. C'est dans le contexte de la mise en œuvre de sondes électro-fluorescentes uniques que s'intègrent les Faux Neurotransmetteurs Fluorescents (FFNs)¹²⁷ ; famille de molécules qui sera présentée dans les paragraphes suivants.

5) Les sondes optiques utilisées pour l'investigation de l'exocytose vésiculaire

Afin de pouvoir accéder à des informations sur la dynamique de la communication cellulaire, la visualisation de vésicules de sécrétion au sein du cytoplasme cellulaire est un point clé et ce, d'autant plus, avec le développement de nouvelles méthodes de microscopie de fluorescence. C'est dans le contexte de l'imagerie des vésicules synaptiques que de nombreuses sondes fluorescentes ont été développées et utilisées sur cellules vivantes¹²⁸. Dans ce cadre, une sonde fluorescente adaptée doit posséder des propriétés de fluorescence permettant sa visualisation par les techniques de microscopie classique (elle doit notamment posséder une émission de fluorescence dans le domaine du visible) et évidemment être capable de marquer les vésicules de sécrétion de manière spécifique^{129,130}. Parmi les démarches mises en place par la communauté scientifique pour élaborer des sondes optiques capable de marquer les vésicules de sécrétion et éventuellement suivre la libération par exocytose, plusieurs approches peuvent être distinguées, telles que le développement de marqueurs neuronaux spécifiques, la formation d'adduits fluorescents avec un neurotransmetteur endogène (**Figure I.2**) ou encore le « *design* » de Faux Neurotransmetteurs Fluorescents (FFNs), analogues structuraux des neurotransmetteurs naturels. Ces différentes stratégies seront présentées au sein de la section suivante.

5.1) Les marqueurs neuronaux fluorescents

Comme nous le verrons à travers cette étude bibliographique, les groupes de D. SAMES et D. SULZER (Columbia University, New York, USA) sont pionniers dans le domaine de la synthèse et du développement de sondes fluorescentes pour l'étude de la

neurotransmission. A ce titre, un nouveau composé dénommé APP⁺ (4-(4-diméthylamino)phényl-1-méthylpyridinium, **Figure I.20**) a été synthétisé en 2013 en tant que marqueur neuronal et analogue fluorescent de MPP⁺ (neurotoxine ; **Figure I.20**)¹³¹. Ce dernier est un substrat des transporteurs de la dopamine, de la sérotonine ainsi que de la norépinéphrine. Il permet notamment de marquer aussi bien les vésicules synaptiques que les mitochondries au sein des neurones catécholaminergiques de tissus cérébraux de souris. Au-delà du fait que la molécule APP⁺ pourrait servir en tant que marqueur de l'activité mitochondriale au sein des neurones catécholaminergiques, il a été démontré qu'une faible proportion de molécules APP⁺ seulement était présente au sein du milieu extracellulaire lors de la stimulation de l'exocytose. Ceci peut provenir d'une faible internalisation de la sonde au sein des vésicules de sécrétion ou à une extinction du signal fluorescent au sein de ces mêmes organites cellulaires. Ajoutée à la question de la sélectivité du marquage, cette caractéristique est problématique pour une étude d'évènements exocytotiques avec le composé APP⁺.

Avec pour objectif d'obtenir un marquage neuronal sélectif, Y.-T. CHANG et ses collaborateurs¹³² ont rapporté dans la littérature en 2015, une molécule dénommée NeuO (pour « *Neuron Orange* », **Figure I.20**). Il s'agit d'une sonde fluorescente permettant de marquer de façon sélective les neurones glutaminergiques au sein de différents tissus cérébraux (tranches de cerveau de souris ou des tissus neuronaux prélevés au sein de larves de poissons zèbres) pour des expériences de visualisation neuronale.

En ajoutant une seconde fonction hydroxyle sur la structure de la sérotonine, l'équipe d'E. LEVITAN a mis au point une sonde fluorescente dans le domaine du visible, dénommée d-HT (5,7 – dihydroxytryptamine, **Figure I.20**)¹³³ et dont l'émission de fluorescence dépend du pH. Il s'est avéré que ce composé possède une fluorescence deux fois plus importante à un pH de 7,4 (pH extracellulaire) qu'à un pH acide de 5,5 (pH intravésiculaire) et possède également la faculté d'être internalisé par les neurones contenus au sein de tranches de cerveau de rat, par le biais du transporteur de la sérotonine (SERT). Il est également intéressant de souligner que ce composé possède la faculté d'être internalisé au sein des vésicules de sécrétion de cellules PC12. Ces caractéristiques font donc de la sonde d-HT un bon modèle pour l'étude de l'exocytose vésiculaire et de la neurotransmission par détection optique. Il est curieux que le comportement

électrochimique de cette entité n'ait jamais été étudié car cette sonde pourrait constituer une piste de travail sérieuse pour un couplage électrochimie-fluorescence de l'exocytose.

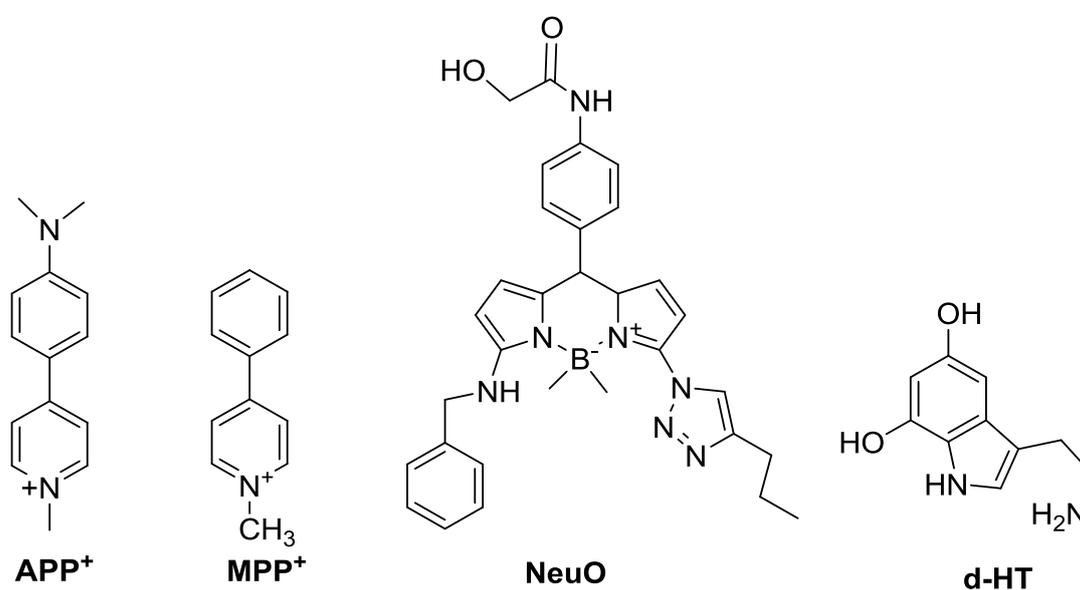


Figure I.20: Structures moléculaires des marqueurs neuronaux APP⁺, NeuO et d-HT

5.2) β-bloquant fluorescents

En 2011, le groupe de R. BORGES s'est inspiré du phénomène d'accumulation des β-bloquants au sein des vésicules de sécrétion de cellules chromaffines¹³⁴ pour synthétiser et développer une molécule appelée RCTM-3 (**Figure I.21**) qui correspond à un β-bloquant adrénergique fluorescent dans le domaine du visible. L'internalisation de la molécule RCTM-3 au sein des vésicules sécrétrices des cellules PC12 a été visualisée par microscopie TIRF¹³⁴. Cette molécule est considérée comme particulièrement intéressante en tant que substrat de VMAT2 et marqueur spécifique des vésicules de sécrétion cellulaires.

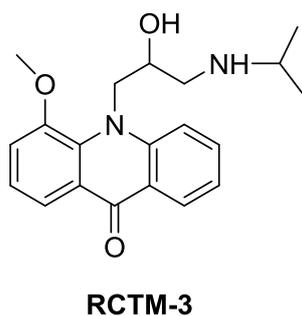


Figure I.21 : Structure moléculaire du β -bloquant RCTM-3

5.3) Les adduits fluorescents

Les travaux présentés précédemment correspondent donc à la synthèse de molécules fluorescentes internalisées par la cellule, puis par les vésicules de sécrétion. Une critique de cette stratégie est liée au fait qu'elle s'appuie sur l'aptitude de la cellule visée à « ingérer » la sonde exogène. Une stratégie parallèle consiste à pouvoir observer les neurotransmetteurs endogènes en faisant réagir au sein de la cellule le neurotransmetteur (telle que la dopamine ou la sérotonine) et sa fonction amine avec une structure moléculaire organique (un dialdéhyde par exemple) afin de former un adduit fluorescent, qui sera ainsi visualisable par détection optique (**Figure I.22**).



Figure I.22 : Schématisation du mode d'obtention des adduits fluorescents (image adaptée de¹³⁵)

A ce titre, K. BERA *et al.* montrent que l'orthophtalaldéhyde (OPA)¹³⁵ réagit avec la dopamine, sérotonine ou la norépinéphrine endogènes pour former des adduits fluorescents, permettant une visualisation de la répartition des neurotransmetteurs au sein des vésicules de sécrétion par imagerie optique.

Sur le même modèle, H. CHAN et ses collaborateurs publient en 2010¹³⁶, une étude décrivant une méthode de suivi en temps réel de l'exocytose par microscopie de

fluorescence et électrochimie sur cellules neuroblastomes SH-SY5Y contenues au sein d'un canal microfluidique. Au sein de ce travail, le naphthalène-2,3-dicarboxaldéhyde (NDA) réagit avec les neurotransmetteurs monoamines primaires (dopamine et norépinéphrine) contenus au sein des vésicules sécrétrices en présence d'un composé cyanure pour former un adduit fluorescent et électroactif.

« *Neurosensor 521* »¹³⁷ (ou NS521 – structure présentée en **Figure I.23**) a été développé par l'équipe de T. GLASS pour un marquage sélectif des neurotransmetteurs endogènes monoamines primaires uniquement (norépinéphrine ou dopamine) au sein des vésicules sécrétrices de cellules chromaffines. Cette molécule se lie aux amines primaires via la formation d'ions iminiums et forme un adduit fluorescent. Le composé NS521 est déjà fluorescent mais cette réactivité déplace la longueur d'onde d'émission du composé formé vers des valeurs plus élevées (déplacement bathochrome de 40 nm avec la norépinéphrine couplé à une augmentation de l'émission de fluorescence d'un facteur 5). Cette molécule peut donc être considérée comme une sonde optique permettant de discriminer les cellules contenant les neurotransmetteurs monoamines primaires (dopamine, norépinéphrine) par rapport à celles contenant l'épinéphrine par exemple.

Cette même équipe a également développé une seconde famille de molécules appelée « *Exosensors* ». La base moléculaire de la sonde NS521 a été utilisée afin de créer des composés dont l'émission de fluorescence varie avec le pH. Dans ce contexte, le groupement diéthylamine de la sonde NS521 a été remplacé par un groupement sulfonamide¹³⁸ (**Figure I.23**). Parmi les cinq composés synthétisés, il s'avère que la molécule ES517 présente les caractéristiques les plus intéressantes en termes de fluorescence lorsqu'elle est liée à la dopamine ou à la norépinéphrine endogènes. De plus, en milieu acide, la fluorescence du composé résultant de la réaction de la sonde ES517 et du neurotransmetteur est dite « éteinte » (car très faible). A contrario, en milieu neutre, la fluorescence de ce composé est exacerbée. Ces caractéristiques photo-physiques particulières font de cette molécule un outil d'imagerie moléculaire parfaitement adapté à l'étude de l'exocytose vésiculaire par détection optique. En effet, lors de l'internalisation de la molécule ES517 au sein des vésicules de sécrétion acides et de sa liaison avec le neurotransmetteur monoamine primaire, la fluorescence du produit généré sera d'abord très faible, puis sera exacerbée lors d'un événement exocytotique ; lors du passage du produit généré (adduit ES517- neurotransmetteur)^{138,139}.

En 2019, cette même équipe introduit dans la littérature, un nouveau marqueur optique, le composé NS510, conçu à nouveau pour avoir une forte affinité avec les neurotransmetteurs catécholamines primaires et pouvoir notamment se lier à la norépinéphrine, pour en permettre la visualisation au sein des vésicules de sécrétion de cellules chromaffines¹⁴⁰. « *Neurosensor 510* » est décrit comme la première sonde sélective de la norépinéphrine par rapport à la dopamine capable de discriminer la norépinéphrine par rapport à la dopamine en se basant sur les différences d'intensité de fluorescence des deux adduits formés.

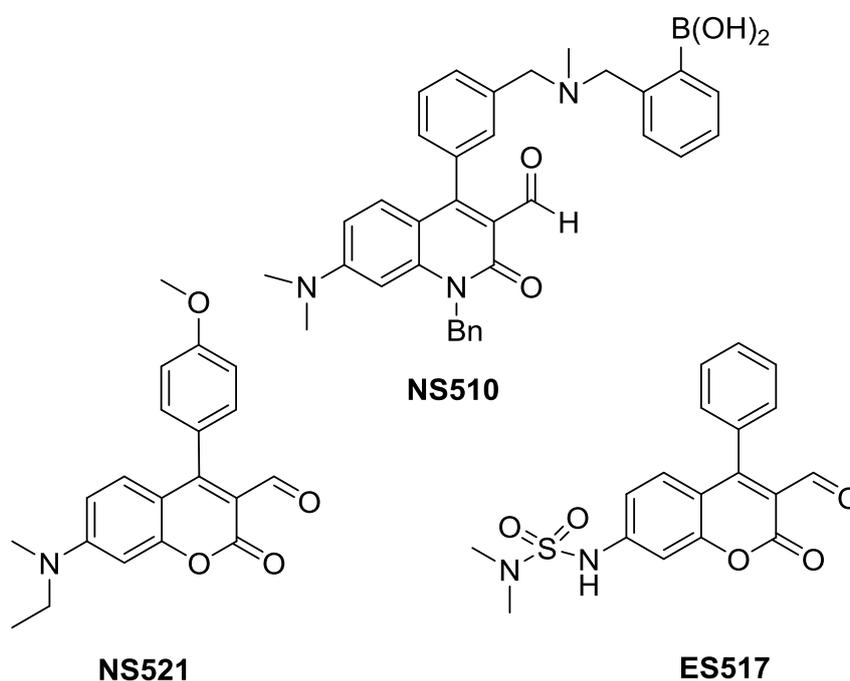


Figure I.23 : Structures moléculaires des marqueurs ES517, NS521 et NS510

Cette stratégie « de l'adduit » est particulièrement élégante dans le sens où le marquage fluorescent est réalisé sur le neurotransmetteur endogène. De plus, les neurotransmetteurs endogènes sont électroactifs. Cette orientation scientifique permet donc de mettre en place le couplage électrochimie-fluorescence pour la détection de l'exocytose, ce qui a été réalisé dans le cadre de NS510.¹⁴⁰ La seule limite de cette option est de taille : l'un des neurotransmetteurs les plus importants, l'épinéphrine, ne forme aucun adduit et est exclu du marquage et de la détection.

5.4) Les Faux Neurotransmetteurs Fluorescents (FFNs), des candidats à privilégier pour l'imagerie optique

Nous avons précédemment décrit deux orientations scientifiques très différentes pour marquer les vésicules de sécrétion : en premier lieu, l'internalisation d'une sonde fluorescente exogène, puis la formation d'un adduit fluorescent avec un neurotransmetteur endogène. Ces deux voies possèdent chacune leurs avantages et inconvénients. A ce titre, les développements les plus poussés ces dernières années ont concerné la synthèse de divers analogues fluorescents de neurotransmetteurs naturels, à savoir les Faux Neurotransmetteurs Fluorescents (FFNs)^{90,141}. L'idée centrale reste donc d'impliquer des sondes au départ exogènes mais qui présentent des analogies structurales avec des neurotransmetteurs endogènes.

Comme nous l'avons précédemment explicité, VMAT2 joue un rôle primordial au sein du système de transmission monoaminergique, car ce dernier est responsable du transport des neurotransmetteurs monoamines du cytoplasme vers les vésicules sécrétrices¹¹⁰. Cependant, cette protéine est peu spécifique et capable de transporter les monoamines endogènes (dopamine, sérotonine, norépinéphrine) et les amines synthétiques (telles que l'amphétamine, la tyramine ou d'autres composés de type phényléthylamines^{142,143}) du cytoplasme aux vésicules sécrétrices. Inspiré par cette particularité, les groupes de Dalibor SAMES et David SULZER ont conçu et synthétisé, en 2009¹⁴¹, la première sonde fluorescente de la famille des Faux Neurotransmetteurs Fluorescents (FFNs), le composé FFN511 (**Figures 1.24**) dans le but de visualiser directement les neurotransmetteurs et la libération des terminaux présynaptiques individuels par imagerie optique.

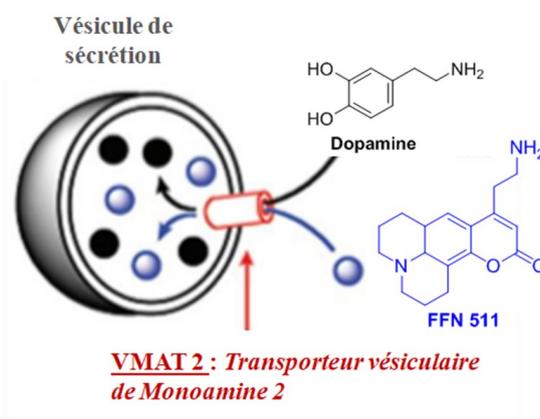


Figure I.24 : Internalisation vésiculaire de la Dopamine et des FFNs par VMAT2¹⁴⁴

Le concept général d'élaboration des FFNs consiste à synthétiser les molécules organiques fonctionnelles (telles que FFN511) dont la structure moléculaire ressemble, dans sa globalité, à celle des neurotransmetteurs endogènes courants (telles que la dopamine ou l'épinéphrine, **Figure I.2**) en conservant leur forme, taille et conformation. Il s'agit donc d'une structure moléculaire possédant un groupe éthylamine primaire fonctionnant comme site de reconnaissance vésiculaire. Une structure aromatique adaptée (un noyau coumarine ou acridone par exemple, **Figure I.25**), présent sur la structure de ces molécules leur confère les caractéristiques de fluorescence nécessaires à la détection optique.

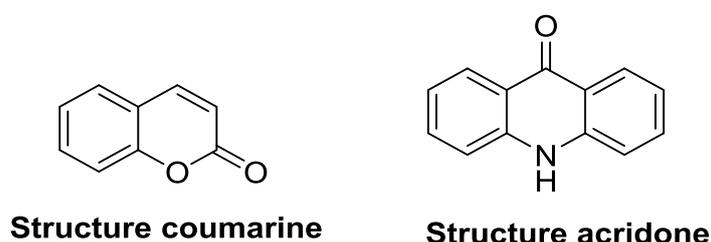


Figure I.25 : Bases moléculaires générant la fluorescence pour les FFNs

Ainsi, lors de l'incubation de cellules avec un composé de la famille des FFNs, VMAT (ou le transporteur considéré) sera « induit en erreur » par la similitude élevée de structure des FFNs et des neurotransmetteurs endogènes. Par conséquent, la molécule synthétique sera internalisée au même titre que le composé naturel. Depuis la synthèse de FFN511 en 2009, les groupes de D. SAMES et D. SULZER ont répertorié dans la littérature une liste impressionnante d'autres Faux Neurotransmetteurs Fluorescents avec pour objectif d'étudier la neurotransmission et d'accéder à une plateforme d'imagerie cérébrale. FFN511 (structure présentée en **Figure I.26**) a également été décrit comme internalisé au sein de neurones sérotoninergiques.^{145,146} Il s'est également avéré que FFN511 était libéré par les vésicules synaptiques lors d'une stimulation exocytotique induite par KCl. Cette libération a pu être visualisée et également quantifiée par microscopie confocale¹⁴⁶.

Ainsi, au même titre que FFN511, une autre sonde appelée FFN206¹⁴⁷ (structure présentée en **Figure I.26**) a été synthétisée comme traceur optique de la sécrétion cellulaire. Cette dernière est considérée comme spécifique de VMAT2 au sein des vésicules sécrétrices de cellules HEK par microscopie de fluorescence classique. Ce composé permet donc une localisation subcellulaire des vésicules de sécrétion.

5.4.1) FFNs dont l'émission de fluorescence dépend du pH

Le fort engouement pour les FFNs ne tient pas seulement au fait qu'ils conservent en partie les propriétés structurales de leur « parent » naturel. L'intérêt qu'ils suscitent pour des études de neurotransmission¹⁴⁸ et de communication cellulaire par détection optique¹⁴⁹ tient à la fluorescence « pH-dépendante » de certains membres de la famille. Rappelons que le pH vésiculaire étant bien plus acide (pH de 5,5) que celui du milieu extracellulaire (pH de 7,4), une sonde dont la fluorescence augmente avec le pH permet non seulement de visualiser la vésicule dans le cytoplasme mais aussi la libération sous forme de « flashes » (comme explicité au sein du paragraphe 2.4.1). Sur le modèle de FFN511, une famille de 14 molécules pH-dépendantes, dont certaines sont reconnues par VMAT2 et internalisées par les vésicules de sécrétion de cellules HEK et PC12⁹⁰, a été établie. Ainsi, parmi ces différentes structures, nous pouvons distinguer les molécules dénommées FFN102, FFN202 ou encore FFN201 (anciennement notés « mini » au lieu de FFN dans les premières publications) possédant toutes le noyau coumarine sur leur structure et la ramification éthylamine primaire mais aussi et surtout d'un groupement OH qui va jouer sur la relation entre pH et fluorescence (**Figure I.26**). Au sein de ces travaux, la molécule FFN202 a montré que sa fluorescence était augmentée à pH neutre en raison d'un pKa voisin de 6,4. Internalisée par les cellules PC12, elle est à même d'être utilisée pour mesurer le pH intravésiculaire ($5,88 \pm 0,08$) en mesurant les variations d'intensité de cette dernière par microscopie deux photons^{86,90}. La fluorescence du composé FFN102¹⁵⁰ a également été décrite comme stable et fortement dépendante du pH (pKa = 6,2).⁸⁶ FFN102 est donc aussi un traceur optique sensible au pH¹⁵¹, permettant de visualiser la libération de neurotransmetteurs au niveau des terminaux présynaptiques.

En 2018, un autre composé, FFN270 a été introduit dans la littérature en tant que substrat fluorescent du transporteur de la norépinéphrine et également en tant que substrat du transporteur vésiculaire de monoamine VMAT2. FFN270 marque les neurones noradrénergiques ainsi que leurs vésicules synaptiques et permet de visualiser la dissémination du contenu de ces dernières à partir de sites axonaux spécifiques chez des rongeurs vivants¹⁵². D'autres structures de FFNs ont été imaginées en ne se basant pas cette fois sur le noyau coumarine comme base fluorescente, mais sur la structure acridone (**Figure I.25**), sur laquelle une ramification éthylamine primaire a été ajoutée de façon à

permettre la reconnaissance vésiculaire par VMAT2. Ainsi, FFN54 et FFN246 ont été identifiés comme étant substrats à la fois du transporteur de la sérotonine (SERT) et du transporteur vésiculaire de Monoamine 2 (VMAT2)¹⁵³.

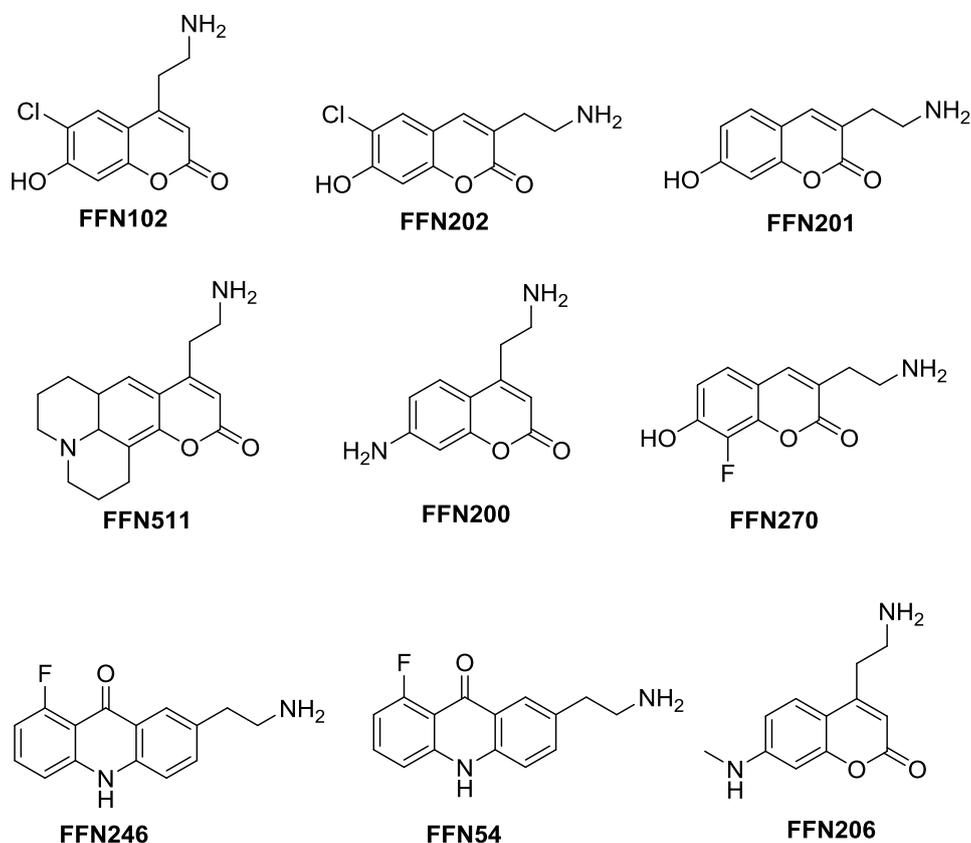


Figure I.26 : Structures moléculaires de quelques FFNs

5.4.2) ***Bilan***

En conclusion, les FFNs, nouvelles sondes optiques émergentes, ont été appliqués avec succès au marquage fluorescent de diverses cellules et organites cellulaires, ainsi qu'au suivi de la libération de neurotransmetteurs lors d'un évènement exocytotique. Le processus de marquage vésiculaire est relativement simple à mettre en place expérimentalement, puisqu'il consiste à incuber des cellules cibles dans des solutions complétées par les sondes FFNs, sans manipulation chimique ou génétique supplémentaire. De plus, ces composés étant considérés comme des substrats préférentiels de VMAT, ils permettent le marquage sélectif des vésicules sécrétrices plutôt que d'autres compartiments cellulaires. Malgré les avantages majeurs de l'utilisation des FFNs en bioanalyse, ces derniers possèdent néanmoins quelques

défauts qu'il convient de prendre en compte. En effet, les longueurs d'onde optimales d'excitation des molécules rapportées à ce jour se situent principalement autour de 370-380 nm. Ceci nécessite des adaptations pour l'utilisation de certaines techniques optiques telles que le TIRFM et la microscopie confocale. En effet, travailler sur matériel biologique à l'aide d'un laser possédant une longueur d'onde proche de l'UV peut entraîner des dommages irréversibles, notamment sur l'ADN cellulaire¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Ceci n'empêche pas une réelle popularité de certains FFNs comme FFN102 qui est désormais utilisé par de nombreux groupes de recherche.

5.5) Etude de l'exocytose par détection couplée Electrochimie-Microscopie de Fluorescence : FFN102 au laboratoire

5.5.1) Historique

Il apparaît nettement que les FFNs ont été conçus uniquement pour une détection optique et un marquage sélectif des vésicules de sécrétion. Toutefois, la structure phénolique commune à certains FFNs semble les rendre compatibles avec une détection électrochimique, le phénol étant une espèce électroactive. A ce titre, le composé FFN102 semble posséder, non seulement les caractéristiques optiques nécessaires pour le suivi des vésicules de sécrétion par microscopie, mais également une possible électroactivité du fait de la présence d'un groupement hydroxyle sur sa structure. Un tel comportement « dual » pourrait, par le biais d'une sonde électro-fluorescente unique, résoudre en partie les problèmes rencontrés lors du doctorat d'Anne MEUNIER (2008-2011)³³ où la détection de l'exocytose vésiculaire par couplage Ampérométrie - TIRFM était limitée par l'apparition d'évènements dits « orphelins » (pics ampérométriques découplés de signaux optiques fluorescents et inversement) du fait de l'absence de contrôle de chargement des deux sondes indépendantes fluorescente (GFP) et électroactive (sérotonine) au sein des vésicules sécrétrices.

Dans ce contexte, la molécule FFN102 a été étudiée au laboratoire de manière approfondie de façon à compléter les informations optiques (longueur d'onde d'excitation, d'émission...) par des informations biologiques (aptitude à être internalisée par les vésicules des modèles cellulaires du laboratoire) et électrochimiques (potentiel d'oxydation...). En résumé, FFN102 possède une fluorescence dépendante du pH et adaptée à la visualisation de l'exocytose par microscopie. Avec un pK_a de 6,4 pour la fonction hydroxyle, la

fluorescence modérée de la forme acide permet de suivre les vésicules (pH interne de 5,5) dans le cytoplasme puis la libération de leur contenu sous forme d'un flash en raison d'une fluorescence intense de la forme basique dans le milieu extracellulaire (pH de 7,4). L'électroactivité du composé FFN102 a été ensuite démontrée sur électrodes et ultramicroélectrodes d'ITO et de carbone. Par ailleurs, la capacité de ce dernier à être internalisé au sein de vésicules de différentes lignées cellulaires BON N13 et PC12 a également été attestée^{157,158}. L'utilisation de cette sonde unique optique et électrochimique pour le suivi de l'exocytose a ensuite été validée^{157,159} dans le cadre du couplage Ampérométrie-TIRFM sur microdispositifs d'ITO. Un résultat marquant est la chute du pourcentage d'orphelins puisque le pourcentage d'événements couplés passe de 22 à 34%^{86,159}.

Cependant, FFN102 possède une longueur d'onde d'excitation λ_{ex} de 371 nm (ce qui reste assez éloigné de la longueur d'onde du laser utilisé au laboratoire pour les expériences de TIRFM, qui s'élève à 405 nm). De plus, l'oxydation de ce composé se produit à des potentiels très anodiques, de l'ordre de 900 mV *vs* Ag/AgCl sur électrode d'ITO. Le potentiel de détection en ampérométrie est donc élevé et très proche de la fin du domaine d'électroactivité borné par l'oxydation du solvant. Ceci peut donc poser un problème de ligne de base trop élevée qui diminue de fait le rapport signal/bruit. Enfin, dans cette gamme de potentiel, la détection est perturbée par les propriétés semi-conductrices de l'ITO, c'est-à-dire l'apparition d'un photo-courant relatif à l'irradiation du dispositif d'ITO par le laser à 405 nm (pour la détection TIRFM). Ceci génère un saut de courant qui déplace la ligne de base mais aussi et surtout génère un bruit sur le courant détecté qui défavorise la détection électrochimique, puisque les pics ampérométriques peu intenses sont alors « noyés » dans la ligne de base. Ces inconvénients majeurs limitent donc la portée de l'utilisation de FFN102 pour le couplage Ampérométrie-TIRFM pour l'exocytose. Il est donc remarquable qu'en dépit de ces faiblesses analytiques, la détection couplée soit améliorée par rapport à celle mettant en jeu des sondes électroactive et fluorescente indépendantes.

Ceci montre que **la stratégie des FFNs électroactifs est pertinente** mais qu'il est nécessaire d'adapter leur structure aux contraintes analytiques du couplage.

5.5.2) Conclusion

La mise en place d'un couplage Ampérométrie-TIRFM pour le suivi en temps réel de l'exocytose vésiculaire à l'échelle de la cellule unique s'apparente à une longue investigation depuis la mise en évidence des deux techniques il y a plus de 30 ans. Ce couplage nécessite une quantité de contraintes analytiques et biologiques qui ont été levées par différents groupes de recherche dans le monde au fur et à mesure des années. Dans ce cadre, c'est la mise au point d'une sonde électro-fluorescente adaptée qui semble être un des derniers verrous à lever. A ce titre, les « défauts » recensés plus haut du composé FFN102 constituent une base de travail prometteuse pour l'élaboration de nouvelles sondes duales (**Figure I.27**). L'un des axes principaux de ce projet de doctorat réside donc dans la synthèse et le développement d'une nouvelle sonde permettant de palier aux inconvénients de FFN102 pour l'étude de l'exocytose. Ainsi, grâce à la collaboration avec l'équipe du Dr. Laurence GRIMAUD à l'ENS et dans la poursuite du travail de synthèse effectué lors de la thèse de Xiaoqing LIU pour FFN102 (2012-2016), de nouvelles molécules ont été élaborées et synthétisées. La base structurale de FFN102 a été conservée (notamment la structure coumarine responsable des propriétés optiques et également la ramification éthylamine primaire, essentielle pour le passage du FFN du cytoplasme cellulaire vers les vésicules de sécrétion) en ajoutant à cette dernière des groupements électrodonneurs dans le but de modifier la longueur d'excitation mais aussi et surtout d'abaisser significativement le potentiel d'oxydation du composé vers des valeurs moins anodiques.

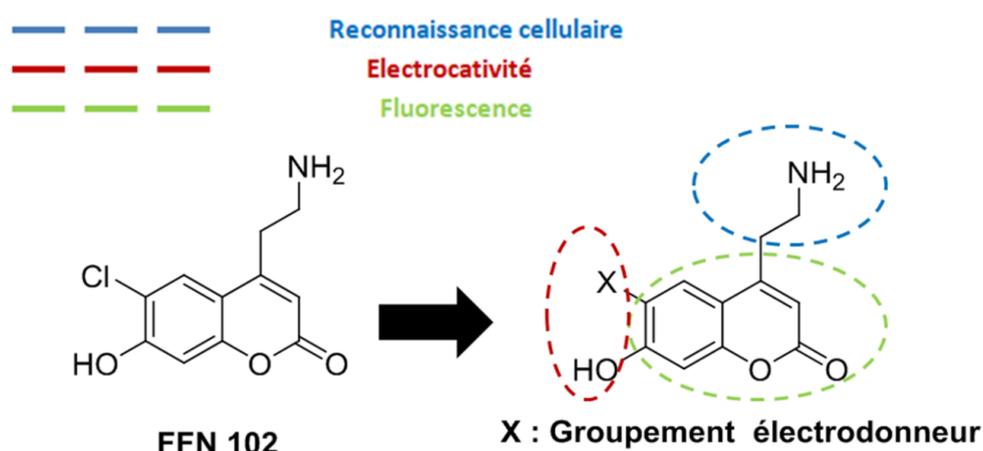


Figure I.27 : Elaboration de nouvelles structures de FFNs pour le suivi de l'exocytose par détection couplée Electrochimie-Microscopie de Fluorescence

Chapitre II : Recherche d'une structure moléculaire adaptée pour l'étude de l'exocytose vésiculaire par détection couplée Electrochimie-Microscopie de Fluorescence

La molécule FFN102, précédemment étudiée au laboratoire comme sonde appropriée pour l'étude de l'exocytose par détection couplée Electrochimie-Microscopie de Fluorescence^{157,159}, constitue une base de travail indispensable pour l'élaboration de nouvelles sondes dans le cadre de ce projet de doctorat. Celles-ci doivent donc respecter trois caractéristiques majeures :

- Une longueur d'onde d'émission de fluorescence dans le domaine du visible (par l'intermédiaire du noyau coumarine) et idéalement déplacée vers le rouge. En effet, il est souhaitable de travailler avec des composés qui émettent à des longueurs d'onde plus élevées que l'UV (et donc dans le rouge), afin d'éviter une dégradation des échantillons et des composants optiques causée par la lumière bleue et sa densité énergétique de rayonnement plus importante.
- Un potentiel d'oxydation relativement bas afin d'éviter une détection proche de la borne positive du domaine d'électroactivité de l'eau. Il est également nécessaire, dans le cadre de cette application, de pouvoir s'affranchir de l'apparition d'un photo-courant généré suite à l'exposition du matériau d'électrode au laser, pendant les expériences de détection couplée, comme observé avec la sonde FFN102⁸⁶.
- La faculté à être internalisée/reconnue par les vésicules de sécrétion cellulaires grâce à la présence d'une ramification éthylamine primaire servant de reconnaissance au transporteur VMAT^{110,115,160}.

Le choix de la molécule la plus appropriée dans ce cadre repose sur une rationalisation des propriétés physico-chimiques pertinentes, mais relève également de la chimie organique dans son ensemble, allant de la réflexion du design de la molécule ciblée jusqu'à sa synthèse. Le travail de design et de synthèse a été réalisé par nos collègues, le Dr. Laurence GRIMAUD et Na PAN (LBM, UMR 7203) et a permis la réalisation des investigations analytiques menées dans le cadre de ce projet de thèse. Les études répertoriées au sein de ce

manuscrit concernent bien évidemment les travaux en aval de la synthèse de ces entités, mais il a été choisi d'inclure au sein de la partie expérimentale les protocoles succincts de synthèse ainsi que quelques considérations mécanistiques afin de refléter l'importance de cet aspect dans le cadre général du projet.

Dans ce contexte, ce chapitre répertorie les analyses électrochimiques, spectroscopiques ainsi que biologiques, effectuées sur les différents composés imaginés et synthétisés en vue de l'étude de l'étude de l'exocytose par détection couplée Electrochimie-Microscopie de Fluorescence.

1) **FFN21**

L'un des inconvénients lié à l'utilisation de FFN102 (thèse de Xiaoqing LIU⁸⁶) pour l'étude par détection couplée de l'exocytose résidait dans sa faible longueur d'onde d'excitation ($\lambda = 371$ nm), assez éloignée de la longueur d'onde du laser la plus faible disponible au laboratoire pour les expériences de microscopie, à savoir 405 nm. Afin d'augmenter la longueur d'onde d'absorption vers les valeurs plus élevées¹⁶¹, un groupement triazole a été ajouté à la structure de la molécule FFN102 pour obtenir une structure dénommée **FFN21**.

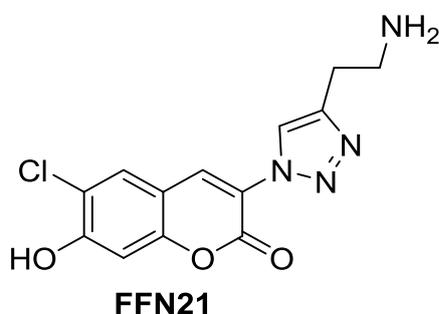


Figure II.1 : Structure chimique de la molécule FFN21

1.1) **Propriétés optiques**

Le spectre d'absorption UV-vis a été mesuré avec un spectrophotomètre Cary 300 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). L'échantillon a été placé dans une cuvette de quartz Hellma (1x1 cm – contenance de 3 mL) thermo-régulée à 293K. Les mesures de fluorescence ont quant à elles également été réalisées à 293K, à l'aide d'un

spectrophotomètre QuantaMaster (PTI Monmouth Junction, NJ) équipé d'un porte-cuve TLC50 (Quantum Northwest). L'échantillon est alors introduit au sein de cuves en quartz Hellma de plus petit volume (3x3 mm – contenance de 54 μL). Ces mesures spectroscopiques ont été répétées à l'identique pour les différents FFNs présentés au sein de ce chapitre. La longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption de la sonde **FFN21** a été déterminée et le spectre d'émission de fluorescence de cette molécule a également été mesuré en solution de tampon phosphate salin (PBS) à $\text{pH} = 7,4$. Les résultats obtenus sont présentés en **Figure II.2**.

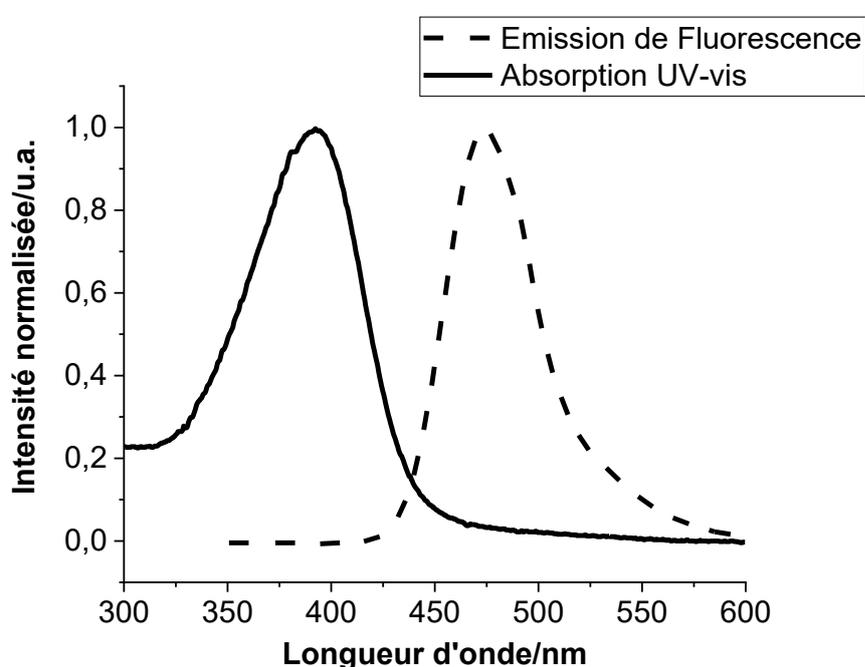


Figure II.2 : Spectres d'émission de fluorescence ($\lambda_{em} = 474 \text{ nm}$) et d'absorption UV-vis ($\lambda_{ex} = 393 \text{ nm}$) obtenus pour $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de composé FFN21 dissous en solution de PBS ($\text{pH} = 7,4$)

Une augmentation de la longueur d'onde du maximum d'absorption de 22 nm par rapport à FFN102 a été obtenue ($\lambda_{ex} = 393 \text{ nm}$ pour **FFN21**, se rapprochant de la longueur d'onde du laser utilisé au laboratoire (405 nm)), ainsi qu'une augmentation de la longueur d'onde du maximum d'émission de fluorescence de 18 nm. ($\lambda_{em} = 474 \text{ nm}$ pour FFN21 et $\lambda_{em} = 456 \text{ nm}$ pour FFN102 dans les mêmes conditions expérimentales). Au vu de ces résultats, **FFN21** présente donc, en première analyse, des caractéristiques optiques plus adaptées

pour une observation en microscopie de fluorescence avec le matériel disponible au laboratoire.

1.2) Comportement électrochimique

Une étude en voltammétrie cyclique a été menée sur ultramicroélectrode (UME) en fibre de carbone ($d=10\ \mu\text{m}$) via l'utilisation d'un potentiostat bas courant (Picostat EA 162 eDAQ – Logiciel EChem 2.0.12). Un montage classique à trois électrodes a été utilisé pour l'étude électrochimique de tous les FFNs de ce chapitre : l'électrode de référence est Ag/AgCl, la contre électrode est un fil de platine et l'électrode de travail est une UME en fibre de carbone. Ainsi, un potentiel d'oxydation de 740 mV *vs* Ag/AgCl a pu être déterminé pour la sonde **FFN21** (**Figure II.3**). Ce dernier, plus faible que celui établi pour le FFN102 (900 mV *vs* Ag/AgCl), demeure encore très proche de la borne d'électroactivité du solvant pour les potentiels anodiques. De plus, cette valeur reste problématique pour une détection sur ITO puisque le potentiel à appliquer en chronoampérométrie (au moins supérieur de 100 mV au potentiel de pic) restera dans la gamme qui fait apparaître un photo-courant parasite (**Chapitre IV** et **Tableau II.1**).

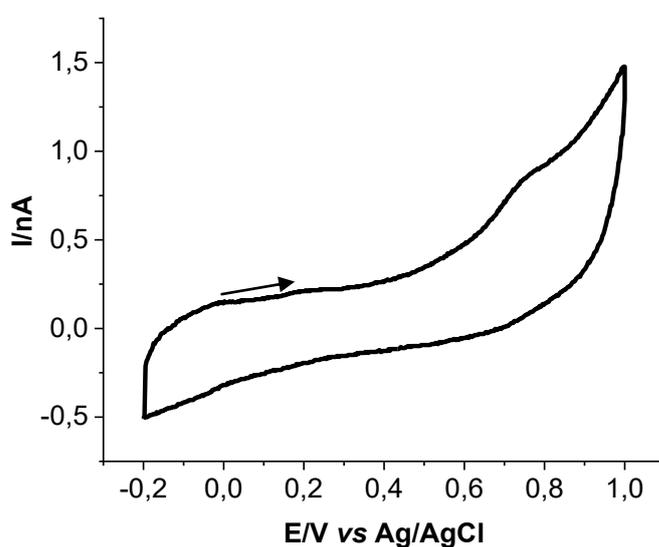


Figure II.3 : Voltammogramme obtenu pour $500\ \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN21 en milieu PBS (pH = 7,4) sur UME en fibre de carbone ($d= 10\ \mu\text{m}$) à $50\ \text{mV.s}^{-1}$. $E_i = -0,2\ \text{V vs Ag/AgCl}$

1.3) Test d'internalisation vésiculaire

Des tests d'internalisation sur cellules BON N13 ont également été effectués avec ce composé, afin d'attester ou non de son internalisation par les vésicules cellulaires. Les cellules ont été incubées pendant 30 minutes avec une concentration de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en **FFN21**. Les échantillons cellulaires ont été observés 24 heures après leur préparation (préparation explicitée en **Partie Expérimentale** section 4.3) et aucune émission de fluorescence n'a pu être observée. Il semble donc que le composé **FFN21** ne puisse être internalisé par les vésicules de sécrétion, car ces dernières ne sont pas observables en épifluorescence.

1.4) Bilan

La modification structurale du composé FFN102, à travers l'ajout d'une fonction triazole en position 4 du cycle de la coumarine (**Figure II.1**) permet d'optimiser la fluorescence et de décaler l'excitation vers des valeurs plus proches de la longueur d'onde du laser utilisé au laboratoire pour les manipulations couplées. Toutefois, contrairement à FFN102, le composé **FFN21** ne semble pas être internalisé au sein des vésicules des modèles cellulaires considérés. Ceci montre que le groupement amine primaire n'est pas suffisant pour la reconnaissance cellulaire, mais que la longueur et/ou nature de la ramification éthylamine est également cruciale (le groupement triazole présent sur la structure altérant vraisemblablement la reconnaissance vésiculaire). *Même s'il est prudent de ne pas généraliser, cette étude suggère que modifier la ramification éthylamine afin d'améliorer les propriétés optiques n'est pas l'orientation à privilégier en l'état.*

2) FFN132

Face à la difficulté d'améliorer en premier lieu les propriétés optiques, nous nous sommes consacrés à la seconde modification possible à effectuer sur la structure moléculaire, à savoir abaisser le potentiel d'oxydation. Dans ce contexte, une molécule notée **FFN132** a été synthétisée en remplaçant le groupement chlore de la structure de FFN102 par un second groupement hydroxyle (**Figure II.4**). Afin de faciliter la synthèse de ce composé et de pouvoir rapidement attester si la stratégie envisagée est pertinente, la fonction amine n'a pas été ajoutée à la structure dans un premier temps.

