HAL
open science

Complexes métalliques pour la reconnaissance de phospholipides d'intérêt biologiques

Phoulinh Chanthavong

To cite this version:

Phoulinh Chanthavong. Complexes métalliques pour la reconnaissance de phospholipides d'intérêt biologiques. Chimie inorganique. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2021. Français. NNT : 2021GRALV046 . tel-04054729

HAL Id: tel-04054729

https://theses.hal.science/tel-04054729

Submitted on 1 Apr 2023

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Chimie inorganique et bio inorganique**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Phoulinh CHANTHAVONG

Thèse dirigée par **Catherine BELLE, Directrice de recherche, CNRS** et
co-encadrée par **Angéline VAN DER HEYDEN, Maître de conférence, UGA**

préparée au sein du **Département de chimie moléculaire**
dans **l'École Doctorale Chimie et Science du Vivant**

Complexes bimétalliques pour la reconnaissance de phospholipides d'intérêts biologiques

Thèse soutenue publiquement le **01 octobre 2021,** devant le jury composé de :
Monsieur, Olivier, SENEQUE
Directeur de recherche, CNRS délégation Alpes, Président
Madame, Katalin, SELMECZI
Maître de conférence, Université de Lorraine, Rapporteure
Monsieur, Wilfrid, BOIREAU
Directeur de recherche, CNRS délégation Centre-Est, Rapporteur
Madame, Aurélie, BOUCHET-SPINELLI
Maître de conférence, Université Grenoble Alpes, Examinatrice
Monsieur, Benoît, COLASSON
Professeur des universités, Université de Paris, Examinateur
Madame, Catherine, BELLE
Directrice de recherche, CNRS délégation Alpes, Directrice de thèse
Madame, Angéline, VAN DER HEYDEN
Maître de conférence, Université Grenoble Alpes, Co-encadrante de thèse et membre invité

Pour ma mère,

REMERCIEMENTS

dans le TGV pour Paris, le 15/07/2021 à 13h55, update 04/10/2021

Flashback, je me revois passer ce portique du bâtiment Nanobio, m'asseoir sur un fauteuil et boire un chocolat chaud, en attendant de rencontrer une de mes encadrantes avec un sentiment de stress et d'excitation, un lundi 2 octobre 2017, mon premier jour de thèse. Depuis ce jour, beaucoup de choses se sont passées et je me rends compte que j'arrive bientôt au bout puisque vous tenez ce manuscrit entre vos mains. Il est le fruit de trois années (plus un prolongement du covid) passées entre les équipes Chimie Inorganique REdox (CiRE) et Ingénierie et Interactions BioMoléculaires (I2BM) du Département de Chimie Moléculaire (DCM) de Grenoble. Avant de commencer votre lecture, j'aimerais remercier quelques personnes qui comptent pour moi.

Tout d'abord, je tiens à remercier chaleureusement les membres du Jury : Mesdames Katalin Selmeczi, Aurélie Bouchet-Spinelli et Messieurs Wilfrid Boireau, Olivier Sénèque, Benoît Colasson pour avoir accepté d'examiner ou rapporter ce travail.

Ensuite, tout cela n'aurait pas été possible sans ma directrice de thèse Catherine Belle et ma co-encadrante Angéline Van Der Heyden. Merci pour tout, merci de m'avoir poussé, aidé, écouté, (engueulé parfois aussi 😊) et pour votre disponibilité. Je vous en serais éternellement reconnaissant. Vous êtes de vraies belles personnes et j'espère que vous garderez un bon souvenir de votre étudiant.

Coach Aurore, je ne t'oublie évidemment pas; merci de m'avoir soutenu pendant ces années (#hautslescoeurs) et d'avoir relu ce manuscrit à plusieurs reprises.

Coach Gisèle, je n'aurais pas soutenu avant que tu partes à la retraite malheureusement mais je tenais également à te remercier spécialement pour avoir toujours été disponible pour nous les étudiants et pour les synthèses que tu

as effectué sur ce projet. Je me souviendrais longuement de toutes les conversations que nous avons pu avoir.

Mes remerciements vont aussi à Liliane Guerente et Jérôme Dejeu qui ont toujours été présents afin de répondre à mes interrogations concernant les études en surface à nanobio.

Je tenais également à remercier tout le personnel du DCM que j'ai pu côtoyer ces quatre années et plus spécialement certains étudiants qui ont égayé mes années : Clarisse, Damien, Richard, Vianney (esquimaux), Baptiste, Romain, Zak, Elarbi, Romy (<3), Laure (je m'excuse pour toutes les taquineries, mais faut avouer que c'était drôle), Laura, Sparta, Valentine, Mathieu, Noémie, Claire, Laury-Anne, Flo, Justin, Deborah (parce qu'elle a dit qu'elle me taperait si je ne la citais pas), Anastasia, Marie y Lorna. Je vous souhaite bon courage et de belles réussites pour vos projets futurs.

Merci également à mes camarades doctorants Lucas, Rémi, Katia et Benoît avec qui nous avons suivi un master de management des entreprises à l'IAE en parallèle de notre thèse. On aura formé une belle bande.

Après la thèse, un nouveau chapitre va commencer, mais je n'oublie pas le précédent. Je tiens à exprimer ma gratitude auprès de mes précédents professeurs et encadrants Diana Over, Olivia Reinaud, Benoît Colasson, Delphine Onidas, Jalila Simaan, Olga Iranzo et Marius Réglier.

J'ai presque fini promis, un proverbe dit « loin des yeux, loin du cœur » (ou l'inverse, mais considérez que ce que j'ai mis est correct) ; apparemment ce n'est pas vrai pour certaines amitiés. Un petit tour pour remercier mes camarades de master avec qui nous avons déjà vécu beaucoup de choses ma sœur Sarah et mes frères Maxime et Saïd. Je n'oublie évidemment pas les amitiés de longues dates, Alexandre C., Jonathan, Justin, Geoffrey, Thibaut, Pierre, Lina, Céline, Cristina (influenceuse de chez wish), Laura S., Phillipine, Mélanie, Camille, Ariane, Alexandre H., Eugénie, Romain, Guillaume et Wilford (les deux derniers sont nuls à fifa).

Enfin, je finirais par les personnes les plus importantes à mes yeux : mes parents, très proches de moi, je vous remercie pour tous les sacrifices que vous avez fait pour moi et je suis conscient que grâce à vous, depuis tout petit, je n'ai jamais manqué de rien. Vous êtes des exemples de persévérance et de réussite et j'espère pouvoir vous avoir à mes côtés le plus longtemps possible.

J'espère n'avoir oublié personne et je vous souhaite une bonne lecture.

Phoulinh

ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AFM : Microscope à force atomique, dit *Atomic Force Microscopy*
ARN : Acide Ribonucléique
AVC : Accident Vasculaire Cérébral
BOC : *tert*-butoxycarbonyle
cAPOs : Corps Apoptotiques
CD : Centrifugation Différentielle
CF : Cytométrie en flux
CMC : Concentration Micellaire Critique
CTAD : Citrate de sodium
DLS : Diffusion dynamique de la lumière, dit *Dynamic Light Scattering*
DPA : Dipicolylamine
DHPC : 1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DHPS : 1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphoserine
DOPC : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DOPS : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phopspho-L-serine
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EXOs : Exosomes
EMVs : Microvésicules d'origine endothéliales
FT : Facteur tissulaire
GC : Gradient de densité
HATU : Hexafluorophosphate de -diméthlamino)-N,N-diméthyl(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-yloxy)méthanininium
IC : Immunocapture
ISEV : Société Internationale des Vésicules Extracellulaires
MVB : Corps multivésiculaires, dit *Multi Vesicular Bodies*
MVs : Microvésicules
NTA : Analyse du suivi individuel de particules, dit *Nanoparticle Tracking Analysis*
PC : Phosphatidylcholine
PE : Phosphatidyléthanolamine
PFP : Plasma dépourvu en plaquettes, dit *Platelet Free Plasma*
PMVs : Microvésicules issues de plaquettes
PPi : Pyrophosphate
PS : Phosphatidylsérine
ROS : Espèces réactives de l'oxygène, dit *Reactive Oxygen Species*
RU : Response Unit
SEC : Chromatographie d'exclusion stérique
TEM : Microscopie électronique à transmission, dit *Transmission Electron Microscopy*
TFA : Acide TriFluoroAcétique
TRPS : Détection d'impulsions résistives accordable, dit *Tunable Resistive Pulse Sensing*
VEs : Vésicules Extracellulaires
WB : Western Blot (Chap 1) – Working Buffer (Chap 3)

GLOSSAIRE

Angiogenèse : processus impliquant la formation et la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins.

Cellules endothéliales : tapissent la couche interne des vaisseaux sanguins : l'endothélium dont le rôle est de retenir le sang dans les vaisseaux sanguins, contrôler la coagulation et la vasomotricité.

Cellules épithéliales : cellules spécialisées composant l'épithélium (couche de cellules tapissant les organes creux et les glandes).

Cellules hématopoïétiques : cellules à l'origine de toutes les lignées de cellules sanguines.

Cellules monocytaires : un type de globule blanc (leucocytes) dont le rôle est de protéger l'organisme contre les bactéries, les virus, les parasites, les cellules tumorales; plus précisément ils vont présenter les antigènes aux lymphocytes et sont également responsables de la phagocytose.

Coagulation sanguine : mécanisme aboutissant à la formation de caillots sanguins.

Fibrillation atriale : fréquence cardiaque irrégulière et souvent très rapide.

Endocytose : processus au cours duquel la membrane d'une cellule enveloppe et absorbe une particule.

Erythrocytes : aussi appelé hématie ou globules rouges ; avec des rôles variés comme le transport d'oxygène ou la régulation du pH sanguin par exemple.

Exosomes : vésicules sécrétées par la cellule après fusion de corps multivésiculaires endosomal avec la membrane plasmique.

Facteur tissulaire : glycoprotéine transmembranaire qui est le principal responsable de l'activation des cascades de la coagulation sanguine en cas de rupture vasculaire.

Leucocytes : ou globules blancs proviennent de la moëlle osseuse et jouent un rôle important dans la réponse immunitaire.

Microvésicules : vésicules sécrétées par la cellule après bourgeonnement de la membrane plasmique et exposition de la phosphatidylsérine sur le feuillet externe de la membrane.

Plaquettes sanguines : cellules sans noyau provenant de la moëlle osseuse et jouant un rôle essentiel dans la coagulation.

Prothrombinase : complexe enzymatique capable en présence de calcium, de transformer la prothrombine et thrombine.

Prothrombine : protéine de la coagulation, précurseur de la thrombine.

Thrombine : produit de de la prothrombine ; joue un rôle dans la cascade de signalisation de la coagulation.

SOMMAIRE

CHAPITRE 1 : ETAT DE L'ART 18
1. Introduction générale 19
1.1. Composition d'une cellule et de la membrane plasmique 19
1.1.1. La cellule 20
1.1.2. La membrane plasmique 21
1.2. Description des vésicules extracellulaires (VEs) 23
1.2.1. Les microvésicules (MVs) 24
1.2.1.1. Généralités 24
1.2.1.2. Biogenèse 26
1.2.1.3. Composition moléculaire des MVs 28
1.2.1.4. Fonctions et pathologies impliquant les MVs 30
1.2.1.5. Rôles des MVs en tant que biomarqueurs 34
1.2.1. Les exosomes (EXOs) 35
1.2.1.1. Généralités 35
1.2.2.2. Biogénèse 36
1.2.2.3. Composition moléculaire des EXOs 37
1.2.2.4. Fonctions et pathologies impliquant des EXOs 38
1.2.3. Les corps apoptotiques (cAPOs) 39
1.2.3.1. Généralités 39
1.2.3.2. Biogenèse 39
1.2.3.3. Composition moléculaire des cAPOs 40
1.3. Communication intercellulaire 40
1.4. Elimination des VEs 41
1.5. Résumé des caractéristiques des VEs 43
2. Méthodes d'isolement, de détection et de caractérisation 44
2.1. Aspect pré-analytique 45
2.1.1. Centrifugation différentielle (CD) 46
2.1.2. Ultracentrifugation sur gradient de densité (GC) 49
2.1.3. Filtration et chromatographie d'exclusion 49
2.1.4. Immuno-affinité 51
2.1.5. Précipitation 52
2.1.6. Résumé et tableau comparatif des techniques d'isolement des VEs 53

2.2. Aspect analytique 55
2.2.1. Principales techniques immunologiques utilisées dans la caractérisation de VEs 55
2.2.2. Méthodes optiques 57
2.2.3. Méthodes microscopiques 60
2.2.4. Autres méthodes 62
2.2.5. Résumé et tableau récapitulatif des techniques utilisées pour la caractérisation des VEs 62
3. Objectifs du projet de thèse 63
CHAPITRE 2 : SYNTHESES ET ETUDES D'INTERACTIONS EN SOLUTION 68
1. Utilisation des complexes bimétalliques pour la reconnaissance de composés anioniques 69
1.1. Généralités 69
1.2. La dipicolylamine (DPA), un ligand connu 69
1.3. De la DPA à la phosphatidylsérine et choix structural 72
2. Synthèse et études de reconnaissance de la phosphatidylsérine avec les complexes basés sur les ligands de type DPA (1ère série) 79
2.1. Synthèse des ligands CC-DPA et LC-DPA (1ère série) 79
2.2. Préparation des complexes dinucléaires de Cu(II) ou Zn(II) 80
2.3. Caractérisation des complexes de Zn(II) 82
2.3.1. ESI-MS et RMN 82
2.3.2. Etudes en fonction du pH 84
2.4. Caractérisation des complexes de Cu(II) 86
2.4.1. Caractérisation des formes µ-OH 87
2.4.2. Spectroscopie UV –Vis 89
2.4.3. Spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique (R.P.E.) 93
2.5. Etudes par RMN ^{31}P des interactions avec des phospholipides modèles 95
2.5.1. En milieu tamponnée 96
2.5.2. En milieu DMSO 100
3. Synthèse et études de reconnaissance de la phosphatidylsérine avec le complexe basé sur le ligand à motif quinoline (2ème série) 103
3.1. Choix structural 103
3.2. Synthèse du ligand LC-PyQy (2ème série) 105
3.3. Préparation des complexes dinucléaires de Zn(II) – 2ème série 107
3.4. Caractérisation du complexe Zn(II) – 2ème série par RMN 110
3.5. Etudes des interactions par spectroscopie UV-Vis et fluorescence 111

3.5.1. O-phospho-L-sérine 111
3.5.2. SUVs PC et SUVs PC/PS 112
3.5.3. Microvésicules 113
4. Conclusion 115
CHAPITRE 3 : ETUDES DES INTERACTIONS COMPLEXES -MICROVESICULES SUR SUPPORTS SOLIDES 118
1. Introduction 119
2. Généralités sur les interactions biomoléculaires 120
2.1. Introduction 120
2.2. Paramètres thermodynamiques et cinétiques d'une interaction biomoléculaire 120
2.3. Méthodes de détermination des paramètres thermodynamiques et cinétiques des interactions biomoléculaires 122
2.3.1 L'isotherme de Langmuir 122
2.3.2 La représentation de Scatchard 124
2.3.3 Modèle cinétique dans le cas d'une interaction monovalente 125
3. Plan d'étude des interactions entre complexes bimétalliques et la phosphatidylsérine sur surface 127
4. Principes des techniques de caractérisation de surface et d'interface 128
4.1. La résonance plasmonique de surface (SPR) 128
4.2. L'interférométrie de bicouche (BLI) 131
4.3. Comparatif SPR et BLI 133
4.4. Immobilisation covalente sur surface des complexes bi-nucléaires 134
4.4.1. Généralités 134
4.4.2. Capteurs utilisés en BLI 135
4.4.3. Surfaces utilisées en Biacore 135
4.4.3.a. Le greffage sur polymère 136
4.4.3.b. Les monocouches auto-assemblées (SAMs) 136
5. Caractérisation de l'interaction entre M^{2+}-DPA/PS par SPR 138
5.1. Généralités : études SPR mettant en jeu des systèmes vésiculaires 138
5.2. Etudes avec les phospholipides à chaînes courtes 140
5.2.1. Etape d'immobilisation 140
5.2.2. Tests d'interactions 142
5.2.3. Caractérisations des interactions 144
5.3. Etudes sur vésicules modèles 147
5.3.1. immobilisation des complexes sur SAM 148

5.3.2. résultats d'immobilisation sur SAM 148
5.3.3. tests d'interaction dans WB 149
5.3.4. Interaction dans WB-BSA 151
5.3.5. Cinétique dans WB-BSA + 10 mM Ca^{2+} 154
5.4. Etudes sur microvésicules isolées à partir de plasma 156
6. Caractérisation de l'interaction entre M^{2+}LC-DPA/PS par BLI 158
6.1. Capteurs AR_2G 158
6.1.1. résultats d'immobilisation 159
6.1.2. tests d'interaction dans WB et dans WB-BSA 159
6.2. Capteurs SA 161
6.2.1. test de reconnaissance de SUVs sur capteurs nu et fonctionnalisé avec l'AV 161
6.2.2. Synthèse et complexation du ligand biotinylé CC-DPA 162
6.2.3. Tests d'interactions des SUVs avec complexe Zn^{2+}CCBiot-DPA sur capteurs SA 163
7. Conclusion 164
CONCLUSION ET PERSPECTIVES 168
PARTIE EXPERIMENTALE 174
General methods 175
1. Nuclear magnetic resonance spectroscopy (N.M.R.) 175
1.1. ^{1}H NMR et ^{13}C NMR 175
1.2. ^{31}P NMR 175
2. Electron paramagnetic resonance spectroscopy (E.P.R.) 175
3. UV-Visible and fluorescence spectroscopy 176
4. Mass spectroscopy (ESI-MS) 176
5. Solvent and reagents 176
Synthesis procedures 177
1. Synthesis of DPA ligand and complexes 177
2. Biotinylation of DPA ligand and zinc complexation 186
3. Synthesis of quinoline ligand and zinc complexation 188
Crystallographic data 196
Interactions studies on solid support 199
1. Methods 199
1.1. Buffer 199
1.2. Phospholipids 199
1.3. Surface preparation 199

2. Small Unilamellar Vesicles (SUVs) preparation 200
3. Microvesicles isolation 202
4. MV quantification by prothrombinase assay 203
5. Surface Plasmon Resonance (SPR) 204
6. Biolayer Interferometry (BLI) 204
ANNEXES 206
- Annexe 1 : études des interactions entre les complexes et les phospholipides à chaînes courtes par SPR 207
- Annexe 2 : études des interactions entre les complexes et les vésicules modèles par SPR 210
- Annexe 3 : études des interactions entre les complexes et les microvésicules par SPR 211
- Annexe 4 : formations, posters et communications 212
1. Formations 212
2. Posters 212
3. Communications 212

CHAPITRE 1 : ETAT DE L'ART

1. Introduction générale

1.1. Composition d'une cellule et de la membrane plasmique

La société internationale des vésicules extracellulaires (ISEV) nous définit ces dernières comme étant des particules délimitées par une bicouche lipidique, relarguées par les cellules et qui ne peuvent se dupliquer.[1] Elles sont présentes dans le corps humain et circulent dans la majeure partie des fluides biologiques (sang, urine, salive, lait maternel, sperme, fluide amniotique et cérébrospinal…).[2,3,4] Une stimulation inflammatoire, thrombotique, apoptotique ou l'exposition à un stress, conduit la cellule à libérer des vésicules extracellulaires (VEs) de petites tailles (30 nm à 1 µm de diamètre) dans l'espace extracellulaire.[5,6] Ces dernières se retrouvent ainsi dans les différents fluides biologiques du corps humain. Elles ont un rôle dans les processus physiologiques et pathologiques à travers la signalisation et le transfert de matériel génétique de cellules mères aux cellules cibles.[3]

Les VEs sont relarguées par la plupart des cellules dont elles conservent un certain nombre d'informations qui sont issues de l'intérieur de la cellule mère et de sa membrane plasmique (qui marque la limite avec le milieu extracellulaire).[7] De manière plus détaillée, une cellule et sa membrane plasmique sont décrit dans les paragraphes suivants.

---

[1] Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV 2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelides. *J. extracell. Vesicles*, **2018**;7(1):1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750

[2] Akers JC, Gonda D, Kim R et al. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol*. **2013**; 113(1):1-11. doi: 10.1007/s11060-013-1084-8

[3] Yuana Y, Sturk A, Nieuwland R. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood Reviews*. **2013**;27(1):31-39. doi: 10.1016/j.blre.2012.12.002

[4] Ko J, Carpenter E, Issadore D. Detection and isolation of circulating exosomes and microvesicles for cancer monitoring and diagnostics using micro-/nano-based devices. *Analyst*. **2016**;141(2):450-460. doi: 10.1039/C5AN01610J

[5] Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur. J. Clin. Invest*. **2004**;34(6):392-401. doi: 10.1111/j.1365-2362.2004.01355.x

[6] Lenhmann BD, Paine MS, Brooks AM, et al. Senescence-Associated Exosome Release from Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Res*. **2008**;68(19):7864-7871. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6538

[7] Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostatsis and vascular medicine. *Thromb Haemost*. **2009**;101(03):439-451. doi: 10.1160/TH08-08-0521

1.1.1. La cellule

Le corps humain est constitué des cellules eucaryotes, caractérisées par la présence d'un noyau et d'organites. Elles sont entourées par une membrane plasmique (cellulaire) qui vient délimiter le milieu extracellulaire du cytosol dans lequel sont baignés les organites cellulaires (**Figure 1**).[8]

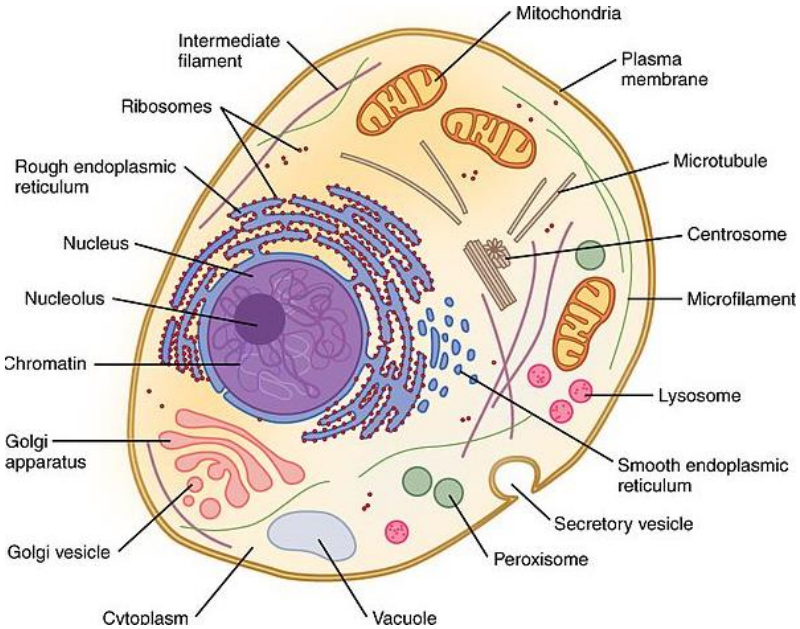


Figure 1 : représentation des organites d'une cellule eucaryote[8]

Le cytosol est composé de différents éléments, dont :

- le noyau qui contient l'information génétique sous forme d'ADN.
- les mitochondries qui produisent de l'énergie sous forme d'ATP, des cofacteurs métaboliques (NADH, $FADH_2$) et sont impliquées dans différents processus tels que la communication, la différenciation, l'apoptose et la régulation du cycle cellulaire.
- le réticulum endoplasmique granulaire (REG), lieu de synthèse et maturation des protéines.
- l'appareil de Golgi, réservoir et lieu de transit des protéines synthétisées dans le REG.
- le cytosquelette, réseau de filaments (actines et microtubules) qui assure une certaine rigidité à la cellule et sert à la fixation des organites présentés ci-dessus.[9]

[8] Betts JG, Desaix P, Johnson E, et al. *Anatomy & Physiology*; 98

[9] Structure des cellules eucaryotes/la cellule eucaryote – wikiversité. Accessed october 04, **2021**. http://fr.wikiversity.org/wiki/Structure_des_cellules_eucaryotes/La_cellule_eucaryote

1.1.2. La membrane plasmique

Outre le fait de servir de barrière entre le milieu intracellulaire (cytosol) et le milieu extracellulaire, la membrane plasmique possède également un rôle dans le processus de formation et/ou de relargage des VEs. Elle est composée de protéines et de lipides (phospholipides, glycolipides, stérols…) formant la bicouche lipidique (**Figure 2**). Les phospholipides sont les plus abondants : ils ont une « tête » polaire (partie phosphate) tournée vers les surfaces de la bicouche et une « queue » apolaire (partie acide gras) tournée vers l'intérieur de la membrane.

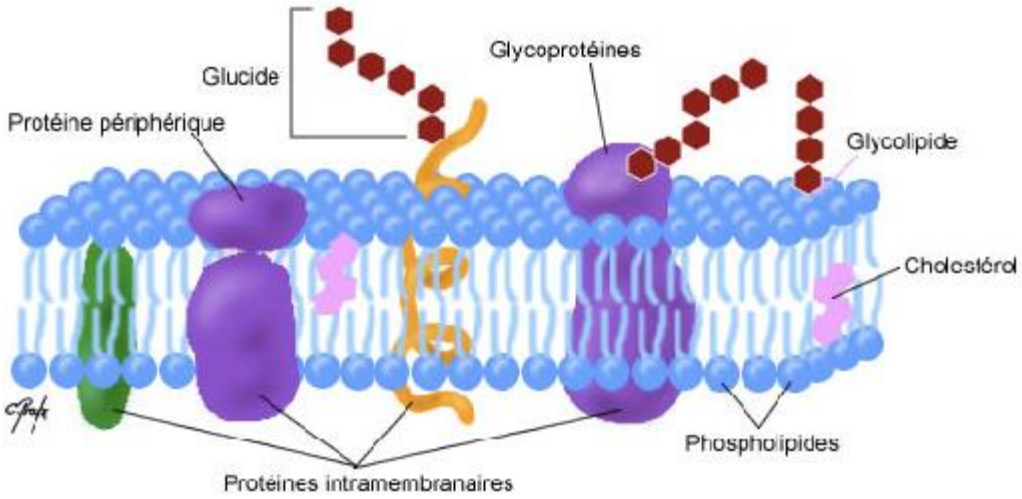


Figure 2 : schéma de la membrane plasmique ; elle est composée d'une bicouche lipidique dans laquelle s'insèrent des protéines transmembranaires, du cholestérol et des glycolipides[9]

Dans une cellule saine, la distribution des phospholipides au sein de la membrane est asymétrique. Elle est constituée de quatre phospholipides principaux (**Figure 3**) :

- trois phospholipides zwiterioniques (de charge globale nulle), la phosphatidylcholine (PC) et la sphingomyéline (SM) localisées principalement sur le feuillet externe, la phosphatidyléthanolamine (PE) localisée principalement sur le feuillet interne.
- un phospholipide anionique, la phosphatidylsérine (PS) localisée principalement sur le feuillet interne de la membrane.[10]

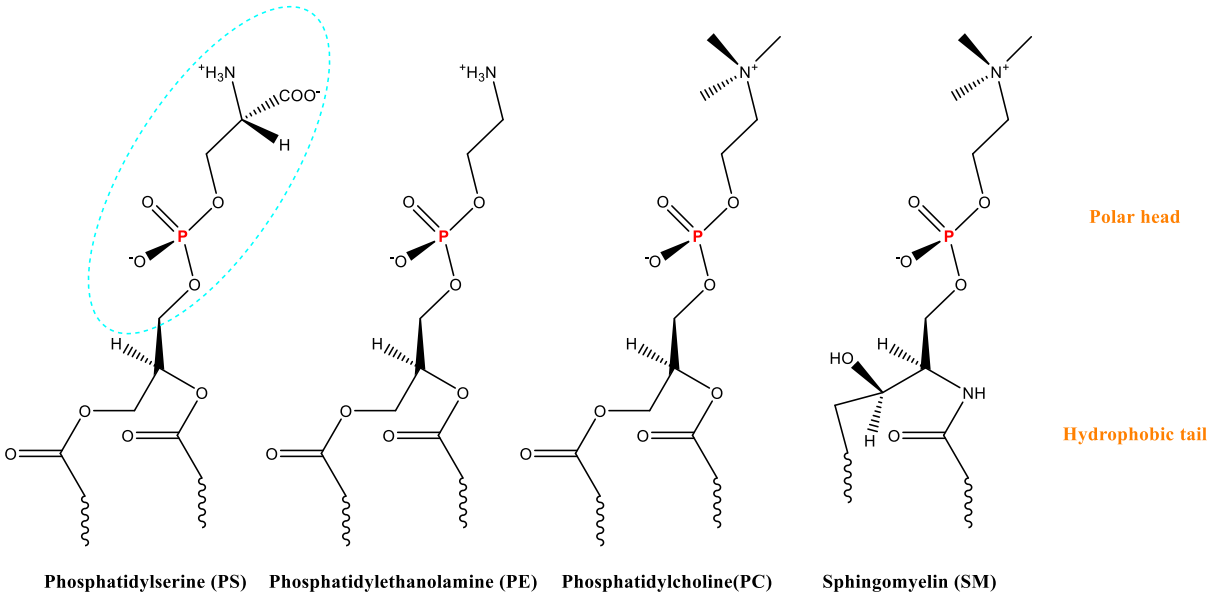


Figure 3 : représentation des principaux phospholipides membranaires

Une perte de l'asymétrie de la membrane via l'externalisation de PS est un marqueur d'apoptose ou de dysfonctionnement cellulaire conduisant à la libération de microvésicules extracellulaires (MVs) qui sont ciblées dans le cadre de cette thèse.[11] Ces MVs font partie des vésicules extracellulaires (VEs) que nous allons décrire dans la partie suivante.

[10] Quinn PJ, Plasma Membrane Phospholipid Asymmetry. In: *Phospholipid Metabolism in Apoptosis*. Subcellular Biochemistry. Vol 36. Springer; **2002**-2

[11] Doeuvre L, Plawinski L, Goux D, Plasmin on adherent cells : from microvesiculation to apoptosis. *Biochem. J.* **2010**;432(2), 365-373. doi: 10.1042/BJ20100561

1.2. Description des vésicules extracellulaires (VEs)

Le milieu extracellulaire est composé de métabolites, ions, protéines et polysaccharides. Il voit également circuler des vésicules extracellulaires (**Figure 4**).

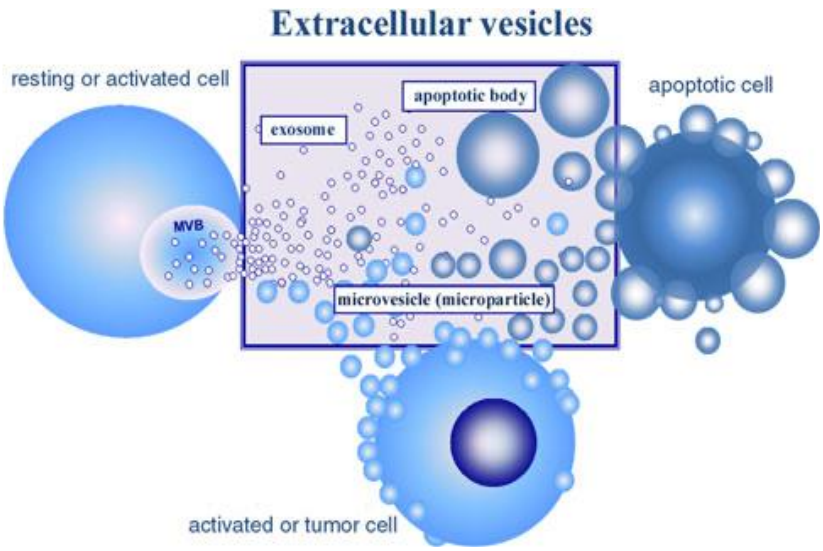


Figure 4 : représentation des différentes populations de vésicules extracellulaires : exosomes, microvésicules et corps apoptotiques[12]

Les VEs sont de différents types (exosomes, microvésicules et corps apoptotiques) libérées par tous types de cellules dans le milieu extracellulaire suite à différents processus d'activation de ces dernières ou à l'apoptose (mort cellulaire programmée). Elles ont une taille comprise entre 30 nm et 1 µm de diamètre et se retrouvent dans les différents fluides biologiques du corps humain.[12]

Par ailleurs, elles sont généralement de formes sphériques et renferment du matériel génétique comme de l'ARN, des protéines et des métabolites qui reflètent l'origine et l'état de leurs cellules mères. Elles sont impliquées dans le transport de molécules à des cellules cibles afin de moduler leurs fonctions, participer à des fonctions physiologiques/pathologiques. Elles peuvent ainsi servir comme biomarqueurs dans certaines pathologies.[13]

---

[12] György B, Szabó TG, Pásztói M, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life. Sci*. **2011**;68(16):2667-2688. doi:10.1007/s00018-011-0689-3

[13] Shah R, Patel T, Freedman JE. Circulating extracellular Vesicles in Human Disease. *N. Engl. J. Med.* **2018**;379(10):958-966.doi:10.1056/NEJMra1704286

Au sein de la communauté scientifique, plusieurs terminologies ont été utilisées pour désigner les vésicules libérées par les cellules, faisant référence soit à leur fonction biologique ou leur mode de biogenèse.[14,15,16,17,18]

Au cours de cette dernière décennie, malgré de nombreux débats, la nomenclature/terminologie des VEs n'est pas encore clairement établie.[19] Le chevauchement des caractéristiques (taille, densité, compositions protéiques…) entre les différents sous-types de VEs ne permet par une classification basée sur une seule de ces caractéristiques physico-chimiques. Cependant, dans ce manuscrit, la terminologie utilisée est basée sur le mode de biogenèse à savoir 1) les **exosomes** (EXOs) pour des vésicules sécrétées par la cellule après fusion de corps multivésiculaires endosomal avec la membrane plasmique ; et 2) les **microvésicules** (MVs) pour celles libérées par un bourgeonnement de la membrane plasmique suite à une perte de l'asymétrie de la bicouche lipidique avec l'exposition de la phosphatidylsérine sur le feuillet externe de la membrane.[1,20]

Bien que le sujet de cette thèse porte sur la détection des microvésicules, il nous paraît important de faire une description plus détaillée des sous-types de VEs (biogenèse et marqueurs biochimiques) que sont les microvésicules, les exosomes et les corps apoptotiques.

1.2.1. Les microvésicules (MVs)

1.2.1.1. Généralités

Les microvésicules (MVs) ont été décrites pour la première fois par Erwin Chargaff et Rodolph West en 1946.[14] Ils ont découvert la présence dans le plasma dépourvu de plaquettes (*Platelet Free Plasma, PFP*), d'un facteur pouvant accélérer la conversion de la prothrombine

---

[14] Chargaff E, West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J. Biol. Chem.* **1946**;166(1):189-197. doi:10.1016/S0021-9258(17)34997-9

[15] Anderson HC. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J. Cell Biol.* **1969**;41(1):59-72. doi:10.1083/jcb.41.1.59

[16] Pan B-T, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell*. **1983**;33(3):967-978. doi:10.1016/0092-8674(83)90040-5

[17] Taylor DD, Homesley HD, Doellgast GJ. Binding of Specific Peroxidase-labeled Antibody to Placental-type Phosphatase on Tumor-derived Membrane Fragments. *Cancer Res*. **1980**;40(11):4064-4069

[18] Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* **1996**;183(3):1161-1172. doi : 10.1084/jem.183.3.1161

[19] Witwer KW, Théry C. Extracellular vesicles or exosomes? On primacy, precision, and popularity influencing a choice of nomenclature. *J. extracell. Vesicles*. **2019**;8(1):1-7. doi: 10.1080/20013078.2019.1648167

[20] Brisson AR, Tan S, Linares R et al. Extracellular vesicles from activated platelets : a semiquantitative cryo-electron microscopy and immune-gold labelling study. *Platelets*. **2017**;28(3):263-271. doi:10.1080/09537104.2016.1268255

en thrombine, une protéine de coagulation sanguine une protéine de coagulation sanguine; sachant que les plaquettes sanguines sont la source majeure du matériel thrombotique permettant la coagulation. Après une ultracentrifugation à 31000 g, il a été observé que la capacité du plasma à entrainer une coagulation sanguine est significativement réduite. Ces résultats ont montré la présence d'autres facteurs que les plaquettes, responsables de la coagulation sanguine.[14]

En 1967, Peter Wolf rapporte l'existence de petites vésicules cellulaires, présentes dans le PFP, permettant la génération de thrombine et a pu montrer que ces vésicules sont d'origine plaquettaire à l'aide d'un microscope électronique et ont donc été appelés « débris plaquettaires » (platelet dust). Par ailleurs, il a également montré que l'augmentation de l'activité coagulante lors du stockage de plasma citraté riche en plaquettes était liée à l'augmentation de vésicules libérées par les plaquettes.[21]

Au niveau de leurs caractéristiques, les MVs sont des structures avec un diamètre compris entre 100 et 1000 nm et entourées par une bicouche de phospholipides ; elles ont une densité de 1.14-1.20 g/mL et sédimentent à 10000-15000 g.[22,23] Elles sont libérées à la suite d'un réarrangement du cytosquelette et d'un remodelage de la membrane plasmique conduisant à un bourgeonnement et à la libération de MVs dans le milieu extracellulaire (**Figure 5**) où elles vont exercer leurs fonctions au contact de cellules cibles.[11]

[21] Wolf P. The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *Br. J. Haematol*. **1967**;13(3):269-288. doi:10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x

[22] Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefact no more. *Trends Cell Biol.* **2009**;19(2):43-51. doi: 10.1016/j.tcb.2008.11.003

[23] Yuana Y, Bertina R, Osanto S. Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles. *Thromb. Haemostasis.* **2011**;105(03):396-408. doi: 10.1160/TH10-09-0595

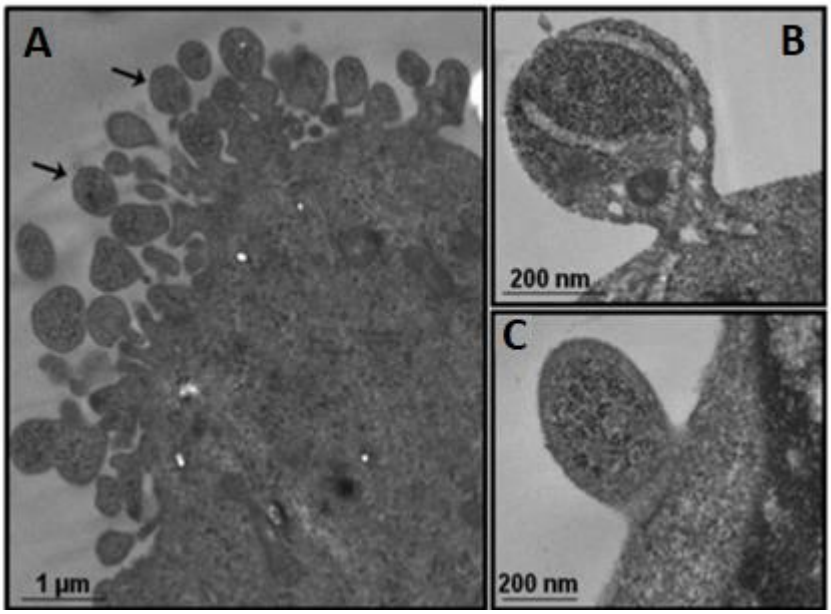


Figure 5 : (A) bourgeonnement et libération de microvésicules à partir de la membrane plasmique de cellules CHO (Chinese hamster ovary) adhérentes (B) et (C) : Agrandissements montrant les microvésicules en formation ; images obtenues par microscopie électronique à transmission[11]

1.2.1.2. Biogenèse

Différents stimuli physicochimiques peuvent venir activer la cellule et conduire à la libération de MVs. Les plaquettes par exemple libèrent les MVs suite à l'activation par la thrombine, l'ionophore A23187 du calcium, le collagène ou le stress cellulaire (pouvant être de nature environnementale, hormonale ou pathologique).[24] Les cellules monocytaires, endothéliales (couche interne des vaisseaux sanguins), hépatocytaires et musculaires lisses artérielles libèrent quant à elles des MVs suite à l'activation par les lipopolysaccharides (LPS), les cytokines ainsi que des hydroperoxydes.[24]

La libération de microvésicules est en général dépendante du taux de calcium intracellulaire. L'augmentation de calcium intracellulaire entraîne un réarrangement de la bicouche lipidique, une translocation de la phosphatidylsérine (PS) du feuillet interne au feuillet externe de la membrane plasmique et donc une perte de l'asymétrie lipidique.[7]

[24] Vanwijk M, Vanbavel E, Sturk A, et al. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc. Res.* **2003**;59(2):277-287. doi: 10.1016/S0008-6303(03)00367-5

A l'état basal, l'asymétrie de la bicouche lipidique est maintenue par trois enzymes :

- la flippase, une aminophospholipide translocase chargée de spécifiquement transférer la PS et la PE du feuillet externe au feuillet interne de la membrane.
- la floppase qui transfère les phospholipides du feuillet interne au feuillet externe.
- la scramblase qui joue le rôle de transporteur entre les deux feuillets de la membrane et est inactive à l'état basal.

Différents mécanismes successifs initient la formation de MVs pendant l'activation cellulaire. Tout d'abord, le réticulum endoplasmique va libérer le calcium qui va (i) inactiver la flippase et activer la floppase et la scramblase; induisant la perte de l'asymétrie lipidique et (ii) induire un remaniement du cytosquelette (**Figure 6**).[7]

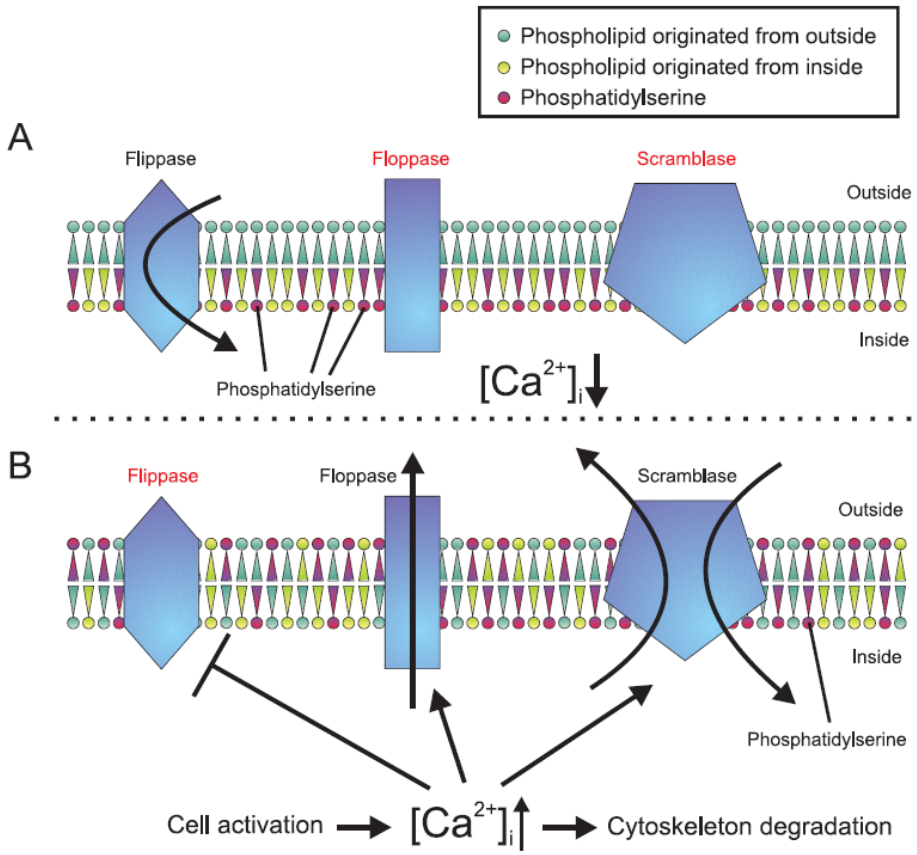


Figure 6 : maintien de l'asymétrie lipidique par trois enzymes : flippase, floppase et scramblase. A) état basal caractérisé par une faible concentration en calcium B) rupture d'asymétrie de la bicouche lipidique engendrée par une augmentation de $[Ca^{2+}]$, entraînant un remaniement des phospholipides membranaires, une dégradation du cytosquelette conduisant à la formation de MVs. [7]

La présence de calcium va activer des enzymes comme la calpaïne et la gelsoline qui vont dégrader les protéines du cytosquelette localement ; ce qui va conduire à un bourgeonnement de la membrane et la libération des MVs avec la PS sur le feuillet externe (**Figure 7**).[7,25]

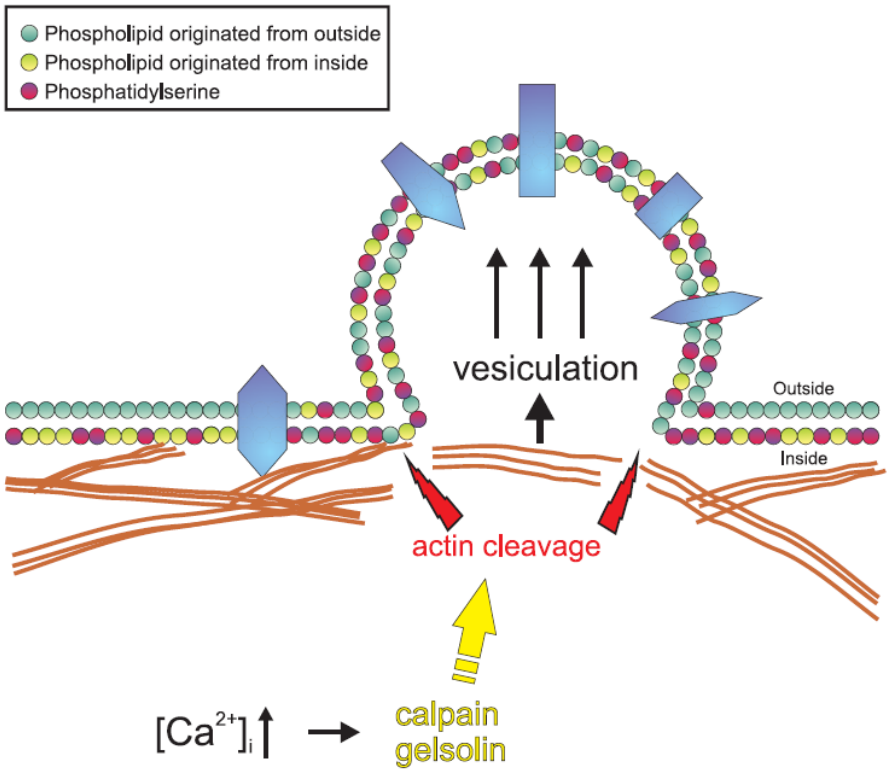


Figure 7 : microvésicules libérées suite à un réarrangement du cytosquelette et un bourgeonnement de la membrane plasmique[7]

1.2.1.3. Composition moléculaire des MVs

La membrane des MVs est enrichie en phospholipides anioniques par rapport à la membrane plasmique, avec en particulier l'exposition de la phosphatidylsérine chargée négativement, une caractéristique des MVs. Cette PS intervient dans la liaison des facteurs de coagulation et la formation de la ténase et prothrombinase, générant la thrombine. Ceci est à l'origine du rôle pro-coagulant des MVs.

[25] Ridger VC, Boulanger CM, Angelillo-Scherrer A, et al. Microvesicles in vascular homeostatsis and diseases: Position Paper of the European Society of Cardiology (ESC) Working Group on Atherosclerosis and Vascular Biology. *J. Am. Coll. Cardiol*. **2017**;117(07):1296-1316. doi: 10.1160/TH16-12-0943

On retrouve également à leur surface des marqueurs de la famille des tétraspanines permettant d'identifier l'origine cellulaire impliquée dans la formation des MVs (**Tableau 1**) ainsi que des glycoprotéines membranaires, des récepteurs, des protéines associées au cytosquelette ou encore le facteur tissulaire (FT). Par ailleurs, ce facteur tissulaire est un élément essentiel dans la cascade de signalisation lors du processus de coagulation.

Tableau 1 : exemples de marqueurs utilisés pour la détermination de l'origine cellulaire des MVs[7]

Origine cellulaire des MVs	Marqueurs	Refs
Globule rouges	CD235a	26
Monocytes	CD14	26
Lymphocytes	CD4, CD8, CD20	26,27,28
Plaquettes	CD31, CD41, CD41a, CD42a-b, CD61, CD62P	26,28,29
Cellules endothéliales	CD31, CD34, CD51, CD54, CD62E, CD105	26,30,31

A l'intérieur, le contenu des MVs, lui, dépend du mode d'activation de la cellule mère. On y retrouve des protéines, des ARNm, miARN et de l'ADN mitochondrial. Les MVs présentes dans le sang sont essentiellement d'origine plaquettaire mais peuvent provenir d'autres sources cellulaires comme des globules rouges, monocytes, lymphocytes ou cellules endothéliales par exemple. Leur concentration dépend du ratio entre leur vitesse de formation et d'élimination ; un changement de la concentration de MVs dans la circulation sanguine peut conduire à des situations pathologiques détaillées dans la partie suivante.

[26] Leroyer AS, Isobe H, Lesèche G, et al. Cellular Origins and Thrombogenic Activity of Microparticles Isolated From Human Atherosclerotic Plaques. *J. Am. Coll. Cardiol*. **2007**;49(7):772-777. doi: 10.1016/j.jacc.2006.10.053

[27] Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood*. **2000**;95(3):930-935. doi: 10.1182/blood.V95.3.930.003k46_930_935

[28] Gelderman MP, Simak J. Flow cytometric analysis of cell membrane microparticles. *Methods Mol Biol*. **2008**; 484:79-93. doi:10.1007/978-1-59745-398-1_6

[29] Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J. Thromb. Haemostasis*. **2004**;2(10):1842-1843. doi: 10.1111/j.1538-7836.2004.00936.x

[30] Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, et al. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb. Res*. **2003**;109(4):175-180. doi: 10.1016/s0049-3848(03)00064-1

[31] Abid Hussein MN, Meesters EW, Osmanovic N, et al. Antigenic characteriation of endothelial cell-derived microparticles and their detection ex vivo. *J. Thromb. Haemost*. **2003**;1(11):2434-2443. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00455.x

1.2.1.4. Fonctions et pathologies impliquant les MVs

Outre le fait d'être impliquées dans le transport de matériel d'une cellule mère à une cellule cible (ce qui permet par conséquent de moduler sa fonction), les MVs sont également impliquées dans des processus d'angiogenèse, d'inflammation et de coagulation, entraînant des pathologies thrombotiques et cardiovasculaires. Après une brève définition de ces processus, des exemples de pathologies impliquant les MVs seront donnés.

- L'angiogenèse est le processus impliquant la formation et croissance de nouveaux vaisseaux sanguins permettant de fournir les organes et les tissus en développement en oxygène et nutriments ainsi que l'élimination des déchets métaboliques.[32] In vitro, il a été montré que les MVs d'origine endothéliales (EMVs) contiennent des métalloprotéinases (MMP-2 et MMP-9) responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire (matière entre les cellules), et permettant par conséquent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins.[33] En sus, de leur côté « pro-angiogenèse », les EMVs peuvent également inhiber l'angiogenèse en stimulant la production d'espèces endothéliales réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS).[34]

Par ailleurs, les MVs issues de plaquettes (PMVs, également dénommées dans la littérature par PMP pour Platelet-derived microparticules) permettent également la prolifération, survie, migration et formation de capillaires proches en structure des cellules endothéliales.[35] In vivo, les PMVs induisent également l'angiogenèse. En effet, le groupe de Brill et al., a montré que des injections sous-cutanées de PMVs soutiennent le développement de capillaires chez la souris, et que des injections au niveau d'un cœur ischémique augmentent la revascularisation chez le rat.[36] L'induction de l'angiogenèse par les PMVs peut favoriser le développement de tumeurs/métastases. Par exemple, le contact entre les PMVs et des cellules

---

[32] Bussolati B, Grange C, Camussi G. Tumor exploits alternative strategies to achieve vascularization. *FASEB J.* **2011**;25(9) :2874-2882. doi : 10.1096/fj.10-180323

[33] Taraboletti G, D'Ascenzo S, Borsotti P, et al. Shedding of the Matrix Metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as Membrane Vesicle-Associated Components by Endothelial Cells. *Am. J. Pathol.* **2002**;160(2):673-680. doi : 10.1016/S0002-9440(10)64887-0

[34] Burger JA, Kipps TJ. CXCR4 : a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood.* **2006**;107(5):1761-1767. doi: 10.1182/blood-2005-08-3182

[35] Kim HK, Song KS, Chung J-H, et al. Platelet microparticles induce angiogenesis *in vitro*. *Br. J. Haematol.* **2004**;124(3):376-384. doi: 10.1046/j.1365-2141.2003.04773.x

[36] Brill A, Dashevsky O, Rivo J, et al. Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization. *Cardiovasc. Res.* **2005**;67(1):30-38. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.04.007

cancéreuses du poumon provoque l'expression de métalloprotéinases et facteurs de croissance.[37]

- La réponse immunitaire suite à une inflammation, correspond aux mécanismes de défenses de l'organisme contre les agents pathogènes. Les MVs peuvent en ce sens moduler la réponse immunitaire en l'activant ou en l'inhibant.

Une augmentation de la réponse inflammatoire est observée dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires. Les cellules endothéliales exposent à leur surface des récepteurs qui attirent les leucocytes (globules blancs), ainsi que les MVs issues de ces dernières.[24] Une fois liés, ils vont migrer au niveau de l'intima des vaisseaux où ils libèreront des cytokines et des facteurs de croissance qui favorisent la prolifération de cellules musculaires lisses entraînant la formation de plaques.[38,39]

Dans des études in vivo, il a été observé un rôle direct des MVs dans le processus inflammatoire avec leur augmentation dans la circulation systémique/veineuse. Le **Tableau 2** nous donne quelques exemples de pathologies dans lesquelles il est observé cette augmentation des MVs.

[37] Skog J, Würdinger T, Van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* **2008**;10(12):1470-1476. doi: 10.1038/ncb1800

[38] Mehdi Mesri, Dario C. Altieri. Endothelial cell activation by leucocyte microparticles. *J. Immunol.* **1998**;161(8):4382-4387. doi: 10.1074/jbc.274.33.23111

[39] Nomura S. High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis.* **2001**;158(2):277-287. doi: 10.1016/S0021-9150(01)00433-6

Tableau 2 : exemples de maladies dans lesquelles le nombre de MVs augmente dans la circulation veineuse[24]

Maladies	Augmentation MVs	Refs
syndrome coronarien aigu	total, endothélium, plaquettes	40
artériosclérose	plaquettes	41
diabète	total, plaquettes	42
hypertension	plaquettes	43

Enfin, les MVs possèdent également une activité anti-inflammatoire en agissant directement sur les macrophages.[44,45]

- La coagulation sanguine est le mécanisme aboutissant à la formation de caillot sanguin. Les patients avec des pathologies cardiovasculaires ont un risque plus élevé de thrombose pouvant aboutir à un infarctus du myocarde ou un accident vasculaire cérébral (AVC). L'augmentation de l'activité de thrombose combinée à celle des MVs circulantes indiquent leur rôle important dans ces pathologies.

La coagulation est possible en présence de facteurs de coagulation et de membrane exposant la phosphatidylsérine (MVs). Cette exposition facilite l'interaction des facteurs de coagulation avec la membrane, permettant la formation de complexes avec la tenase et la prothrombinase d'une part, et l'exposition du facteur tissulaire (FT), une protéine transmembranaire qui initie la coagulation d'autre part.[46,47]

---

[40] Mallat Z, Benamer H, Hygel B, et al. Elevated Levels of Shed Membrane Microparticles With Procoagulant Potential in the Peripheral Circulating Blood of Patients With Acute Coronary Syndromes. *Circulation*. **2000**;101(8):841-843. doi: 10.1161/01.CIR.101.8.841

[41] Nomura S, Imamura A, Okuno M, et al. Platelet-Derived Microparticles in Patients with Arteriosclerosis Obliterans: Enhancement of High Shear-Induced Microparticle Generation by Cytokines. *Thromb. Res*. **2000**;98(4):257-268. doi: 10.1016/s0049-3848(00)00186-9

[42] Nomura S. Platelet-derived microparticles may influence the development of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. **1995**;116(2):235-240. doi: 10.1016/0021-9150(95)05551-7

[43] Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, et al. Effects of Severe Hypertension on Endothelial and Platelet Microparticles. *Hypertension*. **2003**;41(2):211-217. doi: 10.1161/01.hyp.0000049760.15764.2d

[44] Gasser O, Schifferli JA. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood*. **2004**;104(8):2543-2548. doi: 10.1182/blood-2004-01-0361

[45] Batool S, Abbsian N, Burton JO, et al. Microparticles and their Roles in Inflammation: a Review§. *Open Immunol. J*. **2013**;6(1):1-14. doi: 10.2174/1874226201306010001

[46] Key N, Mackman N. Tissue Factor and Its Measurement in Whole Blood, Plasma and Microparticles. *Semin. Thromb. Hemostasis*. **2010**;36(08):865-875. doi: 10.1055/s-0030-1267040

[47] Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, et al. Assembly of the Platelet Prothrombinase Complex Is Linked to Vesiculation of the Platelet Plasma Membrane. *J. Biol. Chem*. **1989**;264(29):17049-17057. doi: 10.1016/S0021-9258(18)71457-9

Hormis les effets directs des MVs sur la coagulation, les MVs peuvent également la stimuler de manière indirecte. Par exemple, les plaquettes qui exposent la sélectine P déclenchent l'expression du facteur tissulaire (FT) sur les monocytes, d'où également leur exposition sur les PMVs (**Figure 8**).[48]

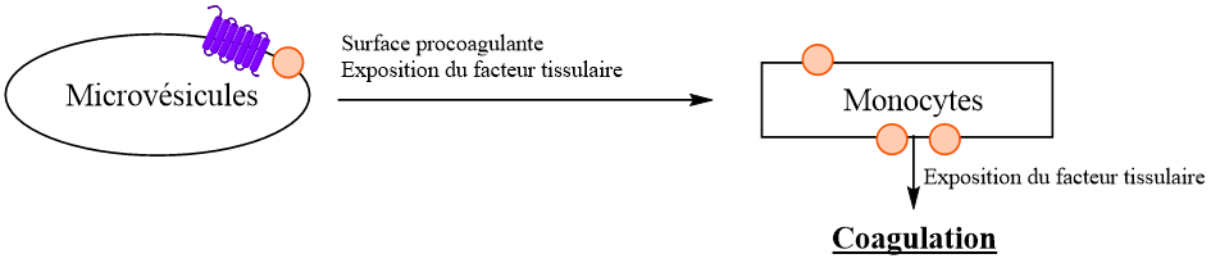


Figure 8 : rôle des microvésicules dans le processus de coagulation[24]

Dans le syndrome de Scott, on observe un défaut de translocation de la PS du feuillet interne au feuillet externe de la membrane plasmique des plaquettes entraînant un manque de relargage de PMVs et par conséquent un défaut dans l'activité pro-coagulante des plaquettes, augmentant par conséquent les risques d'hémorragies.[49]

Enfin, dans des conditions physiologiques normales, les MVs exprimant FT sont issues majoritairement des cellules hématopoïétiques (ce sont les cellules à l'origine de toutes les lignées de cellules sanguines du corps lors du processus d'hématopoïèse). Cependant, dans le plasma de patients cancéreux, il a été détecté une augmentation de MVs exprimant FT provenant de cellules tumorales.[50] Ces dernières libèrent des MVs qui activent les cellules endothéliales, les monocytes et les plaquettes; et donc la production de MVs.[51] Elles vont également jouer un rôle dans la progression du cancer via le processus d'angiogenèse (cf. paragraphe angiogenèse) : la formation de nouveaux vaisseaux sanguins garantit l'apport en nutriments, oxygène et facteurs de croissances aux cellules tumorales.52 Pour résumer, le FT

[48] Celi A, Pellegrini G, Lorenzet R, et al. P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**;91(19):8767-8771. doi: 10.1073/pnas.91.19.8767
[49] Zwaal RFA, Comfurius P, Bevers EM. Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochim.* Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids **2004**;1636(2-3):119-128. doi: 10.1016/j.bbalip.2003.07.003
[50] Falanga A, Barbui T, Rickles F. Hypercoagubality and Tissue Factor Gene Upregulation in Hematologic Malignancies. *Semin. Thromb. Hemostasis*. **2008**;34(02):204-210. doi: 10.1055/s-2008-1079262
[51] Falanga A, Panova-Noeva M, Russo L. Procoagulant mechanisms in tumor cells. *Best Pract. Res., Clin. Haematol*. **2009**;22(1):49-60. doi: 10.1016/j.beha.2008.12.009
[52] Martinez MC, Andriantsitohaina R. Microparticles in Angiogenesis: Therapeutic Potential. *Circ Res.* **2011**;109(1):110-119. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.233049

exposé sur les MVs joue un rôle crucial dans le développement des cellules tumorales via les processus d'angiogenèse et de thrombose (**Figure 9**).

1.2.1.5. Rôles des MVs en tant que biomarqueurs

Dans la littérature plusieurs travaux ont observé une corrélation entre l'augmentation de MVs et diverses pathologies. Par exemple, dans le cas de patients sujet à des thromboembolies (formation d'un thrombus qui peut obstruer la circulation sanguine et dans certains cas migrer puis provoquer une embolie pulmonaire), il a été montré un lien entre l'augmentation du taux de MVs avec le FT à la surface (mesure de l'activité de MV-FT, cytométrie en flux, …) et la pathologie.[53,54,55]

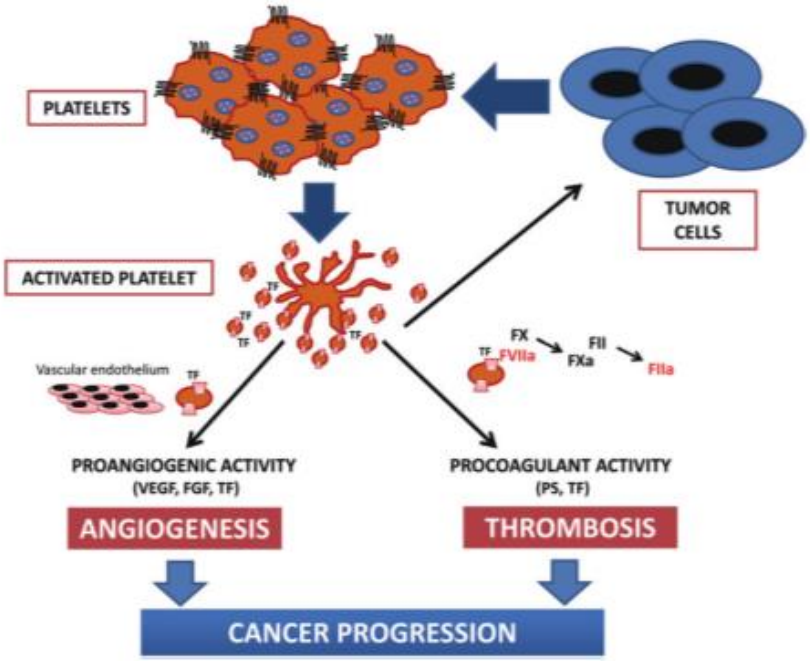


Figure 9 : implication des microvésicules issues de plaquettes dans la progression cancéreuse. Les cellules tumorales activent les plaquettes et relarguent dans le réseau sanguin les PMVs avec à leur surface le facteur tissulaire. Ils contiennent le matériel nécessaire à l'angiogenèse et la thrombose, deux activités favorisant la progression tumorale.[56]

---

[53] Bharthuar A, Khorana AA, Huston A, et al. Association of elevated tissue factor (tf) with survival and thromboembolism (te) in pancreaticobiliary cancers (pbc). *J. Clin. Oncol.* **2010**;28(15),4126-4126. doi: 10.1200/jco.2010.28.15_suppl.4126

[54] Khorana AA, Francis CW, Menzies KE, et al. Plasma tissue factor may be predictive of venous thromboembolism in pancreatic cancer. *J. Thromb. Haemost.* **2008**;6(11), 1983-1985. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.03156.x.

[55] Rautou PE, Mackman N. Microvesicles as risk markers for venous thrombosis. *Expert Rev. Hematol.* **2013**;6(1):91-101. doi: 10.1589/ehm.12.74

[56] Falanga A, Tartari CJ, Marchetti M. Microparticles in tumor progression. *Thromb. Res.* **2012**;129:S132-S136. doi: 10.1016/0005-2736(81)90512-5

Par ailleurs, le groupe d'Evans et al, en 2016 a mis en évidence grâce à une association de méthodes (décrites dans la partie 2.), la centrifugation et la cytométrie en flux, le rôle des MVs comme biomarqueurs (suivi grâce à l'association annexine V - MVs) pour des patients atteint de glioblastomes (cancer cérébral).[57]

Enfin, plus récemment en 2020, le groupe de Thulin et al, a réalisé une étude clinique montrant l'association des VEs (avec à leur surface la PS) avec des patients sujets à des fibrillations atriales et avec un risque d'AVC.[58]

Toutes ces pathologies dont la liste est non exhaustive font qu'il y a un réel intérêt à étudier ces MVs comme biomarqueurs pour la détection précoce, la thérapie, et le suivi de diverses pathologies.