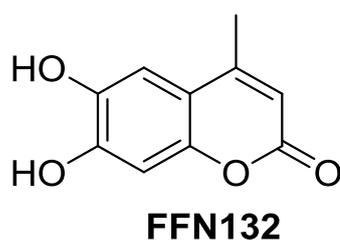


Figure II.4 : Structure moléculaire du composé FFN132

2.1) Détermination du potentiel d'oxydation de la molécule FFN132

Le potentiel d'oxydation de ce composé a été déterminé sur UME de carbone et s'élève à 260 mV *vs* Ag/AgCl (**Figure II.5**). Cela représente une baisse de 640 mV par rapport au potentiel d'oxydation de FFN102 dans les mêmes conditions. Ceci est probablement dû au remplacement du groupement chlore par un groupement hydroxyle, électroactif et plus électrodonneur sur la structure de la coumarine (se référer à la section 3 de ce chapitre, consacrée à la molécule **FFN42**).

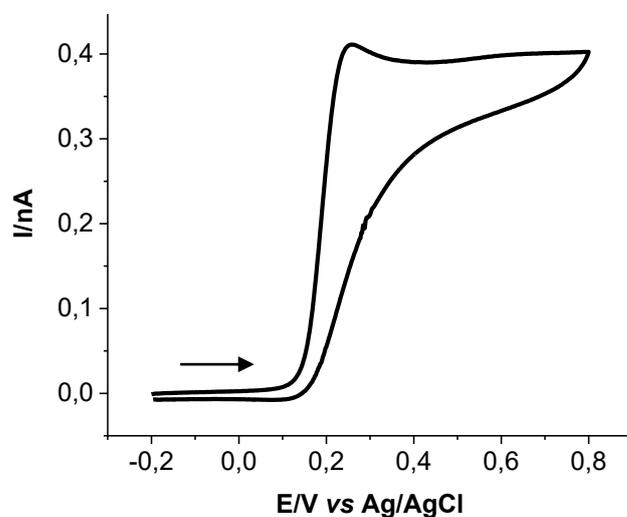


Figure II.5 : Voltammogramme obtenu pour 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN132 en milieu PBS (pH = 7,4) sur UME en fibre de carbone ($d = 10 \mu\text{m}$) à 100 mV.s^{-1} . $E_i = -0,2 \text{ V vs Ag/AgCl}$

2.2) Propriétés optiques de la molécule FFN132

Les spectres d'absorption UV-visible et d'émission de Fluorescence de la sonde **FFN132** ont été mesurés, en solution de tampon phosphate salin (PBS) à pH = 7,4 et sont présentés en **Figure II.6**

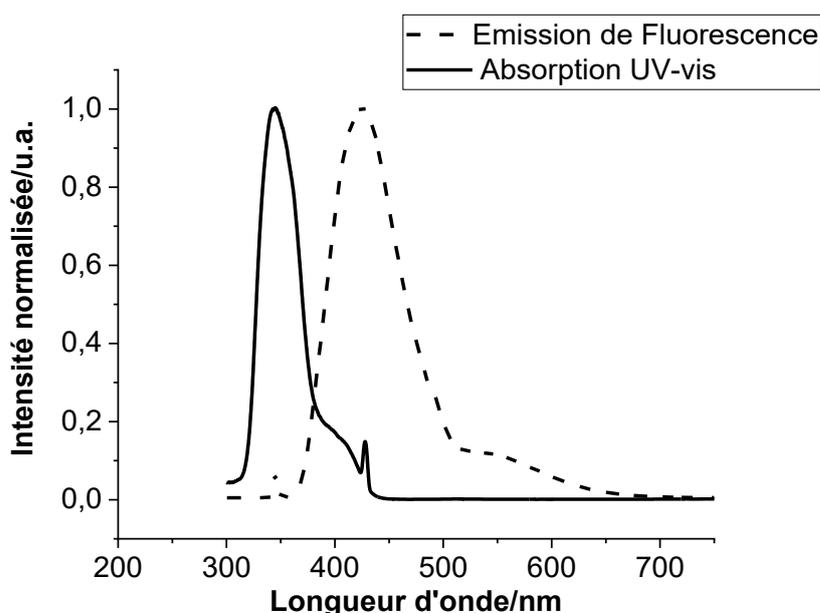


Figure II.6 : Spectres d'émission de fluorescence ($\lambda_{em} = 423$ nm) et d'absorption UV-vis ($\lambda_{ex} = 344$ nm) obtenus pour $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de composé FFN132 dissous en solution de PBS (pH = 7,4)

Le maximum d'absorption de la molécule dans le domaine du visible est obtenu pour une longueur d'onde de 344 nm et le maximum d'émission de fluorescence est atteint pour une longueur d'onde de 423 nm. Ces données sont donc en l'état plutôt décevantes, mais il est nécessaire de garder à l'esprit qu'elles concernent la structure de la coumarine incomplète et ne sont donc que peu probantes.

2.3) Bilan

Au regard des différentes expériences effectuées, il apparaît que la modification de la ramification éthylamine permet d'améliorer la détection optique mais inhibe les propriétés d'internalisation de la sonde. Par ailleurs, le composé **FFN132** représente, par le remplacement de $-\text{Cl}$ par $-\text{OH}$, une orientation intéressante pour notre application puisque son potentiel d'oxydation bien moins anodique que celui répertorié pour FFN102

(**Tableau II.1**), permet vraisemblablement de pouvoir s'affranchir du photo-courant résiduel malheureusement généré lors des expériences avec FFN102 sur ITO.

Cependant, la longueur d'absorption du composé **FFN132** reste trop basse et éloignée de la longueur d'onde du laser disponible au laboratoire, ce qui rend inintéressante cette structure pour la détection optique. Il est de toute façon évident que **FFN132**, qui ne présente pas la ramification éthylamine, ne peut être la sonde finale mais une simple étape dans son « *design* ». Il est en effet peu probable qu'en l'absence du groupement $(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$, **FFN132** puisse être reconnu et internalisé (il a été montré que le remplacement de $(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ par $(\text{CH}_2)\text{Cl}$ dans FFN102 faisait perdre en totalité la faculté à être internalisé⁵² au sein des cellules BON N13).

Nous avons donc choisi de considérer en priorité la détection électrochimique sur la base de la structure probante de **FFN132**, et de rajouter la ramification éthylamine sur cette dernière afin de pouvoir étudier l'internalisation cellulaire.

3) **FFN42**

La molécule **FFN42** (dont la structure est présentée en **Figure II.7**) possède la même structure moléculaire que la sonde **FFN132**, à laquelle a été ajoutée une ramification éthylamine, dans le but de conserver les propriétés d'internalisation vésiculaire.

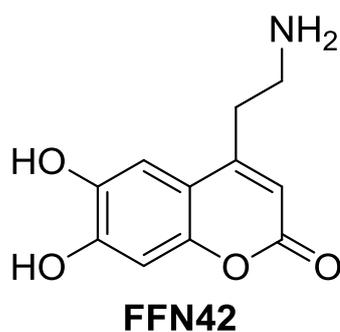


Figure II.7 : Structure moléculaire de la sonde FFN42

3.1) Comportement électrochimique

3.1.1) Détermination du potentiel d'oxydation sur différents matériaux d'électrode

Le potentiel d'oxydation de FFN42 a été déterminé sur UME de carbone (entre -0,2 V et 0,6 V *vs* Ag/AgCl ; **Figure II.8 A.**) et sur électrode d'ITO (entre 0,1V et 0,6 V *vs* Ag/AgCl ; **Figure II.8 B.**).

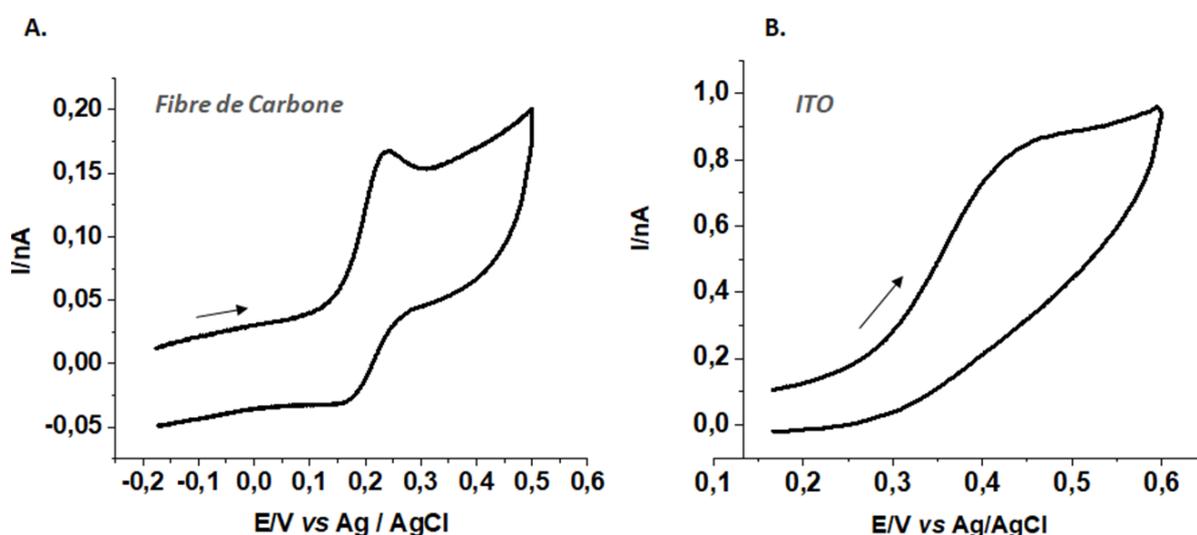


Figure II.8 : Voltammogrammes obtenus pour 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de FFN42 en milieu PBS (pH = 7,4)
 A) Sur UME en fibre de carbone ($d = 10 \mu\text{m}$) à 200 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. $E_i = -0,2 \text{ V vs Ag/AgCl}$
 B) Sur électrode d'ITO ($d = 150 \mu\text{m}$) à 200 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. $E_i = 0,1 \text{ V vs Ag/AgCl}$

Le potentiel d'oxydation sur fibre de carbone est de 240 mV *vs* Ag/AgCl et celui sur électrode d'ITO se situe à 450 mV *vs* Ag/AgCl ; ce sont des potentiels d'oxydation moins anodiques que ceux répertoriés pour FFN102 sur les mêmes matériaux d'électrode (gain de 420 mV sur fibre de carbone et de 450 mV sur ITO). Le fait que le potentiel d'oxydation soit plus élevé sur ITO est habituel pour ce type de structure. L'ITO est en effet un semi-conducteur et correspond à un matériau pour lequel la vitesse du transfert de charge est plus lente que sur carbone^{162,163}. Par ailleurs, l'ITO est considéré comme souvent plus sensible à l'absorption des produits secondaires dus à l'oxydation des catécholamines^{126,164}. Il a également été montré dans la littérature que l'adsorption des ions phosphates (contenus dans la tampon PBS) pouvait également engendrer une modification du comportement

électrochimique de certaines espèces à sa surface de l'électrode d'ITO¹⁶⁵ et dans certains cas bloquer le transfert électronique direct pour certaines protéines¹⁶⁶.

Quoi qu'il en soit, le gain obtenu respectivement pour l'oxydation de **FFN42** par rapport à FFN102 résulte nécessairement du remplacement du chlore par un second groupement hydroxyle en position 6 du noyau de la coumarine. Ce nouveau groupement, possédant un caractère électrodonneur plus marqué, favorise l'oxydation de la structure. Il est également intéressant de souligner que **FFN42** possède une valeur de potentiel d'oxydation sur électrode de carbone globalement plus basse que celles répertoriées pour les neurotransmetteurs endogènes généralement détectés par électrochimie (**Tableau II.1**).

<u>Neurotransmetteur</u>	<u>Potentiel d'oxydation sur fibre de carbone (vs Ag/AgCl)</u>	<u>Références</u>
Dopamine	300-650 mV	167,168
Epinéphrine	550-650 mV	169,170
Sérotonine	400-550 mV	171,172
FFN102	850 mV	159
FFN42	240 mV	Ce travail ¹⁷³

Tableau II.1 : Liste des potentiels d'oxydation de différents neurotransmetteurs sur fibre de carbone

Ce tableau répertorie les gammes de potentiels d'oxydation obtenus en voltammétrie cyclique de plusieurs neurotransmetteurs. Il est important de spécifier qu'en raison du comportement électrochimique de ces structures qui demeure assez singulier (schéma carré incluant des transferts électroniques et de protons, absorption possible (**Figure II.18**)), les grandeurs tabulées ci-dessous dépendent fortement de la concentration et du pH. Ici, uniquement les données à pH 7,4 ont été considérées, bien que les concentrations employées puissent différer pour les références citées.

Quoi qu'il en soit, cette faible valeur de potentiel d'oxydation pour **FFN42** est un atout supplémentaire (par rapport au problème de courants parasites sur ITO à fort potentiel appliqué, ce qui permettra vraisemblablement de diminuer le bruit électrique) puisqu'elle offre également la possibilité de ne pas se limiter à des lignées cellulaires « vides » de neurotransmetteurs endogènes électroactifs. Dans ce cas, aucune interférence ne devrait

survenir, puisqu'à 240 mV *vs* Ag/AgCl, seul **FFN42** sera oxydé à la surface de l'électrode. Cette diversité potentielle de l'objet d'étude biologique est d'une grande importance, les propriétés de l'exocytose étant fortement dépendantes du modèle cellulaire¹⁴.

3.1.2) Passivation de la surface de l'électrode

Lors des expériences de voltammétrie cyclique avec le composé **FFN42**, une perte de courant a été observée entre chaque cycle comme le révèle la **Figure II.9** ci-dessous. Une perte de 50 % en moyenne est constatée entre chaque cycle (pour la **Figure II.9**, une perte de 54% a été mesurée entre le premier et le deuxième cycle, puis de 45% entre le second et le troisième et enfin de 54% entre le troisième et le quatrième). Cette diminution du courant maximal est probablement due à la perte de surface active de l'électrode suite à l'adsorption du ou des produits électrogénérés lors du processus d'oxydation du composé **FFN42**. Ce phénomène de passivation de l'électrode avait également été observé pour le processus d'oxydation de la molécule **FFN102**⁸⁶.

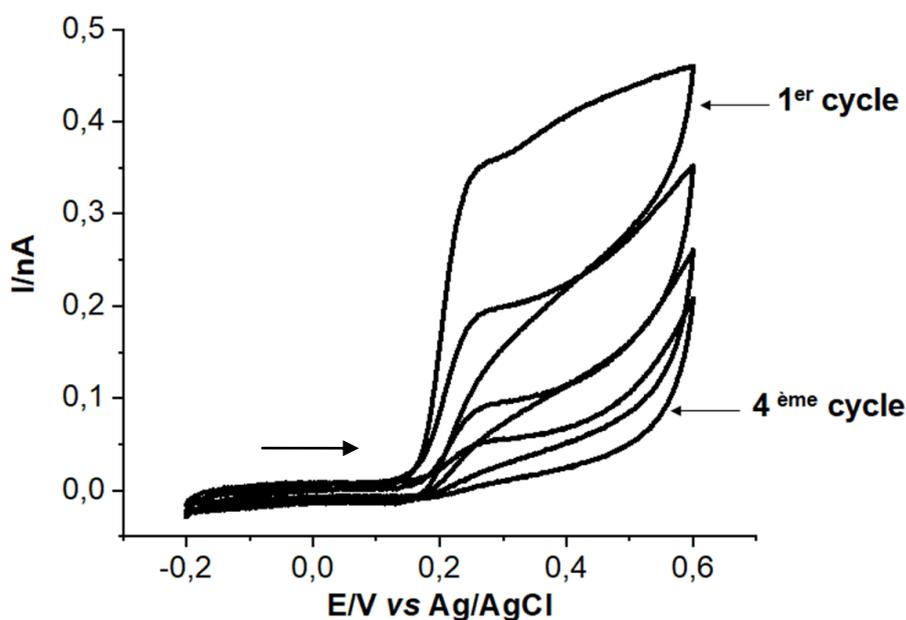


Figure II.9 : Succession de 4 cycles consécutifs obtenus en voltammétrie cyclique sur CFE pour une solution de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de **FFN42**, PBS (pH = 7,4) à une vitesse de 200 mV.s^{-1} . $E_i = -0,2 \text{ V vs Ag/AgCl}$

Cependant, contrairement à ce qui avait été étudiée pour la molécule FFN102 (où une forte absorption chimique a été observée), l'adsorption du composé **FFN42** est générée de façon majoritairement électrochimique. Nous avons en effet pu vérifier cette caractéristique par voltammétrie cyclique, en effectuant un balayage en potentiel d'une solution contenant $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Ferrocène-méthanol (FcMeOH) sur UME en fibre de carbone avant, puis après avoir placé la surface de cette dernière dans une solution concentrée à $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en **FFN42**.

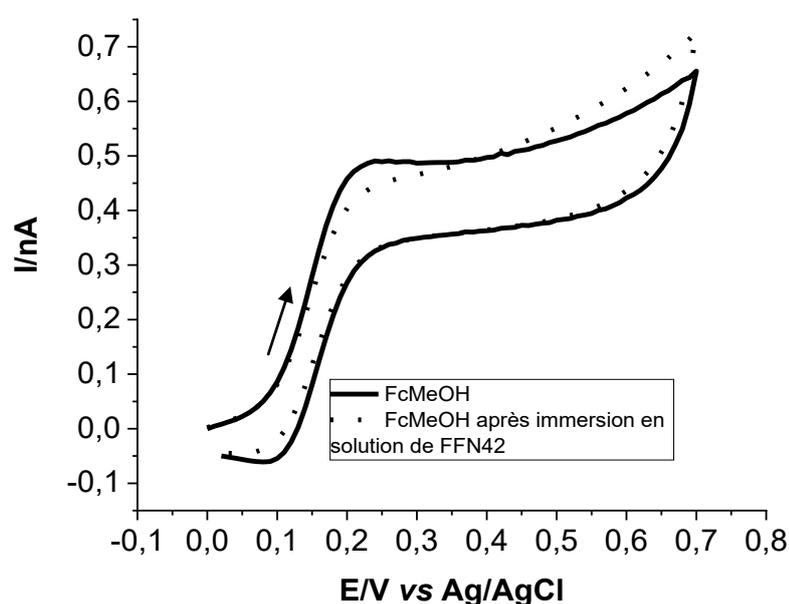


Figure II.10 : Superposition des voltammogrammes obtenus sur CFE pour $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FcMeOH en milieu PBS (pH = 7,4) à une vitesse de 100 mV.s^{-1} , avant et après immersion en solution de FFN42. $E_i = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}$

Comme le révèle la **Figure II.10**, la modification du voltammogramme du ferrocène-méthanol est très faible (8% de diminution de l'intensité du plateau) par rapport à celle mise en jeu lors de l'acquisition des voltammogrammes. Cela montre que l'absorption de la molécule à la surface de l'électrode n'est pas de nature chimique (elle ne se fait pas de façon spontanée), mais essentiellement électrochimique (elle nécessite l'imposition d'un potentiel). La nature ainsi que le mécanisme d'adsorption de ce composé n'ont néanmoins pas fait l'objet d'une investigation plus poussée, mais sont globalement cohérentes à ce stade avec le comportement électrochimique des catécholamines comme la dopamine où le

produit d'oxydation bi-électronique peut être impliqué dans des réactions de cyclisation et/ou de polymérisation¹⁷⁴⁻¹⁷⁶.

Il est nécessaire de souligner que ce phénomène de passivation ne remet pas en question l'utilisation de la molécule FFN42 pour l'étude électrochimique de l'exocytose. Les conditions voltampérométriques et ampérométriques ne sont pas équivalentes (solution non dynamique pour la voltammétrie cyclique, ainsi que différentes échelles temporelles et spatiales pour les deux techniques). Ainsi, la dopamine et la sérotonine sont deux neurotransmetteurs couramment utilisés pour l'étude de l'exocytose par ampérométrie, bien que ces derniers présentent une passivation élevée à la surface des électrodes de travail utilisées lors des expériences en voltammétrie cyclique¹⁷⁷⁻¹⁷⁹.

3.1.3) Mécanisme d'oxydation du composé FFN42

En raison de sa structure de type catéchol, un mécanisme d'oxydation (préalable à une possible adsorption de produits d'oxydation et/ou polymérisation) impliquant un échange de deux électrons et de deux protons ($2e^-/2H^+$) est attendu pour **FFN42**. Même si cela peut sembler évident, il est nécessaire de déterminer le nombre d'électrons échangés lors de l'oxydation de **FFN42** pour s'assurer du caractère bi-électronique ou non du processus. Ceci peut être réalisé à partir de deux mesures électrochimiques indépendantes (méthodes en régime transitoire et en régime stationnaire). Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Pr. Eric LABBE et le Dr. Olivier BURIEZ (UMR 8640). Le principe consiste à étudier les équations liées au courant et à calculer des paramètres inconnus (à savoir le coefficient de diffusion « **D** » et le nombre d'électrons « **n** » impliqués dans le processus électrochimique de type **Ox + ne⁻ = Red**) à partir de paramètres contrôlés (concentration, surface d'électrode, vitesse de balayage). Ceci repose donc sur l'utilisation de techniques électrochimiques pour lesquelles les deux inconnues **n** et **D** présentent des dépendances différentes dans les équations liées au courant faradique¹⁸⁰. En pratique, une technique transitoire (voltammétrie cyclique sur une électrode millimétrique statique) et une technique à l'état stationnaire (ici une électrode à disque tournant (« *Rotating Disk Electrode* » / RDE) sont associées. En voltammétrie cyclique (**Figure II.11**), l'intensité du courant de pic (courant maximal) est exprimée par la loi de Randles-Sevcik pour un processus contrôlé par la diffusion¹⁸¹.

$$i = 0,446nFAC^*D^{1/2}\left(\frac{nFv}{RT}\right)^{1/2} = 268604n^{3/2}AC^*D^{1/2}v^{1/2} \quad \text{à } 25^\circ\text{C} \quad (1)$$

Avec

A : la surface de l'électrode (cm^2),

D : le coefficient de diffusion ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$),

C^* : la concentration en espèce électroactive ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$),

v : la vitesse de balayage ($\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$)

F : la constante de Faraday ($96500 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$)

La mesure des courants de pic en fonction de la vitesse de balayage permet de déduire la valeur du terme « $n^{3/2}D^{1/2}$ ».

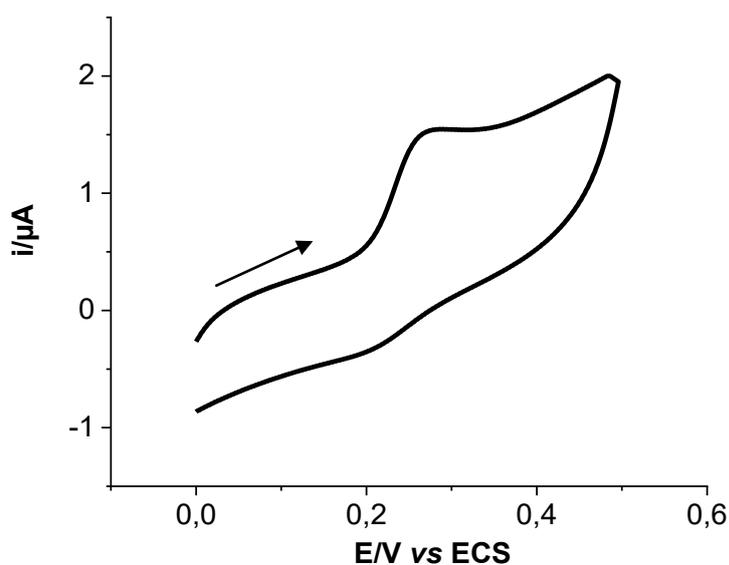


Figure II.11 : Exemple de voltammogramme obtenu pour $75 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de FFN42 dissous dans du PBS ($\text{pH} = 7,4$) sur une électrode de carbone vitreux ($d = 1 \text{ mm}$) à $200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. $E_i = 0,0 \text{ V vs ECS}$

D'autre part, les expériences menées à l'aide de l'électrode tournante (**Figure II.12**) permettent d'accéder à un courant de plateau exprimé selon l'équation de Levich¹⁸⁰.

$$i = 0,62nF\omega^{1/2}v^{-1/6}D^{2/3}C^* \quad (2)$$

Avec

ω : est la vitesse de rotation angulaire de l'électrode (rad.s^{-1})

ν : la viscosité cinématique ($\nu = 10^{-6} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$ pour l'eau)

La mesure des effets de la variation de la vitesse de rotation « ω » sur le plateau de courant permet de déduire la valeur de l'expression du terme « $nD^{2/3}$ ».

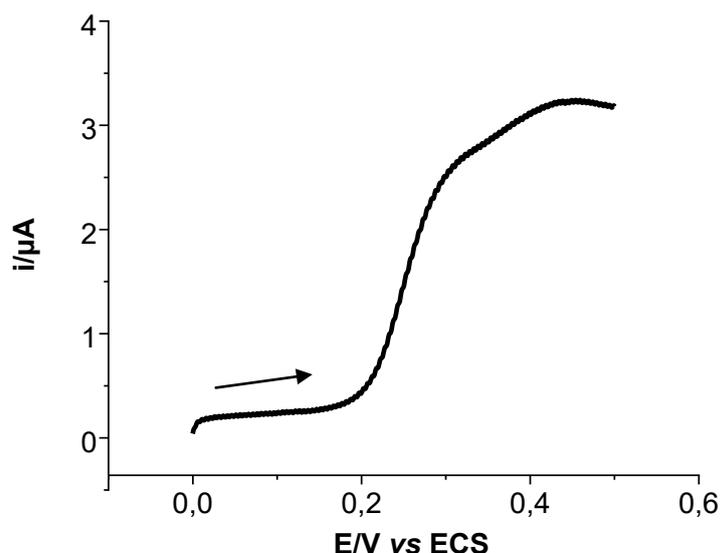


Figure II.12 : Exemple de voltammogramme obtenu pour $75 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN42 dissous dans une solution de PBS (pH = 7,4) sur une électrode tournante de carbone vitreux ($d = 3\text{mm}$) ($\omega = 5000 \text{ rpm}$ et $\nu = 200 \text{ mV.s}^{-1}$). $E_i = 0,0 \text{ V vs ECS}$

Grâce à la combinaison des deux équations (1) et (2), nous avons pu déduire la valeur du nombre d'électrons n échangés durant le processus d'oxydation, qui vaut $n = 2,01$, ainsi que la valeur du coefficient de diffusion D , estimé à $1,99.10^{-5} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle répertoriée pour l'oxydation de la dopamine dans des conditions expérimentales similaires¹⁸² ($D = 0,9.10^{-5} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$ sur des électrodes en fibre de carbone).

S'il peut sembler peu surprenant *a posteriori* que l'oxydation de **FFN42** soit bi-électronique, la connaissance du nombre d'électrons échangés lors de ce processus est un paramètre essentiel permettant de calculer la quantité ou le nombre de molécules libérées (loi de Faraday) lors de l'analyse de signaux exocytotiques obtenus en ampérométrie¹⁴. Il est également à noter que cette oxydation bi-électronique est un gain notable par rapport à

FFN102 dont l'oxydation était mono-électronique¹⁷³. Dans le contexte de la détection ampérométrique de l'exocytose avec **FFN42**, ceci correspond en théorie à un doublement du signal et donc une amélioration de la sensibilité de la détection.

3.1.4) Etude de l'influence du pH de la solution

L'influence du pH sur l'évolution du pic d'oxydation a ensuite été étudiée en réalisant des expériences de voltammétrie cyclique au sein d'une solution de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de **FFN42** (en milieu tampon phosphate salin (PBS)), sur une plage de pH allant de 4,1 à 8,4. Cette série d'expériences a été menée sur UME de carbone à une vitesse de balayage de 200 mV.s^{-1} .

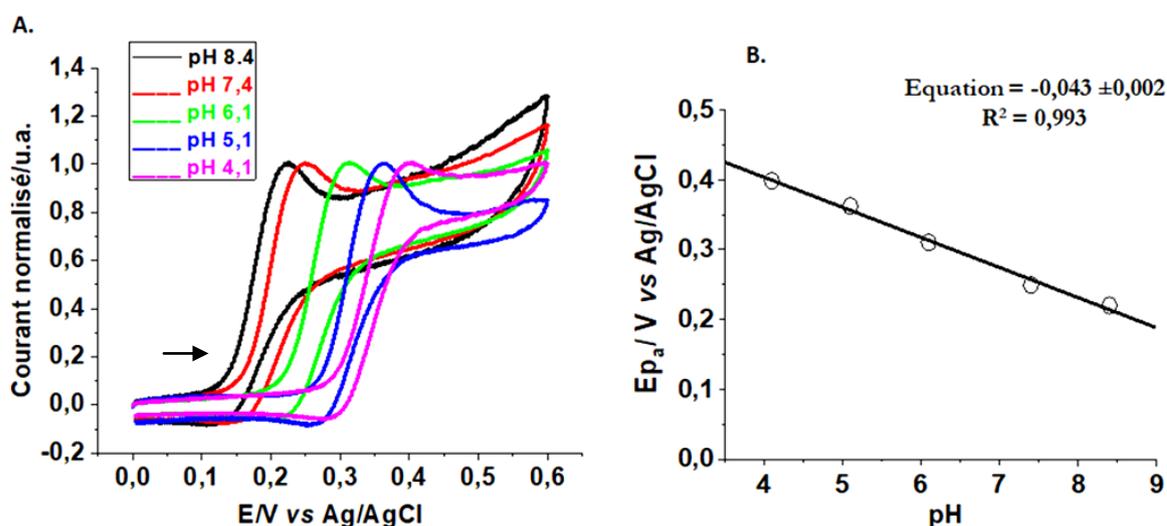


Figure II.13 : A) Voltammogrammes obtenus pour une solution de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN42 dissous dans du PBS, à différents pH pour une vitesse de balayage de 200 mV.s^{-1} . $E_i = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}$
 B) Valeurs de potentiels de pic anodiques obtenus pour l'oxydation de FFN42, par voltammétrie cyclique en fonction du pH

Comme le montre la **Figure II.13 A.**, le pic d'oxydation est déplacé vers des valeurs de potentiels moins anodiques, lorsque la valeur de pH augmente. En d'autres termes, l'oxydation est d'autant plus facile que le pH est basique. Ce résultat suggère que l'oxydation de **FFN42** implique probablement les deux fonctions hydroxyles dont la déprotonation à pH basique augmente la densité électronique sur le cycle aromatique à travers la formation d'anions phénolates. Ceci est en accord avec la littérature pour un composé voisin de **FFN42**, l'Esculetine¹⁸³. Ces deux molécules possèdent par ailleurs un

potentiel d'oxydation très proche comme le montre la **Figure II.14** ($E_a = 225 \text{ mV vs Ag/AgCl}$ pour l'Esculetine).

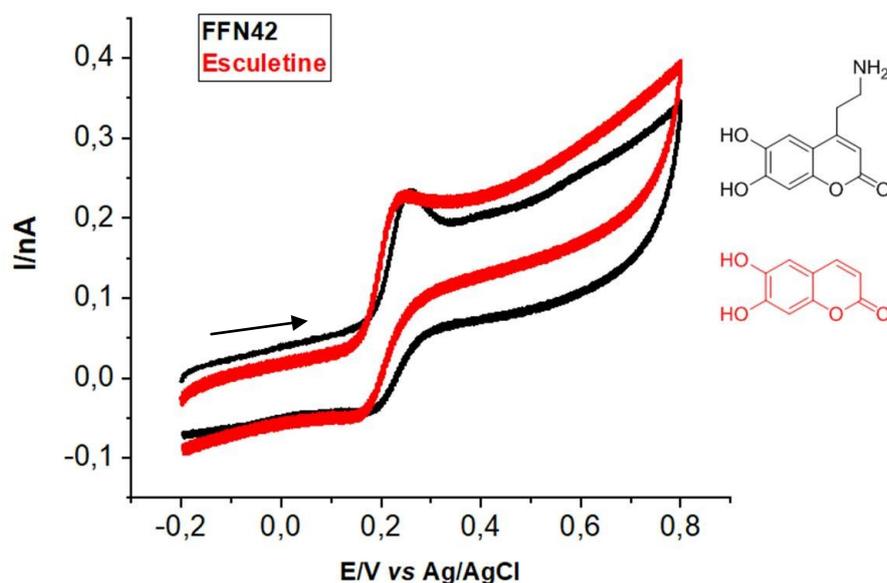


Figure II.14 : Superposition des voltammogrammes obtenus pour $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ d'Esculetine (en rouge) et de FFN42 (en noir) en solution de PBS (pH = 7,4), à 100 mV.s^{-1} . $E_i = -0,2 \text{ V vs Ag/AgCl}$

Le potentiel de pic d'oxydation ($E_{p,a}$) de la molécule **FFN42** a été reporté en fonction du pH sur la **Figure II.13 B**. Une droite a alors été obtenue avec une pente de 43 mV.

Dans le cas général pour un système électrochimique réversible impliquant électrons et protons ($\text{Ox} + n\text{e}^- + m\text{H}^+ = \text{Red}$), la pente attendue est exprimée selon l'équation suivante :

$$\frac{\partial E_{p,a}}{\partial \text{pH}} = -2,3 \frac{mRT}{nF} \sim -59 \frac{m}{n} (\text{mV}) \quad \text{à } 25^\circ\text{C} \quad (3)$$

Pour un processus d'oxydation impliquant un électron et un proton ($m=n=1$, **Equation 3**), la pente attendue est de 59 mV, ce qui est bien le cas pour FFN102^{86,173} comme observé sur la **Figure II.15**.

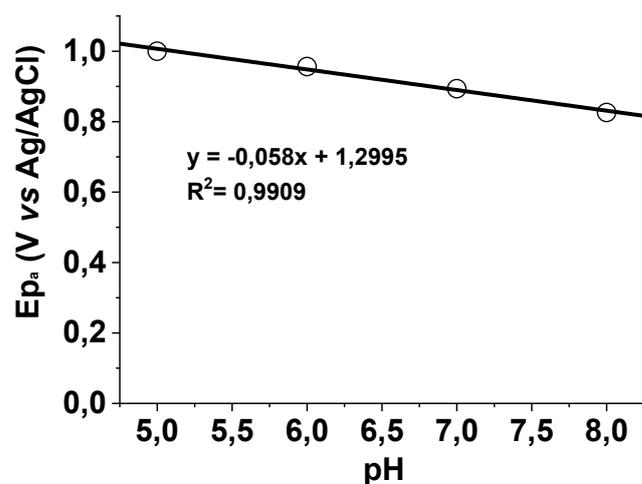


Figure II.15 : Valeurs de potentiels de pic anodiques obtenus pour l'oxydation de FFN102, par voltammétrie cyclique en fonction du pH¹⁷³

Concernant **FFN42**, comme nous l'avons précédemment démontré, deux électrons sont échangés durant le processus d'oxydation. Ceci suggère un processus impliquant deux électrons et deux protons pour l'oxydation du composé **FFN42** ($m = n = 2$; **Figure II.16**).

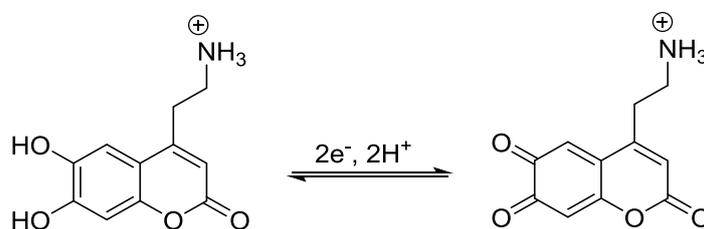


Figure II.16 : Processus d'oxydation supposé pour FFN42

Cependant, la pente attendue dans ce cas (de 59 mV également) n'est pas obtenue. Ce résultat n'est toutefois pas inhabituel pour les structures benzéniques portant des groupements hydroxyles comme les quinols^{184,185}. Cette caractéristique a également été mise en évidence dans les études électrochimiques récentes sur le catéchol¹⁸⁶ (structure présentée en **Figure II.17**).

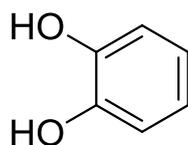


Figure II.17 : Structure moléculaire du catéchol

Le comportement électrochimique ce dernier a été étudié de manière approfondie par le groupe de R. COMPTON (Université d'Oxford). Des analyses théoriques et expérimentales ont montré que l'ensemble du mécanisme d'oxydation implique bel et bien deux électrons ainsi que deux protons de façon globale, mais que ce dernier s'inscrit au sein d'un schéma carré à neuf espèces avec une étape mono-électronique irréversible étant à l'origine du comportement observé. En effet, dans ce cadre mécanistique, différentes pentes allant de 40 à 59 mV en fonction du pH ont été observées. Cette interprétation est en accord avec les deux valeurs de pKa différentes pour le catéchol (9,5 et 12,8 respectivement). A pH acide, l'espèce de départ est doublement protonée et son chemin sur le schéma carré permet « d'éviter » l'étape mono-électronique irréversible et d'obtenir une pente caractéristique à $2e^-$ et $2H^+$, soit 59 mV. Inversement, pour des pH basiques aux alentours de 10-12, l'espèce de départ est déjà déprotonée et mono-anionique. Son chemin sur le schéma carré est alors différent et implique l'étape cinétiquement déterminante d'où une pente (tenant compte de $1H^+$ et d'un nombre d'électrons « apparent ») de 40 mV. Les deux valeurs de pKa obtenues pour les deux groupements -OH de **FFN42** (5,4 et 6,7 respectivement ; détermination des pKas explicitée au sein de la section 3.2.4 de ce chapitre) ne permettent pas un parallèle simple avec l'étude du catéchol car trop proches pour permettre une forte prédominance des formes acide / basique de **FFN42** pour les valeurs de pH utilisées pour cette étude. Il en résulte donc un comportement moyen retranscrit par la relation linéaire entre potentiel de pic anodique et pH dans notre cas. Le mécanisme général d'oxydation de **FFN42** est donc probablement similaire à celui décrit pour le catéchol, c'est-à-dire un processus d'échange à deux électrons et deux protons décrit par un schéma carré comme celui proposé en **Figure II.18**.

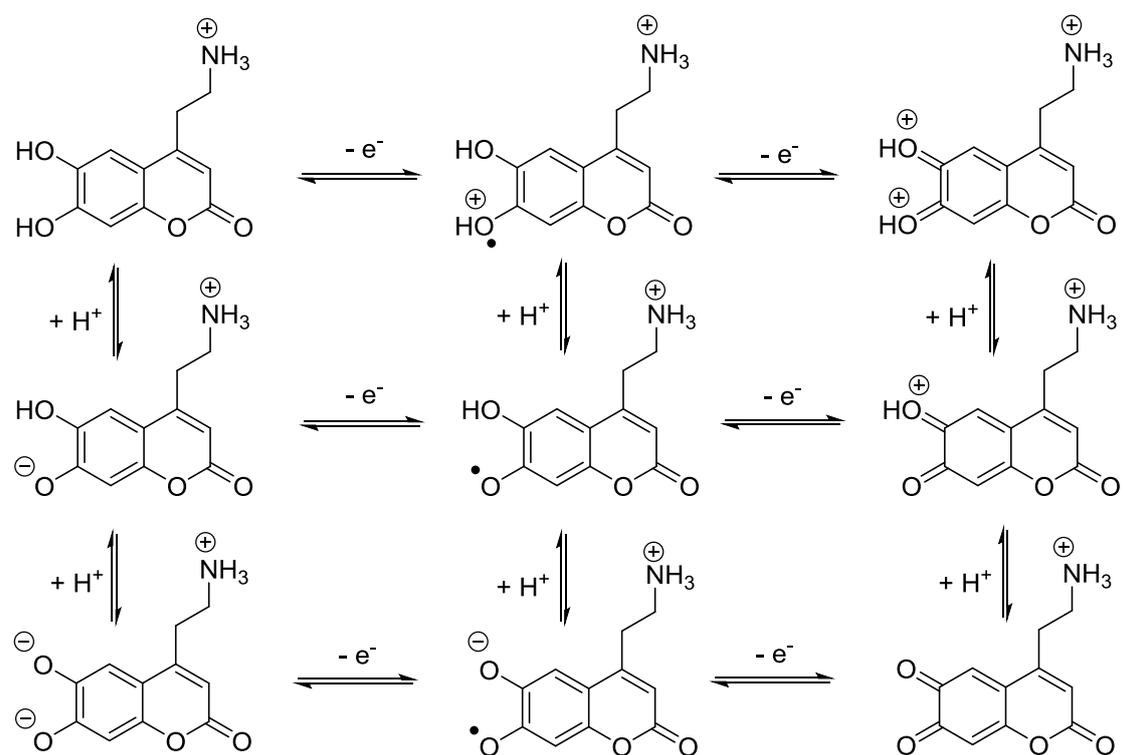


Figure II.18 : Schéma carré possible du processus d'oxydation de FFN42

3.1.5) Influence de la vitesse de balayage

L'influence de la vitesse de balayage sur l'intensité du pic d'oxydation de **FFN42** a également été étudiée en voltammétrie cyclique sur fibre de carbone. Les différents voltammogrammes obtenus pour des vitesses de balayage s'échelonnant de 10 à 500 $mV.s^{-1}$ ont été superposés en **Figure II.19**. Comme nous pouvons le remarquer, l'intensité du pic d'oxydation (I_{p_a}) augmente avec la vitesse de balayage pour les hautes vitesses de balayage (100, 200 et 500 $mV.s^{-1}$) et demeure relativement constante pour les faibles vitesses de balayage (10, 25 et 50 $mV.s^{-1}$).

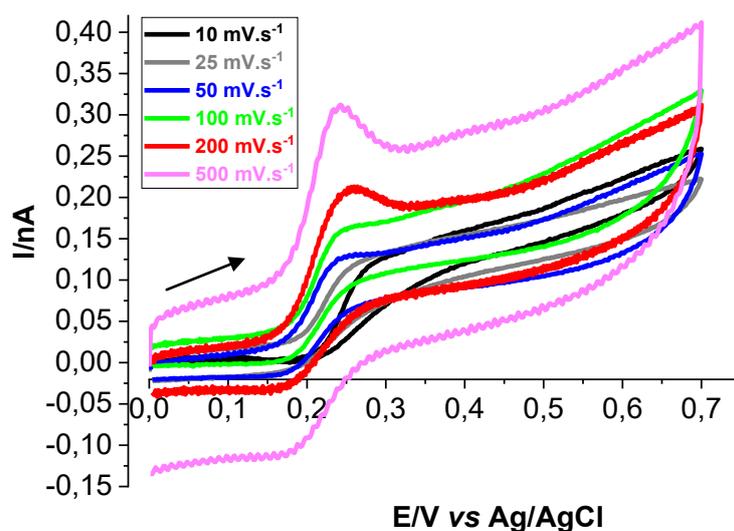


Figure II.19 : Superposition des voltammogrammes obtenus pour une solution de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN42 en solution de PBS (pH = 7,4) sur fibre de carbone, pour différentes vitesses de balayage. $E_i = -0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}$

Les valeurs d'intensité du pic d'oxydation (I_{p_a}) en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage ont été répertoriées en **Figure II.20A**. En **Figure II.20B**, les valeurs d' I_{p_a} ont été reportées en fonction de la vitesse de balayage.

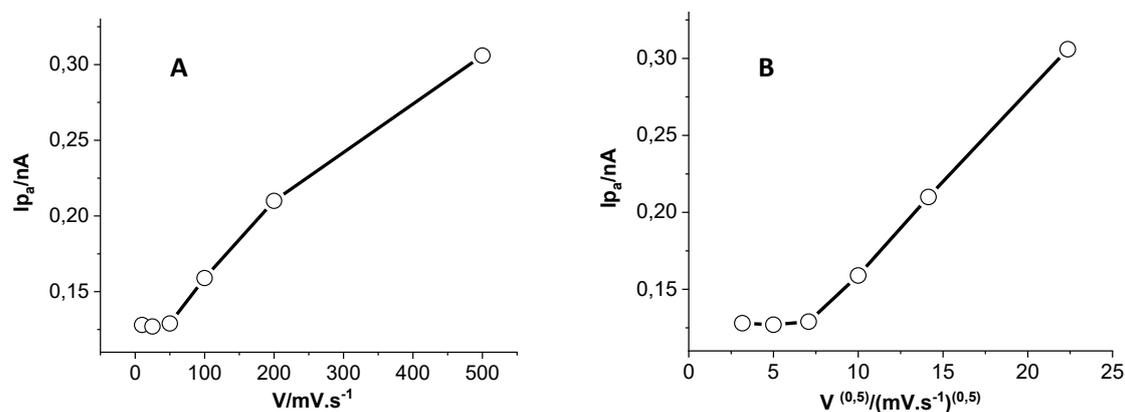


Figure II.20 : A) : $I_{p_a} = f(v)$; B) : $I_{p_a} = f(v)^{0,5}$ pour $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN42 dissous en solution de PBS (pH = 7,4)

D'après ces deux figures, nous pouvons observer deux régimes distincts : un régime régi par l'adsorption pour les faibles vitesses de balayage ($10, 25$ et 50 mV.s^{-1}) et un régime régi par la diffusion pour les plus hautes vitesses de balayage ($100, 200$ et 500 mV.s^{-1}). Lors des

expériences menées pour les faibles vitesses de balayage pour l'oxydation de FFN42, l'échelle de temps permet aux produits d'oxydation d'évoluer vers la formation de structures susceptibles de s'adsorber à la surface de l'électrode et de réduire sa surface active. Pour ce qui est des vitesses de balayage plus importantes, le produit d'oxydation ne possède pas le temps nécessaire pour évoluer chimiquement et est plus rapidement réduit au balayage retour.

3.1.6) Bilan

En conclusion, **FFN42** possède un potentiel d'oxydation bien plus bas que FFN102 (240 mV *vs* Ag/AgCl sur fibre de carbone et 450 mV *vs* Ag/AgCl sur électrode d'ITO), ce qui, pour la détection couplée, est un avantage indéniable permettant d'éviter les zones de potentiel où l'imposition du laser génère un photo-courant, et par conséquent, à terme, de limiter l'apparition d'évènements orphelins lors du couplage. Par ailleurs, il a pu être montré que le processus d'oxydation est bi-électronique. Cette information permettra, lors des études d'exocytose par ampérométrie, d'accéder au nombre de molécules libérées.

D'un point de vue purement électrochimique, le composé **FFN42** semble être un candidat à privilégier pour l'étude de l'exocytose par détection couplée. Ceci conduit donc à étudier plus en détails les caractéristiques optiques de cette sonde pour savoir si elles se différencient de FFN132.

3.2) Propriétés optiques de la sonde FFN42

3.2.1) Spectres d'absorption UV-vis et d'émission de fluorescence

Les spectres d'absorption UV-visible et d'émission de Fluorescence ont été mesurés pour 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de **FFN42** en solution de PBS (pH = 7,4) et sont présentés en **Figure II.21**.

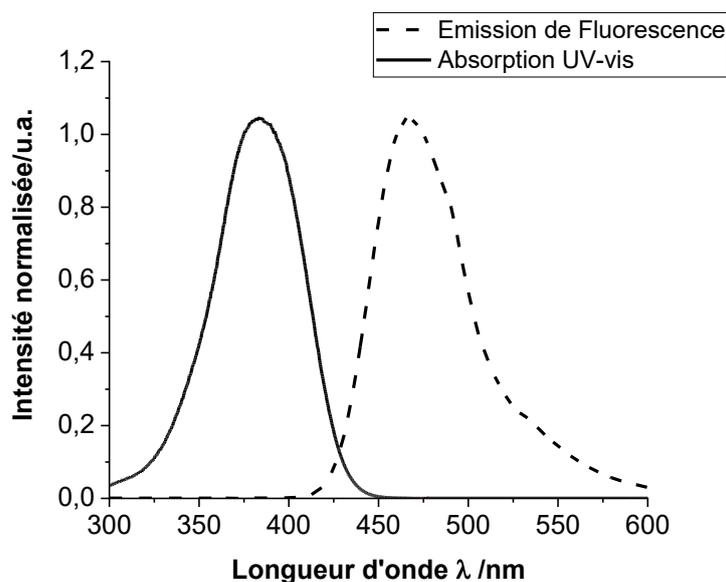


Figure II.21 : Spectres d'émission de fluorescence ($\lambda_{em} = 470$ nm) et d'absorption UV-vis ($\lambda_{ex} = 380$ nm) obtenus pour $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN42 dissous en solution (pH = 7,4)

Dans des conditions de pH physiologique (pH = 7,4), les longueurs d'onde optimales d'excitation et d'émission pour **FFN42** se situent respectivement à 380 nm et 470 nm (**Figure II.21**). Rappelons que concernant FFN102, les longueurs d'onde optimales d'excitation et d'émission étaient situées à 371 nm et 456 nm, respectivement. Ainsi, pour **FFN42**, on assiste à un décalage bathochrome de 9 nm par rapport à FFN102 pour la longueur d'onde du maximum d'absorption¹⁶¹.

Au-delà de cette légère augmentation, l'utilisation de **FFN42** plutôt que de FFN102 pour l'étude de l'exocytose par détection couplée permettra certains avantages en termes de fluorescence. À la longueur d'onde d'excitation de 405 nm (longueur d'onde du laser disponible sur l'installation de microscopie du laboratoire), la fluorescence de FFN102 n'a atteint que 25% du maximum de l'intensité de fluorescence normalisée¹⁵⁹ (**Figure II.22**).

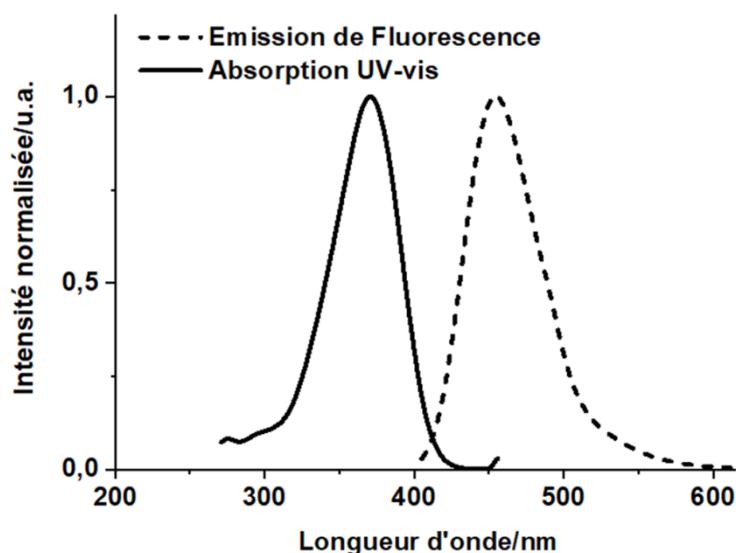


Figure II.22 : Spectres d'émission de fluorescence ($\lambda_{em} = 456$ nm) et d'absorption UV-vis ($\lambda_{exc} = 371$ nm) obtenus pour $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN102 dissous en solution de PBS (pH = 7,4)¹⁵⁹

En ce qui concerne **FFN42**, à une longueur d'onde de 405 nm, 95% de l'intensité normalisée est atteinte, en raison de son spectre d'absorption plus large. Ainsi, nous espérons pouvoir recueillir une fluorescence plus importante lors des expériences de TIRFM que pour FFN102.

3.2.2) Fluorescence dépendante du pH

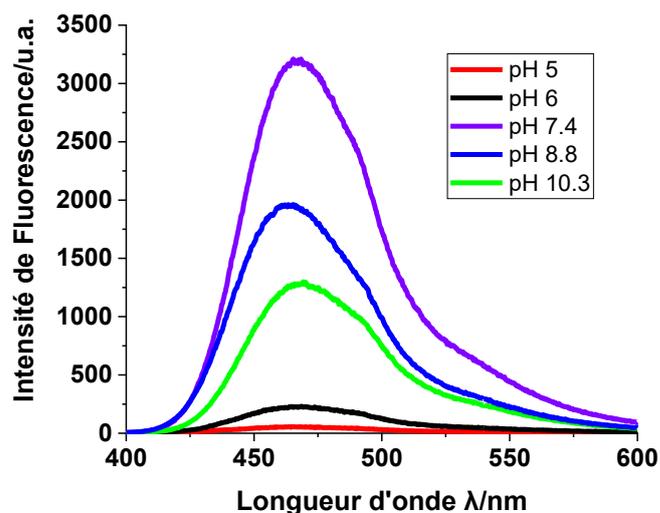


Figure II.23 : Spectres d'émission de Fluorescence obtenus pour $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN42 dissous en solution de PBS pour différents pH

L'intensité de la fluorescence augmente considérablement en fonction du pH, en particulier lors du passage d'un pH 6 à un pH 7,4, où l'intensité d'émission augmente d'un facteur 13 (**Figure II.23**). On assiste à une décroissance de l'intensité de fluorescence pour des pH plus basiques (8,8 et 10, 3). Un phénomène similaire a été observé dans la littérature pour la 6-amino-coumarine¹⁸⁷, pour laquelle le maximum de fluorescence se situe à un pH 7,2 et les émissions de fluorescence mesurées pour des valeurs de pH plus basiques possèdent une intensité plus faible. Une des hypothèses postulées dans le cas de la molécule **FFN42**, afin d'expliquer cette perte d'intensité de fluorescence pour des pH basiques est la formation de dimères ou d'agrégats. Ainsi, la concentration en **FFN42** diminuerait pour des valeurs de pH supérieures à 7,4 au profit de la formation de ces dimères. Cette observation pour les pH basiques n'a pas été investiguée au sein de ce doctorat, la valeur du pH extracellulaire étant de 7,4 et celle du milieu intravésiculaire étant comprise entre 5 et 6.

Compte tenu de la différence de pH entre les milieux intravésiculaire et extracellulaire l'émission de fluorescence devrait donc augmenter lors du passage de **FFN42** du cœur de la vésicule sécrétrice acide vers le milieu physiologique extracellulaire. Cette dépendance au pH est tout à fait compatible avec les propriétés requises d'une sonde fluorescente pour la recherche de l'exocytose¹⁸⁸. **FFN42** appartient donc à la catégorie des sondes « pH-dépendantes », cette caractéristique permettant de faciliter la détection optique de l'exocytose, non seulement en améliorant le signal de détection généré par la sécrétion cellulaire mais aussi en évitant de confondre des extinctions de fluorescence dues au retour de la vésicule au cœur du cytoplasme cellulaire⁵².

3.2.3) Détermination du coefficient d'extinction molaire, du rendement quantique et de la brillance

FFN42 possédant une longueur d'onde d'absorption et d'émission de fluorescence adaptées à l'étude du phénomène d'exocytose par microscopie de fluorescence, il est donc nécessaire de compléter sa caractérisation et de déterminer certaines de ses propriétés optiques telles que son coefficient d'extinction molaire ou son rendement quantique. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Dr. Thomas LE SAUX (UMR 8640). L'intensité d'absorption (ou coefficient d'extinction ϵ , ou absorbance spécifique) reflète la probabilité d'absorption. Sa connaissance constitue un critère de choix des fluorophores.

Plus ϵ est grand, plus la fluorescence à intensité lumineuse incidente égale sera importante.

Par exemple, pour la fluorescéine à 488 nm, $\epsilon = 8.10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

Tout d'abord, la loi de Beer-Lambert (**Equation 4**) a été vérifiée sur des spectres d'absorption UV-Visible et a donné accès au coefficient d'absorption molaire (ϵ) de **FFN42** qui s'élève à $12000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ dans un mélange acétonitrile/tampon phosphate (50/50 v/v) à 380 nm.

$$A = \epsilon lc \quad (4)$$

Avec **A** correspondant à l'absorbance du composé en solution, **l** la largeur de la cuve (en cm), **c** la concentration de l'espèce considérée (mol.L^{-1}) et le coefficient d'absorption molaire ϵ (en $\text{mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

Cette valeur est comparable à la valeur obtenue pour le noyau coumarine à 311 nm dans une solution d'éthanol ($5700 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) ainsi que pour l'ombelliférone (**Figure II.24**) à 330 nm d'éthanol (évaluée à $16800 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).¹⁸⁹



Figure II.24 : Structure moléculaire de l'ombelliférone

Le rendement quantique (Φ) de la sonde **FFN42** a par la suite été déterminé. La notion de rendement quantique définit l'efficacité relative de la fluorescence comparée aux autres voies de désexcitation et représente le rapport entre le nombre de photons de fluorescence émis et le nombre de photons absorbés par la molécule. Les fluorochromes possèdent des rendements quantiques compris entre 0,1 et 1. Ce calcul fournit « l'efficacité » d'un fluorophore.

Le spectre de fluorescence de **FFN42** et celui de la référence de sulfate de quinine utilisée pour cette série d'expériences ont donné accès au rendement quantique de **FFN42** (d'après l'**Equation 5**) et une valeur de 0,18 a été déterminée.

$$\phi f(x) = \phi f(0) \frac{1 - 10^{-A_0}}{1 - 10^{-A_x}} \frac{J_x}{J_0} \left(\frac{n_x}{n_0} \right)^2 \quad (5)$$

Le terme A_0 correspond à l'absorbance maximale de la référence (sulfate de quinine) et le terme A_x à l'absorbance maximale du composé d'intérêt (**FFN42**). J_x et J_0 correspondent respectivement aux intégrales des pics d'Émission de fluorescence du composé de référence et de celui de la sonde **FFN42** (**Figure II.27**). $\phi f(0) = 0,5^{190}$ est la valeur du rendement quantique de fluorescence de la Quinine sulfate dans $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ de H_2SO_4 pour une longueur d'onde d'excitation de 350 nm. Les termes n_0 et n_x correspondent aux indices de réfraction des solvants dans lesquels sont dissous le composé de référence (n_0) et la molécule d'intérêt (n_x).

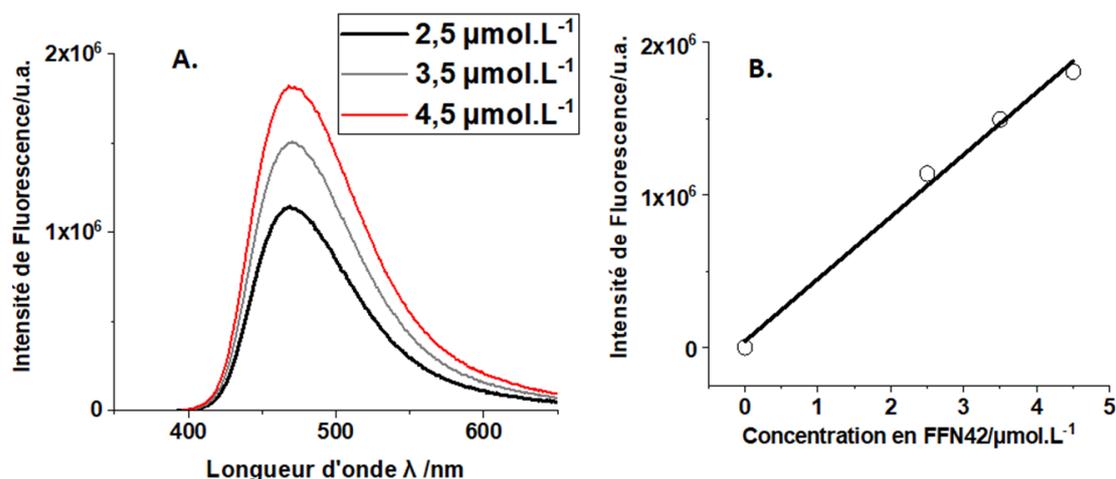


Figure II.25 : A. Spectres d'émission de Fluorescence obtenus pour la molécule **FFN42** en milieu acétonitrile/tampon phosphate (50/50 v/v) pour différentes concentrations. B. Spectres d'émission de fluorescence intégrés en fonction de la concentration en **FFN42**

La brillance (β) du composé **FFN42** a également été déterminée (**Equation 6**) et s'élève à 2160.

$$\beta = \varepsilon * \phi \quad (6)$$

La brillance obtenue lors de l'utilisation de **FFN42** a permis l'imagerie par fluorescence de vésicules sécrétrices de cellules cancéreuses avec un bon rapport signal/bruit (**Partie 3.3**).

3.2.4) Détermination des pKas

Cette étude a été réalisée par Mme Dina H. EBENE (stage L3 au laboratoire) avec l'aide du Dr. Thomas LE SAUX. Dans le cadre de la détermination des pKas pour **FFN42**, l'évolution de l'absorbance du composé en fonction du pH a été mesurée entre 3,57 et 11,05 dans un tampon « Britton-Robinson » composé de 10 mmol.L⁻¹ d'acide acétique, 10 mmol.L⁻¹ de CHES (acide N-cyclohexyl-2-aminoéthanesulfonique) et 10 mM dihydrogénophosphate de sodium dans 50 mM de NaCl¹⁹¹. Les valeurs de pKa des trois sites de protonation de **FFN42** ont été extraites à l'aide du système d'analyse global « SPECFIT » / 32 (version 3.0 pour les systèmes Windows 32 bits).

Les valeurs déterminées grâce à cette série d'expériences sont les suivantes :

- 9,8 pour l'amine primaire (qui fait référence au couple ion ammonium / amine) en position 4 de la structure (**Figure II.26**)
- 6,7 pour le groupement hydroxyle en position 6 et 5,4 pour celui en position 7 (**Figure II.26**)

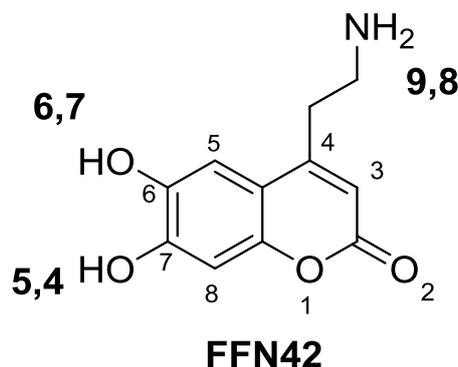


Figure II.26 : pKas des trois sites de protonation de FFN42

La valeur obtenue pour le groupement amine correspond aux valeurs obtenues pour des structures similaires (par exemple, pKa = 9,83 pour la phénéthylamine¹⁹²). De plus, la dépendance au pH de la fluorescence pour **FFN42** est en accord avec ses pKas modérément acides de 5,4 et 6,7 pour les deux fonctions phénol. En effet, à un pH physiologique, la concentration des formes phénolates de la sonde est suffisamment élevée pour augmenter le niveau de fluorescence. Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, cette propriété est d'une importance primordiale. En conclusion, les propriétés optiques (légère augmentation de la longueur d'onde du maximum d'absorption

et la présence d'une bande d'absorption assez large, pH-dépendance) rendent **FFN42** approprié pour une étude de l'exocytose par microscopie de fluorescence. Il est donc nécessaire d'étudier ses propriétés d'internalisation.

3.3) Tests d'internalisation vésiculaire

3.3.1) Expériences menées sur cellules BON N13

Afin d'étudier l'internalisation de la sonde **FFN42** au sein de vésicules cellulaires sécrétrices, la lignée de cellules BON N13 a tout d'abord été employée. Il s'agit d'un clone stable de cellules BON, dérivées d'une tumeur carcinoïde métastatique humaine, qui a démontré un intérêt considérable ces dernières années pour leur utilisation en tant que modèle cellulaire pour les études exocytotiques¹⁰⁷. Ces cellules sont « vides » de neurotransmetteurs endogènes et doivent être chargées en sérotonine exogène¹⁹³ ou **FFN102**⁵² pour détecter la sécrétion par ampérométrie et en GFP¹⁹⁴ ou **FFN102**¹⁵⁹ pour les analyses optiques en TIRFM. L'internalisation vésiculaire et la distribution de **FFN42** dans BON N13 ont été analysées par épifluorescence.

Les cellules BON N13 sont préalablement adhérentes sur la surface de boîtes de Petri recouvertes d'un dépôt de collagène IV. Après une durée de 24 heures, le milieu cellulaire est remplacé par le milieu supplémenté en **FFN42**. Les échantillons sont par la suite placés à l'incubateur durant trente minutes (37 °C et 5 % en CO₂) puis analysés par épifluorescence (**Partie Expérimentale** section 4.3). Au préalable, les échantillons sont rincés à l'aide d'une solution de PBS (pH = 7,4) filtrée, à trois reprises, et ces derniers sont ensuite analysés au sein de cette même solution. Les images obtenues par épifluorescence ont été enregistrées à l'aide d'une caméra EMCCD. La **Figure II.27** montre les effets de la concentration en **FFN42** et du temps d'incubation sur les images obtenues en épifluorescence.

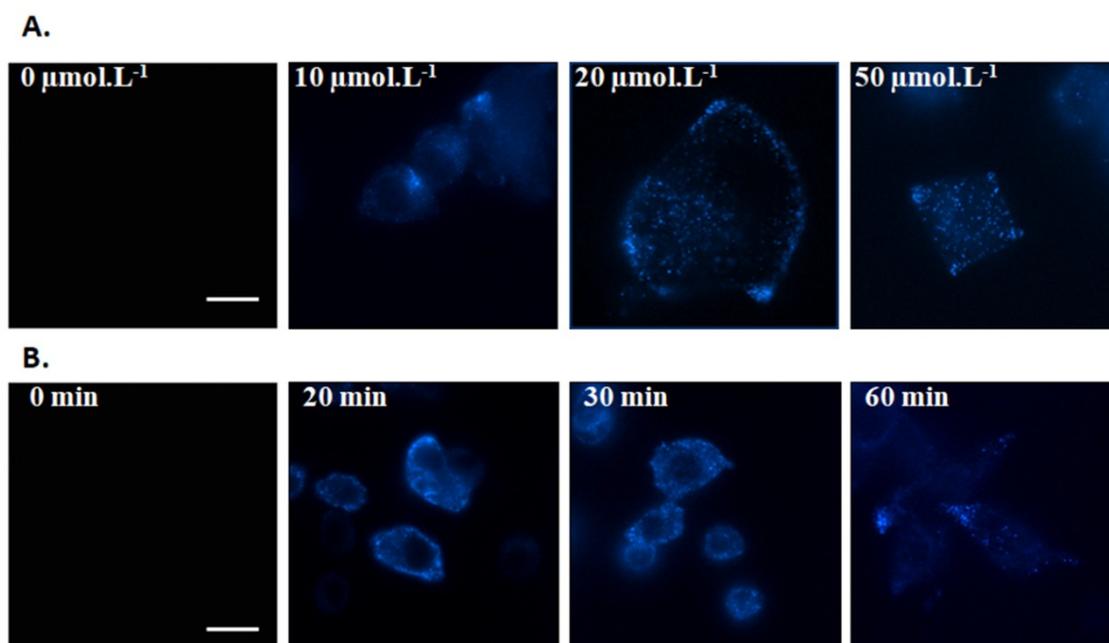


Figure II.27 : Images obtenues en épifluorescence pour des cellules BON N13, ayant internalisées différentes concentrations en FFN42 (période d'incubation de 20 min) (A) et pour différentes périodes d'incubation (concentration en FFN42 de 20 μmol.L⁻¹) (B) (Échelle 10 μm)

Les images présentées sur la **Figure II.27** indiquent que la concentration minimale de **FFN42** pour une observation optimale des granules de sécrétion clairement visibles dans la cellule (points fluorescents sur les images obtenues) est de 20 μmol.L⁻¹. Des tests d'incubation ont montré qu'une durée d'incubation de 20 minutes est optimale pour la pénétration vésiculaire de **FFN42**. Aucune différence d'intensité de fluorescence n'a été observée entre 20 et 60 min d'incubation et le pourcentage de cellules présentant des vésicules fluorescentes est indépendant du temps d'exposition des cellules en présence de la sonde **FFN42** (valeur comprise entre 10 et 50%). Ces résultats sont cohérents avec la capacité des FFNs à imiter globalement les propriétés intrinsèques des neurotransmetteurs monoamines et à être transportées par les VMAT¹ (transporteur vésiculaire de monoamines), dont les deux isoformes sont exprimés par des cellules BON¹⁹⁵. Par conséquent, la ramification amine primaire présente sur la structure moléculaire du composé **FFN42** permet son internalisation au sein des vésicules de sécrétion des cellules BON N13.

3.3.2) Expériences menées sur cellules PC12

Une étude de l'internalisation vésiculaire de **FFN42** au sein de vésicules sécrétrices de cellules PC12 a également été menée. Les effets de la concentration en **FFN42** et de la durée d'incubation ont été analysés avec un protocole similaire à celui utilisé pour les cellules BON N13 (se référer à la **Partie Expérimentale** section 4.3) et sont présentés en **Figure II.28**. Il est à noter que les cellules PC12 possèdent des vésicules de sécrétion de taille inférieure à celles des cellules BON N13 (typiquement de 75 à 120 nm de rayon)¹⁰¹, ce qui rend plus difficile l'identification des vésicules de sécrétion individuelles. La fluorescence a été observée dans les cellules PC12 dans des conditions optimales pour une concentration de 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ en molécule **FFN42** pour une durée d'incubation de 30 minutes. Le pourcentage de cellules présentant une coloration par fluorescence dans les cellules PC12 incubées avec le composé FFN42 est d'environ 60 à 70%.

Cette étude démontre que **FFN42** possède la faculté d'être internalisé au sein de granules de sécrétion de deux modèles cellulaires classiquement utilisés pour l'étude de l'exocytose.

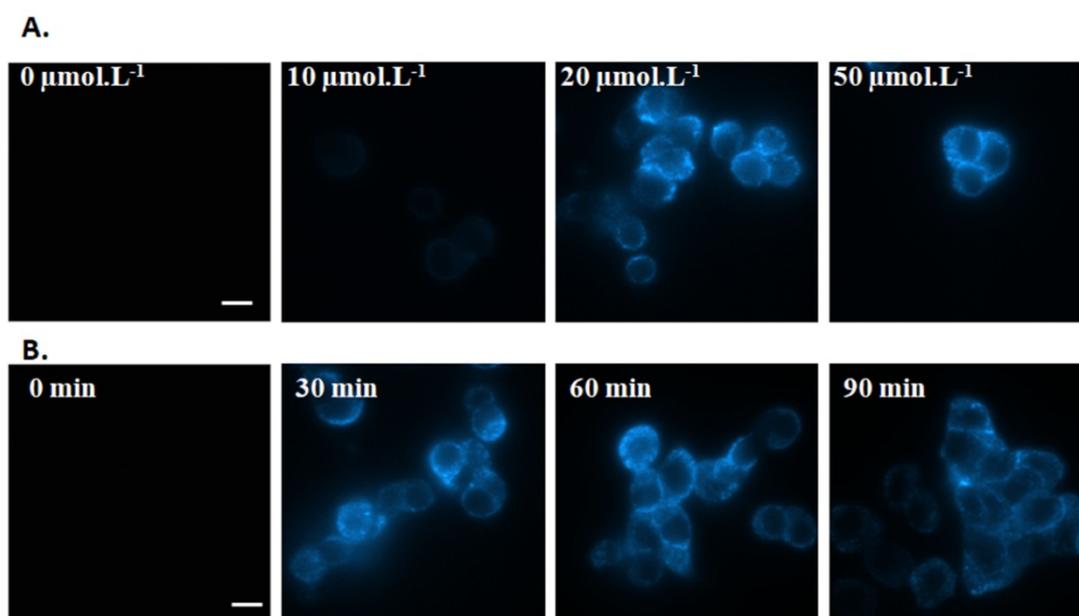


Figure II.28 : Images obtenues en épifluorescence pour des cellules PC12, ayant internalisées différentes concentrations en FFN42 (période d'incubation de 30 min) (A) et pour différentes périodes d'incubation (concentration en FFN42 de 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) (B) (échelle 5 μm)

3.4) Toxicité cellulaire

Afin de pouvoir utiliser la sonde FFN42 pour des études de sécrétion cellulaire, il est nécessaire de s'assurer de la non-toxicité de cette dernière sur les modèles cellulaires employés. Les cellules BON N13 ont été incubées avec une solution de **FFN42** à $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pendant une durée de 20 minutes, qui correspondait aux conditions optimales d'internalisation vésiculaire préalablement déterminées. Des tests de toxicité ont été réalisés (détails explicités en **Partie Expérimentale** section **10.1**; en collaboration avec Marie-Aude PLAMONT (UMR 8640)) en utilisant une solution de $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de calcéine et $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ d'éthidium homodimère (du kit LIVE / DEAD-Thermofischer Scientific) dans du PBS (pH = 7,4). Au sein d'une population cellulaire, les cellules vivantes sont sélectivement marquées par une molécule fluorescente appelée « calcéine » et qui indique l'activité d'une enzyme cellulaire : l'estérase. Les cellules mortes sont quant à elles marquées par un composé fluorescent en rouge et appelé « éthidium homodimère », qui démontre la perte de l'intégrité de la membrane plasmique suite à l'apoptose.

Les échantillons de cellules ont été rincés avec une solution de PBS filtrée (pH = 7,4), avant leur observation en microscopie de fluorescence, puis analysés dans cette même solution. Aucune cellule morte (rouge) n'a été observée sur l'ensemble des expériences réalisées dans les meilleures conditions d'absorption de **FFN42** par les cellules BON N13 (**Figure II.29**).

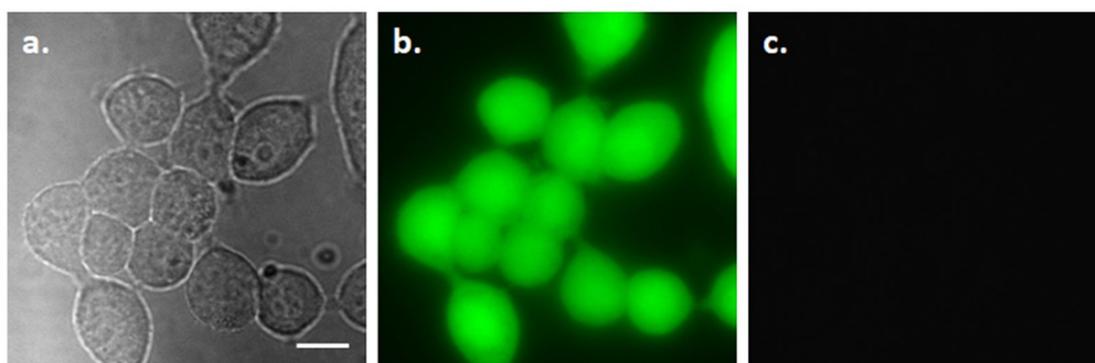


Figure II.29 : Tests de toxicité effectués sur cellules BON N13 ayant préalablement internalisé $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN42 durant une période d'incubation de 20 minutes : a. Image obtenue en lumière blanche b. Image obtenue en épifluorescence (filtre GFP/vert) c. Image obtenue en épifluorescence (filtre Rhod/rouge) (échelle 10 μm)

La même observation a été obtenue dans des conditions de contrôle (c'est-à-dire une incubation avec une solution sans **FFN42** pendant 20 minutes en **Figure II.30**).

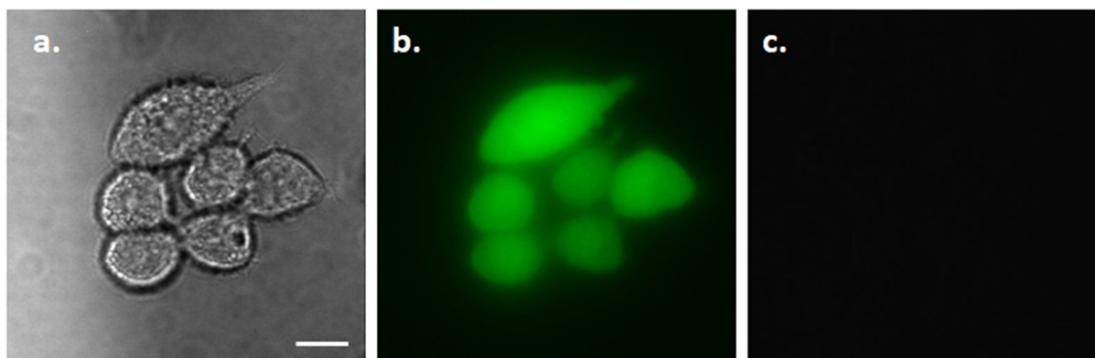


Figure II.30 : Tests de toxicité effectués sur cellules BON N13 sans internalisation préalable de **FFN42** : a. Image obtenue en lumière blanche b. Image obtenue en épifluorescence (filtre GFP/vert) c. Image obtenue en épifluorescence (filtre Rhod/rouge) (échelle 10 μm)

Cette expérience a confirmé la non-toxicité du **FFN42** en tant que sonde fluorescente et électrochimique internalisée au sein de cellules BON N13 aux concentrations testées et à l'échelle de temps classique d'une expérience de détection optique ou ampérométrique.

3.5) Bilan

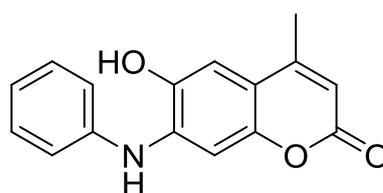
Les propriétés électrochimiques, optiques et d'internalisation cellulaire de **FFN42** permettent de retenir sans ambiguïté cette molécule comme le candidat à privilégier pour l'étude de l'exocytose par détection couplée Electrochimie-Microscopie de Fluorescence. En effet, son potentiel d'oxydation s'élève à 240 mV *vs* Ag/AgCl sur fibre de carbone, un potentiel d'oxydation plus faible que celui répertorié pour **FFN102**, ainsi que pour de nombreux neurotransmetteurs endogènes, ce qui permettra vraisemblablement de s'affranchir du photo-courant généré et observé lors de l'utilisation de **FFN102** lors des expériences couplées. De plus, le processus d'oxydation de cette molécule a pu être établi comme bi-électronique, permettant sans doute l'obtention de courant plus important qu'avec une oxydation mono-électronique comme **FFN102**. Cette caractéristique permettra également d'accéder à la quantité de molécules disséminées au sein du milieu extracellulaire durant un phénomène exocytotique.

Par ailleurs, **FFN42** possède une longueur d'onde d'absorption proche de la longueur d'onde du laser disponible au laboratoire pour les expériences de microscopie ainsi qu'une bande d'absorption assez large. De ce fait, à une longueur d'onde de 405 nm, 95% de l'intensité maximale est atteinte. Ainsi, nous espérons pouvoir détecter une fluorescence importante lors des observations cellulaires en microscopie TIRF. De plus, le rendement quantique ainsi que la brillance obtenus pour ce composé ont permis d'obtenir une imagerie par fluorescence de vésicules sécrétrices de cellules cancéreuses avec un bon rapport signal/bruit. Grâce à une observation en microscopie de fluorescence, il a également été montré que la sonde **FFN42** pénètre bien au sein des granules de sécrétion, représentés par de petits points fluorescents de la taille attendue. L'absence de toxicité de ce composé sur les modèles cellulaires employés a également été vérifiée, conférant définitivement au composé **FFN42** les caractéristiques nécessaires à l'étude de l'exocytose par détection couplée Electrochimie-Microscopie de Fluorescence.

*La suite des travaux sur le couplage sera donc consacrée en totalité à **FFN42**. Toutefois, d'autres orientations sont possibles quant à l'élaboration de sondes dérivées des coumarines. Certaines pistes ont été étudiées et sont brièvement décrites dans les paragraphes qui suivent même si elles n'ont pas présenté le même degré d'aboutissement que **FFN42**.*

4) FFN145

Une autre alternative afin d'abaisser le potentiel d'oxydation et également d'obtenir un décalage bathochrome d'environ 30 nm¹⁶¹ a été testée en parallèle et consiste à ajouter une fonction phénylamine sur la structure. A cet égard, la molécule **FFN145** a été synthétisée sur la base structurale du composé **FFN132**, en remplaçant le groupement hydroxyle en position 7 par le groupement NH(C₆H₅).



FFN145

Figure II.31 : Structure moléculaire du composé FFN145

4.1) Comportement électrochimique

Le potentiel d'oxydation de **FFN145** a été déterminé sur fibre de carbone. Celui-ci est de 250 mV *vs* Ag/AgCl (**Figure II.32**), un potentiel d'oxydation très proche de celui de FFN42 et de FFN132.

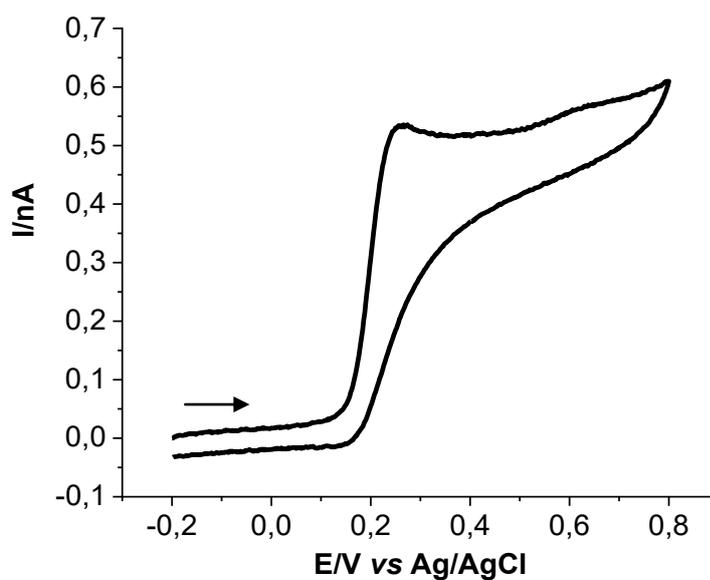


Figure II.32 : Voltammogramme obtenu pour 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN145 en milieu PBS (pH = 7,4) sur électrode en fibre de carbone ($d = 10 \mu\text{m}$) à 200 mV.s^{-1} . $E_i = -0,2 \text{ V vs Ag/AgCl}$

4.2) Propriétés optiques de FFN145

Les spectres d'absorption UV-visible et d'émission de fluorescence de la sonde FFN145 ont été mesurés, en solution de tampon phosphate salin (PBS) à pH = 7,4 et sont présentés en **Figure II.33**. Le maximum d'absorption de la molécule dans le domaine du visible est obtenu pour une longueur d'onde de 345 nm et le maximum d'émission de fluorescence est atteint pour une longueur d'onde de 455 nm.

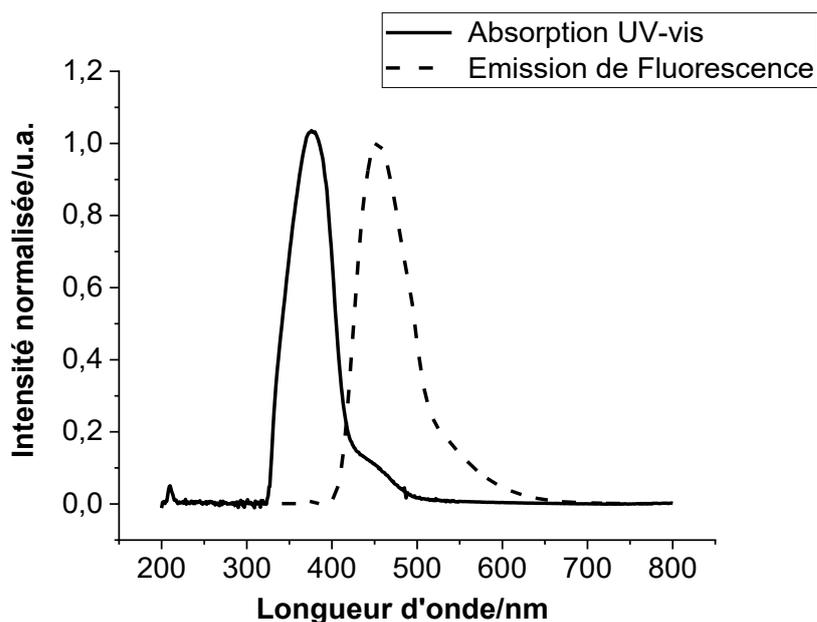


Figure II.33 : Spectres d'émission de fluorescence ($\lambda_{em} = 455$ nm) et d'absorption UV-vis ($\lambda_{ex} = 345$ nm) obtenus pour $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN145 dissous en solution de PBS (pH = 7,4)

4.3) Bilan

D'après les différentes expériences effectuées, **FFN145** semble être une structure pertinente pour notre application, son potentiel d'oxydation étant bien moins anodique que celui répertorié pour FFN102. Cependant, la longueur d'absorption de **FFN145** reste assez éloignée de la longueur d'onde du laser disponible au laboratoire, même si l'absence de la ramification éthylamine influe sans doute sur cette faible valeur. A ce stade, il n'est pas nécessaire de tester la faculté d'internalisation de la molécule au sein des vésicules de sécrétion dont on sait qu'elle exige la présence du bras éthylamine. Il est bien sûr prématuré

d'affirmer que ce type de molécule n'est pas adapté pour une étude de l'exocytose par détection couplée. Bien que cette structure semble intéressante d'un point de vue électrochimique, de plus amples investigations n'ont pas été menées sur cette molécule, l'ajout de la fonction éthylamine primaire constituant une étape de synthèse très fastidieuse. Il est par ailleurs légitime de se poser la question de l'influence (bénéfique ou non), de la présence du groupement $\text{NH}(\text{C}_6\text{H}_5)$ sur la faculté d'une telle sonde à être reconnue et internalisée dans les vésicules.

5) **FFN122**

En se basant sur la structure moléculaire de FFN42, une autre molécule a été synthétisée en greffant un atome de brome sur la structure de la coumarine (**Figure II.34**), l'ajout d'un halogène ayant déjà été répertorié dans la littérature pour provoquer un décalage bathochrome de 30 nm sur des structures similaires^{161,196}.

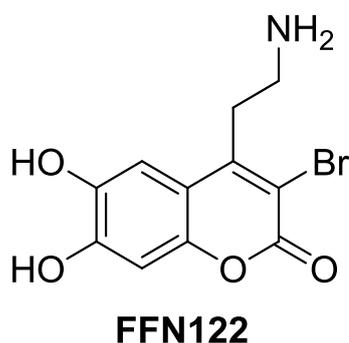


Figure II.34 : Structure moléculaire du composé FFN122

5.1) **Détermination du potentiel d'oxydation**

Le potentiel d'oxydation de **FFN122** a été déterminé par voltammétrie cyclique sur ultramicroélectrode en fibre de carbone. Comme le révèle la **Figure II.35** ci-dessous, la molécule s'oxyde à un potentiel de 300 mV *vs* Ag/AgCl, un potentiel beaucoup moins anodique que celui répertorié pour FFN102.

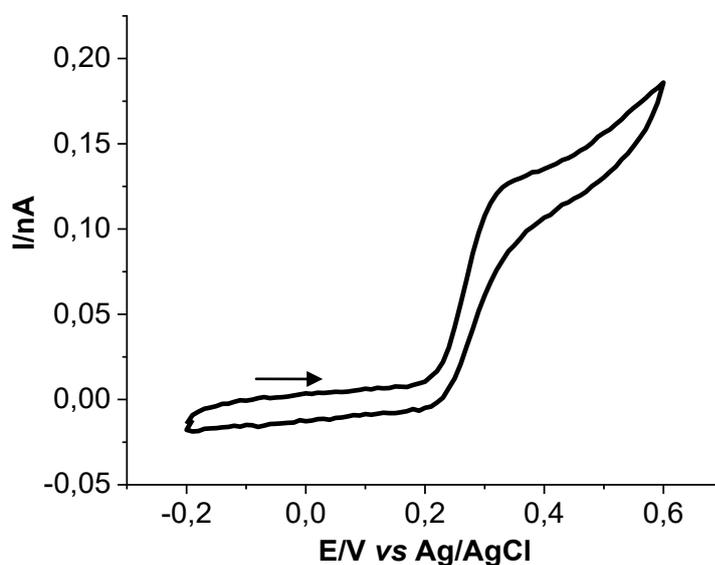


Figure II.35 : Voltammogramme obtenu pour $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN122 en milieu PBS (pH = 7,4) sur électrode en fibre de carbone ($d = 10 \mu\text{m}$) à 50 mV.s^{-1} . $E_i = -0,2 \text{ V vs Ag/AgCl}$

Cette diminution de la valeur du potentiel d'oxydation est probablement liée à l'ajout de la seconde fonction hydroxyle sur la structure du composé, qui permet d'augmenter la densité électronique du cycle aromatique, comme déjà observé pour FFN42. Cet effet semble légèrement compensé par l'effet électro-attracteur du brome. Toutefois, la principale différence observée avec FFN42 du point de vue électrochimique réside dans l'absence de phénomène de passivation de l'électrode lors de l'acquisition des voltammogrammes.

5.2) Propriétés optiques

Les spectres d'absorption UV-visible et d'émission de Fluorescence ont également été obtenus pour **FFN122**. La longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption s'élève à 388 nm et la longueur d'onde du maximum d'émission à 471 nm (**Figure II.36**).

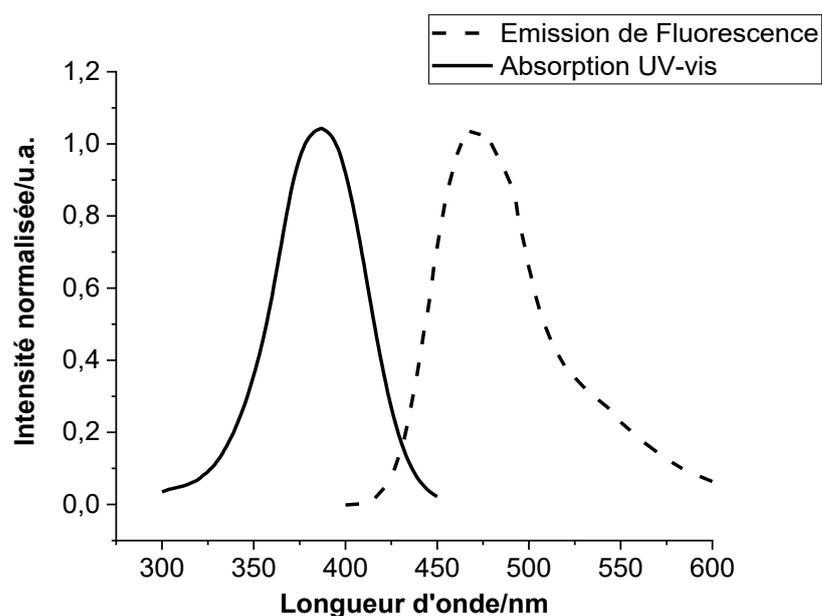


Figure II.36 : Spectres d'émission de fluorescence ($\lambda_{em} = 471$ nm) et d'absorption UV-vis ($\lambda_{ex} = 388$ nm) obtenus pour $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN122 dissous en solution de PBS (pH = 7,4)

Ce composé possède donc un maximum d'absorption plus proche de la longueur d'onde d'excitation du laser disponible au laboratoire. Lors de l'excitation de cette molécule à une longueur d'onde de 405 nm (supérieure à FFN42), 85 % de l'absorption maximale du composé est atteinte, ce qui devrait conférer une émission de fluorescence suffisante pour une observation en microscopie.

5.3) Test d'internalisation vésiculaire

FFN122 possédant des caractéristiques optiques et un comportement électrochimique des plus intéressants pour notre application, des tests d'internalisation vésiculaires ont été réalisés. Une population de cellules BON N13 a été incubée au sein de leur milieu de culture supplémenté en **FFN122** (concentration de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$) pendant une durée de 30 minutes. Les échantillons par la suite ont été rincés à trois reprises avec une solution de PBS (pH = 7,4) filtrée et ont également été analysés au sein de cette même solution. Les images obtenues en épifluorescence sont présentées en **Figure II.37**.

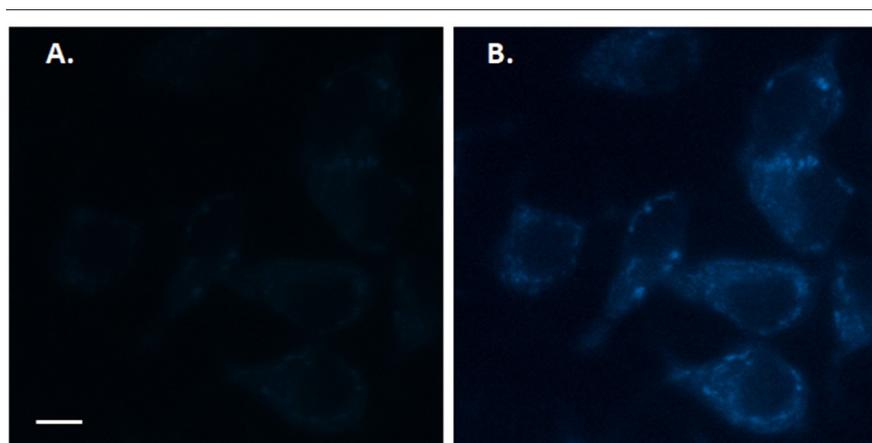


Figure II.37 : Image obtenue en épifluorescence pour des cellules BON N13, incubées pendant une durée de 20 minutes avec $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN122 (échelle $10 \mu\text{m}$). (A. sans modification de contraste B. Diminution du contraste de l'image d'un facteur 5)

Comme le révèle la **Figure II.37**, aucune vésicule n'est clairement observable en épifluorescence. La membrane cellulaire uniquement apparaît avec une intensité très faible. En effet, une modification du contraste de l'image a été nécessaire afin de pouvoir observer les cellules de manière satisfaisante (contraste diminué de 65535 à 13107) sur le logiciel « HCImageLive » Ceci suggère que **FFN122** est capable de passer la membrane cellulaire, mais n'est pas internalisée par les vésicules de sécrétion.

5.4) **Bilan**

FFN122 possède des propriétés optiques et un comportement électrochimique très intéressants pour l'étude de l'exocytose vésiculaire par détection couplée : un potentiel d'oxydation assez bas ainsi qu'un maximum d'absorption proche de la longueur d'onde du laser disponible au laboratoire. Cependant, aucune internalisation vésiculaire claire n'a pu être observée par microscopie.

6) **Conclusion**

Ce deuxième chapitre retrace les différents designs de molécules imaginés puis synthétisés pour la recherche d'une sonde duale avec pour objectif principal d'augmenter l'efficacité du couplage Ampérométrie-TIRFM lors de l'analyse de l'exocytose vésiculaire. La molécule FFN102 a été utilisée comme base structurale de travail pour la synthèse des autres

composés, par le biais d'une structure coumarine conférant les propriétés de fluorescence ainsi qu'un groupement hydroxyle permettant l'électroactivité du composé. Les propriétés électrochimiques et spectroscopiques de cinq composés ont été étudiées. La faculté d'internalisation de ceux possédant les caractéristiques analytiques les plus intéressantes a également été testée, grâce à l'ajout d'une ramification amine primaire sur leur structure. Les différentes caractéristiques de ces composés sont répertoriées au sein du **Tableau II.2** ci-dessous.