1.2.1. Les exosomes (EXOs)

1.2.1.1. Généralités

Le terme *exosomes* a été utilisé la première fois en 1981 par l'équipe de Trams et al., ils décrivaient des microvésicules ayant une activité 5' nucléotidase (une glycoprotéine membranaire ayant un rôle dans le métabolisme des nucléotides) et libérées par des cellules néoplasiques.[59] Quelques années plus tard, le groupe de Stahl et Johnstone reprend et adopte le terme *exosomes* pour décrire des vésicules de 50 nm d'origine endosomique, libérées lors de la différenciation de réticulocytes (jeunes globules rouges) en érythrocytes.[60,61]

De nos jours, la communauté scientifique semble s'accorder sur le fait que les exosomes (EXOs) sont des vésicules avec un diamètre compris entre 30 et 100 nm, une

[57] Evans SM, Putt M, Yang XY, et al. Initial evidence that blood-borne microvesicles are biomarkers for recurrence and survival in newly diagnosed glioblastoma patients. *J. Neuro-oncol*. **2016**;127(2):391-400. doi: 10.1007/s11060-015-2051-3

[58] Thulin A, Lindbäck J, Granger CB, et al. *Thromb Res*. **2020**;193:180-189. doi: 10.1016/j.thromres.2020.07.029

[59] Trams EG, Lauter CJ, Norman Salem Jr, et al. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr*. **1981**;645(1):63-70. doi: 10.1016/0005-2736(81)90512-5

[60] Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol*. **1983**;97(2):329-339. doi: 10.1083/jcb.97.2.329

[61] Pan BT, Teng K, Wu C, et al. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J. Cell Biol*. **1985**;101(3):942-948. doi: 10.1083/jcb.101.3.942

densité de 1.13-1.19 g/mL, et une sédimentation à une accélération d'environ 100 000 g.[62,63]

Elles sont libérées par l'exocytose et fusion d'endosomes intracellulaire et exercent leurs fonctions biologiques 1) au contact direct avec la surface, 2) par endocytose ou 3) fusion avec les cellules cibles.[64]

1.2.2.2. Biogénèse

Après l'activation de récepteurs de surface par les cellules, il se produit une invagination de la membrane (endocytose), donnant lieu à la formation de vésicules intraluminales (endosomes). Ces endosomes vont ensuite fusionner pour donner des corps multivésiculaires (*MultiVesicular Bodies, MVB*) qui pourront soit être dégradés par des lysosomes soit fusionner avec la membrane plasmique de la cellule et libérer les EXOs dans l'espace extracellulaire (**Figure 10**). Il est à noter que la sécrétion d'EXOs peut se faire de manière spontanée ou induite par des stimuli sur la surface des cellules.[65,66]

---

[62] Théry C, Amigorena S, Raposo G, et al. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol*. **2006**;30(1):3.22.1-3.22.29. doi: 10.1002/0471143030.cb0322s30

[63] Xu R, Simpson RJ, Greening DW. A protocol for Isolation and Proteomic Characterization of Distinct Extracellular Vesicle Subtypes by Sequential Centrifugal Ultrafiltration. *Methods Mol. Biol*. **2017**;1545:91-116. doi: 10.1007/978-1-4939-6728-5_7

[64] Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol*. **2009**;9(8):581-593. doi: 10.1038/nri2567

[65] Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol*. **2002**;2(8):569-573. doi: 10.1038/nri855

[66] Jones L.B, Bell C.R, Bibb K.E, et al. Pathogens and Their Effect on Exosome Biogenesis and Composition. *Biomedicines*. **2018**;6,79. doi: 10.3390/biomedicines6030079

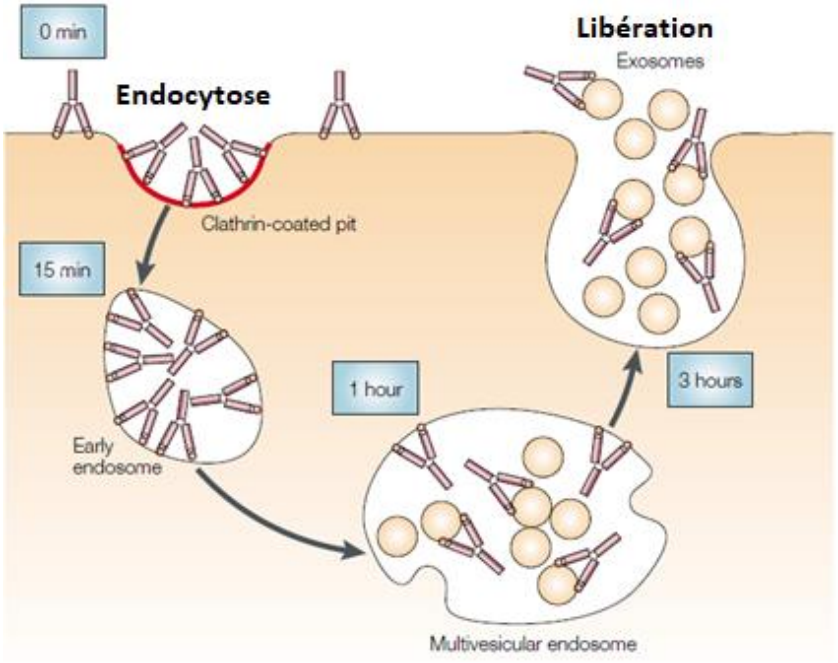


Figure 10 : mécanisme de formation des exosomes par endocytose, fusion des endosomes et libération dans le milieu extracellulaire[65]

1.2.2.3. Composition moléculaire des EXOs

Les EXOs peuvent être secrétées par différents types de cellules comme les cellules mastocytaires, dendritiques, T, B, souches, endothéliales, épithéliales ou cancéreuses, par exemple.[67,68,69] Elles possèdent des molécules de surface qui leur permettent d'activer des récepteurs ; et de participer à des échanges avec la cellule cible. Par ailleurs, elles sont composées principalement de protéines, de lipides, de carbohydrates et de miARN (**Figure 11**).[67,70]

Plus précisément, les EXOs contiennent différentes protéines (qui vont jouer différents rôles : formation des EXOs, réponse immunitaire, trafic cellulaire etc) qui sont exprimées et dépendantes de l'origine cellulaire de ces dernières. Ces protéines comprennent les protéines chaperons, de choc thermique (*shock proteins*, HSP, 60-70 et 90), du cytosquelette (actine et

[67] Corrado S, Poon I.K.H, Chiesi A, et al. Exosomes as intercellular signaling organelles involved in health and disease: Basic science and clinical applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**;6, 14(3):5338-2366. doi: 10.3390/iljms14035338
[68] Zhou H, Cheruvanky A, Hu X, et al. Urinary exosomal transcription factor, a new class of biomarkers for renal disease. *Kidney int*. **2008**;74(5):613-621. doi: 10.1038/ki.2008.206
[69] Eldh M, Ekstrom, K, Valadi H, et al. Exosomes communicate protective messages during oxidative stress; possible role of exosomal shuttle rna. *PLoS ONE*. **2010**;17;5(12):e15353. doi: 10.1371/journal.pone.0015353
[70] Lee Y, El Andaloussi S, Wood M.J. Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Hum. Mol. Genet*. **2012**;21(1):125-134. doi: 10.1093/hmg/dds317

tubuline), de fusion (flotilline), des tétraspanines (CD9, CD37, CD53, CD63, CD81) etc.[67,68,71] Ces tétraspanines sont des protéines membranaires qui en font de bons marqueurs d'EXOs.[72]

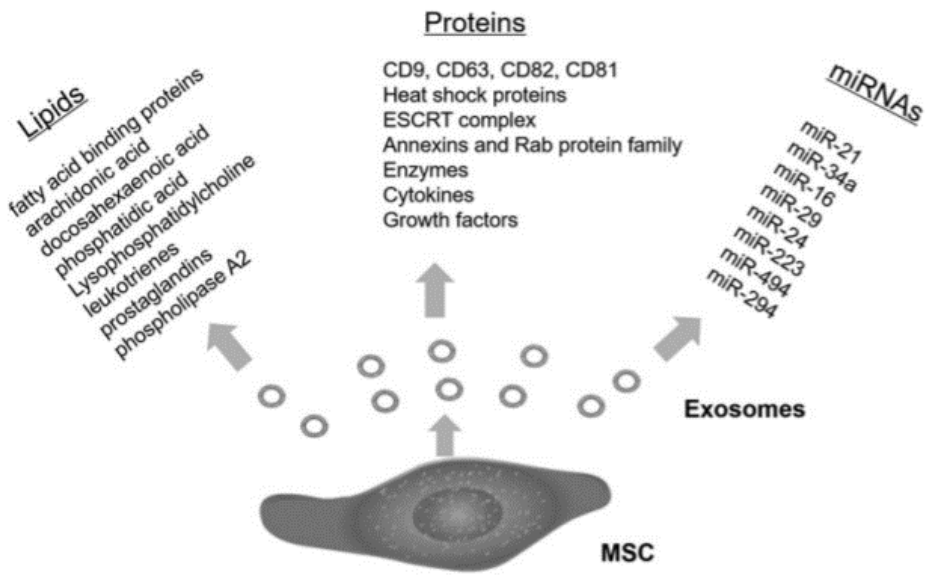


Figure 11 : contenus lipidiques, protéiques et en miARNs dans des exosomes libérées par des cellules mésenchymateuses[73]

1.2.2.4. Fonctions et pathologies impliquant des EXOs

Les EXOs sont impliqués dans des processus semblables aux MVs (communication intercellulaire, angiogenèse, réponse immunitaire, coagulation…). Seuls leurs implications dans l'angiogenèse et la modulation de la réponse immunitaire seront détaillés.

- Dans certains cancers les exosomes vont libérer du matériel génétique favorisant l'angiogenèse ce qui est responsable du remodelage et de la progression de la tumeur. Par exemple, les EXOs relargués par des glioblastomes (tumeur primitive au niveau du cerveau) sont riches en angiogénine et interleukine (IL-6 et IL-8) lesquelles sont impliquées dans le développement de nouveaux vaisseaux et donc de la maladie.[37]

---

[71] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* **2013**;200(4):373-383. doi: 10.1083/jcb.201211138.
[72] Meckes D.G. Jr, Raab-Traub N. Microvesicles and viral infection. *J. Virol*. **2011**;85(24): 12844-12854. doi: 10.1128/JVI.05853-11
73 Deng H, Sun C, Sun Y, et al. Lipid, Protein, and MicroRNA Composition Within Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes. *Cell. Reprogram*. **2018**;20(3):178-186. doi: 10.1089/cell.2017.0047

- Les EXOs issus de cellules tumorales peuvent également moduler la réponse immunitaire en affectant la différenciation d'antigènes à la surface de cellules, comme les cellules dendritiques (DCs). Ces derniers vont voir leur nombre réduit à la suite de contacts avec des EXOs issus de cellules tumorales; ce qui entraîne une diminution de la réponse immunitaire.[64]

1.2.3. Les corps apoptotiques (cAPOs)

1.2.3.1. Généralités

Le terme corps apoptotiques (cAPOs) est apparu en 1972 et utilisé par le groupe de Kerr et al.74 Très peu d'études ont été faites sur les cAPOs contrairement aux EXOs et MVs. Cependant, il est établi qu'ils ont un diamètre compris entre 1 et 5 µm, une densité de 1.16-1.28 g/mL et sédimentent à une accélération de 1200 - 10000 g. Ils contiennent des organites et des fragments nucléaires.[34,37,64]

1.2.3.2. Biogenèse

L'apoptose est le processus de mort programmée de la cellule. Cela est caractérisé par une contraction de la cellule, la fragmentation de l'ADN et la libération de cAPOs. Après avoir reçu les signaux d'apoptose, la cellule va activer la voie de dégradation ROCK I, qui permet un réarrangement du réseau de cytosquelette (actine et myosine). Cela abouti à la contraction cellulaire et le transport de fragments d'ADN du noyau à la membrane en bourgeonnement des corps apoptotiques. Ces cAPOs sont ensuite libérés puis reconnus par les cellules phagocytaires où ils sont éliminés.[75]

---

[74] Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer*. **1972**;26(4):239-257. doi: 10.1038/bjc.1972.33

[75] Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, et al. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol*. **2001**;3(4):339-345. doi: 10.1038/35070009

1.2.3.3. Composition moléculaire des cAPOs

Les cAPOs provenant de l'apoptose (mort cellulaire programmée), nous y retrouvons donc différentes molécules d'origine nucléaire, cytosolique et endosomique. À leur surface, des molécules de surface oxydées permettent la liaison avec la thrombospondine et la C3b, deux protéines reconnues par les cellules phagocytaires.[76]

Par ailleurs, il est à noter que contrairement aux EXOs et aux MVs qui peuvent être générées dans des conditions physiologiques, les cAPOs sont libérés uniquement pendant le processus de mort cellulaire programmée.

1.3. Communication intercellulaire

Après avoir vu le rôle des VEs, nous allons détailler comment ces dernières interagissent avec leurs cellules cibles afin de transmettre leurs biomolécules.

Les VEs peuvent fusionner avec la membrane cellulaire de la cellule cible et/ou être internalisées par endocytose pour aller moduler leur fonction. D'autre part, l'interaction peut également se faire avec la cellule cible via une interaction ligand-récepteur, ce qui a pour conséquence l'activation de différentes voies de signalisation cellulaire (**Figure 12**).[77]

[76] Merovach D, Mascarenhas JO, Gershov D, et al. Complement-dependent Clearance of Apoptotic Cells by Human Macrophages. *J. Exp. Med.* **1998**;188(12):2313-2320. doi: 10.1084/jem.188.12.2313

[77] Mause SF, Weber C. Microparticles : protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ. Res.* **2010**;107(9):1047-1057. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.226456

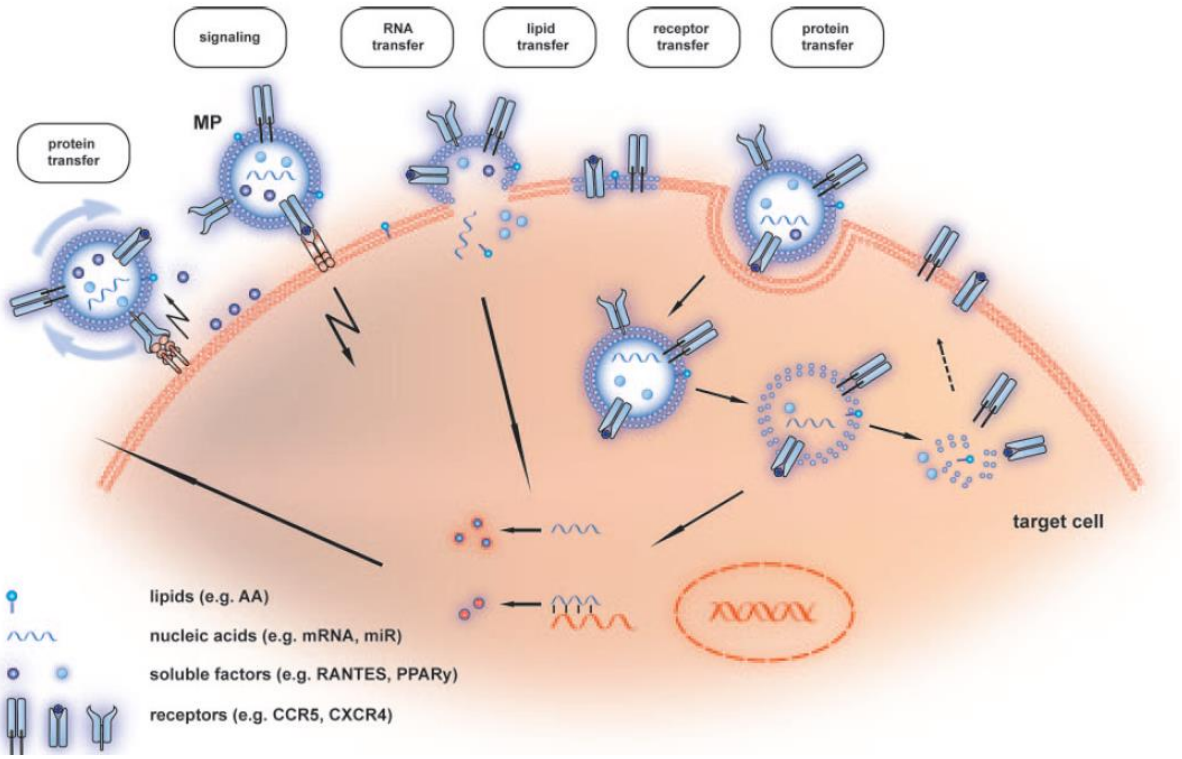


Figure 12 : différents constituants moléculaires et modes de communication utilisés par les vésicules extracellulaires dans le transfert d'information intercellulaire[77]

Enfin, les VEs peuvent également libérer directement dans le milieu extracellulaire, des molécules bioactives comme les métalloprotéases et le facteur tissulaire.

1.4. Elimination des VEs

Suite à différents stimuli (hypoxie, inflammation, stress cardiovasculaire…), la demi-vie des VEs et plus particulièrement des MVs peut être variable de quelques minutes jusqu'à plusieurs heures voire jours en fonction de l'exposition des molécules spécifiques à la surface des MVs qui interviennent dans l'interaction avec les cellules épithéliales, endothéliales ou les macrophages.[78]

Ces MVs sont éliminées essentiellement par endocytose, phagocytose et fusion aux organes suivants : le foie, les poumons et la rate.[78]

[78] Ayers L, Nieuwland R, Kohler M, et al. Dynamic microvesicle release and clearance within the cardiovascular system: triggers and mechanisms. *Clin. Sci.* **2015**;129(11):915-931. doi: 10.1042/CS20140623

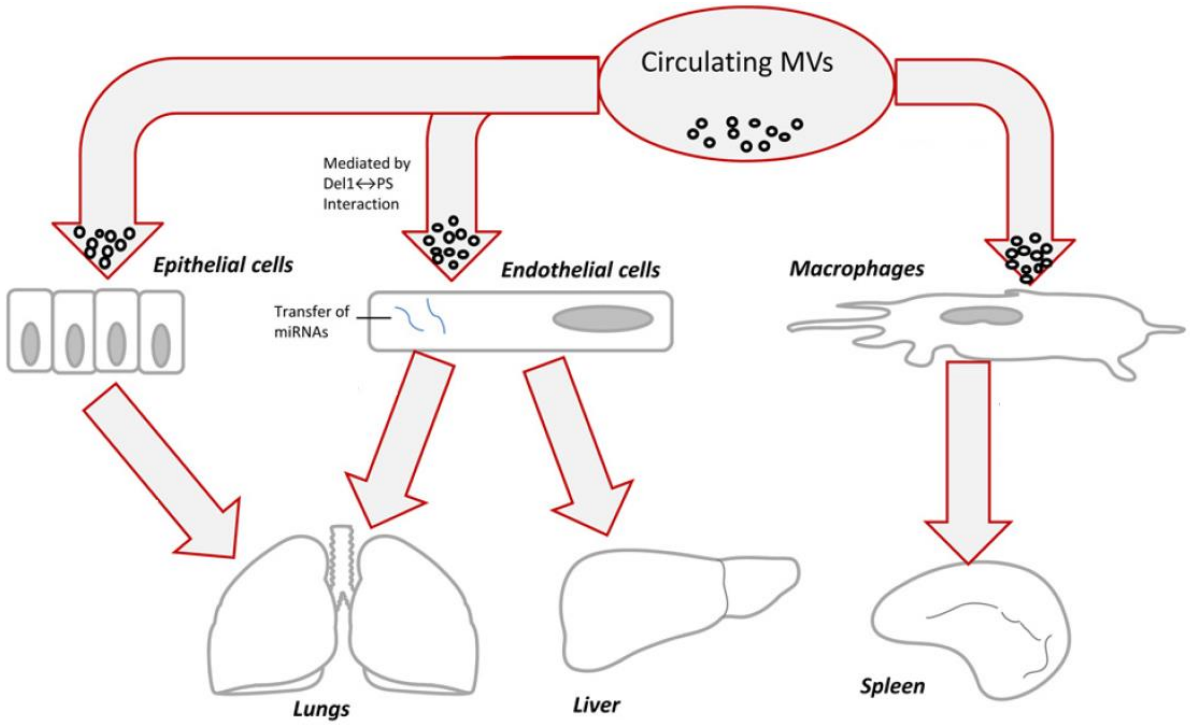


Figure 13 : mécanisme d'élimination des MVs. Les MVs passent dans la circulation sanguine pour aller vers les cellules épithéliales, endothéliales ou les macrophages et être dirigées vers les poumons, le foie ou la rate[78]

Dans la littérature, des études se sont intéressées à la vitesse d'élimination des MVs sur des modèles expérimentaux ; tous ont mis en évidence une vitesse très rapide d'élimination des MVs de la circulation sanguine.[79,80,81] A titre d'exemple, le groupe de Rand et al, a injecté des PMVs (Platelets microvesicles) dans des lapins ; ces PMVs n'ont plus été identifiables après 10 minutes et restent absents de la circulation après 50 minutes, suggérant qu'une fois éliminées, elles ne sont pas libérées de nouveau.[81] Pour Flaumenhalft, les PMVs injectés chez la souris ont été éliminées après 30 minutes.[79]

[79] Flaumenhaft R. Formation and fate of platelet microparticles. *Blood Cells, Mol, Dis.* **2006**;36(2):182-187. doi: 10.1016/j.bcmd.2005.12.019

[80] Al Faraj A, Gazeau F, Wilhelm C, et al. Endothelial cell-derived microparticles loaded with iron oxide nanoparticles: feasibility or MR imaging monitoring in mice. *Radiology*. **2012**;263(1):169-178. doi: 10.1148/radiol.11111329

[81] Rand M.L, Wang H, Bang K. W, et al. Rapid clearance of procoagulant platelet-derived microparticles from the circulation of rabbits. *J. Thromb. Haemost*. **2006**;4(7):1621-1623. doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.02011.x

1.5. Résumé des caractéristiques des VEs

Les principales caractéristiques permettant de différencier les types de vésicules extracellulaires sont regroupées dans le **Tableau 3** suivant. *Nous pouvons en particulier retenir que les exosomes et les corps apoptotiques possèdent des mécanismes de formation totalement différents de celui des MVs.*

Tableau 3 : caractéristiques principales des différents types de VEs[12]

	MVs	**EXOs**	**cAPOs**
taille (nm)	100-1000	50-100	1000-5000
densité (g/mL)	1.14-1.20	1.10-1.20	1.16-1.28
accélération utilisée pour l'isolation par centrifugation	10000-15000 g	100 000 g	1200 – 10 000 g
biogénèse	bourgeonnement de la membrane plasmique	endocytose puis fusion et relargage des endosomes intracellulaires	Relargage de fragments cellulaires subissant l'apoptose
sources majoritairement utilisées pour caractérisation cellulaire	plaquettes, globules rouges et cellules endothéliales	cellules dendritiques, cellules tumorales, entérocytes, lymphocytes T et B	lignée cellulaire
exemples marqueurs	CD63, CD81, CD9, LAMP1 et TSG101	AV, facteur tissulaire & marqueurs cellulaires	thrombospondine C3b

Longtemps considérées comme des débris cellulaires sans rôle spécifique auparavant, les dernières décennies (**Figure 14**) ont permis de découvrir les multiples intérêts des MVs qui transportent et expulsent des composants cellulaires ; transmettant ainsi des informations de la cellule mère vers des cellules cibles, ce qui en fait des vecteurs clefs de la communication intercellulaire.

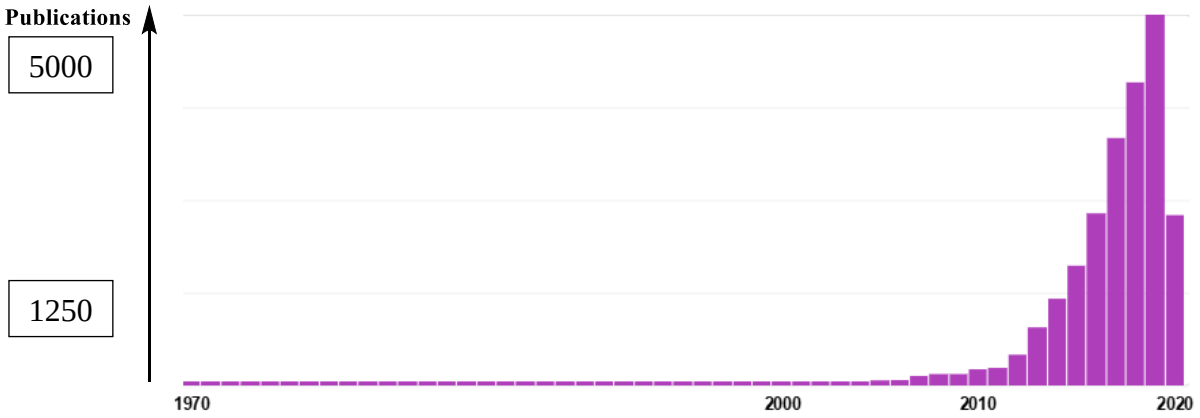


Figure 14 : évolution du nombre de publications traitant des MVs entre 1970 et 2020 : on observe une augmentation des études sur les MVs à partir du milieu des années 2000 (données sci-finder n)

Elles possèdent également des fonctions biologiques propres comme, l'angiogenèse, la réponse immunitaire ou la coagulation. La corrélation entre l'augmentation de la concentration de MVs et diverses pathologies pourraient conduire à l'utilisation de celles-ci pour le diagnostic précoce. Malheureusement à ce jour, ce point reste encore largement méconnu car les méthodes utilisées pour la caractérisation et quantification des MVs sont peu efficaces, principalement en raison de l'hétérogénéité et la petite taille de ces dernières (entre 50 nm et 1 µm).

Par conséquent, la purification des VEs et leur phénotypage est une des clefs (i) pour étudier leur implication dans certaines pathologies et (ii) pour leur utilisation potentielle comme outil de prédiction du risque, de diagnostic et de suivi thérapeutique. Ce sont les méthodes d'isolement, détection et caractérisation qui vont être décrites dans la partie suivante.

2. Méthodes d'isolement, de détection et de caractérisation

Actuellement, l'utilisation des VEs comme biomarqueurs au niveau clinique pour le diagnostic ou le suivi thérapeutique est limitée. Cela est dû à la difficulté à analyser des objets de petites tailles et à la préparation nécessaire à leurs mesures. En effet, compte tenu de leur diversité de tailles, structures, fonctions et leur nature poly-dispersées, des techniques et compétences particulières doivent être utilisées.

De multiples paramètres des VEs peuvent être mesurés, comme le nombre, la distribution de taille, les marqueurs à la surface, la composition en protéines ou lipides ou

encore leurs fonctionnalités. Ces paramètres sont sujets à variation et sont affectés par de nombreux facteurs à commencer par le prélèvement de l'échantillon, le traitement et les méthodes d'isolation et de détection utilisées. Cependant, aucune méthode ne permet d'analyser tous les paramètres à elles seules ; chacune d'elles a ses avantages, ses limites, ses pourcentages de récupération (total de VEs préservées après isolation) et ses taux de pureté des populations (ratio entre VEs et composants non-vésiculaires) récupérées.

Dans cette partie, nous allons donc nous intéresser aux stratégies de préparation et d'isolement des VEs, ainsi qu'aux différentes techniques employées pour leur analyse.[4,82,83,84]

2.1. Aspect pré-analytique

Les VEs se retrouvent dans les fluides du corps humain comme la salive, le lait maternel, le liquide amniotique, les urines et le sang.[4] Cependant, dans ces fluides biologiques, d'éventuels contaminants, comme les lipoprotéines, virus ou des molécules pouvant former des agrégats/complexes peuvent intervenir lors de la préparation/isolement des VEs.

Par conséquent, afin de quantifier et caractériser les VEs, il faut d'abord les séparer des cellules et autres constituants présents dans l'échantillon. Ensuite, il est également important de pouvoir séparer les différentes populations de VEs.[12]

Dans le cas d'échantillon sanguin, afin d'éviter l'activation des plaquettes lors du prélèvement, il est recommandé de collecter les échantillons sanguins de manière atraumatique à l'aide d'une aiguille de large diamètre (calibre 19 ~ 1.0 mm) et d'anticoagulant comme le citrate de sodium associé à des inhibiteurs plaquettaires (théophylline, adénosine et dipyridamole) connu sous le diminutif CTAD.[85]

Pour l'isolement des VEs, différentes méthodes et techniques conventionnelles sont utilisées comme la centrifugation différentielle qui est la plus utilisée, la séparation sur

---

[82] Kailashiya J. Platelet-derived microparticles analysis : Techniques, challenges and recommendations. *Anal. Biochem.* **2018**;546:76-85. doi: 10.1016/j.ab.2018.01.030

[83] Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Zimoch J, et al. The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**;18(6):1153-1171. doi: 10.3390/ijms18061153

[84] Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, et al. Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circ. Res.* **2017**;120(10):1632-1648. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.309417

[85] Chandler WL. Measurement of microvesicle levels in human blood using flow cytometry. *Cytometry, Part B.* **2016**;90(4):326-336. doi: 10.1002/cyto.b.21343

gradient de densité, la chromatographie d'exclusion et l'immunocapture.[86,87] Ce sont ces techniques qui seront présentées dans les paragraphes suivants.

2.1.1. Centrifugation différentielle (CD)

La centrifugation différentielle (CD) est la technique la plus communément utilisée.[88] Elle permet de séparer les exosomes et microvésicules des autres éléments en fonction de leur forme, taille et densité à travers différents cycles de centrifugation. Une des principales difficultés d'utilisation de cette technique réside dans le chevauchement partiel des propriétés des objets à séparer. Par exemple, le domaine de taille des MVs se chevauche partiellement avec celui des exosomes et celui les bactéries (**Figure 15**).

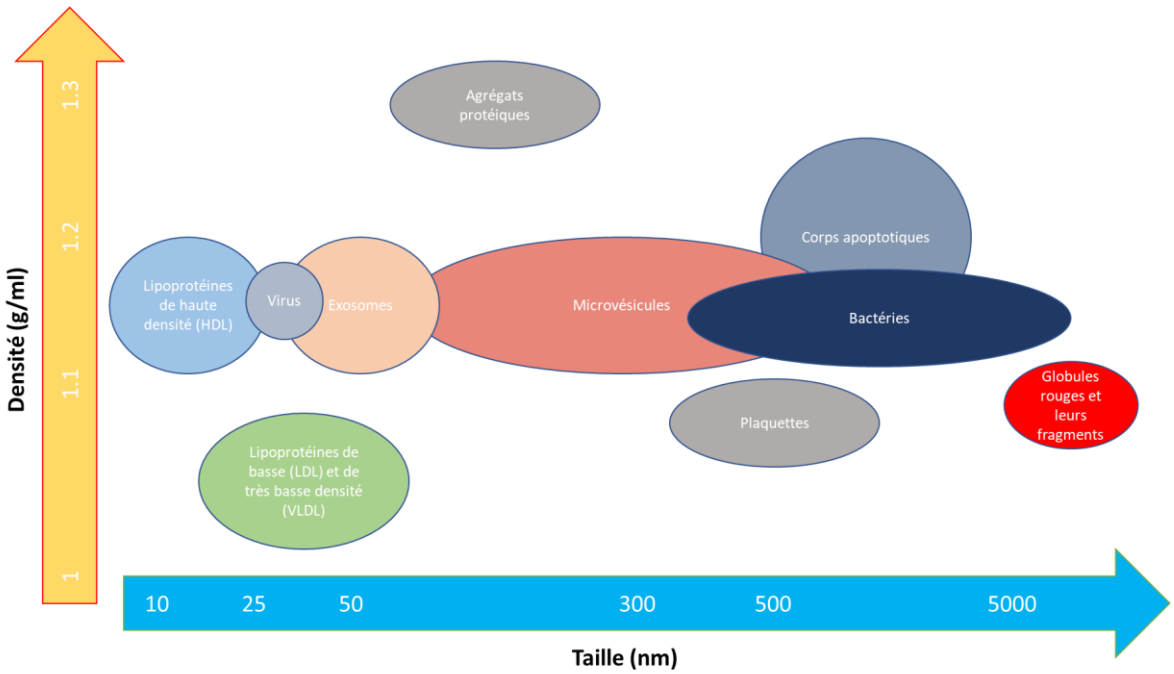


Figure 15 : caractéristiques physiques des VEs et des autres éléments pouvant être présents dans l'échantillon[89]

[86] Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, et al. Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM863-derived exosomes. *Methods*. **2012**;56(2):293-204. doi: 10.1016/j.ymeth.2012.01.002

[87] Gupta D, Zickler A. M, El Andaloussi S. Dosing extracellular vesicles. *Adv. Drug Delivery Rev*. **2021**;178:113961. doi: 10.1016/j.addr.2021.113961

[88] Gardiner C, Vizio DD, Sahoo S, et al. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *J. Extracell. Vesicles*. **2016**;5(1):32945. doi: 10.3402/jev.v5.32945

[89] Obeid S. *Analyses quantitative et qualitative sur puce de vésicules extracellulaires en milieux complexes au sein d'une plateforme nanobioanalytique*; Thèse de doctorat, Université de Bourgogne Franche-Comté, **2017**

Quand une solution est centrifugée, les particules vont se déplacer vers le fond du tube en direction de la force centrifuge. Après une centrifugation, les culots collectés au fond du tube contiennent les particules les plus larges et/ou denses ; les particules prenant plus de temps à sédimenter (taille et/ou densité plus faible) restent dans le surnageant (**Figure 16**).

Les particules de différentes tailles ont donc des vitesses ou temps de sédimentation différentes : les particules de grande taille sédimentent facilement et requièrent donc une faible force de centrifugation (et un temps court) tandis que les particules de petite taille requièrent l'application d'une force et d'un temps de centrifugation plus élevée.[90]

Dans le cas de la collecte de VEs à partir d'échantillon sanguin, une première étape consiste en plusieurs centrifugations à faible accélération (≈ 300 – 2000 g) afin : i) **d'éliminer les cellules et les débris cellulaires** avec un diamètre supérieur à 1 µM, et ii) minimiser l'activation plaquettaire. Le surnageant avec les plaquettes est ainsi récupéré (**Figure 16-étape 1**).[90] Le surnageant subit ensuite une double centrifugation 1500-5000 g (une première, pour éliminer les grosses particules comme les globules rouges et blancs, et une seconde pour éliminer les plaquettes), pendant 15 minutes à température ambiante pour obtenir du plasma pauvre en plaquette (PPP). Le culot (plaquettes + cellules) est éliminé, le surnageant centrifugé pendant 1 à 2 minutes à 13000 g pour culotter les débris ou fragments cellulaires et obtenir du plasma dépourvu en plaquettes (*Platelets Free Plasma, PFP*). Le surnageant, PFP, contenant les MVs et EXOs est congelé à -80°C pour un stockage de longue durée ou alors conservé à 4°C pour une semaine avant analyse (**Figure 16**-**étape 2**).[85]

Pour une séparation plus spécifique, de nouveaux cycles de centrifugation plus rapides et plus longs permettent de séparer les MVs et EXOs de tailles différentes.

Un exemple de protocole d'isolement de VEs est représenté en **Figure 16**. Des études ont montré un faible nombre de VEs dans le PFP par rapport à celui dans le PPP indiquant une perte d'une partie des VEs à l'étape de centrifugation à moyenne accélération.[91,92,93]

---

[90] Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, et al. Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biol. Chem*. **2013**;394(10):1253-1262. doi: 10.1515/hsz-2013-0141.
[91] Thaler J, Ay C, Weinstabl H, et al. Circulating procoagulant microparticles in cancer patients. *Ann. Hematol.* **2011**;90(4):447-453. doi: 10.1007/s00277-010-1111-1
[92] Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, et al. New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *Keio J. Med.* **2004**;53(4):210-230. doi: 10.2302/kjm.53.210
[93] Van Ierssel SH, Van Craenenbroeck EM, Conraads VM, et al. Flow cytometric detection of endothelial microparticles (EMP): Effects of centrifugation and storage alter with the phenotype studied. *Thromb. Res.* **2010**;125(4):332-339. doi: 10.1016/j.thromres.2009.12.019

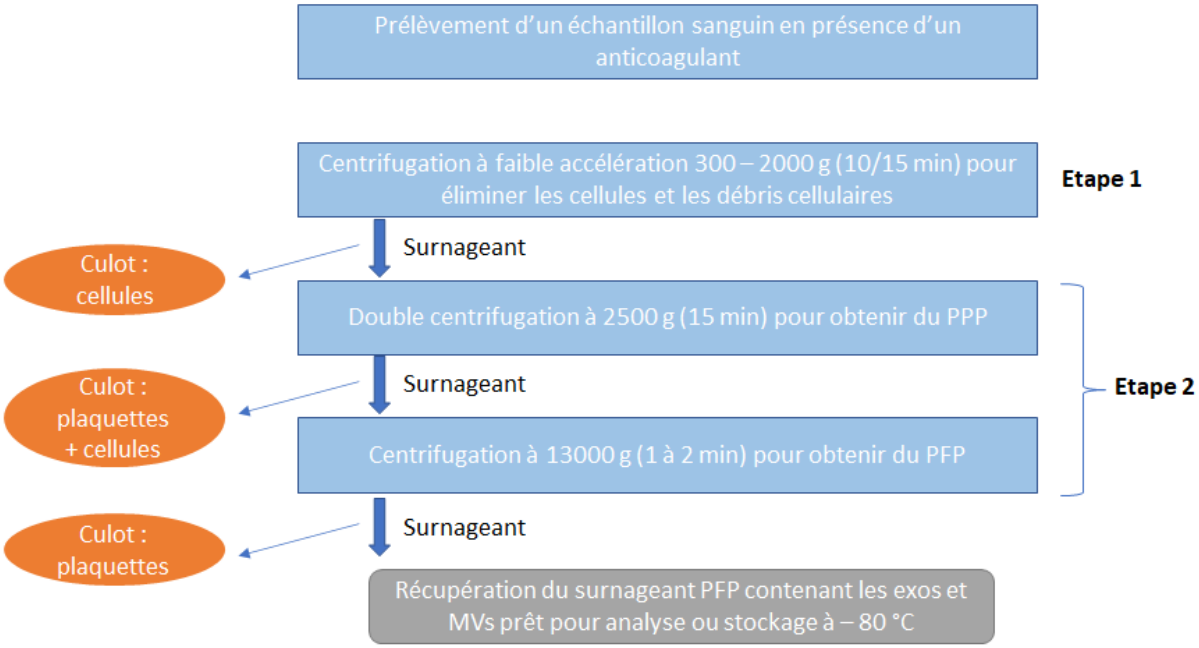


Figure 16 : protocole pour isolement de VEs à partir d'échantillons sanguins par centrifugation

Enfin, nous pouvons noter que la CD est une méthode qui demande du temps (> 4 h) et qui résulte en une faible spécificité puisque exosomes et microvésicules peuvent y être retrouvés.[4]

2.1.2. Ultracentrifugation sur gradient de densité (GC)

L'ultracentrifugation sur gradient de densité permet de séparer les constituants en fonction de leur densité. Elle s'effectue dans un gradient de densité préparé à partir de solutions de sucrose ou l'iodixanol.[94]

Par rapport à la CD, elle permet d'obtenir un taux de pureté et de récupération plus élevé des VEs.[95] Cependant, la densité très proche des VEs et autres composants (LDL et HDL par exemple), rend difficile l'isolement d'un type de VEs de manière efficace.[96] Enfin, tout comme la CD, la centrifugation sur gradient de densité demande du temps (> 4 h), et un équipement coûteux rendant difficile son utilisation pour de nombreuses applications cliniques de routine.

2.1.3. Filtration et chromatographie d'exclusion

La filtration permet la séparation des VEs d'un échantillon de manière plus rapide (≃ 20 minutes) comparée aux méthodes de centrifugation et permet un taux de récupération jusqu'à 80 %.[97] Elle peut être combinée à d'autres techniques comme l'ultracentrifugation et la chromatographie d'exclusion. Afin de passer la solution à travers un filtre, une pression est appliquée ou le filtre est placé dans une centrifugeuse. A cause de cette pression externe, les particules d'un diamètre supérieur à celui des pores du filtre peuvent être déformées et passer à travers cette dernière, ce qui constitue un inconvénient de cette technique.[84]

Néanmoins, la pureté est à relativiser puisque cette technique souffre de différentes limitations comme i) la contamination des VEs par des protéines et une possible déformation/rupture des grosses vésicules et des plaquettes, ainsi qu'une ii) adsorption des VEs dans la membrane du filtre.[98,99]

---

[94] Lawrence JE, Steward GF. Purification of viruses by centrifugation. In Manual of Aquatic Viral Ecology: Wilhelm S, Weinbauer M, Suttle C. *Am. Soc. Limnol. Oceanogr*. **2010**:166-281. doi: 10.4319/mave.2010.978-0-9845591-0-7.166

[95] Zhang Z, Wang C, Li T, et al. Comparison ultracentrifugation and density gradient separation methods for isolating Tca8113 human tongue cancer cell line-derived exosomes. *Oncol. Lett*. **2014**;8(4):1701-1706. doi: 10.3892/ol.2014.2373

[96] Yuana Y, Levels J, Grootemaat A, et al. Co-isolation of extracellular vesicles and high-density lipoproteins using density gradient ultracentrifugation. *J. Extracell. Vesicles*. **2014**;3(1):1-5. doi: 10.3402/jev.v3.23262

[97] Lobb RJ, Becker M, Wen Wen S, et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J. Extracell. Vesicles*. **2015**;4(1):1-11. doi: 10.3402/jev.v4.27031

[98] Rood IM, Deegens JKJ, Merchant ML, et al.. Comparison of three methods for isolation of urinary microvesicles to identify biomarkers of nephrotic syndrome. *Kidney Int.* **2010**;78(8):810-816. doi: 10.1038/ki.2010.262

Dans ce contexte, à titre d'exemple, le groupe de Liu et al. via une approche micro-fluidique a développé en 2013 un dispositif composé de micropiliers ciliés (nanofils poreux) permettant d'isoler les petites vésicules (40 - 100 nm). Les vésicules piégées sont ensuite libérées grâce à du tampon PBS (**Figure 17**). Bien que le temps de piégeage des VEs à partir d'un échantillon soit court et requiert un faible volume (~ 30 µL et 10 min), le temps total de récupération prend plusieurs heures dû à la dissolution du micro-réseau.[100]

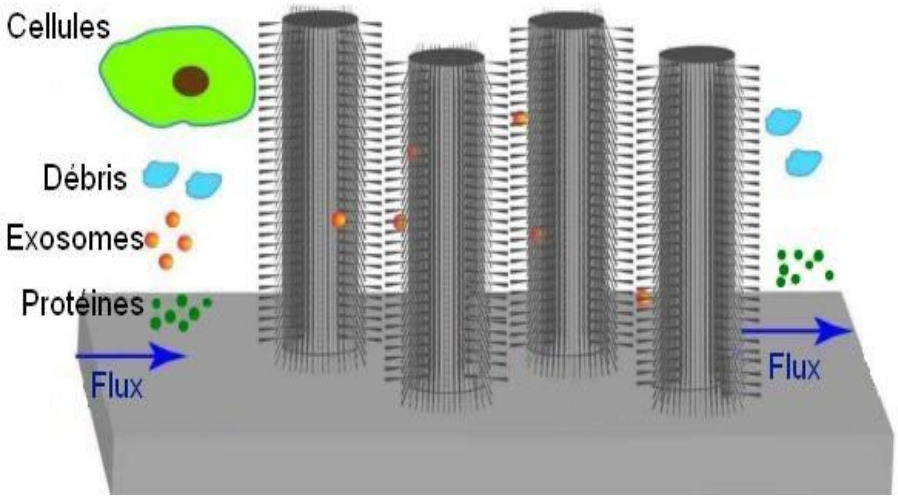


Figure 17 : dispositif de Liu et al., permettant de piéger et isoler les VEs par un micro-réseau formé par des micropiliers ciliés[100]

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) permet de séparer des molécules (ici des VEs) en fonction de leur taille et de leur forme en une seule étape. Cela s'effectue grâce à des granules de gel poreux. Les grosses molécules comme les contaminants protéiques sont exclues et éluées en premières, les moyennes et petites molécules sont ensuite successivement éluées car retenues dans le gel d'exclusion.[101]

Par exemple, Böing et al. en 2014 ont examiné l'efficacité de la chromatographie d'exclusion pour isoler des VEs issues de plasma riche en plaquettes, des lipoprotéines et d'agrégats protéiques. Les fractions ont été récupérées et analysées par nanoparticle tracking analysis (NTA) et cytométrie en flux (CF). Cette méthode a amené à un taux de récupération de 43 % des VEs par rapport au dépôt initial et un ratio de 7/3 avec les agrégats protéiques et

[99] Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicles research. *J. Extracell. Vesicles*. **2013**;2(1):1-25. doi: 10.3402/jev.v2i0.20360
[100] Wang Z, Wu H, Fine D, et al. Ciliated micropillars for the microfluidic-based isolation of nanoscale lipid vesicles. *Lab Chip*. **2013**;13(15):2879-2882. doi: 10.1039/c3lc41343h
[101] Xu R, Greening DW, Zhu H-J, et al. Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application. *J. Clin. Invest*. **2016**;126(4):1152-1162. doi: 10.1172/JCI81129

8/2 avec les lipoprotéines.[102] Il est à noter que cette chromatographie mène à la dilution de l'échantillon et que la limite basse de séparation des VEs dépend de la taille des pores du gel de séparation utilisé. Enfin, c'est une technique simple à mettre en œuvre et très peu destructrice pour les constituants à séparer.

2.1.4. Immuno-affinité

En contraste avec les stratégies permettant de séparer les VEs en fonction de leur taille ou de leurs caractéristiques physiques, l'approche par immuno-capture permet de les trier en fonction de l'expression spécifique d'antigènes à leur surface. Cette technique à l'avantage de réduire la co-purification avec les potentiels débris cellulaires et agrégats de protéines ainsi que d'isoler les sous-populations de VEs basées sur l'expression de marqueurs spécifiques à leur surface.[103,104,105]

Un exemple est l'utilisation de colonnes de tri cellulaire magnétique. Les billes magnétiques modifiées par des ligands (anticorps) sont plongées dans l'échantillon à étudier. Ces billes vont lier les VEs d'intérêt et seront piégées par un aimant ; le reste de l'échantillon étant éliminé. Dans un dernier temps, les VEs sont éluées/détachées des billes, puis récupérées grâce à des tampons d'élution.[106]

Le groupe de Taylor via cette stratégie a isolé des exosomes provenant d'échantillon de sérum de patients à un stade précoce du cancer des ovaires. Dans cette étude, des molécules d'adhésion à la surface d'exosomes provenant de cellules épithéliales (EpCAM) sont incubés avec des billes magnétiques modifiées (anti-EpCAM) et piégées dans une colonne de tri cellulaire magnétique. Après élution et élimination du matériel non retenu, les

---

[102] Böing AN, Van Der Pol E, Grootemaat AE, et al. Single-step isolation extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J. Extracell. Vesicles*. **2014**;3(1):23430. doi: 10.3402/jev.v3.23430

[103] Bobrie A, Colombo M, Krumeich S, et al. Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *J. Extracell. Vesicles*. **2012**;1(1):18397. doi: 10.3402/jev.vli0.18397

[104] Mathivanan S, Lim JWE, Tauro BJ, et al. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. *Mol. Cell. Proteomics*. **2010**;9(2):197-208. doi: 10.1074/mcp.M900152-MCP200

[105] Vaidyanathan R, Naghibosadat M, Rauf S, et al. Detecting Exosomes Specifically: A Multiplexed Device Based on Alternating Current Electrohydrodynamic Induced *Nanoshearing*. *Anal. Chem*. **2014**;86(22):11125-11132. doi: 10.1021/ac502082b

[106] Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol. Oncol*. **2008**;110(1):13-21. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.04.033

exosomes ont été élués et collectés. Au final l'étude a montré que la quantité d'exosomes circulant est croissante en fonction du stade d'avancement du cancer (**Figure 18**).[106]

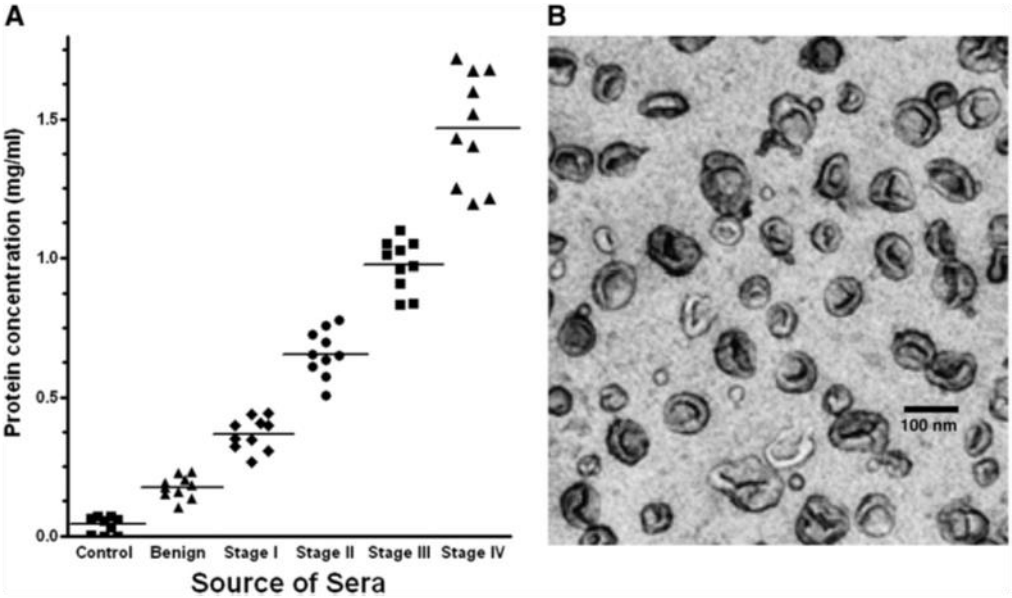


Figure 18 : (A) niveau d'exosomes circulant (lignée tumorale) en fonction du stade du cancer des ovaires; (B) visualisation par TEM d'exosomes isolés[106]

2.1.5. Précipitation

Des kits composés de polyéthylène glycol (PEG) permettent d'isoler les VEs en les faisant précipiter. Les kits sont incubés avec le matériel de départ à 4°C de 15 minutes à 12 heures.[84] Bien que le rendement soit meilleur par rapport aux autres techniques présentées ci-dessus, un inconvénient majeur est la co-précipitation avec des constituants non-vésiculaires et des polymères récupérés dans la solution finale.[107]

[107] Kim J, Shin H, Kim J, et al. Isolation of High-Purity Extracellular Vesicles by Extracting Proteins Using Aqueous Two-Phase System. *PLoS ONE*. **2015**;10(6):e0129760. doi: 10.1371/journal.pone.0129760

2.1.6. Résumé et tableau comparatif des techniques d'isolement des VEs

Les principales techniques utilisées pour l'isolement des VEs sont présentées schématiquement en **Figure 19** et comparées dans le **Tableau 4**.

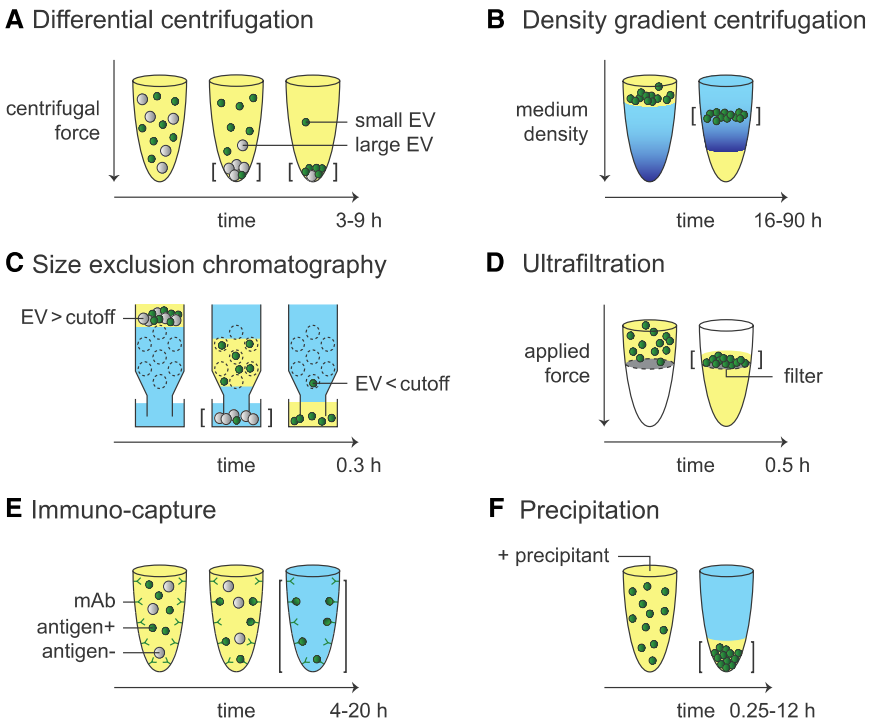


Figure 19 : principales méthodes utilisées pour isoler les VEs. La séparation peut être basée entre autres sur la taille, la densité ou la composition de la membrane[84]

Tableau 4 : différentes méthodes d'isolement de VEs. CD : centrifugation différentielle ; GC : chromatographie sur gradient de densité ; SEC : chromatographie d'exclusion stérique ; IC : immunocapture[84]

	CD	GC	Filtration	SEC	IC
Spécificité	Taille	densité et taille	taille	taille et forme	marqueurs
Contaminants	particules de même taille	lipoprotéines	particules de même taille	particules de même taille	
Durée (h)	3-9	16-90	0.5	0.3	4-20
Rendement	moyen	moyen	forte	moyen	faible
Pureté	faible	forte	forte	moyen	forte
Refs	90,99	108,109	110,111	112	113

Nous pouvons conclure qu'aucune méthode d'isolement aboutie à une parfaite purification des VEs et d'un sous-type de VEs. De plus, les étapes de préparation et d'isolement manquent de standardisation.[114] Les étapes de purification pré-analytiques sont cruciales afin de récupérer les VEs puisque du rendement et de la pureté des échantillons récupérés découle la réussite de l'étape d'analyse. Comme il n'y a pas de méthode optimale, le choix de la méthode sera fonction de la problématique spécifique à chaque étude.

Après avoir détaillé les méthodes d'isolation, nous allons voir dans la partie suivante les méthodes d'analyses permettant d'étudier les VEs.

[108] Van Deun J, Mestdagh P, Sormunen R, et al. The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. *J. Extracell. Vesicles*. **2014**;3(1):24858. doi: 10.3402/jev.v3.24858

[109] Greening DW, Xu R, Ji H, et al. A protocol for Exosome Isolation and Characterization: Evaluation of Ultracentifugation, Density-Gradient Separation, and Immunoaffinity Capture Methods. In: Posch A, ed. *Proteomic Profiling: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology. Springer; **2015**:179-209. doi: 10.1007/978-1-4939-2550-6_15

[110] EV-TRACK Consortium, Van Deun J, Mestdagh P, et al. EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nat. Methods*. **2017**;14(3):228-232. doi: 10.1038/nmeth.4185

[111] Xu R, Greening DW, Rai A, et al. Highly-purified exosomes and shed microvesicles isolated from the human colon cancer cell line LIM1863 by sequential centrifugal ultrafiltration are biochemically and functionally distinct. *Methods*. **2015**;87:11-25. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.04.008

[112] Welton JL, Webber JP, Botos L-A, et al. Ready-made chromatography columns for extracellular vesicle isolation from plasma. *J. Extracell. Vesicles*. **2015**;4(1):27269. doi: 10.3402/jev.v4.27269

[113] Jørgensen M, Baek R, Pedersen S, et al. Extracellular vesicle (EV) Array: microarray capturing of exosomes and other extracellular vesicles for multiplexed phenotyping. *J. Extracell. Vesicles*. **2013**;2(1):20920. doi: 10.3402/jev.v2i0.20920

[114] Xu R, Greening DW, Zhu H-J, et al. Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application. *J. Clin. Invest*. **2016**;126(4):1152-1162. doi: 10.1172/JCI81129

2.2. Aspect analytique

L'isolation des VEs détaillée dans la partie précédente est l'étape initiale avant leur caractérisation. Par la suite, la taille et la forme des VEs ainsi que leur concentration pourront être déterminées : leur surface/membrane (contenant des marqueurs) et leurs contenus (protéines, lipides, ARN) pourront être analysés afin de définir leur composition, origine cellulaire et fonctionnalités. Toutes ces données permettront de surveiller les changements physiologiques et pathologiques dans les cellules de culture cellulaire ainsi que dans l'organisme entier.

Dans la communauté scientifique, les techniques les plus utilisées pour l'étude des VEs sont : les méthodes immunologiques (ELISA et Western Blot), les techniques optiques (cytométrie en flux, DLS, NTA) et les techniques microscopiques (TEM, AFM).[88] La partie suivante est consacrée à la description de ces méthodes d'études des VEs.

2.2.1. Principales techniques immunologiques utilisées dans la caractérisation de VEs

Le Western Blot (WB) et l'Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) sont deux méthodes utilisées permettant de faire un profil des protéines des VEs (**Figure 20**) mais ne permettent pas d'obtenir des informations sur la taille et la morphologie des VEs. Nous allons les détailler dans les paragraphes suivants.

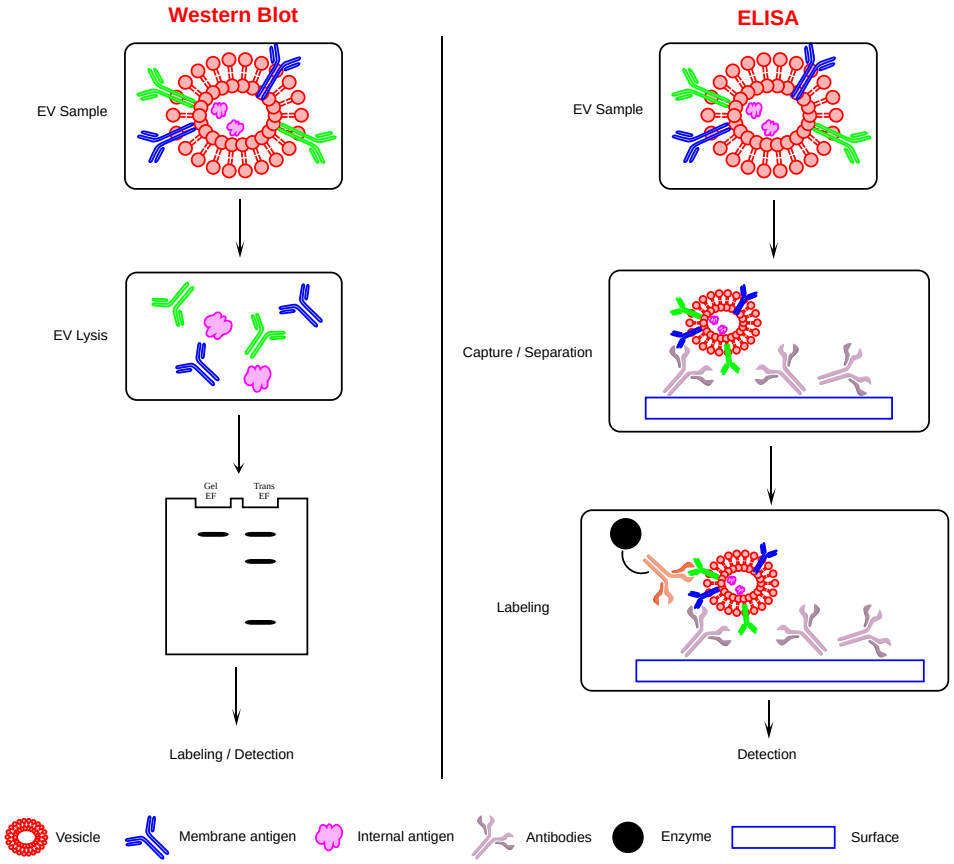


Figure 20 : comparatif des techniques immunologiques utilisées dans la caractérisation des VEs. A gauche, le WB commence par une lyse cellulaire, suivi d'un gel d'électrophorèse (Gel EF) de toutes les protéines, puis transfert de la membrane (Trans EF) avant un marquage. À droite, l'ELISA consiste en la capture de VEs sur une surface fonctionnalisée par des anticorps, puis marquage par un second anticorps[115]

Le Western Blot est une technique indiquant la présence et le poids moléculaire d'un antigène d'intérêt par gel d'électrophorèse après marquage de ce dernier.

Dans le cas des VEs, cela débute par une lyse des VEs puis toutes les protéines sont séparées par un gel d'électrophorèse selon leur charge et poids moléculaire. Les protéines ou antigènes (Ag) sont ensuite transférés à une membrane, comme la nitrocellulose. La membrane est incubée avec un anticorps (Ac) *vs* l'antigène d'intérêt, suivi par un second anticorps qui ciblera le premier anticorps. Notons, que le second anticorps est conjugué à un marqueur fluorescent ou une enzyme catalysant une réaction qui peut être suivie par colorimétrie afin de révéler la présence de l'Ag d'intérêt (**Figure 20**).[115]

En résumé, cette technique permet la détection des protéines transportées à l'intérieur et à la surface des VEs. Cependant, elle ne permet pas d'obtenir des informations comme la

[115] Coumans FAW, Gool EL, Nieuwland R. Bulk immunoassays for analysis of extracellular vesicles. *Platelets.* **2017**;28(3):242-248. doi: 10.1080/09537104.2016.1265926

forme, la taille et la concentration. Autres inconvénients : i) les VEs ne pourront être analysées complétement puisque le WB nécessite la lyse des VEs ; ii) la durée totale de l'expérience qui comprend également la récupération et l'analyse des données.[109]

L'ELISA est une méthode immuno-enzymatique sur microplaque permettant de détecter et doser un analyte à l'aide d'un révélateur. Elle permet de détecter des VEs dans différents liquides physiologiques ainsi que des petites vésicules (diamètre inférieur à 300 nm) qui ne seraient pas détectées par d'autres techniques telles que la cytométrie en flux.

Dans une étape initiale, les VEs vont être capturées d'un côté par un Ac spécifique immobilisé sur une microplaque ; un second Ac spécifique ciblant la VE est ensuite ajouté. Ce dernier pouvant être directement conjugué à une enzyme colorimétrique : un changement de couleur indique la présence du substrat d'intérêt et donc des Ag à la surface des VEs (**Figure 20**).[116]

2.2.2. Méthodes optiques

Des techniques optiques comme par exemple, la cytométrie en flux, la diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering*, DLS), l'analyse du suivi individuel de particules (*Nano-particle Tracking Analysis, NTA*) sont utilisées afin d'une part de détecter des VEs, mais aussi de les quantifier, déterminer leur origine cellulaire et/ou leur taille.

- La cytométrie en flux (CF) est une des méthodes les plus utilisées pour étudier les VEs. En effet, elle permet d'estimer la taille/forme et quantifier les particules analysées. Dans un cytomètre en flux traditionnel, on retrouve un système fluidique et optique.

Le système fluidique permet le passage d'échantillons contenant les particules à travers l'instrument (**Figure 21A**). Les particules marquées au préalable vont passer une par une à travers un faisceau laser, la lumière diffusée (*forward scatter*, FSC et *side scatter*, SSC) et la fluorescence émise arrivent à différents capteurs et seront convertie en données numériques pour être analysées.

[116] Hornbeck PV. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Curr. Protoc. Immunol.* **2015**;110(1): p.2.1.1-2.1.23. doi: 10.1002/0471142735.im0201s110

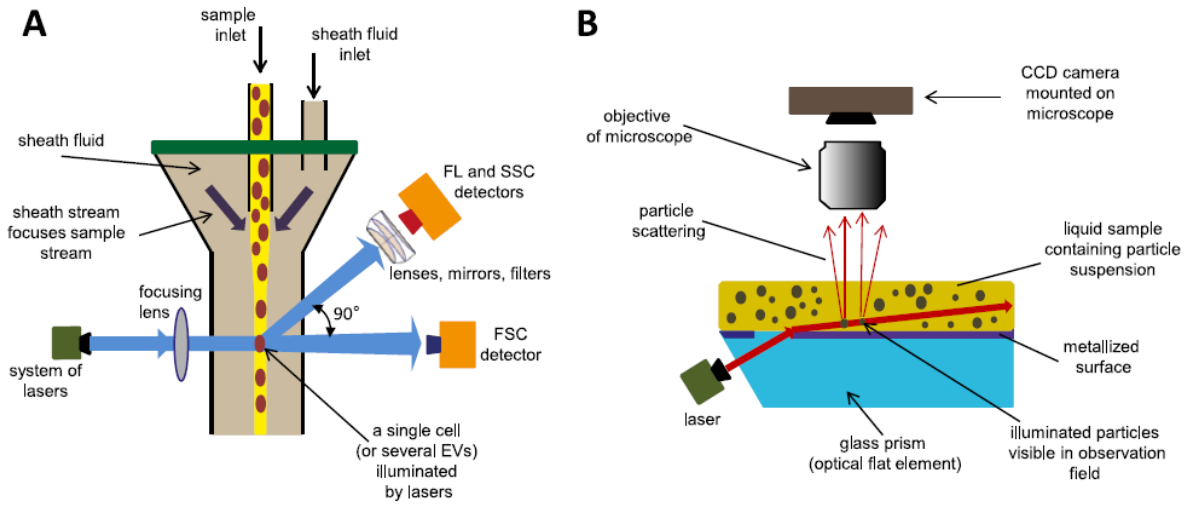


Figure 21 : principe de (A) la cytométrie en flux (FC) et de (B) l'analyse de suivi individuel de particules (NTA)[117]

Cette technique permet de caractériser les échantillons dont la taille est supérieure à la longueur d'onde du laser. Dans le cas des VEs, la CF ne permet pas de mesurer celles dont la taille est en-dessous de 300 nm (la limite de détection).[118] Certains appareils à la pointe de la technologie sont capables de détecter des molécules de 100 nm.[119] Dans certains cas, les VEs peuvent être marquées par des ligands fluorescents associés à des anticorps afin de cibler les antigènes sur la surface des VEs.[120]

En résumé, la CF est une puissante technique utilisée par beaucoup de laboratoire de recherche pour analyser des VEs dans les fluides biologiques.[121] Cependant, seule une concentration approximative peut être donnée compte tenu de la limite de détection. De plus, une calibration préliminaire est nécessaire pour déterminer la taille et la concentration des

[117] Shpacovitch V, Hergenröder R. Optical and surface plasmonic approaches to characterize extracellular vesicles. *Anal. Chim. Acta.* **2018**;1005:1-15. doi: 10.1016/j.aca.2017.11.066
[118] Erdbrügger U, Lannigan J. Analytical challenges of extracellular vesicle detection: A comparison of different techniques: Analytical Challenges of Extracellular Vesicle Detection. *Cytometry*. **2016**;89(2):123-124. doi: 10.1002/cyto.a.22795
[119] Kibria G, Ramos EK, Lee KE, et al. A rapid, automated surface protein profiling of single circulating exosomes in human blood. *Sci Rep*. **2016**;6(1):1-9. doi: 10.1038/srep36502
[120] Van der Pol E, Coumans F, Varga Z, et al. Innovation in detection of microparticles and exosomes. *J. thromb. Haemostasis*. **2013**;11(1):36-45. doi: 10.1111/jth.12254
[121] Nolan JP. Flow Cytometry of Extracellular Vesicles: Potential, Pitfalls, and Prospects. *Curr. Protoc. Cytom.* **2015**;73(1):13.14.1-13.14.16. doi: 10.1002/0471142956.cy1314s73

VEs dans un échantillon, le tout combiné à des coûts et des durées d'expérience élevés (> 4 h) ce qui restreint l'utilisation de la CF pour l'analyse de VEs en routine.[122]

- L'analyse du suivi individuel de particules (*Nano-Particle Tracking Analysis, NTA*) est une autre méthode optique utilisée permettant de déterminer la taille (10 - 2000 nm) et la concentration des particules présentes dans un échantillon. Elle repose sur la diffusion de la lumière et le mouvement Brownien. La détection s'effectue grâce à un microscope (**Figure 21B**). Certains dispositifs de NTA peuvent avoir deux modes de fonctionnement en analysant : 1) la lumière diffusée par les particules et 2) la lumière fluorescente de particules marquées.