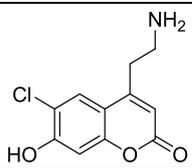
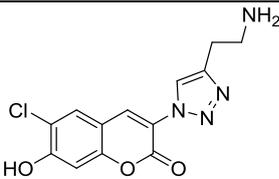
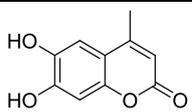
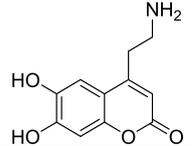
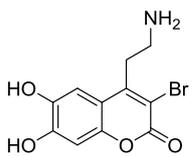
Molécule	Structure	$\lambda_{(ex)}$ (nm)	$\lambda_{(em)}$ (nm)	E_a (mV) vs Ag/AgCl sur CFE	Internalisation vésiculaire
FFN102		371	456	900	Molécule internalisée
FFN21		393	474	740	Molécule non internalisée
FFN132		344	423	260	Non déterminée
FFN42		380	470	240	Molécule internalisée
FFN145		345	455	250	Non déterminée
FFN122		388	471	300	Molécule non internalisée

Tableau II.2: Tableau récapitulatif des différentes caractéristiques physico-chimiques des molécules étudiées dans ce chapitre et de FFN102 (thèse Xiaoqong LIU 2012-2016 au laboratoire)

Ainsi, **FFN42** apparait comme étant l'entité la plus prometteuse du fait de ses caractéristiques électrochimiques adaptées (faible potentiel d'oxydation sur les matériaux d'électrodes utilisés pour la détection couplée) ainsi que ses caractéristiques optiques appropriées (large bande d'absorption UV-vis, rendement quantique et brillance permettant une observation optimale des cellules en microscopie de fluorescence). La ramification éthylamine primaire permet également une internalisation du composé au sein des vésicules de sécrétion de cellules cancéreuses.

La molécule **FFN42** a donc été retenue comme étant la plus adaptée pour l'investigation de l'exocytose par détection couplée Electrochimie-Microscopie de Fluorescence. Cette dernière sera utilisée comme sonde duale pour l'étude de la sécrétion cellulaire sur cellules cancéreuses BON N13 par ampérométrie sur fibre de carbone et par microscopie TIRFM (**Chapitre III**).

Chapitre III: Etude de la libération par exocytose de la sonde FFN42 par Ampérométrie et Microscopie de Fluorescence par Réflexion Totale Interne sur cellules BON N13

Au sein du chapitre précédent, il a été démontré que la molécule FFN42 possédait la faculté d'être internalisée par les vésicules sécrétrices de cellules BON N13. A ce stade, et avant d'envisager toute tentative de couplage sur microdispositifs d'ITO, il est néanmoins nécessaire de montrer que cette dernière peut également être libérée par les vésicules de ces mêmes cellules par exocytose vésiculaire. Indépendamment du choix d'une sonde duale appropriée, la réalisation d'une détection couplée Ampérométrie-TIRFM nécessite la mise en place de nombreux prérequis, comme la fabrication de dispositifs d'ITO adaptés, ainsi que la probabilité de trouver une cellule marquée (possédant des vésicules fluorescentes) et adhérente sur la surface de l'électrode transparente. Dans un premier temps, il est donc plus approprié d'étudier la capacité de FFN42 à être libérée du milieu intravésiculaire vers le milieu extracellulaire par des méthodologies utilisées en routine, en d'autres termes, par ampérométrie sur UME de carbone et par microscopie TIRF sur substrat de verre séparément.

1) Détection ampérométrique sur fibre de carbone

Dans le cadre de cette série d'expériences, les cellules BON N13 ont été cultivées dans des boîtes de Petri à fond de verre. Un montage à deux électrodes est utilisé et la fibre de carbone est placée à proximité d'une seule cellule ayant préalablement internalisé la molécule FFN42 (montage présenté en **Partie Expérimentale**, section 10.4). Après une période d'incubation de 20 minutes dans un milieu à une concentration de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en FFN42, les échantillons sont rincés à deux reprises avec une solution de tampon phosphate filtrée puis sont analysés dans une solution de Locke x1 (composition détaillée en **Partie Expérimentale**, section 3.2). Il existe dans la littérature de nombreux sécrétagogues possibles pour déclencher la libération exocytotique. Ils reposent pour l'essentiel sur une

stimulation de l'exocytose par augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire.³¹ On peut notamment mentionner la digitonine, les ions baryum, l'ionomycine ou une solution concentrée de $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$. L'utilisation du sécrétagogue le plus adapté est toujours un sujet de débat à l'heure actuelle puisque certains sont réputés, à raison, moins physiologiques que d'autres. Par exemple, la digitonine est un perméabilisant de la membrane qui permet de laisser entrer les ions Ca^{2+} .¹⁹⁷ La nicotine a un effet dépolarisant et active les canaux calciques¹⁹⁸. Le mode d'action des ions baryum n'est à l'heure actuelle pas clairement défini.¹⁹⁹ S'il n'est pas impossible qu'ils interagissent avec les canaux calciques et déclenchent une libération intracellulaire de Ca^{2+} , il a pu être montré qu'ils pouvaient à eux seuls stimuler la machinerie cellulaire pour provoquer une libération exocytotique sans assistance du calcium. Il s'agit cependant d'un agent de stimulation assez utilisé car contrairement à la plupart des sécrétagogues, la libération par exocytose se poursuit plusieurs minutes après avoir cessé la stimulation.²⁰⁰

Dans le cadre de cette étude, deux solutions de stimulation communément admises comme étant les plus « physiologiques » seront utilisées, à savoir une solution d'ionomycine concentrée à $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et une solution de potassium K^+ (55mmol.L^{-1}) toutes deux supplémentées en Ca^{2+} ($2,5 \text{mmol.L}^{-1}$). L'ionomycine est un ionophore du calcium. Il se forme alors un complexe ionomycine- Ca^{2+} 1:1. L'ionomycine est soluble dans les membranes lipidiques et permet donc le transport des ions calcium du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire. Dans le second cas, une forte concentration en ions potassium K^+ entraîne une dépolarisation de la membrane cellulaire et l'ouverture des canaux calciques. La concentration en calcium du milieu extracellulaire étant très supérieure à la concentration intracellulaire, le calcium va entrer dans la cellule et déclencher la fusion membranaire puis le phénomène exocytotique²⁰¹. Il est à mentionner que pour ces deux sécrétagogues, la sécrétion par exocytose ne dure que le temps de la stimulation, soit une minute dans notre cas.

1.1) Stimulation de l'exocytose par une solution d'ionomycine

Dans le but de montrer que la sonde FFN42 peut être libérée après son internalisation, des études par ampérométrie sur UME de carbone (diamètre $10 \mu\text{m}$) ont été mises en place. Comme précisé dans la partie expérimentale, l'électrode de travail est placée au sommet et au contact de la cellule isolée étudiée, sans autre contrainte que l'internalisation préalable de

FFN42. Un potentiel d'oxydation de +500 mV *vs* Ag/AgCl est appliqué en accord avec les études réalisées en voltammétrie cyclique et décrites dans le précédent chapitre. La variation de courant est enregistrée en fonction du temps. Après stabilisation de la ligne de base, le phénomène d'exocytose est déclenché par l'injection de la solution d'ionomycine (10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pendant une minute) qui est initialement contenue au sein du capillaire de stimulation placé à proximité de la cellule cible (quelques dizaines de micromètres ; **Partie expérimentale Figure E.14**) via l'utilisation d'un injecteur. Une série de vingt-quatre pics ampérométriques a été obtenue en stimulant l'exocytose sur trois cellules. La fréquence de sécrétion a été calculée à partir de ces chronoampérogrammes et correspond à une valeur de $0,13 \pm 0,03$ Hz.

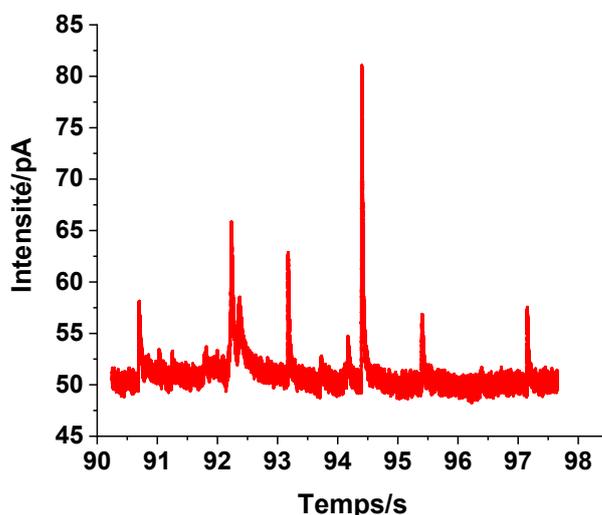


Figure III.1 : Exemple de chronoampérogramme obtenu après stimulation à l'ionomycine (10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) sur cellule BON N13 isolée et ayant internalisé la molécule FFN42 (20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pendant 20 minutes)

Chaque pic de courant obtenu reflète la libération du contenu électroactif d'une vésicule unique. Aucun contenu électroactif n'est initialement présent au sein des vésicules de cellules BON N13 et les chronoampérogrammes dans les mêmes conditions ne donnent lieu à aucun pic de courant.^{57,124} Dans ce contexte, les pics ampérométriques obtenus à un potentiel de $E_a = 500$ mV *vs* Ag/AgCl ne peuvent résulter que de l'oxydation de la sonde FFN42. **Cette étude montre donc d'ores et déjà que FFN42 peut être libéré par exocytose après avoir été internalisé au sein des vésicules de sécrétion.**

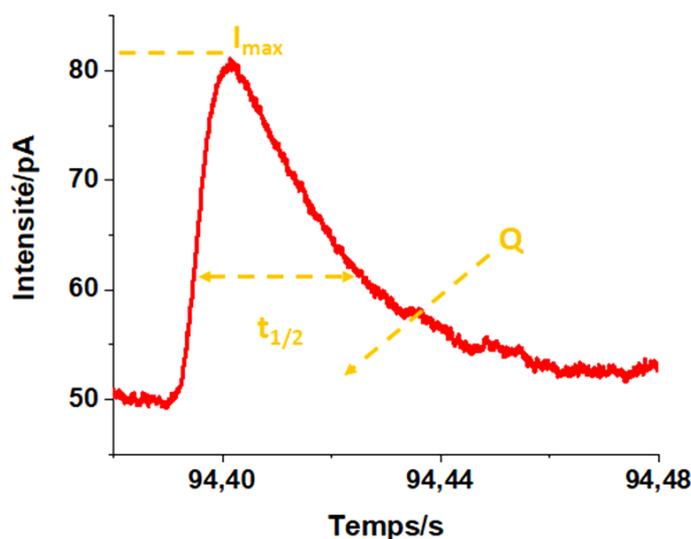


Figure III.2 : Exemple de pic ampérométrique isolé (et ses trois paramètres $t_{1/2}$, Q et I_{\max}) obtenu sur cellule BON N13 unique ayant préalablement internalisé FFN42 ($20 \mu\text{mol.L}^{-1}$)

Une analyse plus poussée peut être réalisée à partir de chaque événement ampérométrique. Les principales caractéristiques suivantes : largeur à mi-hauteur $t_{1/2}$, la charge Q , et l'intensité maximale I_{\max} (**Figure III.2**) ont ainsi été déterminées à partir des différents pics ampérométriques via l'utilisation d'un programme informatique élaboré au laboratoire. Les ordres de grandeur obtenus restent cohérents avec la gamme recensée pour différents sécrétagogues et modèles cellulaires² ($I_{\max} = 3\text{-}25 \text{ pA}$; $Q = 50\text{-}2000 \text{ fC}$; $t_{1/2} = 3\text{-}150 \text{ ms}$) et la vitesse de sécrétion peut être estimée à environ $25000 \text{ molécules.ms}^{-1}$. Par ailleurs, en considérant un diamètre moyen de $200\text{-}300 \text{ nm}$ pour les vésicules des cellules BON N13²⁰², la concentration intravésiculaire en FFN42 internalisée peut être évaluée au minimum à $0,09 \text{ mol.L}^{-1}$. Il s'agit d'une valeur cohérente de concentration de neurotransmetteurs, obtenue par ampérométrie. En effet, un résultat similaire a été déterminé pour l'adrénaline internalisée au sein de vésicules de cellules chromaffines pour laquelle la concentration obtenue à partir d'études en ampérométrie et microscopie²⁰³ est de $0,11 \text{ mol.L}^{-1}$. Enfin, la fréquence de sécrétion est plutôt faible par comparaison avec d'autres modèles cellulaires comme les cellules chromaffines, les mastocytes de souris beige ou les cellules PC12 où la

²**Modèles cellulaires concernés :** cellules BON (libération de sérotonine), cellules chromaffines (libération de catécholamines), cellules PC12 (libération de dopamine), mastocytes de souris beige (libération d'histamine et de sérotonine), cellules β -pancréatiques (libération d'insuline). **Gamme de sécrétagogues mis en jeu :** Ba^{2+} , Calcium cagé, calcium ionophore A23187, ionomycine, nicotine, digitonine, glucose, tolbutamide, K^+ .

fréquence peut atteindre des valeurs s'échelonnant entre 1,5 et 4 Hz.³³ Cette valeur de fréquence de sécrétion assez basse constitue également un résultat encourageant puisqu'elle permet d'éviter la superposition des événements ampérométriques. Cette superposition possible des pics à haute fréquence est en effet un biais possible de l'étude qui, bien que clairement établie dans la littérature^{159,204,205}, n'est pas ou peu mentionnée dans le cadre d'une analyse ampérométrique indépendante. Si ce problème peut être contourné en accumulant les données pour une étude électrochimique seule, il ne peut être résolu dans le contexte d'un couplage puisqu'elle conduirait à la présence de signaux combinés impossibles à interpréter.

De plus, il est intéressant de comparer les caractéristiques ampérométriques obtenues pour FFN42 à celles répertoriées pour le même modèle cellulaire pour FFN102 et la sérotonine. Ces deux molécules ont en effet été utilisées auparavant au laboratoire dans le cadre de l'investigation de l'exocytose vésiculaire via une stimulation par une solution d'ionomycine. Le **Tableau III.1** ci-dessous répertorie les différents paramètres obtenus pour les trois sondes précédemment citées.

	$t_{1/2}$ (ms)	Q (fC)	I_{max} (pA)
Sérotonine ²⁰⁶	32,0 ± 0,5	182 ± 11	4.9 ± 0.5
FFN102 ⁵²	30.2 ± 1,2	209 ± 15	5.3 ± 0.5
FFN42 ¹⁷³	26.0 ± 1,9	421 ± 55	9,6 ± 1,3

Tableau III.1 : Caractéristiques des pics ampérométriques obtenus pour la sérotonine, FFN102 et FFN42

Dans les trois cas, la sonde électroactive est exogène et a nécessité un chargement préalable des cellules BON N13. On remarque tout d'abord que la durée moyenne de l'évènement exocytotique reste globalement relativement inchangée, quelle que soit la sonde électroactive mise en jeu. Ce résultat est bien sûr en accord avec le fait que les conditions expérimentales (sécrétagogue, modèle cellulaire, milieu de culture, sérum physiologique) sont identiques dans les trois études et ne modifient donc pas les caractéristiques de la libération exocytotique. Par contre, la quantité de sonde électroactive émise durant un évènement d'exocytose ainsi que le flux correspondant sont significativement plus élevés pour FFN42. Cet écart peut s'expliquer différemment pour la sérotonine et FFN102. Les calculs de concentration intravésiculaire internalisée pour la sérotonine montrent que celle-ci est deux fois inférieure à celle obtenue pour FFN42 (pour une oxydation bi-électronique

de la sérotonine). Ceci montre donc que la sérotonine est plus faiblement internalisée au sein des vésicules de sécrétion des cellules BON N13. A ce stade, les raisons de cette plus faible internalisation ne sont pas encore bien comprises. Pour FFN102, dont la structure est plus proche de FFN42, l'écart peut s'interpréter en rappelant que le mécanisme d'oxydation de FFN102 fait intervenir un seul électron (comme étudié au sein du **Chapitre II**) alors celui déterminé pour FFN42 implique un échange de deux électrons¹⁷³. Dans ce contexte, l'internalisation est similaire pour les deux sondes mais le signal électrochimique est simplement doublé pour la sonde bi-électronique.

Quoi qu'il en soit, ces résultats démontrent que l'intensité des signaux ampérométriques résultant de l'oxydation de la molécule FFN42 est environ deux fois plus élevée que pour les deux autres sondes, améliorant ainsi considérablement le rapport signal/bruit de la détection électrochimique par rapport aux espèces électroactives précédemment utilisées au laboratoire. Ceci permet de confirmer que la sonde FFN42, en plus de sa capacité à être libérée avec une fréquence modérée, est une sonde appropriée pour le couplage Ampérométrie-TIRFM.

1.2) Stimulation de l'exocytose par une solution de potassium/calcium (K⁺/Ca²⁺)

La configuration expérimentale employée pour cette série d'expériences est identique à celle mise en place pour la stimulation par une solution d'ionomycine. La sécrétion cellulaire est générée par l'injection de la solution de K⁺ à proximité de la cellule cible et ce pendant une minute. Une série de vingt pics ampérométriques a été obtenue sur deux cellules ayant au préalable internalisé la sonde FFN42 (20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pendant 20 minutes). La fréquence de sécrétion a été déterminée à partir du nombre de pics obtenus au cours du temps et vaut $0,18 \pm 0,09$ Hz. En tenant compte de l'incertitude sur la mesure, cette fréquence n'est pas modifiée par rapport à la stimulation avec l'ionomycine.

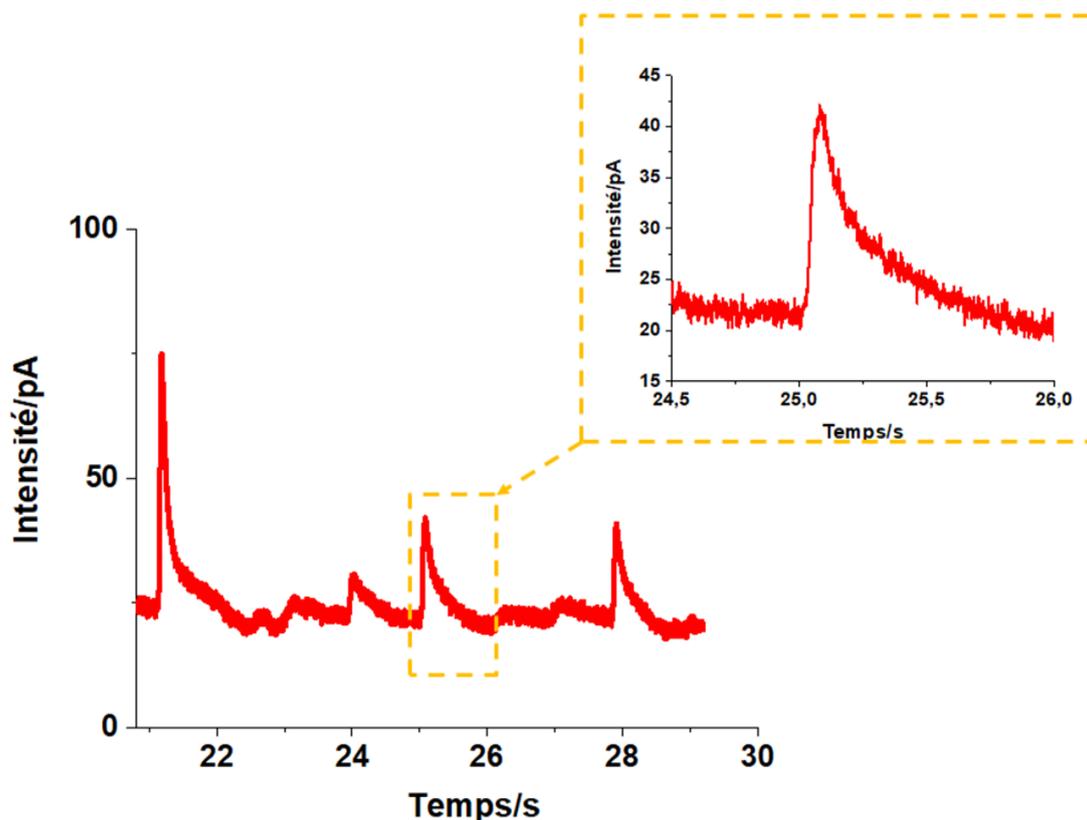


Figure III.3 : Exemple de chronoampéromètre obtenu après stimulation au potassium K^+ (55 mmol.L^{-1}) sur cellule BON N13 unique, ayant internalisé la molécule FFN42 ($20 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ pendant 20 minutes)

Les caractéristiques principales (largeur à mi-hauteur $t_{1/2}$, la charge Q , et l'intensité maximale I_{max}) ont également été déterminées pour ces pics ampérométriques obtenus suite à cette stimulation via l'ion potassium K^+ et s'élèvent à $t_{1/2} = (83,5 \pm 11,6) \text{ ms}$, $Q = (2412 \pm 450) \text{ fC}$ et $I_{\text{max}} = (10,3 \pm 2,5) \text{ pA}$.

Nous observons donc une augmentation de la charge, ainsi que de la largeur à mi-hauteur (d'un facteur légèrement supérieur à 3) par rapport aux pics obtenus par stimulation par l'intermédiaire d'une solution d'ionomycine. L'intensité maximale est quant à elle comparable pour les deux modes de stimulation du phénomène exocytotique en tenant compte de l'incertitude sur la mesure : I_{max} (ionomycine) = $9,6 \text{ pA}$ et I_{max} (K^+) = $10,3 \text{ pA}$. Les paramètres des pics ampérométriques résultant de la sécrétion cellulaire varient avec le mode de stimulation (choix du sécrétagogue), le modèle cellulaire ou encore l'espèce électroactive contenue au sein des vésicules de sécrétion³³. Toutefois, dans le cas présent, et

compte tenu du fait que la fréquence reste globalement inchangée entre les deux stimulations, ces augmentations de charge et de flux suggèrent que la stimulation par K^+/Ca^{2+} corresponde à un stade plus avancé de la libération de chaque vésicule et de son matériel électroactif.

En conclusion, l'obtention de pics ampérométriques par une stimulation via une solution d'ionomycine ou de K^+/Ca^{2+} permet de montrer la pertinence de la molécule FFN42 dans le cadre de l'étude de l'exocytose vésiculaire. Elle démontre que FFN42 est bien libéré avec une fréquence de sécrétion relativement faible (0,13 - 0,18 Hz), permettant l'absence de superposition et donc l'attribution d'un pic ampérométrique à un événement de sécrétion cellulaire donné et ce sans ambiguïté. Ceci est un résultat important puisqu'une trop grande fréquence de sécrétion pourrait mener à des pics ampérométriques superposés et une difficulté à les attribuer aux signaux optiques associés tout en ne pouvant pas bénéficier d'une analyse quantitative.

Après avoir montré la détection possible de FFN42 par ampérométrie, il convient également d'étudier la visualisation du phénomène exocytotique par microscopie TIRF dans le cadre d'une étude future de l'exocytose par détection couplée grâce à l'utilisation de la sonde FFN42.

2) Détection de l'exocytose vésiculaire par microscopie TIRF

2.1) Visualisation des vésicules de sécrétion

Une série d'expériences a été réalisée sur des cellules BON N13 cultivées dans des boîtes de Petri à fond de verre, ayant préalablement internalisé FFN42 ($20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pendant 20 minutes). Avant toute stimulation, il est nécessaire de vérifier la présence de vésicules de sécrétion fluorescentes au sein du cytoplasme cellulaire. La **Figure III.4** permet de visualiser la présence de vésicules fluorescentes par épifluorescence (B) et en TIRFM (C).

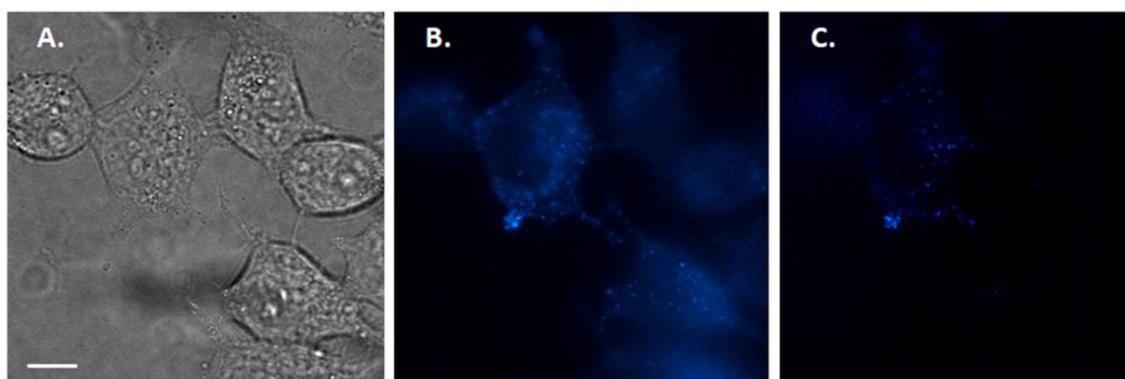


Figure III.4 : Observation des cellules BON N13 ayant préalablement internalisé FFN42 ($20 \mu\text{mol.L}^{-1}$) (A) Lumière blanche (B) Epifluorescence (C) TIRFM (laser $\lambda = 405\text{nm}$) (Échelle $5 \mu\text{m}$)

Les granules de sécrétion sont représentés par de petits points fluorescents en microscopie de fluorescence et en TIRFM de la taille attendue d'après la connaissance des rayons moyens des vésicules de sécrétion du modèle cellulaire étudié et d'après la littérature, attestant ainsi de l'internalisation ciblée de la sonde au sein de ces compartiments spécifiques. Cette visualisation justifie *a posteriori* l'utilisation de la sonde FFN42 qui conserve la ramification éthylamine, afin de remplir la condition de reconnaissance moléculaire par le transporteur VMAT présent au sein des membranes vésiculaires des cellules BON N13. Cette étape de visualisation doit être réalisée relativement rapidement (en quelques secondes) de façon à éviter le phénomène de photo-blanchiment de la sonde FFN42 suite à l'exposition de cette dernière à une source lumineuse. En effet, en absence de couplage avec l'ampérométrie, la fluorescence peut être un paramètre important et significatif pour caractériser l'exocytose au niveau d'une seule vésicule. Ainsi lors de la thèse précédente au laboratoire utilisant FFN102⁸⁶, il a été montré que les cellules BON N13 marquées par FFN102 subissaient un photo-blanchiment avec l'excitation d'une source laser à 405 nm, conduisant à la réduction de l'intensité de fluorescence qui pourrait donc interférer avec la caractérisation de l'intensité de fluorescence de l'exocytose. Par conséquent, lors de ce travail passé, deux vésicules de référence montrant une mobilité réduite ont été choisies pour étudier si l'effet de photo-blanchiment interférait avec la caractérisation de l'intensité de fluorescence. Leurs intensités de fluorescence normalisées et résultant d'une excitation au laser 405 nm en configuration de TIRFM ont été tracées en fonction du temps. Il a été observé que les intensités de fluorescence de ces deux vésicules

de référence étaient assez stables durant une seconde, même si une fluctuation légèrement aléatoire causée par les faibles déplacements des vésicules a été mesurée. Il a ainsi été établi que la diminution de l'intensité de fluorescence causée par le photo-blanchiment en configuration TIRFM semble être négligeable à l'échelle temporelle d'un événement exocytotique individuel dont la durée n'excède pas la centaine de millisecondes. Ce résultat peut être raisonnablement transposé à la présente étude, puisque les concentrations intravésiculaires en FFN102 et FFN42 déterminées par ampérométrie sont très proches (comme le montrent les résultats obtenus répertoriés dans le **Tableau III.1**) et les rendements quantiques de fluorescence sont du même ordre de grandeur pour les structures des FFNs impliqués (entre 0,1 et 0,18 pour les dérivés de la 7-hydroxycoumarine)²⁰⁷.

2.2) Observation de la sécrétion cellulaire par microscopie TIRF

Dès lors que l'on souhaite réaliser une étude indépendante de la libération de FFN42 par microscopie TIRF, il n'apparaît pas nécessaire de travailler sur électrode d'TTO. Dans ce contexte, les cellules BON N13 préalablement adhérees sur une boîte de Petri à fond de verre avec une lamelle centrale en verre de $(175 \pm 15 \mu\text{m})$ d'épaisseur et d'un diamètre de 14 mm, (permettant à nouveau de limiter la contrainte de l'étude à la seule identification d'une cellule marquée), sont soumises au rayonnement du laser à 405 nm. Le phénomène d'exocytose est déclenché par l'injection d'une solution d'ionomycine ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pendant une minute) à proximité d'une cellule unique. Pour une stimulation effectuée sur deux cellules, treize flashes de fluorescence³ ont pu être observés à une fréquence de $0,11 \pm 0,01$ Hz. Cette fréquence est à comparer à celle obtenue en ampérométrie dans les mêmes conditions ($0,13 \pm 0,03$ Hz). Il est intéressant et remarquable de constater que les deux valeurs de fréquence de sécrétion obtenues en TIRFM ou ampérométrie, pour l'étude de l'exocytose à l'aide de l'internalisation de la sonde FFN42, sont équivalentes au regard de l'incertitude sur la mesure. En effet, ce résultat laisse supposer que le nombre d'évènements orphelins sera faible dans le cas de la détection couplée future de l'ampérométrie et du TIRFM sur cellules BON N13 chargées avec FFN42, puisqu'aucune des deux techniques

³Les flashes de fluorescence observés en microscopie TIRF sont dus, pour une sonde pH-dépendante, à une exacerbation de l'intensité de fluorescence du contenu intravésiculaire puis d'une diminution très rapide de cette dernière.

analytiques ne recueille plus d'évènements que l'autre. Néanmoins, avant de valider cette assertion il convient de rappeler qu'ici, les évènements observés en TIRFM sont obtenus sur verre et non pas sur les microdispositifs en ITO conçus au laboratoire lors de cette thèse (se référer au **Chapitre IV**), la libération par exocytose pouvant dépendre de l'adhésion de la cellule. Deux exemples de flashes différents sont présentés en **Figures III.5** et **III.6**.

2.2.1) *Le flash « soudain »*

La **Figure III.5** présente un premier exemple de la variation de fluorescence d'une vésicule de sécrétion individuelle en fonction du temps. Nous pouvons observer que la fluorescence de cette dernière est relativement stable pendant les premières centaines de millisecondes après le début de la stimulation, à l'exception de quelques légères variations. Nous assistons par la suite à une augmentation soudaine de fluorescence (d'un facteur 5,5) probablement due au passage de FFN42, sonde pH-dépendante, du milieu vésiculaire acide vers le milieu extracellulaire qui lui possède un pH neutre. Nous avons en effet étudié dans le **Chapitre II**, la dépendance en pH de la molécule FFN42 qui augmente fortement lors du passage d'un pH 6 à un pH 7,4.

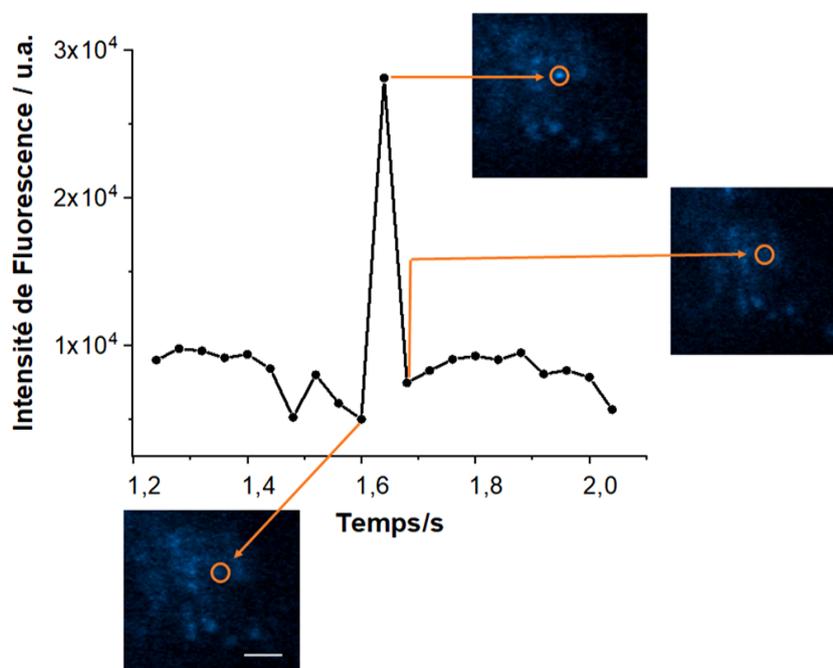


Figure III.5 : Premier exemple d'évolution de l'intensité de fluorescence d'une vésicule de sécrétion individuelle (indiquée par le cercle orange sur les images obtenues en microscopie TIRF – échelle 500 nm) en fonction du temps lors d'une stimulation par une solution d'ionomycine et d'une exposition au laser $\lambda = 405$ nm

L'intensité de fluorescence décroît par la suite de façon très rapide (~40 ms) pour retrouver une valeur comparable à celle observée avant l'apparition du flash de fluorescence. Ceci peut être interprété par la dissémination totale du contenu intravésiculaire vers le milieu extracellulaire. Cette catégorie de flashes de fluorescence a déjà été observée dans la littérature dans le cadre de l'étude du phénomène de sécrétion cellulaire par microscopie TIRF sur cellules BON internalisées avec FFN102 et a été qualifié de « flash soudain »^{52,89} du fait de l'impossibilité de visualiser le granule de sécrétion avant la dissémination du contenu intravésiculaire.

Deux formes de « flash soudain » peuvent se produire. L'un a lieu hors de la profondeur de pénétration de l'onde évanescente du TIRFM, tandis que l'autre se produit dans l'espace extracellulaire entre la cellule adhérente et la lamelle de verre ; donc dans le champ d'observation du TIRFM. Le premier cas est accompagné de la diffusion latérale de la sonde électro-fluorescente duale, indiquant que les vésicules parentes invisibles en TIRFM sont en fait situées sur la membrane cellulaire latérale, en dehors du champ évanescent et ne nous concernent donc pas. En ce qui concerne le deuxième cas, deux explications alternatives ont été proposées dans la littérature⁸⁶.

- TRAN *et al.*²⁰⁸ ont montré qu'environ 25% de tous les événements exocytotiques dans les membranes basales des cellules BON (dont les vésicules ont été transfectées par NPY-GFP fluorescent) ont lieu via un processus spécifique de « fusion séquentielle ». Lors de ce phénomène, lorsqu'une première vésicule fusionne avec la membrane cellulaire, contrairement au cas de fusion complète, sa membrane vésiculaire prend une forme de « Ω » qui survit pendant au moins plusieurs secondes après la libération. Comme tout son contenu fluorescent a déjà été expulsé, il devient invisible sous TIRFM, existant sous forme de vésicule dite « fantôme ». Ensuite, une deuxième vésicule, positionnée plus profondément dans le cytoplasme, vient fusionner avec cette vésicule « fantôme ». Lorsque les fluorophores provenant de l'intérieur de la deuxième vésicule sont libérés dans la lumière vide en forme de « Ω » de la vésicule « fantôme », les marqueurs fluorescents pénètrent dans le champ évanescent, entraînant une apparition soudaine de fluorescence. Enfin, ces sondes diffusent vers l'espace extracellulaire entre la cellule adhérente et la lamelle. En résumé, la rétention de forme des premières vésicules fusionnées et qui sont devenues des cibles pour des fusions séquentielles avec des

vésicules plus profondes joue un rôle clé. C'est l'une des explications possibles pour lesquelles des événements de « flash soudain » sont observés.

- Une seconde explication a été rapportée dans la littérature et suggère que le phénomène observé viendrait d'une population particulière de vésicules appelées « vésicules balistiques »²⁰⁸⁻²¹⁰ compte tenu de leur mobilité distincte et spécifique. Généralement, avant la fusion, ces « vésicules balistiques » sont situées dans le cytosol profond, au-delà du champ évanescent et sont donc invisibles sous TIRFM. Contrairement aux vésicules profondes en fusion séquentielle, elles ne dépendent pas de la vésicule « fantôme » en forme de « Ω » pour accomplir leur exocytose. Lors de la stimulation, elles parcourraient directement plusieurs centaines de nanomètres dans un court laps de temps (moins de ~ 100 ms) afin de fusionner avec la membrane cellulaire dans le champ évanescent, générant un événement sans vésicule parent détectable en TIRFM.

2.2.2) Le flash « normal »

Le flash normal diffère du flash « soudain », du fait de la visualisation de la vésicule sécrétrice au sein du cytoplasme avant expulsion de son contenu dans le milieu extracellulaire. Comme le révèle la **Figure III.6**, la fluorescence de la vésicule apparaît de façon plus progressive. La vésicule est visible avant sécrétion sur plusieurs images et dans ce cas précis pendant plus de 100 ms. Il s'agit d'un signal optique typique largement observé lors des sécrétions cellulaires de cellules BON^{86,89}. Comme pour le flash « soudain », une décroissance rapide de l'intensité de fluorescence est observée suite à une dissémination totale du contenu vésiculaire.

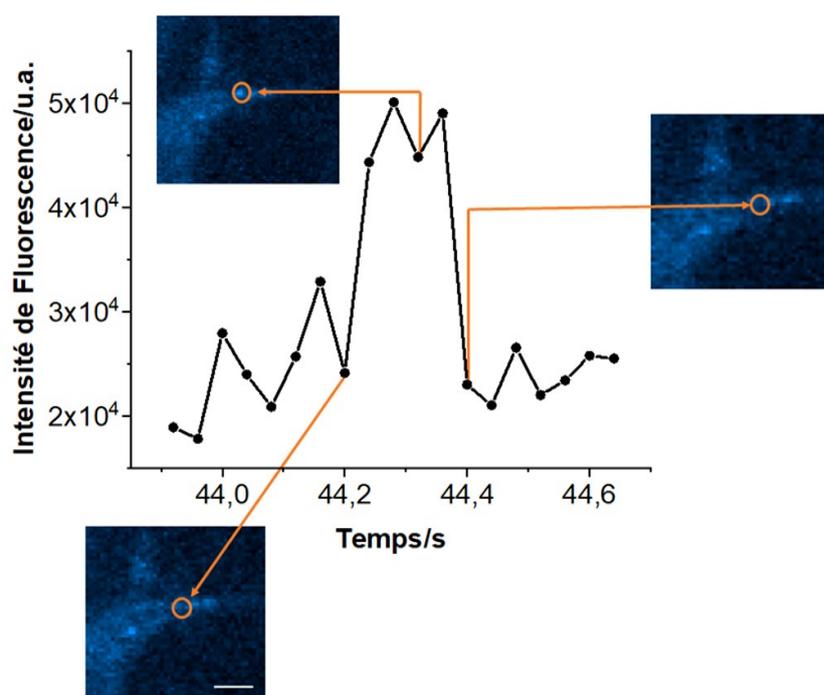


Figure III.6 : Second exemple d'évolution de l'intensité de fluorescence d'une vésicule de sécrétion individuelle (indiquée par le cercle orange sur les images obtenues en microscopie TIRF – échelle 500 nm) en fonction du temps lors d'une stimulation par une solution d'ionomycine et d'une exposition au laser $\lambda = 405$ nm

Sur les treize flashes répertoriés, six correspondent à des flashes dits « soudains » et sept à des flashes dits « normaux ». Cette étude ne constitue pas en soi une étude statistique des différentes catégories de signaux optiques obtenus par microscopie TIRF pour l'investigation de l'exocytose sur cellules BON, du fait du faible nombre d'évènements obtenus. En revanche, cette série d'expériences constitue une preuve de concept montrant que la dissémination de la sonde FFN42 au sein du milieu extracellulaire lors d'un phénomène exocytotique est détectable et caractérisable par microscopie TIRF.

3) Bilan

Au sein du **Chapitre II** de ce manuscrit, il a été démontré que la sonde FFN42 possédait la faculté d'être internalisée au sein de granules de sécrétion de différents modèles cellulaires. Dans ce **Chapitre III**, l'exocytose vésiculaire a été déclenchée sur des cellules BON N13 ayant préalablement internalisé cette sonde, par l'intermédiaire de modes de stimulation appropriés. Le phénomène de sécrétion cellulaire a pu être étudié par ampérométrie sur fibre de carbone et par microscopie TIRF indépendamment, avec une fréquence de sécrétion comparable pour les deux techniques analytiques employées. Cette fréquence exocytotique comprise entre 0,11 et 0,18 Hz est relativement faible et permettra vraisemblablement, lors des expériences de détection couplée, d'attribuer les pics ampérométriques aux signaux optiques associés et ce, sans ambiguïté. Ces résultats semblent prometteurs. FFN42 apparaît comme une molécule appropriée pour le suivi optique de l'exocytose par microscopie TIRF d'une part et constitue également une sonde de choix pour accéder aux informations d'ordre cinétique obtenues par ampérométrie. A ce stade, il est nécessaire pour élaborer le couplage de considérer les microdispositifs d'ITO les plus adaptés en matière de détections électrochimique et optique. Ce sera l'objet du **Chapitre IV** qui est consacré à discuter des avantages et inconvénients des précédents « designs » au laboratoire et des modifications nécessaires à apporter.

Chapitre IV: Elaboration d'un dispositif d'ITO pour l'étude de l'exocytose par détection couplée Electrochimie-Microscopie de Fluorescence

Le chapitre précédent a mis en évidence la faculté de la sonde FFN42 à être détectée par fluorescence et électrochimie, après avoir été internalisée au sein de vésicules sécrétrices de cellules BON N13. Toutefois, l'étude du phénomène d'exocytose dans son intégralité par détection couplée (Electrochimie-TIRFM) impose une détection au même endroit de la cellule, à savoir au niveau du pôle basal de cette dernière. Au regard de la littérature, plusieurs matériaux métalliques et semi-conducteurs peuvent être envisagés comme candidats potentiels pour la détection couplée. On peut ainsi citer l'ITO (« *Indium Tin Oxide* » traduit en langue française soit en « Oxyde d'Indium-Etain » soit en « Oxyde d'indium dopé à l'étain »)⁵³, le diamant dopé au bore « *Boron Doped Diamond* » ou BDD²¹¹, l'or¹²⁵, les nanotubes de carbone (CNT)²¹² ou encore les films de DLC : N (« *Nitrogen-Doped Diamond Like Carbon* »)²¹³. Effectuer un compromis entre les performances optiques et électrochimiques afin de trouver le matériau adapté semble impératif dans le cadre d'une détection couplée¹²². L'or et le platine constituent bien évidemment des matériaux de choix pour la détection électrochimique, mais possèdent une transmission modérée dans le domaine du visible (50 à 70% pour des films d'or de 13 nm d'épaisseur)^{126,211}. Cela nécessite de concevoir des films très fins (quelques dizaines de nanomètres seulement), d'une épaisseur comparable, ou légèrement plus élevée que la couche d'accroche nécessaire au dépôt sur verre (en général le titane), ce qui confère à ce type de film une fragilité mécanique non négligeable. Le BDD et le DLC : N présentent aussi des transmissions modérées dans le visible (~50%). Par ailleurs, le DLC : N nécessite souvent d'être préalablement déposé sur ITO²¹¹ afin d'améliorer sa conductivité. Enfin, les CNTs présentent l'avantage de pouvoir être déposés sur du verre mais un compromis entre concentration surfacique, épaisseur, conductivité et reproductibilité les rend difficiles d'utilisation en routine. Dans ce contexte, l'ITO apparaît comme le candidat possédant la meilleure transmission (> 80% pour des dépôts de l'ordre de 150 nm) dans le domaine du visible²¹⁴. Même si son comportement peut se rapprocher de celui d'un métal, comme nous

le verrons plus en détails dans la suite de ce chapitre, il possède une conductivité moins élevée que le platine ou l'or¹²⁵ mais qui reste toutefois adaptée aux études électrochimiques. Dans le cadre de ce projet de doctorat, de nouveaux dispositifs ont été développés au laboratoire et permettent cette étude par l'intermédiaire d'une fine couche d'ITO (d'une épaisseur de 150 nm) directement déposée sur une lamelle de verre circulaire de 4 cm de diamètre¹⁷³. Ces dispositifs d'ITO viennent s'inscrire dans la continuité de ceux élaborés précédemment par notre équipe^{53,86} tout en palliant certains défauts observés avec l'utilisation des précédents systèmes.

1) L'ITO (Oxyde d'Indium dopé à l'étain)

L'oxyde d'indium dopé à l'étain (ITO) est un mélange d'oxyde d'indium (In_2O_3) et d'oxyde d'étain (SnO_2), généralement en proportions massiques respectives 90/10. Il s'agit d'un semi-conducteur à large gap variant de 3,3 à 4,3 eV^{215,216}, selon les auteurs et les dopages (plus le dopage en étain est élevé, plus le gap est petit). L'ITO dopé « n » (semi-conducteur intrinsèque et dopé avec des espèces donneuses d'électrons) est communément utilisé en recherche et dans le milieu industriel (pour la fabrication d'écrans tactiles et de cellules solaires par exemple) du fait de sa transparence dans le domaine du visible, ainsi que de sa relative facilité de dépôt sous forme de film plus ou moins épais²¹⁷. Ce dernier étant considéré comme un semi-conducteur fortement dégénéré (son niveau de Fermi se situant au-dessus du minimum de la bande de conduction), il possède un comportement quasi-métallique. Sa dégénérescence est causée à la fois par les lacunes d'oxygène et par l'étain : un atome d'étain (Sn^{4+}) remplace un atome d'indium (In^{3+}) et se comporte comme un donneur de type « n ». La conductivité est donc assurée à la fois par les atomes d'étain et par les lacunes d'oxygène²¹⁶.

La conductivité électrique du dépôt d'ITO peut aller de 10^4 à $2 \cdot 10^5 \text{ S.m}^{-1}$ (la conductivité métallique est de l'ordre de 10^7 S.m^{-1}).²¹⁸⁻²²⁰ L'ITO apparaît donc comme particulièrement adapté pour notre application. Par ailleurs, sa fenêtre de détection, qui s'étend de -0,8 à +1,2 V *vs* Ag/AgCl²²¹, semble compatible avec l'observation de l'oxydation de la molécule FFN42 sur la base du comportement électrochimique décrit au sein du second chapitre. De plus, pour des dépôts d'ITO en couches minces (de l'ordre de quelques centaines de nanomètres) sur un substrat de verre, une transmission de plus de 85% est obtenue^{214,222}.

Avec de telles caractéristiques, l'ITO est le matériau que nous avons choisi pour la fabrication de dispositifs de détection dans le cadre de la détection couplée de l'exocytose vésiculaire¹⁵⁷.

2) Dispositifs précédemment élaborés au laboratoire

Dans le cadre des précédents travaux effectués au laboratoire, les dispositifs utilisés pour l'étude de l'exocytose par détection couplée étaient élaborés selon un protocole différent de celui utilisé dans le cadre de cette thèse. Le dépôt d'ITO de 150 nm (étape 1 sur la **Figure IV.1**), était effectué par une entreprise externe : ACM (Villiers Saint Frédéric). Par la suite, deux étapes de lithographie étaient réalisées au laboratoire impliquant une photo-résine positive⁴ « AZ9260 » (2) suivie d'une insolation UV (3), d'une étape de développement (4) et d'une gravure à l'acide chlorhydrique, ce qui permettait d'obtenir le design des électrodes souhaité. Une seconde étape, nécessitant l'utilisation de la photo-résine négative (SU-8 3010) (6), permettait de former un puits sur le dispositif afin de pouvoir obtenir la surface souhaitée des électrodes⁸⁶ (étape 8 **Figure IV.1**).

Ces lamelles de verre étaient par la suite collées, à l'aide de PDMS (polydiméthylsiloxane – polymère siliconé biocompatible) au centre de boîtes de Petri (P50G-1.5-14-F, MatTek Cultureware, Ashland, Massachusetts) préalablement percées d'un orifice de 1,5 cm de diamètre. Ces dispositifs ainsi créés ont permis l'étude de l'exocytose vésiculaire ainsi que l'obtention de signaux couplés dans le cadre des thèses d'Anne MEUNIER et de Xiaoqing LIU⁵².

⁴Une résine positive est une résine dont la partie insolée à l'UV possède une solubilité accrue au solvant de révélation (ou développeur). A contrario, le rayonnement UV entraîne une polymérisation à la surface des résines négatives, conférant à ces dernières une forte résistance au solvant de révélation.

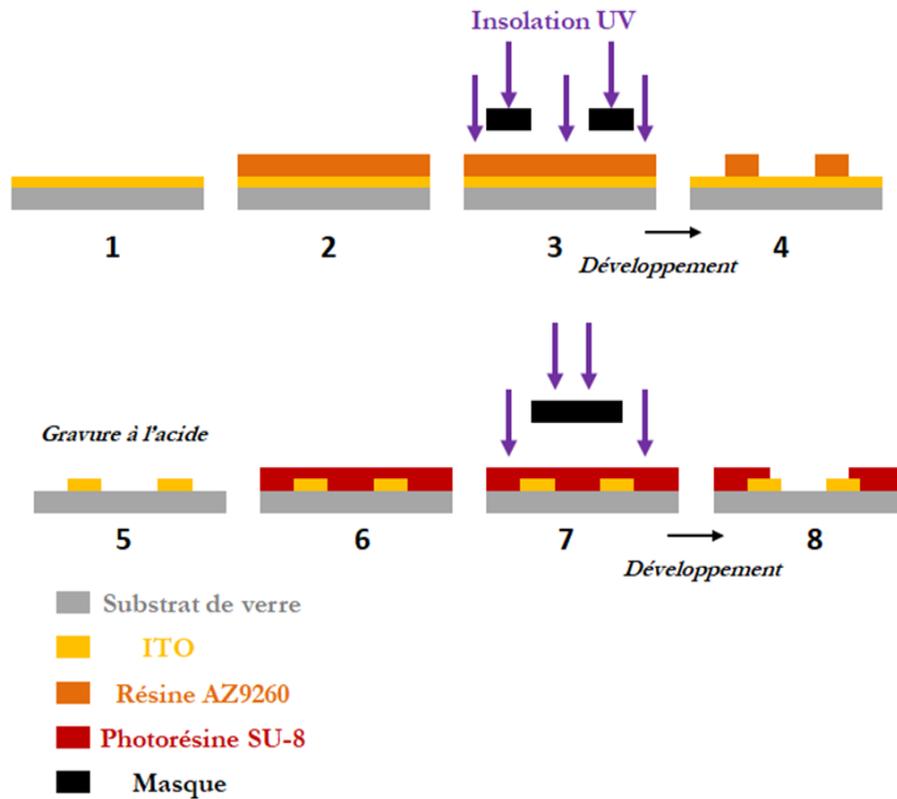


Figure IV.1 : Etapes de lithographie pour la réalisation du dispositif précédemment utilisé au laboratoire

Cependant, certains inconvénients concernant la fabrication et l'utilisation de ces dispositifs ont été constatés. Le procédé de fabrication de ces derniers reposait sur un processus de « gravure » de l'ITO par l'acide chlorhydrique, ce qui pouvait causer la dégradation des bords des électrodes obtenues, ainsi que la réduction de la dimension de ces dernières par rapport à la définition du masque, en pouvant aller jusqu'à leur disparition à moyen terme. Hormis cette absence de contrôle de la surface réelle des électrodes, l'uniformité de l'adhésion des cellules sur l'ensemble SU-8/ITO nécessitait également un traitement final supplémentaire au plasma. Enfin, la photo-résine SU-8, sensible à l'irradiation UV, pouvait être détériorée lors des expériences de TIRFM et de détection couplée, révélant une surface active d'ITO qui s'avérait problématique pour le rapport signal/bruit. Les dispositifs ainsi obtenus ne sont pas réutilisables, ce qui, combiné aux questions de variabilité cellulaire, conduit à un temps expérimental conséquent concernant l'élaboration et la mise en place de ces dispositifs de détection en conditions biologiques.

3) Procédé de fabrication des nouveaux dispositifs d'ITO

De nouveaux dispositifs ont été élaborés au sein du laboratoire par le biais d'un procédé de lithographie optique et de dépôt d'ITO par « *sputtering* ». La réalisation de ces nouveaux dispositifs a demandé un travail d'investigation sur le design des électrodes et la technique de dépôt, mené de concert avec M. Eric AIT-YAHIA TENE, ingénieur d'étude au laboratoire.

3.1) La lithographie

La première étape de ce procédé consiste à délimiter la surface des électrodes sur le substrat de verre. Pour ce faire, une résine photosensible positive (AZ5214-E – Microchemicals) est utilisée. Cette dernière est déposée sur le substrat de verre par enduction centrifuge. Le substrat, ici constitué par une lame de verre, est posé et maintenu par aspiration sur un plateau tournant à haute vitesse, afin d'étaler la résine déposée de façon uniforme par force centrifuge.

Dans un premier temps, les lames de verres (lamelles circulaires de 4 cm de diamètre et de 170 μm d'épaisseur - Thermoscientific) sont nettoyées à l'acétone, puis à l'isopropanol, avant d'être séchées à l'air comprimé. Elles subissent ensuite un traitement au plasma à oxygène (0,2 mBar pendant 4 minutes) de façon à rendre leur surface totalement dépourvue d'impuretés (le plasma permet de nettoyer la surface tout en l'activant, la rendant hydrophile et favorisant l'étalement de la résine). Un promoteur d'adhérence (*Ti-primer*) est ensuite déposé sur la lame de verre (afin de faciliter l'adhésion de la résine par la suite) par enduction centrifuge (*spincoater*) selon les paramètres répertoriés dans le **Tableau IV.1**.

	Durée (s)	Vitesse (rpm)	Accélération ($\text{rpm}\cdot\text{s}^{-1}$)
1 ^{ère} étape	5	1500	500
2 ^{ème} étape	30	4000	1500

Tableau IV.1 : Tableau répertoriant les paramètres de dépôt du Ti-primer

Les lamelles de verre sont ensuite placées sur une plaque chauffante pendant une durée de deux minutes à 110 °C. La résine AZ5214-E est déposée à leur surface par enduction centrifuge également et selon deux étapes dont les paramètres sont identiques à ceux utilisés pour le Ti-Primer (**Tableau IV.1**).

Les lamelles subissent ensuite une étape de recuit pendant une durée de deux minutes à une température de 110°C. Une étape d'insolation UV sur aligneur (SUSS MicroTec SUSS MicroTecMJB4 Mask Aligner) est par la suite réalisée (mode : « *First Exposure* ») à l'aide d'un masque (Selba, Versoix, Suisse) délimitant les surfaces des futures électrodes (**Figure IV.2**), et préalablement nettoyé à l'isopropanol.

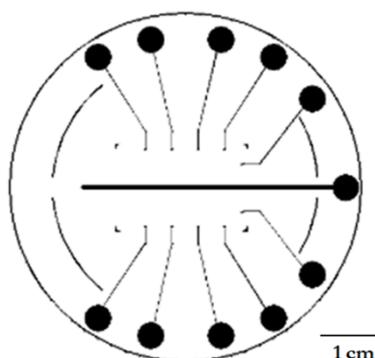


Figure IV.2 : Masque du futur dispositif réalisé grâce au logiciel « Clewin »

Le rayonnement UV produit une transformation chimique des macromolécules à la surface de la résine positive (**Figure IV.3**, étape 2), entraînant une solubilité accrue des zones exposées aux rayonnements UV, lors de leur immersion dans le solvant de développement. Une étape de recuit est ensuite réalisée sur plaque chauffante pendant deux minutes à 125°C, permettant la réticulation de la résine déposée. Une seconde exposition UV sur aligneur est effectuée, cette fois-ci sans masque (mode « *Flood Exposure* »), et ce, durant 30 secondes.

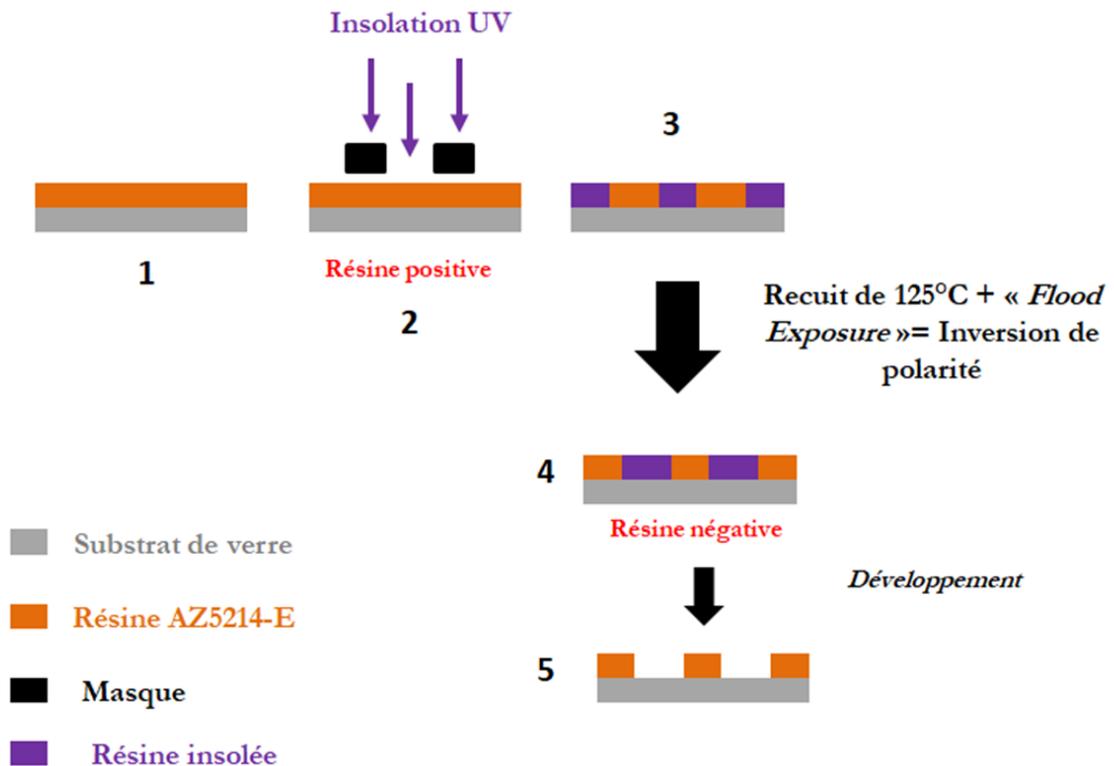


Figure IV.3 : Etapes de lithographie optique pour la réalisation du dispositif d'ITO employé dans le cadre de ce doctorat

Ces dernières étapes vont créer une inversion de polarité de la résine (**Figure IV.3**, étape 4) qui va alors revêtir un caractère négatif. Le rayonnement ultraviolet entraîne une polymérisation de la résine et confère aux zones insolées une tenue particulière au solvant de révélation alors que les parties non insolées (et donc par conséquent, les motifs des électrodes définis par le masque (présenté en **Figure IV.2**) et protégés des rayonnements UV par ce dernier), disparaissent sélectivement dans ce solvant. Les substrats sont donc immergés au sein d'un récipient contenant le développeur (AZ 726 MIF –Microchemicals) pendant une durée de 30 secondes. Ces derniers sont par la suite rincés à l'eau déionisée et séchés à l'air comprimé. Cette étape permet de révéler la surface des futures électrodes sur lesquelles sera déposé l'ITO ultérieurement. La résine est alors présente sur toute la surface du substrat à l'exception de la surface des futures électrodes (**Figure IV.3**, étape 5).

3.2) L'étape de dépôt par « sputtering »

3.2.1) L'ITO

Les électrodes d'ITO utilisées pour l'étude couplée de l'exocytose sont issues de dépôts effectués par pulvérisation cathodique assistée par plasma. Le matériel disponible au laboratoire est un métalliseur RF (Emitech K675XD). Dans une chambre sous vide secondaire contenant de l'argon $\text{Ar}_{(g)}$, un champ électrique E Haute Fréquence (HF) appliqué entre l'anode et la cathode sur laquelle se trouve la cible ITO, permet de créer un plasma froid d'ions (Ar^+) et d'électrons (e^-) maintenu localement par un champ magnétique B . Les ions argon (Ar^+), issus de l'ionisation de l'argon atomique $\text{Ar}_{(g)}$ par collision électronique, présentent une énergie cinétique suffisamment importante (sous l'action du champ électrique E), pour arracher des atomes métalliques et venir les déposer sur l'échantillon. Les conditions opératoires de dépôt, en matière d'intensité de pulvérisation et de temps d'exposition, sont consignées dans le **Tableau IV.2**.

<u>Courant appliqué</u>	150 mA
<u>Durée d'un cycle de métallisation</u>	84 s
<u>Nombre de cycles</u>	10

Tableau IV.2 : Paramètres de dépôt de l'ITO sur lamelles de verres lithographiées

Il a été montré dans la littérature, que la qualité du dépôt d'ITO était optimale (notamment une résistivité faible, de l'ordre de $4,3 \times 10^{-3} \Omega \cdot \text{cm}$) à une puissance et donc une intensité maximale du métalliseur^{223,224}. Le métalliseur disponible au laboratoire permettant de réaliser des dépôts avec une intensité maximale de 150 mA, c'est donc cette valeur qui a logiquement été retenue. L'épaisseur du dépôt d'ITO doit par ailleurs permettre dans le cadre de notre application, une transmission dans le visible suffisante pour l'observation par microscopie TIRFM, ainsi qu'une conductivité permettant la détection électrochimique. Il a été montré que pour des dépôts d'ITO en couches minces (de l'ordre de quelques centaines de nanomètres) une transmission de plus de 85% est obtenue^{214,222}. De plus, la résistivité électrique diminue avec l'épaisseur offrant ainsi une bonne conductivité, c'est-à-dire entre $2,1 \times 10^{-3}$ et $8 \times 10^{-3} \Omega \cdot \text{cm}$ pour des épaisseurs typiquement comprises entre 100 et 200 nm^{217,225,226}. Le choix d'une épaisseur de 150 nm d'ITO a donc été fait dans le cadre de

cette application. L'ITO ainsi déposé subit par la suite une étape de recuit qui sera explicitée **partie 3.3** de ce chapitre.

3.2.2) Le platine

Une seconde métallisation de platine est réalisée aux extrémités des électrodes de travail d'ITO (en cachant la partie centrale du dispositif lors de la métallisation), ceci afin d'augmenter la conductivité des électrodes et de faciliter la réalisation des connectiques. Ainsi, la partie des électrodes se situant à l'intérieur de la partie rectangulaire du puits est constituée uniquement d'ITO, tandis que les extrémités de ces dernières sont également constituées d'un dépôt d'ITO mais aussi recouvertes d'une cinquantaine de nanomètres de Platine (**Figure IV.6**). Les paramètres de dépôt du platine sont répertoriés au sein du **Tableau IV.3** ci-dessous.

<u>Courant appliqué</u>	125 mA
<u>Durée d'un cycle de métallisation</u>	90 s
<u>Nombre de cycles</u>	2

Tableau IV. 3 : Paramètres de dépôt du Platine sur lamelles de verres lithographiées

Une étape de « *Lift-off* » dans un bain d'acétone soumis aux ultrasons est ensuite effectuée, afin de dissoudre la résine et de faire apparaître le dépôt réalisé et ainsi révéler le design des électrodes.

3.2.3) L'électrode de référence Ag/AgCl

Un autre inconvénient des anciens dispositifs, bien que moins crucial, concernait l'utilisation d'une électrode de référence non intégrée (constituée par un fil d'argent recouvert d'une couche de chlorure d'argent). Dans ce contexte d'élaboration de nouveaux dispositifs d'ITO, l'électrode de référence est également déposée par pulvérisation cathodique. Cette dernière se situe au centre du rectangle du puits qui servira à la culture cellulaire et possède les dimensions suivantes : 1,5 cm de longueur pour 500 μm de largeur (**Figure IV.2**).

Pour l'étape de métallisation, un masque des dimensions de l'électrode d'argent été créé de façon à déposer le métal uniquement sur cette partie de la lamelle de verre. Quelques

dizaines de nanomètres de titane⁵ sont tout d'abord déposés afin d'améliorer l'adhésion de l'argent sur le verre. Les paramètres de dépôt de l'argent sont répertoriés au sein du

Tableau IV. 4

<u>Courant appliqué</u>	125 mA
<u>Durée d'un cycle de métallisation</u>	60 s
<u>Nombre de cycles</u>	4

Tableau IV.4: Paramètres de dépôt de l'électrode d'Argent sur lamelles de verres lithographiées

L'électrode d'argent ainsi déposée sur la lamelle de verre est immergée dans une solution de 5 mmol.L⁻¹ de trichlorure de fer (FeCl₃) durant 2 minutes²²⁸. Ceci permet alors d'oxyder dans des conditions douces une partie de l'argent en chlorure d'argent.

3.3) Le recuit de l'ITO

L'étape de recuit est indispensable afin d'augmenter de façon considérable la conductivité et la transparence du dépôt brut d'ITO. Le recuit va permettre de faire croître les différents grains (constituant la structure de l'ITO) de la couche mince d'ITO et ainsi de passer de l'état amorphe à l'état cristallin. La littérature indique qu'une cristallisation s'opère à partir d'une température de 150°C et qu'il existe une fenêtre de recuit optimale comprise entre 200°C et 320°C²²⁹. Le four disponible au laboratoire étant capable de monter en température de 300°C, une valeur de 290°C a été choisie comme température de recuit.

Cette étape de recuit est réalisée au sein d'un four classique, à l'air et sous pression atmosphérique. La programmation du four s'effectue en trois étapes, la première consistant à appliquer une rampe linéaire en température pendant 1h30 jusqu'à 290°C (de 5°C/min), la seconde est un plateau d'une durée de 3h15 (195 minutes) à 290°C. La dernière consiste à effectuer un retour à température ambiante par l'intermédiaire d'une descente en température dite « douce » (environ 1°C/min qui va permettre d'éviter une fracture du réseau cristallin).

La durée du plateau à 290 °C est d'une importance primordiale puisqu'elle a une incidence sur la conductivité de l'ITO fabriqué. Ainsi, plusieurs durées ont été testées et il apparaît,

⁵Le choix du titane en couche d'accroche est lié au fait que ce dernier est biocompatible²²⁷.

d'après la **Figure IV.4**, que celles générant la résistance carrée la plus faible (Ω/\square) se situent entre 180 et 200 minutes.

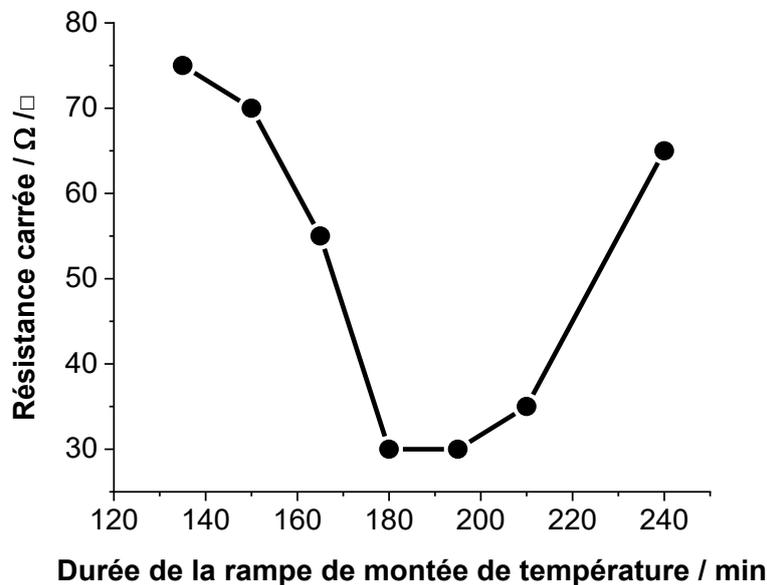


Figure IV.4 : Valeurs de résistances obtenues pour différents plateaux de températures

La courbe expérimentale présentée en **Figure IV.4** montre l'évolution de la résistance en fonction du temps de recuit. On observe ainsi, une diminution de la résistance du dépôt pour des durées s'échelonnant de 130 à 180 min, correspondant à la croissance des grains de la couche mince d'ITO, passant ainsi d'une structure amorphe à une structure cristalline, avec une augmentation de la concentration en porteurs de charge²¹⁸. Les plus gros grains vont croître au détriment des plus petits et ainsi créer une structure cristalline de qualité bien supérieure en termes de transparence mais aussi de conductivité.

Pour des durées de recuit s'échelonnant de 180 à 200 min environ, la résistance n'évolue plus et une valeur minimale de $30 \Omega/\square$ est obtenue. Cette valeur est liée à la fin de cette plage de croissance des grains et à l'obtention d'une couche mince d'ITO cristallisée. Une nette augmentation de la résistance de l'ITO est observée pour des temps de recuit plus longs (supérieurs à 200 min). Ceci n'est vraisemblablement plus lié à la cristallisation, mais à un phénomène de diffusion des atomes d'étain (Sn) à partir des joints de grains vers l'extérieur de la couche mince, ce qui a pour conséquence d'augmenter la valeur de la résistance de façon drastique. En effet, les ions Sn^{4+} vont se lier à un atome d'oxygène

supplémentaire, pour former l'oxyde d'étain (SnO_2), piégeant ainsi les électrons tout en diminuant la mobilité des porteurs de charge²³⁰.

3.4) La réalisation des contacts électriques et la délimitation de la surface active des électrodes

Les contacts électriques sont réalisés à l'aide de fils électriques étamés et soudés à l'étain sur les dépôts circulaires de platine situés à l'extrémité de la plaque de verre. Par la suite, un dépôt d'Araldite® est effectué de façon à rigidifier l'ensemble des connexions électriques. Un double puits est conçu avec deux matériaux différents possibles. Ce dernier est soit confectionné en PDMS (réalisé à l'aide d'un moule en aluminium), soit en plastique Zortrax Z-HIPS fabriqué par impression 3D (**Partie Expérimentale** section 6.1). La partie circulaire supérieure est de 3 cm de diamètre et de 1,5 cm de hauteur. Elle permet de délimiter le volume de solution nécessaire à la culture cellulaire et à l'étude de l'exocytose sur ces échantillons. Le second puits de forme rectangulaire (inclus au sein du puits circulaire) de 1 cm de largeur, 1,5 cm de longueur et 0,5 cm de hauteur permet de délimiter la surface active des électrodes (**Figure IV.5** et **IV.6**) et est au contact de la lamelle circulaire de verre.

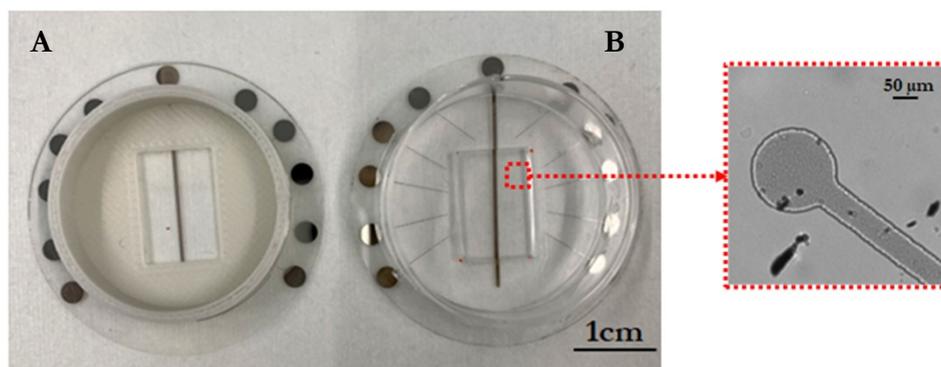


Figure IV.5 : Exemple de puits obtenu par impression 3D (A.) et de puits en PDMS (B.)

Les dispositifs ainsi créés possèdent huit à dix électrodes d'TTO (selon les masques utilisés) comprenant chacune un disque d'TTO possédant un diamètre de 150 μm et une bande de 50 μm de largeur placée à 500 μm du bord (**Figure IV.6**).

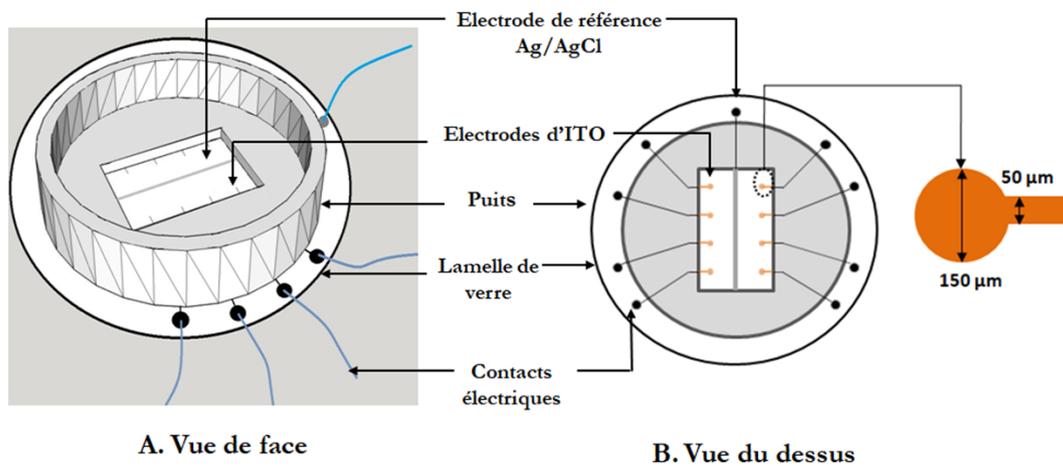


Figure IV.6 : Schéma des dispositifs d'ITO élaborés au laboratoire

Une fois la conception de ces dispositifs effectuée, une caractérisation du dépôt d'ITO ainsi que de ses caractéristiques optiques et électriques a été effectuée.

4) Caractérisation du nouveau dispositif

4.1) Caractérisation du dépôt d'ITO par AFM

Afin de déterminer l'épaisseur du dépôt d'ITO, une caractérisation par Microscopie à Force Atomique (« *Atomic Force Microscopy* » ; AFM) a été effectuée (Microscope « Dimension EDGE » - Brücker). Ainsi la topographie et le profil de l'ITO déposé par pulvérisation cathodique ont pu être observés et ont été obtenus via le logiciel « Nanoscope Analysis » (Figure IV.7).

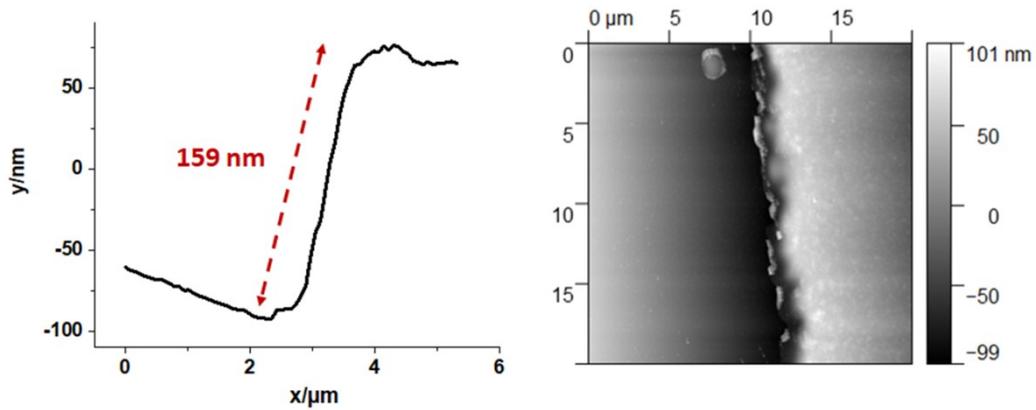


Figure IV.7 : Profil et topographie de l'ITO déposé par pulvérisation cathodique

D'après la **Figure IV.7**, une hauteur de 159 nm a été mesurée entre la plaque de verre et l'ITO déposé. La même expérience a été réitérée sur la partie de l'électrode d'ITO recouverte de platine (**Figure IV.8**).

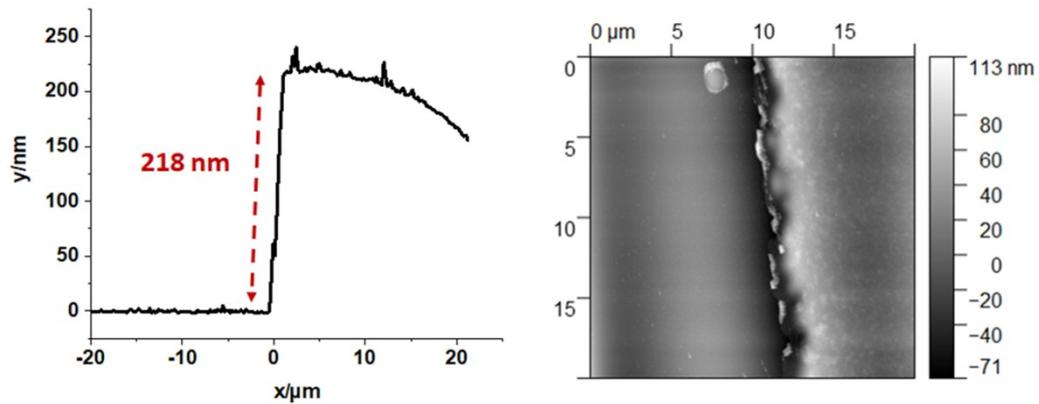


Figure IV.8 : Profil et topographie du dépôt ITO + platine, obtenu par pulvérisation cathodique

Une hauteur de 218 nm a été relevée entre le verre et le dépôt. Le dépôt de platine mesure donc 59 nm.

4.2) Caractérisation physico-chimique des nouveaux dispositifs

4.2.1) Propriétés optiques

Des mesures de la transmission optique de nos dépôts d'ITO obtenus par pulvérisation cathodique ont ensuite été effectuées afin de confirmer leur compatibilité avec une étude Ampérométrie- TIRFM couplée.

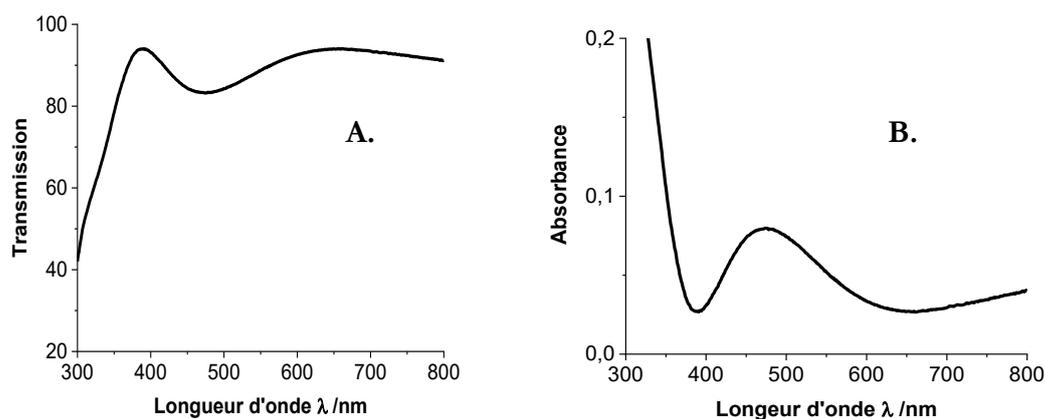


Figure IV.9 : Spectres de transmission (A.) et d'absorption (B.) du dépôt d'ITO

La **Figure IV.9A** montre que pour une épaisseur de 150 nm dans nos conditions de dépôt et de recuit, l'ITO ainsi généré possède à 405 nm (longueur d'onde du laser utilisé au laboratoire), une transmission de 92,3%. Il s'agit d'une valeur remarquable de 10% plus élevée que les transmissions habituelles pour l'ITO dans cette gamme de longueur d'onde. De plus, d'après la **Figure IV.9B**, l'ITO n'absorbe que très peu à une longueur d'onde de 405 nm (absorbance de l'ordre de 0,035), ce qui ne devrait ni altérer ni gêner l'observation cellulaire par microscopie TIRF.

Par conséquent, l'ITO obtenu par pulvérisation cathodique puis recuit semble posséder les caractéristiques optiques adaptées pour l'étude de l'exocytose vésiculaire. Cependant, dans le but d'une future détection couplée, il est également nécessaire d'étudier ses caractéristiques électriques et électrochimiques.

4.2.2) Propriétés électriques

Les propriétés électriques des dépôts d'ITO obtenus ont également été étudiées. La résistance carrée a été mesurée et s'étend de 30 à 35 Ω/\square soit environ $2 \times 10^5 \text{ S.m}^{-1}$, ce qui correspond à une gamme élevée de conductivité pour un film d'ITO.

Avec comme perspective l'utilisation de ce dispositif d'ITO lors d'expériences couplées Electrochimie-TIRFM, le potentiel d'oxydation de la molécule FFN42 a été étudié sur un dépôt d'ITO réalisé au laboratoire et le voltammogramme obtenu est présenté en **Figure IV.10**.

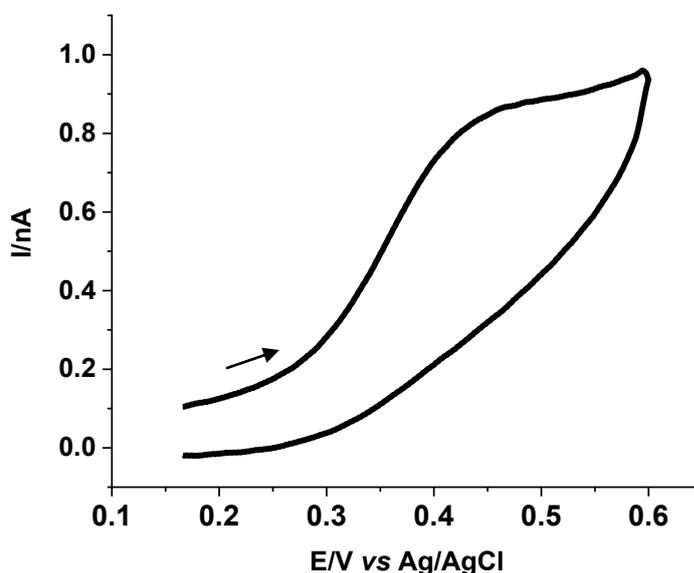


Figure IV.10 : Voltammogramme obtenu pour $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN42 en milieu PBS (pH = 7,4) sur électrode d'ITO à 200 mV.s^{-1} ($E_i = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}$)

Ainsi, la molécule FFN42 s'oxyde à un potentiel de 450 mV *vs* Ag/AgCl. Ce potentiel est plus élevé que celui répertorié sur électrode en fibre de carbone (240 mV *vs* Ag/AgCl) mais reste cohérent avec la nature de l'ITO pour lequel le transfert de charges s'effectue de manière plus lente (même s'il est un semi-conducteur fortement dégénéré, l'ITO reste moins conducteur qu'un métal). Plus particulièrement, cette valeur est bien inférieure à celle mesurée sur ITO pour la molécule FFN102 (900 mV *vs* Ag/AgCl)¹⁵⁹. Ceci suggère que les conditions électrochimiques de détection de FFN42 peuvent permettre de s'affranchir du photo-courant généré lors des manipulations couplées, et qui pouvait s'élever à plus de

20 pA⁸⁶. A cet égard, une série d'expériences relevant le bruit (ou photo-courant) généré pour les différentes puissances du laser 405 nm a été effectuée.

4.3) Etude du bruit électrochimique généré par le laser à 405 nm

La molécule d'intérêt, FFN42, absorbant dans le proche UV à une longueur d'onde $\lambda = 380$ nm, le laser présent au laboratoire choisi pour les analyses en TIRFM est celui qui possède la longueur d'onde la plus proche, soit 405 nm. Comme décrit précédemment, lors des mesures couplées (Ampérométrie-TIRFM) réalisées avec la sonde FFN102, le potentiel appliqué combiné à l'utilisation du laser à 405 nm génère un bruit électrochimique ou photo-courant, dont il est nécessaire de s'affranchir.

Dans ce contexte, la **Figure IV.11** ci-dessous présente le saut de courant observé en fonction de la puissance du laser à 405 nm utilisée, ainsi que du potentiel électrique appliqué. Ainsi, il a été observé une augmentation du saut de courant avec l'augmentation du potentiel appliqué et de la puissance du laser utilisé.

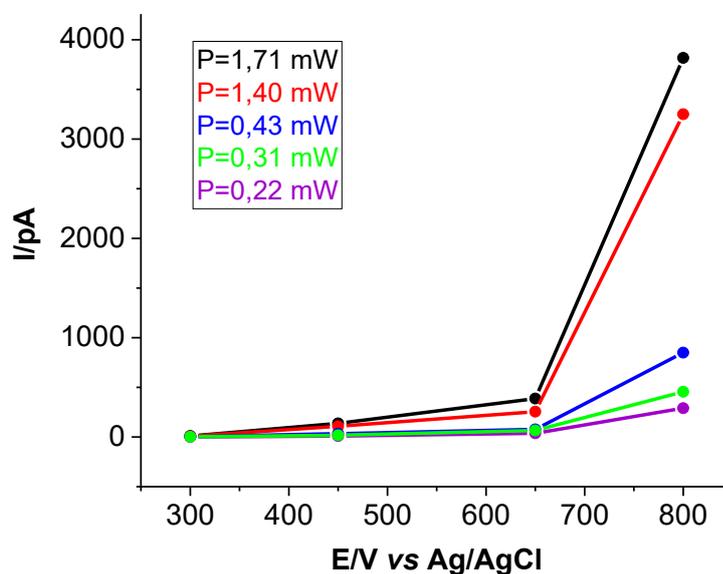


Figure IV.11 : Etude du saut de courant observé en fonction des différents potentiels d'oxydation appliqués pour les 5 puissances du laser à 405 nm

On constate donc que pour des valeurs élevées de potentiel, un photo-courant apparaît, en accord avec certaines propriétés semi-conductrices de l'ITO.

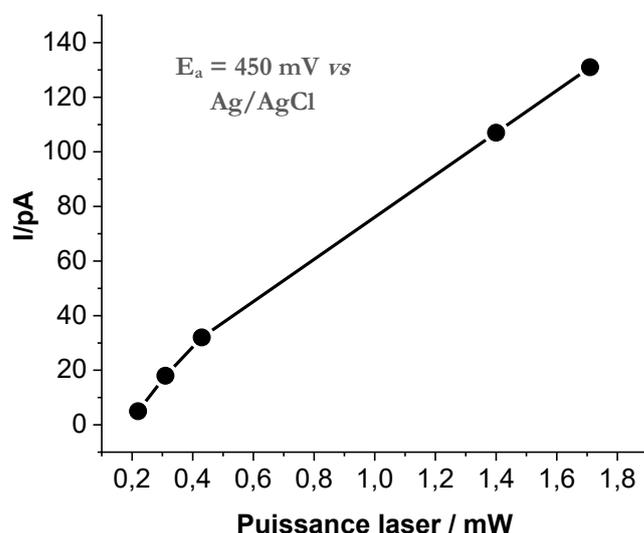


Figure IV.12 : Etude du saut de courant observé, pour un potentiel de 450 mV vs Ag/AgCl en fonction des différentes puissances du laser à 405 nm

La **Figure IV.12** représente l'intensité du photo-courant pour un potentiel appliqué de 450 mV vs Ag/AgCl. A nouveau, le saut de courant augmente avec la puissance du laser à 405 nm.

Cependant, il est à souligner que, malgré ce saut de courant, la ligne de base obtenue en chronoampérométrie suite à l'exposition du laser est très rapidement stable (de l'ordre d'une centaine de millisecondes). De plus, nous pouvons noter que le « bruit électrochimique » généré par le laser sur le dispositif d'ITO reste toujours compris entre 2 et 5 pA, quelle que soit la puissance du laser utilisé. La **Figure IV.13** présente un exemple pour une puissance de laser de 1,40 mW et pour un potentiel appliqué de +450 mV vs Ag/AgCl.

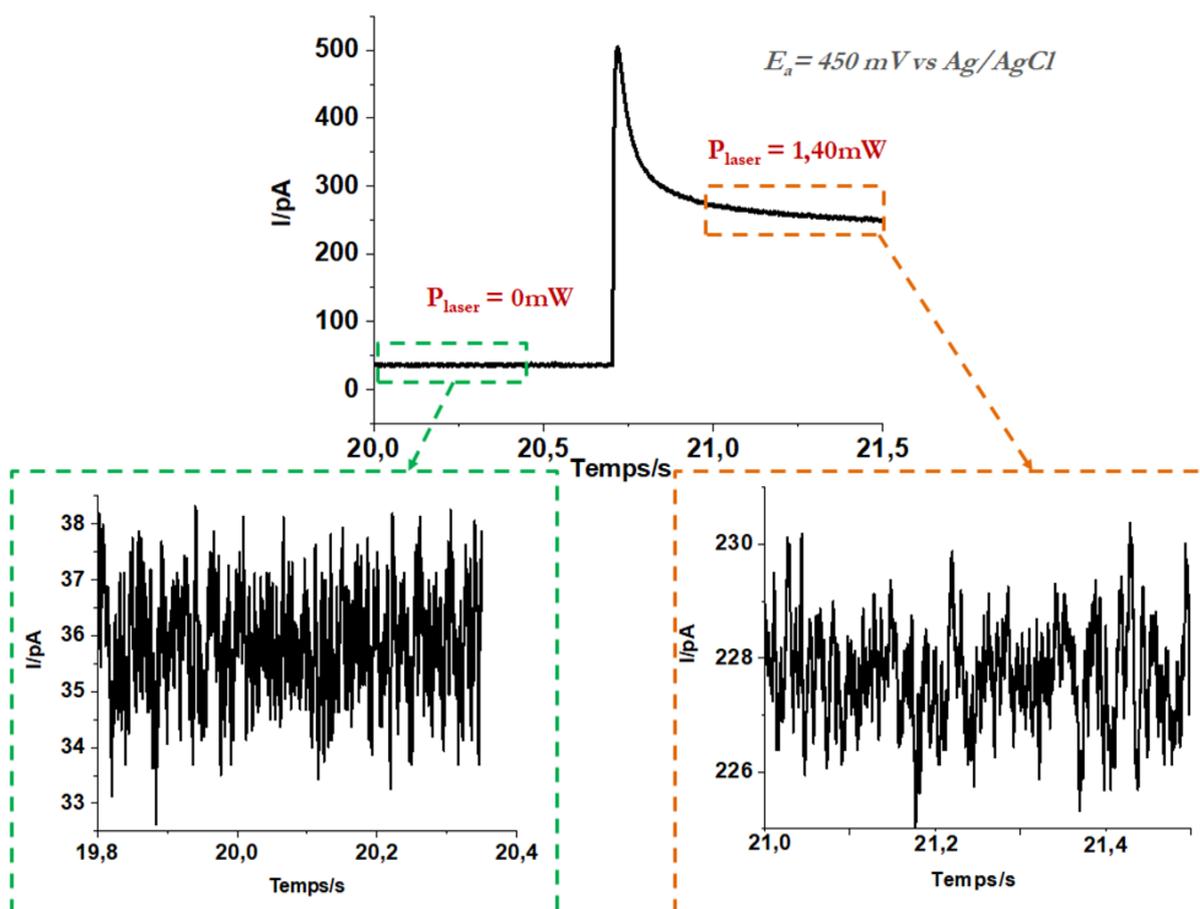


Figure IV.13 : Exemple de chromatogramme obtenu lors de l'imposition du laser à 405 nm pour une puissance de 1,40 mW et pour un potentiel de + 450 mV vs Ag/AgCl

Ainsi, nous pouvons observer que pour une puissance de laser nulle, le bruit résiduel pour un potentiel de 450 mV vs Ag/AgCl est compris entre 2 et 5 pA, ce qui est le cas également pour le bruit observé après l'exposition de l'échantillon à une puissance de laser de 1,40 mW. Le laser ne semble donc pas avoir d'incidence sur ce paramètre. Le bruit électrochimique a été relevé pour les cinq puissances de laser disponibles au laboratoire et ce dernier se révèle toujours comparable à celui relevé pour l'électrode non exposée au laser à 405 nm. Par ailleurs, l'intensité des pics obtenus pour l'étude de l'exocytose sur cellules BON N13 avec FFN102 s'échelonne de la dizaine de picoampères à plus de 70 pA⁵². Ainsi, ce courant résiduel de quelques pA ne devrait pas affecter l'observation de la plupart des pics ampérométriques obtenus pour les expériences d'ampérométrie sur cellules BON N13 ayant préalablement internalisé FFN42. Nous pouvons ainsi espérer augmenter, grâce à

l'utilisation de ce dispositif et du composé FFN42, le nombre d'évènements optiques et ampérométriques couplés.

4.4) Etude de la stabilité des microsystèmes d'ITO

L'un des objectifs de la mise en place de ce nouveau dispositif d'ITO consistait à pouvoir le réutiliser à plusieurs reprises pour les expériences sur cellules. Ainsi, afin de s'assurer de cette caractéristique, une expérience de voltammétrie cyclique a été effectuée pour une solution de ferrocène méthanol (FcMeOH) sur une des électrodes présente sur le dispositif d'ITO (courbe noire de la **Figure IV.14**). Ce dernier a par la suite été utilisé pour des expériences de TIRFM sur cellules BON N13 (expériences décrites au sein de **la partie 4.6** de ce chapitre).

Ce même dispositif a été préalablement traité avec une solution de collagène IV ($0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$; préparation de la solution décrite en section **3.4** de la **Partie Expérimentale**) avant l'ajout de cellules. Par la suite, $300 \mu\text{L}$ de la solution de collagène IV ont été utilisés de façon à recouvrir l'intégralité de la surface du substrat. Cette solution de collagène IV permet une adhésion optimale des cellules sur le substrat de verre, rendant leur observation plus aisée au microscope par épifluorescence et au TIRFM.

Une fois les expériences sur cellules réalisées, 1 mL de Trypsine-EDTA est ajouté, de façon à détacher les cellules qui ont adhérees à la surface de verre. La Trypsine est par la suite rincée à plusieurs reprises avec de l'eau déminéralisée et de l'éthanol à 99%. Les échantillons sont ensuite observés au microscope de façon à exclure toute présence de débris cellulaires sur le dispositif.

Afin de vérifier que les électrodes d'ITO déposées par lithographie n'ont pas été altérées par le protocole de nettoyage précédemment décrit ainsi que lors des expériences de TIRFM effectuées sur cellules BON N13, un second voltammogramme du ferrocène méthanol a été effectué sur la même électrode que celui réalisé avant adhésion des cellules. La **Figure IV.14** présente la superposition des deux voltammogrammes pour une solution de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FcMeOH en solution de PBS et pour une vitesse de balayage de 20 mV.s^{-1} .