- La diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering, DLS*) peut être utilisée pour déterminer la distribution de taille des EXOs et MVs en mesurant le changement dans l'intensité de la lumière diffusée au contact des particules en suspension (**Figure 22**). Cependant, elle ne permet pas de différencier les sous-populations de VEs.[117]

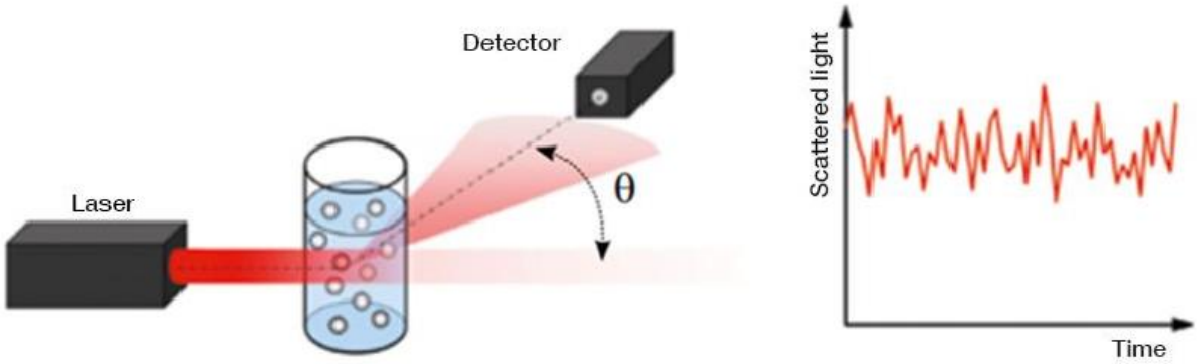


Figure 22 : principe de base de la DLS (Dynamic Light Scattering)[123]

Plus précisément, l'échantillon va être illuminé par un faisceau laser qui au contact des VEs va diffuser la lumière incidente dans toutes les directions. Ces VEs vont être constamment en mouvement de manière aléatoire dû aux collisions avec les molécules de solvant (mouvement Brownien). Dû à ce mouvement Brownien, la distance entre chaque particule est constamment en changement créant des changements d'interférence. Cela abouti

[122] Van der Vlist EJ, Nolte-'t Hoen ENM, Stoorvogel W, et al. Fluorescent labeling of nano-sized vesicles released by cells and subsequent quantitative and qualitative analysis by high-resolution flow cytometry. *Nat. Protoc*. **2012**;7(7):1311-1326. doi: 10.1038/nprot.2012.065

[123] ISO. Particle size analysis. ISO. Accessed March 31, **2021**. https://www.iso.org/cms/render/live/en/sites/isoorg/contents/data/standard/06/54/65410.html

à des fluctuations de l'intensité de la lumière détectée. La vitesse de fluctuation dépend de la vélocité des particules (les particules de petite taille se déplacent plus vite), de la viscosité du solvant et de la température de l'expérience. Par conséquent, le profil de distribution de taille des VEs peut être obtenu en analysant les fluctuations de la lumière diffusée en fonction du temps.[124]

La DLS ne permet pas d'obtenir d'informations phénotypiques concernant les particules analysées. Si cette technique de mesure n'est pas combinée à une autre, l'utilisateur obtiendra des valeurs précises uniquement pour des échantillons contenant des particules de taille similaire (échantillon monodisperse). Cela limite l'utilisation de la DLS pour la détermination de taille des VEs dans les fluides biologiques (urine, plasma, salive…) étant donné qu'ils contiennent des VEs de tailles variées.[125] Par contre, elle est plus appropriée à la détermination de la taille des VEs issues de cultures cellulaires, où la taille des VEs attendue est monodisperse.[117]

2.2.3. Méthodes microscopiques

Différentes techniques microscopiques peuvent être utilisées pour caractériser les VEs. Cependant, les VEs ne peuvent être observées avec un microscope optique classique étant donné que leur diamètre est inférieur à la longueur d'onde optique du microscope.

- L'utilisation du microscope électronique à transmission (*Transmission Electron Microscopy, TEM*) permet de détecter et d'observer des particules de petites tailles (jusqu'à 0.1 nm). Cependant, une préparation minutieuse doit être effectuée avant analyse (fixation, déshydratation) et celle-ci peut affecter la taille et la morphologie des vésicules analysées.[126]

C'est pour cela que ces dernières années, des groupes se sont intéressés à la cryo-microscopie électronique (*cryo-TEM*); cette dernière évite des éventuelles déformations des VEs durant la préparation des échantillons en appliquant une cryo-fixation des échantillons.[20]

---

[124] Palmieri V, Lucchetti D, Gatto I, et al. Dynamic light scattering for the characterization and counting extracellular vesicles: a powerful non-invasive tool. *J. Nanopart. Res.* **2014**;16(9):2583(p1-9). doi: 10.1007/s11051-014-2583-z

[125] Van Der Pol E, Böing AN, Harrison P, et al. Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. Mattson Mp, ed. *Pharmacol. Rev.* **2012**;64(3):676-705. doi: 10.1124/pr.112.005983

[126] Wu Y, Deng W, Klinde II DJ. Exosomes: improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers. *Analyst.* **2015**;140(19):6631-6642. doi: 10.1039/C5AN00688K

Par ailleurs, des informations sur les marqueurs présents à la surface des vésicules peuvent être obtenues par immuno-marquage combiné à la TEM/Cryo-TEM (**Figure 23**). Cependant, l'étape de fixation des vésicules exclue toute utilisation dans des études fonctionnelles ultérieures.[117]

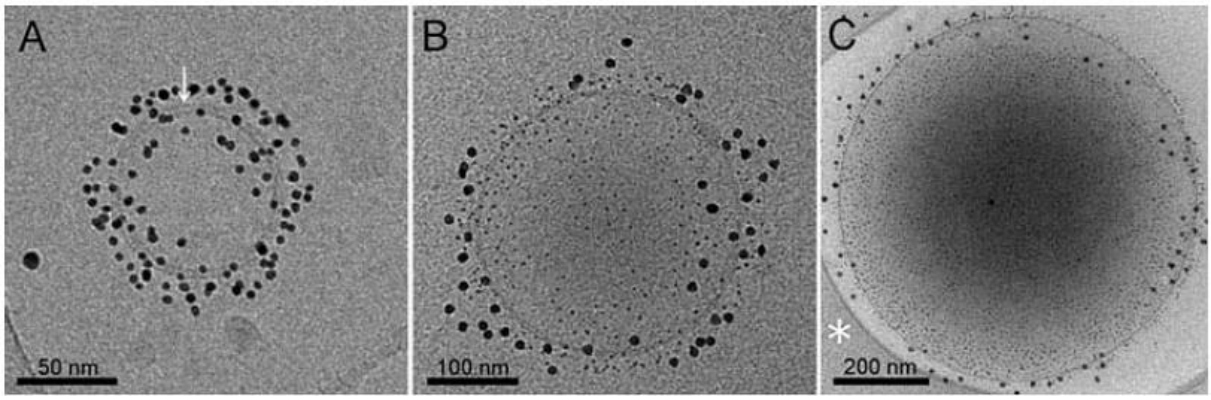


Figure 23 : images obtenues par cryo-microscopie électronique de VEs isolées à partir d'échantillon de plaquettes activées suite au marquage par A) Anx5-NPs-d'or et par B-C) CD41+/PS+. On observe dans A) la bicouche lipidique de la membrane (flèche blanche) et dans B-C) le marquage de CD41et PS, caractéristiques des MVs[20]

- Le microscope à force atomique (*Atomic Force Microscopy, AFM*) est également une technique utilisée pour obtenir des informations à la surface et caractériser la distribution de taille des particules. Les mesures par AFM permettent une visualisation de la topographie de la surface en 3D de particules et cela sans contact entre la pointe du microscope et la surface de l'échantillon. En revanche, elles ne permettent pas d'obtenir d'informations concernant la concentration des échantillons.[127]

Ensemble, la TEM et l'AFM sont deux techniques permettant de déterminer la taille des VEs et d'obtenir des informations concernant leur surface grâce à l'immuno-marquage. Cependant, elles demandent beaucoup de temps, limitant leur utilisation dans des tests de routine visant à analyser des échantillons contenant des VEs.[88]

[127] Sharma S, Rasool HI, Palanisamy V, et al. Structural-Mechanical Characterization of Nanoparticle Exosomes in Human Saliva, Using Correlative AFM, FESEM, and Force Spectroscopy. *ACS Nano*. **2010**;4(4):1921-1926. doi: 10.1021/nn901824n

2.2.4. Autres méthodes

- La détection d'impulsions résistives accordable (*Tunable Resistive Pulse Sensing, TRPS*) est une méthode pour l'analyse de particules individuelles. Elle permet la mesure de la taille et concentration des VEs en suspension, et est basée sur la mesure de la résistance électrique due au passage individuel des VEs à travers un pore au sein d'une membrane séparant deux chambres. Cependant, la TRPS ne fait pas la distinction entre les composants vésiculaires et non-vésiculaires (et qui peuvent boucher les pores en fonction de leur taille).[128]

- De manière à compléter les techniques décrites ci-dessus, il a aussi été montrer que les VEs pouvaient être isolées avec d'autres approches faisant intervenir des récepteurs non biologiques.[129,130] Par exemple, le groupe de Zhang et al, a observé la capacité d'aptamères liés à des nanoparticules d'or à détecter des MVs issues de cellules tumorales.[131] D'autres approches de détection via des complexes inorganiques ont également été décrites pour des vésicules modèles et cellules en apoptose. (cf. **CHAPITRE 2 : SYNTHESES ET ETUDES D'INTERACTIONS EN SOLUTION**).

2.2.5. Résumé et tableau récapitulatif des techniques utilisées pour la caractérisation des VEs

A travers cette partie, nous avons montré que de multiples paramètres peuvent être déterminés concernant les VEs. Il existe une variété de techniques permettant l'analyse de ces différents paramètres, l'une pouvant être plus ou moins appropriée pour la détermination d'un paramètre défini. Par ailleurs, pour obtenir un paramètre, une technique peut être plus efficace qu'une autre, mais l'obtention et l'analyse de multiples paramètres requièrent la combinaison de plusieurs techniques. Le

---

[128] Coumans FAW, Van Der Pol E, Böing AN, et al. Reproducible extracellular vesicles size and concentration determination with tunable resistive pulse sensing. *J. Extracell. Vesicles.* **2014**;3(1):25922(p1-8). doi: 10.3402/jev.v3.25922

[129] Liangsupree T, Multia E, Riekkola M-L. Modern isolation and separation techniques for extracellular vesicles. *J. Chromatogr. A.* **2021**;1636:461773. doi: 10.10156/j.cjroma.2020.461773

[130] Mun Bae S, Park S. J, Choi M, et al. PSP1, a phosphatidylserine-recognizing peptide, is useful for visualizing radiation-induced apoptosis in colorectal cancer in vitro and in vivo. *Transl. Oncol.* **2018**;11(4):1044-1052. doi : 10.1016/j.tranon.2018.06.008

[131] Wu D, Yu Y, Zhang et al. Dual-Aptamer modified graphene field-effect transistor nanosensor for label-free and specific detection of hepatocellular carcinoma-derived microvesicles. *Anal. Chem.* **2020**;92(5):4006-4015. doi: 10.1021/acs.analchem.9b05531

Tableau 5 compare les différentes techniques présentées ci-dessus et utilisées pour la caractérisation des VEs.

Tableau 5 : informations concernant les méthodes d'analyses de VEs

	ELISA/WB	CF	TRPS	NTA
Gamme de taille minimum détectée		≃ 300 nm (pour les conventionnels) et ≃ 100 nm pour les nouvelles générations	70 nm – 100 nm	10 nm – 2µm
Quantification	oui	oui	oui	oui
Taille	non	oui	oui	oui
Phénotype	oui	oui	non	oui
Durée	> 1 h	> 1 h	< 1 h	< 1 h

Par conséquent, d'après les recommandations de l'ISEV, la démarche pour l'étude des VEs doit respecter certaines conditions (non exhaustives) comme[1] :

- Les procédures de séparation et/ou d'isolement doivent être décrites en détails pour permettre leur reproductibilité. En effet, de nombreuses méthodes (précédemment décrites) sont disponibles avec des taux de récupération/pureté différents. Par ailleurs, la quantification des VEs doit être fournie (nombre de VEs/mL).

- L'utilisation de marqueurs spécifiques d'un type de VEs impliquent qu'ils doivent être choisis avec soin après vérification que le marqueur est spécifique d'un type de VEs soit non pas générique.

3. Objectifs du projet de thèse

Nous venons de voir que les microvésicules sont des vésicules extracellulaires relarguées par les cellules dans des conditions physiologiques et pathologiques;[83] Pour rappel, les MVs expriment à leur surface la phosphatidylsérine, un phospholipide anionique ainsi que, entre autres, le facteur tissulaire (*tissue factor*, *TF*) ayant un rôle dans la coagulation. Très peu étudiées en comparaison des exosomes, ce n'est qu'au cours de ces dernières années, que les MVs ont attirés l'attention des scientifiques qui les ont associées à des maladies cardio-

vasculaires, inflammatoires, etc.[82] Les MVs ont donc été proposées comme marqueurs précoces de ces pathologies.[25,132]

Compte tenu des défauts et faiblesses des méthodes d'isolation et de caractérisation existantes que nous venons de décrire ; nous proposons de développer un test, où les MVs seraient captées sur une surface solide grâce à des complexes de coordination greffés, capables de reconnaître la phosphatidylsérine. L'utilisation de ce type de composé supprimera les inconvénients rencontrés avec des tests basés sur des molécules biologiques (interférence d'autres ligands issus des fluides biologiques, dégradation par protéolyse des anticorps, sensibilité au calcium, etc) et permettrait le développement d'une méthode pour la caractérisation complète des microvésicules à des fins de diagnostic précoce. Les objectifs de cette thèse sont la synthèse et la caractérisation de complexes de coordination ainsi que l'étude de leur reconnaissance pour la phosphatidylsérine (PS).

Pour ce faire, les travaux de thèse ont été scindés en plusieurs étapes distinctes :

- La synthèse et caractérisation d'une première série de complexes à zinc(II) et cuivre(II) porteurs de groupements dipicolylamine (DPA). Une première étude de la reconnaissance de PS par le complexe de zinc a été réalisée en solution par RMN du phosphore en utilisant la O-phospho-L-sérine puis des monomères de phospholipides à chaines courtes.

- La synthèse et caractérisation d'une seconde série de complexes à zinc(II) porteurs de groupements quinoline, leur conférant des propriétés de fluorescence. Cette série a permis de réaliser l'étude des interactions complexe de coordination/PS par fluorescence en utilisant des phospholipides agencés dans des structures de complexités croissantes : 1) des monomères de phospholipides à chaînes courtes comme pour la première série, mais également, 2) des vésicules modèles dont nous pouvons contrôler la taille et la composition et enfin 3) des microvésicules isolées à partir d'échantillons de plasma humain.

- Pour finir, les études d'interactions de PS par l'ensemble des complexes de coordination ont été réalisées sur phase solide après immobilisation des complexes. Ces études ont également été menées avec des phospholipides agencés dans des structures de

[132] Amoura L, El-Ghazouani FZ, Kassem M, et al. Assessment of plasma microvesicles to monitor pancreatic islet graft dysfunction: Beta cell- and leukocyte-derived microvesicles as specific features in a pilot longitudinal study. *Am. J. Transplant*. **2020**;20(1):40-51. doi: 10.1111/ajt.15534

complexités croissantes, monomères, vésicules modèles puis microvésicules isolées à partir d'échantillons de plasma humain. Les techniques utilisées sont la résonance plasmonique de surface (SPR) et interférométrie de biocouches (BLI).

CHAPITRE 2 : SYNTHESES ET ETUDES D'INTERACTIONS EN SOLUTION

1. Utilisation des complexes bimétalliques pour la reconnaissance de composés anioniques

1.1. Généralités

La reconnaissance d'anions est un sujet de recherche majeur pour de nombreux groupes dans le monde.[133,134] En effet, les cibles biomoléculaires importantes comme les peptides, nucléotides, carbohydrates et phospholipides se trouvent être anioniques.[135]

Par exemple, des métallo-protéines via leur site actif enfoui sont capables de se lier à des phosphates et sulfates. En effet, les centres métalliques cationiques étant des acides de Lewis, ils permettent la reconnaissance d'anions (base de Lewis). Cependant, la reconnaissance d'anions en milieu aqueux reste un grand défi pour de nombreuses raisons[136] :

- Les récepteurs doivent avoir des structures complémentaires aux anions.
- Les anions sont fortement hydratés et n'importe quel processus de reconnaissance impliquant leur déshydratation sont liés à une grande dépense énergétique.[137]
- Il est difficile de développer des systèmes pour reconnaître des anions en milieu aqueux, car les molécules d'eau entrent en compétition (liaisons hydrogènes).

Pour ces raisons, il y a une nécessité d'améliorer ces affinités par des objets synthétiques, en incorporant des interactions électrostatiques, plus compétitives en milieu aqueux.

1.2. La dipicolylamine (DPA), un ligand connu

Une des stratégies les plus efficace pour la liaison et reconnaissance de phosphate anionique est l'utilisation de complexes de coordination avec un ou deux sites de coordination

---

[133] Molina P, Zapata F, Caballero A. Anion Recognition Strategies Based on Combined Noncovalent Interactions. *Chem Rev*. **2017**;117(15):9907-9972. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00814

[134] Gale PA, Howe ENW, Wu X. Anion Receptor Chemistry. *Chem*. **2016**;1(3):351-422. doi: 10.1016/j.chempr.2016.08.004

[135] O'Neil EJ, Smith BD. Anion recognition using dimetallic coordination complexes. *Coord. Chem. Rev*. **2006**;250(23-24):3068-3080. doi: 10.1016/j.ccr.2006.04.006

[136] Langton MJ, Serpell CJ, Beer PD. Anion Recognition in Water: Recent Advances from a Supramolecular and Macromolecular Perspective. *Angew. Chem., Int. Ed*. **2016**;55(6):1974-1987. doi: 10.1002/anie.201506589

[137] Marcus Y. In: Ion properties. New York : Marcel Dekker, Eds. **1997**

labiles ou échangeables. En effet, les métaux sont coordonnés à des plateformes organiques (ligand) à des distances permettant différents modes d'interaction avec la molécule anionique.

Dans le cas d'une étude de reconnaissance avec la phosphatidylsérine, différents modes d'interactions peuvent être proposés (Figure 24).

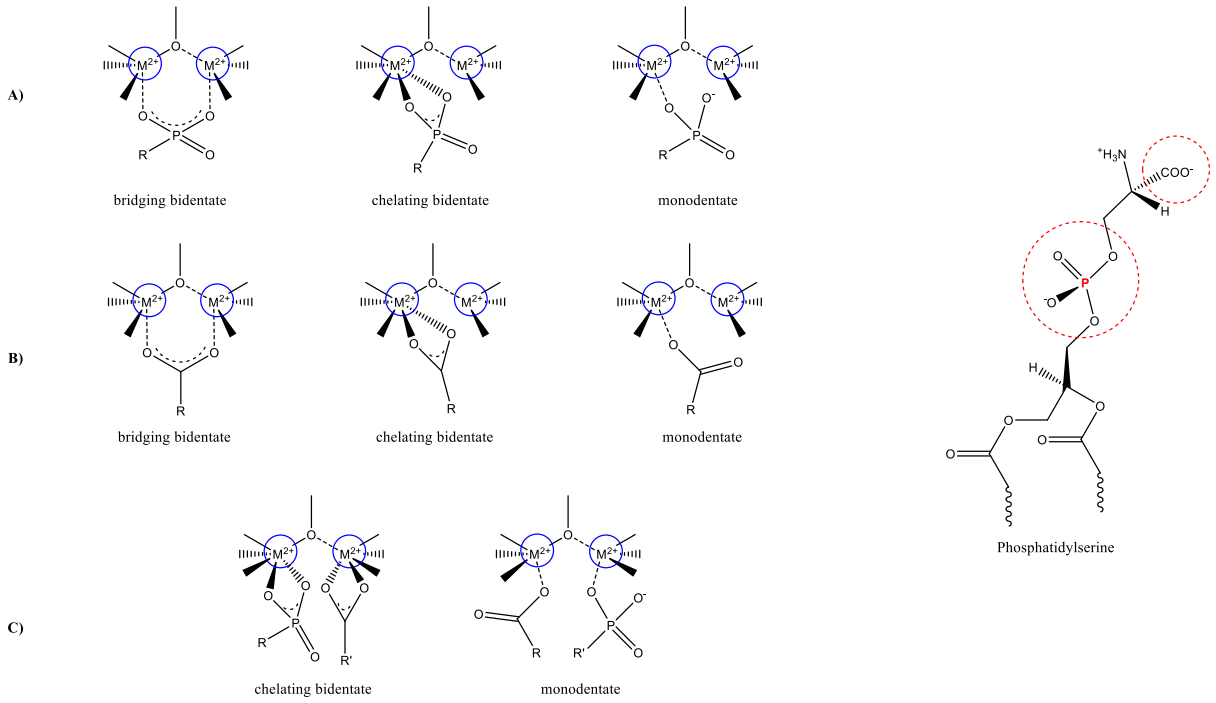


Figure 24 : reconnaissance d'anions via un complexe bimétallique ponté (phénoxo ou hydroxo). Exemples de différents modes d'interaction avec A) un phosphate, B) un carboxylate, et C) les deux

De nombreux métaux de transition et lanthanides ont servi de récepteurs;[138,139] l'un des plus utilisé est le Zn(II) : des complexes modèles inspirés de sites actifs de métallo-enzymes dans lesquels les phosphates sont des substrats ou inhibiteurs capables de coordonner un ou plusieurs ions de Zn(II) dans la poche enzymatique ont été synthétisés. De plus, leur capacité à également détecter les anions a été rapidement reconnue.[140,141]

[138] Hewitt S.H, Macey G, Mailhot R, et al. Tuning the anion binding properties of lanthanide receptors to discriminate nucleoside phosphates in a sensing array. *Chem. Sci*. **2020**;11(14):3619-3628. doi: 10.1039/D0SC00343C

[139] Ramakrishnam Raju M.V, Harris S.M, Pierre V.C. Design and applications of metal-based molecular receptors and probes for inorganic phosphate. *Chem. Soc. Rev*. **2020**;49(4):1090-1108. doi: 10.1039/C9CS00543A

[140] Singh H. Tiwari K, Tiwari R, et al. Small Molecule as Fluorescent Probes for Monitoring Intracellular Enzymatic Transformations. *Chem. Rev*. **2019**;119(22):11718-11760. doi: 10.1021/acs.chemrev.9b00379

Le ligand dipicolylamine (DPA-**Figure 25**) est l'un des ligands les plus utilisés dans ce type de système. Il a été décrit pour la première fois par le groupe de Kabzinska en 1964 comme étant un ligand tridente avec trois azotes donneurs qui permettent i) une bonne sélectivité pour le Zn^{2+} comparé à d'autres cations biologiques comme le Na^{+}, K^{+}, Mg^{2+} et Ca^{2+} et ii) des sites de coordination libres pour la liaison avec les anions.[142,143]

Des espèces mono ou bi-nucléaires peuvent être préparées en liant deux complexes monomères [Zn^{2+}-DPA] à travers différents ponts et espaceurs. Ces complexes de Zn^{2+} sont particulièrement intéressants comme senseurs puisque comparés à d'autres cations en général, ils ne quenchent (abaissent) pas la fluorescence de fluorophores.

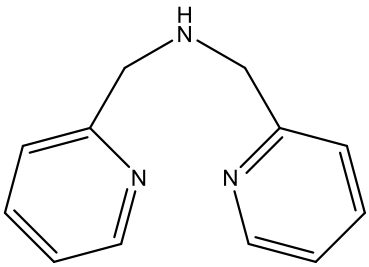


Figure 25 : représentation de la dipicolylamine (DPA)

Par exemple, le groupe de Ahn et al a synthétisé des complexes mononucléaires de Zn(II)-DPA et Cu(II)-DPA lié à un fluorophore (*2-hydroxy-6-cyanonaphtalène*) capable de reconnaitre spécifiquement le pyrophosphate (PPi) par rapport à l'adénosine triphosphate (ATP) et d'autres anions en fluorescence de type « turn-on » (**Figure 26**).[144]

---

[141] Das P, Chandar N.B, Chourey S, et al. Role of Metal Ion in Specific Recognition of Pyrophosphate Ion under Physiological Conditions and Hydrolysis of the Phosphoester Linkage by Alkaline Phosphatase. *Inorg Chem*. **2013**;53(19):11034-11041. doi: 10.1021/ic401243h

[142] Biniecki S, Kabzinska S. Synthesis of bis-(pyridylmethyl)-amines. *Ann Pharm Fr*. **1964**;22:685-687.

[143] Xue L, Wang H-H, Wang X-J, et al. Modulating Affinities of Di-2-picolylamine(DPA)-Substituted Quinoline Sensors for Zinc Ions by Varying Pendant Ligands. *Inorg Chem*. **2008**;47(10):4310-4318. doi: 10.1021/ic702393z

[144] Roy B, Raso AS, Ahn KH. Mononuclear Zn(II)- and Cu(II)-complexes of a hydroxynaphthalene-derived dipicolylamine; fluorescent sensing behaviours toward pyrophosphate ions. *Org. Biomol. Chem*. **2011**;9(22):7774-7779. doi: 10.1039/c1ob05999h

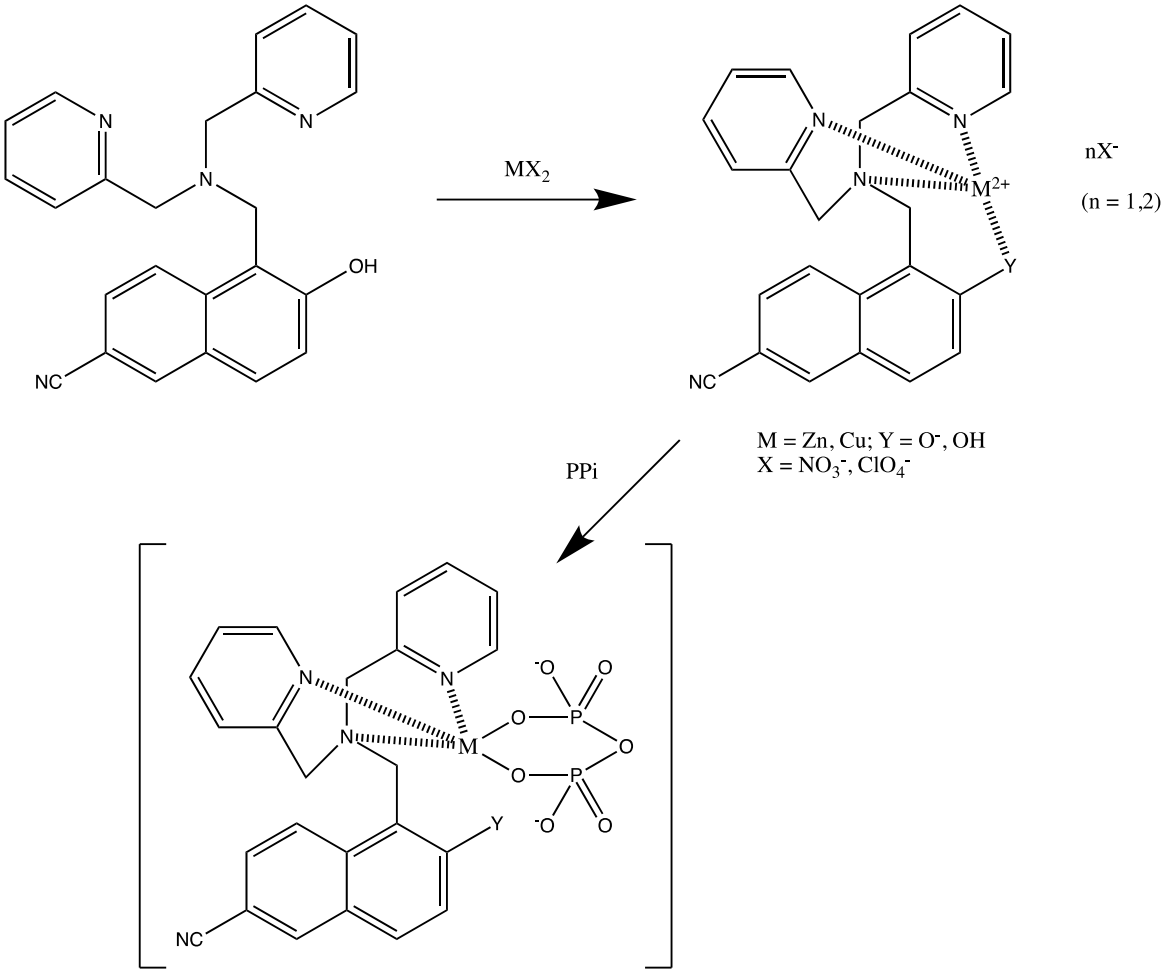


Figure 26 : représentation schématique des complexes de Zn(II) et de Cu(II) de dipicolylamine-hydroxynaphtalène interagissant avec le PPi[93]

1.3. De la DPA à la phosphatidylsérine et choix structural

Pour rappel, une méthode permettant de détecter la PS à la surface des membranes des microvésicules est l'utilisation de l'annexine V (AV).[145,146] Cependant, cette protéine coûteuse couplée à un fluorophore nécessite la présence de Ca^{2+}, de l'ordre du mM pour pouvoir se lier complètement avec la membrane. L'utilisation du Ca^{2+} peut conduire à des faux positifs puisque la membrane possède parmi ses composants la scramblase qui est l'enzyme, dépendante du calcium, capable de transférer la PS d'un feuillet à l'autre de la membrane.

[145] Van Heerde WL, Robert-Offerman S, Dumont E, et al. Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V. *Cardiovasc. Res.* **2000**;45(3):549-559. doi: 10.1016/s0008-6363(99)00396-x
[146] Ma Y-H, Li B, Yang J, et al. Calcium-dependent and -independent annexin V binding: distinct molecular behaviours at cell membrane interfaces. *Chem. Commun.* **2020**;56(11):1653-1656. doi: 10.1039/c9cc09184j

De plus, une interaction totale avec l'AV nécessite une durée d'incubation d'une heure, problématique pour des tests cinétiques.[57,147,148] Bien que, l'AV est utilisée pour reconnaître la PS, il y a un intérêt à développer une molécule de faible poids moléculaire capable de détecter la PS rapidement et indépendamment du calcium.

La structure résolue à 1.9 Å par diffraction des rayons X de l'AV liée à la glycérophosphosérine (GPS) montre que la partie phosphosérine (tête polaire) est associée avec un des quatre domaines de l'AV via deux ions calcium pontés, par les groupements de la GPS (phosphate et carboxylate chacun sur un calcium) : la distance entre les deux atomes de Ca^{2+} étant de 8.7 Å (Figure 27).[149] Des complexes de coordination pourraient reconnaître la PS et donc mimer fonctionnellement l'AV (et non structurellement dans la mesure où la distance entre les deux atomes de Ca^{2+} est de 8.7 Å pour l'AV).

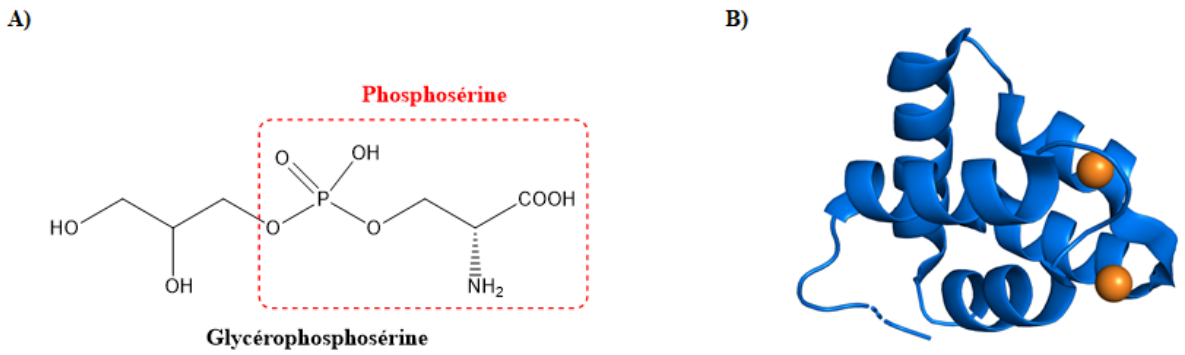


Figure 27 : A) représentation de la glycérophosphosérine (GPS) et de sa partie phosphosérine (tête polaire). B) visualisation d'un domaine de l'AV (bleu) pouvant interagir avec la glycérophosphosérine en présence d'ions calciums (représentés avec des sphères jaunes)

[147] Zweifach A. FM1-43 reports plasma membrane phospholipid scrambling in T-lymphocytes. *Biochem. J.* **2000**;349(1):255-260. doi: 10.1042/0264-6021:3490255

[148] Stoner S. A, Duggan E, Condello D, et al. High Sensitivity Flow Cytometry of Membrane Vesicles. *Cytometry, Part A*. **2016**;89(2):196-206. doi: 10.1002/cyto.a.22787.

[149] Swairjo MA, Concha NO, Kaetzel MA, et al. Ca^{2+}-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1995**;2(11):936-974. doi: 10.1038/nsb1195-968

Dans la littérature, des complexes de Zn(II)-DPA associés à des espaceurs ou des supports (macrocycliques, peptidiques…) se sont montrés efficaces comme senseurs de bicouches lipidiques enrichies de phospholipides anioniques (PS), ou d'autres composés anioniques comme le pyrophosphate.[150,151,152,153,154]

En particulier, le groupe de Smith a été pionnier pour la détection de PS située sur les membranes. Des complexes bimétalliques de Zn(II)-DPA (**Figure 28A**) couplés à un fluorophore (NBD : nitrobenzoxadiasole) ont été utilisés dans la reconnaissance de vésicules modèles (**Figure 28B**).[151]

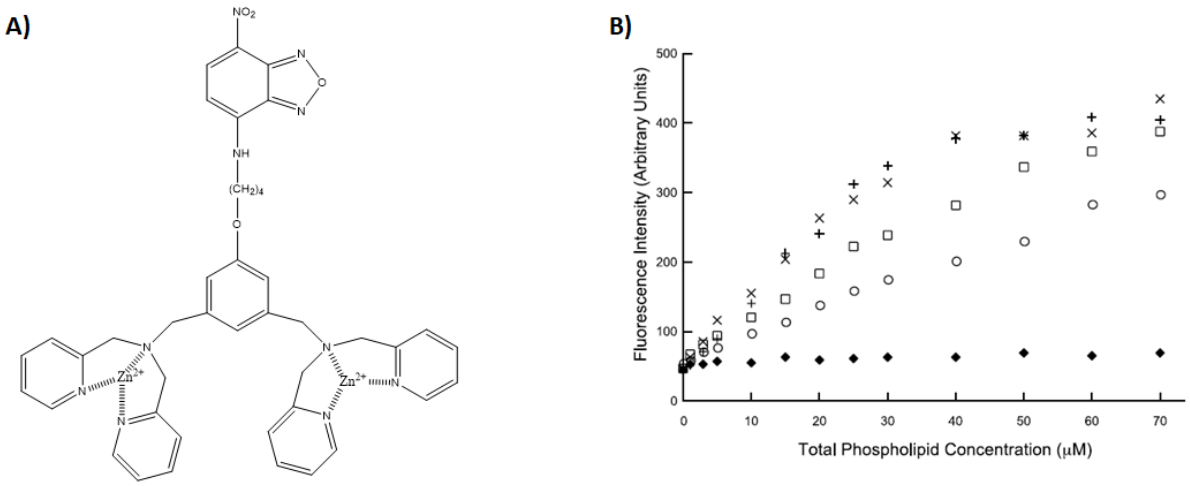


Figure 28 : A) exemple du complexe Zn(II)-DPA lié à un fluorophore NBD. B) intensité de fluorescence après addition de vésicules POPC et 0 % (◆), 5% (○), 10 % (□), 20 % (X), ou 50 % (+) de POPS[151]

[150] Oh J, Hong J-I. Molecular Recognition of Pyrophosphate with Extended Bis(Zn(II)-DPA) Derivatives. *J. Org. Chem*. **2019**;84(24):15797-15804. doi: 10.1021/acs.joc.9b01726

[151] Lakshmi C, Hansha RG, Smith BD. Fluorophore-linked zinc(II)dipicolylamine coordination complexes as sensors for phosphatidylserine-containing membranes. *Tetrahedron*. **2004**;60(49):11307-11315. doi: 10.1016/j.tet.2004.08.052

[152] Turkyilmaz S, Rice DR, Palumbo R, Smith BD. Selective recognition of anionic cell membranes using targeted liposomes coated with zinc(II)-bis(dipicolylamine) affinity units. *Org. Biomol. Chem*. **2014**;12(30):5645-5655. doi: 10.1039/C4OB00924J

[153] Clear KJ, Harmatys KM, Rice DR, et al. Phenoxide-Bridged Zinc(II)-Bis(dipicolylamine) Probes for Molecular Imaging of Cell Death. *Bioconjugate Chem*. **2016**;27(2):363-375. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00447

[154] Jollife KA. Pyrophosphate Recognition and Sensing in Water Using Bis[zinc(II)dipicolylamino]-Functionalized Peptides. *Acc. Chem. Res*. **2017**;50(9):2254-2263. doi: 10.1021/acs.accounts.7b00252

Très actif dans ce domaine de recherche, ce groupe a introduit différentes fonctions permettant des applications intracellulaire ou la reconnaissance sélective de cellules en apoptose.[155] Toujours en utilisant une détection par fluorescence, il a également montré que le complexe bi-nucléaire de Zn(II)-DPA espacé par un anthracène (PSS-380) (**Figure 29A**) était capable de détecter la PS à la surface de vésicules modèles.[156] L'intensité de fluorescence émise par PSS-380 est inchangée avec des vésicules synthétiques formées uniquement avec de la phosphatidylcholine. Cependant, on observe une amélioration d'intensité de fluorescence par 10 après addition de vésicules formées avec un ratio 50:50 de 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoserine (POPC:POPS). POPC et POPS étant respectivement des modèles de la phosphatidylcholine et de la phosphatidylsérine. De même des vésicules contenant 5 % de POPS permettent une amélioration d'intensité de fluorescence par 4 (**Figure 29B**).[156]

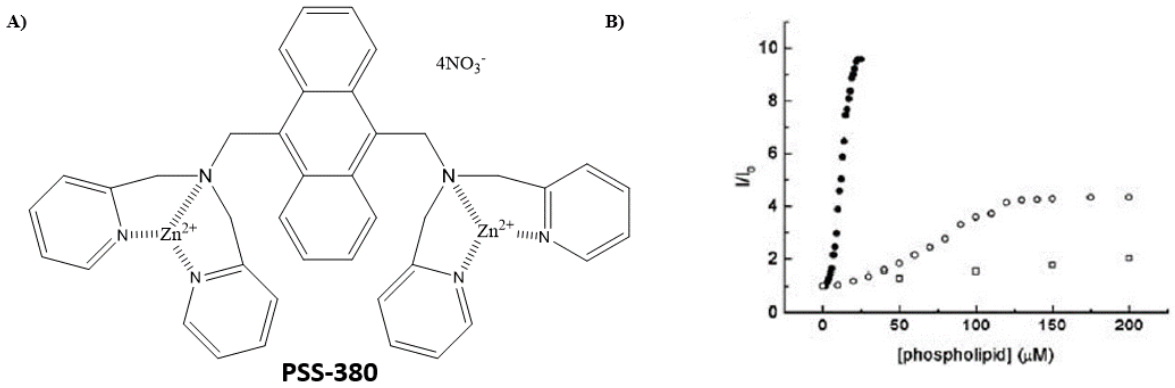


Figure 29 : A) représentation du complexe bimétallique de zinc (PSS-380); B) changement de l'intensité de fluorescence I/I_0 (ex 380, em 440 nm) de PSS-380 (1 µM) dans le tampon HEPES (10 mM, pH 7.2) après addition de vésicules unilamellaires constituées de 100 % POPC (□), POPC:POPS (95:5, ○), et POPC:POPS (50:50, ●)[156]

Toujours à l'aide des complexes Zn(II)-DPA couplés à un fluorophore, ce même groupe a décrit un composé à même de reconnaître des cellules apoptotiques en imagerie sur petit animal.[153]

[155] Hanshaw RG, Lakshmi C, Lambert TN, et al. Fluorescent Detection of Apoptotic Cells by using Zinc Coordination Complexes with a Selective Affinity for Membranes Surfaces Enriched with Phosphatidylserine. *ChemBioChem*. **2005**;6(12):2214-2220. doi: 10.1002/cbic.200500149

[156] Koulov AV, K A Stucker, C Lakshmi, et al. Detection of apoptotic cells using a synthetic fluorescent sensor for membrane surfaces that contain phosphatidylserine. *Cell Death Differ*. **2003**;10(12):1357-1359. doi: 10.1038/sj.cdd.4401315

De plus, une forte affinité de PS localisé dans la bicouche lipidique vis-à-vis de sels de Cu^{2+} a été constatée, mais cette particularité n'a pas (encore) été explorée dans le domaine de la détection des microvésicules.[157,158] Ceci nous a incité à explorer l'utilisation des complexes de coordination cuivrique dans le cadre de nos travaux.

D'autre part, au sein de notre équipe, les ligands de type H-BPP (2,6-Bis[bis(2-pyridylmethyl)aminomethyl]-phénol), substitués ou non en para du groupement phénol (**Figure 30A**), ont été largement utilisés pour préparer des complexes binucléaires avec des sels de cuivre(II), zinc(II), fer(III).[159,160,161,162] Les ions métalliques sont complexés par les unités DPA et pontés par le phénoxo qui permet de maintenir les ions métalliques à des distances proches de l'ordre de 2.9 à 4.0 Å.

En particulier, il a été précédemment montré que des complexes binucléaires (Zn(II)Zn(II), Fe(III)Fe(III) ou encore Fe(III)Zn(II) basés sur les ligands de types H-BPP sont capables d'interagir avec des phosphates et peuvent accélérer l'hydrolyse d'esters de phosphate. A titre d'exemple, la structure obtenue par diffraction des rayons X montrant l'interaction d'un complexe hétérobinucléaire Fe(III)Zn(II) et de deux molécules de diphényl phosphate en mode pontant est illustrée (**Figure 30B**).[162]

Pour une distance intermétallique de 3.7 Å, la distance entre les atomes d'oxygènes du diphényl phosphate liés aux centres métalliques est de l'ordre de 2.6 Å. Cette architecture de type H-BPP est donc en mesure d'interagir avec des phosphates, c'est pourquoi elle a été choisie dans le cadre de ce travail. Pour préparer les complexes, nous avons intégré des groupements $-CH_2-NH_2$ ou ($-CH_2-NHCO-(CH_2)_5-NH_2$) en *para* du groupement phénol afin de pouvoir être greffés (via la fonction amine) et mettre en œuvre une possible détection des

---

[157] Monson CF, Cong X, Robison AD, et al. Phosphatidylserine Reversibly Binds Cu^{2+} with Extremely High Affinity. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**;134(18):7773-7779. doi: 10.1021/ja212138e

[158] Cong X, Poyton MF, Baxter AJ, et al. Unquenchable Surface Potential Dramatically Enhances Cu^{2+} Binding to Phosphatidylserine Lipids. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**;137(24):7785-7792. doi: 10.1021/jacs.5b03313

[159] Torelli S, Belle C, Gautier-Luneau I, et al. pH-Controlled Change of the Metal Coordination in a Dicopper(II) Complex of the Ligand H-BPMP : Crystal Structures, Magnetic Properties, and Catecholase Activity. *Inorg. Chem.* **2000**;39(16):3256-3536. doi: 10.1021/ic010534g

[160] Belle C, Beguin C, Gautier-Luneau I, et al. Dicopper(II) Complexes of H-BPMP-Type Ligands: pH induced Changes of Redox, Spectroscopic (19F NMR Studies of Fluorinated Complexes), Structural Properties, and Catecholase Activities. *Inorg. Chem.* **2002**;41(3):479-491. doi:10.1021/ic010534g

[161] Selmeczi K, Michel C, Milet A, et al. Structural, Kinetic, and Theoretical Studies on Models of the Zinc-Containing Phosphodiesterase Active Center: Medium-Dependent Reaction Mechanisms. *Chem. – Eur. J.* **2007**;13(32):9093-9106. doi: 10.1002/chem.200700104

[162] Albedyhl S, Averbuch-Pouchot MT, Belle C, et al. Dinuclear Zinc(II)-Iron(III) and Iron(II)-Iron(III) Complexes as Models for Purple Acid Phosphatases. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2001**;2001(6):1457-1464. doi: 10.1002/1099-0682

MVs sur support solide. En effet, PS étant un phospholipide anionique présent à la surface des MVs ; cette particularité peut permettre une reconnaissance sélective entre la PS et d'autres phospholipides neutres ou cationiques et par extension permettre la reconnaissance sélective entre les microvésicules et les exosomes.

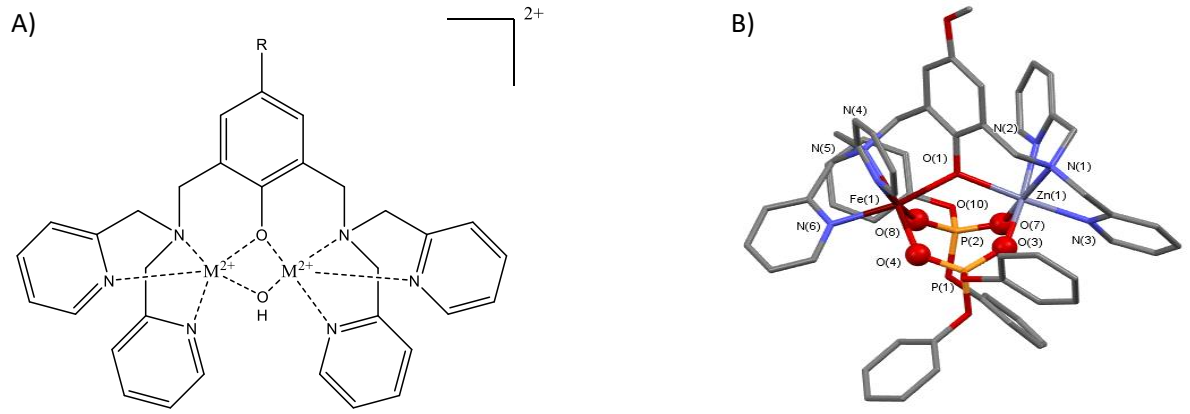


Figure 30 : A) famille de complexes basés sur des ligands de type H-BPP mis en œuvre dans ce travail, M=Zn ou Cu ; et B) exemple de structure d'un complexe FeZn lié à deux anions diphényl phosphate en mode pontant[162]

Au cours de ce chapitre, nous allons présenter la synthèse de deux séries de ligands : une première basée sur le groupement DPA partiellement caractérisée en début de ce travail et une seconde basée sur le groupement quinoline (pour une éventuelle détection par fluorescence). Aux synthèses et caractérisations des complexes de zinc, nous compléterons ce travail par celles des complexes de cuivre(II) correspondants. En effet, il a été montré que le Cu^{2+} peut lier la PS avec la capacité à interagir simultanément avec les fonctions carboxylate et amine de la tête polaire de la PS.[157,163]

Par la suite, ces complexes ont été utilisés pour des études d'interactions en solution avec des entités de phospholipides de complexité croissante : 1) avec l'O-phospho-L-sérine, la partie polaire de la phosphatidylsérine (PS) nommée 'tête polaire', 2) des phospholipides modèles de PS et PC (phosphatidylcholine) avec des parties hydrophobes 'à chaînes courtes', 3) des vésicules synthétiques dont nous avons pu contrôler la taille et la composition et enfin 4) des microvésicules issus d'échantillons biologiques (**Figure 31**).

[163] Kusler K, Odoh SO, Silakov A, et al. What Is the Preferred Conformation of Phosphatidylserine-Copper(II) Complexes ? A combined Theoretical and Experimental Investigation. *J. Phys. Chem. B*. **2016**;120(50):12883-12889. doi: 10.1021/acs.jpcb.6b10675

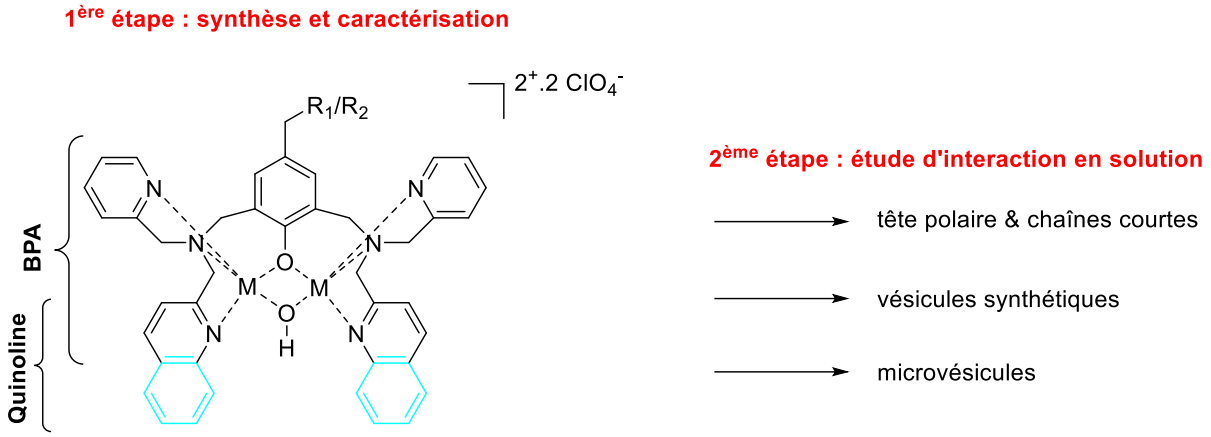


Figure 31 : stratégies mises en œuvre pour les études d'interactions en solution des différents complexes bimétalliques : des phospholipides simples aux microvésicules

Par ailleurs, la question de l'interférence avec d'autres phospholipides anioniques/zwiterioniques comme le phosphatidylinositol ou l'acide phosphorique pourrait être soulevée dans la détection de microvésicules dans les fluides biologiques. Cependant, les phospholipides anioniques sont majoritairement localisés dans la couche interne de la bicouche lipidique, les rendant non accessibles pour entrer en compétition avec la PS exposée à la surface des MVs libérées par des cellules activées.

2. Synthèse et études de reconnaissance de la phosphatidylsérine avec les complexes basés sur les ligands de type DPA (1ère série)

2.1. Synthèse des ligands CC-DPA et LC-DPA (1ère série)

Le ligand CC-DPA (**5**) est obtenu en trois étapes à partir de l'intermédiaire (**1**) préalablement synthétisé avant le début de ce présent travail. Après une première étape de chloration (**2**), deux équivalents de DPA (**3**) sont condensés sur l'intermédiaire chloré (**2**) dans le THF anhydre à 0°C. Le produit (**4**) est alors déprotégé avec de l'hydrazine en excès dans de l'éthanol à température ambiante afin d'obtenir le ligand **(5)** dit « chaîne courte » (CC)-DPA (**Figure 32**).

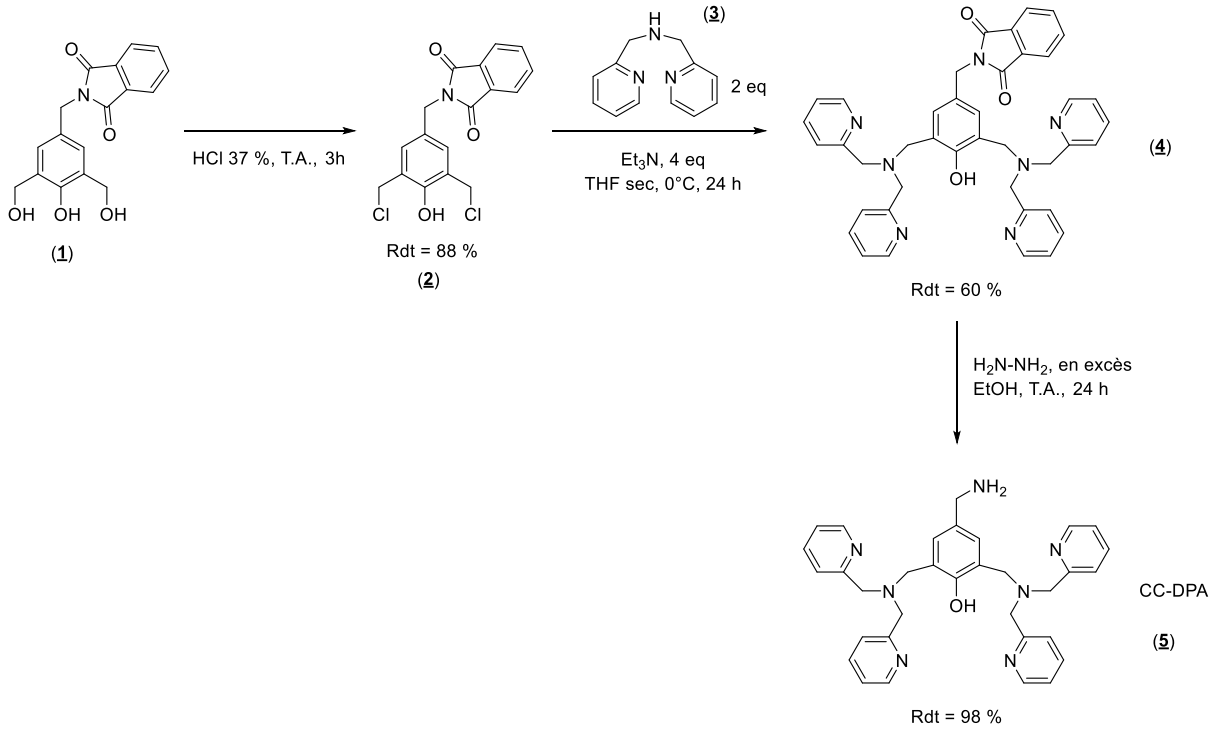


Figure 32 : synthèse du ligand CC-DPA. Conditions (2) : HCl 37 %, T.A., 3h, 88% ; (4) : 2.2'-dipicolylamine, Et_3N, THF sec, 0°C, 24h, 60% ; (5) : H_2N-NH_2, EtOH, T.A., 24 h, 98 %

Par la suite, un deuxième ligand (**8**) dit « longue chaîne » (LC-DPA) est synthétisé à partir du ligand (**5**) CC-DPA en deux étapes : 1) premièrement, pour le greffage d'une chaîne à 6 carbones (**6**) est condensé sur le ligand (**5**) CC-DPA activé par l'HATU (hexafluorophosphate de (diméthylamino)-N,N-diméthyl(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-yloxy)méthaniminium) dans le dichlorométhane afin d'obtenir le ligand (**7**) LC-DPA protégé par un groupement tert-butoxycarbonyle (BOC) ; 2) puis une étape de déprotection avec de

l'acide trifluoroacétique (TFA) est menée pour au final obtenir le ligand (**8**) LC-DPA (**Figure 33**).

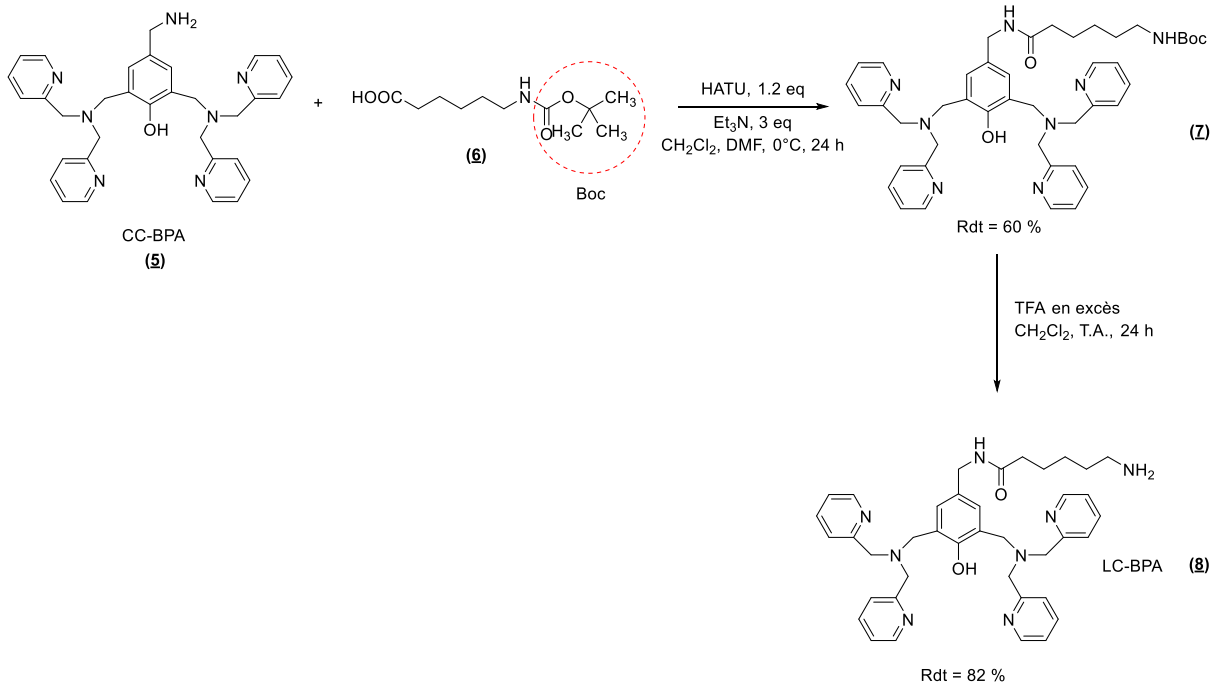


Figure 33 : synthèse du ligand LC-DPA. Conditions (7) : (6), HATU, Et_3N, CH_2Cl_2, DMF, 0°C, 24 h, 60 % ; (8) : TFA, CH_2Cl_2, T.A., 24 h, 82 %

Par la suite, ces deux ligands sont utilisés dans la préparation de complexes dinucléaires de Zn(II) et de Cu(II).

2.2. Préparation des complexes dinucléaires de Cu(II) ou Zn(II)

Les ligands de type H-BPP possèdent un groupement phénol qui n'est pas nécessairement pontant entre les deux ions métalliques après complexation. Les travaux précédents du laboratoire ont montré qu'en présence de deux équivalents de triéthylamine et d'eau, les formes doublement pontés (par le phénoxo et un hydroxo) sont obtenues (**Figure 34**).[164,165,166]

[164] Torelli S, Belle C, Gautier-Luneau I, et al. pH-Controlled Change of the Metal Coordination in a Dicopper(II) Complex of the Ligand H-BPMP: Crystal Structures, Magnetic Properties, and catecholase Activity. *Inorg. Chem*. **2000**;39(16):3526-3536. doi: 10.1021/ic991450z

[165] Belle C, Beguin C, Gautier-Luneau I, et al. Dicopper(II) Complexes of H-BPMP-Type Ligands: pH induced Changes of Redox, Spectroscopic (19F NMR Studies of Fluorinated Complexes), Structural Properties, and Catecholase Activities. *Inorg. Chem*. **2002**;41(3):479-491. doi: 10.1021/ic010534g

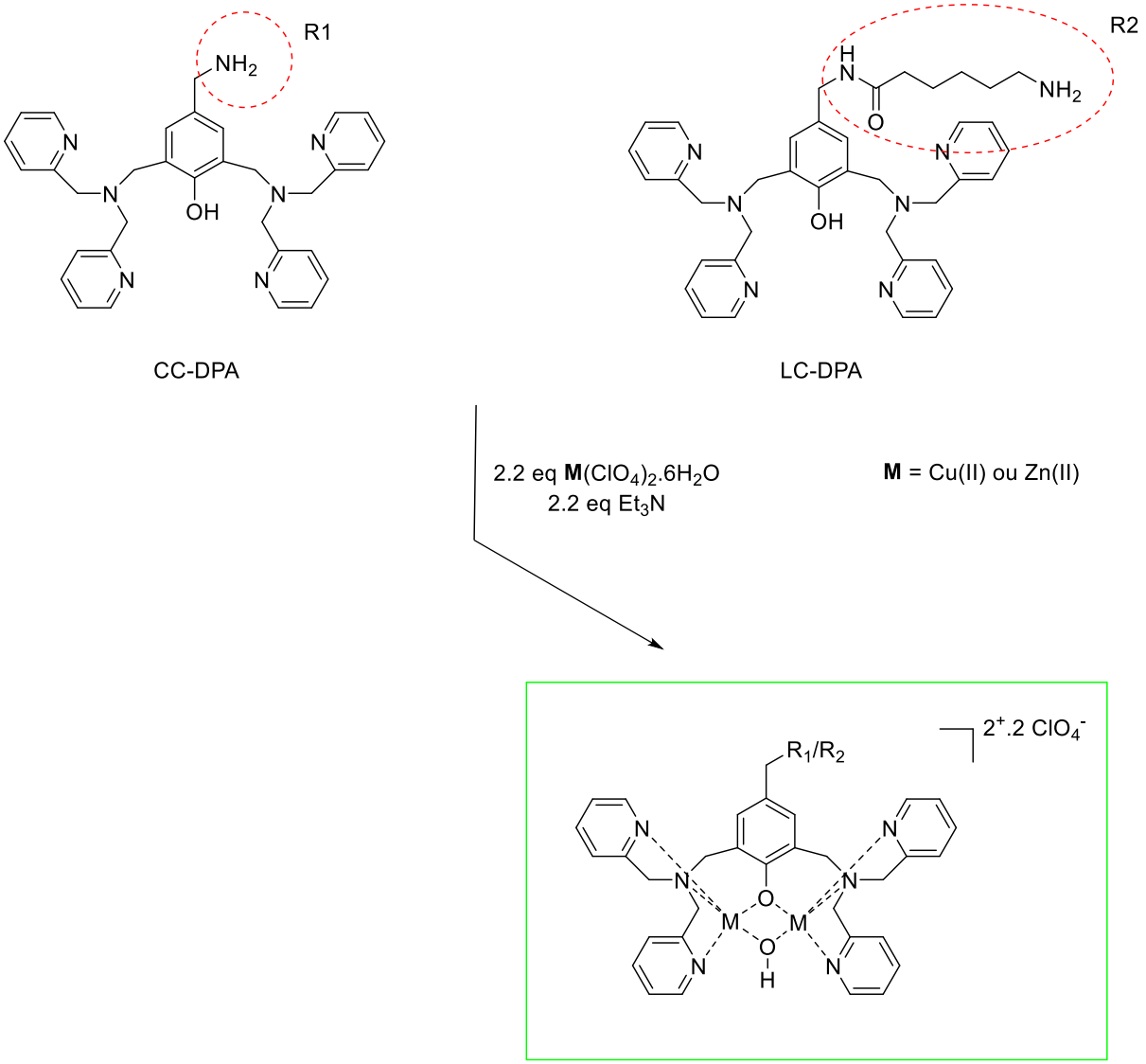


Figure 34 : préparation des différents complexes dinucléaires de Cu(II) ou Zn(II) dans CH_3CN

De manière générale, les complexes sont préparés dans l'acétonitrile à partir d'un équivalent de ligand (CC-DPA ou LC-DPA) et de 2.2 équivalents de perchlorate de M(II) (avec M = Cu ou Zn) hexahydrate et en présence 2.2 équivalents de triéthylamine. Les produits sont récupérés par précipitation à – 20°C après addition de THF ou d'éther diéthylique. Une deuxième précipitation peut être nécessaire pour obtenir les complexes attendus sous forme de poudre. La principale difficulté de ces synthèses est l'élimination des dernières traces de sels de perchlorate de triéthylamine : ceci se fait par lavage successifs dans du THF. Les 4 complexes ciblés obtenus seront mentionnés dans ce manuscrit sans les contre

[166] Selmeczi K. Michel C, Milet A, et al. Structural, Kinetic, and Theoretical Studies on Models of the Zinc-Containing Phosphodiesterase Active Center: Medium-Dependent Reaction Mechanisms. Chem. – *Eur. J.* **2007**;13(32):9393-9106. doi: 10.1002/chem.200700104

ions perchlorates et seront désormais appelés : Cu^{2+}CC-DPA, Cu^{2+}LC-DPA, Zn^{2+}CC-DPA et Zn^{2+}LC-DPA.

2.3. Caractérisation des complexes de Zn(II)

2.3.1. ESI-MS et RMN

Les complexes de zinc obtenus avec les ligands CC et LC ont été analysés à l'état solide par l'analyse élémentaire (partie expérimentale) qui pour chaque complexe correspond à la présence de trois ions perchlorates en accord avec une protonation du complexe via l'amine terminale sous forme NH_3^+. En solution dans l'acétonitrile pour le complexe Zn^{2+}CC-DPA les analyses par ESI-MS en mode positif montre la présence d'une espèce tri-chargée à *m/z* = 230.05 (*z* = 3) attribuée à l'espèce $[M\text{-}3ClO_4^-]^{3+}$ avec M correspondant au complexe doublement ponté par le phénoxo et un hydroxo avec la fonction amine terminale protonée ($Zn_2(C_{33}H_{36}N_7O_2)$). Sur ce même spectre on retrouve également la présence de l'espèce di-chargée du même complexe avec l'amine terminale sous forme NH_2 à *m/z* = 344.57 (z = 2) attribué à $[M'\text{-}2ClO4^-]$ avec M' = ($Zn_2(C_{33}H_{35}N_7O_2)$) et (M' = M-H) et dont les profils isotopiques correspondent aux profils théoriques (**Figure 35**).