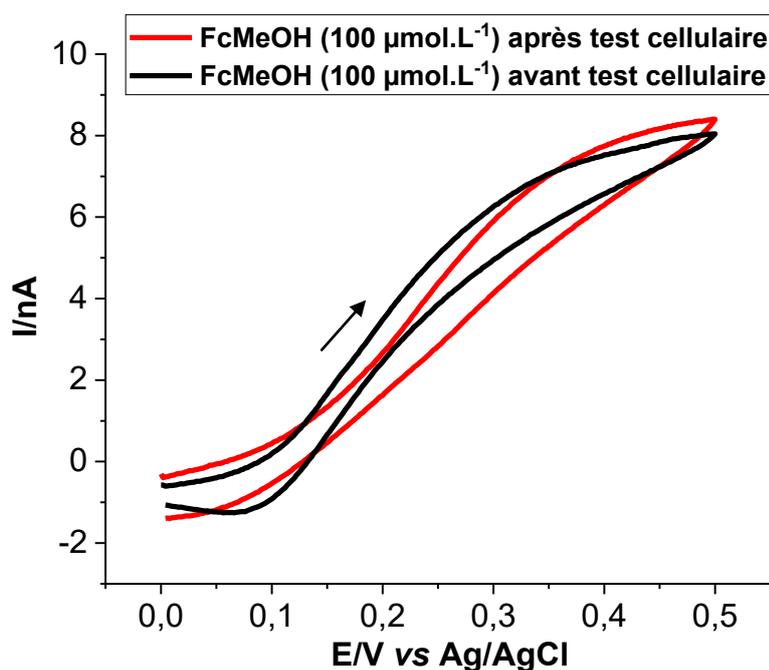


Figure IV.14 : Voltammogrammes obtenus pour le Ferrocène Méthanol ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en milieu PBS $\text{pH} = 7,4$ pour une vitesse de balayage de 20 mV.s^{-1}) ($E_i = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}$)

Bien que les voltammogrammes obtenus ne soient pas parfaitement superposables, l'intensité du courant de plateau obtenue est sensiblement la même (aux alentours de 8 nA). Néanmoins, le comportement électrochimique du ferrocène méthanol semble légèrement plus lent après expériences sur cellules. Ceci suggère que le traitement à la trypsine, bien qu'efficace, laisse subsister des films liés à l'adhésion des cellules (par exemple de matrice cellulaire) ou des résidus de solutions de collagène.

La surface de l'électrode n'est donc que peu altérée par le traitement puis l'adhésion cellulaire. Ces dispositifs semblent donc être réutilisables, ce qui n'était pas le cas pour les précédents dispositifs développés au laboratoire. Ce nouveau prototype d'échantillons semble donc être prometteur mais il nécessite encore d'être testé en conditions réelles d'expériences d'exocytose cellulaire avec le composé FFN42.

4.5) Croissance des cellules sur les nouveaux dispositifs

Nous avons voulu vérifier la croissance et le développement des cellules BON N13 sur ces nouveaux dispositifs d'ITO, afin de pouvoir les utiliser dans le contexte des expériences de détection couplée. La **Figure IV.15** montre des cellules BON N13 mises en culture au sein de ces dispositifs 48 heures avant leur observation au microscope. Comme le montre

l'uniformité de la densité cellulaire sur l'ensemble du dispositif, les cellules semblent se développer aussi bien sur le verre que sur l'ITO, tous deux préalablement traités à l'aide d'une solution de Collagène IV.

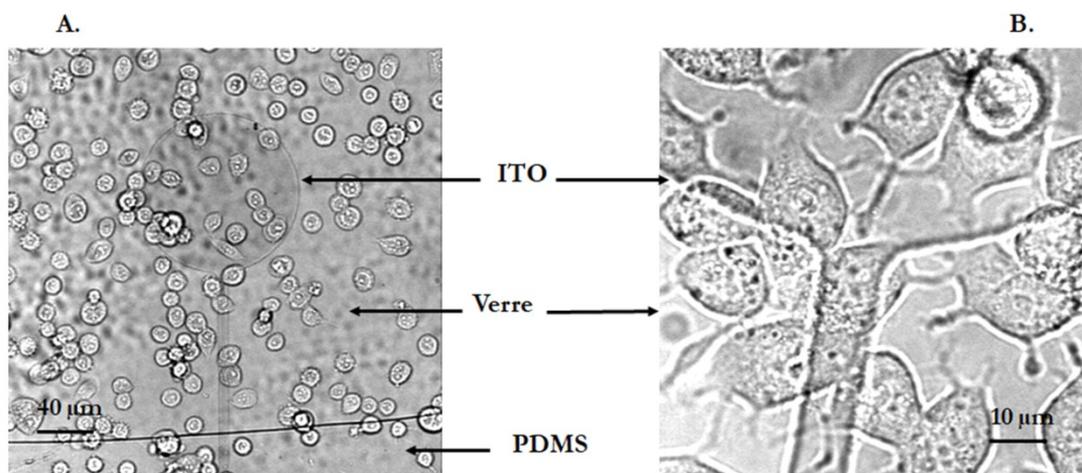


Figure IV.15 : Croissance des cellules BON N13 sur les nouveaux dispositifs d'ITO élaborés (A. x40 B. x100).

4.6) Expériences de TIRFM

Des expériences de TIRFM ont également été réalisées à l'aide de ces dispositifs sur cellules BON N13 ayant préalablement internalisé la molécule FFN 42 à une concentration de 20 µmol.L⁻¹. Les échantillons ont été analysés 48 heures après leur préparation (explicitée en section 4.3 de la **Partie Expérimentale**) dans une solution de Locke x1 et les images obtenues sont présentées en **Figure IV.16**.

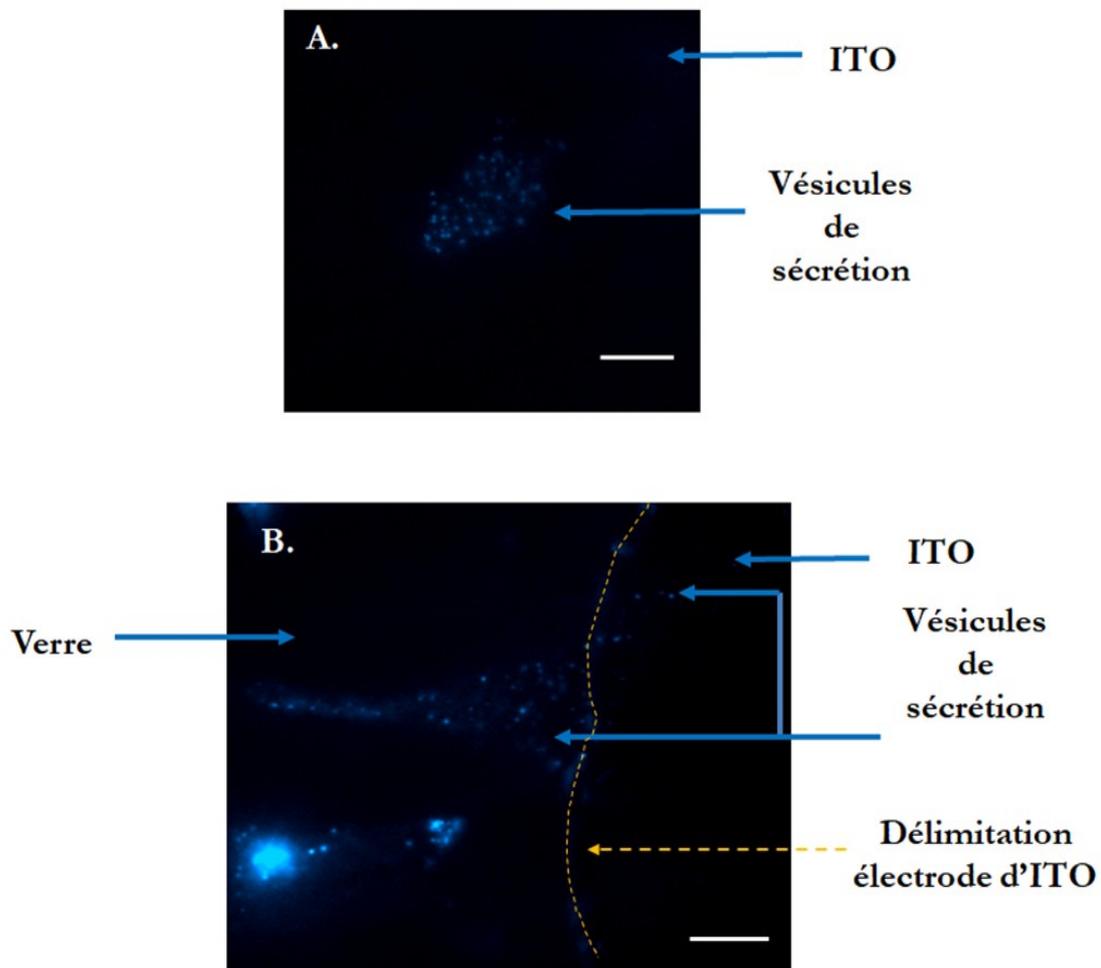


Figure IV.16 : Images de cellules BON N13 ayant internalisé FFN42, obtenues en TIRFM ($\lambda = 405$ nm) (échelle 10 μm) A. Cellule sur ITO B. Cellule sur Verre et ITO

La Figure **IV.16 A.**, présente une image de cellule BON N13 sur ITO obtenue en TIRFM et la Figure **IV.16 B.** représente quant à elle, une image de cellule BON N13, ayant adhéré à la fois sur ITO et sur le verre, obtenue en TIRFM également. Les vésicules de sécrétion sont clairement visibles sur ces deux images, ce qui prouve que ces dispositifs d'ITO constituent des outils analytiques utilisables dans le cadre d'une détection optique par microscopie de fluorescence par réflexion totale interne.

5) Conclusion

Dans le cadre de ce projet de doctorat, un nouveau dispositif d'ITO a été mis au point par un procédé de lithographie optique ainsi que par dépôt par pulvérisation cathodique effectuée au laboratoire. Ce dépôt est directement réalisé sur une lamelle de verre circulaire, puis recuit, selon un design d'électrodes défini au préalable. L'ITO ainsi obtenu semble posséder les caractéristiques appropriées pour l'étude de l'exocytose par détection couplée comme mentionné au sein du **Tableau IV.5**.

	<u>Transmission</u>	<u>Résistance carrée</u>	<u>Epaisseur</u>	<u>Courant résiduel</u>	<u>Utilisation</u>
<u>Nouveau dispositif</u>	92,3 %	30-35 Ω / \square	150 nm	2-5pA	Réutilisable
<u>Ancien dispositif</u>	85%	30-40 Ω / \square	150 nm	2-5pA	Utilisable une fois

Tableau IV.5 : Comparaison des caractéristiques du nouveau dispositif mis au point, par rapport à celui précédemment utilisé au laboratoire

De plus, cette nouvelle méthode de conception permettant de s'affranchir de la gravure chimique et de l'utilisation de photo résine SU-8 sensible à l'irradiation UV, permet une réutilisation des dispositifs ainsi créés. Ces derniers ont été réutilisés à cinq reprises pour des expériences d'électrochimie et d'observation en microscopie TIRF et sont à l'heure actuelle, a priori, toujours utilisables dans le cadre d'expériences sur cellules.

Par voltammétrie cyclique, le potentiel d'oxydation de la sonde FFN42 a pu être déterminé et s'élève à 450 mV *vs* Ag/AgCl, un potentiel deux fois plus faible que celui répertorié pour FFN102.

Une étude du photo-courant généré lors de l'utilisation du laser à 405 nm en fonction du potentiel électrochimique imposé a également été effectuée. Il s'avère que pour un potentiel de 450 mV *vs* Ag/AgCl, le saut de courant observé augmente de façon croissante avec l'intensité du laser employé. Cependant, le courant électrochimique résiduel (ou bruit) obtenu suite à l'exposition du dispositif au laser, est identique à celui observé en l'absence de laser et se situe entre 2 et 5 pA, ce qui conduit à un chronoampérogramme possédant

une ligne de base assez stable pour permettre l'étude de l'exocytose par chronoampérométrie. En effet, les pics ampérométriques obtenus pour des cellules BON N13 ayant préalablement internalisées FFN102 au laboratoire, possèdent une intensité de plusieurs dizaines de picoampères⁵² ; ce courant résiduel ne devrait donc pas générer de biais durant les expériences de détection couplée. Nous pouvons alors espérer, grâce à l'utilisation de ce dispositif sur cellules BON N13 ayant préalablement internalisé FFN42, augmenter le nombre d'évènements ampérométriques et optiques couplés.

D'autres designs d'électrodes sont possibles et il est également envisageable de réduire la surface de ces dernières afin d'essayer de minimiser d'avantage le bruit électrochimique. A cet effet, d'autres tailles d'électrodes ont déjà été envisagées, en passant de bandes de 50 μm de large à des bandes de 20 ou 10 μm . Bien que les vésicules sécrétrices des cellules BON N13 chargées avec FFN42 aient pu être observées par microscopie TIRF, il sera nécessaire à l'avenir de tester ces dispositifs en conditions réelles d'exocytose afin de vérifier leurs performances et de pouvoir juger de leur intérêt dans le cadre de la détection couplée Ampérométrie-TIRFM.

Conclusion générale et perspectives

Ce projet de doctorat a été mené dans le cadre de l'investigation de l'exocytose vésiculaire à l'échelle de la cellule unique. Ce phénomène biologique est étudié au sein de notre équipe depuis 2006, notamment grâce à la combinaison de deux techniques analytiques complémentaires : l'Ampérométrie et la Microscopie de Fluorescence par Réflexion Totale Interne (sur un matériau d'électrode transparent et conducteur : l'ITO). Cette méthodologie couplée nécessite au préalable l'internalisation de sondes exogènes électroactives et fluorescentes au sein des vésicules de sécrétion cellulaires. A partir de 2012, une sonde duale unique, à la fois fluorescente et électroactive, appelée « FFN102 » et appartenant à la famille des « Faux Neurotransmetteurs Fluorescents » (FFNs) a été testée au laboratoire. L'utilisation de cette molécule a permis d'obtenir une détection couplée pour environ 34% des événements exocytotiques observés (soit une augmentation de 12% par rapport à l'utilisation de deux sondes indépendantes l'une optique, la GFP, et l'autre électroactive, la sérotonine). Cependant, l'étude de la libération par exocytose de la sonde FFN102 internalisée au sein de cellules enterochromaffines BON N13 sur électrode d'ITO était accompagnée d'un photo-courant résiduel de plusieurs dizaines de picoampères, dans lequel étaient noyés certains pics ampérométriques. Ceci favorisait donc l'apparition d'évènements optiques orphelins de leurs signaux électrochimiques associés et inversement. Ceci va à l'encontre de la stratégie initiale des FFNs qui vise à diminuer le pourcentage d'évènements optiques et ampérométriques découplés. De plus, les caractéristiques optiques de la sonde (longueur d'onde d'absorption éloignée de celle du laser utilisé d'environ 35 nm pour les expériences de TIRFM), n'étaient pas optimales.

Ce projet de doctorat s'est donc orienté autour de l'étude d'une nouvelle sonde duale, permettant de limiter les inconvénients relatifs à l'utilisation de la sonde FFN102 pour l'investigation de l'exocytose vésiculaire. La molécule FFN102 a été utilisée comme base structurale pour la synthèse d'autres composés, en conservant la structure coumarine (conférant les propriétés de fluorescence) ainsi qu'un groupement hydroxyle permettant l'électroactivité du composé. Les propriétés électrochimiques et spectroscopiques de cinq

composés, analogues structuraux de la molécule FFN102, ont ainsi été étudiées. La faculté d'internalisation de ceux possédant les caractéristiques analytiques les plus intéressantes a également été testée, tout en préservant la ramification amine primaire sur leur structure. Ainsi, parmi les cinq composés étudiés, la molécule dénommée « FFN42 » apparaît comme étant la plus prometteuse du fait de ses caractéristiques électrochimiques adaptées (faible potentiel d'oxydation sur les matériaux d'électrodes utilisés pour la détection électrochimique, carbone et ITO) et de ses caractéristiques optiques (large bande d'absorption UV-vis, rendement quantique et brillance permettant une observation des cellules en microscopie de fluorescence). De plus, il a été démontré que la fluorescence de cette molécule était dépendante du pH. En effet, on assiste à une augmentation de l'intensité de fluorescence d'un facteur 13, lors du passage d'un milieu à pH 6 vers un milieu à pH 7,4. Ceci constitue un résultat très prometteur dans le cadre de l'observation de l'exocytose par microscopie TIRF, puisque l'apparition de « flash » de fluorescence est associée à cette exacerbation de fluorescence lors du passage de la sonde du milieu intravésiculaire vers le milieu extracellulaire. La preuve de l'internalisation de cette dernière au sein de ces mêmes granules de sécrétion a pu être obtenue par microscopie de fluorescence classique et par microscopie TIRF.

La molécule FFN42 a donc été retenue comme étant la plus adaptée dans le cadre de ce projet et la libération de cette dernière par exocytose sur cellules BON N13 a pu être étudiée, par ampérométrie et microscopie TIRF de façon indépendante.

Une fréquence de sécrétion comparable et assez faible (comprise entre 0,11 et 0,18 Hz) pour les deux techniques analytiques employées a été relevée pour deux sécrétagogues communs de l'exocytose vésiculaire (ionomycine et potassium/calcium). Cette faible fréquence d'activité exocytotique était un prérequis indispensable à l'étude couplée puisqu'elle permettra lors de futures expériences de détection couplée, d'attribuer les pics ampérométriques aux signaux optiques associés sans ambiguïté. FFN42 apparaît donc comme la molécule appropriée pour le suivi optique de l'exocytose par microscopie TIRF d'une part et constitue également une sonde de choix pour accéder aux informations d'ordre cinétique obtenues par ampérométrie. En effet, il s'avère que l'intensité des signaux ampérométriques résultant de l'oxydation de la molécule FFN42 est environ deux fois plus élevée que pour les sondes électroactives précédemment utilisées au laboratoire (FFN102 et

sérotonine), améliorant ainsi considérablement le rapport signal/bruit de la détection électrochimique.

Hormis le choix d'une sonde duale appropriée, l'étude de l'exocytose par détection couplée Ampérométrie-TIRFM nécessite également l'utilisation d'un matériau d'TTO adapté. Dans le cadre de ce doctorat, un nouveau dispositif d'TTO a également été mis au point par un procédé de lithographie optique ainsi que par un dépôt par pulvérisation cathodique effectué pour la première fois sur site au laboratoire. Ce dépôt est directement réalisé sur une lamelle de verre circulaire, puis recuit, selon un dessin d'électrodes défini au préalable. Ces nouveaux dispositifs viennent s'inscrire dans la continuité de ceux élaborés précédemment au sein de notre équipe, tout en faisant disparaître certains défauts observés avec l'utilisation des précédents systèmes, notamment leur caractère à usage unique. Ces nouveaux dispositifs sont en effet réutilisables et ne nécessitent pas l'intervention d'une société extérieure pour effectuer le dépôt d'TTO et possèdent également une transmission dans le visible supérieure à 10% par rapport aux précédents. De plus, il a été montré que quelle que soit la valeur de potentiel imposée, le bruit électrochimique généré lors de l'exposition du dispositif au laser à 405 nm s'échelonnait entre 2 et 5 pA alors qu'il pouvait atteindre jusqu'à 70 pA pour l'utilisation de FFN102. Ainsi, ce courant résiduel de quelques picoampères ne devrait pas affecter l'observation de la plupart des pics ampérométriques obtenus pour les expériences sur cellules BON N13 ayant préalablement internalisé FFN42. Nous pouvons ainsi espérer augmenter, grâce à l'utilisation de ce dispositif et du composé FFN42, le nombre d'évènements optiques et ampérométriques couplés. L'observation des vésicules de sécrétion préalablement internalisées avec FFN42 a également pu être effectuée sur ces nouveaux dispositifs d'TTO par microscopie TIRF.

A ce stade du projet, toutes les conditions sont réunies pour la mise en place de la détection couplée proprement dite puisque sonde duale, sécrétagogues et microsystèmes d'TTO ont été optimisés au préalable. La suite logique de ce travail sera donc de montrer ce que l'analyse couplée Ampérométrie-TIRFM à l'aide de la sonde FFN42 sur les nouveaux dispositifs d'TTO pourra apporter dans le contexte biologique de l'exocytose vésiculaire. Nous espérons ainsi pouvoir augmenter le nombre d'évènements couplés à une valeur la plus proche possible de 100% et ainsi mettre en regard les résultats obtenus avec certaines

questions fondamentales du phénomène exocytotique dont certaines propriétés demeurent méconnues encore à l'heure actuelle. La corrélation des signaux optiques et électrochimiques devrait offrir l'opportunité de mettre en évidence deux mécanismes encore mal compris que sont le « *kiss and run* » et l'exocytose composée. En effet, observables en microscopie TIRF, ces deux modes de libération doivent conduire à des signaux ampérométriques particuliers (larges et peu intenses pour le phénomène de « *kiss and run* » et multiples pour l'exocytose composée) dont les caractéristiques associées pourront ainsi être comparées. De plus, il a été admis et observé que le phénomène d'exocytose se produit au niveau de zones préférentielles de la cellule appelées « *hotspots* » (ou « points chauds »). La méthode de couplage Ampérométrie-TIRFM permettra d'analyser les dynamiques de libération du neurotransmetteur au niveau de ces zones ainsi que les quantités libérées, la dimension des vésicules impliquées et de montrer s'il existe ou non une spécificité physico-chimique (cinétique, quantité de molécule disséminée) à chacun de ces points chauds. Il devrait également être possible d'étudier la dynamique d'ouverture et de fermeture du pore de fusion ainsi que sa stabilité durant le phénomène exocytotique.

Partie Expérimentale

1) Voies de synthèse des différents FFNs

Les différents FFNs mis en jeu lors de ce doctorat ont été synthétisés selon deux grandes voies de synthèse, qui se distinguent au niveau de l'étape de cyclisation et de la formation du noyau coumarine. Dans un premier cas, cette étape est réalisée par le biais d'une condensation entre un ester et un aldéhyde, suivie d'une crotonisation (permettant *in fine* d'obtenir le composé FFN21 après d'autres étapes ; **Figures E.1 et E.2**) et dans le second cas, par le biais d'une condensation de Pechmann qui a permis d'obtenir les molécules FFN122, FFN145, FFN132 et FFN42 (**Figures E.3 et E.4**).

1.1) Première voie de synthèse

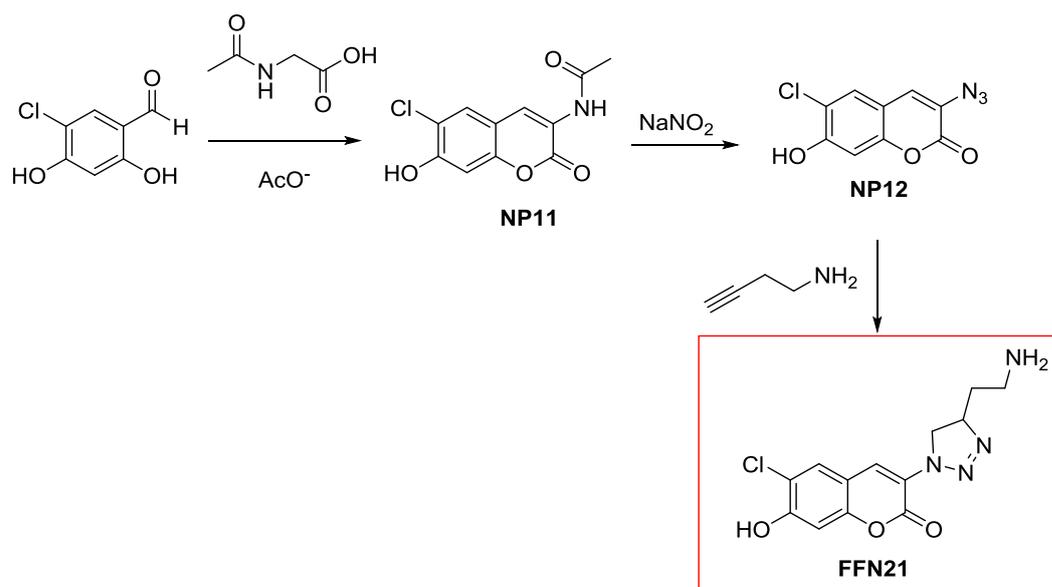


Figure E.1 : Première voie de synthèse permettant l'obtention du composé FFN21

1.1.1) Mécanisme de cyclisation

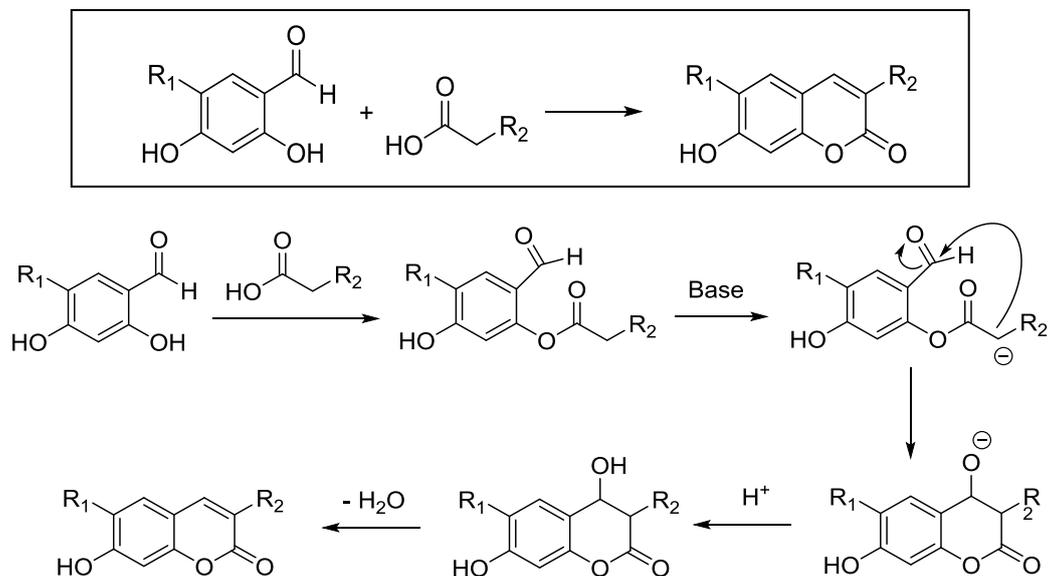


Figure E.2 : Mécanisme de cyclisation impliqué lors de la première voie de synthèse

1.2) Seconde voie de synthèse

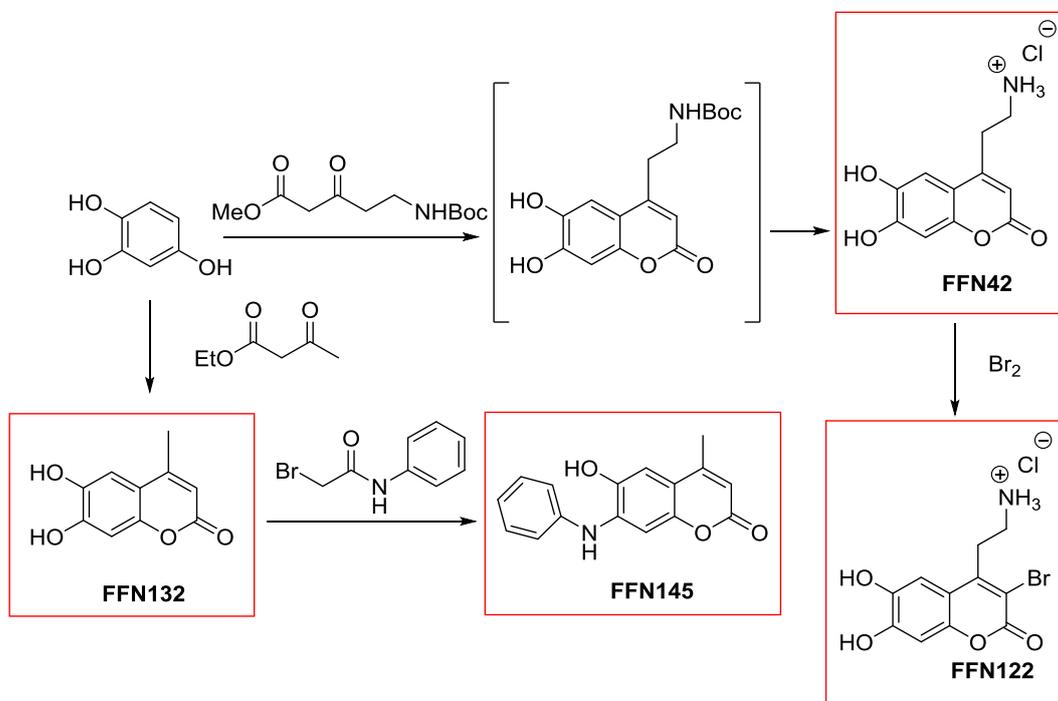


Figure E.3 : Seconde voie de synthèse permettant l'obtention des composés FFN132, FFN145, FFN122 et FFN42

1.2.1) Mécanisme de cyclisation

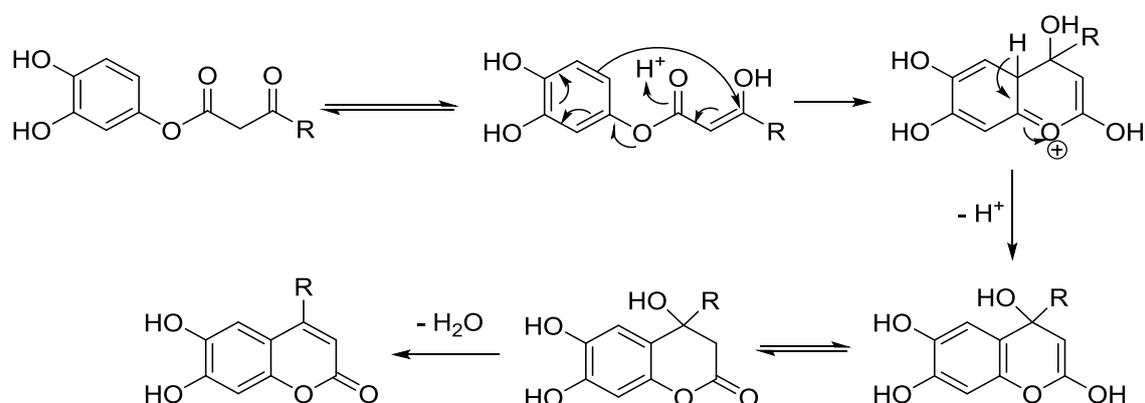


Figure E.4: Mécanisme de cyclisation impliqué lors de la seconde voie de synthèse

2) Protocoles de synthèse

Au sein de ce paragraphe sont détaillés les protocoles de synthèses des intermédiaires réactionnels NP11 et NP12 (Figure E.1), ainsi que des différents Faux Neurotransmetteurs Fluorescents étudiés au cours de ce doctorat (Chapitre II).

2.1) NP11

Un mélange de 5-chloro-2,4-dihydroxybenzaldéhyde (1,00 g; 5,79 mmol; 1 équiv), N-acétylglycine (678 mg; 5,79 mmol, 1 équiv), d'acétate de sodium anhydre (NaOAc; 1,42 g; 5,79 mmol; 1 équiv) dans l'anhydride acétique (C₄H₆O₃) (30 mL) est porté à reflux sous agitation pendant 4h. Le mélange réactionnel est ensuite versé sur de la glace, ce qui conduit à l'obtention d'un précipité brun. Après filtration, le solide est lavé avec de l'eau glacée pour conduire au produit souhaité sous la forme d'un solide brun (378 mg; 22%).
 RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*⁶) δ (ppm): 9,83 (1H, NH); 8,61 (1H, s, Har); 8,04 (1H, s, Har); 7,50 (1H, s, Har); 2,36 (3H, s, CH₃); 2,17 (3H, s, CH₃).
 RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*⁶) δ (ppm): 170,3; 168,1; 156,9; 148,4; 146,4; 128,0; 125,1; 122,2; 121,5; 119,2; 112,0; 24,0; 20,4.

2.2) NP12

Le solide précédent est porté à reflux dans une solution concentrée d'acide chlorhydrique (HCl) et d'éthanol (EtOH) (2/1; 4 mL) pendant 1h. De l'eau glacée (5 mL) est ensuite ajoutée afin de diluer la solution. Cette dernière est par la suite refroidie dans un bain de glace avant l'ajout de nitrate de sodium (NaNO₂) (177 mg; 2,56 mmol; 2 équiv). Le mélange ainsi obtenu est alors agité pendant 20 min avant ajout d'azoture de sodium (NaN₃) (250 mg; 3,84 mmol; 3 équiv); ajout lent et réalisé avec précautions par petites quantités. Après agitation pendant 15 min, un précipité est obtenu. Ce dernier est par la suite filtré et lavé avec de l'eau. Le produit souhaité se présente sous la forme d'un solide marron après séchage sous pression réduite (178 mg; 58%). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*⁶) δ (ppm): 11,35 (1H, OH); 7,72 (1H, s, Har); 7,55 (1H, s, Har); 6,94 (1H, s, Har). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*⁶) δ (ppm): 157,0; 155,3; 150,9; 128,1; 126,4; 122,5; 117,5; 112,2; 103,2.

2.3) FFN21

A un mélange de NP12 (40 mg; 0,168 mol; 1 equiv) et de but-3-yn-1-amine (14 μL; 0,168 mol; 1 equiv) dans l'eau/EtOH (1/1; 5 mL) est ajouté de l'acétate de sodium (C₂H₃NaO₂) (7 mg; 0,036 mol; 0,2 equiv) puis du sulfate de cuivre (CuSO₄.5H₂O) (2 mg; 0,084 mol; 0,05 equiv). Après agitation vigoureuse pendant 24h, l'éthanol est évaporé et le résidu dilué dans 5 mL d'eau. Après refroidissement dans un bain de glace, le milieu est filtré et le solide isolé est lavé avec de l'eau froide puis séché (17 mg; 33%).

2.4) 5-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-oxopentanoate de méthyle

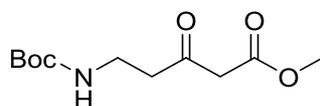


Figure E.5 : Structure moléculaire du 5-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-oxopentanoate de méthyle

Le composé Boc-β-Ala-OH (1,00 g; 5,28 mmol; 1 équiv) est ajouté à une suspension fraîchement préparée de 1,1'-carbonyldiimidazole (1,03 g; 11,63 mmol; 2,2 equiv) dans du THF distillé (15 mL) sous argon. La suspension obtenue est agitée pendant 4h. Du chlorure de magnésium (MgCl₂; 503 mg; 5,28 mmol; 1 équiv) et du méthylmalonate de

potassium ($C_6H_9O_4$) (1,65 g ; 10,6 mmol ; 2 équiv) sont alors ajoutés, toujours sous argon. La solution obtenue est agitée vigoureusement toute la nuit avant ajout d'eau H_2O (15 mL) et d'acide chlorhydrique (HCl) 1 mol L^{-1} (10 mL). La phase aqueuse est ensuite traitée avec de l'acétate d'éthyle ($C_4H_8O_2$) (30 mL *3). Les phases organiques sont ensuite réunies et lavées avec HCl 1 mol L^{-1} (10 mL), puis avec une solution saturée en NaCl (8 mL) et enfin séchées (avec du sulfate de magnésium ($MgSO_4$)). Elles sont par la suite filtrées et concentrées sous pression réduite. Le produit souhaité se présente sous forme d'un liquide jaune (657 mg; 51%). RMN 1H (300 MHz, $CHCl_3-d$) δ (ppm): 4,96 (1H, NH) ; 3,74 (3H, CH_3); 3,46 (2H, s, CH_2); 3,37 (2H, q, CH_2); 2,77 (2H, t, CH_2); 1,42 (9H, s, CH_3). RMN ^{13}C (75 MHz, $CHCl_3-d$) δ (ppm): 202,5 ; 167,4 ; 156,0 ; 79,6 ; 77,6 ; 77,2 ; 76,7 ; 52,6 ; 49,2 ; 43,2 ; 35,1 ; 28,5.

2.5) FFN42

De l'acide méthanesulfonique (CH_4O_3S) (6,65 mL; 10 mmol; 10 équiv) est ajouté à du 1,2,4-trihydroxybenzène ($C_6H_6O_3$) (164 mg; 1,3 mmol, 1,3 équiv) et du 5-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-oxopentanoate de méthyle (245 mg ; 1 mmol, 1 équiv) à $0^\circ C$ et agité pendant 3h à $25^\circ C$. Le mélange est ensuite dilué avec de l'éther froid (10 mL) et filtré. Le solide obtenu est lavé avec de l'éther froid puis recristallisé dans HCl $0,1\text{ mol L}^{-1}$. Le produit souhaité se présente sous la forme d'un solide gris pâle (191 mg ; 74 %). RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 10,49 (br s, 1H, OH) ; 9,34 (br s, 1H, OH); 7,83 (br s, 3H, NH_3); 7,09 (s, 1H, Har); 6,77 (s, 1H, Har); 6,14 (s, 1H, Har); 3,13 (2H, dd, $J= 12.4\text{ Hz}$, 6.9 Hz, CH_2); 2,97 (2H, t, $J= 6.9\text{ Hz}$, CH_2). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 160,6 ; 151,7 ; 150,5 ; 148,2 ; 143,1 ; 111,2 ; 110,5 ; 109,3 ; 103,0 ; 37,4 ; 29,1.

2.6) FFN122

Dans une solution de dibrome (Br_2) (20 μL ; 0,78 mmol; 2 équiv) dans l'acide acétique (CH_3COOH) (1,5 mL) est ajouté goutte à goutte une solution fraîchement préparée de FFN42 (100 mg ; 0,39 mmol ; 1 équiv) dans l'acide acétique (1,0 mL) sous atmosphère d'argon. Le milieu réactionnel est alors agité à $25^\circ C$ pendant 2h puis filtré et lavé avec de l'éther froid (10 mL). Le solide obtenu est recristallisé avec HCl 1 mol.L^{-1} et conduit au produit souhaité sous la forme d'un solide marron (21 mg ; 16%). RMN 1H (300 MHz,

DMSO-*d*⁶) δ (ppm): 10,68 (br s, 1H, OH); 10,11 (br s, 1H, OH); 7,99 (br s, 3H, NH₃); 7,93 (s, 1H, Har); 7,21 (s, 1H, Har); 3,31-3,18 (2H, m, CH₂); 3,06-2,90 (2H, m, CH₂).

2.7) FFN132

De l'acide méthanesulfonique (2,59 mL; 40 mmol; 20 équiv) est ajouté à du 1,2,4-trihydroxybenzène (252 mg; 2 mmol, 1,5 équiv) et de 3-oxobutanoate d'éthyle (379 μ L; 3 mmol; 1,5 équiv) à 0°C et agité pendant 3h à 25°C. De l'eau glacée est ajoutée goutte à goutte et provoque la précipitation du produit souhaité sous la forme d'un solide jaune vert (293 mg ; 73%).

2.8) FFN145

Un mélange de FFN132 (300 mg; 1,56 mmol; 1 équiv), KOH (88 mg, 1.56 mmol, 1 equiv) et de 2-bromo-N-phenylacetamide (351 mg; 1,64 mmol; 1,05 équiv) dans le DMSO (4.5 mL) est agité à 50 °C pendant 2h. Ensuite, de l'hydroxyde de potassium KOH (96 mg; 1,72 mmol; 1,1 équiv) est ajouté à nouveau et le milieu est chauffé à 130 °C pendant une nuit. 15 mL d'une solution saturée de chlorure de sodium sont alors ajoutés à la solution qui est ensuite lentement refroidie à 25°C. La phase aqueuse est traitée avec du dichlorométhane (CH₂Cl₂) (20,0 mL à trois reprises). Les phases organiques réunies sont lavées avec une solution concentrée de chlorure de sodium (10,0 mL à trois reprises) puis séchées avec MgSO₄, filtrées et concentrées sous vide. Le produit brut est purifié sur colonne chromatographique avec PE-EtOAc (1/1) comme éluant. Le produit se présente sous la forme d'un solide jaune vert (117 mg ; 28%). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*⁶) δ (ppm): 10,10 (1H, s, OH) ; 7,93 (1H, s, NH) ; 7,36-7,28 (4H, m, Har) ; 7,02 (1H, s, Har) ; 7,01-6,97 (1H, m, Har) ; 6,96 (1H, s, Har) ; 6,06 (1H, d, *J*=0.8 Hz, Har) ; 2,32 (3H, d, *J*=0.8 Hz, CH₃). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*⁶) δ (ppm): 160,7 ; 152,9 ; 148,3 ; 142,6 ; 141,1 ; 137,3 ; 129,2 ; 122,1 ; 120,1 ; 110,6 ; 109,6 ; 108,0 ; 98,9 ; 18,1

3) Préparation des solutions tampons et de stimulation

Toutes les solutions tampons employées lors de ce doctorat ont été préparées en utilisant de l'eau ultra-pure extraite d'un système de purification Millipore (résistivité de 18,2 M Ω cm à 25°C). La plupart des produits et sels utilisés pour la fabrication des solutions

tampons et de stimulation ont été obtenus auprès de la société Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Concernant les autres provenances, elles seront spécifiées individuellement.

3.1) Solution de PBS

Le PBS ou (Phosphate Buffer Saline ; Tampon Phosphate Salin) à pH= 7,4 contenant 10 mmol.L⁻¹ d'hydrogénophosphate de sodium (Na₂HPO₄), 2,68 mmol.L⁻¹ de chlorure de potassium (KCl) et de 140 mmol.L⁻¹ de chlorure de sodium (NaCl) a été utilisé pour une grande partie des expériences *in vitro* de ce doctorat, ainsi que pour l'étape de passage des cellules BON N13. Cette solution a été préparée en dissolvant une pastille de 5g de PBS (Gibco – ThermoFisher Scientific) dans 500 ml d'eau ultra pure et est conservée à +4 ° C.

3.2) Le tampon Locke x1

Le sérum physiologique dit « Locke x1 » a été utilisé comme tampon tout au long des expériences menées sur cellules BON N13. Cette solution est préparée par dilution d'une solution de Locke x10, fabriquée également au laboratoire et composée des sels suivants dissous dans de l'eau ultra-pure :

- 56 mmol.L⁻¹ de chlorure de potassium (KCl)
- 56 mmol.L⁻¹ de glucose
- 50 mmol.L⁻¹ d'HEPES
- 1540 mmol.L⁻¹ de chlorure de sodium (NaCl)
- 36 mmol.L⁻¹ d'hydrogencarbonate de sodium (NaHCO₃)

Le pH de la solution obtenu est par la suite ajusté à 7,4 à l'aide d'une solution de soude (NaOH) concentrée à 1 mol.L⁻¹. La solution de Locke x10 est par la suite filtrée à l'aide de filtres de 0,22 µm de diamètre. Les solutions de Locke sont conservées à -20 ° C. Dans le cas où la solution de Locke x1 doit être supplémentée en ions Ca²⁺ et Mg²⁺, la dilution de la solution de Locke x10 s'accompagne de l'ajout de volumes appropriés de solutions aqueuses de CaCl₂ et MgCl₂.

Tableaux récapitulatifs pour la préparation des tampons Locke

Locke x10 $V_{\text{Total}} = 500 \text{ mL}$	M (g.mol⁻¹)	Concentration (mmol.L⁻¹)	Masse (g)
Glucose	180,26	56	5,05
NaCl	58,44	1540	45,00
KCl	74,55	56	2,09
HEPES	238,3	50	5,96
NaHCO ₃	84,01	36	1,51

Tableau E.1 : Récapitulatif des différents constituants de la solution de Locke x10

Solutions mères $V_{\text{Total}} = 50 \text{ mL}$	Concentration (mol.L⁻¹)	M (g.mol⁻¹)	Masse (g)
MgCl ₂ (anhydre)	0,02	95,21	0,095
CaCl ₂ (2H ₂ O)	0,5	147	3,675
HEPES	0,5	238,3	5,95

Tableau E.2 : Préparation des solutions de Calcium et de Magnésium

Locke x1 Mg²⁺/Ca²⁺	Locke x10	CaCl₂ (0,5 mol.L⁻¹)	MgCl₂ (20 mmol.L⁻¹)	HEPES (0,5 mol.L⁻¹)	Eau
Volume (mL)	10	0,5	6	2	Pour 100 mL
Concentration (mmol.L ⁻¹)	-	2,5	1,2	-	-

Tableau E.3 : Préparation de la solution de Locke x1 supplémentée en Ca²⁺ et Mg²⁺**3.3) Solutions de stimulation****3.3.1) Ionomycine**

Cette solution est utilisée afin d'augmenter la concentration en calcium intracellulaire et ainsi permettre de déclencher les événements exocytotiques dans les cellules BON N13.

Une solution de 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'ionomycine est obtenue à partir d'une solution commerciale de ionomycine 1 mmol.L^{-1} dans le DMSO (I3909-1ML ; Sigma Aldrich), en diluant (à l'abri de la lumière) cette dernière avec de l'eau et une solution de Locke x10 tout en assurant la

supplémentation de la solution en calcium ($2,5 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ CaCl}_2$) et en magnésium ($1,2 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ MgCl}_2$).

Tableaux récapitulatifs concernant la préparation de la solution d'ionomycine

- Avec une solution de Locke x1 supplémenté en $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$

	Ionomycine (1 mmol.L^{-1})	Locke x1 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
Volume	0,250 μL	QSP 50 mL
Concentration ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	5	-
Volume	500 μL	QSP 50 mL
Concentration ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	10	-

Tableau E.4 : Préparation de la solution d'ionomycine à partir d'une solution de Locke x1 supplémentée en Ca^{2+} et Mg^{2+}

- A partir d'une solution de Locke x10 et ajout de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ et HEPES durant la préparation.

	Locke x10	CaCl_2 ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$)	MgCl_2 (20 mol.L^{-1})	HEPES ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$)	Ionomycine (1 mmol.L^{-1})	Eau
Volume (mL)	5	0,25	3	1	500 μL	QSP 50 mL
Concentration	-	$2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$	$1,2 \text{ mmol.L}^{-1}$	-	$10 \mu\text{mol.L}^{-1}$	-

Tableau E.5 : Préparation de la solution d'ionomycine à partir d'une solution de Locke x10 non supplémentée au préalable en $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ et HEPES

3.3.2) $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$

Il s'agit d'une solution concentrée en K^+ (55 mmol.L^{-1}) employée afin de provoquer la dépolarisation de la membrane de la cellule cible, ce qui permet l'entrée du Ca^{2+} ($2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$) contenu dans la solution de stimulation au sein de la cellule et le déclenchement de l'activité exocytotique.