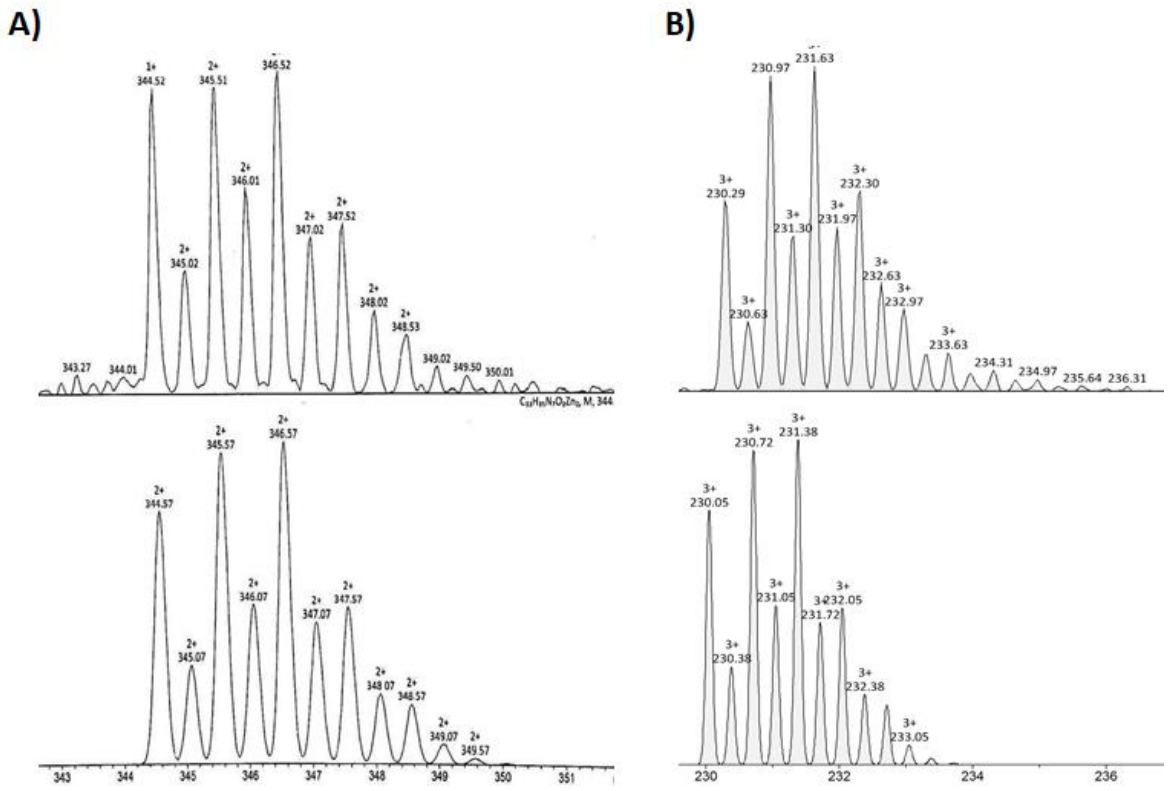


Figure 35 : spectre ESI-MS de Zn^{2+}CC-DPA dans CH_3CN (mode positif) : profils isotopiques expérimentaux en haut et théoriques en bas pour l'espèce di-chargée à m/z = 344.57 associée à $[Zn_2(C_{33}H_{35}N_7O_2)\text{-}2ClO_4]^{2+}$ (amine terminale non protonée) et pour l'espèce tri-chargée à m/z = 230.05 associée à $[Zn_2(C_{33}H_{36}N_7O_2)\text{-}3ClO_4]^{3+}$ (amine terminale protonée)

Les complexes ont également été caractérisés par RMN (^1H et ^{13}C) dans le DMSO et/ou l'acétonitrile deutéré. Comme exemple, la RMN ^1H du complexe Zn^{2+}LC-DPA est présentée sur la **Figure 36** ci-dessous. En particulier, les déplacements chimiques des protons des pyridines sont déblindés par rapport au ligand initial (cf. PARTIE EXPERIMENTALE), ce qui indique un changement dans leur environnement lié à la complexation par le zinc.

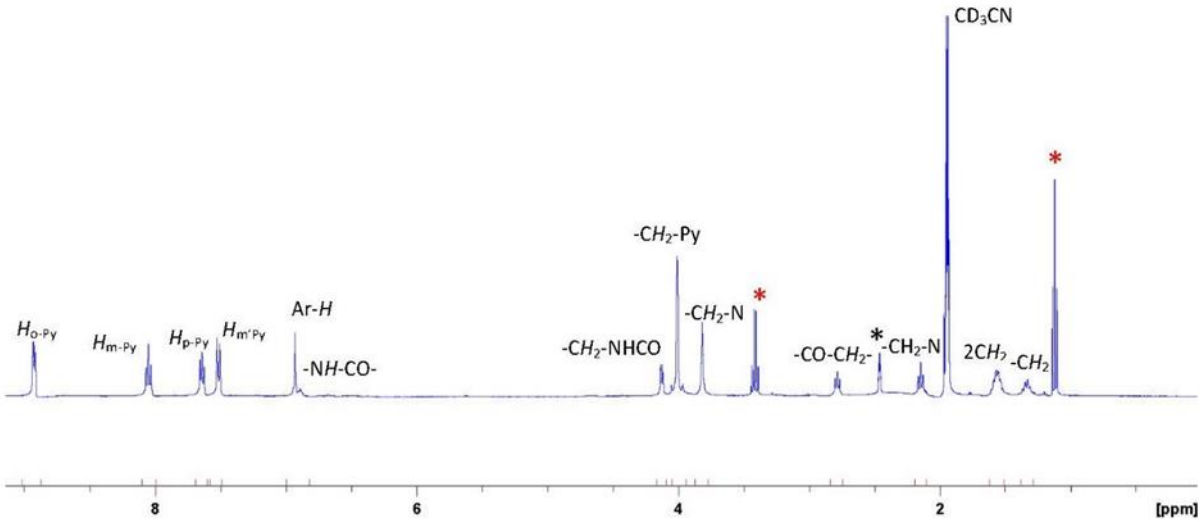


Figure 36 : spectre RMN ^{1}H (CD_3CN + 1 goutte de DMSO deutéré (*) du complexe Zn^{2+}LC-DPA, éther diéthylique résiduel (*)

2.3.2. Etudes en fonction du pH

Par analogie avec ce qui a été déjà observé avec des complexes de zinc analogues de la même série, les complexes isolés dans ce travail, sont l'objet de changements de coordination en fonction du pH.[161] La détermination des p*K*a associés à ces changements a été réalisé au laboratoire dans le cadre de travaux de stagiaires de L3 et M1 par des mesures de potentiométrie dans le mélange H_2O/DMSO (70/30). La **Figure 37** et le **Tableau 6** résument les résultats obtenus.

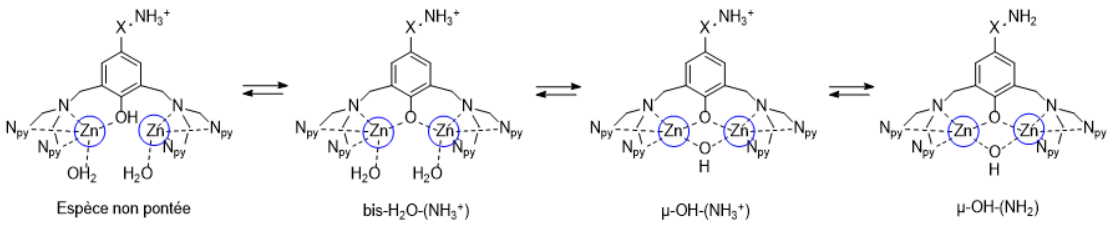


Figure 37 : représentation des équilibres en fonction du pH dans H_2O/DMSO (70/30) pour les complexes Zn^{2+}CC-DPA et Zn^{2+}LC-DPA. X = $-CH_2-$ ou $-CH_2-NHCO-(CH_2)_5-$ respectivement dit CC ou LC

Tableau 6 : valeurs des p*K*a associés à la distribution des espèces en équilibre pour les complexes Zn^{2+}CC-DPA et Zn^{2+}LC-DPA

	espèce non pontée ⇌ bis-H_2O-(NH_3^+)	**bis-H_2O-(NH_3^+) ⇌ µ-OH-(NH_3^+)**	**µ-OH-(NH_3^+) ⇌ µ-OH-(NH_2)**
Zn^{2+}CC-DPA	p*Ka* = *6.2*	p*Ka* = *7.6*	p*Ka* = *9.6*
Zn^{2+}LC-DPA	p*Ka* = *6.4*	p*Ka* = *7.4*	p*Ka* = *9.7*

Les deux complexes étudiés présentent des p*K*a très voisins. A pH acide, une espèce non pontée est présente car le phénol est protoné. Les p*K*a associés à la déprotonation des espèces bis-H_2O (7.4 et 7.6) sont en accord avec le p*K*a (7.4) sur une espèce analogue (méthyl en *ortho* du phénol).[161]

Au pH physiologique auquel nous serons amenés à travailler, les formes µ-OH et bis-H_2O seront présentes simultanément comme cela est visualisé sur les diagrammes de répartition des espèces représentés **Figure 38**.

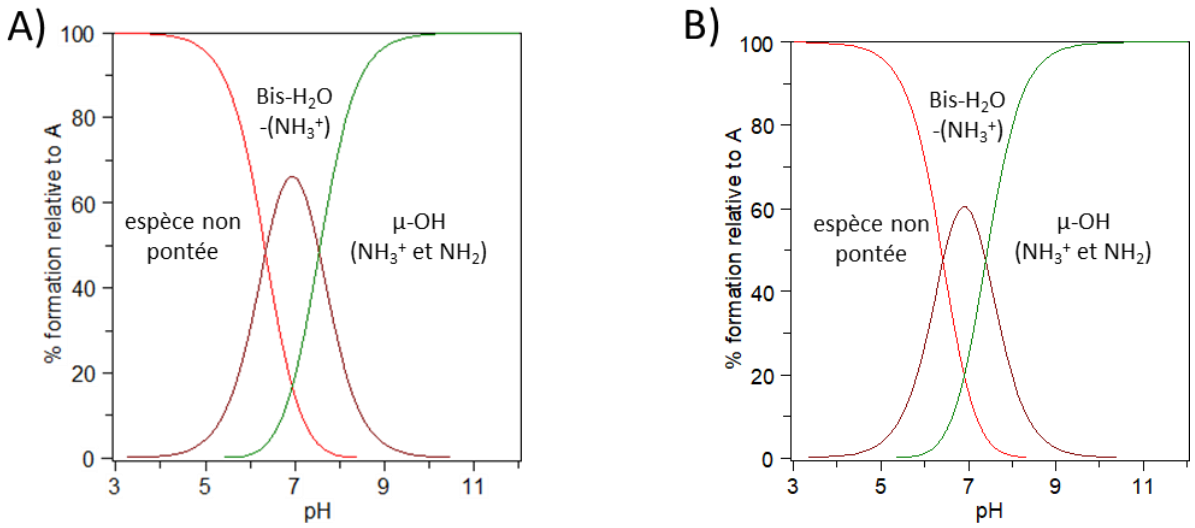


Figure 38 : diagramme de distribution des espèces pour (A) Zn^{2+}CC-DPA et (B) Zn^{2+}LC-DPA en fonction du pH à 25°C dans H_2O/DMSO (70/30). Les espèces µ-OH avec l'amine protonée ou non sont représentées ensemble pour plus de clarté

Pour compléter ce travail de caractérisations des espèces présentes en solution aqueuse, nous avons effectué différents essais de cristallisation. Malheureusement, les groupements qui portent les fonctions amines pour le greffage sont sources d'agitations, ce qui semble restreindre la cristallisation. Néanmoins, après évaporation lente d'une solution aqueuse de Zn^{2+}CC-DPA, des cristaux jaune pâle ont pu être récupérés et la structure par diffraction des rayons X a pu être résolue (**Figure 39**). Cette structure est en lien avec une forme de type « bis-H_2O » bien qu'un des ligands aquo a été remplacé par un atome de chlore

au cours de la cristallisation, ce qui induit des environnements différents pour chaque atome de zinc. Ceux-ci sont mono-pontés par l'espaceur phénoxo. On note que la distance inter-métallique est de 3.635 Å, du même ordre de grandeur que pour un complexe bis-H_2O précédemment étudié (distance Zn---Zn'=3.791 Å).[161]

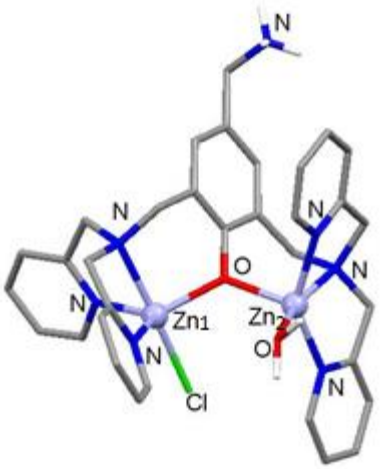


Figure 39 : structure de $[Zn_2(C_{33}H_{37}N_7O_2)(Cl)(H_2O)](ClO_4)_3$. Pour plus de clarté les hydrogènes (sauf ceux de la molécule d'eau liée et de l'amine terminale protonée) ainsi que les trois contre ions perchlorates ont été omis. Détails de l'analyse et tableau des distances et angles dans la partie expérimentale

Le Zn_1 est dans une géométrie de type bipyramide trigonale dont les positions axiales sont occupées par le chlore et l'amine tertiaire. Le Zn_2 est également dans une géométrie de type bipyramide trigonale mais beaucoup plus distordue. Une molécule d'eau complète sa sphère de coordination. L'amine terminale est protonée ce qui conduit à la présence de trois contre ions perchlorates.

2.4. Caractérisation des complexes de Cu(II)

Les deux complexes bi-nucléaires de cuivre Cu^{2+}CC-DPA et Cu^{2+}LC-DPA ont été isolés et caractérisés. Le cuivre(II) est paramagnétique (configuration électronique d^9), contrairement au zinc précédemment étudié. C'est pourquoi, les caractérisations des complexes de cuivre sont menées par d'autres méthodes comme la spectrophotométrie UV-Vis et la résonance paramagnétique électronique (RPE) en plus de la spectrométrie de masse et de l'analyse élémentaire. Ces points seront discutés dans les paragraphes suivants.

2.4.1. Caractérisation des formes μ-OH

De la même manière que pour les complexes de zinc, les complexes de cuivre obtenus avec les ligands LC (**Figure 40**) et CC (**Figure 41**) ont été analysés à l'état solide par l'analyse élémentaire (partie expérimentale) qui pour chaque complexe correspond à la présence de trois ions perchlorates en accord avec une protonation du complexe via l'amine terminale sous forme NH_3^+.

En spectrométrie de masse (ionisation par électrospray), le spectre de Cu^{2+}LC-DPA en mode positif dans l'acétonitrile présente les signaux correspondants (A) à l'espèce mono-chargée à *m/z* = 1001 (*z* = 1) de l'entité $[M\text{-}ClO_4^-]^+$ avec M = $[Cu_2(C_{39}H_{47}N_8O_3)(ClO_4)_3]$ correspondant au complexe avec l'amine terminale protonée, (B) l'espèce di-chargée à *m/z* = 451 (*z* = 2) correspondant à $[M\text{-}2ClO_4^-]^{2+}$ et (C) l'espèce tri-chargée à *m/z* = 267 (*z* = 3) correspondant à $[M\text{-}3ClO_4^-]^{3+}$. Les profils isotopiques expérimentaux et théoriques correspondants sont décrits dans la **Figure 40**.

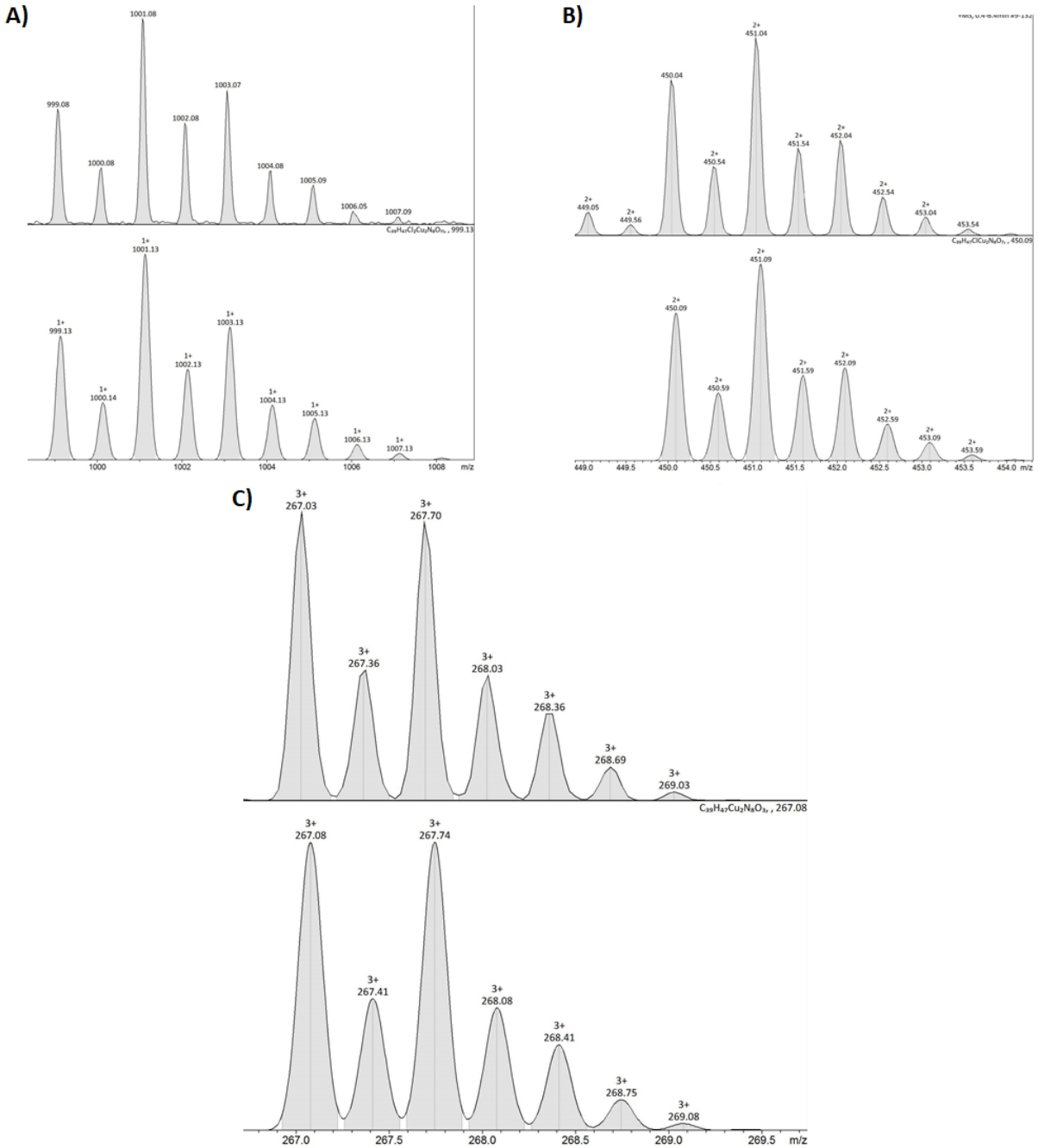


Figure 40 : spectre ESI-MS de Cu^{2+}LC-DPA dans CH_3CN : profils isotopiques expérimentaux (haut) et théoriques (bas) des espèces A) mono-chargée m/z = 1001.08 associée à $[Cu_2(C_{39}H_{47}N_8O_3)\text{-}ClO_4]^+$, B) di-chargée m/z = 451.04 associée à $[Cu_2(C_{39}H_{47}N_8O_3)\text{-}2ClO_4]^{2+}$ et C) tri-chargée m/z = 270.03 associée à $[Cu_2(C_{39}H_{47}N_8O_3)\text{-}3ClO_4]^{3+}$

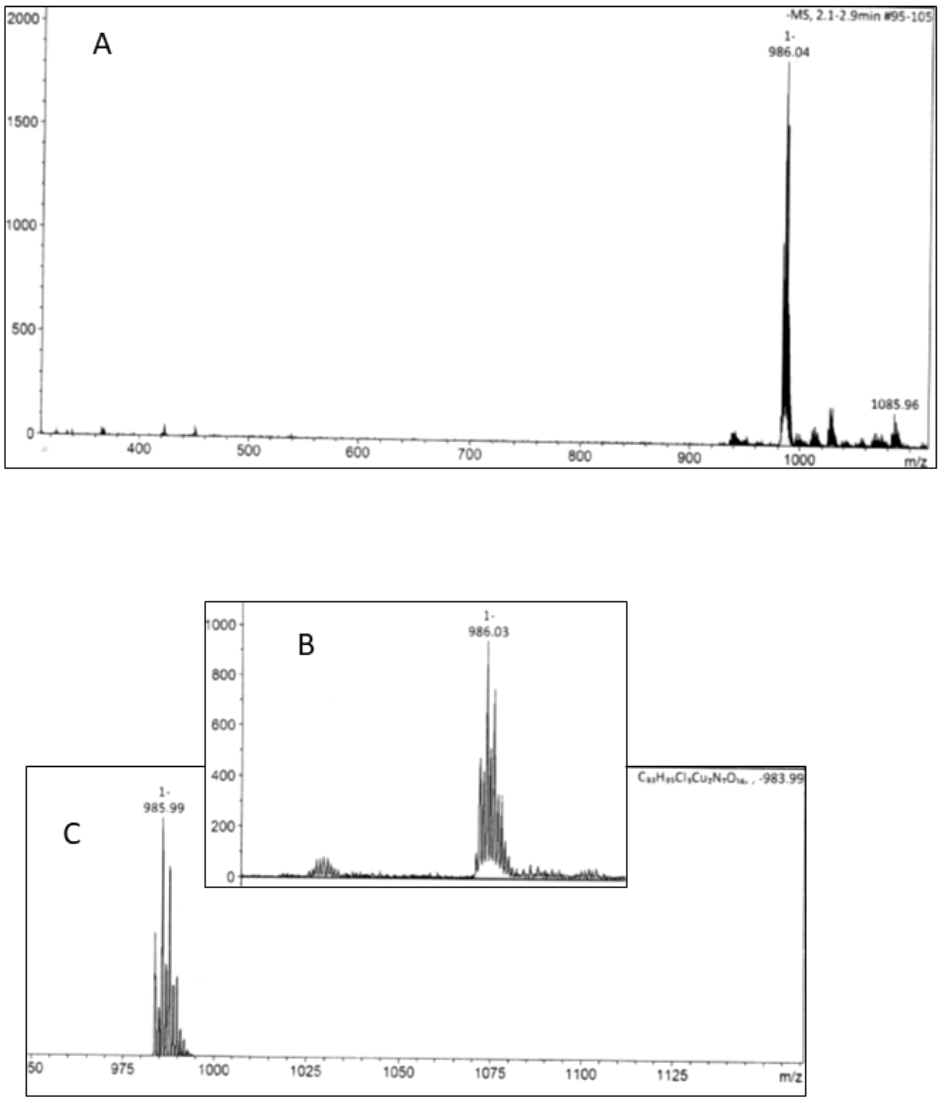


Figure 41 : spectre ESI-MS de Cu^{2+}CC-DPA dans CH_3CN, (mode négatif) : (A) spectre complet, (B) profil isotopique expérimental, (C) profil isotopique théorique pour $[M + ClO_4^-]^-$ avec M = $[Cu_2(C_{33}H_{35}N_7O_2)(ClO_4)_2]$

2.4.2. Spectroscopie UV –Vis

Les complexes de cuivre(II) sont habituellement colorés et cette coloration est due aux transitions électroniques de type d-d entre les orbitales t_{2g} et les orbitales e_g, du cuivre qui sont influencées par la nature des ligands et par la géométrie autour de l'ion métallique. Comme elles sont interdites par les règles de Laporte, leurs coefficients d'extinction molaire sont très faibles ($\varepsilon \sim 100\ M^{-1}.\ cm^{-1}$).

Les bandes relatives aux transferts de charge (CT) entre le ligand et le métal sont autorisées par la règle de Laporte et par la règle de spin et c'est pourquoi, leurs coefficients d'extinction molaires sont élevés ($\varepsilon \sim 10^3$-10^6 M^{-1}. cm^{-1}). Dans le cas de nos complexes de Cu(II), où l'ion est coordonné par des ligands donneurs (PhO^-, OH^-), ces transitions sont des transferts de charge de type ligand vers le métal.

Au final, trois types de transitions sont susceptibles d'être observées dans un domaine d'étude classique compris entre 200 et 1100 nm :

1) transitions internes du ligand (< 300 nm)
2) transitions de transfert de charge LMCT (350 nm < λ < 500 nm)
3) transitions d-d (> 500 nm), interdites par la règle de Laporte mais permises par les règles de spin.

De manière expérimentale, on mesure l'intensité du rayonnement monochromatique de la solution étudiée qui est transmis. Un rayon incident, noté I_0 est envoyé sur la cuve UV et un rayon I est transmis. L'absorbance (A), dépend de la loi de Beer-Lambert notée $A = \varepsilon.l.C$ avec C, la concentration de l'échantillon en $mol.L^{-1}$, l, le trajet optique dans l'échantillon (largeur de la cuve) en cm et ε en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$.

Les spectres du complexe Cu^{2+}LC-DPA ont été mesurés à différents pH dans un mélange H_2O/DMSO (70:30) et sont présentés sur la **Figure 42** :

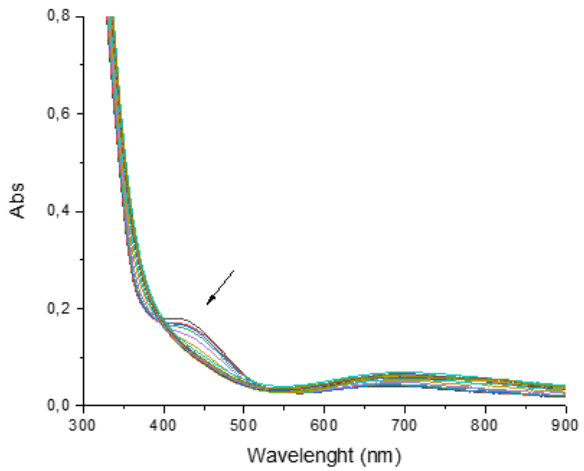


Figure 42 : spectres UV-Vis du complexe Cu^{2+}LC-DPA en fonction du pH (de 3.8 à 9.4) dans un mélange H_2O/DMSO (70:30) à 5.00 x 10^{-3} M par ajouts successifs de NaOH (1 M).

L'ensemble des spectres présente une transition de faible intensité centrée autour de 711 nm associée aux transitions d-d du cuivre qui évolue peu en fonction du pH. En ce qui concerne les transitions associées au transfert de charge du ligand (OH^- et PhO^-) vers le métal (LMCT) nous les observons vers 420 nm.[164,165] Les variations observées en fonction du pH correspondent à des modifications des complexes, de manière similaire à ce qui a été observés précédemment pour des complexes de cuivre (II) analogues qui portent des groupements en *para* du phénoxo (OCH_3, CH_3, F ou CF_3) en place des groupements pour le greffage présents sur Cu^{2+}LC-DPA.[164,165] Ces modifications en fonction du pH sont représentés sur la **Figure 43** et le **Tableau 7**.

Au final les coefficients d'extinction molaire (ε) des transitions d-d ont pu être déterminés uniquement pour les espèces μ-OH qui sont les seules espèces présentent à pH = 9.4 (voir ci-dessous). Ainsi : λ_{max} nm (ε M^{-1}. cm^{-1}) ≈ 710 (196) pour Cu^{2+}LC-DPA.

Les variations de ces spectres UV-Vis ont été mises en œuvre en parallèle par un stagiaire L3 pour déterminer les équilibres mis en jeu en fonction du pH et la détermination des p*K*a par spectrophotométrie (**Figure 43**). En revanche, le p*K*a correspondant à la déprotonation de la fonction amine terminale pour le complexe Cu^{2+}CC-DPA a été déterminé par potentiométrie; concernant le complexe Cu^{2+}LC-DPA cette mesure n'a pu être effectuée en raison d'une trop faible solubilité.

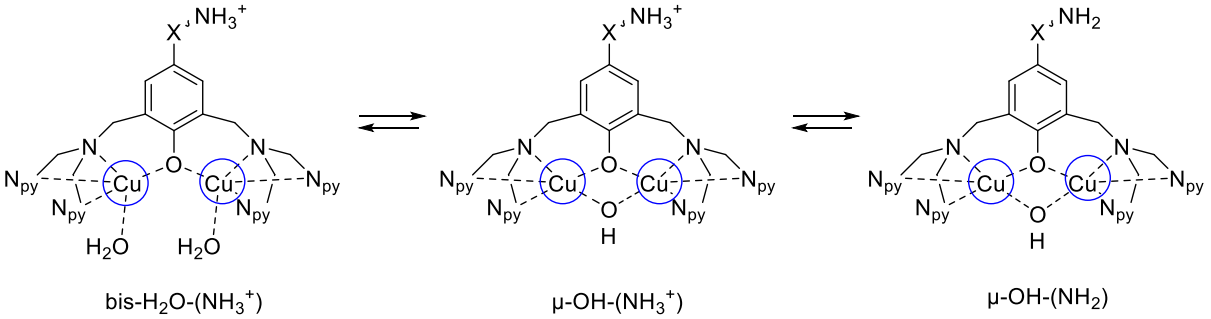


Figure 43 : représentation des équilibres en fonction du pH dans un mélange H_2O/DMSO (70:30) pour les complexes Cu^{2+}CC-DPA et Cu^{2+}LC-DPA. X = $-CH_2-$ ou $-CH_2-NHCO-(CH_2)_5-$ respectivement dit CC ou LC

Tableau 7 : valeurs des p*K*a associés à la distribution des espèces en équilibre pour les complexes Cu^{2+}CC-DPA et Cu^{2+}LC-DPA

	bis-H_2O-(NH_3^+) ⇌ µ-OH-(NH_3^+)	**µ-OH-(NH_3^+) ⇌ µ-OH-(NH_2)**
Cu^{2+}CC-DPA	p*K*a = 5.5	p*K*a = 9.5
Cu^{2+}LC-DPA	p*K*a = 5.5	non déterminé

De manière similaire aux complexes de zinc, quel que soit le groupement pour le greffage, les p*K*a sont similaires. Celui correspondant à la déprotonation de la fonction amine libre a pu être déterminé uniquement pour Cu^{2+}CC-DPA : il est très voisin de ceux des complexes de zinc (entre 9.6 et 9.7). A l'inverse, les p*K*a associés à la déprotonation des espèces bis-H_2O-(NH_3^+) avec les complexes de cuivre sont beaucoup plus bas (5.5 vs 7.4 pour les complexes de zinc). Ceci implique qu'à pH physiologique les formes présentes pour les complexes de cuivre sont quasi-uniquement les formes bipontées µ-OH-(NH_3^+) comme cela est illustré sur les diagrammes de répartition des espèces (**Figure 44**).

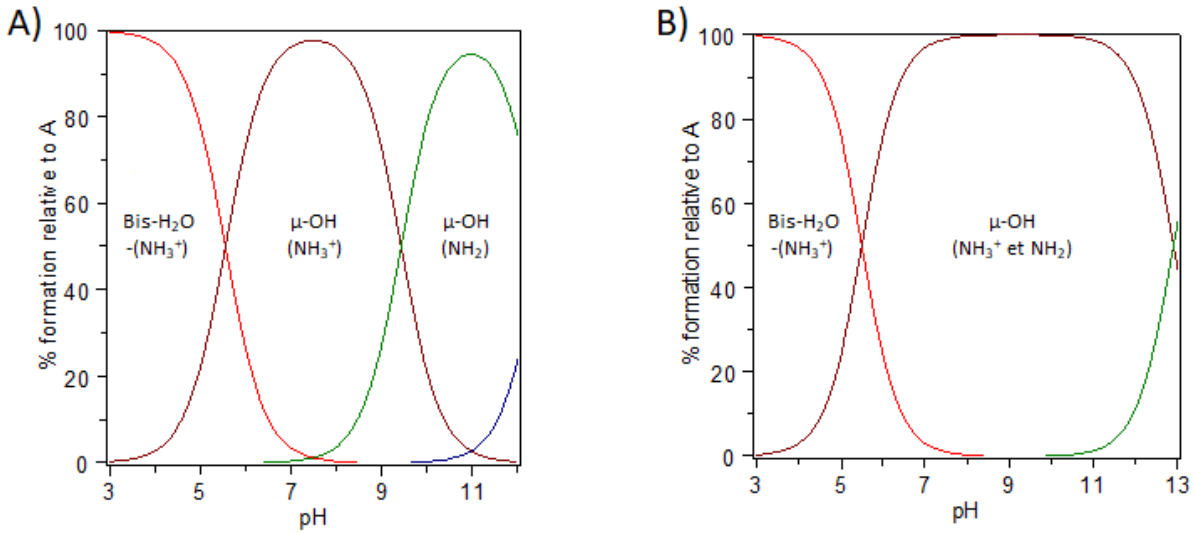


Figure 44 : diagramme de distribution des espèces pour (A) Cu^{2+}CC-DPA et (B) Cu^{2+}LC-DPA en fonction du pH à 25 °C dans H_2O/DMSO (70:30). Pour le complexe Cu^{2+}LC-DPA la faible solubilité à empêcher la mesure de la déprotonation de l'amine terminale

2.4.3. Spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique (R.P.E.)

Cette partie a été rédigée à l'aide d'un ouvrage et d'un article :

- Richard Cammack, *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (EPR, Methods)*, 2017, pages 527-538.[167]
- Michael J. Davies, *Detection and characterisation of radicals using electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping and related methods*, Methods, **2016**, *109*, 21-30.[168]

La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) est une technique utilisée pour étudier des espèces paramagnétiques possédant un ou plusieurs électrons non appariés.

Elle repose sur l'interaction entre un moment magnétique et un champ magnétique **B** (effet Zeeman électronique).

Lorsqu'un champ magnétique externe **B** entre en interaction avec le spin électronique d'un électron, cela entraîne une levée de dégénérescence de spin et l'apparition de deux niveaux d'énergie Zeeman différents (**Figure 45**) avec (M_s = +1/2 et -1/2). L'énergie de ces deux directions est proportionnelle à la force du champ magnétique B :

$$E = g_e \beta_e B M_S$$

avec g_e (= 2,0023) le facteur g d'un électron libre, β_e le magnéton de Bohr (= 9,2740.10^{-24} J. T^{-1}).

La résonance est obtenue lorsque que l'application d'un champ externe à une fréquence appropriée excite le spin électronique de la basse vers la haute énergie :

$$\delta E = h\nu$$

avec h la constante de Planck et ν la fréquence du spectromètre RPE.

[167] Cammack R. EPR, Methods. In : Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition). Lindon JC, Tranter GE, Koppenaal DW, eds. **2017**:527-538. doi: 10.1016/B978-0-12-803224-4.00138-2

[168] Davies MJ. Detection and characterisation of radicals using electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping and related methods. *Methods*. **2016**;109:21-30. doi:10.1016/j.ymeth.2016.05.013

La règle de sélection qui gouverne cette transition est la suivante : $\Delta_{Ms} = \pm 1$ (**Figure 45**).

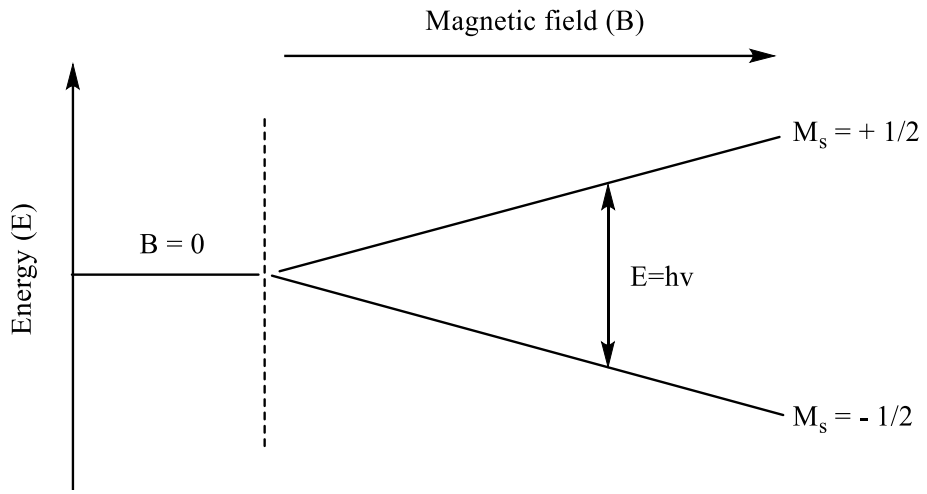


Figure 45 : effet du champ magnétique sur un système de spin électronique S = ½

Dans le cas des complexes dinucléaires, l'interaction entre deux centres paramagnétiques de spin électronique S = ½ via un pont peut conduire à un couplage ferromagnétique de spin $S_{total} = 1$ ou antiferromagnétique de spin $S_{total} = 0$.

Des études de RPE ont été conduites sur nos deux complexes Cu^{2+}CC-DPA et Cu^{2+}LC-DPA à différents pH. Pour les deux complexes à pH 7.4 et 9, les spectres sont quasiment silencieux. A titre d'exemple les spectres enregistrés à 100 K pour le complexe Cu^{2+}LC-DPA en solution gelée à différents pH dans un mélange Tampon/DMSO (70:30) sont présentés sur la **Figure 46**.

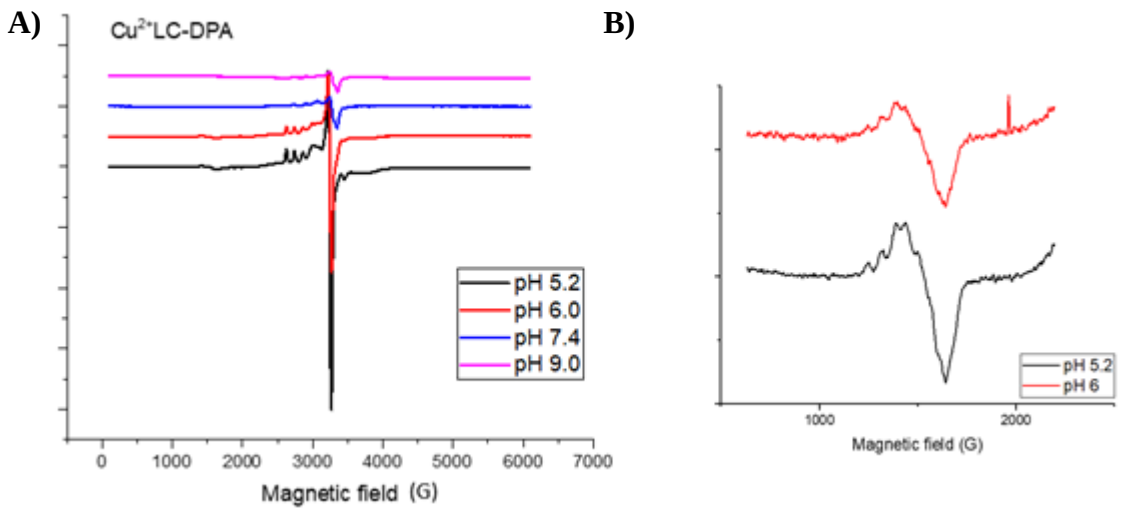


Figure 46 : (A) spectres RPE 100 K du complexe Cu^{2+}LC-DPA dans Tampon/DMSO (70:30) à différents pH. (B) agrandissement de la zone entre 1000 – 2000 G pour pH 5.2 et 6.0

A pH = 9, les signaux résiduels observés **Figure 46** correspondent à une impureté mononucléaires de cuivre(II) présente dans l'échantillon. Ceci est en accord avec une structure doublement pontée et un spin total S = 0 du complexe Cu^{2+}LC-DPA en accord avec la distribution des espèces reportée sur la **Figure 43**. Lorsque le pH diminue les spectres ne sont plus silencieux. Ils présentent une transition Δ_{MS} = ± 2 à g = 4.3 de faible intensité et un autre signal plus intense Δ_{MS} = ± 1 autour de g = 2. Ces signatures spectroscopiques sont associées à un couplage ferromagnétique entre les deux cuivres (II). Ceci traduit des changements des complexes en fonction du pH. Ce type de comportement est en accord avec ceux reportés sur des complexes de cuivre analogues.[164,165]

2.5. Etudes par RMN ^{31}P des interactions avec des phospholipides modèles

La présence d'un atome de phosphore dans les phospholipides (phosphate) nous a permis d'utiliser la RMN ^{31}P comme outil d'études qualitatives d'interactions entre le complexe Zn^{2+}LC-DPA et les phospholipides (ce fut le complexe choisi pour ces études puisque les études sur surface ont été réalisées avec ce dernier et différents phospholipides). Les études ont été réalisées en milieu tamponné et/ou dans le DMSO avec différents équivalents du groupe formant la partie polaire de PS (O-phospho-L-sérine) disponible commercialement (ce qui n'est pas le cas pour la partie polaire de la phosphatidylcholine), la DHPC (1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) et la DHPS (1,2-Dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphoserine) qui sont des phospholipides analogues de PC et PS mais dont la partie hydrophobe a seulement 6 carbones (chaînes courtes-**Figure 47**) au lieu de 18 carbones pour PC et PS. Ceci permet leur solubilisation en milieu aqueux et aux concentrations utilisées de pouvoir être en dessous de leur concentration micellaire critique (CMC 15 mM pour DHPC (6:0) en milieu aqueux, 1.2 mM pour DHPS (6:0) en milieu aqueux + 5 mM Ca^{2+}), d'être sous forme de monomères ce qui permet une étude des interactions à l'échelle moléculaire.[169] Les spectres ont été enregistrés à 25°C en utilisant l'acide phosphorique comme référence externe.

[169] Critical Micelle Concentrations (CMCs). Avanti Polar Lipids. Accessed August 2, 2021. https://avantilipids.com/tech-support/physical-properties/cmcs

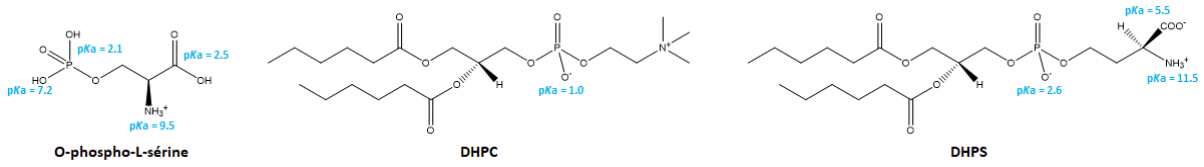


Figure 47 : représentation de la O-phospho-L-serine, la DHPC et de la DHPS avec les p*K*a associés

2.5.1. En milieu tamponnée

Dans un premier temps, nous avons étudié l'interaction entre notre complexe Zn^{2+}LC-DPA et le groupement qui constitue la tête polaire de la PS dans un mélange solution aqueuse tamponnée/DMSO (70:30) à 10 mM, à différents pH : 6 (MES), 7.4 (HEPES), 9 (CHES). Le but de ces études est de mettre en évidence des interactions avec le complexe de zinc qui en fonction du pH est présent sous différentes formes. Par ailleurs, en fonction du tampon utilisé, les fonctions phosphates et/ou carboxylate peuvent être protonée ou non (**Figure 47**).

A pH basique, aucune interaction entre la tête polaire de PS même après addition d'un excès d'O-phospho-L-sérine en présence du complexe Zn^{2+}LC-DPA n'est mis en évidence par RMN de ^{31}P (**Tableau 8Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). En revanche, à pH 6 et 7.4 des changements ont pu être mis en évidence.

A pH 6 (tampon MES), où la forme mono pontée bisH_2O est présente simultanément avec une forme non-pontée (**Figure 37**), l'interaction avec la tête polaire de PS se traduit par un signal à 2.20 ppm pour l'O-phospho-L-sérine seule, à 4.67 ppm après ajout d'un équivalent et à 3.06 ppm après ajout de deux équivalents d'O-phospho-L-sérine en présence d'un équivalent du complexe (**Figure 48**).

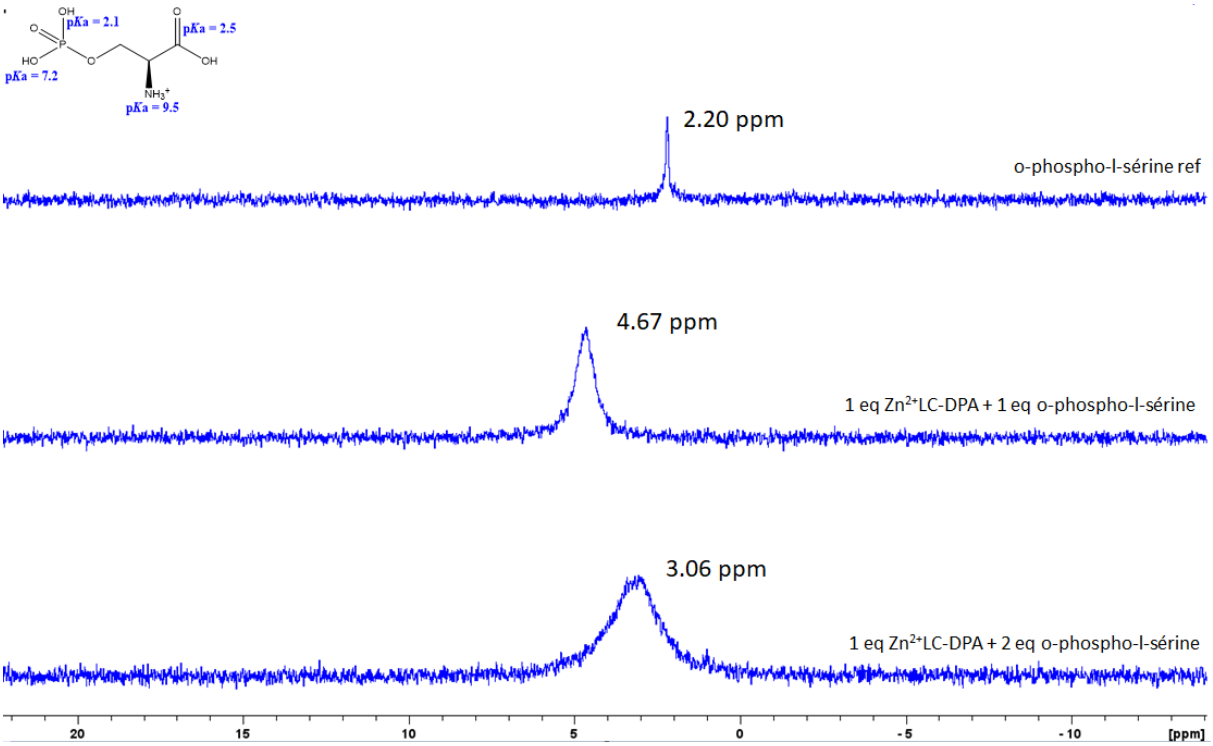


Figure 48 : spectres RMN ^{31}P de l'O-phospho-L-sérine seule (haut) et en interaction avec Zn^{2+}LC-DPA à 5 mM dans solution aqueuse tamponnée à pH = 6/DMSO (70:30) et 25°C ; 1 et 2 équivalents

Le déplacement du seul signal observé, suivant le nombre d'équivalent de l'O-phospho-L-sérine ajouté, indique que ce signal est un signal moyen entre des espèces en échange rapide à l'échelle de temps de la RMN.

A pH 7.4 où il existe un équilibre entre les formes bis-H_2O et µ-OH du complexe Zn^{2+}LC-BPA, on observe que le déplacement chimique du phosphore passe de 1.55 à 2.93 ppm après addition d'un équivalent d'O-phospho-L-sérine au complexe et à 2.02 ppm après deux équivalents (**Figure 49**). De la même manière qu'à pH = 6, le déplacement du seul signal observé, suivant le nombre d'équivalent de l'O-phospho-L-sérine ajouté, indique que ce signal est un signal moyen entre des espèces en échange rapide à l'échelle de temps de la RMN.

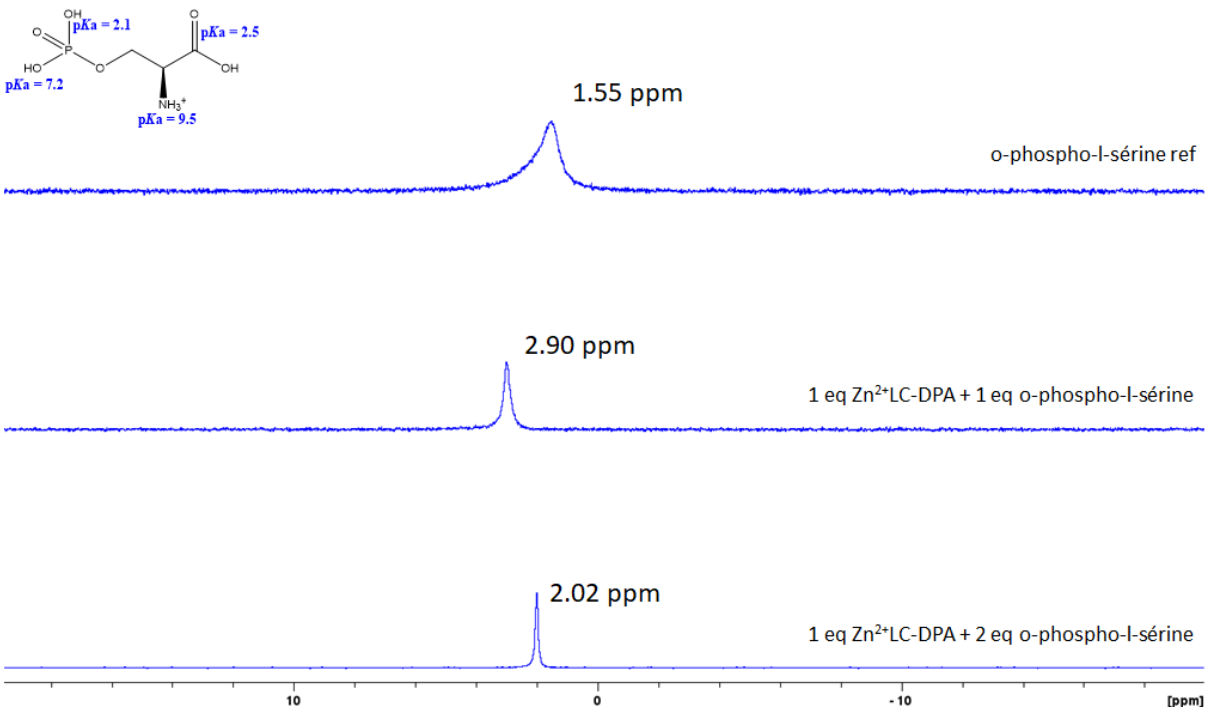


Figure 49 : spectres RMN ^{31}P de l'O-phospho-L-sérine seule (haut) et en interaction avec Zn^{2+}LC-DPA à 5 mM en solution aqueuse tamponnée à pH = 7.4/DMSO (70:30) et 25°C ; 1 et 2 équivalents

L'étude en température (de 25 à -10°C) du signal obtenu après l'ajout d'un équivalent de la tête polaire de PS et d'un équivalent de Zn^{2+}LC-DPA (**Figure 50B**) met en évidence la présence de l'O-phospho-L-sérine « libre » (signal à 1.55 ppm identique à celui de ce composé seul-**Figure 50B**) associé à un autre signal à 4.37 ppm, à -10°C qui correspond à un adduit avec le complexe.

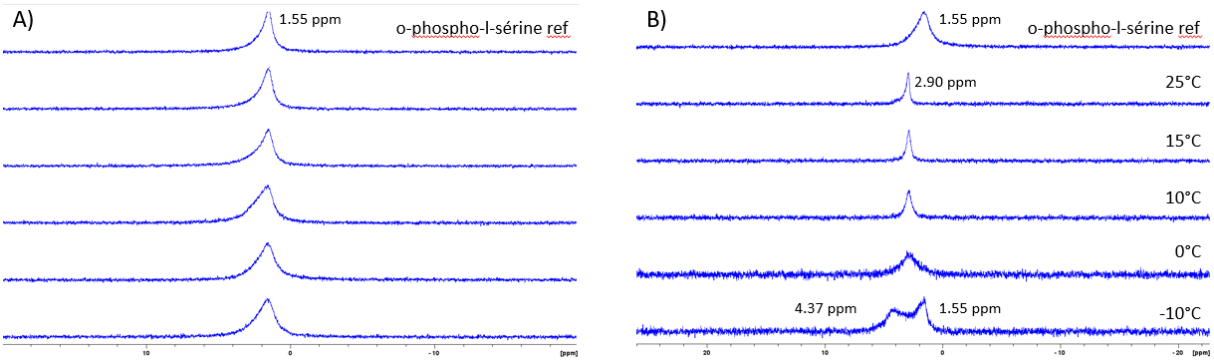


Figure 50 : spectres RMN ^{31}P de (A) l'O-phospho-L-sérine seule et (B) en interaction avec 1 équivalent de Zn^{2+}LC-DPA à 5 mM en solution aqueuse tamponnée à pH = 7.4/DMSO (70:30) en fonction de la température (de 25°C à -10°C)

Par la suite, nous avons étudié le comportement du complexe Zn^{2+}LC-DPA avec des modèles de chaînes courtes de phospholipides disponibles commercialement, dans un mélange HEPES/DMSO (70:30).

Au vu de ces informations, il semble que la forme optimale pour la reconnaissance de la tête polaire de PS ne soit pas la forme bi-ponté µOH (aucune interaction détectée par RMN du ^{31}P à pH 9) mais plutôt la forme mono-pontée bisH_2O. Ces observations traduisent la capacité du complexe Zn^{2+}LC-DPA à fixer au moins en partie l'O-phospho-L-sérine à pH 7.4.

Tableau 8 : déplacements chimiques du phosphore (δP ppm) pour la tête polaire de PS seule et en présence du complexe Zn^{2+}LC-DPA à différents pH

	Ref (δP ppm)	**1 eq (δP ppm)**	**2 eq (δP ppm)**
MES (pH = 6)	2.20	4.67	3.06
HEPES (pH = 7.4)	1.55	2.90	2.02
CHES (pH = 9)	5.78	X	5.78

- A pH 7.4, on observe sur la **Figure 51** aucun déplacement du signal du phosphore après l'ajout d'un ou deux équivalents de DHPC en présence du complexe Zn^{2+}LC-DPA : aucune interaction n'est mise en évidence par RMN de ^{31}P.

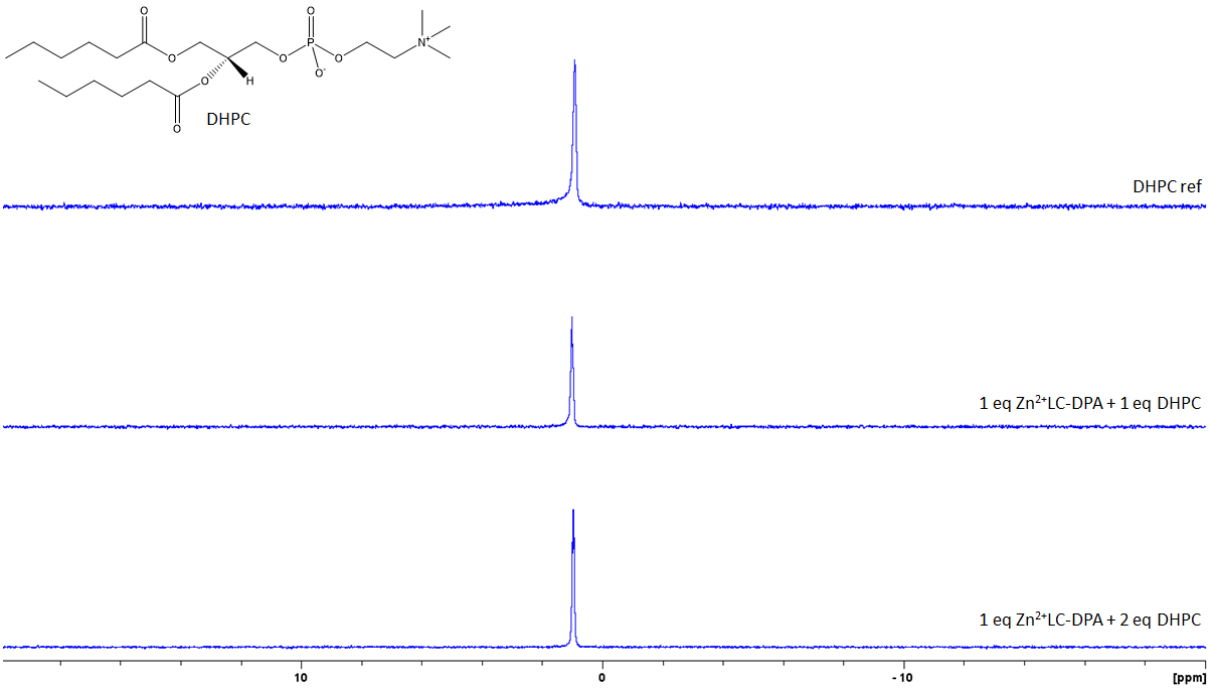


Figure 51 : spectres RMN ^{31}P du phospholipide modèle DHPC seul (en haut), à 1 (au milieu), à 2 (en bas) équivalents et en présence de Zn^{2+}LC-DPA en solution aqueuse tamponnée à pH 7.4/DMSO (70:30) et 25 °C

- Enfin, cette étude a été réalisée avec DHPS, le modèle de PS. Les résultats sont présentés sur la **Figure 52**. On observe un léger déplacement du signal du phosphore après ajout d'un et de deux équivalents de DHPS en présence du complexe Zn^{2+}LC-DPA suggérant une interaction à ce pH.

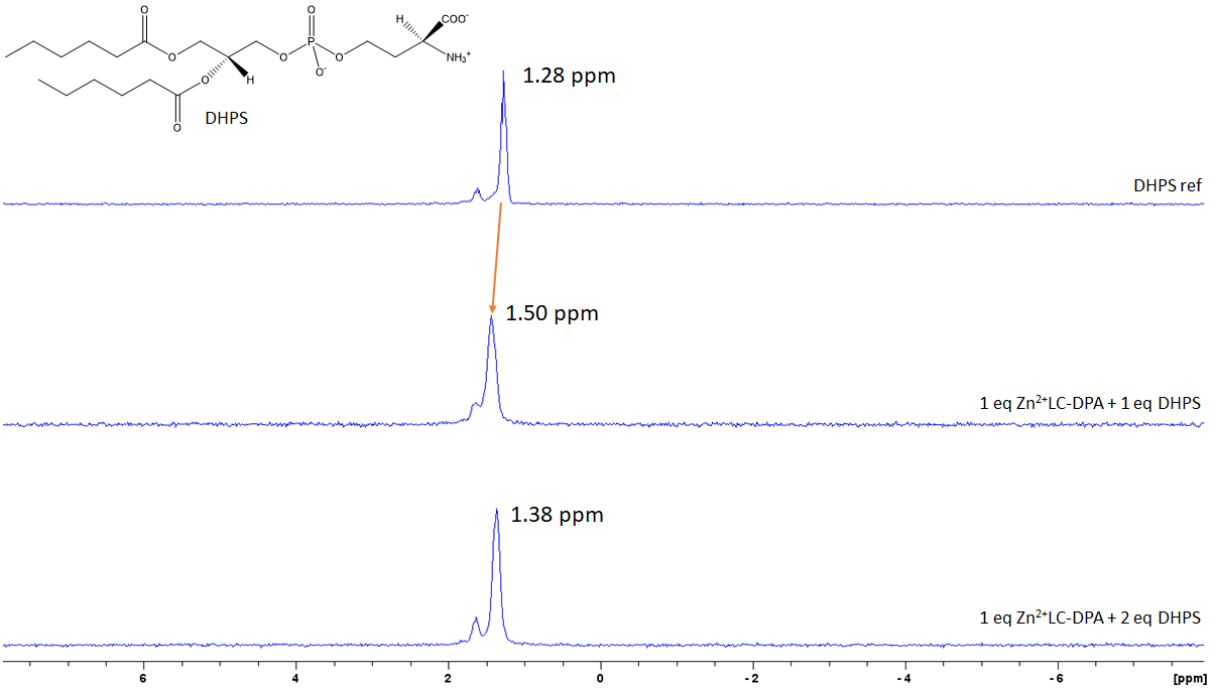


Figure 52 : spectres RMN ^{31}P du phospholipide modèle DHPS seul (en haut), à 1 (au milieu), à 2 (en bas) équivalents et en présence de Zn^{2+}LC-DPA à 5 mM, en solution aqueuse tamponnée à pH 7.4/DMSO (70:30) et 25 °C

Au final, en milieu tamponné (pH 7.4), et par RMN ^{31}P, les variations de déplacement chimique de l'O-phospho-L-sérine et du modèle DHPS de PS traduisent des modifications en présence du complexe Zn^{2+}LC-DPA.

2.5.2. En milieu DMSO

- Dans un second temps, les études d'interaction avec les modèles de chaines courtes de phospholipides ont été réalisés dans le DMSO. Les résultats sont présentés dans les paragraphes ci-dessous.

D'après la **Figure 53** et le **Tableau 9**, on constate une modification entre le spectre du phospholipide DHPC libre (modèle de la phosphatidylcholine) et celui où il est en présence du complexe de Zn^{2+}LC-DPA sous la forme µ-OH. Le signal majoritaire à 0.6 ppm,

correspond au phospholipide libre qui est encore largement présent mais on observe entre 2.0-2.3 ppm l'apparition de plusieurs nouveaux signaux. Ils peuvent traduire différents modes d'interaction du phosphate de DHPC avec le complexe (monodente, chelate, pontant par exemple-**Figure 24**).

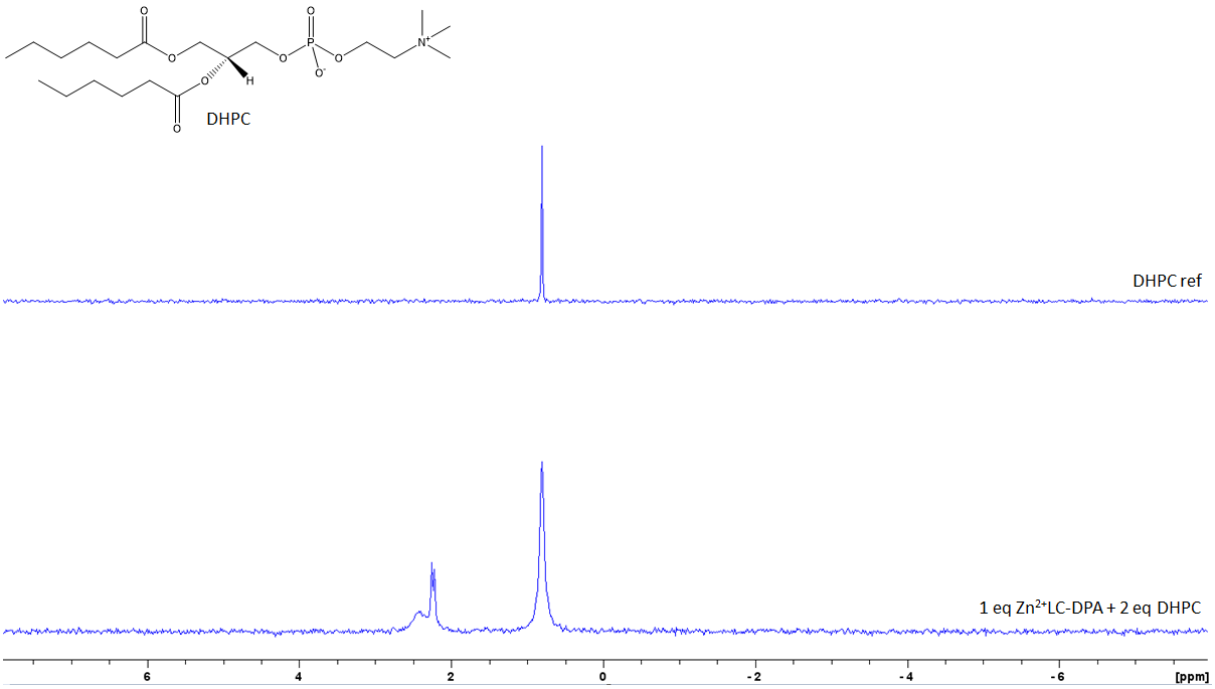


Figure 53 : spectres RMN ^{31}P du phospholipide modèle DHPC seul (haut) et en présence de Zn^{2+}LC-DPA à 5 mM (bas) dans le DMSO à 25°C

- En revanche, en présence du phospholipide modèle DHPS (modèle de la phosphatidylsérine), on observe sur la **Figure 54** que le signal du phosphore est totalement déplacé en présence du complexe Zn^{2+}LC-DPA puisqu'il passe de 2.9 à 4.2 ppm (**Tableau 9**). Ceci met en évidence la reconnaissance préférentielle du DHPS *vs* DHPC dans le DMSO par le complexe Zn^{2+}LC-DPA.

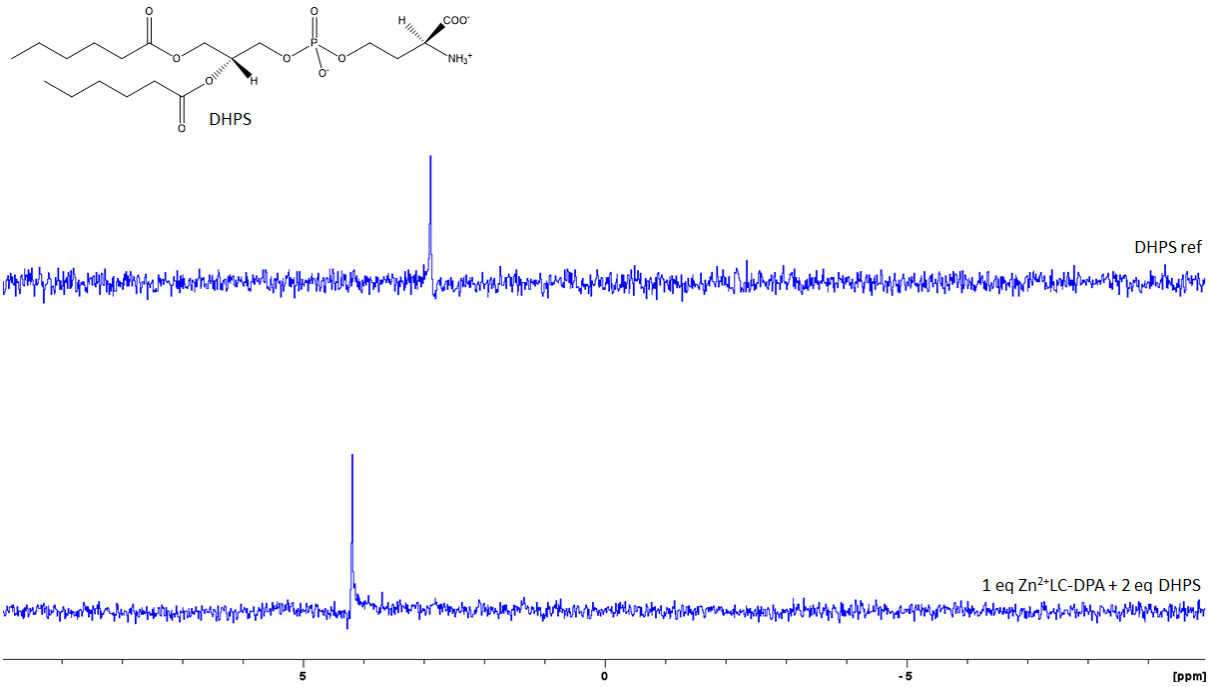


Figure 54 : spectres RMN ^{31}P du phospholipide modèle DHPS seul (haut) et en présence de Zn^{2+}LC-DPA à 5 mM (bas) dans le DMSO à 25°C

En résumé, en solution dans le DMSO, des différences de comportement entre notre complexe Zn^{2+}LC-DPA et 2 équivalents de DHPC (**Figure 53**) d'une part, et 2 équivalents de DHPS (**Figure 54**) d'autre part, ont été mis en évidence par RMN ^{31}P. Après ajout de 2 équivalents de DHPC, le signal du phospholipide libre est encore majoritairement présent, alors qu'avec l'ajout de 2 équivalents de DHPS on observe qu'un seul signal, déplacé par rapport à celui de DHPS seul : ces spectres RMN du ^{31}P suggèrent une différence de comportement du modèle DHPS par rapport à DHPC lorsqu'ils sont mis en présence du complexe Zn^{2+}LC-DPA.

Tableau 9 : déplacements chimiques du phosphore (δP ppm) pour les phospholipides modèles (DHPC et DHPS) seuls et en présence du complexe Zn^{2+}LC-DPA dans le DMSO

	Ref (δP ppm)	**2 eq (δP ppm)**
DHPC	0.6	0.6 – 2.5
DHPS	2.9	4.2

3. Synthèse et études de reconnaissance de la phosphatidylsérine avec le complexe basé sur le ligand à motif quinoline (2ème série)

3.1. Choix structural

La détection par fluorescence à l'aide de sondes chimiques est une des techniques idéales pour la reconnaissance d'anions en solution grâce à leurs fortes sensibilités et à leurs réponses rapides. La reconnaissance de certains anions phosphates comme par exemple, le pyrophosphate (PPi), l'ATP, les protéines phosphorylées est particulièrement étudiée de par l'importance en biologie de ces anions.

Afin d'être efficace dans un environnement biologique, une sonde chimique doit être spécifique de sa cible et applicable à des analyses quantitatives : une réponse rapide due à un changement de concentration de l'analyte est idéale pour des analyses en temps réel.

La détection du pyrophosphate par des sondes fluorescentes a beaucoup été étudiée ces dernières décennies. Parmi ces dernières, des molécules ayant un centre bimétallique ont été rapportées.[170,171,172,173,174] Ceci a conduit Smith et coll à appliquer la méthode à la détection de membranes enrichies en phosphatidylsérine.

Dans ce contexte, pour étudier la détection du pyrophosphate par fluorescence, le groupe japonais de Mikata et coll. a mis en œuvre un complexe bimétallique de zinc qui possède un ligand quinoline (**Figure 55**). Ce ligand possède deux sites de coordination azotés identiques pouvant chacun accueillir un ion zinc. Le groupement –OH pourra, sous sa forme alcoolate, ponter les deux ions zinc.[175]

---

[170] Lee S, Yuen KKY, Jolliffe KA, Yoon J. Fluorescent and colorimetric chemosensors for pyrophosphate. *Chem. Soc. Rev*. **2015**;44(7):1749-1762. doi:10.1039/C4CS00353E

[171] Mawai K, Nathani S, Roy P, et al. Combined experimental and theoretical studies on selective sensing of zinc and pyrophosphate ions by rational design of compartmental chemosensor probe: Dual sensing behaviour via secondary recognition approach and cell imaging studies. *Dalton Trans*. **2018**;47(18):6421-6434. doi:10.1039/C8DT01016A

[172] Kim SK, Lee DH, Hong J-I, et al. Chemosensors for Pyrophosphate. *Acc. Chem. Res*. **2009**;42(1):23-31. doi:10.1021/ar800003f

[173] Chen W-H, Xing Y, Pang Y. A highly selective pyrophosphate sensor based on ESIPT turn-on in water. *Org. Lett*. **2011**;13(6):1362-1365. doi:10.1021/ol200054w

[174] Anbu S, Kamalraj S, Jayabaskaran C, et al. Naphthalene carbohydrazone based dizinc(II) chemosensor for a pyrophosphate ion and its DNA assessment application in polymerase chain reaction products. *Inorg. Chem*. **2013**;52(15):8294-8296. doi:10.1021/ic4011696

[175] Mikata Y, Ugai A, Ohnishi R, et al. Quantitative Fluorescent Detection of Pyrophosphate with Quinoline-Ligated Dinuclear Zinc Complexes. *Inorg. Chem*. **2013**;52(18):10223-10225. doi:10.1021/ic401605m

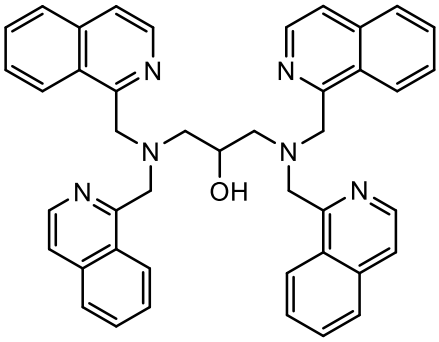


Figure 55 : ligand quinoline par Mikata

Ce complexe bimétallique de zinc solubilisé dans un mélange DMF et H_2O (1:1) montre une faible intensité de fluorescence après excitation à 317 nm, mais après addition de pyrophosphate (PPi) à la solution, il a été observé une amélioration de l'intensité de fluorescence (**Figure 56**).

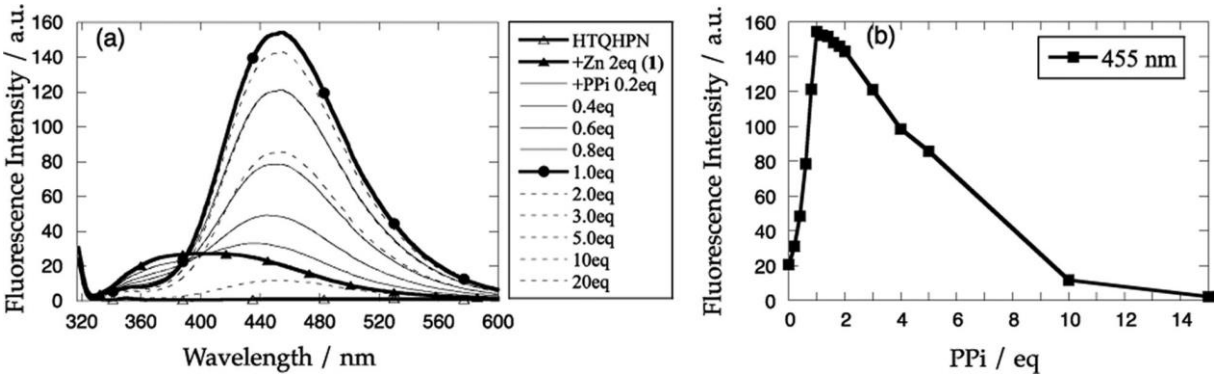


Figure 56 : (a) spectre de fluorescence du complexe bimétallique de zinc solubilisé dans un mélange DMF/H_2O (1:1) en présence d'équivalents croissants de PPi à 25°C (λex = 317 nm) (b) intensité de fluorescence à 455 nm en fonction d'équivalents de PPi[172]

En effet, l'intensité de fluorescence à 455 nm en présence d'un équivalent de PPi est multipliée par 8 en comparaison au complexe seul grâce à la formation d'excimères intramoléculaires. Par la suite, l'ajout successif d'équivalents de PPi sur le complexe de zinc conduit à une diminution de l'intensité de fluorescence due à la décoordination du zinc. La reconnaissance par fluorescence du PPi est spécifique car une plus faible réponse est observée en présence d'autres anions possédants ou non des phosphates (ADP, F^-, ClO_4^-…).

L'utilisation de complexes bi-nucléaires de zinc couplés à une sonde est une méthode prometteuse pour la reconnaissance de microvésicules par fluorescence.[135,176] Inspiré par le

[176] Ngo HT, Liu X, Jolliffe KA. Anion recognition and sensing with Zn(II)–dipicolylamine complexes. *Chem. Soc. Rev.* **2012**;41(14):4928-4965. doi:10.1039/C2CS35087D

groupe de Mikata, nous avons souhaité modifier notre ligand LC-DPA (**Figure 32**) en y introduisant le groupement quinoline (**Figure 57**). Ce nouveau ligand est symétrique et possède deux sites de coordination pouvant chacun accueillir un ion zinc avec pour chacun trois donneurs azotés. Le groupement -OH phénolique permet sous sa forme phénolate de ponter les deux ions de zinc.

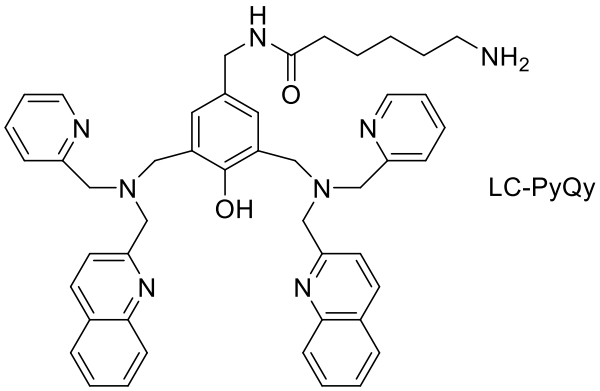


Figure 57 : structure du ligand LC-PyQy

3.2. Synthèse du ligand LC-PyQy (2ème série)

La synthèse du ligand s'est effectuée séquentiellement, en utilisant une stratégie calquée sur la synthèse des ligands de la 1ère série.

Tout d'abord, nous avons dû synthétiser le groupement (**9**) pyridine-quinoline (PyQy) en suivant la procédure publiée par Rompel et coll (Figure 58**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).[177]

[177] Baldeau SM, Slinn CH, Krebs B, et al. Five manganese(II) complexes with seven- or eight-coordinated Mn(II), revealing different coordination modes for the nitrato ligands. *Inorg. Chim. Acta*. **2004**;357(11):3295-3303. doi:10.1016/j.ica.2004.03.021

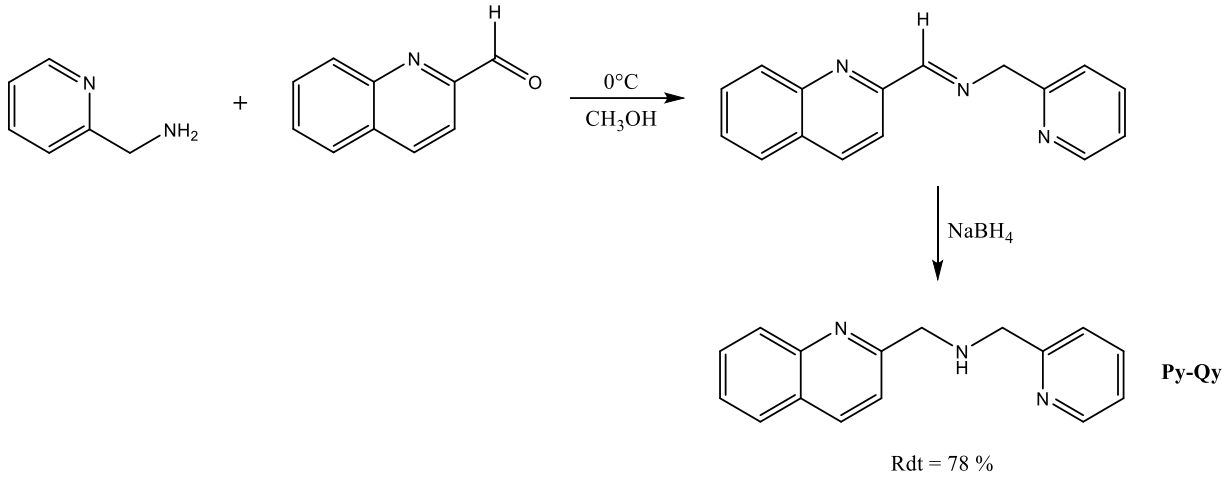


Figure 58 : synthèse du groupement pyridine-quinoline (Py-Qy)[174]

Ce groupement (**9**) est obtenu en deux étapes à partir de la 2-aminomethylpyridine et de la 2-quinolinecarboxyaldehyde mis en solution dans du méthanol à 0°C pour conduire à une imine qui est réduite par $NaBH_4$ afin d'obtenir la 2-Pyridylmethyl)(2-quinolylmethyl)amine (Py-Qy).

Cette amine secondaire (**9**) est ensuite condensée sur le dérivé chloré (**2**) afin d'obtenir le composé (**10**). De manière similaire à la synthèse de la 1ère série, sa déprotection conduit au ligand CC-PyQy (**11**). A partir de celui-ci, les étapes de couplage peptidique et de déprotection de la chaîne de greffage ont conduit au ligand (**12**) LC-PyQy (**Figure 59**). Dans la suite de ce travail, nous avons plus particulièrement travaillé avec le complexe de zinc correspondant.

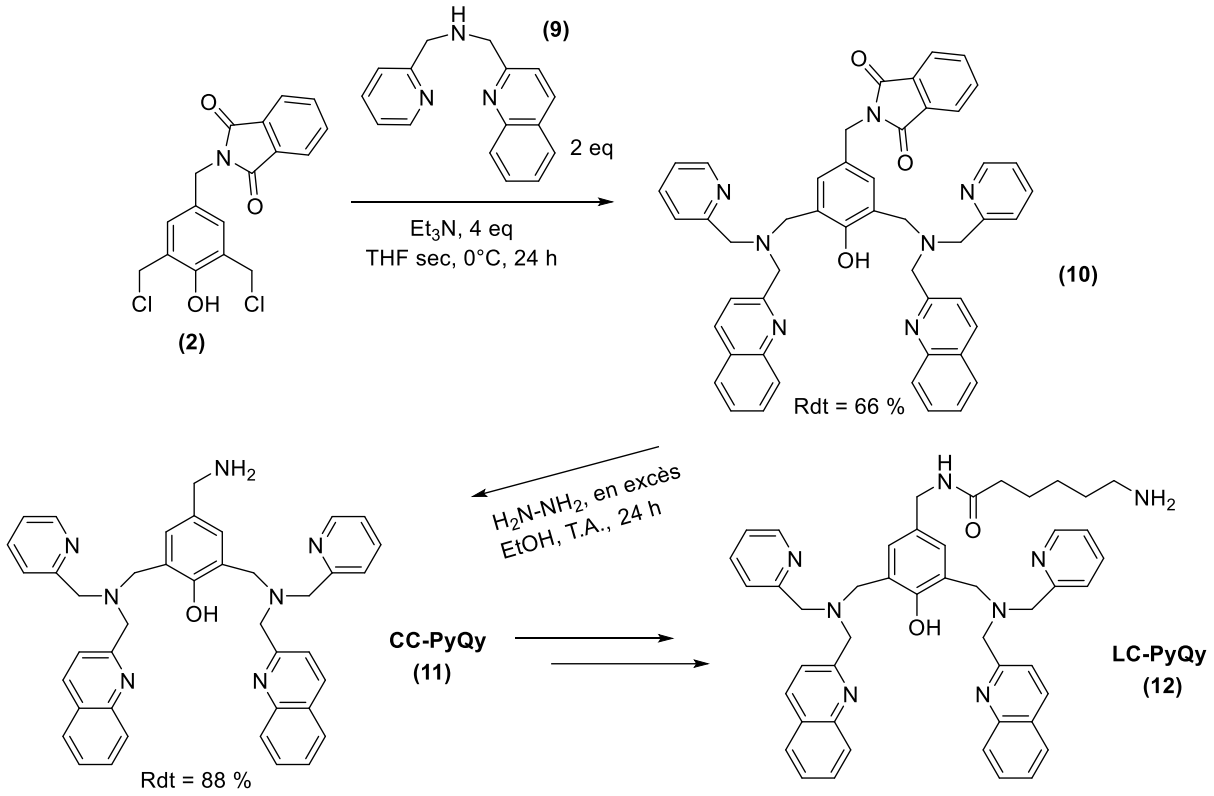


Figure 59 : synthèse du ligand LC-PyQy. Conditions (10) : (9), Et_3N, THF sec, 0°C, 24h, 66% ; (11) : H_2N-NH_2, EtOH, T.A., 24 h, 88 % ; (12-protégé) : (6), HATU, Et_3N, CH_2Cl_2, DMF, 0°C, 24 h, 60 % ; (12) : TFA, CH_2Cl_2, T.A., 24 h, 82 %

3.3. Préparation des complexes dinucléaires de Zn(II) – 2ème série

De manière identique à la première série (**Figure 34**), l'ajout d'une base, la triéthylamine (Et_3N) et de perchlorate de zinc ($Zn(ClO_4)_2.6H_2O$) à notre ligand LC-PyQy dans l'acétonitrile (CH_3CN) permettent d'obtenir le complexe de cette deuxième série : Zn^{2+}LC-PyQy (**Figure 60**).

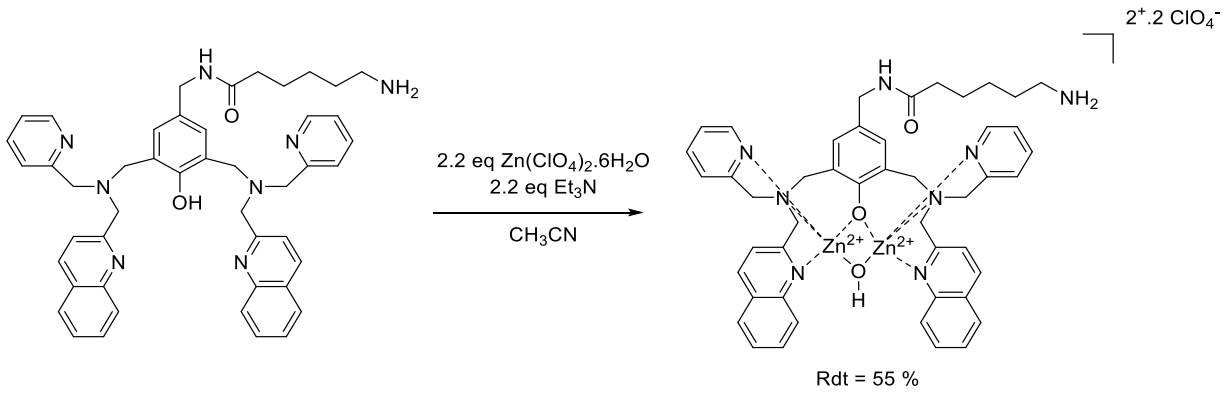


Figure 60 : préparation du complexe di-nucléaire Zn^{2+}LC-PyQy dans CH_3CN

En solution dans l'acétonitrile pour le complexe Zn^{2+}LC-PyQy les analyses par ESI-MS en mode positif montre la présence de l'espèce di-chargée du même complexe doublement ponté par le phénoxo et un hydroxo avec l'amine terminale sous forme NH_2 et NH_3^+ respectivement à *m/z* = 453.13 (z = 2) attribuée à [M'-2ClO_4^-] avec M' = [$Zn_2(C_{47}H_{50}N_8O_3)(ClO_4)_2$] et *m/z* = 501.12 (z = 2) attribuée à [M-2ClO_4^-]$^{2+}$ avec M correspondant au complexe [$Zn_2(C_{47}H_{51}N_8O_3)(ClO_4)_3$]. De plus, on observe la présence de l'espèce tri-chargée à *m/z* = 302.40 (*z* = 3) attribuée à l'espèce [M-3ClO_4^-]$^{3+}$ avec la fonction amine terminale protonée. Sur ce même spectre, les profils isotopiques expérimentaux correspondent aux profils théoriques (**Figure 61**).

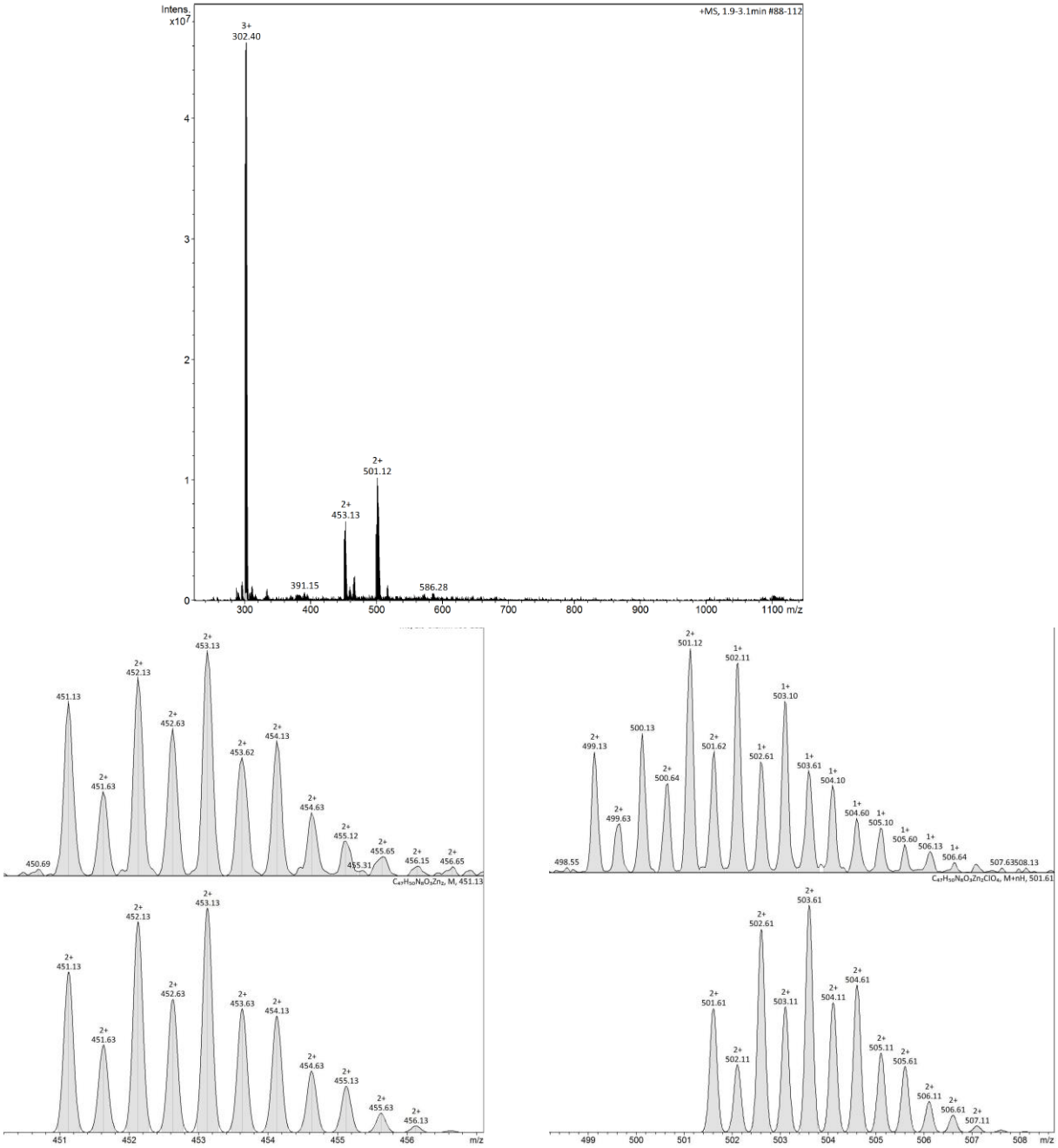


Figure 61 : spectre ESI-MS de Zn^{2+}LC-PyQy dans CH_3CN (mode positif) : profils isotopiques expérimentaux en haut et théoriques en bas pour les espèces di-chargée à m/z = 453.13 associée à $[(Zn_2(C_{47}H_{50}N_8O_3)(ClO_4)_2)\text{-}2ClO_4]^{2+}$ (amine terminale déprotonée) et m/z = 501.12 associée à $[(Zn_2(C_{47}H_{51}N_8O_3)(ClO_4)_3)\text{-}2ClO_4]^{2+}$ (amine terminale protonée) avec z = 2

3.4. Caractérisation du complexe Zn(II) – 2ème série par RMN

Concernant cette deuxième série, nous avons utilisé la RMN ^{1}H en plus de la spectrométrie de masse pour caractériser le complexe en solution. Les études qui suivent ont été réalisées avec le ligand longue chaîne (LC) puisque c'est celui dont nous nous sommes servis pour les études sur surface.

Les spectres du ligand LC-PyQy et du complexe Zn^{2+}LC-PyQy dans CD_3CN sont représentés sur la **Figure 62** et les déplacements chimiques indiqués dans la partie expérimentale.

Nous pouvons clairement observer un déplacement des protons aromatiques en particulier ceux du groupement quinoline montrant une implication de ce motif dans la coordination avec le zinc (**Figure 62**) (l'ensemble des attributions se trouve dans la partie expérimentale).

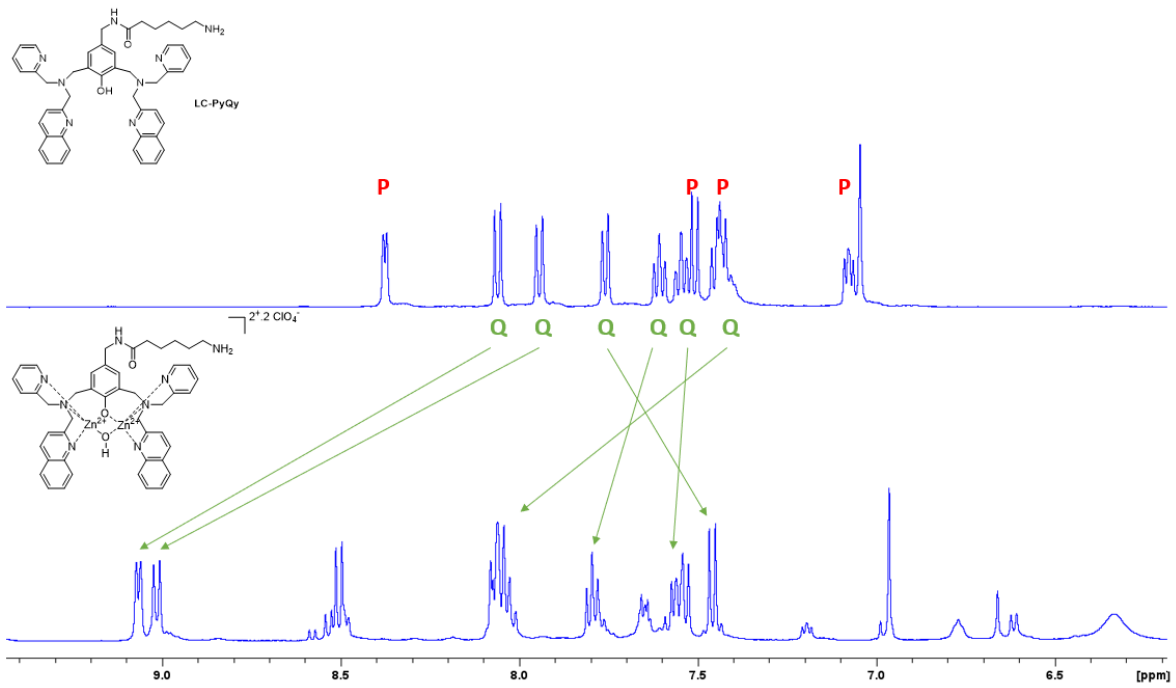


Figure 62 : agrandissement des spectres RMN ^{1}H du ligand LC-PyQy et du complexe Zn^{2+}LC-PyQy dans CD_3CN à 298 K correspondant à la zone des protons aromatiques (Q = signaux associés aux groupements quinolines, P aux groupements pyridines)

Suite à cela, nous avons pu utiliser notre complexe pour les études de reconnaissance par fluorescence.

3.5. Etudes des interactions par spectroscopie UV-Vis et fluorescence

Suite à la synthèse de la seconde série, des études de fluorescence ont été menées entre notre complexe Zn^{2+}LC-PyQy et :

- la tête polaire de la PS (O-phospho-L-sérine).
- des vésicules synthétiques (SUVs) constituées de PC (100 %).
- des vésicules synthétiques (SUVs) constituées de PC/PS (70 % /30 %).
- des microvésicules issues de plasma humain disponibles commercialement.

3.5.1. O-phospho-L-sérine

Tout d'abord, différents tests de solubilités ont été réalisés pour l'O-phospho-L-sérine ; malgré sa solubilité dans le DMSO, aucun changement de fluorescence n'a été observé en présence du complexe Zn^{2+}LC-PyQy, ce qui nous a conduit à travailler avec de l'acétonitrile : le mélange HEPES/CH_3CN (90:10) a permis d'assurer la solubilité du complexe et de travailler dans des conditions proches du pH physiologique.

Les spectres UV-Vis et de fluorescence du complexe Zn^{2+}LC-PyQy (30 µM) avant et après différents ajouts d'O-phospho-L-sérine dans un mélange HEPES/CH_3CN (90:10) sont présentés sur la **Figure 63**.

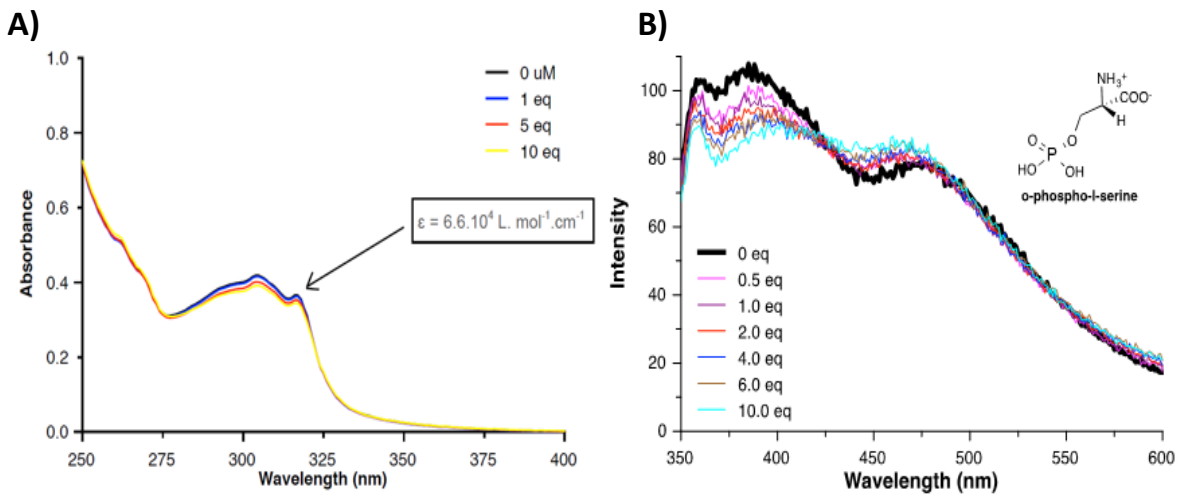


Figure 63 : Spectres (A) UV-Vis et (B) fluorescence (λex = 317 nm) du complexe Zn^{2+}LC-PyQy (30 µM) avant et après des ajouts successifs d'O-phospho-L-sérine dans un mélange HEPES/CH_3CN (90:10)

Aucun changement significatif par UV-Vis ou par fluorescence (λ_{em} = 480 nm) n'a pu être observé après différents ajouts d'O-phospho-L-sérine de 1 à 10 équivalents. Des études similaires en présence de SUVs modèles à la place de la O-phospho-L-sérine ont par la suite été réalisées.

3.5.2. SUVs PC et SUVs PC/PS

Les vésicules modèles SUVs PC et SUVs PC/PS (70:30) ont été préparées par extrusion d'une solution polydispere en liposomes multilamellaires à 1 mM (concentration totale en phospholipides) sur des membranes de 0.1 µm selon le protocole présenté en partie expérimentale. Les concentrations en SUVs indiquées dans la suite du manuscrit correspondent à la concentration totale en phospholipides .

Par ailleurs, des études par diffusion dynamique de la lumière (DLS), nous ont permis de visualiser la taille d'échantillon de SUV PC et SUV PC/PS avec des diamètres hydrodynamiques respectifs de 123 nm et 106 nm (particules mono-disperses) dans le mélange HEPES/CH_3CN (90:10).

Les spectres de fluorescence du complexe Zn^{2+}LC-PyQy 30 µM avant et après des ajouts croissants de SUVs PC et de SUVs PC/PS dans un mélange HEPES/CH_3CN (90:10) sont présentés sur la **Figure 64**.

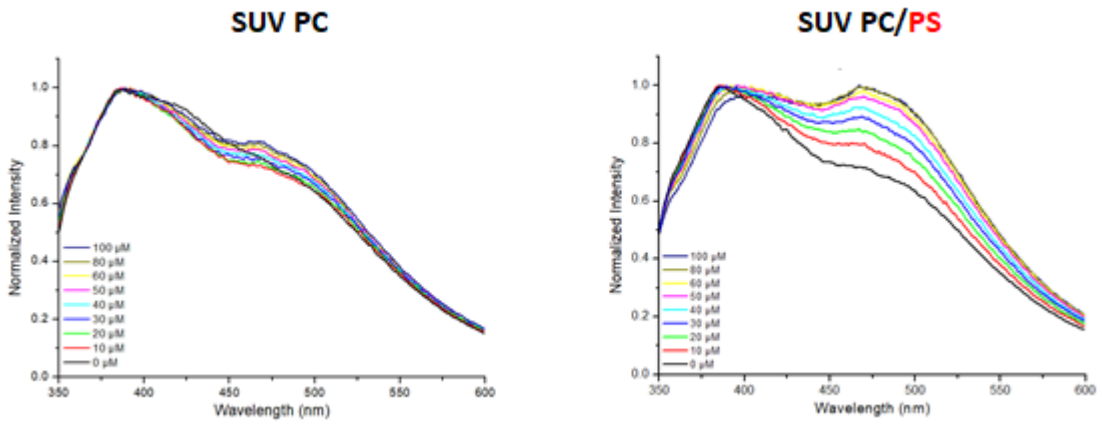


Figure 64 : spectres de fluorescence (λ_{ex} = 317 nm) du complexe Zn^{2+}LC-PyQy (30 µM) avant et après A) ajouts successifs de 0 à 100 µM de SUVs PC et B) de SUVs PC/PS dans un mélange HEPES/CH_3CN (90:10)

Dans le cas des SUVs PC, on observe aucun changement contrairement à SUVs PC/PS. En effet, l'intensité de fluorescence à 488 nm en présence d'une concentration croissante de SUVs PC/PS a été multipliée par 1.8 en comparaison au contrôle (**Figure 65**).

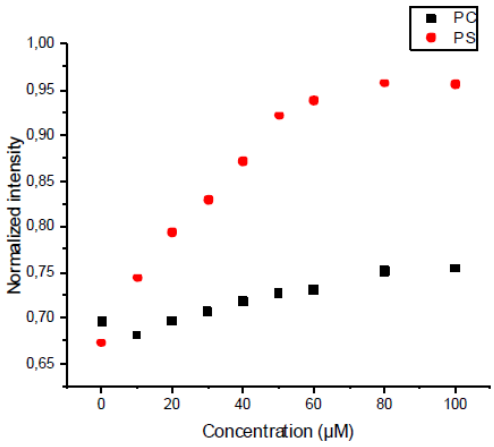


Figure 65 : intensité de fluorescence du complexe Zn^{2+}LC-PyQy (30 µM) à 488 nm (λ_{ex} = 317 nm) en présence de SUV PC (noir) ou SUV PC/PS (70:30) (rouge) dans un mélange HEPES/CH_3CN (90:10)

L'intensité de fluorescence observée est due à l'interaction entre Zn^{2+}LC-PyQy et SUVs PC/PS car aucune fluorescence n'a pu être observée pour des SUVs PC/PS seules (contrôle). Afin de déterminer le K_D, nous avons utilisé l'analyse par Scatchard et nous avons pu déterminer un K_D de 6.6 µM. Ces valeurs sont d'un ordre de grandeur proche (de l'ordre du µM) de celles observées dans la littérature.[151,178]

3.5.3. Microvésicules

Afin de progresser vers les systèmes biologiques plus complexes, nous avons testé la capacité du complexe Zn^{2+}LC-PyQy à interagir avec des microvésicules. Celles-ci ont été fournies par nos partenaires dans le projet et sont issues de plasma humain. Pour les utiliser, elles sont décongelées et après différents lavages successifs réalisés par ultracentrifugation, elles sont re-suspendues dans le tampon HEPES à pH 7.4. (cf. **PARTIE EXPERIMENTALE**). Leur concentration sera exprimée en équivalent PS (eqPS), concentration déterminée par un test fonctionnel à la prothrombinase en utilisant une courbe d'étalonnage réalisée à partir de SUVs PC/PS 70/30 (cf. **PARTIE EXPERIMENTALE**).

[178] Hanshaw RG, O'Neil EJ, Foley M, et al. Indicator displacement assays that detect bilayer membranes enriched in phosphatidylserine. *J. Mater. Chem.* **2005**;15(27-28): 2707-2713. doi: 10.1039/B500522A

Les spectres de fluorescence du complexe Zn^{2+}LC-PyQy (6 µM) avant et après des ajouts croissants de microvésicules (20 µL d'une solution mère à 16 nM eq PS) dans un mélange HEPES/CH_3CN (90:10) qui permet d'assurer la solubilité du complexe sont présentés sur la **Figure 66**.

On observe un changement dans l'intensité de fluorescence après ajouts de microvésicules indiquant une interaction avec le complexe. Cependant, dû à une quantité disponible réduite de ces MVs, nous n'avons pas été en mesure de faire d'autres ajouts qui auraient pu permettre d'atteindre un plateau et d'en extraire un K_D. Néanmoins, nous avons pu mettre en évidence une interaction entre Zn^{2+}LC-PyQy et des microvésicules issues d'échantillons biologiques.

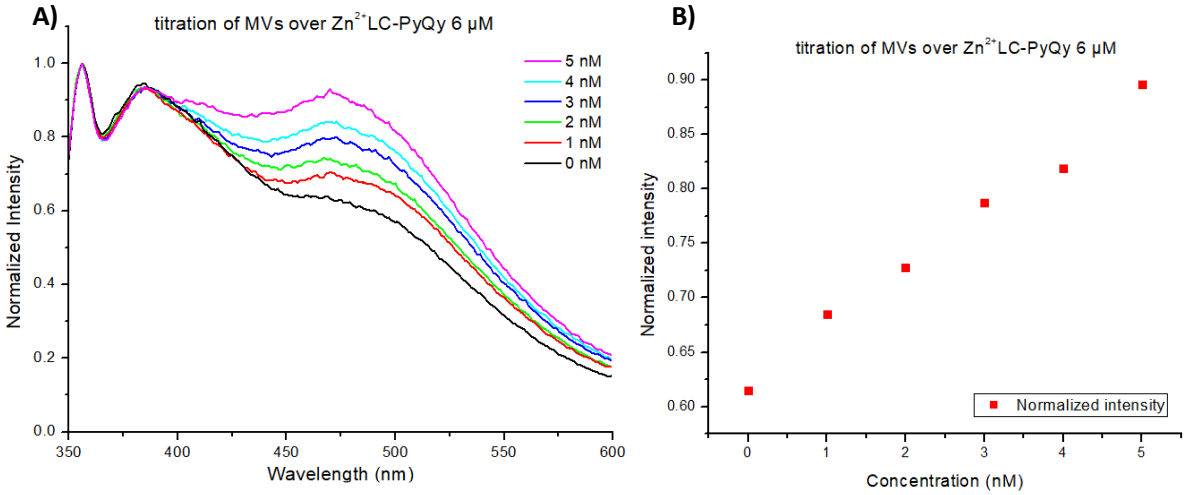


Figure 66 : (A) spectres de fluorescence (λex = 317 nm) du complexe Zn^{2+}LC-PyQy (6 µM) avant et après ajouts d'une concentration croissante de microvésicules dans un mélange HEPES/CH_3CN (90:10). (B) variation de l'intensité de fluorescence à 488 nm (λ_{ex} = 317 nm) du complexe Zn^{2+}LC-PyQy (6 µM) en fonction de la concentration en MVs exprimée en eq PS.

4. Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons présenté la synthèse de deux séries de complexes basés sur la dipicolylamine d'une part et sur la quinoline d'autre part. Ce dernier ligand n'a pas été décrit dans la littérature. Ils ont permis de préparer différents complexes de zinc et de cuivre qui ont été mis en œuvre dans nos travaux de détection de la phosphatidylsérine.

En ce qui concerne les complexes de zinc : en solution, les études préliminaires par RMN ^{31}P dans le DMSO et le milieu tamponné/DMSO (70:30) ont montré des variations de déplacement chimique différents suivant le solvant. En particulier, nous observons proche du pH physiologique, en milieu tamponné/DMSO à pH 7.4, d'une part, aucune modification après ajout de DHPC et d'autre part, des modifications de spectres légèrement marquées en présence de la tête polaire de PS ou de la DHPS.

Ensuite, par fluorescence, le complexe Zn^{2+}LC-PyQy n'a pas mis en évidence une interaction avec la tête polaire de PS, ni les vésicules modèles SUVs PC ; en revanche après excitation à 317 nm, une variation de l'intensité à 488 nm sur le spectre de fluorescence (même si elle est limitée) a montré pour SUVs PC/PS une interaction avec le complexe Zn^{2+}LC-PyQy (avec un K_D à 6.6 µM). Enfin, de manière intéressante, une étude préliminaire a établi une reconnaissance des microvésicules issues d'échantillons biologiques grâce à la fluorescence ce qui peut être considéré comme une preuve de concept. Au final des échantillons plus concentrés de MVs ont pu être préparés par nos partenaires, ce qui devrait permettre de compléter cette étude.

Les études de reconnaissance avec les complexes de cuivre seront décrites plus spécifiquement dans le chapitre suivant.

CHAPITRE 3 : ETUDES DES INTERACTIONS COMPLEXES - MICROVESICULES SUR SUPPORTS SOLIDES

1. Introduction

Des processus vitaux comme l'immunité, la régulation ou le métabolisme mettent en jeu différentes interactions biomoléculaires. Ces dernières se retrouvent dans des interactions protéines/protéines, protéines/ADN, ADN/ADN, protéines/carbohydrates à titre d'exemples.[179,180] L'étude des interactions peut être réalisée en solution ou sur surface, avec ou sans marquage des partenaires.

Lors de cette thèse, les études des interactions réalisées en solution par RMN du phosphore et fluorescence avec les complexes de zinc, présentées au chapitre précédent, ont été complétées par des études sur surface par résonance plasmonique de surface (SPR, *surface plasmon resonance*, en anglais) et par interférométrie de bicouches (BLI, *Biolayer Interferometry*, en anglais). Ces techniques présentent l'avantage de permettre le suivi des interactions en temps réel et sans marquage entre un partenaire immobilisé et son partenaire en solution, donnant ainsi accès aux paramètres cinétiques de l'interaction. De plus, basées respectivement sur des variations d'indice de réfraction et de changement d'épaisseur, les techniques SPR et BLI ne requièrent pas de propriétés particulières (marquage, fluorescence, …) des molécules étudiées et permettent la détection d'une large gamme d'analytes, molécules de faible poids moléculaires, protéines, jusqu'aux cellules entières.[181] Ces techniques seront ici appliquées à l'étude des interactions entre PS et les complexes de zinc et de cuivre décrits au chapitre précédent.

Ce chapitre débutera par une introduction sur les interactions biomoléculaires avant de présenter le plan d'étude des interactions sur surface entre nos complexes de coordinations et PS. Les techniques SPR et BLI seront introduites ainsi que leur mise en œuvre pour ce projet. Enfin, les résultats des études réalisées par ces deux techniques seront présentés et discutés.

---

[179] Zhou M, Li Q, Wang R. Current Experimental Methods for Characterizing Protein–Protein Interactions. *ChemMedChem*. **2016**;11(8):738-756. doi:10.1002/cmdc.201500495

[180] Podobnik M, Kraševec N, Bedina Zavec A, et al. How to Study Protein-protein Interactions. *Acta Chim. Slov.* **2016**;63(3):424-439. doi:10.17344/acsi.2016.2419

[181] Schasfoort R. B. M. Handbook of Surface Plasmon Resonance. In: Royal Society of Chemistry. **2017**. doi:10.1039/9781788010283

2. Généralités sur les interactions biomoléculaires

2.1. Introduction

Les deux partenaires biologiques d'une reconnaissance sont habituellement nommés ligand et analyte, ce dernier étant une molécule reconnue par le ligand. Cette terminologie est à différencier de celle utilisée en chimie de coordination pour laquelle les termes ligand et complexe ont une autre signification : le ligand porte des fonctions chimiques lui permettant de se lier à un ou plusieurs atomes métalliques pour former un complexe de coordination. Lors de l'étude d'interaction aux interfaces, le ligand représente l'entité immobilisée sur la surface et l'analyte le partenaire en solution. La reconnaissance d'un analyte A et de son/ses ligand(s) L se fait grâce à des liaisons non covalentes : liaisons hydrogènes, électrostatiques, hydrophobes, ou de Van der Waals. Cette reconnaissance est illustrée sur la **Figure 67**.

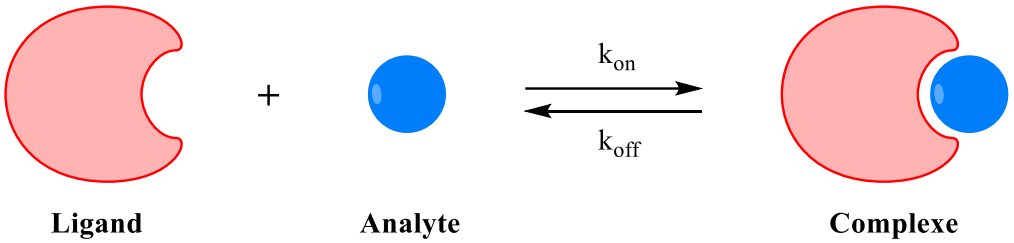


Figure 67 : exemple d'une interaction entre un ligand et son analyte

Si la reconnaissance de l'analyte n'est possible vis-à-vis que d'un ligand donné, l'interaction est dite spécifique (*vs* non-spécifique).

2.2. Paramètres thermodynamiques et cinétiques d'une interaction biomoléculaire

Les paramètres thermodynamiques et cinétiques régissent les interactions biomoléculaires. Ce paragraphe est dédié à leur brève description.[182,183] Une interaction est caractérisée par des paramètres cinétiques (vitesse d'association k_{on} et vitesse de dissociation k_{off}) et thermodynamiques (constante thermodynamique d'association K_A et constante thermodynamique de dissociation K_D).

[182] Cooper A. Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**;3(5):557-563. doi: 10.1016S1367-5931(99)00008-3
[183] Tarcsay A, Keseru GM. Is there a link between selectivity and binding thermodynamics profiles ? *Drug Discovery Today*. **2015**;20(1):86-94. doi: 10.10166/j.drudis.2014.09.014

En suivant l'exemple d'un ligand L et de son analyte A, qui peuvent former un complexe AL selon l'interaction monovalente suivante :

$$\mathbf{A + L} \underset{k_{off}}{\overset{k_{on}}{\rightleftharpoons}} \mathbf{AL}$$

Équation 1

avec k_{on} la vitesse de formation exprimée en $M^{-1}.\ s^{-1}$ et k_{off} la vitesse de dissociation exprimée en s^{-1} du complexe AL.

La loi de Guldberg Waage montre que quelles que soient les conditions initiales, le système tend vers un système d'équilibre et nous permet de déterminer les constantes thermodynamiques d'association K_A et de dissociation K_D à l'équilibre (**Figure 70**)[184]:

$$K_A = \frac{[AL]_{eq}}{[A]_{eq}[L]_{eq}}$$

Équation 2

avec $[A]_{eq}$, $[L]_{eq}$, et $[AL]_{eq}$ les concentrations respectives à l'équilibre du ligand L, analyte A et du complexe AL.

Les constantes thermodynamiques d'association K_A et de dissociation K_D peuvent également être obtenues à partir du rapport des constantes cinétiques d'association et de dissociation selon l'équation suivante :

$$K_A = \frac{1}{K_D} = \frac{k_{on}}{k_{off}}$$

Équation 3

La détermination de la constante thermodynamique de dissociation K_D, rapport des constantes de vitesse k_{off}/k_{on} (cf. Équation 1), permet de juger de l'affinité du ligand vis-à-vis de son analyte. Cette valeur correspond à la concentration de l'analyte A nécessaire afin d'occuper 50 % des ligands L (il faut que la concentration en ligand soit négligeable par

[184] Liu Y, Liu Y-J. Biosorption isotherms, kinetics and thermodynamics. Sep. Purif. Technol. **2008**;61(3):229-242. doi: 10.1016/j.seppur.2007.10.002

rapport à celle de l'analyte). Par conséquent, une forte affinité se traduira par une faible valeur de K_D.

La valeur de K_D est également reliée à l'enthalpie libre standard de l'interaction ΔG° par la relation suivante (avec R = constante des gaz parfait et T = température en K) :

$$\Delta G^0 = R.T.lnK_D$$

Équation 4

Une étude en fonction de la température permet de définir ensuite l'enthalpie libre standard et l'entropie standard de l'interaction par la relation suivante :

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T.\Delta S^0$$

Équation 5

2.3. Méthodes de détermination des paramètres thermodynamiques et cinétiques des interactions biomoléculaires

2.3.1 L'isotherme de Langmuir

Ce modèle a été développé en 1916 par Irvin-Langmuir et permet d'étudier l'adsorption d'un soluté (analyte A) sur une surface (ligand L).[185] Si l'interaction se fait de manière monovalente, l'analyte L en solution n'interagit qu'avec une seule molécule de récepteur jusqu'à l'obtention d'une monocouche à saturation.

Les réponses obtenues à l'équilibre (R_{eq}) en fonction de la concentration en analyte [A] permettent de tracer la courbe ci-dessous (**Figure 68**).

[185] Langmuir I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids part I solids. *J. Am. Chem. Soc.* **1916**;38(11):2221-2295. doi: 10.1021/ja02268a002

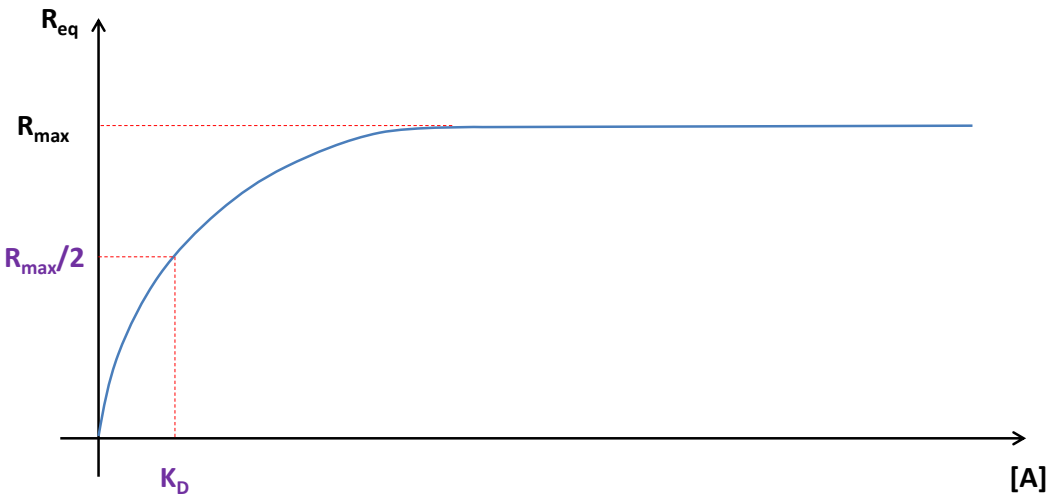


Figure 68 : détermination du K_D par une isotherme de Langmuir

Dans le cas d'une interaction avec un des partenaires immobilisé (R), l'Équation 2 peut être réécrite en prenant en compte que :

- la réponse R_{eq} est proportionnelle à la concentration en L fixée à la surface à l'équilibre et correspond donc à la concentration de complexe formée à l'équilibre : $[AL]_{eq}= R_{eq}$

- la concentration en ligand libre à l'équilibre $[L]_{eq}$ est égale à la concentration totale de ligand $[L]_{totale}$ diminuée de la concentration en ligand lié $[AL]_{eq}$: $[L]_{eq}=[L]_{totale}-[AL]_{eq}$

- $[L]_{totale}$ correspondant à la réponse maximale observée lorsque la surface est saturée avec A. $[L]_{totale} = R_{max}$

On obtient ainsi l'équation :

$$K_D = \frac{R_{max} \,.\, [A] - R_{eq} . [A]}{R_{eq}}$$

Équation 6

La réponse maximale enregistrée R_{max} est associée à l'asymptote de la courbe et correspond à la quantité maximale d'analyte pouvant s'adsorber sur la surface.[185]

Enfin, la valeur du K_D est obtenue par analyse de l'isotherme à partir de l'équation suivante :

$$R_{eq} = \frac{R_{max} \cdot [A]}{K_D + [A]}$$

Équation 7

L'utilisation de l'Équation 7 pour la détermination de K_D exige que : 1) l'interaction A-L atteigne l'équilibre et que 2) la concentration de l'analyte libre, [A], à l'équilibre avec le complexe A-L, puisse être mesurée ou estimée.

Ce modèle simple fonctionnant pour les interactions 1:1 devient obsolète dans le cas de phénomènes plus complexes comme la présence de plusieurs sites d'interaction, une interaction coopérative sur la surface ou/et l'interaction entre les molécules d'analyte.[184] D'autres isothermes et équations sont donc utilisées pour décrire ces interactions mais elles ne seront pas détaillées dans ce manuscrit.

2.3.2 La représentation de Scatchard

La linéarisation du modèle de Langmuir (représentation de Scatchard) permet l'extraction des paramètres d'une interaction monovalente entre une molécule immobilisée et une en solution. Dans le cas où le tracé de $R_{eq}/[A]$ en fonction de R_{eq} (cf. Équation 8) conduit à une droite (**Figure 69**), cela valide une interaction monovalente. L'équation de la droite permet d'obtenir les paramètres K_D et R_{max} :

$$\frac{R_{eq}}{[A]} = \frac{-1}{K_D} R_{eq} + \frac{R_{max}}{K_D}$$

Équation 8

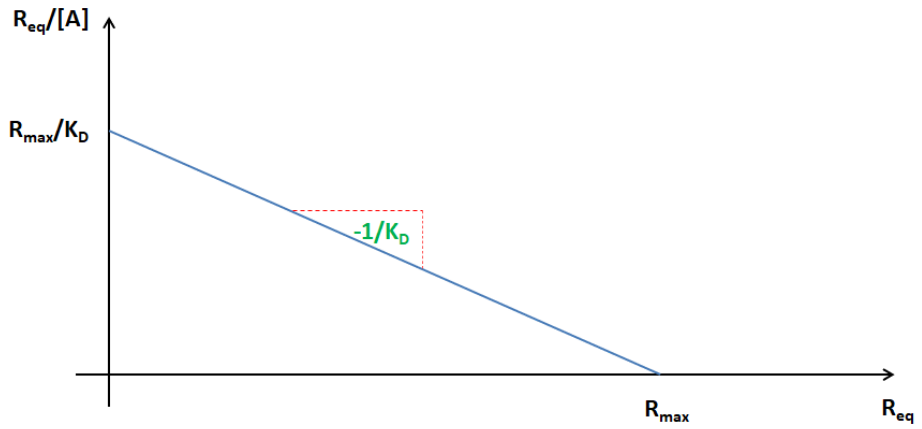


Figure 69 : détermination du K_D par la représentation de Scatchard

En revanche, si la linéarisation ne conduit pas à une droite, cela indiquerait la présence de plusieurs sites d'interactions ou d'interactions coopératives donnant lieu à des affinités différentes.

2.3.3 Modèle cinétique dans le cas d'une interaction monovalente

Lorsque l'on utilise des techniques de surfaces comme la résonance plasmonique de surface, l'utilisation d'un modèle cinétique permet de déterminer les paramètres cinétiques de dissociation k_{on} et de dissociation k_{off} (**Figure 70**).

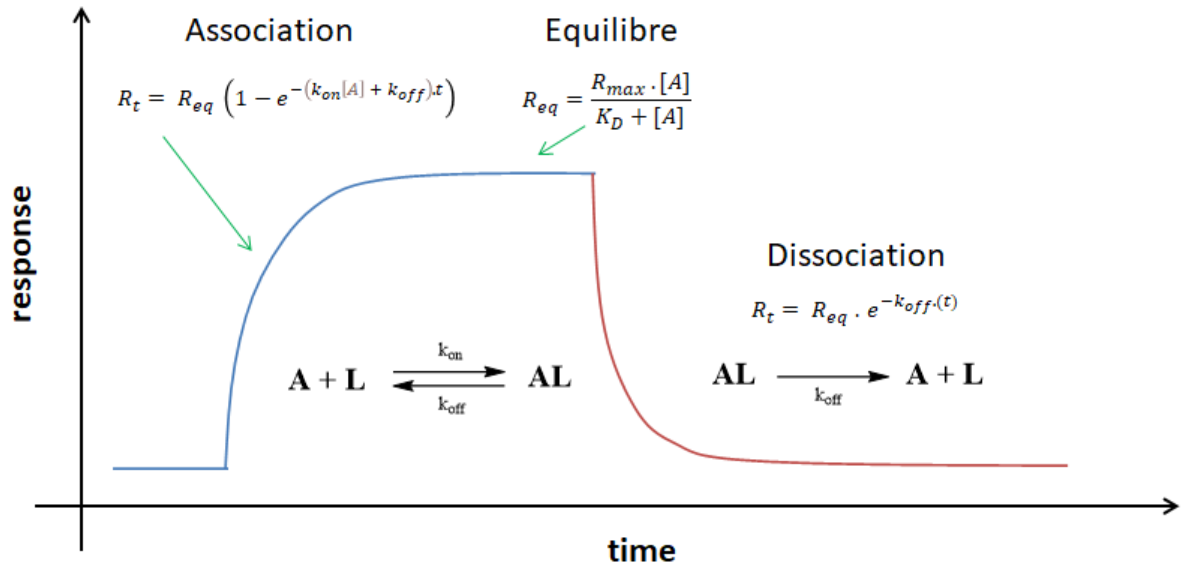


Figure 70 : Réponses caractéristiques enregistrées par SPR ou BLI en fonction du temps (t) et détermination des paramètres thermodynamiques et cinétiques associés lors d'une interaction 1:1

Une régression non linéaire des courbes d'association et de dissociation est réalisée permettant la détermination des constantes cinétique d'association et de dissociation. La constante cinétique de dissociation k_{off} (s^{-1}) est déterminée lors de la phase de dissociation par l'équation suivante :

$$R_t = R_{eq} \cdot e^{-k_{off}.t}$$

Équation 9

avec R_t la réponse obtenue à l'instant t.

Dans un second temps, la constante cinétique d'association k_{on} ($M^{-1}.s^{-1}$) peut ensuite être calculée en analysant l'étape d'association, grâce à l'équation suivante :

$$R_t = R_{eq} \left(1 - e^{-(k_{on}[A] + k_{off}).t}\right)$$

Équation 10

Le rapport de deux constantes cinétiques obtenues permet la détermination de K_D selon l'Équation 3. Cette valeur de K_D peut ainsi être comparée à la valeur obtenue par l'analyse de l'isotherme.

Dans le cas d'interaction quasi irréversible, présentant une très faible dissociation, l'analyse est réduite à la phase d'association permettant de déterminer la constante cinétique observée k_{obs} (s^{-1}).

D'après l'Équation 10, la vitesse d'association observée $k_{obs} = k_{on}.[A] + k_{off}$, augmente avec la concentration en analyte libre. Le tracé k_{obs} en fonction de [*A*] permet d'obtenir une droite. La valeur de k_{on} est alors déterminée grâce au coefficient directeur de la droite alors que le k_{off} correspond à l'ordonnée à l'origine. Enfin, un K_D apparent peut être déterminé en faisant le rapport k_{off}/k_{on}.[186]

[186] Hulme EC, Trevethick MA. Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation: Equilibrium binding assays. *Br. J. Pharmacol*. **2010**;161(6):1219-1237. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00604.x

3. Plan d'étude des interactions entre complexes bimétalliques et la phosphatidylsérine sur surface

L'utilisation des techniques de surface comme la SPR ou le BLI nécessite l'immobilisation/greffage d'un des deux partenaires sur la surface. Dans le cadre de ce projet, il s'agira des complexes bi-nucléaires présentés dans le chapitre précédent. L'immobilisation se fera à l'aide de la chaîne de greffage possédant une fonction amine en mesure de se lier à la surface possédant des fonctions acides carboxyliques: il s'agit dès lors d'un couplage peptidique (**Figure 71**).

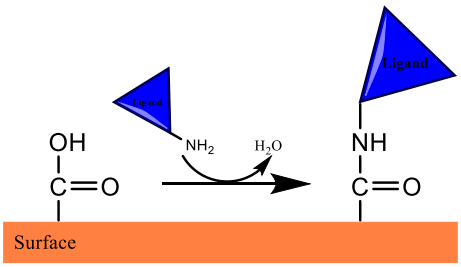


Figure 71 : Immobilisation d'un complexe métallique sur support solide par couplage peptidique

Dès lors, l'analyte pourra être injecté sur la surface fonctionnalisée par un complexe de coordination et l'interaction étudiée. Cette étude, tout comme celles réalisées en solution (présentées au chapitre 2) a été réalisée en trois étapes (**Figure 72**) afin d'augmenter progressivement la complexité de l'interaction. Les trois étapes sont les suivantes :

- L'analyte est un phospholipide à chaîne courte (monomère), DHPC, DHPS ou DHPE (1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine). Ce dernier composé qui n'a pas été utilisé dans le chapitre 2 correspond à un modèle de phosphatidyléthanolamine (également présent dans les membranes).
- L'analyte est une vésicule modèle (SUV) obtenue à partir d'un protocole d'extrusion permettant de contrôler leur taille et composition. Des SUVs composées de 100 % DOPC ou de 70/30 DOPC/DOPS ont été utilisées.
- L'analyte est une microvésicule isolée à partir de plasma humain selon un protocole de centrifugation séquentiel.

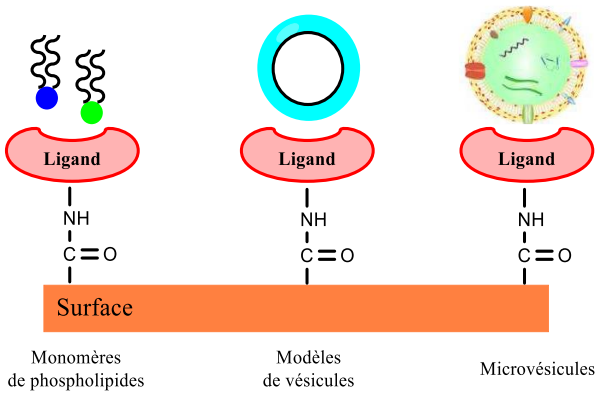


Figure 72 : Différentes étapes de l'étude sur surface de la reconnaissance des phospholipides par les complexes métalliques

4. Principes des techniques de caractérisation de surface et d'interface

Dans le cadre du projet de thèse, afin d'analyser l'interaction de nos complexes bi-nucléaires pour la phosphatidylsérine, nous avons utilisé la résonnance plasmonique de surface et l'interférométrie de bicouche. Par conséquent, cette partie est consacrée à la description de ces deux techniques ainsi qu'à leur mise en œuvre pour ce projet.

4.1. La résonance plasmonique de surface (SPR)

La résonance plasmonique de surface est une méthode d'analyse optique basée sur le phénomène d'onde évanescente permettant de suivre en temps réel les interactions entre des biomolécules non marquées en solution et un ligand immobilisé sur la surface.[117]

Avec une sensibilité de l'ordre de 0.1 ng.cm^{-2} pour des protéines, la SPR permet la détermination précise des constantes cinétiques k_{on}, k_{off}, et thermodynamique K_D des interactions biomoléculaires.[187]

En SPR, un faisceau de lumière polarisée est envoyé à l'interface entre deux milieux diélectriques – verre/liquide avec des indices de réfraction différents à un angle d'incidence menant à des conditions de réflexion interne totale (angle d'incidence **i** > angle d'incidence limite i_l). La lumière (photons) va pouvoir interagir avec une surface métallique (plasmons) qui sera en général de l'argent (*Ag*) ou de l'Or (*Au*) placée à cette interface. Le faisceau lumineux en interagissant avec les électrons de la surface métallique va générer une onde

[187] *Biacore Sensor Surface Handbook.*; GE Healthcare. **2008**. BR-1005-71 AB 05/2008

évanescente se propageant dans le milieu perpendiculairement à la surface et voit son amplitude décroître exponentiellement avec la distance de la surface métallique (sur environ 750 nm en fonction de la nature des équipements).[188,189]

Par ailleurs, la perte de l'énergie lumineuse (absorbée par les plasmons de surface) entraîne une chute de l'intensité du faisceau réfléchi. L'angle pour lequel l'intensité est la plus faible est appelé **angle de résonance** et varie avec l'indice de réfraction des composés à la surface du métal.

Ce signal de résonance est exprimé en unité de réponse (*Response Unit*, *RU* en anglais) correspondant à une variation de 10^{-4} degré de l'angle résonance soit 10^{-8} unité d'indice de réfraction (RIU). Sa variation est mesurée à l'aide d'un micro-réfractomètre donnant lieu à un sensorgramme et reflète ce qui se passe à l'instant *t* dans la cellule micro-fluidique (**Figure 73C**).

La fixation des molécules (analyte) injectées à flux constant sur la surface greffée par les ligands va provoquer un changement d'indice de réfraction du milieu et décaler l'angle de résonance (**Figure 73A et B**).[187,190] Bien que la propagation de l'onde évanescente soit d'environ 750 nm, son intensité diminue de façon exponentielle, et devient faible pour une distance de 200 nm de la surface. La sensibilité est donc plus importante lorsque l'étude se fait proche de la surface.

[188] Knoll W, Kasry A, Liu J, et al. Surface Plasmon Fluorescence Techniques for Bioaffinity Studies. In: *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. Schasfoort RBM, Tudos AJ, eds.. *R. Soc. Chem*. **2008**:275-312. doi:10.1039/9781847558220-00275

[189] Tudos AJ, Schasfoort RBM. Introduction to Surface Plasmon Resonance. In: *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. Schasfoort RBM, Tudos AJ, eds.. *R. Soc. Chem*. **2008**:1-14. doi:10.1039/9781847558220-00001

[190] Kooyman RPH. Physics of Surface Plasmon Resonance. In: *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. Schasfoort RBM, Tudos AJ, eds.. *R. Soc. Chem*; **2008**:15-34. doi:10.1039/9781847558220-00015

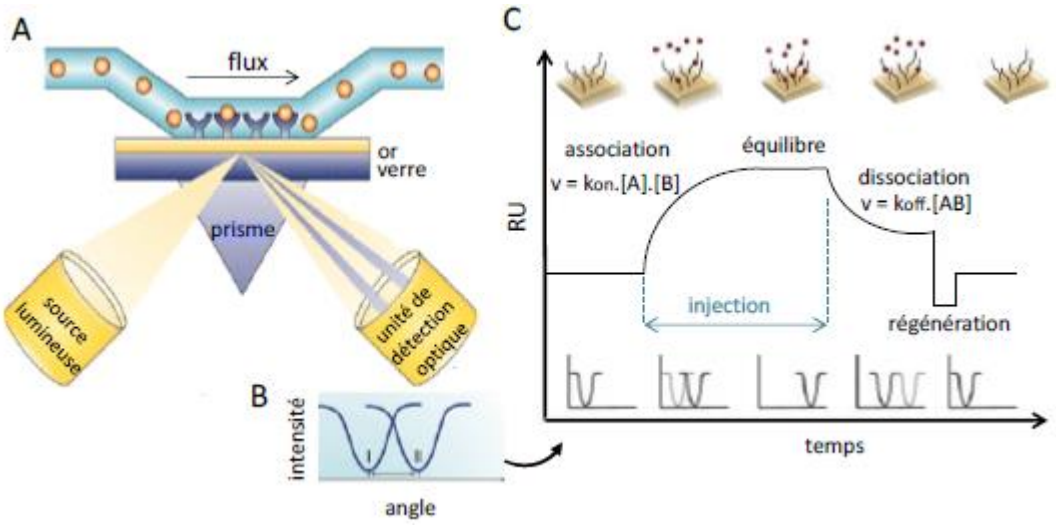


Figure 73 : Principe de la SPR. A) Fixation des molécules d'analytes injectées sur une surface fonctionnalisée par des récepteurs. B) Décalage de l'angle de résonance lors de la reconnaissance. C) Sensorgramme traduisant la réponse enregistrée en fonction du temps lors de l'étude d'interaction[191]

Le sensorgramme est composé de :

1) la phase de stabilisation qui correspond à l'injection du tampon de course appelée également ligne de base.
2) la phase d'association, signal généralement ascendant jusqu'à atteindre un plateau qui correspond à l'équilibre thermodynamique de l'interaction entre les molécules injectées et le ligand immobilisé à la surface.
3) la phase de dissociation, signal décroissant correspondant à une nouvelle injection du tampon.
4) la phase de régénération éventuelle correspondant à l'injection de solutions spécifiques permettant le décrochage de l'analyte, non dissocié lors de la phase de dissociation.