Tableaux récapitulatifs pour la solution K^+ / Ca^{2+}

Solutions mères $V_{Total} = 50 \text{ mL}$	Concentration (mol.L^{-1})	M (g.mol^{-1})	Masse (g)
Glucose	1	180,26	9,01
NaCl	3	58,44	8,77
KCl	2,5	74,55	9,32
HEPES	0,5	238,3	5,95
MgCl ₂ (anhydre)	0,02	95,21	0,095
CaCl ₂ (2H ₂ O)	0,5	147	3,675
NaHCO ₃	1	84,01	4,20

Tableau E.6 : Tableau récapitulatif des différents sels utilisés pour la préparation de la solution de K^+ / Ca^{2+}

	Volume à prélever (μL)	Concentration (mmol.L^{-1})
Glucose (1 mol.L^{-1})	280	5,6
NaHCO ₃ (1 mol.L^{-1})	180	3,6
KCl ($2,5 \text{ mol.L}^{-1}$)	1100	55
NaCl (3 mol.L^{-1})	1800	108
HEPES ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$)	1500	15
MgCl ₂ ($0,02 \text{ mol.L}^{-1}$)	3000	1,2
CaCl ₂ ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$)	250	2,5
Eau	QSP 50 mL	-

Tableau E.7 : Tableau récapitulatif des concentrations et volumes à prélever des différentes solutions mères pour la préparation de la solution de K^+ / Ca^{2+}

3.4) Solution de Collagène IV

Cette solution permet d'assurer une adhésion optimale des cellules BON N13 sur les dispositifs d'ITO ainsi que sur les boîtes de Petri employées pour l'observation de ces dernières. Elle est préparée à partir de 5 mg de collagène IV (C5533-5MG sous forme de poudre; Sigma-Aldrich) qui ont été ajoutés à 50 mL d'acide acétique (CH_3COOH) à 0,1

mol.L⁻¹. Le mélange ainsi obtenu est laissé sous agitation à température ambiante pendant 3 heures afin d'obtenir une solution de collagène à 0,01% (0,1 mg.mL⁻¹), avant d'être transféré au sein d'une bouteille de verre contenant 10 mL de chloroforme (CHCl₃). La bouteille, hermétiquement fermée, est ensuite placée au réfrigérateur à +4°C pendant une durée de 12 à 24 h. A l'issue de ce délai, la phase supérieure de la solution, exempte de la présence de chloroforme a été prélevée et stockée à -20°C.

4) La culture cellulaire

4.1) Culture des cellules BON N13

La lignée cellulaire BON N13 est une lignée dite « adhérente » et a été fournie au laboratoire par C.M. TOWNSEND (*University of Texas Medical Branche*, Galveston, Texas, Etas-Unis) et F. DARCHEN et I. FANGET (UMR 8250, Université Paris-Descartes).

4.1.1) Composition du milieu de culture complet

Le milieu de culture des BON N13 est le DMEM/F12 (« *Dulbecco's modified eagle medium: nutrient mixture* » F-12 – Sigma Life Science) auquel est ajouté 10% (v/v) de FBS (« *Heat Inactivated Fetal Bovine Serum* » 10500-056 - 100 mL- Thermofisher Scientific), ainsi que 1% (v/v) d'une solution de PS (« *Penicillin Streptomycin* » 15140-148 - 20 mL - Thermofisher Scientific). Le mélange est également filtré à l'aide d'un filtre de 0,22 µm (Minisart NML – Sartorius).

4.1.2) L'étape de décongélation

Un cryovial contenant des cellules BON N13 initialement stocké à -80 ° C (dans leur milieu de culture supplémenté de 5% (v/v) en DMSO), est placé dans un bain d'eau préchauffé à 37 ° C et agité pendant environ une minute (durée nécessaire pour qu'il ne reste qu'un petit morceau de glace au sein du cryovial). Les cellules sont ensuite transférées dans un tube à centrifuger stérile de 50 mL contenant 9 mL de milieu de culture complet préchauffé. Le cryovial est par la suite rincé avec 5 mL de milieu de culture complet afin de s'assurer de récupérer l'ensemble des cellules initialement contenues au sein de ce dernier. Une étape de centrifugation est par la suite réalisée à 1000 rpms pendant une durée de 5 minutes et les cellules sont ensuite remises en suspension au sein d'une flasque de culture de 75 cm²

(Nunc, Roskilde, Danemark) contenant 6 mL de milieu de culture complet. Les cellules sont par la suite placées à l'incubateur (à 37 ° C ; 5% de CO₂) et leur croissance est vérifiée tous les jours pendant 5 jours au microscope.

Le DMSO, utilisé pour l'étape de congélation étant toxique pour les cellules, les étapes expérimentales précédemment décrites doivent être effectuées le plus rapidement possible pour obtenir la meilleure viabilité cellulaire.

4.1.3) La culture de routine

Les cellules sont cultivées dans leur milieu de culture complet, dans un incubateur à 37°C, sous une atmosphère à 5% en CO₂. Les cellules se développent et se multiplient au sein d'une flasque de culture de 75 cm² (Nunc, Roskilde, Danemark) et leur milieu de culture est changé tous les deux à trois jours en fonction de la vitesse de croissance cellulaire observée au microscope de façon journalière.

4.1.4) L'étape de passage

Le processus de « passage » des cellules BON N13 inclut quatre étapes distinctes. Premièrement, après avoir retiré le contenant de la boîte de culture (milieu complet), les cellules, qui ont adhéré au fond de la boîte, au terme de leur culture, sont rincées à l'aide de deux fois 5 mL de PBS à pH 7,4 (préalablement filtré à 0,22 µm) de façon à éliminer toute trace de sérum au sein de la boîte. Par la suite, 1 mL de solution de Trypsine-EDTA (25300054-100 mL, Thermofisher – Scientific) est utilisé comme un agent de dissociation des cellules, leur permettant de se décrocher du fond de la boîte de culture. Après une incubation de trois minutes à 37°C et sous une atmosphère de 5% en CO₂, toutes les cellules BON N13 se détachent du fond de la boîte. Afin d'inhiber l'effet de la trypsine, les cellules sont remises en suspension dans 9 mL de milieu de culture complet fraîchement préparé, et sont aspirées méticuleusement à l'aide d'une pipette afin de dissocier les agrégats restants. Enfin, 1 mL de la solution contenant les cellules en suspension est ajouté au sein d'une nouvelle flasque de culture remplie au préalable de 14 mL de milieu de culture fraîchement préparé.

4.1.5) L'étape de congélation

La congélation des cellules BON N13 est effectuée lorsque ces dernières atteignent une confluence de 90 % environ. Les cellules sont tout d'abord détachées de leur support de culture grâce à un traitement à l'aide de Trypsine-EDTA. Elles subissent par la suite une étape de centrifugation à 1250 rpms pendant 6 minutes, puis elles sont introduites au sein du milieu de congélation (milieu de culture complet + 5% (v/v) de DMSO). Le milieu contenant les cellules est ensuite transféré au sein de cryotubes stériles de 1,5 mL de contenance.

Avant d'être placés au sein d'un congélateur à une température de -80°C, tous les cryotubes ont été placés à l'intérieur d'un récipient de congélation (Thermo Scientific™ M. Frosty™) pendant 24 à 48 heures afin de refroidir progressivement les cellules à -80 °C (à raison d'environ 1°C par minute).

4.2) La culture des cellules PC12

La lignée cellulaire des PC12 utilisée au laboratoire est une lignée dite « flottante » (les cellules se trouvent en suspension dans le milieu) et a été obtenue auprès de la société ATCC (« *American Type Culture Collection* » ; référence CRL-1721 »).

4.2.1) Composition du milieu de culture complet

La base du milieu de culture des cellules PC12 est le RPMI – 1640 (GIBCO – Life Technologies). Afin de constituer leur milieu de culture complet, sont ajoutés à cette base, 10% de HS (« *Horse Serum* » - *ThermoFisher Scientific*) 26050070-100 mL, 5% de FBS (« *Heat Inactivated Fetal Bovine Serum* »), ainsi que 1% de PS (*Penicillin streptomycin*). Le mélange est, par la suite, stérilisé par filtration (filtre de 0,22 µm).

4.2.2) Décongélation cellulaire

Toutes les procédures expérimentales de décongélation des cellules PC12 sont identiques à celles décrites précédemment pour la décongélation des cellules BON N13 à l'exception de l'étape de séparation des agrégats de cellules PC12, obtenus à l'issue de l'étape de centrifugation, qui sont séparés à plusieurs reprises, à l'aide d'une seringue stérile de 20 ml

surmontée d'une aiguille biseautée (BD Precisionglide® « syringe needles -22g »), avant d'être ajoutés dans un nouveau flacon de culture contenant le milieu de culture complet.

4.2.3) La culture de routine

Tout comme les cellules BON N13, les cellules PC12 sont cultivées dans leur milieu de culture complet, à 37 °C, sous une atmosphère à 5% en CO₂. Les cellules se développent et se multiplient au sein d'une flasque de culture de 75 cm² et leur milieu de culture est renouvelé tous les deux à trois jours.

4.2.4) Le passage

Concernant l'étape de passage des cellules PC12, les cellules sont tout d'abord aspirées avec leur milieu de culture et sont introduites dans un tube Falcon® de 50 mL à fond conique. Ces dernières sont ensuite centrifugées durant 12 minutes à 1500 tours par minute. Au terme de cette étape, le surnageant contenu au sein du tube est éliminé et les cellules sont remises en suspension dans 5 mL de milieu complet fraîchement préparé. De façon à dissocier les agrégats de cellules s'étant formés durant l'étape de centrifugation, les 5 mL de solution contenant les cellules PC12 sont aspirées méticuleusement avec une seringue stérile munie d'une aiguille (0,7 mm de diamètre interne) et ce à quatre ou cinq reprises. Enfin, 1,5 mL de solution contenant les cellules sont introduits dans une nouvelle boîte de culture préalablement remplie de 13,5 mL de milieu complet.

4.3) La préparation des échantillons cellulaires BON N13 et PC12

4.3.1) Le prétraitement des boîtes de Petri

Les boîtes de Petri à fond de verre (P50G-1.5-14-F, MatTek Cultureware, Ashland, Massachusetts), sont préalablement traitées avec une solution de collagène IV (0,1 mg.mL⁻¹) avant l'ensemencement des cellules. Par la suite, 300 µL de la solution de collagène IV sont utilisés de façon à recouvrir l'intégralité de la surface du substrat. Cette solution de collagène IV permet aux cellules d'adhérer à la boîte de Petri, rendant leur observation au microscope par épifluorescence et au TIRFM plus aisée. Les échantillons sont ensuite conservés sous une hotte à flux laminaire durant six heures, de façon à laisser suffisamment de temps au collagène d'adhérer au substrat. Après ce délai, la solution de collagène est

éliminée de la surface des substrats, qui sont par la suite nettoyés à l'aide d'une solution de PBS (pH= 7,4) préalablement filtrée, deux à trois fois.

4.3.2) L'ajout des cellules

Après l'étape de passage, les cellules sont remises en suspension dans leurs milieux de culture respectifs. Une étape de dilution de cette solution mère contenant les cellules, au sein de leur milieu de culture complet, permet d'obtenir une concentration finale dans l'échantillon de 10^5 cellules par millilitre. Enfin, 4 mL sont introduits au sein des boîtes de Petri à fond de verre ou dispositifs d'ITO, préalablement traités à l'aide de la solution de collagène IV. Les échantillons sont par la suite maintenus dans l'incubateur (à 37 °C et sous une atmosphère de 5% de CO₂), pour une durée de 24 à 48 heures avant leur analyse.

La procédure décrite ici pour les boîtes de Petri Mattek® est identique à celle utilisée pour les échantillons réalisés avec des dispositifs d'ITO.

5) La fabrication des ultramicroélectrodes en fibre de carbone **(« Carbon Fiber Electrode » - CFE)**

5.1) L'isolement de la fibre de carbone

Pour la fabrication des ultramicroélectrodes, une fibre de carbone de 10 µm de diamètre (Thornel P-55S, Cytec) est insérée dans un capillaire de borosilicate (1,2 mm de diamètre externe et 0,69 mm de diamètre interne, GC 120-10, Clark Electromedical Instruments), à l'aide d'une pompe à vide. Le capillaire contenant la fibre de carbone en son centre est par la suite placé au sein d'une micro-étireuse verticale (**Figure E.6**) (Narishige, référence PC-100, New York, Etats Unis) de façon à sceller la fibre de carbone au corps de verre de ce dernier. L'extrémité supérieure du capillaire de verre est fixée à un bloc immobilisé, tandis que l'extrémité inférieure est attachée à un contrepoids mobile. La partie centrale du capillaire passe alors au sein d'un filament, générant une température suffisante pour faire fondre le verre. Le contrepoids tire alors l'extrémité inférieure entraînant la rupture du verre au centre du capillaire. A la fin de cette étape, la fibre de carbone est scellée au capillaire et la partie centrale de la fibre est coupée à l'aide d'une paire de ciseaux. Cette procédure permet ainsi d'obtenir deux électrodes identiques. De façon à établir la connexion entre la fibre de carbone et le fil conducteur (100-30B, Farnell) employé pour

l'étape de polymérisation, une goutte de mercure est insérée à l'extrémité du capillaire.



Figure E.6 : photographie de la micro-étireuse verticale. Le capillaire contenant la fibre de carbone est localisé en haut à gauche.

5.2) L'électropolymérisation

La surface conductrice cylindrique de l'électrode est isolée par un film de polyoxyphénylène déposé de façon électrochimique sur la fibre de carbone nue. Cette technique consiste en l'oxydation de monomères (2-allylphénol et allylamine) à la surface de la fibre. La solution d'électropolymérisation est préparée à partir des trois réactifs suivants : 2-allylphénol ($0,23 \text{ mol.L}^{-1}$), allylamine ($0,4 \text{ mol.L}^{-1}$), et 2-butoxyéthanol ($0,23 \text{ mol.L}^{-1}$), dans un mélange eau/méthanol (1/1). Cette électropolymérisation (montage présenté en **Figure E.7**) est réalisée en appliquant une différence de potentiel de +4V (durant une période de trois minutes) entre la fibre de carbone qui joue le rôle de l'anode et un fil de platine utilisé comme cathode.



Figure E.7 : Photographie du montage de polymérisation des ultramicroélectrodes de carbone

Un film de polymère relativement fin (de l'ordre du micromètre) recouvre alors la surface de la fibre de carbone. Par la suite, chaque électrode est rincée à l'eau distillée par trempage. L'efficacité de la polymérisation est vérifiée à la loupe binoculaire. La présence de bulles de polymères le long de la fibre atteste du bon fonctionnement de la polymérisation. Afin de s'assurer de l'obtention d'un film isolant électriquement, il est nécessaire de réticuler suffisamment le polymère. Un traitement thermique est alors réalisé en plaçant les électrodes à l'étuve à 150°C pendant une période de trois heures. Ceci permet l'évaporation du solvant résiduel ainsi que l'amélioration de la résistance mécanique du polymère. Le mercure est retiré des capillaires avant cette étape de chauffage, et est réintroduit après refroidissement.

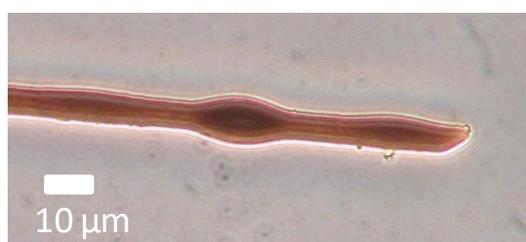


Figure E.8 : Photographie de l'extrémité d'une ultramicroélectrode de carbone polymérisée (les bulles indiquent la bonne qualité de la réticulation)

5.3) Le polissage

A la suite de l'étape d'électropolymérisation, toute la surface de la fibre est recouverte de polymère, il est donc nécessaire d'exposer une surface active (carbone nu) sur la fibre de carbone. Par conséquent, un polissage à 45° est effectué à l'aide d'une micro-polisseuse (**Figure E.9**) (Narishige, référence EG-4, New York, Etats Unis). Tout d'abord, il est nécessaire de couper la fibre de carbone avec un scalpel sous une loupe binoculaire tout en contrôlant sa longueur et prenant garde de choisir la position de la coupe entre deux bulles de polymère. La vitesse de rotation est de 80 tours.min⁻¹ et la durée de polissage est fixée à 5 minutes mais peut être adaptée en fonction de la longueur et du diamètre de la fibre à polir.



Figure E.9 : Photographie du montage de polissage d'une UME de carbone

5.4) Alternative à l'utilisation du mercure

Afin de s'affranchir de l'utilisation du mercure, une nouvelle méthode de contact électrique a été élaborée au laboratoire en remplaçant en guise de contact entre la fibre de carbone et le fil électrique la goutte de mercure liquide par du galinstan (Geratherm Medical AG, Allemagne). Il s'agit d'un alliage eutectique de galium (68,5%), d'indium (21,5%) et d'étain (10%) liquide à température ambiante.

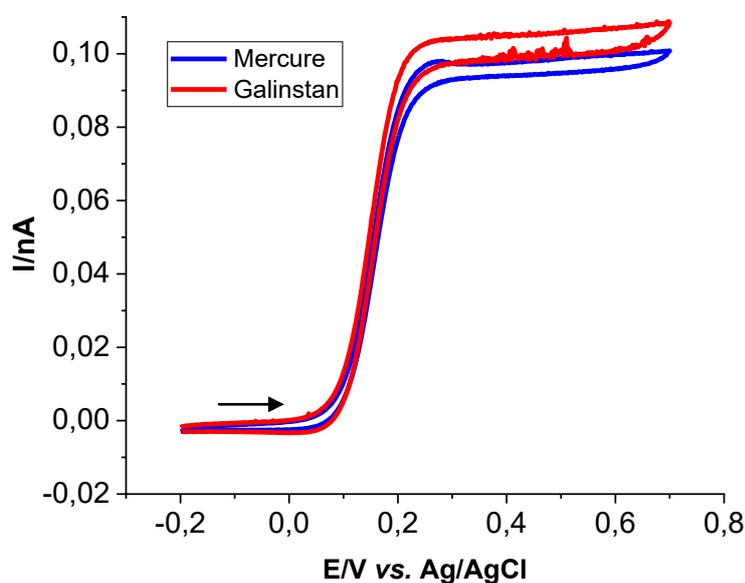


Figure E.10 : Voltammogrammes ($100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$) obtenus pour une solution de $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de ferrocène méthanol (en milieu PBS (pH = 7,4) pour des CFEs avec le contact électrique réalisé à l'aide de mercure (courbe bleue) et un contact électrique effectué avec du galinstan (courbe rouge) ($E_i = -0,2\text{V vs Ag/AgCl}$)

La **Figure E.10** présente les voltammogrammes obtenus pour une solution de $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de ferrocène méthanol en milieu PBS (pH=7,4) pour une électrode polymérisée et dont le contact électrique est effectué soit à l'aide de mercure (courbe bleue) soit avec du galinstan à la place du mercure (courbe rouge). Les deux courbes possèdent des morphologies identiques avec un courant limite stationnaire entre 0,09 et 0,1 nA. Le galinstan semble donc être un matériau prometteur et à considérer pour remplacer à court terme le mercure comme contact électrique dans ce processus de fabrication des ultramicroélectrodes.

6) La fabrication des dispositifs d'ITO

Le procédé de lithographie et de dépôt de l'ITO a fait l'objet du **Chapitre IV** de ce manuscrit. Nous nous intéresserons ici plus en détails à la réalisation des puits de PDMS et ceux obtenus par impression 3D.

6.1) Puits de PDMS

Un puits de PDMS est réalisé de façon à contenir les cellules et leur milieu sur le dispositif d'TTO. Du PDMS liquide (polydiméthylsiloxane RTV-615 ; Momentive Performance Materials –GmbH) est mélangé à un agent de réticulation en proportion massique 90-10. Le mélange ainsi obtenu est stocké à -20°C , température à laquelle il conserve sa forme liquide.

Afin d'obtenir la forme des deux puits désirés, un moule façonné en aluminium selon les proportions souhaitées a été utilisé (**Figure E.11**). Le moule est introduit au sein d'une boîte de Petri contenant une épaisseur suffisante de PDMS (environ 2 cm). Cette dernière est placée à l'étuve pendant une durée de 30 minutes à 80°C , afin de générer la réticulation du polymère et d'obtenir du PDMS solide.

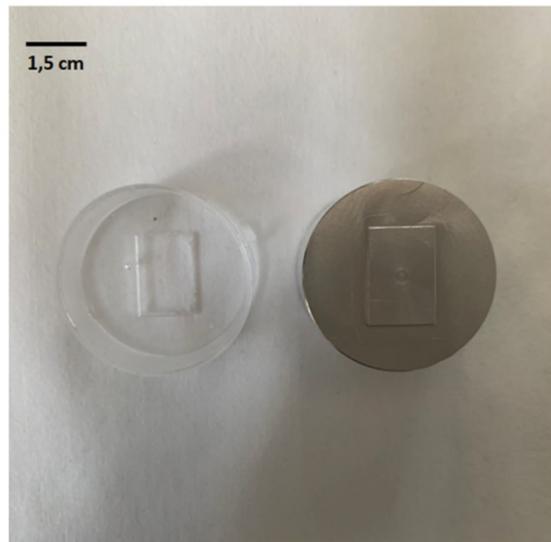


Figure E.11 : Façonnage du puits de PDMS

Le puits ainsi obtenu est par la suite collé sur les lamelles de verre lithographiées grâce à un simple passage au Plasma à Oxygène (Femto PlasmaCleaner – Diener electronics) pendant une durée de 3 minutes à 400 mTorr. Les dispositifs ainsi créés subissent un traitement thermique pendant une durée de 24 heures à 80°C .

6.2) Puits réalisés par impression 3D

Les puits utilisés comme contenant cellulaire sur les dispositifs d'TTO ont été réalisés en PDMS, mais également en plastique, à l'aide d'une imprimante 3D Zortax M-300 et du

filament plastique Zortrax Z-HIPS. Le design du puits est réalisé à l'aide du logiciel de conception 3D « Blender ». Le fichier ainsi créé est exporté de l'ordinateur vers l'imprimante par l'intermédiaire d'une carte SD. Les lamelles de verre lithographiées subissent au préalable un traitement au plasma à oxygène pendant 3 minutes à une pression de 400 mTorr, avant l'impression, afin d'améliorer l'adhésion du filament plastique sur les lamelles. Par empilement de couches successives de plastique fondu, le puits est déposé à la surface de la lamelle de verre selon les dimensions souhaitées.

7) Elaboration de l'électrode de référence Ag/AgCl

Nous avons utilisé l'électrode Ag/AgCl comme électrode de référence pour les mesures électrochimiques sur ultramicroélectrode, du fait de ses nombreux avantages expérimentaux tels que sa petite taille, sa forme flexible ainsi que sa relative facilité de fabrication. Cette électrode de référence est constituée d'un fil métallique d'argent (AG005160 /43, diamètre 1 mm, Goodfellow Cambridge, Angleterre) recouvert d'AgCl déposé de façon électrochimique. Pour cela, une solution de chlorure de sodium NaCl concentrée à 3 mol.L⁻¹ a été électrolysée en appliquant une tension alternative de +15 V entre le fil d'Ag (anode) et un fil de platine (cathode) pendant quelques dizaines de secondes. L'argent métallique a ainsi été partiellement oxydé en ions Ag⁺ sur la surface de l'électrode. Ces derniers forment un précipité solide brun d'AgCl avec les anions chlorures présents en solution, à la surface du fil d'argent. L'inversion régulière de la polarité des électrodes (à deux ou trois reprises) assure la stabilité mécanique du dépôt.

8) Expériences de spectroscopie

8.1) Absorption UV-vis

Les spectres d'absorption UV - vis ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Cary 300 (Agilent Technologies, Santa Clara, Californie – Etats-Unis) équipé d'un double porte-cuvette « Sport t2 » (Quantum Northwest, Liberty Lake, Washington, Etats-Unis) thermo-régulé à 293 K. Les échantillons ont été placés dans des cuvettes en quartz (Hellma) de 1x1 cm (échantillons de 3 mL).

8.2) Mesures de fluorescence

Les mesures de fluorescence ont été effectuées à 293 K avec un spectrophotomètre QuantaMaster (PTI, Monmouth Junction, New Jersey – Etats-Unis) équipé d'un porte-cuvette TLC50 (Quantum Northwest). Les échantillons ont été placés dans des cuves en quartz (Hellma) de 3x3 mm de 54 μL de contenance. Dans le cas de la détermination du rendement quantique de FFN42, les solutions pour les mesures d'émission ont été ajustées à des concentrations telles que l'absorption maximale soit maintenue en dessous de 0,15 dans la gamme de longueurs d'onde souhaitée.

8.3) Détermination des pKas

L'évolution de l'absorbance de FFN42 en fonction du pH a été mesurée entre 3,57 et 11,05 dans un tampon dit « Britton-Robinson » composé de :

- 10 mmol.L^{-1} d'acide acétique (CH_3COOH)
- 10 mmol.L^{-1} de CHES (acide N-cyclohexyl-2-aminoéthanesulfonique)
- 10 mmol.L^{-1} de dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4) dans 50 mmol.L^{-1} de chlorure de sodium (NaCl).

Les valeurs de pKa des trois sites de protonation de FFN42 ont été extraites à l'aide du système d'analyse global « SPECFIT / 32 » (version 3.0 pour les systèmes Windows 32 bits).

9) Mesures électrochimiques

9.1) Voltammétrie cyclique sur CFE

Toutes les analyses voltampérométriques des molécules sur ITO et CFE ont été effectuées avec un picostat EA162 (eDAQ, Australie) via un système « e-corder 401 » associé au logiciel « EChem » à l'intérieur d'une cage de Faraday. Un fil Ag/AgCl a été utilisé comme électrode de référence et la contre-électrode était un fil de platine.

9.2) Détermination du nombre d'électrons

Le nombre d'électrons impliqué lors de l'oxydation de FFN42 a été déterminé au moyen de deux méthodes électrochimiques. La méthode en régime permanent a été réalisée avec une

électrode à disque rotatif (RDE; électrode en carbone vitreux, diamètre 3 mm – Radiometer Analytical Instruments, Copenhague, Danemark). La méthode transitoire était la voltampérométrie cyclique (électrode en carbone vitreux, diamètre 1 mm – Radiometer). Le potentiostat utilisé pour cette série d'expériences est un potentiostat EGG (Princeton Applied Research). L'électrode de référence était une électrode classique au calomel saturé (ECS - Radiometer) et la contre-électrode était constituée par un fil de platine.

10) Expériences sur cellules

10.1) Test de toxicité cellulaire

Le kit de viabilité/cytotoxicité LIVE/DEAD® (Thermofischer Scientific) a été utilisé afin de vérifier l'absence de toxicité de la molécule FFN42 sur les cellules BON N13 à l'échelle de temps des expériences.

Les cellules ont ainsi été incubées avec une solution de 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN42 pendant une durée de 20 minutes. Les échantillons ont par la suite été rincés à trois reprises avec une solution de PBS (pH=7,4). Le milieu de culture des échantillons est remplacé par une solution de PBS contenant 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de calcéïne et 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'Ethidium Homodimer du kit LIVE/DEAD® et les cellules ont été placées à l'incubateur durant trente minutes. Les échantillons ont de nouveau été rincés à trois reprises avec du PBS (pH=7,4) et ont été analysés par microscopie de fluorescence au sein de cette même solution.

10.2) Fabrication des capillaires de stimulation

Concernant l'obtention des capillaires de stimulation pour les expériences menées sur cellules, des capillaires de verre de la marque (GC 120-10, Clark Electromedical Instruments) d'un diamètre externe de 1,2 mm et de diamètre interne de 0,69 mm sont utilisés et scindés en deux parties identiques grâce à l'utilisation d'une étireuse verticale (PC-100 puller Narishige New-York, Etats-Unis). Les deux capillaires ainsi obtenus sont ensuite polis sur une micro-polisseuse munie d'un disque de résine diamanté (modèle EG-4, Narishige) durant quelques secondes afin de créer une ouverture à la pointe de ces capillaires (dont le diamètre varie du micromètre à la dizaine de micromètres), qui permet d'injecter la solution de stimulation au sein des échantillons cellulaires (**Figure E.12**).

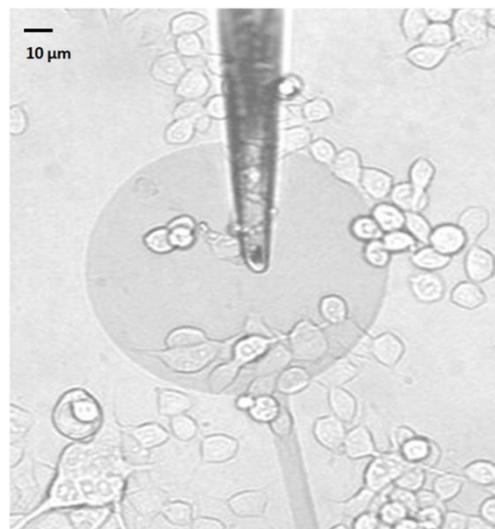


Figure E.12 : Capillaire de stimulation (x40)

10.3) Expériences de microscopie de fluorescence et de TIRFM

Au sein de boîtes de Petri à fond de verre ou sur les dispositifs ITO fabriqués, les cellules ont été incubées dans leur milieu de culture complet supplémenté par $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN42 pendant une durée de 20 minutes. Avant les mesures de fluorescence, les cellules ont été rincées à trois reprises avec du PBS à pH 7,4 afin de s'affranchir de la présence résiduelle du composé FFN42 dans le milieu extracellulaire. Les cellules sont ensuite analysées au sein d'une solution de Locke x1.

Toutes les mesures de microscopie ont été réalisées sur un microscope inversé (Axiovert-135, Zeiss). La caméra utilisée est une caméra EMCCD « *Electron Multiplying Charge Coupled Device* » (Hamamatsu). Les images sont obtenues et traitées sur le logiciel « *HCIImageLive* ». Pour les expériences de microscopie de fluorescence, une lampe HXP 120C (Zeiss) est utilisée comme source lumineuse afin de générer la fluorescence de la sonde FFN42 et l'émission de fluorescence est filtrée par un filtre optique passe-bande: D460/40 nm (Chroma Technology) pour la détection de FFN42. Pour les expériences de toxicité cellulaire, le filtre utilisé pour contrôler la présence des cellules vivantes est un filtre passe-bande 470/40 nm (Chroma Technology) et celui utilisé pour l'observation de cellules mortes est le filtre passe-bande 550/25 nm (Chroma Technology). Concernant les expériences de TIRFM pour la détection optique du composé FFN42, un objectif TIRF à

grande ouverture numérique (x100) (1,45 NA, PlanApo, Zeiss) à immersion dans l'huile (indice de réfraction = 1,52, non fluorescent, Olympus) est utilisé. Un laser de 405 nm (50 mW, CMA1-01983, Newport, New Jersey, Etats-Unis) est également employé comme source de lumière afin d'initier la fluorescence.

10.4) Détection ampérométrique

Dans le cadre de ce doctorat, la détection ampérométrique de l'exocytose cellulaire a été effectuée avec des cellules BON N13 cultivées au sein de boîtes Petri à fond de verre. Après une incubation de 24 à 48 heures, les cellules ont d'abord été rincées à trois reprises par une solution PBS et le milieu de culture cellulaire a ensuite été remplacé par une solution Locke x1. La détection électrochimique basée sur des cellules individuelles a été effectuée sur la plateforme du microscope inversé (**Figure E.13**).

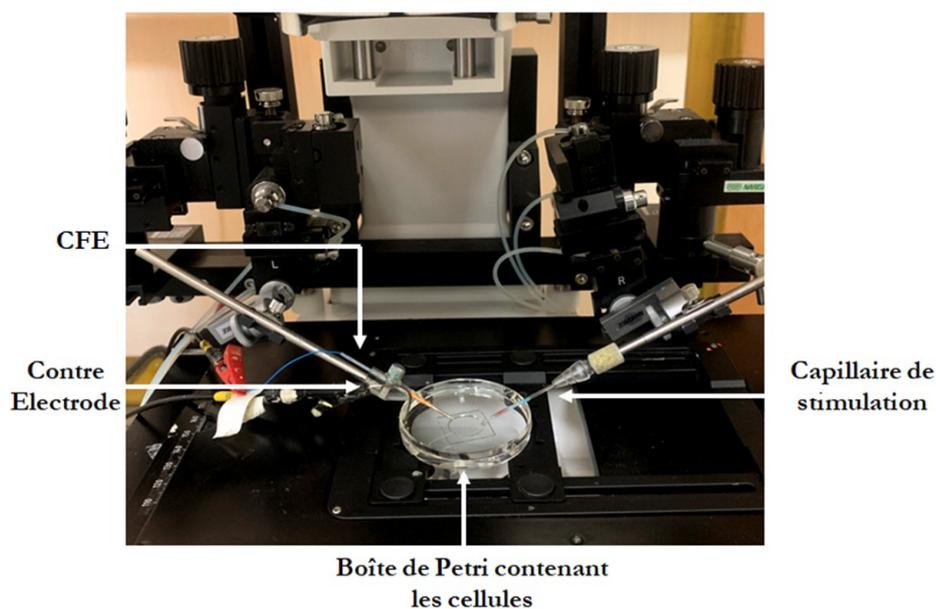


Figure E.13 : Configuration expérimentale pour les expériences de détection ampérométrique

Après avoir détecté une cellule isolée cible, l'électrode en fibre de carbone est approchée à proximité de la membrane cellulaire à l'aide d'un micromanipulateur (MHW-103, Narishige). Puis, avec un deuxième micromanipulateur, un capillaire en verre rempli de solution de stimulation (ionomycine ou K^+/Ca^{2+}) a été placé à proximité de la cellule afin

de déclencher l'exocytose grâce à l'utilisation d'un micro-injecteur (Injecteur Femtojet, Eppendorf Inc., Hambourg, Allemagne; **Figure E.14**).

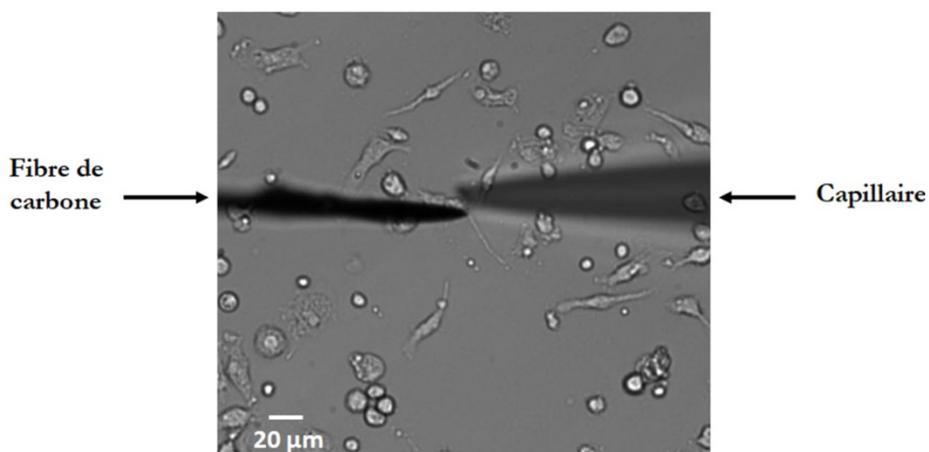


Figure E.14 : CFE et capillaire de verre placés au-dessus de cellules BON N13 (x20)

Un potentiel constant ($E_a = +500$ mV *vs* Ag/AgCl) a été appliqué à l'électrode de travail (CFE) par un potentiostat AMU-130 (Radiometer Analytical Instruments, Copenhague, Danemark) et le courant a été enregistré en fonction du temps via le logiciel « e-DAQ Chart » (version graphique 4.2 Windows, AD Instruments) avec une fréquence d'acquisition de 40 kHz. Une fois le courant stabilisé, la stimulation est déclenchée durant 60 secondes avec une pression d'éjection suffisamment modérée pour ne pas déformer la cellule (environ 100 hPa suivant le rayon du capillaire). L'activité exocytotique se manifeste sous la forme d'une succession de pics de courant. Ces derniers sont analysés et sélectionnés visuellement. Ne sont retenus que les pics non superposés dont le courant maximum est au moins 3 fois supérieur au bruit. Chaque pic est analysé selon trois paramètres : le courant maximum I_{\max} (pA), la durée à mi-hauteur $t_{1/2}$ (ms) et l'aire du pic soit la charge Q (fC) par le biais d'un logiciel développé au laboratoire. Toutes les valeurs sont données comme la moyenne des pics sélectionnés \pm la déviation standard (écart-type/racine (nombre de pics)). Les mesures de bruit électrique des dispositifs ITO ont été réalisées en absence de cellules dans du Locke x1 en faisant varier le potentiel appliqué et la puissance du laser (**Chapitre IV**).

Références Bibliographiques

- (1) *Exocytosis and Endocytosis*; Ivanov, A. I., Ed.; Humana Press, 2008; Vol. 440.
- (2) R Jahn; Südhof, T. C. *Annual Review of Neuroscience* **1994**, *17*, 219.
- (3) A Alabi, A.; Tsien, R. *Annual review of physiology* **2012**, *75*.
- (4) Sugita, S. *Acta Physiologica* **2008**, *192*, 185.
- (5) Steyer, J. A.; Horstmann, H.; Almers, W. *Nature* **1997**, *388*, 474.
- (6) Pang, Z. P.; Südhof, T. C. *Current opinion in cell biology* **2010**, *22*, 496.
- (7) Südhof, T. C. *Annual Review of Neuroscience* **2004**, *27*, 509.
- (8) Ge, S.; Koseoglu, S.; Haynes, C. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *397*, 3281.
- (9) Kopell, W.; Westhead, E. *The Journal of biological chemistry* **1982**, *257*, 5707.
- (10) Videen, J. S.; Mezger, M. S.; Chang, Y. M.; O'Connor, D. T. *Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267*, 3066.
- (11) Südhof, T. C.; Rothman, J. E. *Science (New York, N.Y.)* **2009**, *323*, 474.
- (12) Jahn, R.; Fasshauer, D. *Nature* **2012**, *490*, 201.
- (13) Amatore, C.; Arbault, S.; Guille, M.; Lemaître, F. *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 1597.
- (14) Amatore, C.; Arbault, S.; Guille, M.; Lemaître, F. *Chemical Reviews* **2008**, *108*, 2585.

- (15) Fasshauer, D.; Otto, H.; Eliason, W. K.; Jahn, R.; T Brünger, A. *The Journal of biological chemistry* **1997**, *272*, 28036.
- (16) Fasshauer, D.; Sutton, R. B.; Brunger, A. T.; Jahn, R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 15781.
- (17) Travis, E. R.; Wightman, R. M. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **1998**, *27*, 77.
- (18) Sutton, R. B.; Fasshauer, D.; Jahn, R.; Brunger, A. T. *Nature* **1998**, *395*, 347.
- (19) Xu, T.; Rammner, B.; Margittai, M.; Artalejo, A. R.; Neher, E.; Jahn, R. *Cell* **1999**, *99*, 713.
- (20) Lindau, M.; Alvarez de Toledo, G. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2003**, *1641*, 167.
- (21) Rizzoli, S. O.; Jahn, R. *Traffic* **2007**, *8*, 1137.
- (22) Neher, E. *Nature* **1993**, *363*, 497.
- (23) Wightman, R. M.; Haynes, C. L. *Nature Neuroscience* **2004**, *7*, 321.
- (24) Ma, L.; Bindokas, V. P.; Kuznetsov, A.; Rhodes, C.; Hays, L.; Edwardson, J. M.; Ueda, K.; Steiner, D. F.; Philipson, L. H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 9266.
- (25) Oleinick, A.; Svir, I.; Amatore, C. *Proceedings. Mathematical, physical, and engineering sciences* **2017**, *473*, 20160684.
- (26) Trouillon, R.; Ewing, A. G. *ACS chemical biology* **2014**, *9*, 812.
- (27) van Kempen, G. T. H.; vanderLeest, H. T.; van den Berg, R. J.; Eilers, P.; Westerink, R. H. S. *Biophysical journal* **2011**, *100*, 968.
- (28) Troyer, K. P.; Wightman, R. M. *The Journal of biological chemistry* **2002**, *277*, 29101.

- (29) Gerber, S. H.; Südhof, T. C. *Diabetes* **2002**, *51*, S3.
- (30) Fathali, H.; Cans, A.-S. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **2018**, *470*, 125.
- (31) Burgoyne, R. D.; Morgan, A. *Physiological Reviews* **2003**, *83*, 581.
- (32) Burgoyne, R. D.; Barclay, J. W. *Trends in Neurosciences* **2002**, *25*, 176.
- (33) Meunier, A., Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011, *Méthodes analytiques pour la détection de phénomènes biologiques de sécrétion à l'échelle de la cellule unique*.
- (34) Robinson, I. M.; Finnegan, J. M.; Monck, J. R.; Wightman, R. M.; Fernandez, J. M. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1995**, *92*, 2474.
- (35) Burchfield, J. G.; Lopez, J. A.; Mele, K.; Vallotton, P.; Hughes, W. E. *Traffic* **2010**, *11*, 429.
- (36) Neher, E.; Sakmann, B. *Nature* **1976**, *260*, 799.
- (37) Borges, R.; Camacho, M.; Gillis, K. D. *Acta Physiologica* **2008**, *192*, 173.
- (38) Lollike, K.; Borregaard, N.; Lindau, M. *The Journal of Cell Biology* **1995**, *129*, 99.
- (39) de Toledo, G. A.; Fernández-Chacón, R.; Fernández, J. M. *Nature* **1993**, *363*, 554.
- (40) Spruce, A. E.; Breckenridge, L. J.; Lee, A. K.; Almers, W. *Neuron* **1990**, *4*, 643.
- (41) Barg, S.; Machado, J. D. *Acta Physiologica* **2008**, *192*, 195.
- (42) Hamill, O. P.; Marty, A.; Neher, E.; Sakmann, B.; Sigworth, F. J. *Pflügers Archiv* **1981**, *391*, 85.

- (43) Heinze, J. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1993**, *32*, 1268.
- (44) Wightman, R. M. *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 1125A.
- (45) Stulík, K.; Amatore, C.; Holub, K.; Marecek, V.; Kutner, W. In *Pure and Applied Chemistry* 2000; Vol. 72, p 1483.
- (46) Heinze, J. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1991**, *30*, 170.
- (47) Amatore, C.; Fosset, B. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 4377.
- (48) Schulte, A.; Schuhmann, W. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 8760.
- (49) Zoski, C. G. *Electroanalysis* **2002**, *14*, 1041.
- (50) Wipf, D. O.; Kristensen, E. W.; Deakin, M. R.; Wightman, R. M. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 306.
- (51) Roberts, J. G.; Sombers, L. A. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 490.
- (52) Liu, X. Q.; Hu, L. H.; Pan, N.; Grimaud, L.; Labbe, E.; Buriez, O.; Delacotte, J.; Lemaitre, F.; Guille-Collignon, M. *Biophysical Chemistry* **2018**, *235*, 48.
- (53) Meunier, A.; Fulcrand, R.; Darchen, F.; Guille Collignon, M.; Lemaître, F.; Amatore, C. *Biophysical Chemistry* **2012**, *162*, 14.
- (54) Schroeder, T. J.; Jankowski, J. A.; Kawagoe, K. T.; Wightman, R. M.; Lefrou, C.; Amatore, C. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 3077.
- (55) Amatore, C.; Bouret, Y.; Midrier, L. *Chemistry-a European Journal* **1999**, *5*, 2151.
- (56) Wightman, R. M.; Jankowski, J. A.; Kennedy, R. T.; Kawagoe, K. T.; Schroeder, T. J.; Leszczyszyn, D. J.; Near, J. A.; Diliberto, E. J., Jr.; Viveros, O. H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1991**, *88*, 10754.

- (57) Meunier, A.; Bretou, M.; Darchen, F.; Guille Collignon, M.; Lemaître, F.; Amatore, C. *Electrochimica Acta* **2014**, *126*, 74.
- (58) Amatore, C.; Arbault, S.; Bonifas, I.; Guille, M.; Lemaître, F.; Verchier, Y. *Biophysical Chemistry* **2007**, *129*, 181.
- (59) Amatore, C.; Bouret, Y.; Travis, E. R.; Wightman, R. M. *Biochimie* **2000**, *82*, 481.
- (60) Amatore, C.; Bouret, Y.; Midrier, L. *Chemistry - A European Journal* **1999**, *5*, 2151.
- (61) Amatore, C.; Arbault, S.; Bonifas, I.; Bouret, Y.; Erard, M.; Guille, M. *ChemPhysChem* **2003**, *4*, 147.
- (62) Midorikawa, M. *Neuroscience Research* **2018**, *136*, 1.
- (63) Anantharam, A.; Onoa, B.; Edwards, R. H.; Holz, R. W.; Axelrod, D. *The Journal of Cell Biology* **2010**, *188*, 415.
- (64) Keighron, J.; Ewing, A.; Cans, A.-S. *The Analyst* **2012**, *137*, 1755.
- (65) Takahashi, N. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2015**, *38*, 656.
- (66) Cuchillo-Ibáñez, I.; Michelena, P.; Albillos, A.; García, A. G. *FEBS Letters* **1999**, *459*, 22.
- (67) Panyam, J.; Labhasetwar, V. *Pharmaceutical research* **2003**, *20*, 212.
- (68) Schermelleh, L.; Heintzmann, R.; Leonhardt, H. *The Journal of Cell Biology* **2010**, *190*, 165.
- (69) Huang, B.; Bates, M.; Zhuang, X. *Annual Review of Biochemistry* **2009**, *78*, 993.
- (70) Chiang, H.-C.; Shin, W.; Zhao, W.-D.; Hamid, E.; Sheng, J.; Baydyuk, M.; Wen, P. J.; Jin, A.; Momboisse, F.; Wu, L.-G. *Nature Communications* **2014**, *5*, 3356.

- (71) Willig, K. I.; Rizzoli, S. O.; Westphal, V.; Jahn, R.; Hell, S. W. *Nature* **2006**, *440*, 935.
- (72) Hell, S. W.; Betzig, E.; Moerner, W. E. *M S-Medecine Sciences* **2014**, *30*, 1169.
- (73) Gorlitz, F.; Hoyer, P.; Falk, H. J.; Kastrup, L.; Engelhardt, J.; Hell, S. W. *Progress in Electromagnetics Research-Pier* **2014**, *147*, 57.
- (74) Hirano, T. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **2018**, *12*.
- (75) Calderon, C.; Thompson, M.; Moerner, W. E. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2011**, 242.
- (76) Betzig, E. *Angewandte Chemie-International Edition* **2015**, *54*, 8034.
- (77) Huang, B.; Wang, W.; Bates, M.; Zhuang, X. *Science* **2008**, *319*, 810.
- (78) Holz, R. W.; Axelrod, D. *Acta Physiologica* **2008**, *192*, 303.
- (79) Holz, R. W. *Cellular and Molecular Neurobiology* **2006**, *26*, 437.
- (80) Axelrod, D.; Burghardt, T. P.; Thompson, N. L. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* **1984**, *13*, 247.
- (81) Mattheyses, A. L.; Simon, S. M.; Rappoport, J. Z. *Journal of Cell Science* **2010**, *123*, 3621.
- (82) Oheim, M. *Lasers in Medical Science* **2001**, *16*, 149.
- (83) Yildiz, A.; Vale, R. D. *Cold Spring Harbor Protocols* **2015**, 2015, pdb.top086348.
- (84) Ravier, M. A.; Tsuboi, T.; Rutter, G. A. *Methods* **2008**, *46*, 233.
- (85) Schmoranzler, J.; Goulian, M.; Axelrod, D.; Simon, S. M. *The Journal of Cell Biology* **2000**, *149*, 23.