Par ailleurs, le signal maximum attendu en SPR est donné par la formule de Wilson[192]:

$$R_{A,max} = RU_L . \frac{MW_A . (dn/dC)_A}{MW_L . (dn/dC)_L} \times V$$

Équation 11

[191] Cooper MA. Optical biosensors in drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov*. **2002**;1(7):515-528. doi: 10.1038/nrd838

[192] Davis TM, Wilson WD. Determination of the refractive index increments of small molecules for correction of surface plasmon resonance data. *Anal. Biochem*. **2000**;284(2):348-353. doi:10.1006/abio.2000.4726

où R_{Amax} est la réponse maximale attendue entre l'analyte A et le ligand L immobilisé, RU_L correspondant à la variation de signal enregistré lors de l'immobilisation de L. MW_L and MW_A sont respectivement les masses molaires du ligand immobilisé et de l'analyte. $(dn/dC)_L$ et $(dn/dC)_A$ sont respectivement les incréments d'indice de réfraction du ligand immobilisé et de l'analyte. V correspond à la valence de l'interaction. Cette formule a récemment été élargie au cas d'interactions dans lesquelles intervient un changement conformationnel d'un des partenaires lors de la reconnaissance.[193]

En absence de changement conformationnel, le signal détecté pour l'analyte est fonction à la fois de la masse molaire de l'analyte mais également de la quantité de ligand immobilisé sur la surface. Ainsi, pour la détection de petites molécules, l'utilisation de surfaces polymériques permettant une présentation 3D du récepteur est souvent préférée pour la détection d'analyte de faible poids moléculaire nonobstant le fait qu'une immobilisation en 2D proche de la surface permet une meilleure sensibilité du signal.

A titre informatif, la formule de Wilson ne pourra pas être appliquée dans ce manuscrit car les incréments d'indice de réfraction des complexes métalliques ne sont pas connus.

4.2. L'interférométrie de bicouche (BLI)

Basé sur l'interférométrie, l'interférométrie de bicouche (BLI) est une technique optique de surface permettant de visualiser en temps réel l'interaction entre deux biomolécules. Mis en place par le groupe ForteBio, la plateforme Octet permet d'analyser jusqu'à 96 échantillons au cours d'une expérience.

En BLI, le système fonctionne à partir de biocapteurs avec à leur extrémité une pointe en plastique renfermant la fibre optique permettant à la lumière de le traverser ; une matrice biocompatible nécessaire à l'immobilisation des molécules d'intérêt qui recouvrent l'extrémité de la pointe. La lumière blanche émise par une LED (light-emitting diode) est dirigée par la fibre optique vers le bas du biocapteur où on observe deux interfaces séparées par une mince couche : 1) une <u>interface de référence interne</u> entre la fibre et la couche de

[193] Dejeu J, Bonnet H, Spinelli N, et al. Impact of Conformational Transitions on SPR Signals—Theoretical Treatment and Application in Small Analytes/Aptamer Recognition. *J. Phys. Chem. C.* **2018**;122(37):21521-21530. doi:10.1021/acs.jpcc.8b07298

biocompatibilité (**Figure 74A**) et 2) une interface entre une couche biocompatible (qui sert à la fixation des molécules d'intérêts) sur la surface de la pointe et le tampon. Ces deux interfaces vont réfléchir une partie de la lumière et vont donner à différentes longueurs d'onde des interférences constructives ou destructives (augmentation ou diminution de l'amplitude de l'onde respectivement). L'analyse à plusieurs longueurs d'onde permet de construire un profil interférométrique représenté en **Figure 74B**.

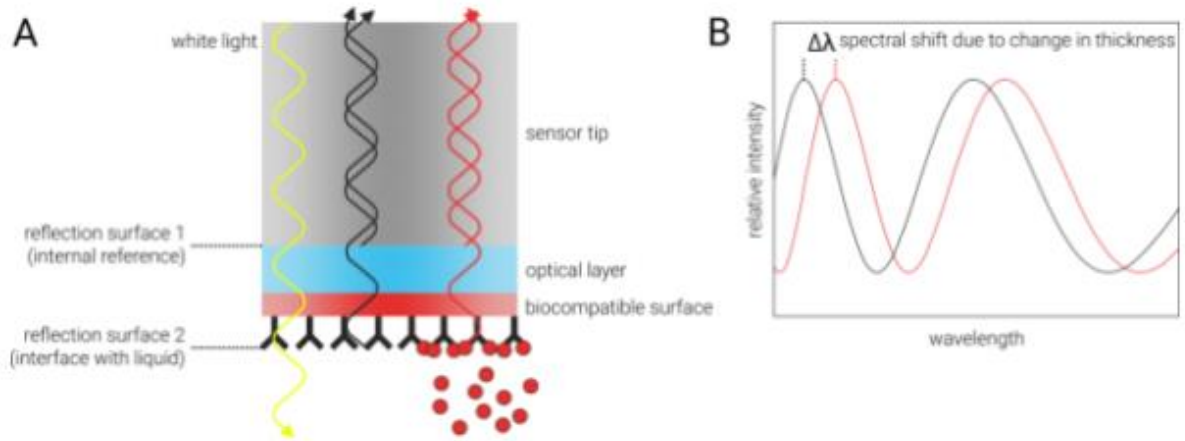


Figure 74 : principe du BLI. A) Schéma d'un capteur utilisé en BLI. B) Décalage du profil interférométrique en fonction de l'épaisseur de la couche biocompatible[194]

En pratique, lorsqu'un capteur est plongé dans une solution contenant les ligands (à fixer), la longueur du trajet de réflexion pour l'interface couche biocompatible/tampon est plus importante, donnant lieu à un décalage du profil interférométrique (**Figure 74B**). Autrement formulé, la couche biocompatible voit son épaisseur augmentée avec l'ajout de nouvelles molécules. Le profil interférométrique en est ainsi modifié (**Figure 74B**) avec un décalage en longueur d'onde (Δλ).

La variation dans le temps de Δλ lors du suivi d'une interaction permet d'obtenir un sensorgramme (**Figure 75**) dont l'analyse permettra la détermination des constantes cinétiques (k_{on}, k_{off}) et thermodynamiques (K_A, K_D) de l'interaction.

[194] BLI • Biolayer Interferometry • Kinetics Alternative to SPR and Biacore. 2bind. Accessed May 30, 2021. https://2bind.com/bli/

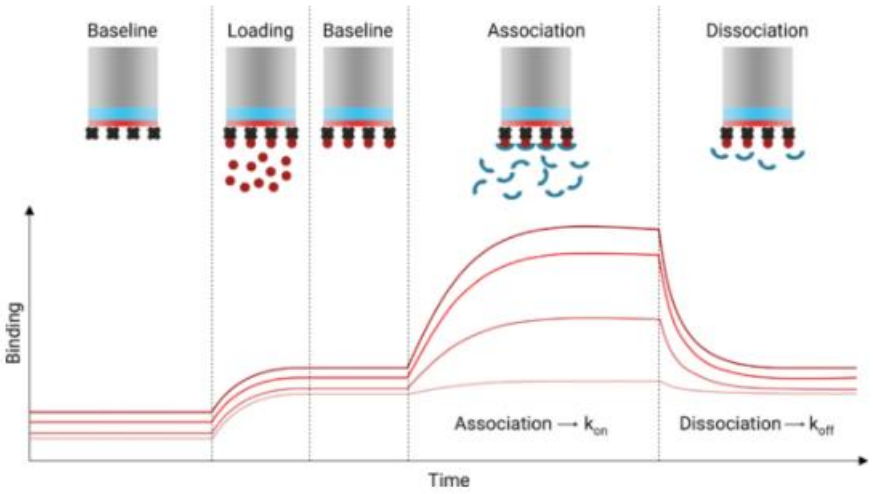


Figure 75 : exemple de sensorgramme représentant la fonctionnalisation d'un capteur par un récepteur (Loading) puis les phases d'association et de dissociation entre deux molécules par BLI[207]

4.3. Comparatif SPR et BLI

Bien que permettant toutes deux de mesurer l'interaction en temps réel entre deux biomolécules, des différences subsistent entre les deux méthodes. Les principales différences entre les appareils que nous avons utilisés sont présentées dans le **Tableau 10** ci-dessous :

Tableau 10 : comparatif des appareils SPR et BLI utilisés dans cette thèse

	Biacore T200 (SPR)	**Octet Red 96 (BLI)**
Puce fonctionnalisée	✓	✓
Flux	✓	X
Volume minimum nécessaire	40 µL/injection	180 µL/puit
Nombre de biocapteurs utilisables en parallèle	1-4	1-8
Evaluation de la quantité absorbée	✓	X

La SPR utilisé est un Biacore T200 qui fonctionne à flux continu et permet de travailler simultanément jusqu'à 4 pistes. Bien que nécessitant un faible volume d'injection, ce dernier peut être récupéré, mais dilué avec le tampon de course, après passage dans la microfluidique. Des puces pré-fonctionnalisées (CM5, C1, SA, par exemple) ou d'or nues (*Au*) sont disponibles.

Concernant le BLI, l'appareil fonctionne avec des plaques multi-puits, ce qui permet de récupérer l'échantillon après trempage du capteur dans la solution. L'appareil permet de suivre jusqu'à 8 capteurs.

Bien que ces deux techniques utilisent des biocapteurs différents, le mode d' immobilisation de nos complexes de coordination reste identique ; via un couplage amine grâce à présence de la chaîne de greffage sur nos complexes présentés dans le **chapitre 2** précédent.

4.4. Immobilisation covalente sur surface des complexes bi-nucléaires

Nous allons donc voir dans cette partie comment est réalisé le greffage de nos complexes bi-nucléaires (**Figure 76**) sur surface.

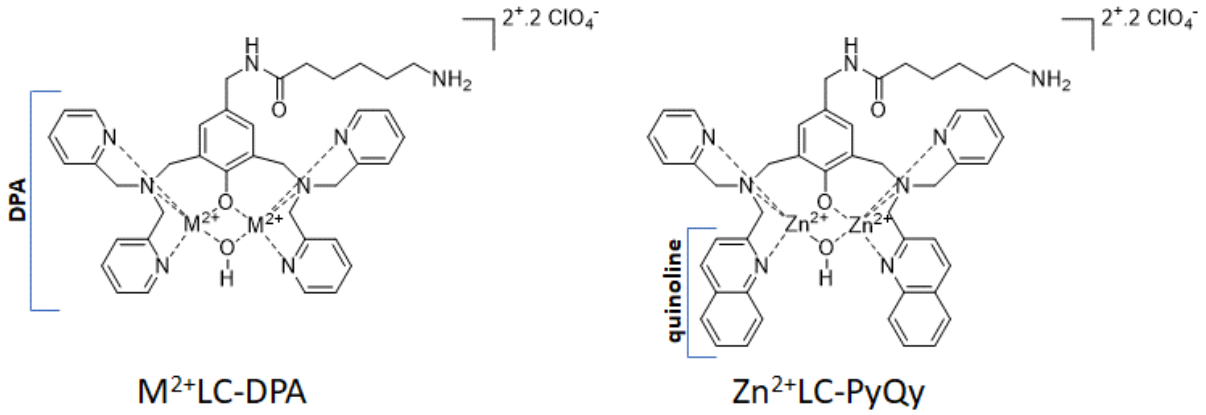


Figure 76 : complexes M^{2+}LC-DPA (avec M = Zn ou Cu) et Zn^{2+}LC-PyQy avec chaîne de greffage C_6-NH_2

4.4.1. Généralités

Le principe d'immobilisation sur capteurs par les deux techniques est identique. En effet, ces capteurs sont pourvus à leur surface de fonctions carboxyliques qui vont se coupler avec notre chaîne de greffage via un couplage peptidique.

Afin d'obtenir une liaison amide les acides carboxyliques sur la surface vont être activés via un mélange de réactifs NHS et EDC (respectivement pour N-hydrosuccinimide et 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidehydrochloride). Ces esters activés vont ensuite pouvoir réagir avec la fonction amine des chaînes de greffage. Enfin, une dernière

étape consiste en une inactivation grâce à l'éthanolamine des esters activés n'ayant pas réagi avec les complexes de coordination (Figure 77).

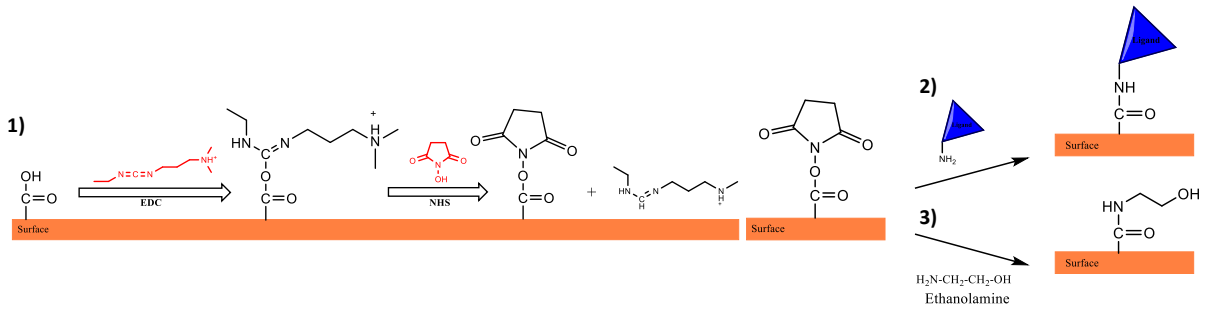


Figure 77 : séquences conduisant à l'immobilisation des complexes M^{2+}LC-DPA et Zn^{2+}LC-PyQy sur surface solide. **1)** activation des acides carboxyliques sur la surface, puis **2)** couplage amine via chaine de greffage, et enfin **3)** inactivation des esters non couplés

4.4.2. Capteurs utilisés en BLI

La société ForteBio commercialise une multitude de biocapteurs permettant la capture directe de ligands d'intérêts marqués ou non. On peut citer des capteurs Anti-GST, Anti-HIS ou encore Ni-NTA (nickel fixé sur de l'acide nitrilotriacétique) qui vont respectivement capturer des biomolécules marquées par la glutathion-S-transférase (GST), le marqueur polyhistidine (HIS); et sans marquage comme les capteurs AHC (*Anti-Human Fc Capture*) qui permettent l'immobilisation d'immunoglobuline humaine (*IgG*).

D'autres capteurs comme les capteurs SA (*streptavidine*) permettant l'immobilisation de molécules biotinylées ou les capteurs AR_2G (*Amine Reactive 2nd generation*) avec à leur surface des groupements carboxylate permettant le couplage covalent de molécules avec une fonction amine.

4.4.3. Surfaces utilisées en Biacore

En Biacore, le métal utilisé pour le phénomène de SPR est l'or. Les surfaces d'or sont ensuite fonctionnalisées par des molécules thiolées.

Afin de limiter les probabilités d'interactions non-spécifiques entre l'analyte et le biocapteur, il est nécessaire de greffer de manière homogène le ligand sur l'ensemble de la surface. De plus, en fonction du type de surface utilisé, le greffage des ligands peut être fait en 2D ou 3D. Ce point sera développé dans les parties ci-dessous.

4.4.3.a. Le greffage sur polymère

Les surfaces CM5 développées par Biacore sont recouvertes par des surfaces d'or elles-mêmes recouvertes d'une matrice polymérique de dextran carboxyméthylé (polymère de dextrose). Cette matrice donne à la surface des propriétés hydrophiles, connues pour diminuer les interactions non spécifiques.[195] De plus, la présence des fonctions carboxylates tout le long de la chaîne de polymère aboutie à une **fonctionnalisation en 3D** de la surface (**Figure 78**). Ceci permet ainsi d'avoir une plus grande densité de récepteur sur la surface, augmentant ainsi le signal de réponse attendu lors de l'interaction (cf. Équation 11). C'est ce type de fonctionnalisation que nous avons utilisé pour l'étude avec nos monomères de phospholipides. Après activation de la surface par le mélange NHS/EDC, le ligand est injecté et immobilisé via l'amine terminale de sa chaîne de greffage.

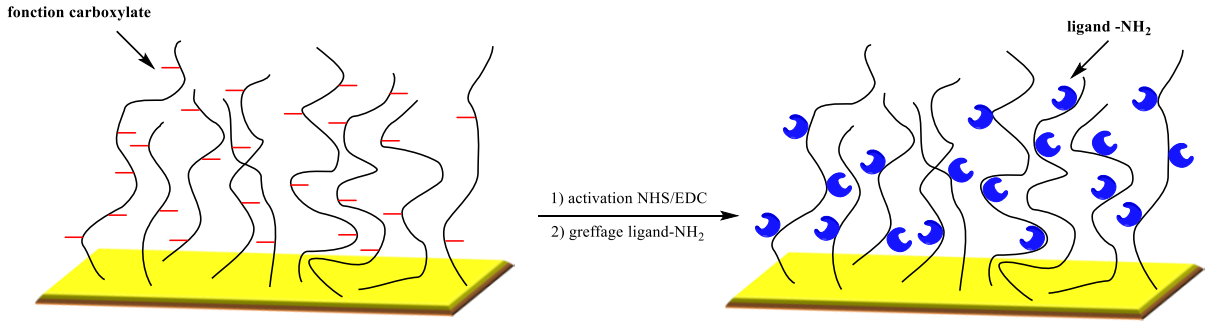


Figure 78 : couplage amine sur surface CM5 après activation des fonctions carboxylates par un mélange NHS/EDC

4.4.3.b. Les monocouches auto-assemblées (SAMs)

Les monocouches auto-assemblées (*self-assembled-monolayers, SAMs en anglais*) représentent l'arrangement spontané de molécules organiques de nature hétéro-bifonctionnelles composées d'un groupement de tête, d'un espaceur et d'un groupement terminal : ces SAMs sont adsorbée de manière très organisée.

Les groupements fonctionnels de tête les plus utilisés sont les thiols (-SH). Ils possèdent une forte affinité pour l'or. En effet, ils vont interagir avec les atomes d'or via une

[195] Mammen M, Choi S-K, Whitesides GM. Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1998**;37(20):2754-2794. doi:10.1002/(SICI)1521-3773(19981102)37:20<2754::AID-ANIE2754>3.0.CO;2-3

addition oxydante et une élimination réductrice de l'hydrogène pour former une liaison avec l'or avec une force de l'ordre de 50 kcal.mol^{-1} (équation ci-dessous).[196]

Cette force va permettre une stabilité de la monocouche.

$$R\text{-}SH + Au \longrightarrow R\text{-}S\text{-}Au + 1/2\ H_2$$

Les groupements terminaux sont choisis en fonction de la nature de la surface que l'on souhaite obtenir. Dans notre cas, il s'agit de fonctions carboxyliques (-COOH) qui vont après activation (NHS/EDC) permettre le greffage de ligands par couplage amine, avec cette fois-ci l'obtention d'une **surface 2D**. Ainsi, les alcanes vont servir à l'autoassemblage des thiols pour former une couche compacte et les PEGs vont limiter l'adsorption non-spécifique des protéines.[197] En effet, la surface des MVs expose des polypeptides constitutives des protéines membranaires et les solutions peuvent contenir diverses contaminants ou constituants protéiques.

Au final, les SAMs sont formées après incubation dans une solution de PEG-alcane-thiols. Ces molécules thiolées s'adsorbent rapidement sur la surface puis s'organisent (s'auto-assemblent) afin d'obtenir une couche compacte semi-cristalline ou cristalline au bout de plusieurs heures (une nuit).[198,199]

Dans le cadre de notre projet, nous avons été amenés à utiliser pour la fonctionnalisation de notre surface d'or le composé HS-C_{11}-EG_6-OCH_2-COOH (**Figure 79**) avec un processus d'activation (NHS/EDC) et greffage identique (liaison peptidique) à ce qui a été présenté en partie 4.4.1. Généralités.

[196] Pensa E, Cortés E, Corthey G, et al. The chemistry of the sulfur-gold interface: in search of a unified model. *Acc. Chem. Res*. **2012**;45(8):1183-1192. doi:10.1021/ar200260p
[197] Prime KL, Whitesides GM. Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide): a model system using self-assembled monolayers. *J. Am. Chem. Soc*. **1993**;115(23):10714-10721. doi:10.1021/ja00076a032
[198] Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, et al. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem. Rev*. **2005**;105(4):1103-1170. doi:10.1021/cr0300789
[199] Frasconi M, Mazzei F, Ferri T. Protein immobilization at gold-thiol surfaces and potential for biosensing. *Anal. Bioanal. Chem*. **2010**;398(4):1545-1564. doi:10.1007/s00216-010-3708-6

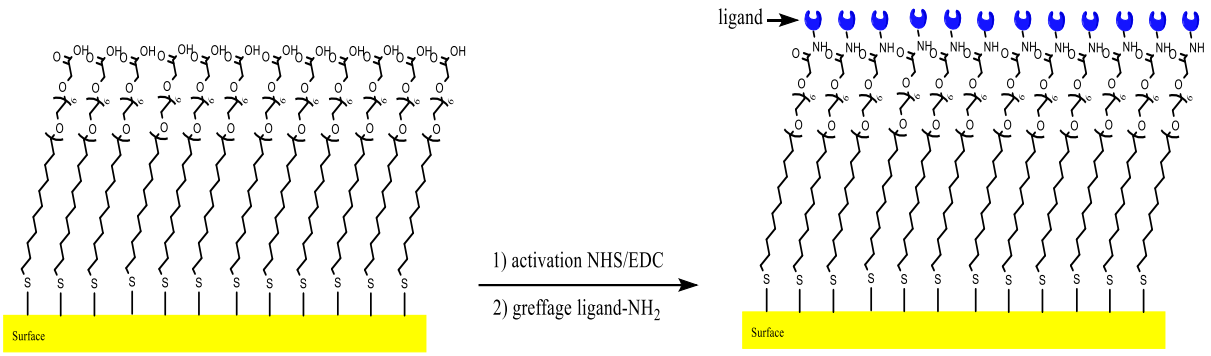


Figure 79 : Fonctionnalisation par couplage amine d'une monocouche auto-assemblée à la surface de l'or à partir d'une liaison S-Au

5. Caractérisation de l'interaction entre M^{2+}-DPA/PS par SPR

5.1. Généralités : études SPR mettant en jeu des systèmes vésiculaires

Dans le cadre de reconnaissance impliquant un partenaire inclus dans des SUVs, les études par SPR sont principalement réalisées avec les SUVs capturées sur surface, notamment en utilisant des puces spécialement dédiées à cette capture (puces L1, Biacore).[200,201,202,203]

Cette approche a été récemment mise en œuvre par le groupe de Tsou et al pour étudier l'interaction entre des SUVs (contenant ou non PS) immobilisées et des complexes métalliques de zinc basés sur le ligand DPA.[204,205] Cette configuration simplifie les études en supprimant les phénomènes de multivalence et la régénération des surfaces. Toutefois, quelques études ont été menées en utilisant des SUVs comme analytes.[206,207]

---

[200] Hodnik V, Anderluh G. Capture of intact liposomes on biacore sensor chips for protein-membrane interaction studies. *Methods Mol. Biol*. **2010**;627:201-211. doi:10.1007/978-1-60761-670-2_13

[201] Figueira TN, Freire JM, Cunha-Santos C, et al. Quantitative analysis of molecular partition towards lipid membranes using surface plasmon resonance. *Sci. Rep*. **2017**;7(1):45647. doi:10.1038/srep45647

[202] Schillinger A-S, Grauffel C, Khan HM, et al. Two homologous neutrophil serine proteases bind to POPC vesicles with different affinities: When aromatic amino acids matter. *Biochim. Biophys. Acta*. **2014**;1838(12):3191-3202. doi:10.1016/j.bbamem.2014.09.003

[203] Wikström A, Deinum J. Probing the interaction of coagulation factors with phospholipid vesicle surfaces by surface plasma resonance. *Anal. Biochem*. **2007**;362(1):98-107. doi:10.1016/j.ab.2006.12.009

[204] Liu Y-W, Shia K-S, Wu C-H, et al. Targeting Tumor Associated Phosphatidylserine with New Zinc Dipicolylamine-Based Drug Conjugates. *Bioconjugate Chem*. **2017**;28(7):1878-1892. doi:10.1021/acs.bioconjchem.7b00225

[205] Liu Y-W, Chen Y-Y, Hsu C-Y, et al. Linker Optimization and Therapeutic Evaluation of Phosphatidylserine-Targeting Zinc Dipicolylamine-based Drug Conjugates. *J. Med. Chem*. **2019**;62(13):6047-6062. doi:10.1021/acs.jmedchem.9b00173

[206] Xiang Y, Kiseleva R, Reukov V, et al. Relationship between Targeting Efficacy of Liposomes and the Dosage of Targeting Antibody Using Surface Plasmon Resonance. *Langmuir*. **2015**;31(44):12177-12186. doi:10.1021/acs.langmuir.5b01386

En parallèle, la SPR et la SPRi (imagerie par SPR) ont été largement utilisée dans le cadre de la capture et de la détection de vésicules extracellulaires. Dans la littérature, de nombreux articles rapportent l'étude d'EVs, principalement des exosomes, dans le but d'identifier les marqueurs présents à leur surface. La capture se fait grâce à des puces fonctionnalisées par les anticorps correspondants.[208,209,210,211,212,213]

Des études se sont également orientées vers la standardisation des mesures SPR/SPRi par la comparaison avec d'autres techniques. L'équipe de Gool a ainsi réalisé une étude comparative entre SPRi et cytométrie en flux sur le phénotypage et la quantification de microvésicules issues de cellules cancéreuses.[208]

Par ailleurs, le groupe de Boireau et al, a développé une plateforme NanoBioAnalytique (NBA) qui combine deux techniques : la SPRi et la microscopie à force atomique (AFM). Cette plateforme a permis de quantifier, caractériser et visualiser des microvésicules issues de plaquettes.[211,212]

Tout comme le plan établi pour les études d'interaction en solution (Cf. Chap 2-1.3. De la DPA à la phosphatidylsérine et choix structural), nous avons débuté nos études avec des monomères de phospholipides (chaîne courte de 6 carbones-**Figure 81**) disponible commercialement afin d'étudier l'interaction ou non avec nos complexes Cu^{2+}CC-DPA et M^{2+}LC-DPA (avec M = Cu ou Zn).

La reconnaissance avec des vésicules modèles sera étudiée, puis les microvésicules issues de plasma sanguins (**Figure 72**). Ces études sont réalisées dans le tampon HEPES 10

---

[207] Jayaraman N, Maiti K, Naresh K. Multivalent glycoliposomes and micelles to study carbohydrate–protein and carbohydrate–carbohydrate interactions. *Chem. Soc. Rev*. **2013**;42(11):4640-4656. doi:10.1039/C3CS00001J

[208] Gool EL, Stojanovic I, Schasfoort RBM, et al. Surface Plasmon Resonance is an Analytically Sensitive Method for Antigen Profiling of Extracellular Vesicles. *Clin. Chem*. **2017**;63(10):1633-1641. doi:10.1373/clinchem.2016.271049

[209] Hosseinkhani B, van den Akker N, D'Haen J, et al. Direct detection of nano-scale extracellular vesicles derived from inflammation-triggered endothelial cells using surface plasmon resonance. *Nanomedicine*. **2017**;13(5):1663-1671. doi:10.1016/j.nano.2017.03.010

[210] Zhu L, Wang K, Cui J, et al. Label-free quantitative detection of tumor-derived exosomes through surface plasmon resonance imaging. *Anal. Chem*. **2014**;86(17):8857-8864. doi:10.1021/ac5023056

[211] Obeid S, Ceroi A, Mourey G, Saas P, Elie-Caille C, Boireau W. Development of a NanoBioAnalytical platform for "on-chip" qualification and quantification of platelet-derived microparticles. *Bios Bioelectron*. **2017**;93:250-259. doi:10.1016/j.bios.2016.08.100

[212] Obeid S, Sung P-S, Le Roy B, et al. NanoBioAnalytical characterization of extracellular vesicles in 75-nm nanofiltered human plasma for transfusion: A tool to improve transfusion safety. *Nanomedicine*. **2019**;20:101977. doi:10.1016/j.nano.2019.02.026

[213] Picciolini S, Gualerzi A, Vanna R, et al. Detection and Characterization of Different Brain-Derived Subpopulations of Plasma Exosomes by Surface Plasmon Resonance Imaging. *Anal. Chem*. **2018**;90(15):8873-8880. doi:10.1021/acs.analchem.8b00941

mM, NaCl 150 mM, pH 7.4 (WB), qui sert de tampon de travail (circulant en flux) au niveau de l'appareil.

5.2. Etudes avec les phospholipides à chaînes courtes

Au regard de la formule de Wilson (cf. Équation 11), la réponse SPR attendue pour les phospholipides à chaines courtes, de faible poids moléculaire est faible. Afin d'augmenter la réponse attendue, nous avons effectué l'immobilisation des complexes métallique sur une puce CM5 qui nous permet d'obtenir une plus grande densité en complexes immobilisés. L'ensemble des expériences a été réalisé à 25°C, en utilisant le tampon de travail (WB), à 10µL/min^{-1}.

5.2.1. Etape d'immobilisation

L'immobilisation des complexes de coordination a été réalisée par un couplage amine avec comme référence une piste ayant été activée par le mélange NHS-EDC puis désactivée par l'éthanolamine (0.3 M). Après l'étape de désactivation, la fonctionnalisation des surfaces est complétée par les injections successives d'une solution de dodecyl sulfate de sodium (SDS) 0.05 % et de n-octyl glucoside (OG) 40 mM . La **Figure 80** montre le sensorgramme enregistré lors d'une immobilisation sur lequel on distingue (1) l'étape d'activation par NHS-EDC, (2) l'injection du complexe Zn^{2+}-LC-DPA solubilisé dans le mélange eau/DMSO (70:30) et (3) désactivation de la surface avec de l'éthanolamine à 0.3 M et pH 11.7.

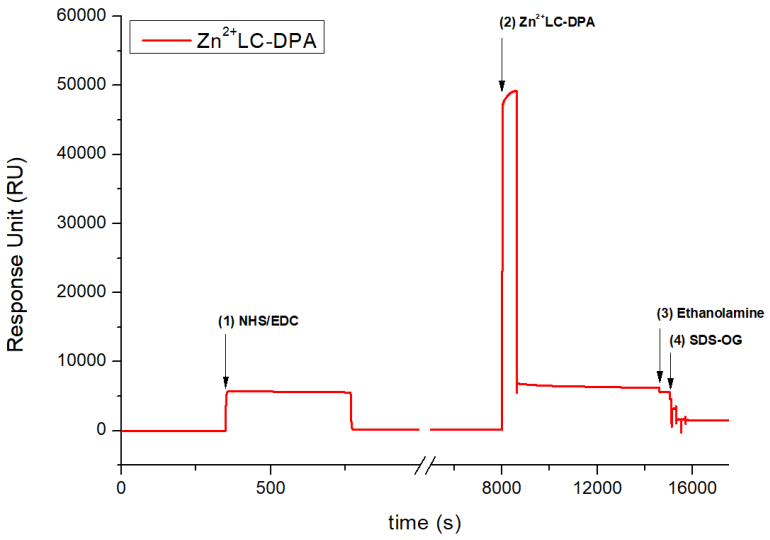


Figure 80 : sensorgramme enregistré lors de l'immobilisation du complexe Zn^{2+}LC-DPA sur CM5. (1) Activation par NHS/EDC; (2) Injection de Zn^{2+}LC-DPA à 250 µM dans H_2O/DMSO (70 :30) ; (3) Inactivation des esters non couplés par l'éthanolamine à 0.3 M et pH 11.7 et (4) Lavage de la surface par injection successive de SDS et d'OG. (n=2)

Les solutions de désactivation recommandées par Biacore ou Fortebio sont à 1 mM avec un pH ajusté à 8.5 par HCl. Des tests préliminaires de reconnaissance des vésicules modèles ont montrés une perte de signal lorsque l'étape de désactivation était réalisée avec un pH de 8.5. Les fortes variations de signaux observés lors des injections correspondent à la différence d'indice de réfraction des solutions utilisées (eau ou eau/DMSO) par rapport au tampon WB. La valeur d'immobilisation est obtenue par la différence de réponse entre la ligne de base (WB) et le retour dans le WB après chaque étape d'injection.

Le greffage des complexes est réalisé à partir d'une solution de complexes à 250 µM dans un mélange eau/DMSO (70:30) afin de s'assurer de la solubilité des complexes.

Après immobilisation, les valeurs obtenues sont respectivement de 168 RU sur la piste de référence, 1300 RU pour la piste avec Cu^{2+}CC-DPA, 1071 RU pour la piste avec Cu^{2+}LC-DPA et de 1522 RU pour la piste avec Zn^{2+}LC-DPA.

5.2.2. Tests d'interactions

Les phospholipides à chaînes courtes utilisés pour cette étude sont les suivants : 1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DHPC), 1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (DHPS) et 1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DHPE) (**Figure 81**).

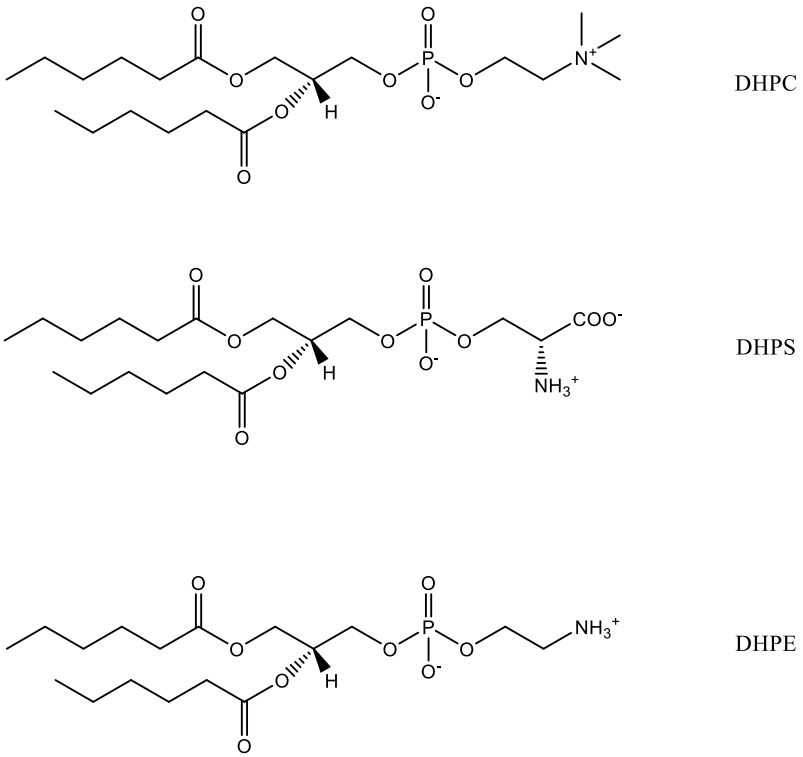


Figure 81 : structure des monomères de phopholipides utilisés. De haut en bas : 1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DHPC), 1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (DHPS) et 1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DHPE)

Après avoir greffé nos complexes Cu^{2+}CC-DPA et M^{2+}LC-DPA (avec M = Cu ou Zn) sur la surface, les différents analytes ont été à leur tour injectés sur les quatre pistes à 30 µL.min^{-1} (**Figure 80**). Comme pour les études en solution, nous avons utilisé les phospholipides à chaînes courtes en dessous de leur CMC afin de n'avoir qu'une seule entité en solution (monomères *vs* micelles). Bien que, le fournisseur préconise l'utilisation de polysorbate 20 (P20) à 0.05 % pour les études d'interaction avec cet appareil afin de réduire les interactions non-spécifiques, nous avons fait le choix de ne pas l'utiliser, afin de ne pas former d'éventuelles micelles mixtes P20/phospholipides à chaînes courtes.

Aux signaux obtenus sur les pistes actives (porteuses des complexes) sont soustraits les signaux enregistrés sur la piste de référence afin de s'affranchir des différences d'indice de

réfraction. Les signaux bruts enregistrés pour l'injection de DHPS sur la piste Cu^{2+}CC-DPA et sur la piste de référence sont présentés **Figure 82A** ; les signaux bruts enregistrés pour l'injection de DHPC et DHPE sont présentés en **annexe 1**. Ces signaux sont à nouveaux soustraits avec ceux enregistrés lors de l'injection de WB afin de pallier à une éventuelle dérive de l'appareil. Enfin, les signaux obtenus après cette procédure de double soustraction sont représentés sur la **Figure 82B**.

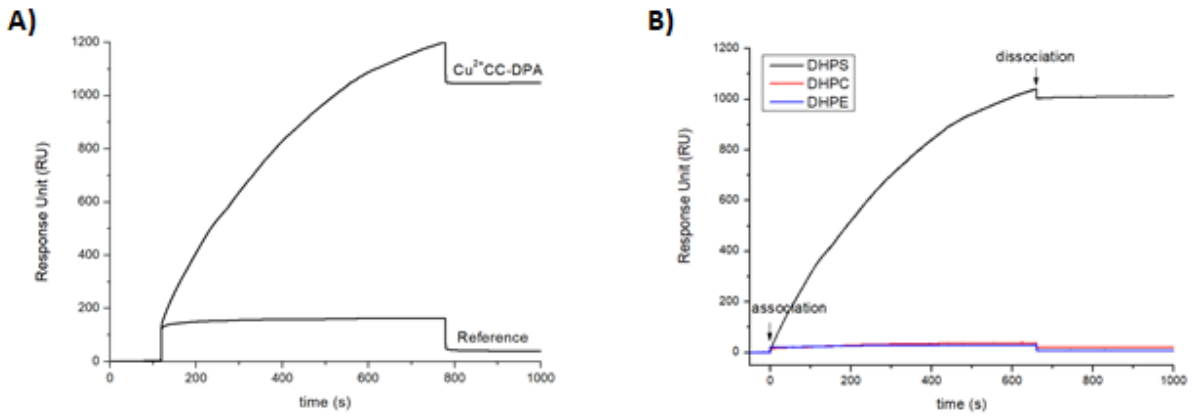


Figure 82 : (A) réponse observée sur la piste de référence et sur la piste fonctionnalisée avec Cu^{2+}CC-DPA lors de l'injection de DHPS 750 µM. (B) réponse observée après procédure de double soustraction pour **1)** en noir DHPS 750 µM, **2)** en rouge DHPC 750 µM et **3)** en bleu DHPE 750 µM sur une la piste fonctionnalisée avec Cu^{2+}CC-DPA

Lors de l'injection de DHPS 750 µM sur la surface de référence (Figure 82B), nous observons un signal au profil carré lié à la différence d'indice de réfraction entre la solution injectée et le WB. Il n'y a pas d'interaction non-spécifique de DHPS sur la surface de référence. Sur la piste fonctionnalisée par Cu^{2+}CC-DPA, un signal associé à la reconnaissance de DHPS par le complexe de coordination est observé. Après procédure de double soustraction (**Figure 82B**), nous observons des signaux nuls pour DHPC (courbe rouge) et DHPE (courbe bleue) et une réponse à 1000 RU pour DHPS (courbe noire) à 750 µM vis-à-vis de Cu^{2+}CC-DPA : il y a une sélectivité du ligand greffé pour DHPS par rapport à DHPE et DHPC. Bien que les molécules de DHPE et DHPC présentent un groupement phosphate, celui-ci ne semble pas suffisant pour induire une interaction avec le complexe de cuivre. De plus, on note que l'interaction est quasi irréversible car on n'observe pas de dissociation. Il faut donc effectuer un cycle supplémentaire afin de régénérer la surface avant de lancer une nouvelle injection. Ces régénérations sont possibles grâce à l'action successive SDS 0.05 % et d'OG 40 mM. Injectés seul, chacun de ces tensioactifs ne permet pas la régénération complète de la surface.

Par ailleurs, nous observons des résultats similaires avec les complexes Cu^{2+}LC-DPA et Zn^{2+}LC-DPA (les graphes sont présentés en **annexe 1**). Ces complexes sont également sélectifs vis-à-vis de l'analyte DHPS par rapport à DHPC et DHPE.

Enfin, la caractérisation de l'interaction entre nos complexes et DHPS est réalisée en injectant une gamme de concentrations d'analytes.

5.2.3. Caractérisations des interactions

Suite aux tests d'interactions précédents, une gamme de concentration allant de 50 à 1500 µM pour DHPS est ensuite injectée sur les différentes pistes (n=2). Les réponses observées après soustraction avec la piste de référence sont présentées sur la **Figure 83**.

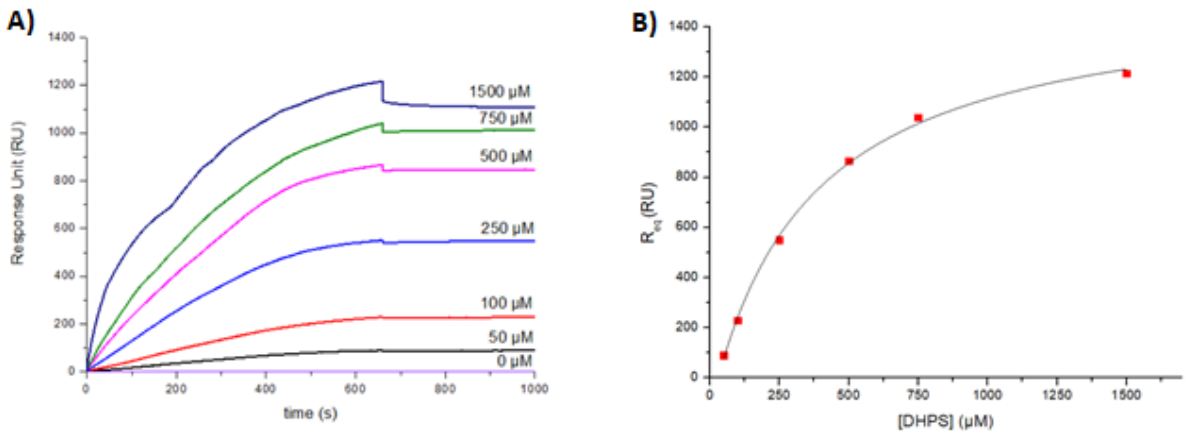


Figure 83 : (A) sensorgrammes obtenus après double soustraction pour la piste fonctionnalisée par Cu^{2+}CC-DPA sur laquelle une gamme de concentration de DHPS allant de 50 à 1500 µM est injectée et (B) tracé de la réponse en fin d'association en fonction de la concentration de DHPS

La réponse observée augmente avec la concentration en DHPS (**Figure 83A**). Bien que l'équilibre ne soit pas tout à fait atteint en fin d'association, les valeurs obtenues sont utilisées pour faire une première estimation de l'affinité. Les réponses en fin d'association, assimilées ici à la réponse à l'équilibre sont tracées en fonction de la concentration et sont représentées sur la **Figure 83B**.

L'analyse de cette courbe avec un modèle de Langmuir, considérant une interaction 1:1 pour une première approche permet d'extraire les valeurs de K_D (**Tableau 11**).

Tableau 11 : détermination du K_D lors de l'interaction entre DHPS et les complexes immobilisés

	Cu^{2+}CC-DPA	Cu^{2+}LC-DPA	Zn^{2+}LC-DPA
K_D (µM)	512 ± 88	339 ± 110	4167 ± 790

Les analyses pour les complexes M^{2+}LC-DPA sont présentées en **annexe 1**. Pour le complexe de Zn^{2+}LC-DPA, la gamme de dilution n'est pas assez étendue, mais l'analyse révèle néanmoins une affinité pour DHPS plus faible du complexe Zn^{2+}LC-DPA par rapport à Cu^{2+}LC-DPA.

Concernant les complexes de cuivre, la longueur de la chaîne de greffage n'a qu'un faible impact sur l'affinité, ce qui peut s'expliquer par le fait que le greffage s'effectue sur une chaîne de dextran, apportant une flexibilité à la couche de reconnaissance. C'est pourquoi dans la suite nous avons travaillé uniquement sur les complexes M^{2+}LC-DPA.

Par ailleurs, l'analyse des phases d'association et de dissociation pour l'obtention des paramètres cinétiques n'est pas possible dans notre cas, compte tenu de la faible dissociation observée. En effet, les constantes cinétiques obtenues par cette analyse sont en dehors des limites de valeurs analysables par l'appareil.

L'analyse sur la seule phase d'association par l'obtention du k_{obs} a donc été réalisée. Le tableau de valeurs de k_{obs} obtenus pour l'injection de DHPS sur une piste fonctionnalisée par Cu^{2+}LC-DPA sont représentées sur la **Figure 84** ainsi que le tracé de k_{obs} en fonction de la concentration en DHPS.

A)

Concentration DHPS (µM)	k_{obs} ($M^{-1}.s^{-1}$)
50	0.001383
100	0.001236
250	0.001906
500	0.002108
750	0.002522
1500	0.004158

B)

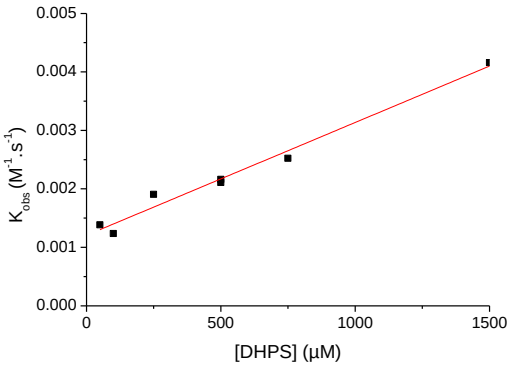


Figure 84 : (A) tableau de valeurs de k_{obs}. (B) tracé de k_{obs} en fonction de la concentration en DHPS injectée sur une piste fonctionnalisée par Cu^{2+}LC-DPA

Les valeurs d'association et de dissociation respectivement de 1,9292 s^{-1} et de 0,0012 $M^{-1} \cdot s^{-1}$, correspondent à un K_D de 622 µM. Toutefois ces constantes cinétiques obtenues par cette méthode ne correspondent pas au profil des sensorgrammes observés expérimentalement. D'après les sensorgrammes obtenus, des valeurs de k_{on} supérieures à 10^2 s^{-1} et de k_{off} inférieures à 10^{-4} $M^{-1}.s^{-1}$ sont attendues (voir **annexe 1**). La gamme de dilution utilisée se révèle être insuffisante pour générer des variations de k_{obs} suffisante permettant de déterminer avec fiabilité les valeurs de k_{on} et k_{off}.

Pour obtenir des données cinétiques, de nouvelles études devront être réalisées en diminuant la quantité de ligands immobilisés sur la surface, en augmentant la gamme de dilution et en rallongeant le temps de dissociation.

Toutefois, ces expériences ont permis de démontrer la spécificité de la reconnaissance des complexes métalliques pour la DHPS *vs* DHPE/DHPC. Ces résultats permettent ainsi d'envisager la capture sélective et la détection de microvésicules extracellulaires grâce à l'interaction PS/complexe de coordination. Pour cela, il faut toutefois s'assurer que la reconnaissance des molécules de PS est maintenue lorsque celles-ci sont engagées dans une structure complexe comme les liposomes ou les MVs. En effet, des facteurs d'encombrement stérique et d'accessibilité peuvent aussi perturber cette reconnaissance.

5.3. Etudes sur vésicules modèles

Nous nous sommes tournés par la suite vers des études avec des vésicules unilamellaires modèles réalisées par extrusion. Deux types de SUVs extrudées sur des membranes avec un diamètre de pore de 100 nm ont été formées (cf. Chap 2-3.5.2. SUVs PC et SUVs PC/PS) :

1) SUV PC 100 % composés entièrement de DOPC (chaîne longue de phosphatidylcholine, avec une chaîne carbonée de 18 atomes au lieu de 6 pour la chaîne courte).
2) SUV PC 70 % / SUV PS 30 % composés d'un mélange de 70 % de DOPC et de 30 % de DOPS (chaîne longue de phosphatidylcholine, avec une chaîne carbonée de 18 atomes au lieu de 6 pour la chaîne courte). Ce mélange a pour but de tester la spécificité de nos ligands vis-à-vis de la PS présente des SUVs.

La taille de 100 nm a été choisie car elle représente la limite basse de la taille des MVs. Pour rappel, la taille des vésicules modèles dans le tampon WB a été mesurée par DLS et sont de 120 nm pour SUV PC et de 110 nm pour SUV PS. Les tailles de ces vésicules sont inférieures à la longueur de pénétration de l'onde évanescente de notre appareil.

Toutefois, afin de pallier à la taille des SUVs, les études ont été réalisées sur des surfaces 2D fonctionnalisées à partir de thiols, ce qui nous a permis (i) de réduire l'épaisseur de la couche de détection afin d'améliorer la sensibilité mais également (ii) de réduire les coûts des expériences.[214] Les SAMs étaient composées à 100 % de HS-C_{11}-EG_6-OCH_2-COOH.

[214] Prado E, Bonnat L, Bonnet H, et al. Influence of the SPR Experimental Conditions on the G-Quadruplex DNA Recognition by Porphyrin Derivatives. *Langmuir*. **2018**;34(43):13057-13064. Doi: 10.1021/acs.langmuir.8b02942

5.3.1. immobilisation des complexes sur SAM

Pour ces expériences, nous avons fonctionnalisé les 4 pistes de l'appareil comme suit :

1) la piste de référence, activée/désactivée (**Figure 77**), sans complexe greffé.
2) la piste de l'annexine V (AV) à 44 µM diluée dans WB. Pour rappel, l'AV est le ligand naturel de reconnaissance de la phosphatidylsérine en présence de Ca^{2+}. Son utilisation sert de point de comparaison pour nos complexes de coordination (cf. Chap2-1.3. De la DPA à la phosphatidylsérine et choix structural).
3) la piste où est greffé le ligand Zn^{2+}LC-DPA solubilisé dans un mélange eau/DMSO (70:30) à 250 µM.
4) la piste où est greffé le ligand Cu^{2+}LC-DPA solubilisé dans un mélange eau/DMSO (70:30) à 250 µM.

5.3.2. résultats d'immobilisation sur SAM

La **Figure 85** montre le sensorgramme enregistré lors d'une immobilisation sur lequel on distingue (1) l'étape d'activation par NHS-EDC, (2) l'injection du complexe Zn^{2+}-LC-DPA solubilisé dans le mélange eau/DMSO (70:30) et (3) la désactivation de la surface avec de l'éthanolamine à 0.3 M et pH 11.7. Cette étape est complétée par l'injection de SDS 0.05 % et d'OG 40 % qui sert ensuite de solution de régénération de la surface.

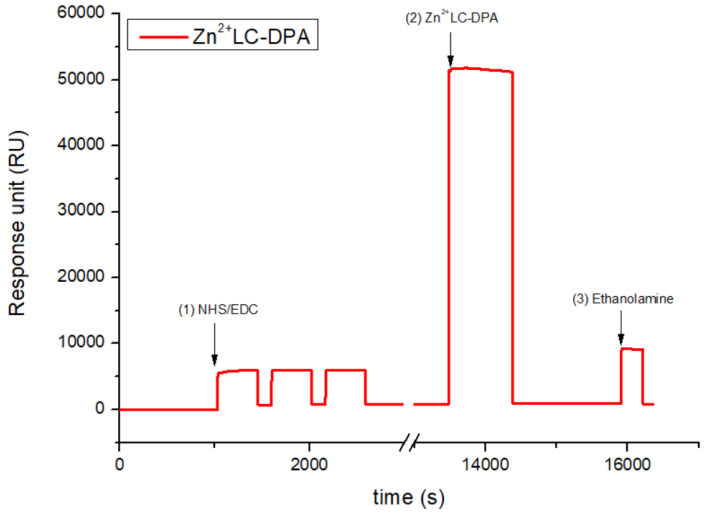


Figure 85 : immobilisation sur SAMs, on observe (1) l'activation par NHS/EDC (2) injection de Zn^{2+}LC-DPA à 250 µM dans un mélange H_2O/DMSO (70 :30), (3) l'inactivation des esters non couplés par l'éthanolamine à 0.3 M et pH 11.7. (n=4)

Après immobilisation, et injection des solutions de SDS 0.05 % et d'OG 40 mM, les valeurs obtenues sont respectivement de 849.9 RU sur la piste de référence, 2500 RU pour la piste avec l'AV, 1248 RU pour la piste avec Zn^{2+}LC-DPA et de 920 RU pour la piste avec Cu^{2+}LC-DPA (n=4). Les quantités immobilisées n'ont pu être calculées dû à la méconnaissance des incréments d'indices de réfraction.

5.3.3. tests d'interaction dans WB

Il est à noter que suite à l'étape d'immobilisation, il a été nécessaire de faire une injection de BSA à 3 % sur la surface afin de pallier aux signaux non-spécifiques observés pour les vésicules SUV PC et SUV PC/PS sur la piste de référence. Il est à noter que pour l'étude sur SUVs, l'utilisation de détergents, classiquement utilisés pour réduire les interactions non-spécifique (exemple : tween20), est à proscrire.[187]

Le sensorgramme présenté sur la **Figure 86** correspond aux signaux obtenus lors des injections des vésicules modèles SUV PC et SUV PC/PS (70:30) à 50 µM sur les différentes pistes.

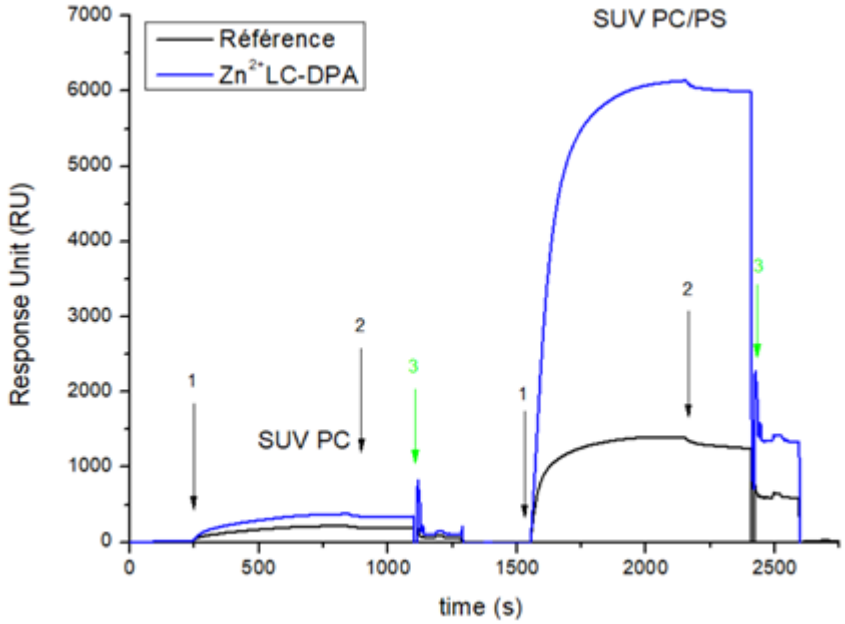


Figure 86 : sensorgrammes enregistrés par SPR dans WB pour l'injection de SUV PC et SUV PC/PS (70:30) à 50 µM sur la piste de référence (noire) et sur une surface fonctionnalisée, Zn^{2+}LC-DPA (bleu) ; (1) phase d'association, (2) phase de dissociation, (3) régénération

Plusieurs informations peuvent être tirées de ces sensorgrammes. Tout d'abord, nous observons une dissociation quasi-nulle après la phase ascendante d'association : l'interaction est irréversible. C'est pour cela qu'il a été nécessaire de régénérer la surface grâce à SDS à 0.05 % et à l'OG à 40 mM, avant d'entamer une nouvelle phase d'association. Ensuite, nous constatons une forte différence de réponse entre SUV PC et SUV PC/PS sur les pistes fonctionnalisées par les complexes de coordination (**Figure 86**).

Cependant, on observe sur la piste de référence (en noir), un signal non-spécifique très important pour SUV PC/PS (~ 1300 RU) correspondant à plus de 20 % du signal total de la piste Zn^{2+}LC-DPA. Afin de diminuer cette interaction non-spécifique, de la BSA à 0.03 % est ajoutée au tampon de course (WB). Le tampon WB additionné de BSA à 0.03 % (WB-BSA) sera également utilisé comme tampon d'injection, c'est-à-dire comme tampon pour diluer les différents analytes. Des résultats similaires sont observés pour la piste fonctionnalisée avec le complexe Cu^{2+}LC-DPA et sont présentés en **annexe 2**.

Par ailleurs, les résultats d'interactions avec l'AV donnent des réponses à la fois pour les SUV PC et SUV PS, compte tenu que le tampon de course utilisé de contient pas de Ca^{2+} (**annexe 2**).[145,146]

5.3.4. Interaction dans WB-BSA

La **Figure 87** montre les sensorgrammes enregistrés lorsque les interactions sont étudiées en utilisant WB-BSA comme tampon de course et d'injection.

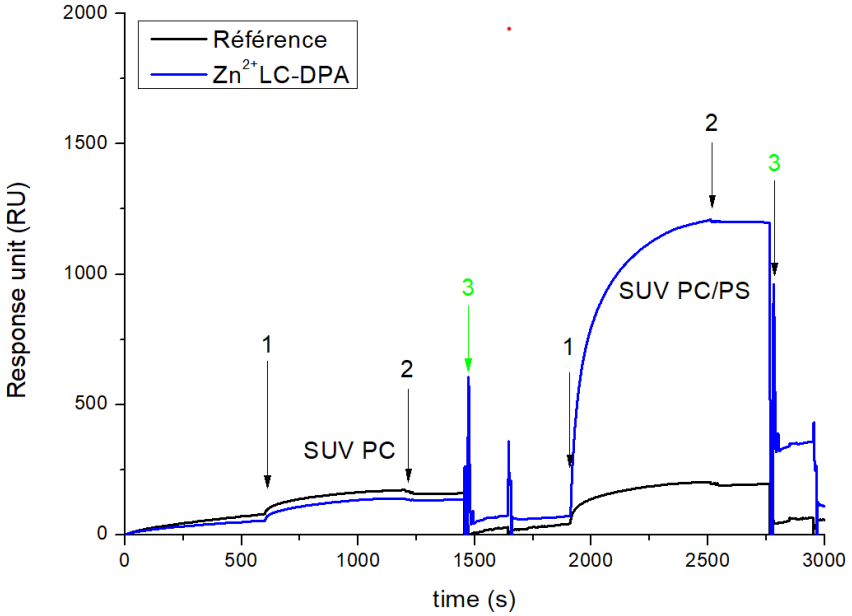


Figure 87 : sensorgrammes enregistrés par SPR dans WB-BSA. Réponse observée avec la piste de référence pour SUVs PC et SUV PC/PS injectées à 50 µM la piste de référence (noire) et sur une surface fonctionnalisée, Zn^{2+}LC-DPA (bleu) ; (1) phase d'association, (2) phase de dissociation, (3) régénération

Nous observons une baisse de l'intensité de réponse du signal pour SUV PC/PS sur l'ensemble des pistes (**Tableau 12**); de plus, les signaux non spécifiques enregistrés sur la piste de référence ont été réduits à 5-10 % des réponses enregistrées sur les complexes confirmant l'utilité de la BSA dans le tampon de course. Les signaux pour la reconnaissance avec SUV PC ont également fortement diminué (jusqu'à être quasiment nuls), les signaux présentés avec SUV PC/PS peuvent être supposés spécifiques pour la reconnaissance entre PS présentes sur les vésicules et nos complexes immobilisés sur les surfaces. La BSA en solution permet très certainement de maintenir la BSA adsorbée sur la SAM, en amont des tests d'interactions.

Tableau 12 : valeurs des réponses enregistrées en fin d'association, exprimées en RU sans (WB, noir) et avec BSA 0.03 % dans le tampon de course (WB-BSA, rouge) pour des SUVs à 50 µM

	Référence	AV	Zn^{2+}LC-DPA	Cu^{2+}LC-DPA
SUV PC 50 µM	194.9 – 81.1	920 - 433	340 – 78	309 - 100
SUV PC/PS 50 µM	1315 – 149.2	3062 - 922	6116 - 1100	6528 - 2100

Par ailleurs, pour l'annexine V, une différence de réponse plus faible est observée entre SUV PC et SUV PC/PS. Ce résultat était attendu compte tenu que l'interaction est effectuée en absence de calcium.[145,146]

Suite à ces observations, une étude est réalisée pour SUV PC/PS avec une gamme de concentrations allant de 1 à 50 µM. Au cours de cette étude, des réplicas ont été introduits afin de vérifier l'efficacité de régénération des pistes entre chaque cycle (**Figure 88**).

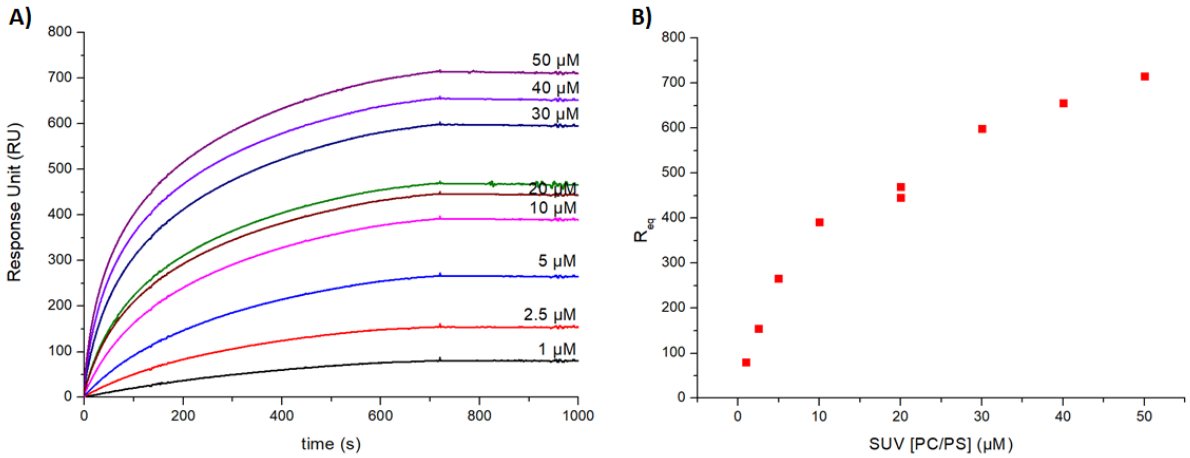


Figure 88 : (A) sensorgrammes observés après procédure de double soustraction sur la piste fonctionnalisée par Cu^{2+}LC-DPA avec une gamme de concentration de SUV PC/PS allant de 1 à 50 µM et (B) tracé de la réponse en fin d'association en fonction de la concentration de SUV PS/PC

Contrairement aux phospholipides à chaînes courtes, les interactions entre PS à la surface des SUVs et les complexes greffés ne sont pas monovalentes. En effet, une vésicule interagit avec la surface à travers plusieurs interactions entre la PS et les complexes (interaction multivalente). Toutefois, nous considérerons l'interaction globale en l'assimilant à une interaction 1:1, ce qui nous permettra de déterminer une constante thermodynamique

d'équilibre apparente (K_{Dapp}). Cette approche a été précédemment utilisé dans la littérature dans le cadre d'interactions multivalentes complexes.[215,216]

Comme pour les phospholipides à chaînes courtes, nous assimilons la réponse à la fin de la phase d'association comme réponse à l'équilibre (R_{eq}) bien que ce dernier ne soit pas totalement atteint. Les valeurs d'affinités sont extraites en traçant la courbe des R_{eq} obtenus en fonction de la concentration en SUV PC/PS. Les valeurs de K_{Dapp} obtenues par cette approche ($K_{Dapp,aff}$) sont présentées dans le **Tableau 13**.

Tableau 13 : valeur de K_{Dapp} déterminées par le tracé de l'isotherme et par la méthode du k_{obs}, pour l'interaction des SUVs avec les complexes Zn^{2+}LC-DPA et Cu^{2+}LC-DPA

	Zn^{2+}LC-DPA	**Cu^{2+}LC-DPA**
$K_{Dapp,aff}$ (µM)	20	23
$K_{Dapp,obs}$ (µM)	94	66
k_{on}	49	54
k_{off}	0.0047	0.0036

Les paramètres cinétiques ont également été extraits en analysant uniquement la phase d'association (par le biais du k_{obs}). Les constantes cinétiques ainsi que le K_{Dapp} obtenues par cette méthode ($K_{Dapp,obs}$) sont listées dans le **Tableau 13**. Toutefois, tout comme pour les phospholipides à chaînes courtes, les valeurs obtenues par cette méthode pour les constantes de k_{on} et k_{off} ne correspondent pas au profil des sensorgrammes expérimentaux.

Les valeurs de $K_{Dapp,aff}$ présentées ci-dessus sont très proches pour les deux complexes métalliques. La reconnaissance des SUVs PC/PS n'est pas modifiée par la différence du métal coordonné par le ligand LC-DPA.

Par comparaison, avec les phospholipides à chaînes courtes les K_{Dapp} pour les vésicules modèles sont 15 fois inférieures pour le complexe de Cu et 200 fois inférieure pour le complexe de Zn. Cette différence est certainement induite par l'effet de multivalence à la fois générée par la surface des complexes et par les vésicules.[206]

[215] Laigre E, Goyard D, Tiertant C, et al. The study of multivalent carbohydrate-protein interactions by bio-layer interferometry. *Org. Biomol. Chem*. **2018**;16:8899-8903. doi: 10.1039/C8OB01664J
[216] Xiang Y, Kiseleva R, Reukov V, et al. Relationship between targeting efficacy of liposomes and the dosage of targeting antibody using surface plasmon resonance. *Langmuir*. **2015**;31(44):12177-12186

5.3.5. Cinétique dans WB-BSA + 10 mM Ca^{2+}

Afin d'améliorer la reconnaissance entre l'AV et la PS, du calcium a été ajouté au tampon de course ainsi qu'au tampon d'injection. Le tampon utilisé, WB-BSA-Ca, est constitué de WB-BSA auquel a été ajouté 10 mM $CaCl_2$. Cette concentration est supérieure à la concentration nécessaire pour établir une interaction spécifique entre l'AV et la PS inclus dans des vésicules (**annexe 3**). En effet, une concentration à 1 mM semble être suffisante pour cette reconnaissance. Compte-tenu que l'isolement des MVs se fait à partir de plasma citraté, l'ajout de calcium à une concentration supérieure a été retenue. Les valeurs des réponses pour une injection de SUV PC/PS dans WB-BSA et WB-BSA-Ca sont présentées dans le **Tableau 14**.

Tableau 14 : valeurs du signal observé lors de l'injection de SUVs à 50 µM après procédure de double soustraction. Valeurs en RU dans WB-BSA (noir) et dans WB-BSA-Ca (rouge)

	AV	**Zn^{2+}LC-DPA**	**Cu^{2+}LC-DPA**
SUV PC 50 µM	410 - 742	358 - 28.3	702 - 48.6
SUV PC/PS 50 µM	773 - 2354	970 - 163	1960 - 370

La présence de calcium a permis l'augmentation du signal de reconnaissance de l'AV pour les SUV PC/PS, et d'augmenter sa sélectivité par rapport à SUV PC. Toutefois, une diminution de réponse est observée pour les complexes de Zn^{2+}LC-DPA et Cu^{2+}LC-DPA.

Des études avec une gamme de concentration en SUV PC/PS sont ensuite réalisées comme précédemment pour en extraire les paramètres cinétiques et thermodynamiques. Les sensorgrammes obtenus dans le tampon WB-BSA-Ca pour l'AV et le Cu^{2+}LC-DPA sont présentés sur la **Figure 89**.

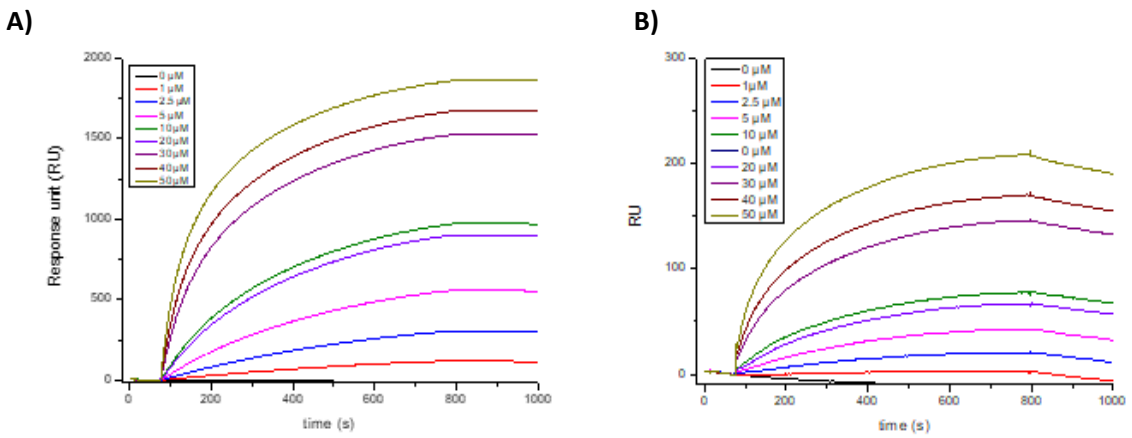


Figure 89 : sensorgrammes après double soustraction enregistrés pour une gamme de concentration de SUV PC/PS allant de 1 à 50 µM injectée sur la piste fonctionnalisée par (A) l'AV et (B) par Zn^{2+}LC-DPA dans WB-BSA-Ca

Ces sensorgrammes ont permis d'extraire un K_D par affinité, en traçant la courbe des réponses à la fin de l'association (assimilées à R_{eq}) en fonction de la concentration en phospholipides totale. L'étude de la phase d'association a également été réalisée et l'ensemble des résultats est présenté dans le Tableau 15.

Tableau 15 : comparaison des valeurs de K_{Dapp} obtenues par analyse de l'isotherme dans WB-BSA et WB-BSA-Ca

	AV	**Zn^{2+}LC-DPA**	**Cu^{2+}LC-DPA**
$K_{Dapp,aff}$ (µM) WB-BSA	108±24	20±5	23±8
$K_{Dapp,aff}$ (µM) WB-BSA-Ca	15±3	47±13	25±6

Les valeurs de K_{Dapp} déterminés par les deux approches sont dans les mêmes ordres de grandeur. On remarque que l'utilisation du calcium diminue les signaux d'interaction mais pas l'affinité observée entre les complexes et les SUVs.

Les valeurs d'affinité déterminées par SPR par injection d'Annexine V sur des SUVs contenant PS, immobilisées sur des puces de type L1 sont de l'ordre du nM.[217,218] Toutefois, ces valeurs sont calculées par rapport à la concentration en Annexine V libre injectée et non

[217] Rand ML, Wang H, Pluthero FG, et al. Diannexin, an annexin A5 homodimer, binds phosphatidylserine with high affinity and is a potent inhibitor of platelet-mediated events during thrombus formation. *J. Thromb. Haemost.* **2012**;10(6):1109-1119. doi: 10.1111/j.1538-7836.2012.04716.x

[218] Kim S, Bae SM, Seo J, et al. Advantages of the phosphatidylserine-recognizing peptide PSP1 for molecular Imaging of Tumor Apoptosis Compared with Annexin V. *PLOS ONE*. 2015;10(3):e0121171. doi: 10.1371/journal.pone.0121171

par rapport à une concentration en phospholipides présents sous forme de vésicules. De plus, l'interaction en AV et PS varie en fonction de la quantité de calcium utilisée, rendant plus compliquée la comparaison.[219]

5.4. Etudes sur microvésicules isolées à partir de plasma

Après avoir vu que notre système est en mesure de détecter PS dans des vésicules modèles, nous avons contrôlé la reconnaissance avec des microvésicules isolées à partir de plasma humain comme décrit au chapitre précédent (cf. Chap2-3.5.3. Microvésicules + **PARTIE EXPERIMENTALE**).

Contrairement aux vésicules modèles dont nous pouvons contrôler la taille et la composition, les microvésicules ont des tailles et des compositions disparates. Nous avons étudié des microvésicules issues de plasma humain isolées par centrifugation séquentielle (cf. **PARTIE EXPERIMENTALE**). Leur concentration sera exprimée en équivalent PS, concentration déterminée par un test fonctionnel à la prothrombinase (cf. **PARTIE EXPERIMENTALE**).[123] Pour une analyse plus complète, il aurait été intéressant de pouvoir caractériser plus précisément l'échantillon de MVs en terme de distribution en taille et de concentration par des techniques telles que la NTA ou TRPS (cf. **CHAPITRE 1 : ETAT DE L'ART**).[1]

Compte tenu que nos complexes ne nécessitent pas la présence de calcium pour interagir avec PS, nous avons dans un premier temps réalisé les études en absence de calcium, dans le tampon WB-BSA puis en présence de calcium. Les sensorgrammes obtenus sont présentés sur la **Figure 90**.

[219] Tait JF, Gibson D. Phospholipid binding of annexin V : effects of calcium and membrane phosphatidylserine content. *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**;298(1):187-191. doi: 10.1016/0003-9861(92)90111-9

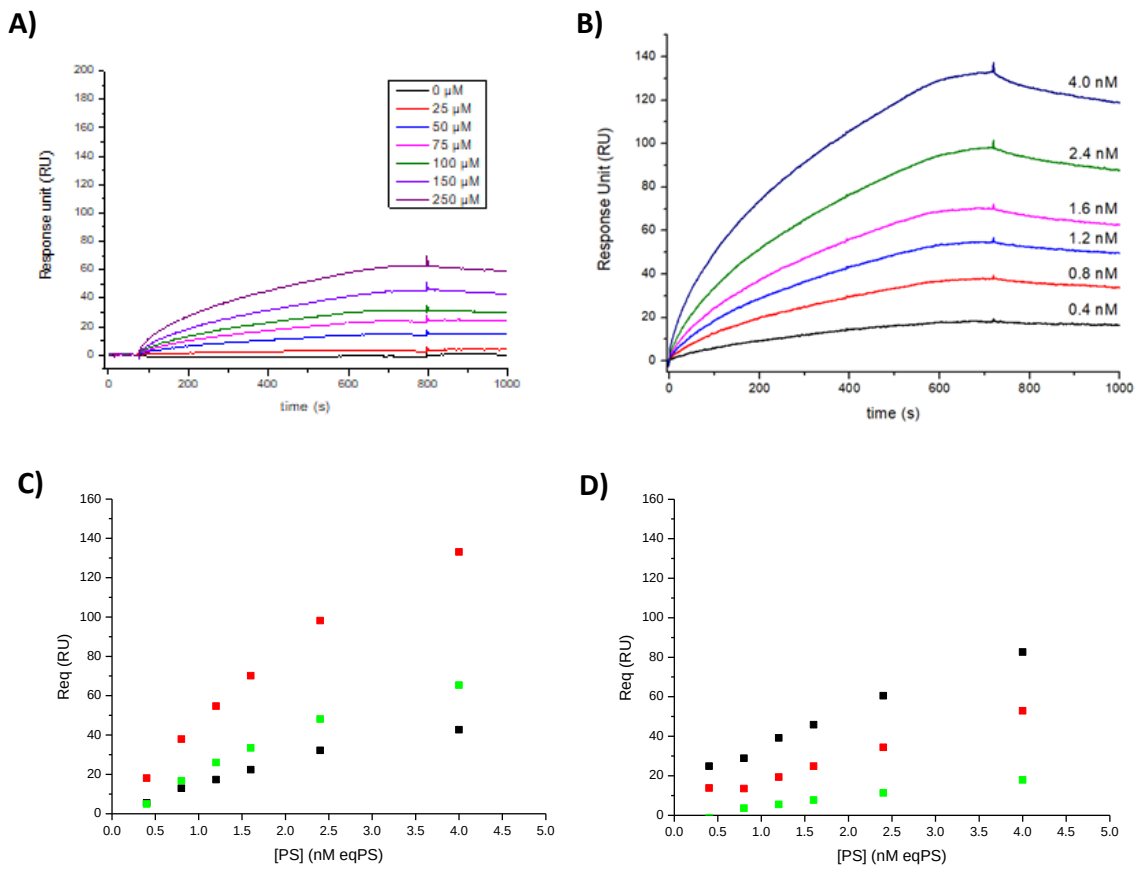


Figure 90 : sensorgrammes après double soustraction enregistrés pour une gamme de concentration de MVs allant de 0.4 à 4.0 nM eq PS injectée sur la piste fonctionnalisée par (A) Zn^{2+}LC-DPA et (B) Cu^{2+}LC-DPA dans WB-BSA; En bas : réponses obtenues après procédure de double soustraction lors de l'injection d'une gamme de concentration de MVs allant de 0.4 à 4.0 nM eq PS sur les pistes fonctionnalisées par (vert) Zn^{2+}LC-DPA, (rouge) Cu^{2+}LC-DPA (noir) Annexine 5 en (C) absence de calcium (WB-BSA) ou en (D) en présence de calcium (WB-BSA-Ca)

L'injection de microvésicules ne génère pas de signaux non-spécifiques sur la piste de référence. Les signaux enregistrés après double soustraction varient en fonction de la concentration de microvésicules. Nous pouvons dire que ces microvésicules issues de plasma humain peuvent être capturées par nos complexes Zn^{2+}LC-DPA et Cu^{2+}LC-DPA.

Lors de l'ajout de calcium dans WB-BSA, on observe une perte de signal importante pour les pistes fonctionnalisées avec nos complexes. Tout comme pour les vésicules modèles, l'utilisation de calcium est défavorable à la capture des MVs par nos complexes métalliques M^{2+}LC-DPA. Cependant, nous pouvons voir des signaux similaires pour la reconnaissance du complexe Cu^{2+}LC-DPA sans calcium vis-à-vis de l'annexine V avec calcium.

6. Caractérisation de l'interaction entre M^{2+}LC-DPA/PS par BLI

Le BLI, technique plus récente, est de plus en plus utilisée pour la caractérisation des interactions. Toutefois, seuls quelques articles s'intéressent à l'étude d'interactions mettant en jeu des SUVs.[220,221] Aucune étude n'a encore été publiée concernant la reconnaissance de VEs.

Dans ce contexte, nous avons décidé de transposer les études SPR sur le BLI. Contrairement à l'appareil T200 utilisé en SPR où les immobilisations sont faites de façon consécutives, l'appareil OctetRed 96 utilisé en BLI permet d'immobiliser simultanément jusqu'à 8 capteurs. Cela permet un gain de temps (**Tableau 10**) et un criblage plus important de ligands.

6.1. Capteurs AR_2G

Pour ce qui est du BLI, nous avons utilisé des capteurs AR_2G et procédé à une immobilisation par couplage amine de nos complexes. Toute comme en SPR, un capteur nu subissant une étape d'activation par NHS/EDC, puis de désactivation par l'éthanolamine sert de référence pour chaque analyse. Des études préliminaires ont été réalisées pour trouver les conditions optimales d'immobilisation : différentes concentrations du mélange NHS/EDC, pourcentage de diméthylsulfoxyde pour solubiliser les complexes, et pH de l'éthanolamine ont été testés.

[220] Wallner J, Lhota G, Jeschek D, Mader A, Vorauer-Uhl K. Application of Bio-Layer Interferometry for the analysis of protein/liposome interactions. *J. Pharm. Biomed. Anal*. **2013**;72:150-154. doi:10.1016/j.jpba.2012.10.008

[221] Zhang H, Li W, Luo H, Xiong G, Yu Y. Quantitative determination of testosterone levels with biolayer interferometry. *Chem. -Biol Interact*. **2017**;276:141-148. doi:10.1016/j.cbi.2017.05.013

6.1.1. résultats d'immobilisation

L'utilisation des capteurs AR2G avec à leur surface des fonctions acides carboxyliques (-COOH) ont permis le greffage des différents complexes de coordination via leur chaîne de greffage avec une amine terminale ($-NH_2$). La **Figure 91** montre les courbes d'immobilisation par BLI pour les complexes Cu^{2+}LC-DPA et Zn^{2+}LC-DPA.

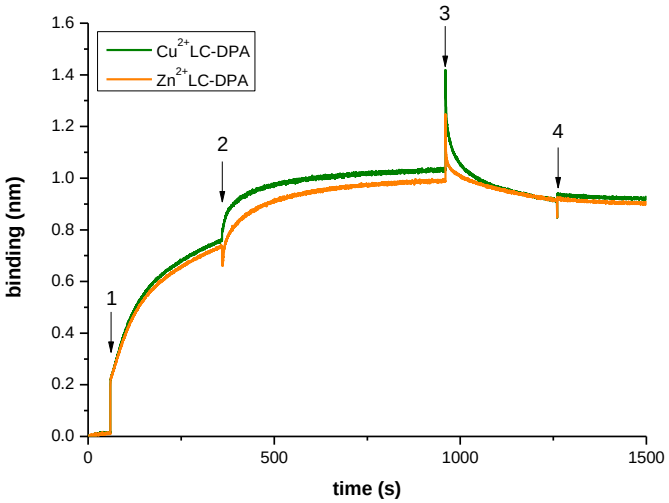


Figure 91 : Immobilisation du Cu^{2+}LC-DPA (vert) à 250 µM et du Zn^{2+}LC-DPA (orange) à 250 µM dans un mélange eau/DMSO (70:30). On observe (1) l'activation par NHS/EDC (200 mM / 50 mM) (2) l'immobilisation Cu^{2+}LC-DPA et de Zn^{2+}LC-DPA, (3) l'inactivation des esters non couplés par l'éthanolamine à 1 M et pH 11.7 et (4) la stabilisation dans le tampon WB

On observe des valeurs de $\Delta\lambda$ très proches après immobilisation avec respectivement 1 nm et 0.95 nm pour Cu^{2+}LC-DPA et Zn^{2+}LC-DPA.

6.1.2. tests d'interaction dans WB et dans WB-BSA

Suite à l'immobilisation des complexes, l'injection de SUVs conduit à des signaux non-spécifiques sur les capteurs de référence. Tout comme en SPR, une étape d'adsorption de BSA 3 % suivie d'injections de SDS 0.05 % et d'OG 40 mM ont été ajoutées. Des tests d'interactions avec des vésicules modèles SUV PC et SUV PC/PS ont été réalisés dans WB (**Figure 92A**).

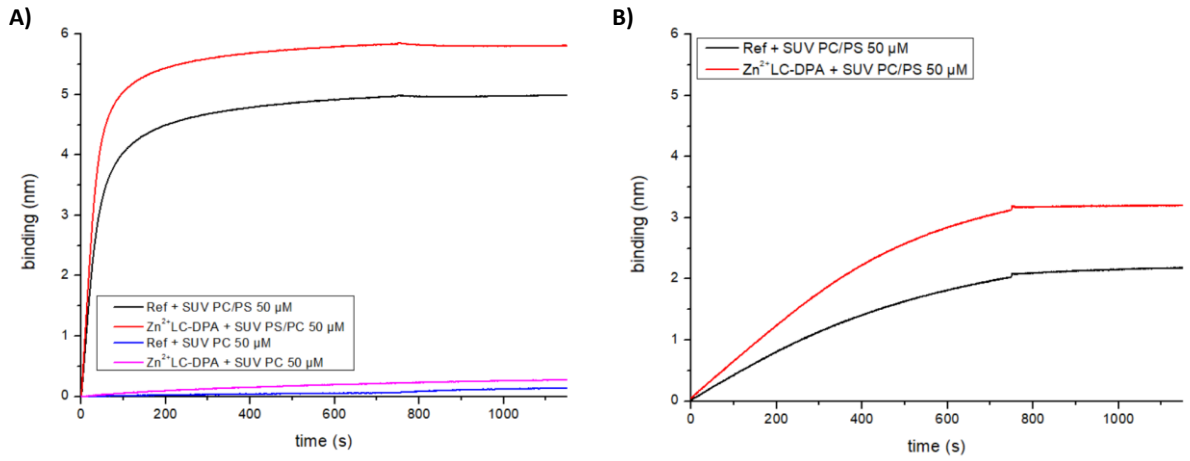


Figure 92 : réponse observée avec SUV PC/PS et SUV PC à 50 µM avec la piste de référence et Zn^{2+}LC-DPA sur capteurs AR_2G dans (A) WB et (B) WB-BSA

Ceci met en évidence :

- Un signal quasiment nul pour SUV PC que ce soit sur des capteurs nus ou fonctionnalisés par les complexes.
- Un signal de 6 nm pour les vésicules SUV PC/PS sur les complexes.
- Une dissociation nulle, nécessitant une étape de régénération.
- Un signal non-spécifique de 5.5 nm sur la surface de référence.

Afin de diminuer ce signal non-spécifique pour SUV PC/PS, nous avons ajouté 0.03 % de la BSA dans WB (**Figure 92B**). Nous observons une diminution du signal suite à l'ajout de BSA dans le tampon de course; cependant, le signal non-spécifique est encore important puisqu'il représente plus de 60 % du signal total d'interaction entre Zn^{2+}LC-BPA et SUV PC/PS. Des tests avec des ajouts plus importants de BSA dans WB n'ont pas permis de s'affranchir de ce problème. De même, la présence de signaux non spécifiques importants a également été observée pour les MVs. Nous avons donc envisagé de travailler sur des capteurs SA présentant une sous-couche différente et étant fonctionnalisé par de la streptavidine.

6.2. Capteurs SA

6.2.1. test de reconnaissance de SUVs sur capteurs nu et fonctionnalisé avec l'AV

Des capteurs SA (streptavidine) permettent le couplage avec des molécules biotinylées. Dans un premier temps, nous avons donc testé la réponse observée en utilisant des capteurs streptavidine (SA) avec SUV PC/PS et SUV PC (**Figure 93**).

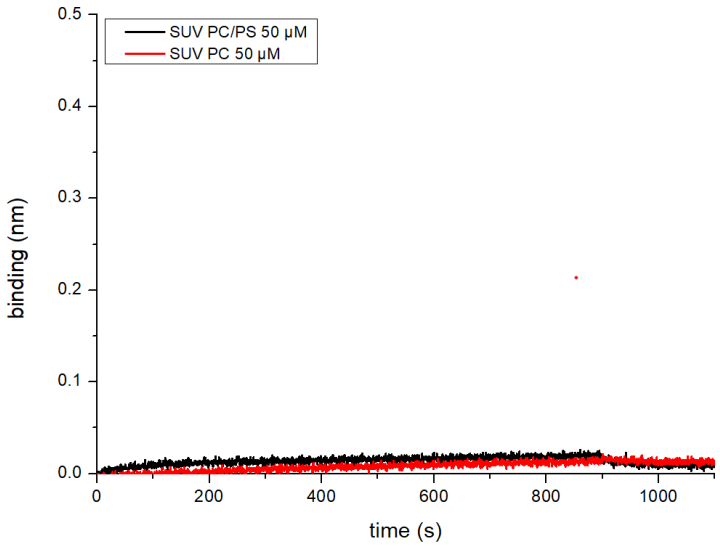


Figure 93 : réponse observée avec 1) SUV PC/PS et 2) SUV PC à 50 µM sur capteurs SA

Les capteurs SA ont conduit à une réponse nulle, signifiant une absence de signaux non-spécifiques avec les vésicules modèles contenant ou non PS.

Dans un second temps, nous avons effectué un contrôle en greffant de l'Annexine V biotinylée sur capteurs SA afin de vérifier les réponses vis-à-vis des vésicules SUV PC/PS et SUV PC dans WB additionné de 10 mM de calcium.

Après l'immobilisation de l'AV donnant un signal de 1.6 nm, nous avons testé les réponses sur trois concentrations croissantes de SUV PC (**Figure 94A**) d'une part et de SUV PC/PS (**Figure 94B**) d'autre part avec de l'AV biotinylée.

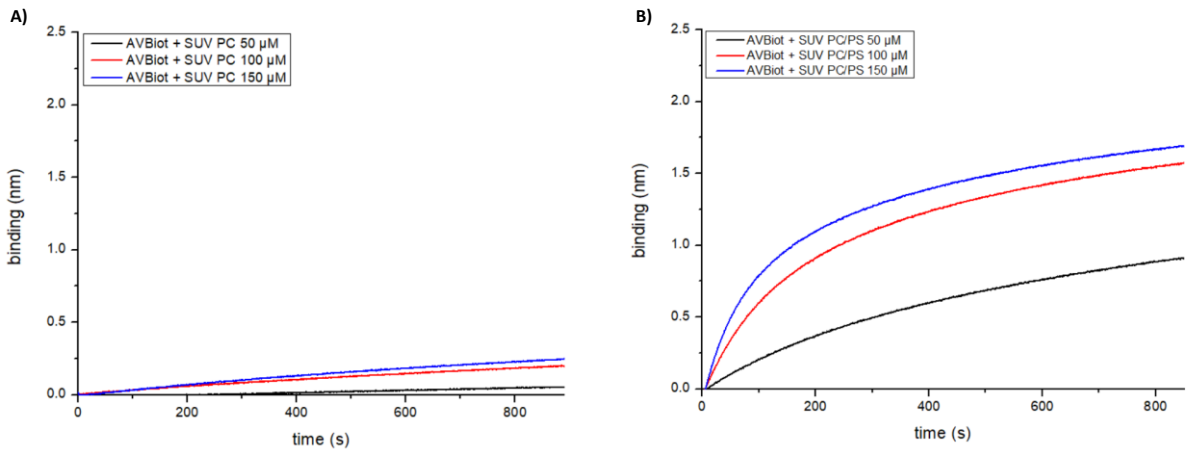


Figure 94 : réponse observée entre AV biotinylée immobilisée sur capteurs SA et des concentrations croissantes de (A) SUV PC et (B) SUV PC/PS

On remarque la différence de reconnaissance de l'AV vis-à-vis de SUV PC/PS par rapport à SUV PC.

Suite à ces tests, nous avons procédé à la biotinylation de notre complexe Zn^{2+}CC-DPA afin de le greffer sur capteurs SA et pouvoir tester/caractériser son interaction avec PS : les parties suivantes seront consacrer à la description de la synthèse et des études d'interaction en BLI.

6.2.2. Synthèse et complexation du ligand biotinylé CC-DPA

Nous nous sommes donc tournés vers une nouvelle stratégie consistant à biotinyler notre ligand CC-DPA en suivant des procédures connues afin de tester un nouveau mode de greffage. Le ligand CC-DPA est solubilisé dans 3 mL de DMF et quelques gouttes de N, N-diisopropyléthylamine (DIPEA) sont ajoutées afin d'ajuster le pH à 9. La biotine-NHS disponible commercialement solubilisée dans 2 mL de DMF est ajoutée au milieu réactionnel. Par la suite, on a transvasé le milieu réactionnel dans un falcon afin de le centrifuger et éliminer le DMF. Le produit brut est repris avec du CH_2Cl_2 et un lavage est effectué avec une solution de $NaHCO_3$.Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice avec un mélange CH_2Cl_2/MeOH comme éluant puis évaporé pour obtenir une poudre jaune-orangée (Rdt = 80 %). Le ligand CCBiot-DPA a ensuite été caractérisé par RMN ^{1}H, RMN ^{13}C et ESI-MS (m/z = 772 ($M-H^+$) avec z = 1).

Le complexe Zn^{2+}CCBiot-DPA est préparé dans l'acétonitrile en suivant la même procédure que dans la partie Chap 2-2.2. Préparation des complexes dinucléaires de Cu(II) ou Zn(II) à la différence du sel de zinc qui ici est le Zn $(CF_3SO_3)_2$ (**Figure 95**). Là encore, le complexe Zn^{2+}CCBiot-DPA (Rdt = 15 %) est caractérisé par RMN ^{1}H, RMN ^{13}C et ESI-MS.

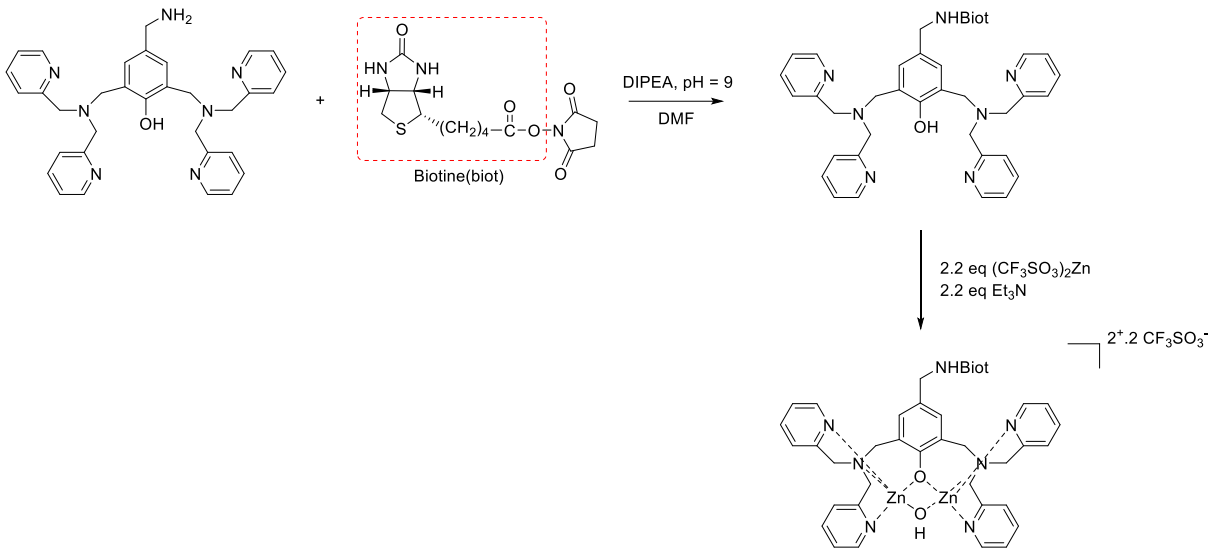


Figure 95 : Synthèse du ligand CCBiot-DPA suivi de la complexation avec 2 eq de Zn $(CF_3SO_3)_2$

6.2.3. Tests d'interactions des SUVs avec complexe Zn^{2+}CCBiot-DPA sur capteurs SA

Le complexe Zn^{2+}CCBiot-DPA est couplé sur capteurs SA avec un signal d'immobilisation de 1.5 nm. Les vésicules SUV PC/PS et SUV PC sont ensuite mise en contact avec ces capteurs. Les résultats sont présentés sur la **Figure 96** ci-dessous.

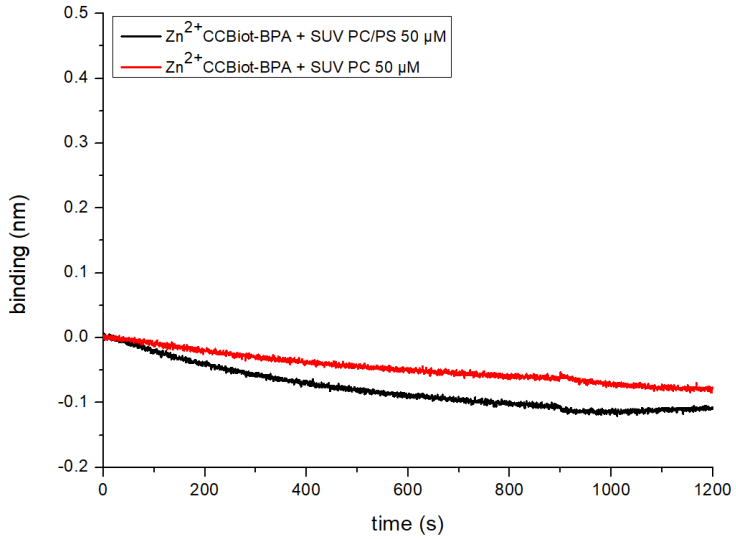


Figure 96 : réponse observée après greffage de Zn^{2+}CCBiot-DPA avec 1) SUV PC/PS et 2) SUV PC à 50 µM sur capteurs SA

Contre toute attente, nous observons une absence de réponse d'interaction entre notre complexe et nos vésicules modèles. Sur capteurs SA, il ne semble pas y avoir d'interaction entre ces deux entités.

La streptavidine est une grosse protéine de 52,8 kDa avec différents domaines possédant des poches et étant le lieu de couplage avec des molécules biotinylées. Une explication qui pourrait être avancée serait que notre complexe Zn^{2+}CCBiot-DPA à l'issue du couplage est complètement masqué par la streptavidine empêchant une reconnaissance avec SUV PC/PS : la chaîne de couplage biotinylée pour le greffage n'est peut-être pas assez longue.

7. Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons décrit en préambule les techniques utilisées (BLI & SPR) afin de réaliser des études d'interactions sur surface solide entre nos complexes et la phosphatidylsérine.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'interaction à l'échelle moléculaire par l'utilisation de phopholipides à chaînes courtes. Cette étude réalisée par SPR a permis de mettre en évidence une interaction entre nos complexes dont le ligand est basé sur le motif DPA et les monomères de DHPS : cette interaction est sélective au regard des autres

phospholipides testés DHPC et DHPE. Une plus forte affinité pour DHPS a été observée pour le complexe de Zn en comparaison avec le complexe de Cu.

Dans un second temps, l'étude a été réalisée avec des vésicules modèles SUV PC et SUV PC/PS (70:30) obtenues par extrusion sur des membranes de 100 nm. Pour cette étude, les complexes ont été greffés par couplage amine sur des couches auto-assemblées PEG-alcane-thiols sur surface d'or d'alcanethiol pegylés. Des signaux non spécifiques importants ont été observés et ont nécessité une étape additionnelle de blocage par la BSA couplée à sa présence dans les tampons d'études. La sélectivité de l'interaction des complexes avec SUV PC/PS a été observée vis-à-vis des SUV PC. Toutefois, nous n'observons pas d'impact de la nature du métal coordonné sur les interactions lors de cette étude. En effet, les interactions entre les vésicules modèles et les complexes mettent probablement en jeu des liaisons de coordination entre les centres métalliques (acide de Lewis) et les espèces chargées négativement (donneurs d'électrons) ce qui peut expliquer la meilleure affinité observée pour les vésicules PC/PS *vs* PC.

Enfin, les études SPR réalisées avec des microvésicules issues de plasma humain ont démontré la capacité des complexes à interagir avec PS présente à leur surface, et ce en dépit de la complexité de la composition des MVs.

Des études similaires entreprises par BLI ont montré pour cette technique les difficultés pour s'affranchir des interactions non spécifiques sur les capteurs commerciaux présentant des fonctions carboxylates (capteurs AR_2G). Après validation de l'absence d'interaction non spécifique sur des capteurs présentant de la streptavidine (capteurs SA), la chaîne de greffage du complexe de zinc a été modifiée. L'étude sur capteur SA avec le complexe biotinylé n'a toutefois pas été concluante, très certainement en raison d'une chaîne de greffage trop courte qui possiblement rend le site de reconnaissance de la phosphatidylsérine caché par la streptavidine donc non accessible.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans ce travail de thèse, l'étude bibliographique a clairement mis en évidence le potentiel de la détection et de la caractérisation phénotypique et fonctionnelle des microvésicules extracellulaires (MVs). Ces petites vésicules sont libérées dans les fluides biologiques et en particulier dans le sang par la membrane plasmique suite à différents simuli. Elles exposent la phosphatidylsérine (PS) sur le feuillet externe de leurs membranes contrairement aux membranes des cellules saines où PS est localisée sur le feuillet interne. Les MVs sont des biomarqueurs de différentes pathologies, en particulier cardiovasculaires. Pour contourner les défauts et faiblesses des méthodes existantes (cytométrie en flux, dosage prothrombinase après capture sur annexine V, etc) nous nous sommes proposé dans ce travail de développer un nouvel outil où les MVs sont captées sur un support solide grâce à des complexes de coordination, préalablement greffés, capables de reconnaître sélectivement la phosphatidylsérine présente à la surface des MVs.

L'architecture des ligands utilisés pour la préparation des complexes de coordination est de type H-BPP (2,6-Bis[bis(2-pyridylméthyl)aminomethyl]-phénol) qui renferme deux sites de coordination et un espaceur phénoxo permettant de stabiliser des complexes bimétalliques de zinc(II) ou de cuivre (II). Suivant les conditions opératoires (présence de base) un second pont entre les deux ions métalliques peut être contrôlé. A pH 7.4, les complexes de cuivre sont présents sous cette forme bi-pontée (μ-OH) alors que ceux de zinc sont en équilibres entre une forme bi-pontée et une mono-pontée (bis-H_2O). L'introduction sur l'espaceur phénoxo de bras (de longueur variable) porteurs de fonctions amine a permis le greffage sur des supports solides. En parallèle, l'introduction de groupement quinoline dans la sphère de coordination a permis de tester la possibilité d'une détection par fluorescence de l' interaction des complexes avec différents phospholipides.

Ces séries de complexes ont ensuite été utilisées pour des études d'interactions avec les phospholipides agencés dans des structures de complexités croissantes : 1) des monomères de phospholipides à chaînes courtes, 2) des vésicules modèles dont nous pouvons contrôler la taille (autour de 100 nm) et la composition (phosphatidylcholine (PC) à 100% ou mélange phosphatidylcholine/phosphatidylsérine) et enfin 3) des microvésicules issues d'échantillons sanguins. Le complexe de zinc (Zn^{2+}LC-DPA) possédant une longue chaine de greffage (6 carbones) a permis de mettre en évidence la reconnaissance préférentielle de ce complexe avec des modèles de la phosphatidylsérine en solution (DMSO ou tampon HEPES à pH =

7.4/DMSO, 70/30) par résonance magnétique nucléaire du phosphore (RMN ^{31}P) vis-à-vis du modèle de la phosphatidylcholine.

L'introduction de deux groupements quinoline à la place de deux motifs pyridine a conduit à la préparation d'un nouveau complexe (Zn^{2+}LC-PyQy). Avec ce dernier aucune interaction avec la tête polaire de PS ou les vésicules modèles constituées uniquement de PC n'as pu être détectée. Par contre, après excitation à 317 nm, une variation de l'intensité à 488 nm sur le spectre de fluorescence (même si elle est limitée) a montré pour vésicules modèles PC/PS une interaction avec le complexe Zn^{2+}LC-PyQy (avec un K_D = 6.6 µM). Enfin, de manière novatrice, une étude préliminaire a établi une reconnaissance des microvésicules issues d'échantillons biologiques grâce à la fluorescence ce qui peut être considéré comme une preuve de concept et met en évidence que la fluorescence peut être une méthode de détection à considérer dans ce contexte. C'est pourquoi une des perspectives de ce travail serait d'intégrer d'autres groupements fluorescents sur les ligands pour amplifier les signaux.

En phases supportées après immobilisation des complexes (zinc mais aussi cuivre) de la première série via leur fonction amine, des études de reconnaissance ont d'abord été entreprises avec des monomères des phospholipides à chaines grasses courtes par SPR. Une immobilisation 3D des complexes a été réalisée sur des surfaces polymériques de dextran par couplage amine afin de favoriser la détection de ces molécules de faibles poids moléculaires. Pour les complexes de cuivre ou de zinc, aucuns signaux de reconnaissance ne sont enregistrés pour DHPC et DHPE alors que DHPS génèrent de signaux permettant une évaluation de l'affinité. Le complexe de cuivre présente une affinité (centaine de micromolaires) dix fois plus importante pour DHPS que le complexe de zinc.

Des vésicules modèles d'environ 100 nm de diamètre composées soit de DOPC uniquement ou de DOPC/DOPS 70/30 ont ensuite été testées sur les surfaces fonctionnalisées par les complexes. Ces études ont été réalisées sur des monocouches auto assemblées d'alcanethiol afin de limiter l'épaisseur de la couche de détection. Malgré la présence de groupements PEG dans SAM, d'important signaux non spécifiques ont été enregistrés nécessitant l'utilisation de BSA adsorbée mais également dans le tampon d'étude. La distinction entre SUV PC et SUV PC/ PS est clairement visible. Toutefois, la différence d'affinité observée avec les monomères n'est plus visible lors que PS est inséré dans une bicouche, ceci étant très certainement lié à l'effet de multivalence de l'interaction entre la surface et les SUVs.

L'injection de microvésicules issues de plasma sanguins ont permis de démontrer la capture de MVs par les surfaces des complexes métalliques ainsi que leur détection par SPR.

Des études similaires réalisées par BLI ont été compromises par la forte adsorption non spécifique des SUVs PS et MVs sur les capteurs commerciaux présentant des fonctions carboxylates. Après vérification de l'absence de cette adsorption non spécifique sur des capteurs présentant de la streptavidine, la modification de l'amine par une biotine en fonction de greffage des complexes a été réalisée. Malgré cela, aucuns signaux ne sont enregistrés lors de l'injection de SUVs PS sur les surfaces de complexes, suggérant une longueur de chaines de greffage trop courte.

Ces premières études ont démontré la capacité des complexes de coordination à reconnaitre PS qu'elle soit présentée sous forme de monomère ou auto-agencée sous la forme de vésicules modèles ou de MVs. Pour parfaire ces études, plusieurs points restent à explorer :

- La spécificité de l'interaction complexe/PS devrait être confirmée par des tests de compétition par exemple complexe/PS versus annexine V/ PS. Ces tests requièrent une mise au point particulière compte tenu d'une part de la nécessité de la présence d'un solvant organique pour solubiliser les complexes (solvant impactant la stabilité des SUVs et MVs) et d'autre part de la diminution des signaux de reconnaissance complexe/ SUV enregistrés en présence de calcium (nécessaire pour la reconnaissance annexine V/PS).
- L'étude d'autres phospholipides ou autres molécules présentant des groupements phosphate permettrait de mieux identifier les molécules/groupements pouvant interférer avec la reconnaissance complexes/PS.
- L'impact de densité de greffage des complexes sur la reconnaissance des SUVs et des MVs devrait être évaluée. L'accessibilité des complexes sur la surface peut effectivement dépendre de l'encombrement stérique. Ainsi, une densité optimale peut être envisagée, résultant d'un compromis entre multivalence et encombrement stérique.

En résumé, de manière qualitative, nous avons réussi à mettre en œuvre des complexes de métaux de transitions pour la reconnaissance sélective de la phosphatidylsérine appliquée à la détection de microparticules extracellulaires après immobilisation sur un support solide. Cette nouvelle approche innovante demande à être développée afin de conduire à des tests en routine et de faible coût.

PARTIE EXPERIMENTALE

General methods

1. Nuclear magnetic resonance spectroscopy (N.M.R.)

1.1. ^{1}H NMR et ^{13}C NMR

^{1}H and ^{13}C NMR were recorded at 298 K either on a Bruker AM300, AV400 or AV500 apparatus. All shifts for ^{1}H and ^{13}C spectra were referenced to the residual solvent peaks and are reported in ppm. Protons and carbons assignments were established through COSY, HSQC, HMBC and/or DEPT experiments. The following abbreviations were used to describe the multiplicities :

- s : singlet
- d : doublet
- t : triplet
- m : multiplet

J = coupling constants are reported in Hertz (Hz) and δ = chemical shift in ppm.

1.2. ^{31}P NMR

^{1}H decoupled ^{31}P NMR spectra were recorded at 298 K on a Bruker AV500 apparatus at 202.5 MHz. 85% phosphoric acid was used as the external reference.

2. Electron paramagnetic resonance spectroscopy (E.P.R.)

X-band EPR spectra were recorded at 100 K with a EMX Bruker spectrometer with a standard ER4102ST Bruker cavity equipped with a nitrogen-flow cryostat and operating at 9.3 GHz. All spectra presented were recorded under non-saturating conditions.

3. UV-Visible and fluorescence spectroscopy

UV-Vis absorption spectra were recorded using a Varian Cary 50 spectrophotometer with temperature controller. The measurements over the spectral range from 250 to 1000 nm were carried out in quartz cells having an optical path length of 1 cm.

All fluorescence spectroscopy experiments were performed on a Varian Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer. Samples were placed in 1 cm optical path length quartz cells. Zn^{2+}LC-PyQy fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 317 and 488 nm respectively. All measurements were performed at 25°C without degassing of samples.

4. Mass spectroscopy (ESI-MS)

ESI-MS were recorded on the mass spectrometer Esquire 3000 plus Bruker Daltonics with a nanospray inlet. Except special notification, analysis were performed in positif mode.

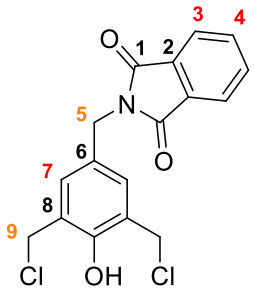
5. Solvent and reagents

All solvents were purchased and used as received except THF that was distilled over sodium/benzophenone under argon. Organic and inorganic reagents used in the procedures described in this thesis were purchased on commercial firms and used without further purification. All evaporations were carried out under reduced pressure with a rotatory evaporator, and all organic extract were washed with water and dried with $MgSO_4$ or Na_2SO_4. Silica gel (SiGel), used for column chromatography refers to Merck silica gel, 40-63 µm. Moreover, during complexation, the used of copper perchlorate must be use with attention.

Synthesis procedures

1. Synthesis of DPA ligand and complexes

(2) : 2-(3,5-bis(chloromethyl)-4-hydroxybenzyl)isoindoline-1,3-dione



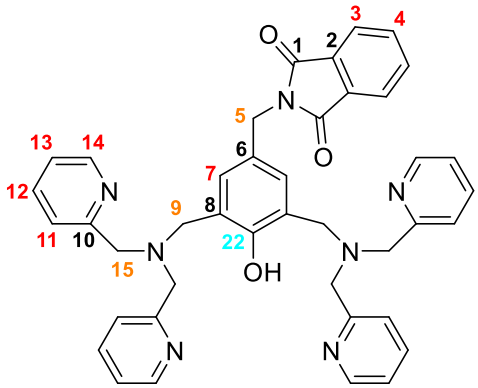
The reaction is done according a modification (HCl (37%) in place of $SOCl_2$) of a published method.[222] The analytical data of the recovered product corresponds to the one published. In a round bottom flask of 50 mL, 2-[4-hydroxy-3,5-bis(hydroxymethyl)benzyl] isoindole-1,3-dione (720 mg, 2.29 mmol, 1 eq.) was dissolved in 8 mL of HCl (37 %). The mixture is heated for 3 hours at 35 °C. After, the reaction mixture was cooled down to room temperature. Water was added to the mixture and the solution was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 25 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated to give a white powder.

Yield: 580 mg (88 %)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz, δ ppm): 4.65 (4H, s, C_9H), 4.75 (2H, s, C_5H), 7.38 (2H, s, C_7H), 7.71 (2H, dd, C_3H, J = 3 Hz, 5.4 Hz), 7.85 (2H, dd, C_4H, J = 3 Hz, 5.4 Hz)

[222] Johansson, A. ; Abrahamsson, M. ; Magnuson, A. ; Huang, P., Martensson, J. ; Synthesis and Photophysics of One Mononuclear Mn(III) and One Dinuclear Mn(II,III) Complex Covalently Linked to a Ruthenium(II) Tris(bipyridyl) Complex, *Inorg. Chem*. **2003**, 42 (23), 7502-7511

(4) : 1-isoindole-1,3-dione-2-[(3,5-bis(2-pyridinylmethyl)amine]methyl]-4-hydroxyphenyl]me -thyl]



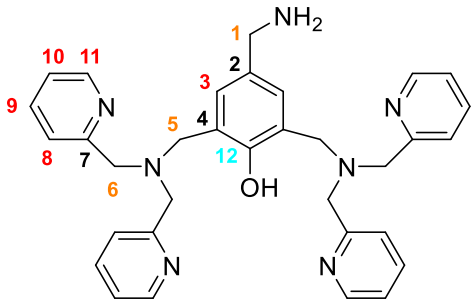
In a round bottom flask of 250 mL, 2-[4-hydroxymethyl)benzyl]isoindole-1,3-dione (530 mg, 1.5 mmol, 1 eq) is dissolved in 45 mL of anhydrous THF under nitrogen atmosphere and put down to 0°C with an ice bath. Dipicolylamine (601 mg, 3.0 mmol, 2 eq) is dissolved in 25 mL of anhydrous THF and added drop by drop to the reaction mixture. After 5 minutes, Et_3N (0.84 mL, 6.04 mmol, 4 eq) is added. The solution was stirred overnight, cooled to room temperature before being washed with THF and filtered. The mother liquor is evaporated and the product is purified by silica column chromatography (eluent: 100 % acetone). Organic layer was dried and evaporated to give a yellow pale powder.

Yield: 580 mg (60 %)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, δ ppm): 3.77 (4H, s, C_9H), 3.86 (8H, s, $C_{15}H$), 4.74 (2H, s, C_5H), 7.10 (4H, t, $C_{13}H$, J = 5 Hz), 7.33 (2H, s, C_7H), 7.49 (4H, d, $C_{11}H$, J = 7.5 Hz), 7.59 (4H, t, $C_{12}H$, J = 7.5 Hz), 7.69 (2H, dd, C_3H, J = 3 Hz, 5.4 Hz), 7.82 (2H, dd, C_4H, J = 3 Hz, 5.4 Hz), 8.49 (4H, d, $C_{14}H$, J = 5 Hz)

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz, δ ppm): 41.3 (C_5), 54.6 (C_9), 59.6 (C_{15}), 121.9 (C_{13}), 123.1 (C_4), 123.2 (C_{11}), 124.2 (**C_8**), 126.4 (**C_2**), 129.6 (C_7), 132.2 (**C_6**), 133.8 (C_3), 136.6 (C_{12}), 148.8 (C_{14}), 155.7 (C_{22}), 159.0 (**C_{10}**), 168.0 (**C_1**)

(5) : phenol-4-(aminomethyl)-2-6bis[[bis(2-pyridinylmethyl)amino]methyl]



In a round bottom flask of 100 mL, 1-isoindole-1,3-dione-2-[(3,5-bis(2-pyridinylmethyl)amine]methyl]-4-4hydroxyphenyl]methyl] (580 mg, 0.85 mmol, 1 eq) is dissolved in 30 mL of absolute ethanol (EtOH). Hydrazine (H_2N-NH_2) (1.83 mL, 37.76 mmol, 44 eq) solubilized in 2 mL of EtOH is added to the reaction mixture before getting refluxed for 3 hours. After, the reaction mixture was cooled to room temperature overnight. The solution was filtered off and evaporated to dryness. Then NaOH 2N (30 mL) was added to the mixture, the solution was adjusted to pH 8-9 with HCl 4N and extracted with CH_2Cl_2 (3 x 30 mL). The organic layer was dried with anhydrous $MgSO_4$, filtered and evaporated to give a yellow powder. The analytical data of the recovered product correspond to the one published.[223]

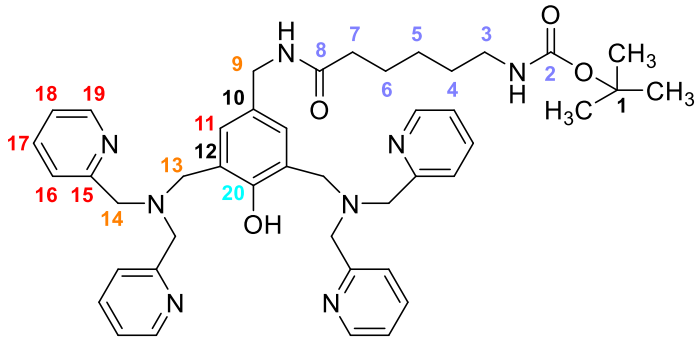
Yield: 450 mg (96 %)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, δ ppm): 3.68 (2H, s, C_1H), 3.72 (4H, s, C_5H), 3.78 (8H, s, C_6H), 7.03 (4H, t, $C_{10}H$, J = 6.2 Hz), 7.05 (2H, s, C_3H), 7.39 (4H, d, C_8H, J = 7.5 Hz), 7.50 (4H, t, C_9H, J = 7.5 Hz), 8.43 (4H, d, $C_{11}H$, J = 6.2 Hz)

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz, δ ppm): 45.9 (C_1), 54.8 (C_5), 59.9 (C_6), 122.0 (C_{10}), 123.0 (C_8), 124.1 (**C_4**), 128.2 (C_3), 132.9 (**C_2**), 136.5 (C_9), 148.9 (C_{14}), 155.0 (C_{12}), 159.2 (**C_7**)

[223] Gentil, S., Molloy, J., Carrière, M., Hobbalah, A., Dutta, A., et al, a nanotube supported dicopper complex enhances Pt-free molecular H_2/air fuel cells, *Joule*. **2019**, 3 (8), 2020-2029

(7) : [6-[[[3,5-bis[[bis(2-pyridinylmethyl)amino]methyl]-4-hydroxyphenyl]methyl]amino]-6-oxohexyl]-1,1-dimethylethylester



N-Boc protected hexanoic acid (1.73 g, 7.47 mmol, 1.2 eq.) was dissolved with 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium3oxidhexafluorophosphate (HATU, 2.84 g, 7.5 mmol, 1.2 eq.) in CH_2Cl_2:DMF (40:10 mL) and stirred until soluble. Et_3N (2.63 mL, 18.8 mmol, 3 eq.) was added and stirred under argon with dropwise addition of the phenol-4-(aminomethyl)-2-6bis[[bis(2-pyridinylmethyl)amino]methyl] (3.4 g, 6.23 mmol, 1 eq.) in 40 mL of dry CH_2Cl_2. The resulting solution was stirred two days at room temperature under argon. The solvent was evaporated and the crude oil product was re-dissolved in ethyl acetate, and washed with brine. The organic phase was dried over Na_2SO_4, filtrated and the solvent was removed under reduced pressure and purified on silica column using acetone as eluent to give a white solid.

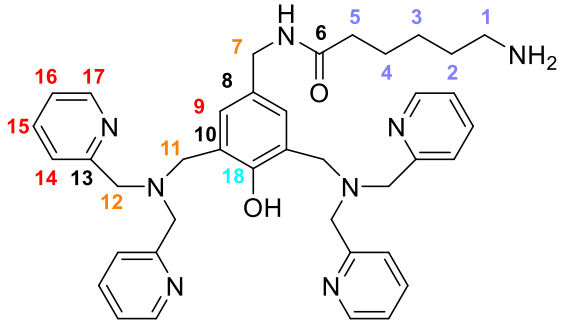
Yield: 2.96 g (62 %)

ESI-MS (CH_3CN) *m/z* = 815 [M + H^+], z = 1

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, δ ppm): 1.31 (2H, m, C_6H), 1.40 (9H, s, $C_{CH3}H$), 1.44 (2H, m, C_5H), 1.63 (2H, m, C_4H), 2.15 (2H, m, C_7H), 3.06 (2H, m, C_3H), 3.79 (4H, s, $C_{13}H$), 3.85 (8H, s, $C_{14}H$), 4.30 (2H, s, C_9H), 7.10 (2H, s, $C_{11}H$), 7.12 (4H, t, $C_{18}H$, J = 4.8 Hz), 7.46 (4H, d, $C_{16}H$, J = 7.7 Hz), 7.59 (4H, t, $C_{17}H$, J = 7.7 Hz), 8.51 (4H, d, $C_{19}H$, J = 4.8 Hz)

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz, δ ppm): 25.3 (C_4), 26.5 (C_6), 28.4 (**C_{CH3}**), 29.8 (C_5), 36.5 (C_7), 40.4 (C_3), 43.5 (C_9), 54.8 (C_{13}), 59.8 (C_{14}), 80.0 (**C_1**), 122.1 (C_{18}), 123.0 (C_{16}), 124.1 (**C_{12}**), 128.0 (**C_{10}**), 129.0 (C_{11}), 136.7 (C_{17}), 149.0 (C_{19}), 155.5 (C_{20}), 156.1 (**C_2**), 159.0 (**C_{15}**), 172.5 (**C_8**)

(8) : [6-amino[[3-5-bis(pyridinylmethyl)(quinolinylmethyl)amine]methyl-4-hydroxyphenyl]methyl



The N-Boc protected ligand compound (2.9 g, 3.88 mmol, 1 eq.) is dissolved in dry CH_2Cl_2 under argon. After cooling at 0°C, 13.8 mL of trifluoroacetic acid (179 mmol, 46 eq.) in 40 mL of dry CH_2Cl_2 was added dropwise. The reaction was left to stir over night and the temperature allowed to rise to room temperature. The resulting suspension was cooled over ice, diluted with H_2O and neutralized with NaOH (2N) then NH_4OH (25%) until pH 9-10. The solution was extracted with dichloromethane and washed with brine. The organic phase was dried over Na_2SO_4, filtrated and the solvent was removed under reduced pressure to give [6-amino[[3-5-bis(pyridinylmethyl)(quinolinylmethyl)amine]methyl-4-hydroxyphenyl]methyl as a pale yellow solid.

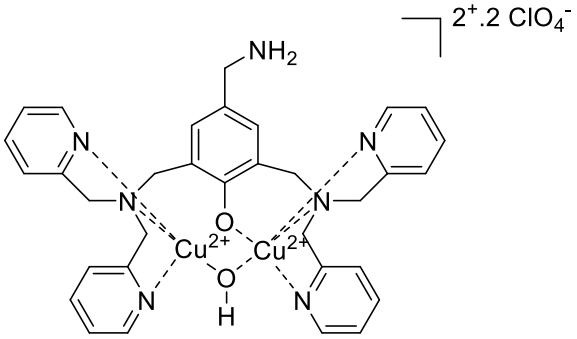
Yield: 2.24 g (87%)

ESI-MS (CH_3CN) *m/z* = 659 [M + H^+], z = 1

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, δ ppm): 1.31 (2H, m, C_4H), 1.47 (2H, m, C_3H), 1.62 (2H, m, C_2H), 2.15 (2H, m, C_5H), 2.16 (2H, m, C_7H), 2.68 (2H, m, C_1H), 3.73 (4H, s, $C_{11}H$), 3.82 (8H, s, $C_{12}H$), 4.26 (2H, s, C_7H), 7.06 (2H, s, C_9H), 7.09 (4H, t, $C_{16}H$, J = 6.4 Hz), 7.41 (4H, d, $C_{14}H$, J = 9.7 Hz), 7.57 (4H, t, $C_{15}H$, J = 9.7 Hz), 8.49 (4H, d, $C_{17}H$, J = 6.4 Hz)

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz, δ ppm): 24.8 (C_2), 25.3 (C_4), 27.6 (C_3), 35.6 (C_5), 39.7 (C_1), 42.9 (C_7), 54.8 (C_{11}), 59.9 (C_{12}), 122.2 (C_{16}), 123.3 (C_{14}), 123.7 (**C_{10}**), 128.8 (**C_8**), 129.5 (C_9), 136.7 (C_{15}), 148.8 (C_{17}), 155.0 (**C_{18}**), 159.6 (**C_{13}**), 172.9 (**C_6**)

Complex Cu^{2+}CC-DPA



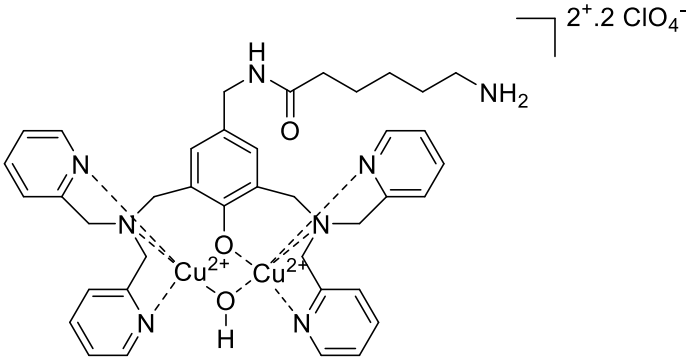
Phenol-4-(aminomethyl)-2-6bis[[bis(2-pyridinylmethyl)amino]methyl] (0.135 g, 0.247 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 8 mL of acetonitrile and 75 µL (2 eq.) of Et_3N was added. A solution of $Cu(ClO_4)_2{\cdot}6H_2O$ (0.190 g, 0.5 mmol, 2 eq.) in acetonitrile (3 mL) was added and the mixture was stirred for 1 h. The mixture was then concentrated, THF was added and put at -20°C for 1 week. The green precipitate was filtered and left to re-precipitate by vapor diffusion using acetonitrile and THF to give the complex **Cu^{2+}CC-DPA** (116 mg, yield 46%) as a green powder recovered in a protonated form of the following formula $[Cu_2(C_{33}H_{35}N_7O)(OH)]{\cdot}(ClO_4)_3$ according the elemental analysis.

ESI-MS (CH_3CN): negative mode, *m/z* = 986 [M-H^+], z =1

UV/Vis (CHES buffer (pH = 9)/DMSO ; 70:30), λ_{max} nm (ε, M^{-1}. cm^{-1}) ≈ 712 (260)

Anal. Calcd. for $[Cu_2(C_{33}H_{35}N_7O)(OH)]{\cdot}(ClO_4)_3$: C, 40.11; H, 3.67; N, 9.92. Found C, 40.32; H, 3.56; N, 10.15.

Complex Cu^{2+}LC-DPA



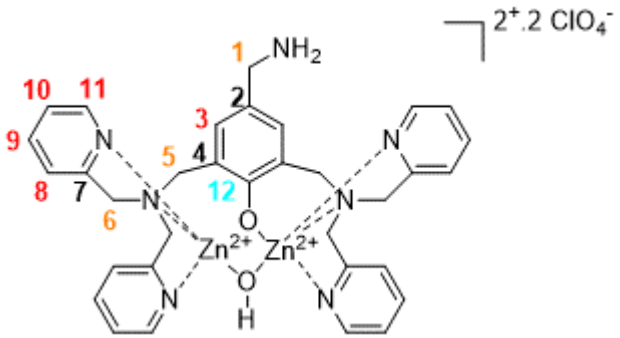
[6-amino[[3-5-bis(pyridinylmethyl)(quinolinylmethyl)amine]methyl-4-hydroxy-phenyl]methyl (0.351 g, 0.533 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 20 mL of acetonitrile and 164 µL (1.17 mmol, 2.2 eq.) of Et_3N was added. A solution of $Cu(ClO_4)_2{\cdot}6H_2O$ (0.435 g, 1.17 mmol, 2.2 eq.) in acetonitrile (5 mL) was added and the mixture was stirred for 2 h. The mixture was then concentrated until 5 mL, then THF was added (around 15 mL) and put at -20°C for 1 week. The green sticky oil is re-dissolved in acetonitrile with THF and left again at -20°C. The recovered oil is crushed with diethylether leading to a green powder left to -20°C with acetonitrile and THF to give after washing with diethylether complex **Cu^{2+}LC-DPA** (241 mg, yield 41%) recovered in a protonated form with the following formula: $[Cu_2(C_{39}H_{46}N_8O_2)(OH)]{\cdot}(ClO_4)_3$.

ESI-MS (CH_3CN) *m/z*, *z* = 1, 993 = $(M\text{-}ClO_4)^+$, *z* = 2, 450 = $(M\text{-}2ClO_4)^{2+}$, *z* = 3, 267 = $(M\text{-}3ClO_4)^{3+}$

UV/Vis (CHES buffer (pH = 9)/DMSO; 70:30), λ_{max} nm (ε, $M^{-1}.\ cm^{-1}$) ≈ 710 (196)

Anal. Calcd. for $[Cu_2(C_{39}H_{46}N_8O_2)(OH)]{\cdot}(ClO_4)_3{\cdot}1.9(H_2O){\cdot}0.55(C_4H_8O)$: C, 42.11; H, 4.73; N, 9.53. Found C, 41.92; H, 4.37; N, 9.17.

Complex Zn^{2+}CC-DPA



Phenol-4-(aminomethyl)-2-6bis[[bis(2-pyridinylmethyl)amino]methyl] (400 mg, 0.733 mmol, 1 eq.) was dissolved in 8 mL of acetonitrile and 215 µL (2 eq.) of Et_3N was added. A solution of $Zn(ClO_4)_2{\cdot}6H_2O$ (0.573 g, 1.53 mmol, 2.2 eq) in acetonitrile (6 mL) was added and the mixture was stirred for 2 hours. The mixture was concentrated, then diethyl ether was added and put at – 20°C overnight. The white precipitate was filtered and left to re-precipitate using acetonitrile and diethyl ether at – 20°C overnight. Finally, the precipitate was filtered to give the complex **Zn^{2+}CC-DPA** (280 mg, yield 43%) as a white powder recovered in a protonated form of the following formula $[Zn_2(C_{33}H_{35}N_7O)(OH)]{\cdot}(ClO_4)_3$ according the elemental analysis.

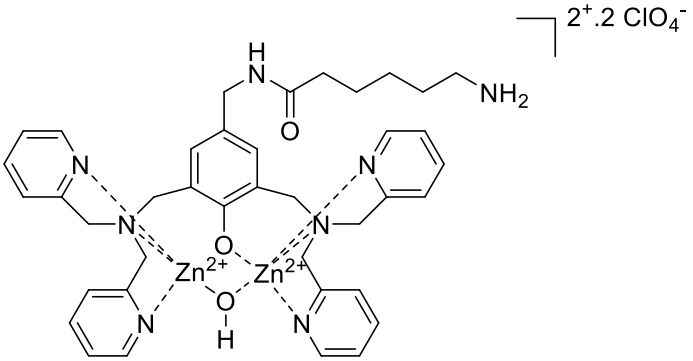
ESI-MS (CH_3CN) *m/z*, *z* = 2, 344.5 = $(M\text{-}2ClO_4)^{2+}$, *z* = 3, 230 = $(M\text{-}3ClO_4)^{3+}$

Anal. Calcd. for $[Zn_2(C_{33}H_{35}N_7O)(OH)]{\cdot}(ClO_4)_3$: C, 39.96; H, 3.66; N, 9.89. Found C, 39.90; H, 4.00; N, 9.95.

^{1}H NMR (CD_3CN, 300 MHz, δ ppm): 3.77 (2H, s, C_1H), 3.84 (4H, s, C_5H), 4.02 (8H, d, C_6H, J = 5.4 Hz), 7.10 (2H, s, C_3H), 7.52 (4H, d, $C_{10}H$, J = 7.8 Hz), 7.67 (4H, t, C_8H, J = 6.0 Hz), 8.07 (4H, t, C_9H, J = 6.0 Hz), 8.91 (4H, d, $C_{11}H$, J = 4.8 Hz)

^{13}C NMR (CD_3CN, 75 MHz, δ ppm): 48.1 (C_5), 57.5 (C_6), 66.3 (C_1), 123.2 (C_{10}), 125.9 (C_4), 126.0 (C_3), 133.8 (**C_2**), 142.5 (C_9), 149.5 (C_{11}), 156.5 (**C_7**), 163.4 (C_{12})

Complex Zn^{2+}LC-DPA



[6-amino[[3-5-bis(pyridinylmethyl)(quinolinylmethyl)amine]methyl-4-hydroxy-phenyl]methyl (0.245 g, 0.371 mmol, 1 eq.) was dissolved in 15 mL of acetonitrile and 109 µL (0.78 mmol, 2.2 eq.) of Et_3N was added. A solution of $Zn(ClO_4)_2{\cdot}6H_2O$ (0.290 g, 0.78 mmol, 2.2 eq) in acetonitrile (3 mL) was added and the mixture was stirred overnight. The mixture was filtered and concentrated, then diethyl ether was added and put at – 20°C for 1 week. The yellow sticky oil is re-dissolved in acetonitrile with diethyl ether and left again at – 20°C for 48 hours. The yellow precipitate is filtered and washed with diethyl ether and acetonitrile to give a pale yellow powder **Zn^{2+}LC-DPA** (0.166 g, yield 40 %).