- (86) Liu, X., Université Pierre et Marie Curie -Paris VI, 2016, *More transparency in bioanalysis of exocytosis : application of fluorescent false neurotransmitters in coupling methodology of electrochemistry with fluorescence microscopy at ITO microelectrodes.*
- (87) Tran, S., Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2008, *Regulated secretion studied by Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy.*
- (88) Huet, S.; Karatekin, E.; Tran, V. S.; Fanget, I.; Cribier, S.; Henry, J.-P. *Biophysical journal* **2006**, *91*, 3542.
- (89) Tran, V. S.; Huet, S.; Fanget, I.; Cribier, S.; Henry, J.-P.; Karatekin, E. *European Biophysics Journal* **2007**, *37*, 55.
- (90) Lee, M.; Gubernator, N. G.; Sulzer, D.; Sames, D. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 8828.
- (91) Johnson, D. S.; Jaiswal, J. K.; Simon, S. *Current Protocols in Cytometry* **2012**, *61*, 12.29.1.
- (92) Marinesco, S.; Carew, T. J. *The Journal of Neuroscience* **2002**, *22*, 2299.
- (93) Martin, K. C.; Hu, Y. H.; Armitage, B. A.; Siegelbaum, S. A.; Kandel, E. R.; Kaang, B. K. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1995**, *92*, 11307.
- (94) Welle, T. M.; Alanis, K.; Colombo, M. L.; Sweedler, J. V.; Shen, M. *Chem Sci* **2018**, *9*, 4937.
- (95) Pothos, E. N.; Davila, V.; Sulzer, D. *The Journal of Neuroscience* **1998**, *18*, 4106.
- (96) Hochstetler, S. E.; Puopolo, M.; Gustincich, S.; Raviola, E.; Wightman, R. M. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 489.
- (97) Michael, D. J.; Wightman, R. M. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1999**, *19*, 33.
- (98) Coupland, R. E. *Nature* **1968**, *217*, 384.

- (99) Bader, M.-F.; Holz, R. W.; Kumakura, K.; Vitale, N. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2002**, *971*, 178.
- (100) Kawagoe, K. T.; Jankowski, J. A.; Wightman, R. M. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1589.
- (101) Westerink, R. H. S.; Ewing, A. G. *Acta Physiologica* **2008**, *192*, 273.
- (102) Greene, L. A.; Tischler, A. S. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1976**, *73*, 2424.
- (103) Lang, T.; Wacker, I.; Steyer, J.; Kaether, C.; Wunderlich, I.; Soldati, T.; Gerdes, H.-H.; Almers, W. *Neuron* **1997**, *18*, 857.
- (104) Hu, L. H.; Savy, A.; Grimaud, L.; Guille-Collignon, M.; Lemaitre, F.; Amatore, C.; Delacotte, J. *Biophysical Chemistry* **2019**, *245*, 1.
- (105) Parekh, D.; Ishizuka, J.; Townsend, C. M. J.; Haber, B.; Beauchamp, R. D.; Karp, G.; Kim, S. W.; Rajaraman, S.; Greeley, G. J.; Thompson, J. C. *Pancreas* **1994**, *9*, 83.
- (106) Sun, J.; Xu, J.; Cairns, N. J.; Perlmutter, J. S.; Mach, R. H. *PloS one* **2012**, *7*, e49483.
- (107) Evers, B. M.; Ishizuka, J.; Townsend, J.R., C. M.; Thompson, J. C. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1994**, *733*, 393.
- (108) Evers, B. M.; Townsend, C. M., Jr.; Upp, J. R.; Allen, E.; Hurlbut, S. C.; Kim, S. W.; Rajaraman, S.; Singh, P.; Reubi, J. C.; Thompson, J. C. *Gastroenterology* **1991**, *101*, 303.
- (109) Tran, V.; Marion-Audibert, A.-M.; Karatekin, E.; Huet, S.; Cribier, S.; Guillaumie, K.; Chapuis, C.; Desnos, C.; Darchen, F. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2004**, *1014*, 179.
- (110) Bernstein, A. I.; Stout, K. A.; Miller, G. W. *Neurochemistry international* **2014**, *73*, 89.

- (111) Colliver, T.; Pyott, S.; Achalabun, M.; Ewing, A. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2000**, *20*, 5276.
- (112) Wimalasena, K. *Medicinal research reviews* **2011**, *31*, 483.
- (113) Weihe, E.; Schäfer, M. K.-H.; Erickson, J. D.; Eiden, L. E. *Journal of Molecular Neuroscience* **1994**, *5*, 149.
- (114) Schonh, J.-S.; Desnos, C.; Darchen, F. *Journal of neurochemistry* **2003**, *84*, 669.
- (115) Gros, Y.; Schuldiner, S. *The Journal of biological chemistry* **2010**, *285*, 5076.
- (116) Hansson, S. R.; Mezey, É.; Hoffman, B. J. *Developmental Brain Research* **1998**, *110*, 159.
- (117) Yuan, T.; Lu, J.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Chen, L. *Biophysical journal* **2015**, *108*, 251.
- (118) Fu, J.; Githaka, J. M.; Dai, X.; Plummer, G.; Suzuki, K.; Spigelman, A. F.; Bautista, A.; Kim, R.; Greitzer-Antes, D.; Manning Fox, J. E.; Gaisano, H. Y.; MacDonald, P. E. *bioRxiv* **2019**, 534669.
- (119) Oberhauser, A. F.; Robinson, I. M.; Fernandez, J. M. *Biophysical journal* **1996**, *71*, 1131.
- (120) Saha, K.; Swant, J.; Khoshbouei, H. *Journal of visualized experiments : JoVE* **2012**.
- (121) Becherer, U.; Pasche, M.; Nofal, S.; Hof, D.; Matti, U.; Rettig, J. *PloS one* **2007**, *2*, e505.
- (122) Lemaître, F.; Guille Collignon, M.; Amatore, C. *Electrochimica Acta* **2014**, *140*, 457.
- (123) Meunier, A.; Jouannot, O.; Fulcrand, R.; Fanget, I.; Bretou, M.; Karatekin, E.; Arbault, S.; Guille, M.; Darchen, F.; Lemaître, F.; Amatore, C. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 5081.

- (124) Liu, X. Q.; Savy, A.; Maurin, S.; Grimaud, L.; Darchen, F.; Quinton, D.; Labbe, E.; Buriez, O.; Delacotte, J.; Lemaitre, F.; Guille-Collignon, M. *Angewandte Chemie-International Edition* **2017**, *56*, 2366.
- (125) Amatore, C.; Delacotte, J.; Guille Collignon, M.; Lemaître, F. *Analyst* **2015**, *140*.
- (126) Kisler, K.; Kim, B. N.; Liu, X.; Berberian, K.; Fang, Q.; Mathai, C. J.; Gangopadhyay, S.; Gillis, K. D.; Lindau, M. *Journal of biomaterials and nanobiotechnology* **2012**, *3*, 243.
- (127) G Gubernator, N.; Zhang, H.; G W Staal, R.; V Mosharov, E.; B Pereira, D.; Wong, M.; Balsanek, V.; Vadola, P.; Mukherjee, B.; H Edwards, R.; Sulzer, D.; Sames, D. *Science (New York, N.Y.)* **2009**, *324*, 1441.
- (128) Merchant, P.; Sulzer, D.; Sames, D. *Neuropharmacology* **2015**, *98*, 90.
- (129) Schloss, P.; Matthäus, F.; Lau, T. *Neural Regeneration Research* **2015**, *10*, 1383.
- (130) Omiatek, D.; Cans, A.-S.; Heien, M.; Ewing, A. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *397*, 3269.
- (131) Karpowicz, R. J., Jr.; Dunn, M.; Sulzer, D.; Sames, D. *ACS Chemical Neuroscience* **2013**, *4*, 858.
- (132) Er, J. C.; Leong, C.; Teoh, C. L.; Yuan, Q.; Merchant, P.; Dunn, M.; Sulzer, D.; Sames, D.; Bhinge, A.; Kim, D.; Kim, S.-M.; Yoon, M.-H.; Stanton, L. W.; Je, S. H.; Yun, S.-W.; Chang, Y.-T. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54*, 2442.
- (133) Colgan, L.; Putzier, I.; Levitan, E. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2009**, *29*, 15878.
- (134) Beltran, B.; Carrillo, R.; Martin, T.; Martin, V. S.; Machado, J. D.; Borges, R. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* **2011**, *4*, 713.
- (135) Bera, K.; Das, A. K.; Rakshit, A.; Sarkar, B.; Rawat, A.; Maity, B. K.; Maiti, S. *ACS Chemical Neuroscience* **2018**, *9*, 469.

- (136) Shi, B.-X.; Wang, Y.; Lam, A.; Huang, W.-H.; Zhang, K.; Leung, Y.-C.; Chan, H. *Biomicrofluidics* **2010**, *4*, 43009.
- (137) Hettie, K. S.; Liu, X.; Gillis, K. D.; Glass, T. E. *ACS Chemical Neuroscience* **2013**, *4*, 918.
- (138) Klockow, J. L.; Hettie, K. S.; Glass, T. E. *ACS Chemical Neuroscience* **2013**, *4*, 1334.
- (139) Klockow, J.; Hettie, K.; Secor, K.; Barman, D.; Glass, T. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2015**, *21*.
- (140) Zhang, L.; Liu, X. A.; Gillis, K. D.; Glass, T. E. *Angewandte Chemie International Edition* **2019**, *58*, 7611.
- (141) Gubernator, N. G.; Zhang, H.; Staal, R. G. W.; Mosharov, E. V.; Pereira, D. B.; Yue, M.; Balsanek, V.; Vadola, P. A.; Mukherjee, B.; Edwards, R. H.; Sulzer, D.; Sames, D. *Science* **2009**, *324*, 1441.
- (142) Kopin, I. J. *Annual Review of Pharmacology* **1968**, *8*, 377.
- (143) Partilla, J. S.; Dempsey, A. G.; Nagpal, A. S.; Blough, B. E.; Baumann, M. H.; Rothman, R. B. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2006**, *319*, 237.
- (144) Vadola, P. A.; Sames, D. *The Journal of Organic Chemistry* **2012**, *77*, 7804.
- (145) Matthaueus, F.; Schloss, P.; Lau, T. *ACS Chemical Neuroscience* **2015**, *6*, 1906.
- (146) Lau, T.; Proissl, V.; Ziegler, J.; Schloss, P. *Journal of Neuroscience Methods* **2015**, *241*, 10.
- (147) Hu, G.; Henke, A.; Karpowicz, R. J.; Sonders, M. S.; Farrimond, F.; Edwards, R.; Sulzer, D.; Sames, D. *ACS chemical biology* **2013**, *8*, 1947.
- (148) M Omiatek, D.; Cans, A.-S.; L Heien, M.; Ewing, A. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *397*, 3269.

- (149) Ganesana, M.; Lee, S. T.; Wang, Y.; Venton, B. J. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 314.
- (150) Sames, D.; Dunn, M.; Karpowicz, R. J.; Sulzer, D. *ACS Chemical Neuroscience* **2013**, *4*, 648.
- (151) Meszaros, J.; Cheung, T.; Erler, M. M.; Kang, U. J.; Sames, D.; Kellendonk, C.; Sulzer, D. *eLife* **2018**, *7*, e42383.
- (152) Dunn, M.; Henke, A.; Clark, S.; Kovalyova, Y.; Kempadoo, K. A.; Karpowicz, R. J.; Kandel, E. R.; Sulzer, D.; Sames, D. *Nature Communications* **2018**, *9*, 2838.
- (153) Henke, A.; Kovalyova, Y.; Dunn, M.; Dreier, D.; Gubernator, N. G.; Dincheva, I.; Hwu, C.; Sebej, P.; Ansorge, M. S.; Sulzer, D.; Sames, D. *ACS Chemical Neuroscience* **2018**, *9*, 925.
- (154) Wäldchen, S.; Lehmann, J.; Klein, T.; van de Linde, S.; Sauer, M. *Scientific reports* **2015**, *5*, 15348.
- (155) Coohill, T. P.; Peak, M. J.; Peak, J. G. *Photochemistry and Photobiology* **1987**, *46*, 1043.
- (156) Masuma, R.; Kashima, S.; Kurasaki, M.; Okuno, T. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2013**, *125*, 202.
- (157) Liu, X.; Hu, L.; Pan, N.; Grimaud, L.; Labbé, E.; Buriez, O.; Delacotte, J.; Lemaître, F.; Guille-Collignon, M. *Biophysical Chemistry* **2018**, *235*.
- (158) Hu, L.; Savy, A.; Grimaud, L.; Guille-Collignon, M.; Lemaître, F.; Amatore, C.; Delacotte, J. *Biophysical Chemistry* **2019**, *245*, 1.
- (159) Liu, X.; Savy, A.; Maurin, S.; Grimaud, L.; Darchen, F.; Quinton, D.; Labbé, E.; Buriez, O.; Delacotte, J.; Lemaître, F.; Guille-Collignon, M. *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56*, 2366.
- (160) Tillinger, A.; Sollas, A.; Serova, L. I.; Kvetnansky, R.; Sabban, E. L. *Cellular and Molecular Neurobiology* **2010**, *30*, 1459.

- (161) Fournier, L.; Aujard, I.; Le Saux, T.; Maurin, S.; Beaupierre, S.; Baudin, J.-B.; Jullien, L. *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19*, 17494.
- (162) Popovich, N.; Wong, S.; Yen, B.; Yeom, H.-Y.; Paine, D. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 3127.
- (163) Hayashi, K.; Iwasaki, Y.; Horiuchi, T.; Sunagawa, K.; Tate, A. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 5236.
- (164) Lee, H.; Dellatore, S. M.; Miller, W. M.; Messersmith, P. B. *Science* **2007**, *318*, 426.
- (165) Kato, D.; Xu, G.; Iwasaki, Y.; Hirata, Y.; Kurita, R.; Niwa, O. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2007**, *23*, 8400.
- (166) Et Taouil, A.; Brun, E.; Duchambon, P.; Blouquit, Y.; Gilles, M.; Maisonhaute, E.; Sicard-Roselli, C. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2014**, *16*, 24493.
- (167) Lin, C.; Chen, L.; Tanner, E. E. L.; Compton, R. G. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2018**, *20*, 148.
- (168) Ciolkowski, E. L.; Maness, K. M.; Cahill, P. S.; Wightman, R. M.; Evans, D. H.; Fosset, B.; Amatore, C. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3611.
- (169) Ciolkowski, E. L.; Cooper, B. R.; Jankowski, J. A.; Jorgenson, J. W.; Wightman, R. M. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 2815.
- (170) Hawley, M. D.; Tatawawadi, S. V.; Piekarski, S.; Adams, R. N. *Journal of the American Chemical Society* **1967**, *89*, 447.
- (171) Meunier, A.; Bretou, M.; Darchen, F.; Collignon, M.; Lemaître, F.; Amatore, C. *Electrochimica Acta* **2014**, *126*, 74.
- (172) Patel, B. A.; Bian, X.; Quaiserová-Mocko, V.; Galligan, J. J.; Swain, G. M. *Analyst* **2007**, *132*, 41.

- (173) Pandard, J.; Pan, N.; Ebene, D. H.; Le Saux, T.; Ait-Yahiatène, E.; Liu, X.; Grimaud, L.; Buriez, O.; Labbé, E.; Lemaître, F.; Guille-Collignon, M. *ChemPlusChem* **2019**, *84*, 1578.
- (174) Heien, M. L. A. V.; Phillips, P. E. M.; Stuber, G. D.; Seipel, A. T.; Wightman, R. M. *Analyst* **2003**, *128*, 1413.
- (175) Zachek, M. K.; Takmakov, P.; Moody, B.; Wightman, R. M.; McCarty, G. S. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 6258.
- (176) Bacil, R. P.; Chen, L.; Serrano, S. H. P.; Compton, R. G. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2020**.
- (177) Manica, D. P.; Mitsumori, Y.; Ewing, A. G. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4572.
- (178) Patel, A. N.; Unwin, P. R.; Macpherson, J. V. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, *15*, 18085.
- (179) Trouillon, R.; O'Hare, D. *Electrochimica Acta - ELECTROCHIM ACTA* **2010**, *55*, 6586.
- (180) Amatore, C.; Azzabi, M.; Calas, P.; Jutand, A.; Lefrou, C.; Rollin, Y. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1990**, *288*, 45.
- (181) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods : Fundamentals and Applications*; John Wiley & Sons, 2001.
- (182) Sujaritvanichpong, S.; Aoki, K.; Tokuda, K.; Matsuda, H. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1986**, *198*, 195.
- (183) Chen, Y. T.; He, P.; Liang, Y.; Cheng, L. Y.; Xia, A.; Zhang, T. H. In *Physical and Analytical Electrochemistry*; Minter, S., Ed.; Electrochemical Soc Inc: Pennington, 2010; Vol. 28, p 91.
- (184) Wedege, K.; Dražević, E.; Konya, D.; Bentien, A. *Scientific Reports* **2016**, *6*, 39101.

- (185) Sternson, A. W.; McCreery, R.; Feinberg, B.; Adams, R. N. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1973**, *46*, 313.
- (186) Lin, Q.; Li, Q.; Batchelor-McAuley, C.; Compton, R. G. *The Journal of Physical Chemistry C* **2015**, *119*, 1489.
- (187) Guha, S.; Lohar, S.; Bolte, M.; Safin, D.; Das, D. *Spectroscopy Letters - SPECTROSC LETT* **2012**, *45*, 225.
- (188) Keighron, J. D.; Ewing, A. G.; Cans, A.-S. *Analyst* **2012**, *137*, 1755.
- (189) Taniguchi, M.; Lindsey, J. *Photochemistry and Photobiology* **2017**, *94*.
- (190) Brouwer, A. *Pure and Applied Chemistry* **2011**, *83*, 2213.
- (191) Charier, S.; Ruel, O.; Baudin, J.-B.; Alcor, D.; Allemand, J.-F.; Meglio, A.; Jullien, L. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43*, 4785.
- (192) *CRC Handbook of Chemistry and Physics. 81st Edition Edited by David R. Lide (National Institute of Standards and Technology). ; American Chemical Society, 2000; Vol. 122.*
- (193) Bretou, M.; Jouannot, O.; Fanget, I.; Pierobon, P.; Larochette, N.; Gestraud, P.; Guillon, M.; Emiliani, V.; Gasman, S.; Desnos, C.; Lennon-Duménil, A.-M.; Darchen, F. *Molecular biology of the cell* **2014**, *25*, 3195.
- (194) Meunier, A.; Fulcrand, R.; Darchen, F.; Collignon, M. G.; Lemaitre, F.; Amatore, C. *Biophysical Chemistry* **2013**, *171*, 84.
- (195) Kölby, L.; Bernhardt, P.; Levin-Jakobsen, A. M.; Johanson, V.; Wängberg, B.; Ahlman, H.; Forssell-Aronsson, E.; Nilsson, O. *British journal of cancer* **2003**, *89*, 1383.
- (196) Wirtz, L.; Kazmaier, U. *European Journal of Organic Chemistry* **2011**, *2011*, 7062.
- (197) Grabner, C. P.; Fox, A. P. *Journal of Neurophysiology* **2006**, *96*, 3082.
- (198) Chen, T. K.; Luo, G.; Ewing, A. G. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3031.

- (199) von Rüden, L.; García, A.; López, M. *FEBS letters* **1994**, *336*, 48.
- (200) Jankowski, J. A.; Finnegan, J. M.; Wightman, R. M. *Journal of Neurochemistry* **1994**, *63*, 1739.
- (201) Borowitz, J. L. *Journal of Cellular Physiology* **1967**, *69*, 311.
- (202) Parekh, D.; Ishizuka, J.; Townsend, C. M.; Haber, B.; Beauchamp, R. D.; Karp, G.; Kim, S. W.; Rajaraman, S.; Greeley, G.; Thompson, J. C. *Pancreas* **1994**, *9*, 83.
- (203) Grabner, C.; Price, S.; Lysakowski, A.; Fox, A. *Journal of Neurophysiology* **2005**, *94*, 2093.
- (204) Amatore, C.; Arbault, S.; Bouret, Y.; Guille, M.; Lemaître, F.; Verchier, Y. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 3087.
- (205) Balaji Ramachandran, S.; Gillis, K. D. *Journal of neuroscience methods* **2019**, *311*, 360.
- (206) Meunier, A.; Bretou, M.; Darchen, F.; Collignon, M. G.; Lemaitre, F.; Amatore, C. *Electrochimica Acta* **2014**, *126*, 74.
- (207) Dubois, L., Université René Descartes - Paris V, 2013, *Design of fluorescent false substrates (FFS) to study vesicular nucleotide transporter and Sialin*.
- (208) Tran, V. S.; Huet, S.; Fanget, I.; Cribier, S.; Henry, J. P.; Karatekin, E. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **2007**, *37*, 55.
- (209) Allersma, M. W.; Wang, L.; Axelrod, D.; Holz, R. W. *Molecular biology of the cell* **2004**, *15*, 4658.
- (210) Allersma, M. W.; Bittner, M. A.; Axelrod, D.; Holz, R. W. *Molecular biology of the cell* **2006**, *17*, 2424.
- (211) Gillis, K. D.; Liu, X. A.; Marcantoni, A.; Carabelli, V. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **2018**, *470*, 97.

- (212) Sudibya, H. G.; Ma, J.; Dong, X.; Ng, S.; Li, L.-J.; Liu, X.-W.; Chen, P. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 2723.
- (213) Huang, Y.; Cai, D.; Chen, P. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 4393.
- (214) Chen, X.; Gao, Y.; Hossain, M.; Gangopadhyay, S.; Gillis, K. *Lab on a chip* **2008**, *8*, 161.
- (215) Gupta, L.; Mansingh, A.; Srivastava, P. K. *Thin Solid Films* **1989**, *176*, 33.
- (216) Hijazi, F., 2010, *Etude des propriétés physiques et de transport dans des films d'ITO et de ZnO (dopé ou non) pour dispositifs optoélectroniques organiques.*
- (217) Mohamed, S. H.; El-Hossary, F. M.; Gamal, G. A.; Kahlid, M. M. *Acta Physica Polonica A* **2009**, *115*, 704.
- (218) Legeay, G., Université Rennes 1, 2011, *Amorphous ITO thin films : characterization, structure, evolution and functionalization under UV radiations.*
- (219) Granqvist, C. G.; Hultåker, A. *Thin Solid Films* **2002**, *411*, 1.
- (220) Hosono, H.; Ohta, H.; Orita, M.; Ueda, K.; Hirano, M. *Vacuum* **2002**, *66*, 419.
- (221) Zudans, I.; Paddock, J. R.; Kuramitz, H.; Maghasi, A. T.; Wansapura, C. M.; Conklin, S. D.; Kaval, N.; Shtoyko, T.; Monk, D. J.; Bryan, S. A.; Hubler, T. L.; Richardson, J. N.; Seliskar, C. J.; Heineman, W. R. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2004**, *565*, 311.
- (222) Guillén, C.; Herrero, J. *Thin Solid Films* **2005**, *480-481*, 129.
- (223) Malathy, V.; Sivaranjani, S.; Vidhya, V. S.; Prince, J. J.; Balasubramanian, T.; Sanjeeviraja, C.; Jayachandran, M. *Journal of Non-Crystalline Solids* **2009**, *355*, 1508.
- (224) Mohamed, S. H.; El-Hossary, F.; Gad, G.; Kahlid, M. M. *Acta Physica Polonica A* **2009**, *115*.

(225) Wang, Y. Y.; Wei, Q. F.; Shao, D. F.; Cai, Y. B.; Yu, L. Y. *Surface Engineering* **2009**, *25*, 531.

(226) Guo, E.-J.; Guo, H.; Lu, H.; Jin, K.; He, M.; Yang, G. *Applied Physics Letters* **2011**, *98*, 011905.

(227) Kaur, M.; Singh, K. *Materials Science and Engineering: C* **2019**, *102*, 844.

(228) Li, Y., Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014, *High-performance electrochemical detection of reactive oxygen/nitrogen species inside microfluidic devices : application for monitoring oxidative stress from living cells.*

(229) Elam, J. W.; Baker, D. A.; Martinson, A. B. F.; Pellin, M. J.; Hupp, J. T. *The Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 1938.

(230) Martínez, M. A.; Herrero, J.; Gutiérrez, M. T. *Solar Energy Materials and Solar Cells* **1992**, *26*, 309.

Liste des Figures

<u>Figure I.1</u> : La synapse chimique	27
<u>Figure I.2</u> : Structures moléculaires de différents neurotransmetteurs endogènes	28
<u>Figure I.3</u> : Schématisation du processus d'exocytose vésiculaire ¹⁴	29
<u>Figure I.4</u> : Complexe SNARE (image adaptée de ¹⁸)	30
<u>Figure I.5</u> : Deux catégories de fusion membranaire (image adaptée de ²³)	31
<u>Figure I.6</u> : Les différentes configurations de patch-clamp (image adaptée de http://research.nki.nl/jalinklab/Homepage%20Phys&ImgGrp%20Patchclamp.htm)	34
<u>Figure I.7</u> : Régimes de diffusion pour une électrode millimétrique et une ultramicroélectrode	36
<u>Figure I.8</u> : Exemple de différentes géométries d'UMEs (image adaptée de ⁴³)	37
<u>Figure I.9</u> : Configuration de détection de l'exocytose sur cellule vivante à l'aide d'une UME en fibre de carbone (Image adapté de ¹⁴)	41
<u>Figure I.10</u> : Exemple de signal obtenu par ampérométrie pour la détection de la cinétique de libération d'une vésicule de sécrétion de cellule BON33	41
<u>Figure I.11</u> : Cinétique de libération du contenu intravésiculaire obtenu par chronoampérométrie ^{14,59}	42
<u>Figure I.12</u> : Comparaison des configurations pour l'épifluorescence (A) et le TIRFM (B)	46
<u>Figure I.13</u> : Exemple de flash de fluorescence obtenu sur cellules BON BC21 par microscopie TIRF (GFP : $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} = 509 \text{ nm}$) ³³	47
<u>Figure I.14</u> : Montage de TIRFM utilisé au laboratoire (image adaptée de ⁸⁶)	48
<u>Figure I.15</u> : Image en obtenue en Microscopie électronique à balayage d'une tumeur BON montrant les granules de sécrétion « dense-core » (en noir ; grossissement x7100) ¹⁰²	51
<u>Figure I.16</u> : Structure secondaire supposée de VMAT2, adaptée de ¹⁰⁷	52

Figure I.17: Les différentes configurations utilisées au laboratoire pour l'étude de l'exocytose ⁸⁶	56
Figure I.18: Exemples de dispositifs utilisés au laboratoire : A) Dispositifs en forme de « lollipop » ⁸⁶ utilisés pour la thèse de Xiaoqing LIU. B) Dispositifs utilisés pendant ce projet de doctorat	56
Figure I.19: Exemple d'événement couplé Ampérométrie-TIRFM sur ITO avec une cellule BON BC21 (électrochimie : détection de sérotonine à $E = + 650 \text{ mV vs Ag/agCl}$; TIRFM : détection de GFP ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emi}} = 509 \text{ nm}$)) ¹¹⁸	57
Figure I.20: Structures moléculaires des marqueurs neuronaux APP ⁺ , NeuO et d-HT	60
Figure I.21 : Structure moléculaire du β -bloquant RCTM-3	61
Figure I.22: Schématisation du mode d'obtention des adduits fluorescents (image adaptée de ¹³²)	61
Figure I.23: Structures moléculaires des marqueurs ES517, NS521 et NS510	63
Figure I.24 : Internalisation vésiculaire de la Dopamine et des FFNs par VMAT2 ¹⁴¹	64
Figure I.25 : Bases moléculaires générant la fluorescence pour les FFNs	65
Figure I.26: Structures moléculaires de quelques FFNs	67
Figure I.27 : Elaboration de nouvelles structures de FFNs pour le suivi de l'exocytose par détection couplée Electrochimie-Microscopie de Fluorescence	70
Figure II.1: Structure chimique de la molécule FFN21	74
Figure II.2: Spectres d'émission de fluorescence ($\lambda_{\text{em}} = 474 \text{ nm}$) et d'absorption UV-vis ($\lambda_{\text{ex}} = 393 \text{ nm}$) obtenus pour $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de composé FFN21 dissous en solution de PBS ($\text{pH} = 7,4$)	75
Figure II.3: Voltammogramme obtenu pour $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN21 en milieu PBS ($\text{pH} = 7,4$) sur UME en fibre de carbone ($d = 10 \mu\text{m}$) à 50 mV.s^{-1} . $E_i = -0,2 \text{ V vs Ag/AgCl}$.	76
Figure II.4 : Structure moléculaire du composé FFN132	78
Figure II.5 : Voltammogramme obtenu pour $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN132 en milieu PBS ($\text{pH} = 7,4$) sur UME en fibre de carbone ($d = 10 \mu\text{m}$) à 100 mV.s^{-1} . $E_i = -0,2 \text{ V vs Ag/AgCl}$	78
Figure II.6 : Spectres d'émission de fluorescence ($\lambda_{\text{em}} = 423 \text{ nm}$) et d'absorption UV-vis ($\lambda_{\text{ex}} = 344 \text{ nm}$) obtenus pour $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de composé FFN132 dissout en solution de PBS ($\text{pH} = 7,4$)	79

Figure II.7 : Structure moléculaire de la sonde FFN42	80
Figure II.8 : Voltammogramme obtenu pour 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN42 en milieu PBS (pH = 7,4)	81
Figure II.9 : Succession de 4 cycles consécutifs obtenus en voltammétrie cyclique sur CFE pour une solution de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN42, PBS (pH = 7,4) à une vitesse de 200 mV.s^{-1} . $E_i = -0,2 \text{ V vs Ag/AgCl}$	83
Figure II.10 : Superposition des voltammogrammes obtenus sur CFE pour 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de FcMeOH en milieu PBS (pH = 7,4) à une vitesse de 100 mV.s^{-1} , avant et après immersion en solution de FFN42. $E_i = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}$	84
Figure II.11 : Exemple de voltammogramme obtenu pour 75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN42 dissous dans du PBS (pH = 7,4) sur une électrode de carbone vitreux ($d = 1 \text{ mm}$) à 200 mV.s^{-1} . $E_i = 0,0 \text{ V vs ECS}$	86
Figure II.12 : Exemple de voltammogramme obtenu pour 75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN42 dissous dans une solution de PBS (pH = 7,4) sur une électrode tournante de carbone vitreux ($d = 3\text{mm}$) ($\omega = 5000 \text{ rpms}$ et $v = 200 \text{ mV.s}^{-1}$). $E_i = 0,0 \text{ V vs ECS}$	87
Figure II.13 : A) Voltammogrammes obtenus pour une solution de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN42 dissous dans du PBS, à différents pH pour une vitesse de balayage de 200 mV.s^{-1} . $E_i = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}$	88
Figure II.14 : Superposition des voltammogrammes obtenus pour 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'Esculetine (en rouge) et de FFN42 (en noir) en solution de PBS (pH = 7,4), à 100 mV.s^{-1} . $E_i = -0,2\text{V vs Ag/AgCl}$	89
Figure II.15 : Valeurs de potentiels de pic anodiques obtenus pour l'oxydation de FFN102, par voltammétrie cyclique en fonction du pH ¹⁶⁸	90
Figure II.16 : Processus d'oxydation supposé pour FFN42	90
Figure II.17 : Structure moléculaire du catéchol	91
Figure II.18 : Schéma carré possible du processus d'oxydation de FFN42	92
Figure II.19 : Superposition des voltammogrammes obtenus pour une solution de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN42 en solution de PBS (pH = 7,4) sur fibre de carbone, pour différentes vitesses de balayage.	93
Figure II.20 : A) : $I_{pa} = f(v)$; B) : $I_{pa} = f(v) 0.5$ pour 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN42 dissous en solution de PBS (pH = 7,4)	93

- Figure II.21** : Spectres d'émission de fluorescence ($\lambda_{em} = 470$ nm) et d'absorption UV-vis ($\lambda_{ex} = 380$ nm) obtenus pour $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN42 dissous en solution (pH = 7,4) **95**
- Figure II.22** : Spectres d'émission de fluorescence ($\lambda_{em} = 456$ nm) et d'absorption UV-vis ($\lambda_{ex} = 371$ nm) obtenus pour $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN102 dissous en solution de PBS (pH = 7,4)¹⁵⁶ **96**
- Figure II.23** : Spectres d'émission de Fluorescence obtenus pour $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN42 dissous en solution de PBS pour différents pH **96**
- Figure II.24** : Structure moléculaire de l'ombelliférone **98**
- Figure II.25** : A. Spectres d'émission de Fluorescence obtenus pour la molécule FFN42 en milieu acétonitrile/tampon phosphate (50/50 v/v) pour différentes concentrations. B. Spectres d'émission de fluorescence intégrés en fonction de la concentration en FFN42 **99**
- Figure II.26** : pKas des trois sites de protonation de FFN42 **100**
- Figure II.27**: Images obtenues en épifluorescence pour des cellules BON N13, ayant internalisées différentes concentrations en FFN42 (période d'incubation de 20 min) (A) et pour différentes périodes d'incubation (concentration en FFN 42 de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$) (B) (Échelle $10 \mu\text{m}$) **102**
- Figure II.28**: Images obtenues en épifluorescence pour des cellules PC12, ayant internalisées différentes concentrations en FFN42 (période d'incubation de 30 min) (A) et pour différentes périodes d'incubation (concentration en FFN42 de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$) (B) (échelle $5 \mu\text{m}$) **103**
- Figure II.29**: Tests de toxicité effectués sur cellules BON N13 ayant préalablement internalisé $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN42 durant une période d'incubation de 20 minutes : a. Image obtenue en lumière blanche b. Image obtenue en épifluorescence (filtre GFP/vert) c. Image obtenue en épifluorescence (filtre Rhod/rouge) (échelle $10 \mu\text{m}$) **104**
- Figure II.30**: Tests de toxicité effectués sur cellules BON N13 sans internalisation préalable de FFN42 : a. Image obtenue en lumière blanche b. Image obtenue en épifluorescence (filtre GFP/vert) c. Image obtenue en épifluorescence (filtre Rhod/rouge) (échelle $10 \mu\text{m}$) **105**
- Figure II.31** : Structure moléculaire du composé FFN145 **107**
- Figure II.32** : Voltammogramme obtenu pour $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN145 en milieu PBS (pH = 7,4) sur électrode en fibre de carbone ($d = 10 \mu\text{m}$) à 200 mV.s^{-1} . $E_i = -0,2 \text{ V}$ vs Ag/AgCl **107**

Figure II.33 : Spectres d'émission de fluorescence ($\lambda_{em} = 455 \text{ nm}$) et d'absorption UV-vis ($\lambda_{ex} = 345 \text{ nm}$) obtenus pour $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN145 dissous en solution de PBS ($\text{pH} = 7,4$)	108
Figure II.34 : Structure moléculaire du composé FFN122	109
Figure II.35 : Voltammogramme obtenu pour $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN122 en milieu PBS ($\text{pH} = 7,4$) sur électrode en fibre de carbone ($d = 10 \mu\text{m}$) à 50 mV.s^{-1} . $E_i = -0,2 \text{ V}$ vs Ag/AgCl	110
Figure II.36 : Spectres d'émission de fluorescence ($\lambda_{em} = 471 \text{ nm}$) et d'absorption UV-vis ($\lambda_{ex} = 388 \text{ nm}$) obtenus pour $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN122 dissous en solution de PBS ($\text{pH} = 7,4$)	111
Figure II.37 : Image obtenue en épifluorescence pour des cellules BON N13, incubées pendant une durée de 20 minutes avec $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN122 (échelle $10 \mu\text{m}$). (A. sans modification de contraste B. Diminution du contraste de l'image d'un facteur 5)	112
Figure III. 1 : Exemple de chronoampérogramme obtenu après stimulation à l'ionomycine ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) sur cellule BON N13 isolée et ayant internalisé la molécule FFN42 ($20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pendant 20 minutes)	119
Figure III.2 : Exemple de pic ampérométrique isolé (et ses trois paramètres $t_{1/2}$, Q et I_{max}) obtenu sur cellule BON N13 unique ayant préalablement internalisé FFN42 ($20 \mu\text{mol.L}^{-1}$)	120
Figure III.3 : Exemple de chronoampérogramme obtenu après stimulation au potassium K^+ (55 mmol.L^{-1}) sur cellule BON N13 unique, ayant internalisé la molécule FFN42 ($20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pendant 30 minutes)	123
Figure III.4 : Observation des cellules BON N13 ayant préalablement internalisé FFN42	125
Figure III.5 : Premier exemple d'évolution de l'intensité de fluorescence d'une vésicule de sécrétion individuelle (indiquée par le cercle orange sur les images obtenues en microscopie TIRF – échelle 500 nm) en fonction du temps lors d'une stimulation par une solution d'ionomycine et d'une exposition au laser $\lambda = 405 \text{ nm}$	127
Figure III.6 : Second exemple d'évolution de l'intensité de fluorescence d'une vésicule de sécrétion individuelle (indiquée par le cercle orange sur les images obtenues en microscopie TIRF – échelle 500 nm) en fonction du temps lors d'une stimulation par une solution d'ionomycine et d'une exposition au laser $\lambda = 405 \text{ nm}$	130
Figure IV.1 : Etapes de lithographie pour la réalisation du dispositif précédemment utilisé au laboratoire	136

Figure IV.2: Masque du futur dispositif réalisé grâce au logiciel « Clewin »	138
Figure IV.3: Etapes de lithographie optique pour la réalisation du dispositif d'ITO employé dans le cadre de ce doctorat	139
Figure IV.4: Valeurs de résistances obtenues pour différents plateaux de températures	143
Figure IV.5: Exemple de puits obtenu par impression 3D (A.) et de puits en PDMS (B.)	144
Figure IV.6 : Schéma des dispositifs d'ITO élaborés au laboratoire	145
Figure IV.7 : Profil et topographie de l'ITO déposé par pulvérisation cathodique	146
Figure IV.8: Profil et topographie du dépôt ITO + platine, obtenu par pulvérisation cathodique	146
Figure IV.9 : Spectres de transmission (A.) et d'absorption (B.) du dépôt d'ITO	147
Figure IV.10 : Voltammogramme obtenu pour 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de FFN42 en milieu PBS (pH = 7,4) sur électrode d'ITO à 200 mV.s^{-1} . ($E_i = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}$)	148
Figure IV.11: Etude du saut de courant observé en fonction des différents potentiels d'oxydation appliqués pour les 5 puissances du laser à 405 nm	149
Figure IV.12 : Etude du saut de courant observé, pour un potentiel de 450 mV vs Ag/AgCl en fonction des différentes puissances du laser à 405 nm	150
Figure IV.13: Exemple de chromatogramme obtenu lors de l'imposition du laser à 405 nm pour une puissance de 1,40 mW et pour un potentiel de + 450 mV vs Ag/AgCl	151
Figure IV.14 : Voltammogrammes obtenus pour le ferrocène méthanol ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en milieu PBS pH = 7,4 pour une vitesse de balayage de 20 mV.s^{-1}) ($E_i = 0,0\text{V vs Ag/AgCl}$)	153
Figure IV.15: Croissance des cellules BON N13 sur les nouveaux dispositifs d'ITO élaborés	154
Figure IV.16 : Images de cellules BON N13 ayant internalisé FFN42, obtenues en TIRFM ($\lambda = 405 \text{ nm}$) (échelle 10 μm) A. Cellule sur ITO B. Cellule sur Verre et ITO	155
Figure E.1 : Première voie de synthèse permettant l'obtention du composé FFN21	165
Figure E.2 : Mécanisme de cyclisation impliqué lors de la première voie de synthèse	166
Figure E.3: Seconde voie de synthèse permettant l'obtention des composés FFN132, FFN145, FFN122 et FFN42	166

Figure E.4 : Mécanisme de cyclisation impliqué lors de la seconde voie de synthèse	167
Figure E.5 : Structure moléculaire du 5-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-oxopentanoate de méthyle	168
Figure E.6 : photographie de la micro-étireuse verticale. Le capillaire contenant la fibre de carbone est localisé en haut à gauche.	180
Figure E.7 : Photographie du montage de polymérisation des ultramicroélectrodes de carbone	181
Figure E.8 : Photographie de l'extrémité d'une ultramicroélectrode de carbone polymérisée (les bulles indiquent la bonne qualité de la réticulation)	181
Figure E.9 : Photographie du montage de polissage d'une UME de carbone	182
Figure E.10 : Voltammogrammes ($100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$) obtenus pour une solution de $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de ferrocène-méthanol (en milieu PBS ($\text{pH} = 7,4$) pour des CFEs avec le contact électrique réalisé à l'aide de mercure (courbe bleue) et un contact électrique effectué avec du galinstan (courbe rouge) ($E_i = -0,2\text{V}$ vs Ag/AgCl)	183
Figure E.11 : Façonnage du puits de PDMS	184
Figure E.12 : Capillaire de stimulation (x40)	188
Figure E.13 : Configuration expérimentale pour les expériences de détection ampérométrique	189
Figure E.14 : CFE et capillaire de verre placés au dessus de cellules BON N13 (x20)	190

Liste des Tableaux

<u>Tableau II.1:</u> Liste des potentiels d'oxydation de différents neurotransmetteurs sur fibre de carbone	82
<u>Tableau II.2:</u> Tableau récapitulatif des différentes caractéristiques physico-chimiques des molécules étudiées dans ce chapitre et de FFN102 (thèse Xiaoqong LIU 2012-2016 au laboratoire)	113
<u>Tableau III.1:</u> Caractéristiques des pics ampérométriques obtenus pour la sérotonine, FFN102 et FFN42	121
<u>Tableau IV.1:</u> Tableau répertoriant les paramètres de dépôt du Ti-primer	137
<u>Tableau IV.2:</u> Paramètres de dépôt de l'ITO sur lamelles de verres lithographiées	140
<u>Tableau IV.3 :</u> Paramètres de dépôt du Platine sur lamelles de verres lithographiées	141
<u>Tableau IV.4:</u> Paramètres de dépôt de l'électrode d'Argent sur lamelles de verres lithographiées	142
<u>Tableau IV.5:</u> Comparaison des caractéristiques du nouveau dispositif mis au point, par rapport à celui précédemment utilisé au laboratoire	156
<u>Tableau E.1 :</u> Récapitulatif des différents constituants de la solution de Locke x10	172
<u>Tableau E.2 :</u> Préparation des solutions de Calcium et de Magnésium	172
<u>Tableau E.3 :</u> Préparation de la solution de Lockex1 supplémentée en Ca^{2+} et Mg^{2+}	172
<u>Tableau E.4:</u> Préparation de la solution d'ionomycine à partir d'une solution de Locke x1 supplémentée en Ca^{2+} et Mg^{2+}	173
<u>Tableau E.5:</u> Préparation de la solution d'ionomycine à partir d'une solution de Locke x10 non supplémentée au préalable en $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ et HEPES	173
<u>Tableau E.6:</u> Tableau récapitulatif des différents sels utilisés pour la préparation de la solution de $\text{K}^+ / \text{Ca}^{2+}$	174
<u>Tableau E.7 :</u> Tableau récapitulatif des concentrations et volumes à prélever des différentes solutions mères pour la préparation de la solution de $\text{K}^+ / \text{Ca}^{2+}$	174

Résumé

L'exocytose vésiculaire constitue un mécanisme fondamental impliqué lors de la neurotransmission ou la libération d'hormones dans le sang. Son principe repose sur la fusion d'organites cellulaires (vésicules sécrétrices contenant des biomolécules) avec la membrane plasmique, afin de libérer leur contenu au sein du milieu extracellulaire. Depuis une dizaine d'années, la mise en place d'une détection couplée de ce mécanisme sur cellule unique a suscité un fort intérêt au sein de la communauté scientifique. Elle implique notamment le couplage de l'Ampérométrie sur ultramicroélectrodes et de la Microscopie de Fluorescence par Réflexion Totale Interne (TIRFM), à l'aide de l'utilisation d'un matériau d'ITO (Oxyde d'Indium dopé à l'Étain) transparent et conducteur. Cependant, l'acquisition d'événements couplés s'accompagne de la présence d'événements dit « orphelins » (pic ampérométrique sans signal fluorescent correspondant et inversement), ce qui soulève des interrogations quant au choix des sondes utilisées. Dans le cadre de cette thèse, de nouvelles sondes électro-fluorescentes, de la famille des « Faux Neurotransmetteurs Fluorescents » (FFNs) ont été développées et synthétisées au nombre de cinq. Une optimisation rationnelle de leur structure a été menée afin d'obtenir *in fine* une molécule aux caractéristiques électrochimiques et fluorescentes adaptées à la détection couplée et appelée FFN42. Les propriétés physico-chimiques (pKas des trois fonctions acides de la structure), électrochimiques (potentiel de détection d'oxydation sur carbone et ITO, comportement électrochimique) et optiques (rendement quantique, coefficient d'extinction molaire, brillance), de cette sonde ont été étudiées. Son aptitude à être internalisée par les vésicules sécrétrices de cellules PC12 et BON N13 a également été attestée. De plus, l'utilisation de FFN42 comme sonde unique optique et électrochimique pour le suivi d'évènements exocytotiques au sein de cellules BON N13 a été validée par ampérométrie sur fibre de carbone et par microscopie TIRFM séparément. Par ailleurs, un dispositif d'ITO, réutilisable et possédant les caractéristiques optiques et électriques adaptées pour la détection couplée a également été élaboré durant cette thèse. Des expériences couplées seront à effectuer à l'avenir, afin de corrélérer les informations obtenues par l'intermédiaire de ces deux techniques analytiques complémentaires, dans le but de mettre en évidence certaines propriétés du phénomène exocytotique.

Mots-clés : exocytose – faux neurotransmetteurs fluorescents – ampérométrie – microscopie de fluorescence par réflexion totale interne – ultramicroélectrodes – oxyde d'indium dopé à l'étain

Abstract

Vesicular exocytosis is a ubiquitous biological pathway involved in neurotransmission or hormones release in blood. Its principle is based on the fusion of cellular organelles (secretory vesicles containing biomolecules) with cellular membrane, in order to release their content within the extracellular medium. Over the last decade, some investigations were focused on the coupled detection involving amperometry on ultramicroelectrodes and "Total Internal Fluorescence Microscopy" (TIRFM) on conductive and transparent ITO (Indium Tin Oxide) electrodes. However, the recording of coupled events also evidenced the appearance of "orphan" events (amperometric spike without corresponding fluorescent signal or the opposite). It thus raises the question of the choice of the appropriate probe. In the context of this PhD, five new electrofluorescent probes, belonging to "Fluorescent False Neurotransmitters" (FFNs) family, were developed and synthesized. In addition, a rational optimization of the structure of these FFNs has been achieved to obtain a molecule, named FFN42, with electrochemical and fluorescence characteristics that seem adapted to the coupled detection set up in our laboratory. The analytical properties of this probe have been studied (pKas of the three acidic functions of the structure, oxidation detection potential on carbon and ITO, electrochemical behavior, quantum yield, molar extinction coefficient, brightness), as well as its ability to be internalized by different cells models : PC12 and BON N13. In addition, the use of FFN42 as a single optical and electrochemical probe for monitoring exocytotic events has been validated (by amperometry on carbon fiber electrode and by TIRFM microscopy separately) on BON N13 cells. Otherwise, a new ITO device was also developed, which is reusable and owns the appropriate (optical and electrical) characteristics for the coupling detection. Coupled experiments will be carried out in the future, in order to correlate the information obtained through these two complementary analytical techniques, in order to highlight certain properties of the exocytotic phenomenon.

Keywords: exocytosis – fluorescent false neurotransmitters – amperometry – total internal fluorescence microscopy – ultramicroelectrodes – indium tin oxide