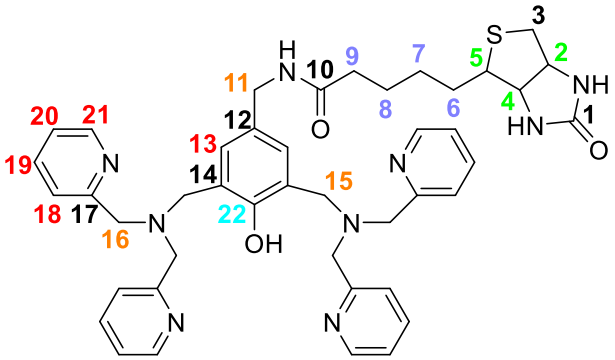
Anal. Calcd. for $[Zn_2(C_{47}H_{51}N_8O_3)(OH)]{\cdot}(ClO_4)_3{\cdot}2H_2O$: C, 45.48; H, 4.47; N, 9.03. Found C, 45.10; H, 4.18; N, 8.93

^{1}H NMR (CD_3CN, 500 MHz, δ ppm): 1.32 (2H, m, C*H*$_2$-), 1.37 (2H, m, C*H*$_2$-), 1.56 (2H, m, C*H*$_2$-), 1.94 (2H, m, C*H*$_2$-), 2.82 (2H, m, C*H*$_2$-), 3.80 (4H, s, PyC*H*$_2$N-), 4.01 (8H, s, HOPhC*H*$_2$N-), 4.12 (2H, d, HOPhC*H*$_2$, J = 3.4 Hz), 6.91 (2H, s, HOPh-*H*, J = 4.5 Hz), 7.51 (4H, d, Py-*H*, J = 4.5 Hz), 7.63 (4H, d, Py-*H*, J = 2.7 Hz), 8.04 (4H, d, Py-*H*, J = 4.5 Hz), 8.92 (4H, d, Py-*H*, J = 2.7 Hz)

^{13}C NMR (CD_3CN, 125 MHz, δ ppm): 24.7 (CH_2-), 25.1 (CH_2-), 26.7 (CH_2-), 35.4 (CH_2-), 39.4 (CH_2-), 42.9 (CH_2-PhOH), 54.9 (NCH_2-PhOH), 60.0 (CH_2-Py), 122.4 (**CH**-Py), 123.5 (**Cq**-Ph), 123.6 (**CH**-Py), 129.1 (**Cq**-Ph), 129.8 (**CH**-Ph), 136.9 (**CH**-Py), 148.9 (**CH**-Py), 155.0 (**Cq**-PhO), 158.4 (**Cq**-Py), 173.2 (**C**=O)

2. Biotinylation of DPA ligand and zinc complexation

Biotinylation of phenol-4-(aminomethyl)-2-6bis[[bis(2-pyridinylmethyl)amino]methyl]



In a round bottom flask of 10 mL, phenol-4-(aminomethyl)-2-6bis[[bis(2-pyridinylmethyl)amino]methyl] (230 mg, 0.42 mmol) is dissolved in 5 mL of DMF. DIPEA is then added drop by drop to adjust the pH at 9. Finally, biotin-NHS (143 mg, 0.42 mmol) is added in 2-3 mL of DMF to the mixture for 15 min. The mixture is centrifuge for two hours in a speed vacuum to evaporate DMF. The excess of DMF is then evaporated several times with CH_2Cl_2 to obtain a yellow pale powder.

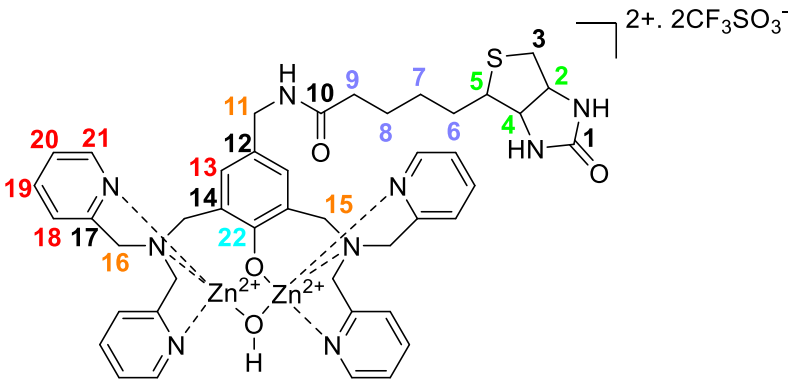
Yield: 260 mg (80 %)

ESI-MS (CH_3CN) *m/z* = 772.3 [M + H^+], z = 1

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, δ ppm): 1.32 (2H, m, C_7H), 1.51 (2H, m, C_6H), 1.59 (2H, m, C_8H), 2.12 (2H, m, C_9H), **2.52 (2H, d, C_3H, J = 12.8 Hz), 2.71 (2H, dd, C_3H, J = 4.9 Hz, 12.8 Hz)**, 2.97 (1H, m, C_5H), 3.70 (4H, s, $C_{15}H$), 3.78 (8H, s, $C_{16}H$), 4.11 (1H, m, C_4H), 4.22 (2H, t, $C_{11}H$, J = 6 Hz), 4.30 (1H, m, C_2H), 7.03 (2H, s, $C_{13}H$), 7.06 (4H, t, $C_{20}H$, J = 5 Hz), 7.39 (4H, d, $C_{18}H$, J = 8.0 Hz), 7.53 (4H, t, $C_{19}H$, J = 8.0 Hz), 8.43 (4H, d, $C_{21}H$, J = 5 Hz)

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz, δ ppm): 25.5 (C_6), 27.9 (C_7), 28.0 (C_8), 36.2 (C_9), 40.6 (**C_3**), 43.1 (C_{11}), 54.9 (C_{15}), 55.3 (C_5), 59.6 (C_{16}), 60.0 (C_2), 62.0 (C_4), 122.1 (C_{20}), 123.2 (C_{18}), 123.9 (**C_{14}**), 128.4 (**C_{12}**), 129.2 (C_{13}), 136.8 (C_{19}), 149.0 (C_{21}), 155.6 (C_{22}), 158.9 (**C_{17}**), 163.7 (**C_1**), 173.4 (**C_{10}**)

Complex Zn^{2+}CCBiot-DPA



In a round bottom flask of 50 mL, biotinylated ligand (100 mg, 0.129 mmol) is dissolved in 25 mL of CH_3CN. Et_3N (35 µM, 0.258 mmol) is added to the bottom flask for 1h30. $Zn(CF_3SO_3)_2$ (97 mg, 0.268 mmol) in 3 mL of CH_3CN is then added drop by drop for 15 min. A few drop of diethyl ether is added to the mixture and we observe a precipitate corresponding to $Et_3NH^+ \cdot CF_3SO_3^-$. The reaction mixture is kept at - 20 °C for 24 h and then filtered. The mother liquor is evaporated to give yellow oil. The product is then washed by THF (5 times) to remove $Et_3NH^+.CF_3SO_3^-$ and evaporated to give the yellow oil product.

Yield: 35 mg (15 %)

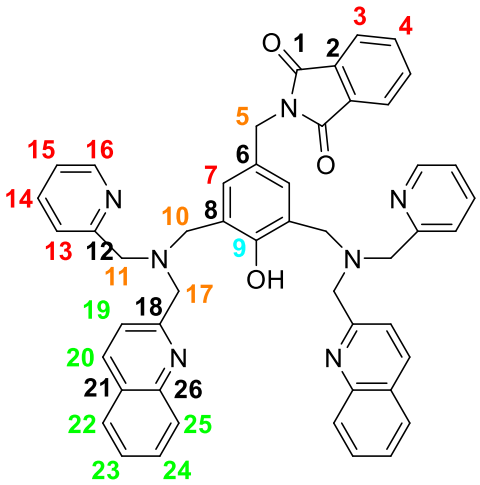
ESI-MS (CH_2Cl_2): *m/z*, *z* = 1, 1112 = $(M\text{-}CF_3SO_3)^+$, *z* = 2, 481 = $(M\text{-}2CF_3SO_3)^{2+}$

^{1}H NMR (CD_3CN, 500 MHz, δ ppm): 1.38 (2H, m, C_7H), 1.52 (2H, m, C_6H), 1.63 (2H, m, C_8H), 2.21 (2H, m, C_9H), **2.57 (2H, d, C_3H, J = 12.4 Hz), 2.79 (2H, dd, C_3H, J = 4.9 Hz, 13.3 Hz)**, 3.17 (1H, m, C_5H), 3.88 (4H, s, $C_{15}H$), 4.04 (8H, s, $C_{16}H$), 4.12 (1H, m, C_4H), 4.16 (2H, m, $C_{11}H$), 4.33 (1H, m, C_2H), 6.98 (2H, s, $C_{13}H$), 7.56 (4H, d, $C_{20}H$, J = 5.0 Hz), 7.67 (4H, t, $C_{18}H$, J = 7.5 Hz), 8.08 (4H, t, $C_{19}H$, J = 7.5 Hz), 8.93 (4H, d, $C_{21}H$, J = 5 Hz)

^{13}C NMR (CD_3CN, 125 MHz, δ ppm): 25.5 (C_6), 27.9 (C_7), 29.0 (C_8), 36.2 (C_9), 41.2 (**C_3**), 42.5 (C_4), 56.4 (C_5), 57.4 (C_{16}), 59.2 (C_{15}), 60.8 (C_2), 62.4 (C_{11}), 125.9 (C_{18}), 123.9 (**C_{14}**), 126.0 (C_{20}), 131.5 (**C_{12}**), 132.6 (C_{13}), 142.5 (C_{19}), 149.4 (C_{21}), 155.4 (C_{22}), 158.9 (**C_{17}**), 163.2 (**C_1**), 173.1 (**C_{10}**)

3. Synthesis of quinoline ligand and zinc complexation

(10) : 1-iosindole-1,3-dione-2-[[3,5bis(pyridinylmethyl)(quinolinylmethyl)amine]methyl-4-hydroxyphenyl]methyl]



In a round bottom flash of 250 mL, a mixture of (2-pyridylmethyl)(2-quinolylmethyl)amine (2.84 g, 11.42 mmol, 2 eq) and Et_3N (3.2 mL, 22.8 mmol, 4 eq) was dissolved in 50 mL of dry THF at 0 °C under nitrogen atmosphere. 2-[[3,5-Bis(chloromethyl)-4-hydroxyphenyl]methyl]-1H-isoindole-1,3(2H)-dione (2 g, 5.7 mmol, 1 eq) was dissolved in THF and added drop by drop. The solution was stirred for 72 h at rt. The solution was filtered off with a mixture THF/pentane and evaporated to dryness. The residue was purified by silica column chromatography (eluant: 100 % acetone). Organic layer was dried and evaporated to give a yellow pale powder.

Yield: 2.93 g (66 %)

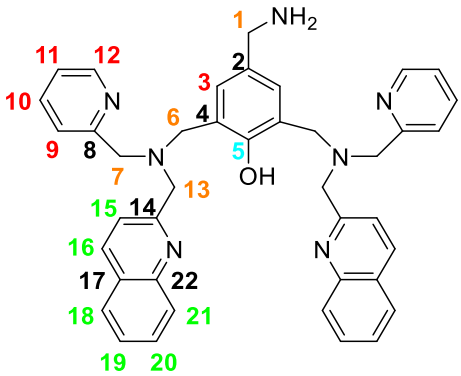
ESI-MS (CH_3CN): *m/z* = 776.31 [M + H^+], z = 1

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, δ ppm): 3.83 (4H, s, $C_{10}H$), 3.87 (4H, s, $C_{11}H$), 4.01 (4H, s, $C_{17}H$), 4.72 (2H, s, C_5H), 7.03 (2H, t, $C_{13}H$, J = 4.4 Hz), 7.34 (2H, s, C_7H), 7.43 (2H, t, $C_{23}H$, J = 8.0 Hz), 7.50 (4H, d, $C_{14}H$, J = 1.5 Hz), 7.51 (4H, d, $C_{15}H$, J = 1.9 Hz), 7.56 (2H, d, $C_{19}H$, J = 8.5 Hz), 7.61 (2H, d, $C_{22}H$, J = 1.7 Hz), 7.63 (2H, d, C_3H, J=3.0 Hz), 7.68 (2H, d, $C_{24}H$, J = 8.5 Hz), 7.77 (2H, dd, C_4H, J = 3.0 Hz, 5.5 = Hz), 7.97 (2H, d, $C_{25}H$, J = 8.5 Hz), 8.06 (2H, d, $C_{20}H$, J = 8.5 Hz), 8.43 (2H, d, $C_{16}H$, J = 4.7 Hz)

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz, δ ppm): 41.2 (C_5), 54.7 (C_{10}), 59.8 (C_{11}), 60.5 (C_{17}), 121.2 (C_{19}), 122.2 (C_{13}), 123.30 (C_{14}), 123.4 (C_4), 124.7 (**C_8**), 126.3 (C_{23}), 126.5 (**C_6**), 127.4 (C_{24}), 127.7

(**C_{18}**), 128.8 (C_{20}), 129.4 (C_{22}), 130.1 (C_7), 132.5 (**C_2**), 133.9 (C_3), 136.5 (C_{25}), 136.6 (C_{15}), 147.6 (**C_{21}**), 148.7 (C_{16}), 156.1 (**C_9**), 159.6 (**C_{26}**), 160.2 (**C_{12}**), 168.31 (**C_1**)

(11) : [3-5-bis(pyridinylmethyl)(quinolinylmethyl)amine]-4-hydroxyphenyl]methylamine]



In a round bottom flask of 100 mL, 1-iosindole-1,3-dione-2-[[3,5bis(pyridinylmethyl)(quinolinylmethyl)amine]methyl-4-hydroxyphenyl]methyl] (2.40 g, 3.0 mmol, 1 eq) was dissolved in ethanol (50 mL). H_2N-NH_2 (6.4 mL, 131.8 mmol, 44 eq) was added and the solution was refluxed for 3h. After, the reaction mixture was cooled to room temperature and stirred overnight. The solution was filtered off and evaporated to dryness. Then NaOH 2N (30 mL) was added to the mixture, the solution was adjusted to pH 8-9 with HCl 4N and extracted with CH_2Cl_2 (3 x 30 mL). The organic layer was dried with anhydrous Na_2SO_4 and evaporated to give a yellow powder.

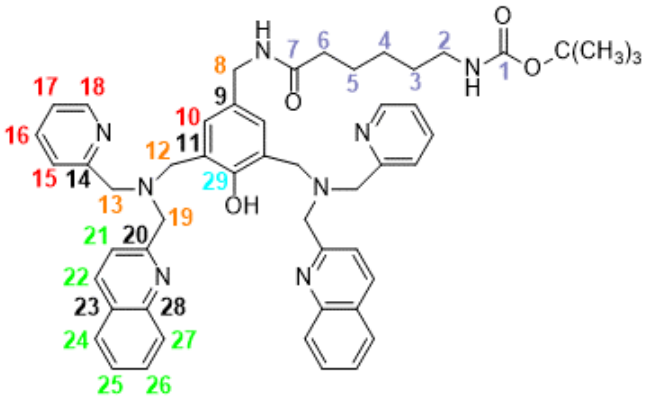
Yield: 1.7 g (88 %)

ESI-MS (CH_3CN) *m/z* = 646.34 [M + H^+], z = 1

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, δ ppm): 3.75 (2H, s, C_1H), 3.88 (4H, s, C_6H), 3.91 (4H, s, C_7H), 4.04 (4H, s, $C_{13}H$), 7.07 (2H, t, C_9H, J = 4.5 Hz), 7.13 (2H, s, C_3H), 7.37 (2H, t, $C_{19}H$, J = 8.0 Hz), 7.53 (4H, d, $C_{10\text{-}11}H$, J = 1.3 Hz), 7.58 (2H, d, $C_{15}H$, J = 8.5 Hz), 7.65 (2H, t, $C_{18}H$, J = 8.3 Hz), 7.71 (2H, d, $C_{20}H$, J = 8.0 Hz), 7.91 (2H, d, $C_{21}H$, J = 8.5 Hz), 8.02 (2H, d, $C_{16}H$, J = 8.3 Hz), 8.49 (2H, t, $C_{12}H$, J = 4.6 Hz)

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz, δ (ppm): 45.8 (C_1), 55.1 (C_6), 60.0 (C_7), 60.5 (C_{13}), 121.2 (C_{15}), 122.3 (C_9), 123.4 (C_{10}), **124.5 (C_4)**, 126.4 (C_{19}), **127.6 (C_{14})**, 127.8 (C_{20}), 129.1 (C_3), 129.2 (C_{16}), 129.8 (C_{18}), **132.3 (C_2)**, 136.8 (C_{21}), 136.9 (C_{11}), **147.4 (C_{17})**, 149.2 **(C_{12})**, **155.1 (C_5)**, **159.5 (C_8)**, **160.0 (C_{22})**

(12-protégé) : [6-[[3-5-bis(pyridinylmethyl)(quinolinylmethyl)amine]methyl-4-hydroxyphenyl] methylamino]-6-hexyl]-1,1dimethyethylester



In a round bottom flask of 100 mL, BOC (430 mg, 1.86 mmol, 1.2 eq) is dissolved in dry CH_2Cl_2 (20 mL) at 0°C under nitrogen atmosphere. The mixture of HATU (700 mg, 1.86 mmol, 1.2 eq) in 3 mL of DMF and Et_3N (647 µL, 4.65 mmol, 3 eq) was added to the solution for 30 minutes. [3-5-bis(pyridinylmethyl)(quinolinylmethyl)amine]-4-hydroxyphenyl]methyl-amine] (1 g, 1.55 mmol, 1 eq) is dissolved in CH_2Cl_2 (10 mL) and added drop by drop to the reaction mixture overnight. Solvent was evaporated to dryness and the residue was purified by silica column chromatography (eluent: acetone 100 %). The organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated to give a red brick powder.

Yield: 830 mg (62.4 %)

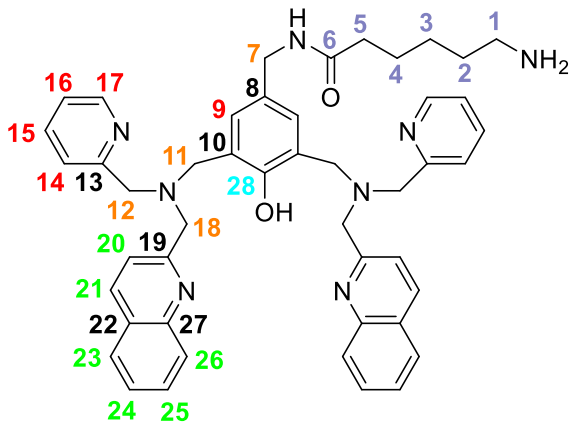
ESI-MS (CH_3CN) *m/z* = 859.44 [M + H^+], z = 1

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, δ ppm): 1.31 (2H, m, C_5H), 1.40 (9H, s, $C_{CH3}H$), 1.45 (2H, m, C_4H), 1.63 (2H, m, C_3H), 2.15 (2H, m, C_6H), 3.06 (2H, m, C_2H), 3.89 (4H, s, $C_{12}H$), 3.93 (4H, s, $C_{13}H$), 4.07 (4H, s, $C_{19}H$), 4.29 (2H, d, C_8H), 7.09 (2H, t, $C_{15}H$, J = 6.0 Hz), 7.12 (2H, s, $C_{10}H$), 7.48 (2H, t, $C_{25}H$, J = 8.0 Hz), 7.51 (2H, d, $C_{16}H$, J = 1.5 Hz), 7.55 (2H, d, $C_{17}H$, J = 8.0 Hz), 7.58 (2H, d, $C_{21}H$, J = 8.5 Hz), 7.65 (2H, t, $C_{24}H$, J = 8.3 Hz), 7.73 (2H, d, $C_{26}H$, J = 8.0 Hz), 8.02 (2H, d, $C_{27}H$, J = 8.5 Hz), 8.11 (2H, d, $C_{22}H$, J = 8.5 Hz), 8.50 (2H, d, $C_{18}H$, J = 4.6 Hz)

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz, δ (ppm): 25.4 (C_3), 26.5 (C_5), 28.4 (**C_{CH3}**), 29.9 (C_4), 36.6 (C_6), 40.5 (C_2), 43.2 (C_8), 54.9 (C_{12}), 59.8 (C_{13}), 60.4 (C_{19}), 79.0 (**$C_{C\text{-}CH3}$**), 120.9 (C_{21}), 122.1 (C_{15}), 123.2 (C_{16}), 124.2 (**C_{11}**), 126.2 (C_{25}), 127.3 (**C_{23}**), 127.6 (C_{26}), 127.9 (**C_9**), 128.8 (C_{22}), 129.6

(C_{10}-C_{24}), 136.6 (C_{27}), 136.7 (C_{17}), 147.3 (**C_{28}**), 148.9 (C_{18}), 155.7 (C_{29}), 156.1 (**C_{1}**), 159.2 (**C_{14}**), 159.7 (**C_{20}**) 172.5 (C_{7})

(12) : 6-amino-N-(4-hydroxy-3,5-bis(((pyridin-2-ylmethyl)(quinolin-2-ylmethyl)amino)methyl) benzyl)hexanamide



In a round bottom flask of 50 mL, [6-[[3-5-bis(pyridinylmethyl) (quinolinylmethyl)amine]methyl-4-hydroxyphenyl]methylamino]-6-hexyl]1,1dimethyethyl-ester (425 mg, 0.5 mmol, 1 eq) is dissolved in dry DCM (30 mL) at 0°C. TFA (1.7 mL, 22.8 mmol) is dissolved in 5 mL of DCM and then added drop by drop to the reaction mixture for 20 h. Then NaOH 2N (30 mL) was added to the mixture, the solution was adjusted to pH 8-9 and extracted with CH_2Cl_2 (3 x 30 mL). The organic layer was dried with anhydrous Na_2SO_4 and evaporated to give a yellow powder.

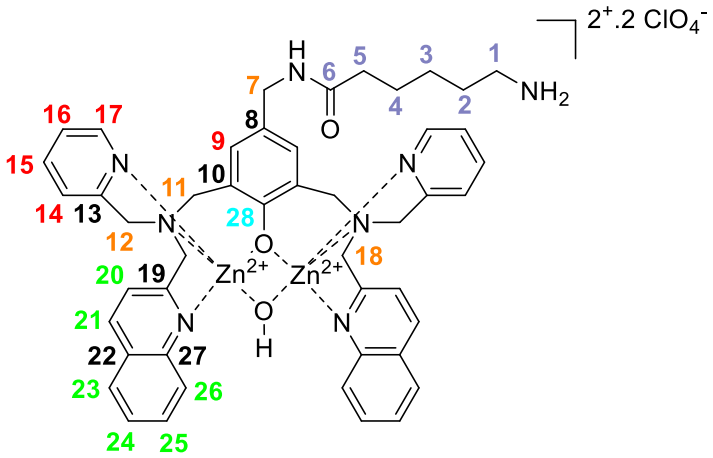
Yield: 350 mg (93 %)

ESI-MS (CH_3CN) *m/z* = 759.45 [M + H^+], z = 1

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, δ ppm): 1.32 (2H, m, C_4H), 1.63 (4H, m, $C_{2\text{-}3}H$), 2.18 (2H, m, C_5H), 2.83 (2H, m, C_1H), 3.82 (4H, s, $C_{11}H$), 3.89 (4H, s, $C_{12}H$), 4.03 (4H, s, $C_{18}H$), 4.24 (2H, s, C_7H), 7.07 (2H, t, $C_{14}H$), 7.10 (2H, s, C_9H), 7.45 (2H, t, $C_{24}H$, J = 7.6 Hz), 7.47 (2H, d, $C_{15}H$, J = 8.4 Hz), 7.52 (2H, d, $C_{16}H$, J = 8.4 Hz), 7.55 (2H, d, $C_{20}H$, J = 7.6 Hz), 7.66 (2H, t, $C_{23}H$, J = 7.6 Hz), 7.73 (2H, d, $C_{25}H$, J = 8.8 Hz), 8.01 (2H, d, $C_{26}H$, J = 8.8 Hz), 8.10 (2H, d, $C_{21}H$, J = 8.8 Hz), 8.47 (2H, d, $C_{17}H$, J = 5.2 Hz)

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz, δ (ppm): 25.6 (C_3), 26.7 (C_4), 32.9 (C_2), 36.5 (C_5), 42.3 (C_7), 42.4 (C_1), 55.0 (C_{11}), 59.9 (C_{12}), 60.5 (C_{18}), 121.5 (C_{16}), 122.6 (C_{14}), 123.4 (C_{24}), 124.1 (**C_{10}**), 126.7 (C_{15}), 127.3 (**C_{22}**), 128.2 (C_{25}), 128.9 (C_{26}), 129.5 (C_9), 130.0 (C_{23}), 136.9 (C_{21}), 137.1 (C_{20}), 147.3 (**C_{27}**), 149.2 (C_{17}), 155.5 (C_{28}), 159.2 (**C_{13}**), 159.8 (**C_{19}**), 172.9 (C_6)

Complex Zn^{2+}LC-PyQy



In a round bottom flask of 50 mL, 6-amino-N-(4-hydroxy-3,5-bis(((pyridin-2-ylmethyl)(quinolin-2-ylmethyl)amino)methyl)benzyl)hexanamide (70 mg, 0.092 mmol) is dissolved in 10 mL of CH_3CN and Et_3N is added to the mixture for 2 h. $Zn(ClO_4)_2.6H_2O$ (71 mg, 0.192 mmol) is then added drop by drop in 3 mL of CH_3CN for 15 min. A few drop of diethylether is added to the mixture and we observe a precipitate corresponding to $Et_3NH^+{\cdot}ClO_4$. The reaction mixture is kept at - 20 °C for 48 h and then filtered. The mother liquor is evaporated to give yellow oil. The product is then washed by THF (x 3) to remove $Et_3NH^+{\cdot}ClO_4^-$and evaporated to give the yellow oil product.

Yield: 35 mg (40 %)

ESI-MS (CH_3CN) *m/z* = 302.40 (*z* = 3) attributed to $[M\text{-}3ClO_4^-]^{3+}$ species with M = $[Zn_2(C_{47}H_{51}N_8O_3),(ClO_4)_3]$

Anal. Calcd. for $[Zn_2(C_{47}H_{50}N_8O_2)(OH)]{\cdot}(ClO_4)_3$: C, 45.39; H, 4.48; N, 9.01. Found C, 45.1; H, 4.18; N, 8.93

^{1}H NMR ($CDCN_3$, 500 MHz, δ ppm): 1.42 (2H, m, C_4H), 1.64 (2H, m, C_3H), 1.70 (2H, m, C_2H), 2.24 (2H, m, C_5H), 3.03 (2H, m, C_1H), 3.59 (2H, d, $C_{11}H$, J = 12 Hz), 4.00 (4H, d, $C_{12}H$, J = 12 Hz), 4.12 (4H, d, $C_{18}H$, J = 18 Hz), 4.25 (4H, d, C_7H, J = 5 Hz), 6.96 (2H, s, C_9H), 7.46 (2H, d, $C_{16}H$ J = 8.5 Hz), 7.53 (2H, d, $C_{24}H$, J = 8 Hz), 7.56 (2H, d, $C_{14}H$, J = 5.5 Hz), 7.65 (2H, t, $C_{15}H$, J = 5.0 Hz), 7.80 (2H, t, $C_{23}H$, J = 7.6 Hz), 8.03 (2H, m, $C_{20}H$), 8.08 (2H, m, $C_{23}H$), 8.5 (2H, d, $C_{17}H$, J = 8.5 Hz), 9.02 (2H, d, $C_{26}H$, J = 8.5 Hz), 9.06 (2H, d, $C_{21}H$, J = 6.0 Hz)

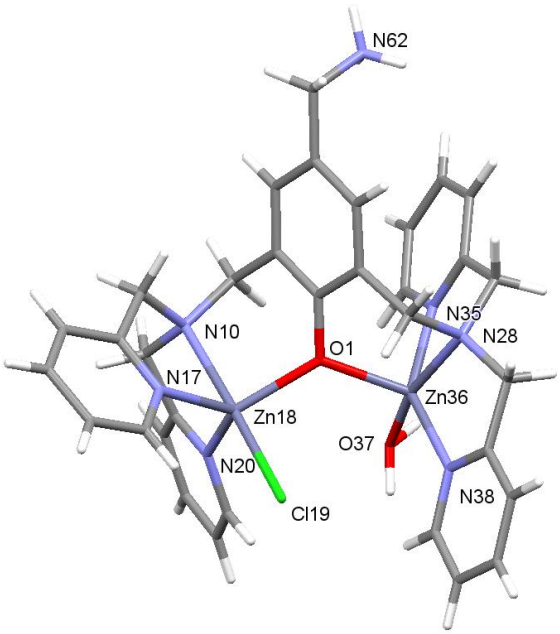
^{13}C NMR ($CDCN_3$, 120 MHz, δ (ppm): 24.7 (C_3), 25.7 (C_4), 26.7 (C_2), 35.7 (C_5), 40.7 (C_1), 42.2 (C_7), 56.5 (C_{18}), 58.7 (C_{11}), 60.5 (C_{12}), 122.4 (C_{16}), 123.8 (**C_{10}**), 125.0 (C_{24}), 125.5 (C_{14}), 126.9 (C_{26}), 127.3 (**C_{22}**), 129.1 (C_{15}), 129.3 (C_{23}), 132.1 (C_9), 141.9 (C_{20}), 142.0 (C_{17}), 145.8 (**C_{27}**), 148.7 (C_{21}), 155.7 (C_{28}), 158.1 (**C_{13}**), 159.8 (**C_{19}**), 173.0 (C_6)

Crystallographic data

Crystal structure determination and refinement

Measurements were made on a Bruker−Nonius Kappa CCD diffractometer with graphite monochromatized Mo(Kα) radiation (λ = 0.71073 Å) at 200 K. The crystal data and details of the data collections are given in Table 1. Crystallographic structure was solved using direct methods implemented by ShelxS-97.[224] Refinement was performed using ShelxL-9722[3] run under Olex2.[225]

Complex Zn^{2+}CC-DPA-Cl



[224] Sheldrick, G., A short history of SHELX, *Acta Crystallogr. A.*, **2008**, 64 (1), 112-122

[225] Dolomanov, O. V., Bourhis, L. J., Gildea, R. J., Howard, J. A. K., Puschmann, H. J., *Appl. Crystallogr.*, **2009**, 42 (2), 339−341

Complex	Zn^{2+}CC-DPA-Cl
Formula	$[Zn_2(C_{33}H_{37}N_7O_2)(Cl)(H_2O)](ClO_4)_3 \cdot 2H_2O$
M	1064.27
Color/morphology	Yellow plate
Crystal size	0.4 × 0.26 × 0.07
Crystal system	triclinic
Space group	$P\bar{1}$
a / Å	12.491 (3)
b / Å	14.068 (3)
c / Å	15.186 (3)
α / °	97.23 (3)
β / °	112.86 (3)
γ / °	113.64 (3)
V / $Å^3$	2122.9 (7)
Z	2
T / K	200 (2)
ρ_c / $g.cm^{-3}$	1.665
μ / mm^{-1}	1.460
Total reflections	33034
Independant reflections	8325
Observed reflections	6042
R[a]	8.90
R_w [a]	19.38

[a] Refinement based on F in which $w=1/[\sigma^2 (F_o) + 0.0976P^2+7.2562P$ where $P=(Fo^2+2Fc^2)/3$

Table 16: crystallographic data for the complex Zn^{2+}CC-DPA-Cl

Atom1	Atom2	Length / Å
Zn18	Zn36	3.635
Zn18	Cl19	2.2951 (18)
Zn18	O1	2.019 (4)
Zn18	N10	2.232 (5)
Zn18	N20	2.072 (5)
Zn18	N17	2.072 (5)
Zn36	O1	2.007 (4)
Zn36	O37	2.045 (5)
Zn36	N28	2.183 (5)
Zn36	N35	2.099 (5)
Zn36	N38	2.062 (5)

Bond Angle	Angle / °
Zn36-O1-Zn18	129.05 (19)
O1-Zn18-Cl19	92.71 (12)
O1-Zn18-N10	89.10 (17)
O1-Zn18-N20	114.57 (19)
O1-Zn18-N17	123.26 (18)
O1-Zn36-O37	100.54 (19)
O1-Zn36-N28	95.00 (17)
O1-Zn36-N35	93.03 (18)
O1-Zn36-N38	117.49 (19)

Table 17: Selected distances and bond angles for the structure obtained from complex Zn^{2+}CC-DPA-Cl

Interactions studies on solid support

1. Methods

1.1. Buffer

The working buffer (WB) used for all experiments was made of 10 mM HEPES (Sigma Aldrich) at pH 7.4 and 150 mM NaCl (Sigma Aldrich) in ultrapure water.

The Bovine Serum Albumin (heat shock fraction, protease free, fatty acid free, essentially globulin free, pH 7, > 98 %) is from Sigma Aldrich.

WB was filtered before further used.

1.2. Phospholipids

1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-[phospho-L-serine] (DOPS), 1,2-dihexanol-sn-glycero-3-phosphocholine (DHPC), 1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (DHPS) and 1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DHPE), were obtained from Avanti Polar Lipids in powder form.

O-Phospho-L-serine is obtained from Sigma Aldrich.

1.3. Surface preparation

- <u>Gold functionalization by SAM</u>

SPR gold surface were purchased from FEMTO-ST institute (University of Besançon). Prior to used, the gold surface was rinsed with water, dried under nitrogen stream and exposed to UV/ozone (Jelight, Irvine, CA, USA) for 10 minutes. After UV/ozone treatment, the gold surface was immerged overnight in a thiol solution of HS-C_{11}-$(EG)_6$-OCH_2-COOH (1 mM). After one night of incubation at room temperature, safe from light and in an environment saturated with ethanol steam, the gold surface is washed with ethanol, then blow-drying with N_2. The surface is then mounted on a sample holder and introduced in the Biacore T200 device.

Before each experiment, a manual run has been proceeded at 10 µL.min^{-1} to rinse the surface with the working buffer until stabilization of the signal. A mixture of N-hydrosuccinimide (100 mM) and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (400 mM) (50:50) is injected 3 times 10 min, to activate the surface. Injection of Annexin V (concentration in WB), Zn^{2+}LC-DPA (250 µM solubilized in water/DMSO (70:30 v:v)) and Cu^{2+}LC-DPA (250 µM solubilized in water/DMSO (70:30 v:v)) for 15 minutes at 5µL/min is performed on the active flow cells. Then ethanolamine (pH 11.7 at 1 mM) is injected 10 min at 10µL/min to inactivated the remaining activated ester.

- CM5 were purchase from Cytiva. The surface comprises a carboxymethylated dextran hydrogel laid above the gold film. Before each experiment, a manual run has been proceeded at 10 µL.min^{-1} to rinse the surface with the working buffer until stabilization of the signal. A mixture of N-hydrosuccinimide (100 mM) and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (400 mM) (50:50) is injected for 10 min, to activate the surface. Injection of Cu^{2+}CC-DPA, Zn^{2+}LC-DPA (250 µM solubilized in water/DMSO (70:30 v:v)) and Cu^{2+}LC-DPA (250 µM solubilized in water/DMSO (70:30 v:v)) for 15 minutes at 5µL/min is performed on the active flow cells. Then ethanolamine (pH 11.7 at 1 mM) is injected 10 min at 10µL/min to inactivated the remaining activated ester.

2. Small Unilamellar Vesicles (SUVs) preparation

All phospholipids were purchased from Avanti Polar Lipids and were used without further purification. Stock solution in chloroform stored à -20°C. Lipid films consisting of appropriate molar fractions of phospholipids (1 mM total lipid) were prepared by dispensing measured aliquots from stock chloroform solutions, evaporating the solvent under a gentle stream of argon, and placing the films under vacuum 45 minutes to ensure complete removal of solvent. The films were hydrated by adding 2 mL of WB. The hydrated lipid films were vortexed 5 minutes and then passed 20 times through a 19 mm polycarbonate Nucleopore filter with 0.1 µm diameter pores using an Avanti Polar Lipids extruder to produce small unilamellar vesicles. The vesicles are stored at 4°C until use. The average diameter and size distribution of were measured on a Zetasizer NanoS Photon Correlation Spectroscopy by dynamic light scattering method (Malvern instrument, United Kingdom) at room temperature. Measurements were performed at 298 K and pH 7.4 using a standard 1 mL cuvette (Figure 1). The average size of the vesicles was found to be 100 ± 20 nm and stable over time (Figure 2).

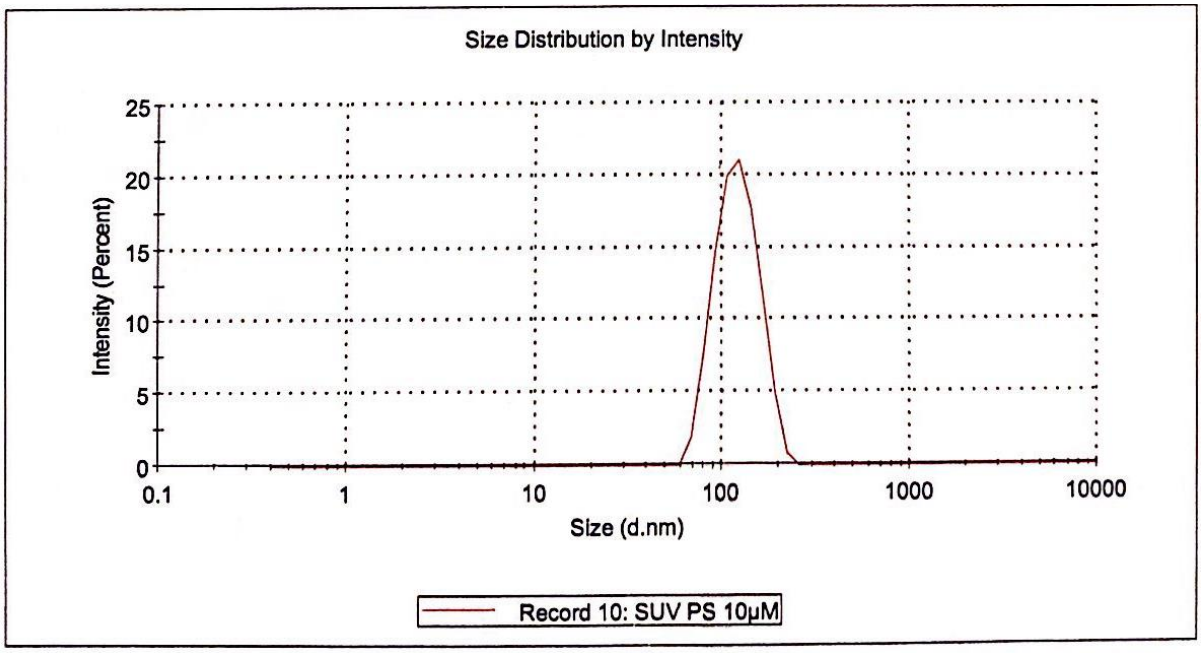


Figure 1 : example of SUV PC/PS size measurement by DLS

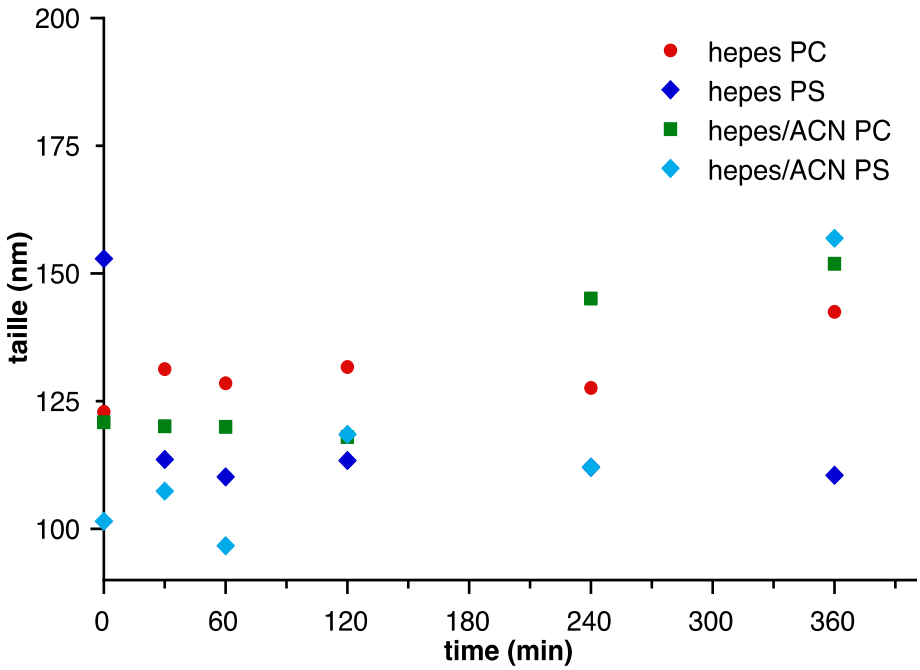


Figure 2 : size measurements of SUVs over time in HEPES and HEPES/CH_3CN (90:10)

3. Microvesicles isolation

- Pooled Normal Plasma from CryoPEP

For further use, PPP sample is de-freeze in a bain-marie at 37°C for 3 to 4 minutes. Then, 2 µL of a mixture of PPACK and Dns-GGACK (50:50), protease inhibitors were added to the PPP sample to avoid clotting for 10 minutes. An initial step centrifugation is done (3 min., 13 000 x g). The pellet is discarded and the supernatant undergo another centrifugation (60 min., 14 000 x g at 4°C). Supernatant was thrown away and 500 µL of WB is added to the pellet and vortexed for 2 minutes. A final centrifugation step is done (60 min., 14 000 x g at 4°C), supernatant was also thrown away and 500 µL of WB is added to the sample. Finally the samples are stored at 4°C and usable for one week maximum.

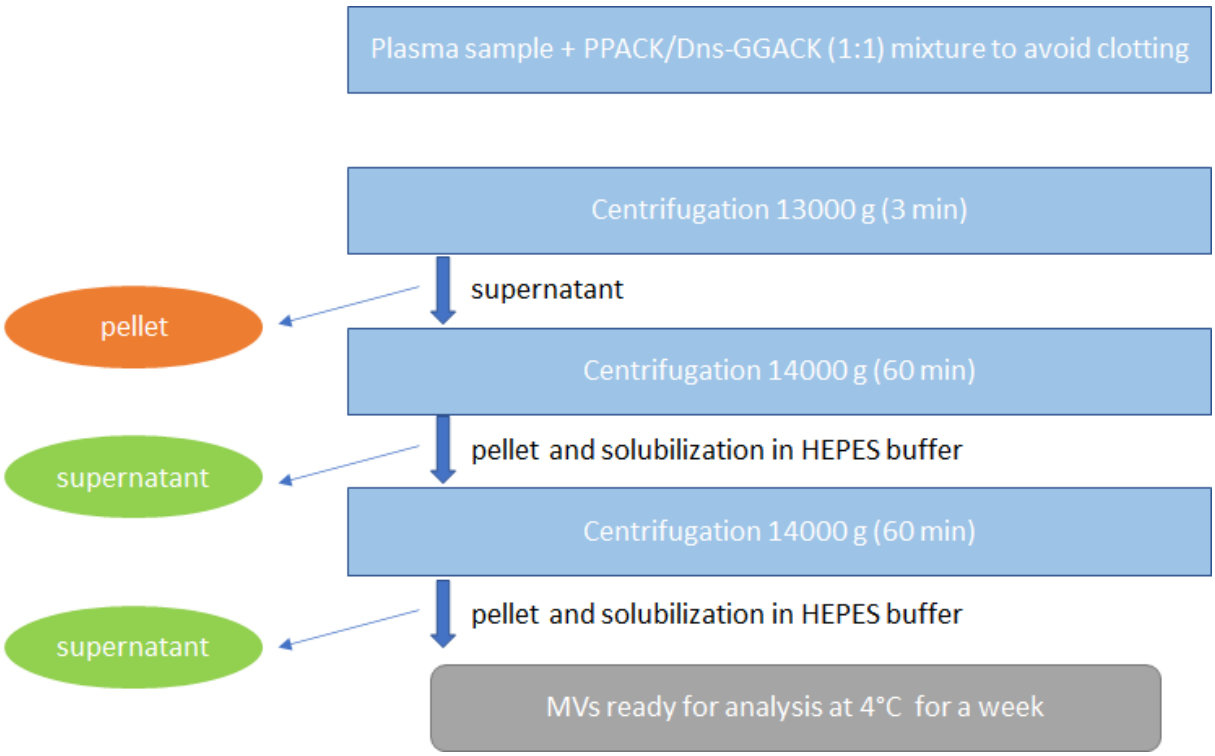


Figure 3 : isolation of microvesicles from plasma sample (PPP) by centrifugation

4. MV quantification by prothrombinase assay

MV quantification by prothrombinase assay was performed by our collaborator Fatiha EL GHAZOUANI under the supervision of Prof Florence TOTI (INSERM, UMR 1260, Regenerative Nanomedicine (RNM), University of Strasbourg, Faculty of Medicine, Strasbourg) following a procedure described elsewhere.[226]

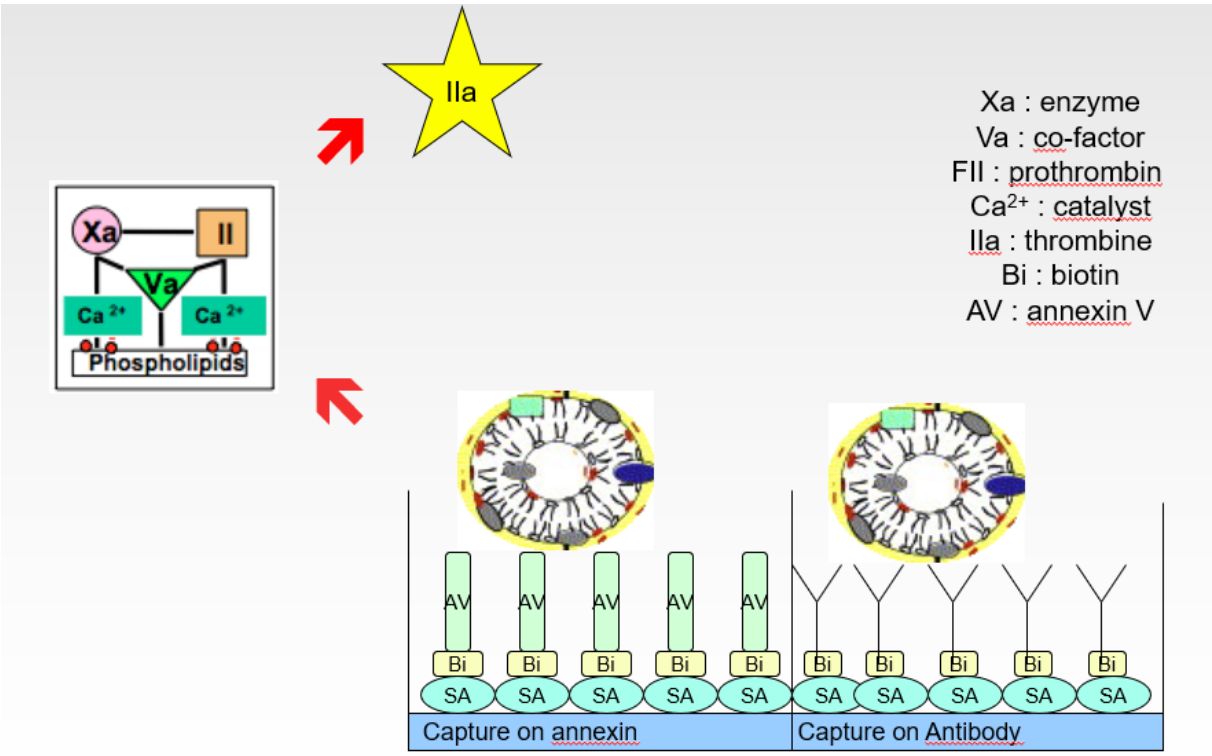


Figure 4 : quantification of MVs by prothrombinase assay

MVs are captured thanks to PS, on a solid surface functionalized with streptavidin. PS is then quantified by prothrombinase assay : PS will form a complex with F(Xa), F(Va), F(II) and prothrombin in presence of Ca^{2+} which will lead to the cleaving of prothrombin in -thrombin. The generated thrombin is proportional to the level of PS in the sample which is measured by the addition of a chromogenic substrate that will in turn be cleaved in a coloured product. The intensity of the generated product is measured at 405 nm and compared to a standard curve of SUVs (with 70 % PC - 30 % PS) whose PS concentration is known.

[226] Amoura, L. ; El-Ghazouani, F.; Kassem, M.; El Habhab, A.; Kreutter, G; Toti, F.; Assessment of plasma microvesicles to monitor pancreatic islet graft dysfunction : beta cell-and leukocyte-derived microvesicles as specific features in a pilot longitudinal study, *Am J Transplant*. **2020**, 20, 40-51

5. Surface Plasmon Resonance (SPR)

SPR measurements were performed with a Biacore T200 (GE Healthcare BioSciences) operated with Biacore T200 evaluation software (version 3.0.1). All measurements were performed at 25°C using a working buffer solution.

6. Biolayer Interferometry (BLI)

- Octet 96 Red (ForteBio, Menlo Park, CA, USA) was used for binding studies. Samples were diluted in black 96 well plates (Nunc F96 MicroWell Plates, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Germany). The total working volume for each sample or buffer was 0.20 ml per well and the rpm setting for each equilibrium, loading, association and dissociation step was 1000 rpm. The test was performed at 25°C. Prior each assay, AR_2G biosensor tips (ForteBio, Menlo Park, CA, USA) were pre-wetted in 0.3 ml HEPES for at least 10 min. Afterwards, AR2G biosensor tips were activated with a mixture of NHS/EDC in a concentration of 100 mM and 400 mM in ultra-pure water for 300 s, followed by a loading step with M^{2+}LC-DPA (M = Zn or Cu) or Zn^{2+}LC-PyQy in a concentration of 250 µM solubilized in water/DMSO (70:30 v:v) for 600 s, then a quenching step with $OH-(CH_2)_2-NH_2$ (pH = 11.7 at 1 mM). Finally, the last step is an equilibration step (600 s) in WB (pH 7.4).

Subsequently, a blocking step with BSA (3 %) for 120 s was introduced followed by a regeneration step with SDS (0.05 %) and OG (40 mM) for 10 s each, followed by an equilibration step (120 s) in WB (pH 7.4). Interaction step with SUVs has been performed with an association step of SUV PC or SUV PC/PS (70:30) in a range of 20 µM to 250 µM for 600 s. The dissociation was monitored with WB (pH 7.4) for 300 s. All measurements were performed in duplicates.

- Raw data, was obtained with the Octet Software (Version 9.0, Menlo Park, CA, USA). Interferometry data were fitted with Octet software, version 9.0, ForteBio).

ANNEXES

- Annexe 1 : études des interactions entre les complexes et les phospholipides à chaînes courtes par SPR

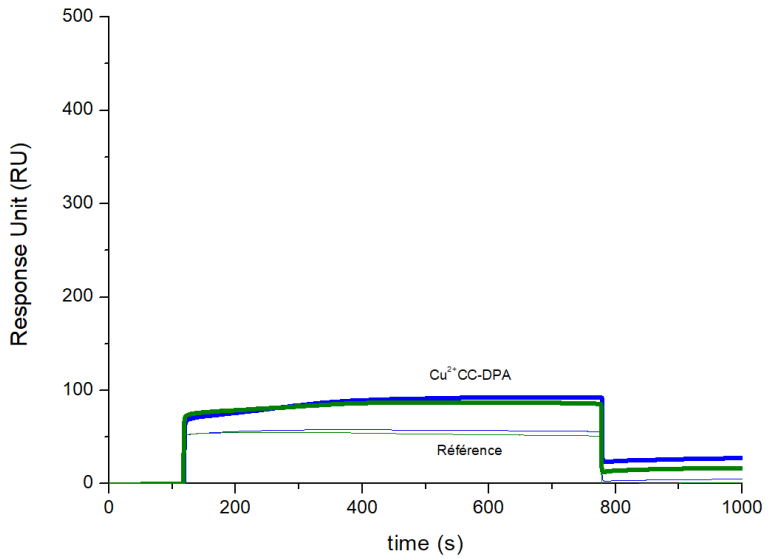


Figure 1 : réponse brute observée pour **1)** en bleu DHPC 750 µM, **2)** en vert DHPE 750 µM sur une surface de référence (trait fin) et sur la surface Cu^{2+}CC-DPA (trait appuyé)

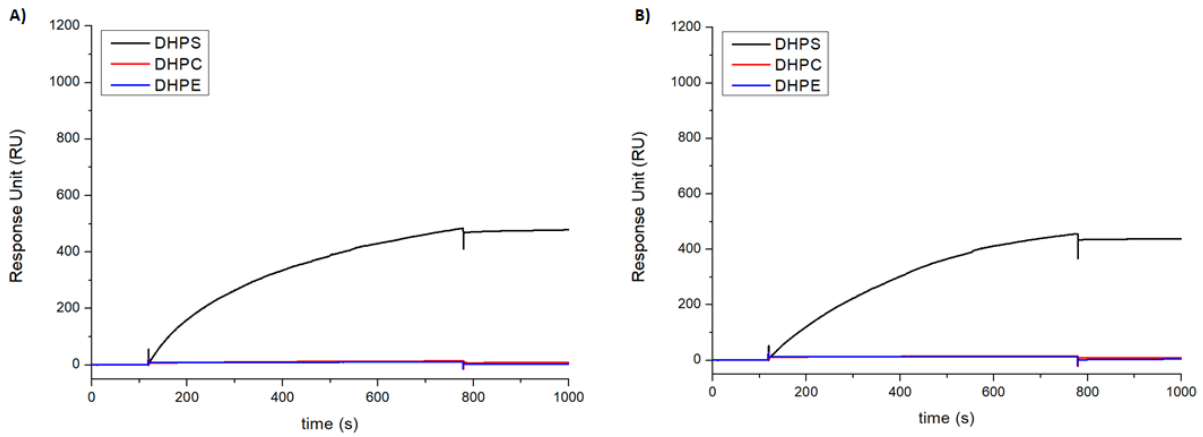


Figure 2 : réponse observée après procédure de double soustraction pour **1)** en noir DHPS 750 µM, **2)** en rouge DHPC 750 µM et **3)** en bleu DHPE 750 µM sur une surface fonctionnalisée avec (A) Cu^{2+}LC-DPA et (B) Zn^{2+}LC-DPA

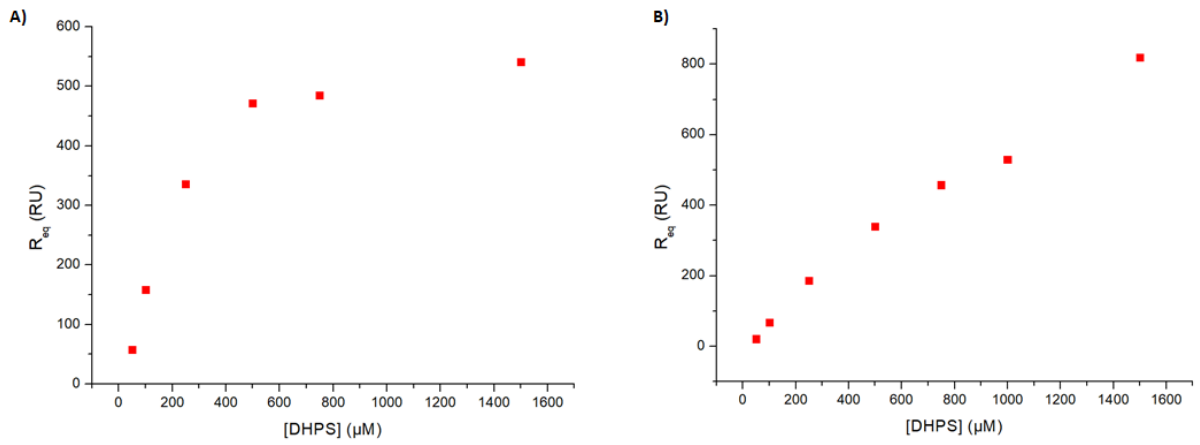


Figure 3 : tracé de la réponse en fin d'association en fonction de la concentration de DHPS avec (A) Cu^{2+}LC-DPA et (B) Zn^{2+}LC-DPA

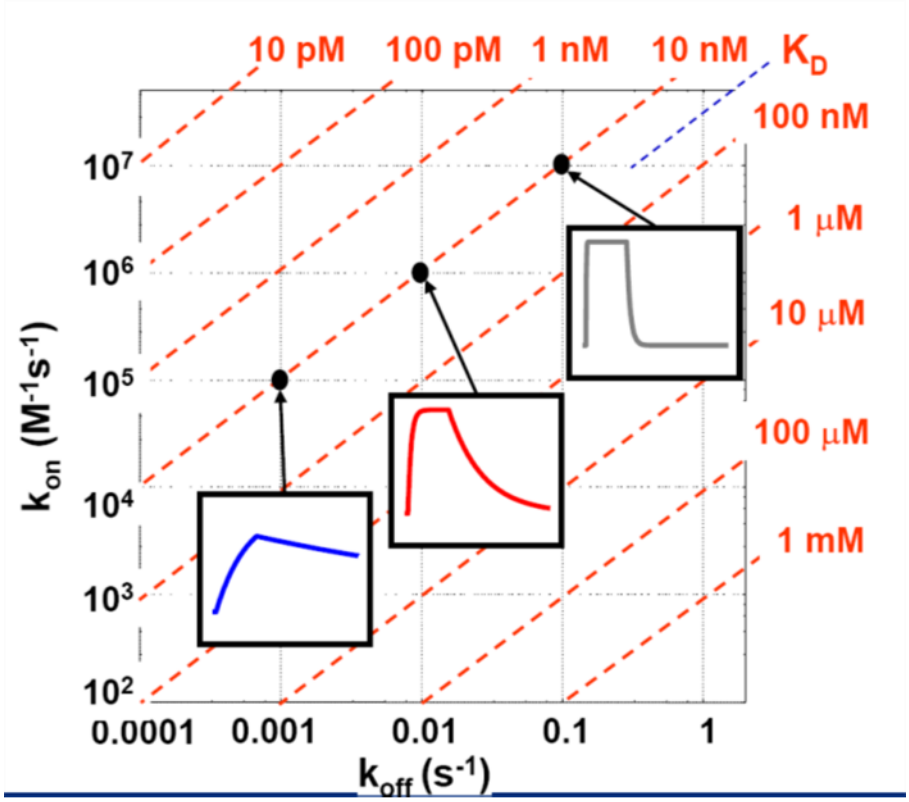


Figure 4 : Exemples de profils de sensorgrammes en fonction des valeurs de k_{on} et de k_{off}

- Annexe 2 : études des interactions entre les complexes et les vésicules modèles par SPR

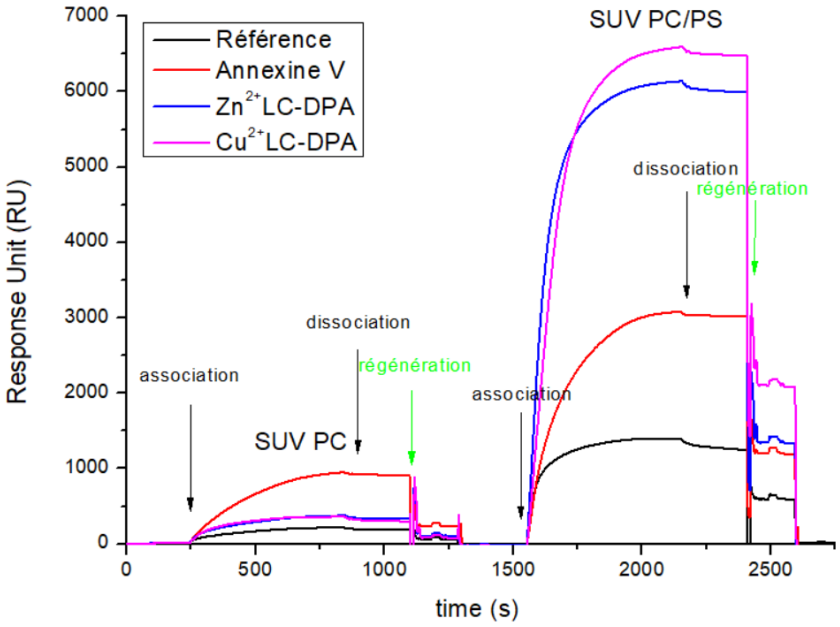


Figure 1 : sensorgrammes enregistrés par SPR dans WB pour l'injection de SUV PC et SUV PC/PS (70:30) injecté à 50 µM sur la piste de référence (noire), sur une surface fonctionnalisée avec l'AV (rouge), Zn^{2+}LC-DPA (bleu) et Cu^{2+}LC-DPA (rose)

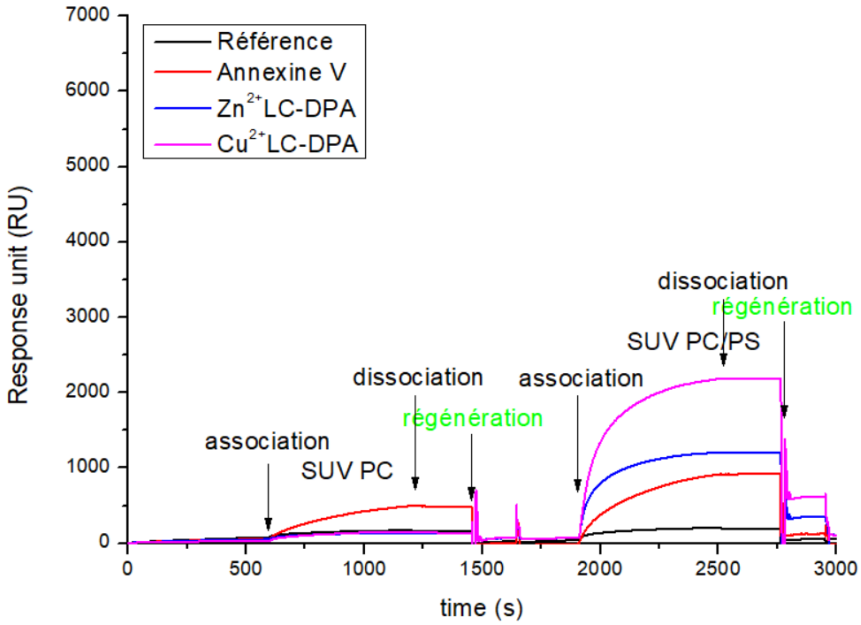


Figure 2 : sensorgrammes enregistrés par SPR dans WB-BSA. Réponse observée avec la piste de référence pour SUVs PC et SUV PC/PS injectées à 50 µM sur une surface fonctionnalisée avec l'AV (rouge), le Zn^{2+}LC-DPA (bleu) et Cu^{2+}LC-DPA (rose)

- Annexe 3 : études des interactions entre les complexes et les microvésicules par SPR

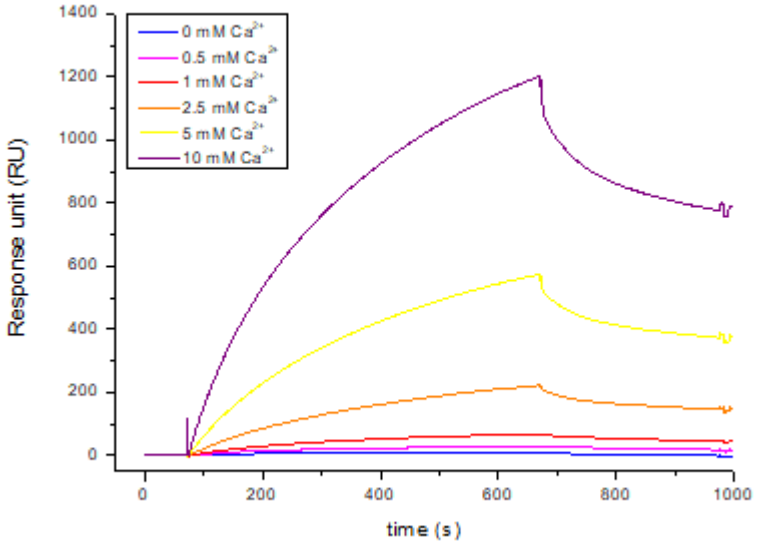


Figure 1 : réponse observée après procédure de double soustraction pour l'injection de SUV PC/PS 50 µM sur la piste fonctionnalisée par Zn^{2+}LC-DPA dans le tampon WB-BSA avec différentes concentrations de Ca^{2+}

- Annexe 4 : formations, posters et communications

1. Formations

- Validation avec mention du M2 Management et Administration des Entreprises (MAE) sur 2 ans et demi à l'IAE (240 h)
- Jeudi de la sécurité : RMN (15/03/2018) et Travail sur écran (15/03/2018) (3 h)
- RMN pour les chimistes en pratique (8-9/03/2018) (14 h)
- Chimie des Processus Biologiques : mécanismes de réactions enzymatiques – chimie de l'évolution et coenzymes (12/01/18) (6 h)
- Formation logiciel de gestion de références bibliographiques ZOTERO (2 h)

2. Posters

- P.Chanthavong, C. Belle, A. Van der Heyden, G. Gellon, A. Thibon-Pourret, J. Dejeu, H. Bonnet ; Coordination complexes to explore the recognition of phospholipids and to develop a membrane active probe (IMBG, Autrans, mars 2018)
- P.Chanthavong, C. Belle, A. Van der Heyden, G. Gellon, A. Thibon-Pourret, J. Dejeu, H. Bonnet ; Dinuclear Zinc Complex for phosphatidylserine detection (SCF, journée annuelle AURA et Journée Annuelle des Doctorants 2019, Grenoble, juin 2019)
- P.Chanthavong, C. Belle, A. Van der Heyden, G. Gellon, A. Thibon-Pourret, J. Dejeu, H. Bonnet ; Quinoline-Ligated Dinuclear Zinc Complex for Phosphatidylserine Detection (IMBG, Villard de lans, septembre 2019)

3. Communications

- P.Chanthavong, C. Belle, A. Van der Heyden, G. Gellon, A. Thibon-Pourret, J. Dejeu, H. Bonnet ; Dinuclear Zinc Complexes for detection of phosphatidylserine on microvesicles (FrenchBIC, Webinar, 10/2020) : prix de la communication orale
- P.Chanthavong, C. Belle, A. Van der Heyden, G. Gellon, A. Thibon-Pourret, J. Dejeu, H. Bonnet ; Dinuclear Zinc Complexes for detection of phosphatidylserine on microvesicles (SCF, Webinar, 01/2021)

Résumé

A la suite de différents stimuli, la cellule peut être activée, ce qui conduit à un remodelage de sa membrane et via un bourgeonnement, à a libération de microvésicules dans le milieu extracellulaire. Ces microvésicules exposent à leur surface la phosphatidylsérine contrairement aux cellules saines où ce phospholipide anionique est localisé sur le feuillet interne de la bicouche membranaire. Présentes, dans les fluides biologiques, les microvésicules sont impliquées dans de nombreuses pathologies (diabète, hypertension, thrombose…), aussi il a un réel intérêt à les étudier en tant que biomarqueurs pour la détection précoce, la thérapie et le suivi de pathologies. Le travail présenté dans ce manuscrit s'intéresse au développement d'une nouvelle méthode de capture des microvésicules par des complexes bimétalliques immobilisés sur une surface. Pour ce faire, deux séries de complexes à zinc(II) et cuivre(II) ont été préparés et caractérisés par diverses techniques spectroscopiques. Ces deux séries ont ensuite été utilisés pour des études d'interactions avec les phospholipides agencés dans des structures de complexités croissantes : 1) des monomères de phospholipides à chaînes courtes, 2) des vésicules modèles dont nous pouvons contrôler la taille et la composition et enfin 3) des microvésicules issues d'échantillons sanguins. Ces études ont permis de valider l'interaction complexes métalliques/phosphatidylsérine en solution par résonance magnétique nucléaire (RMN) du phosphore et fluorescence, ainsi qu'en phases supportées après immobilisation des complexe par résonance plasmonique de surface (SPR) et l'interférométrie (BLI).

Mots clés : microvésicules, phosphatidylsérine, complexes de zinc, complexes de cuivre, interaction biomoléculaire

Abstract

In response to different stimuli, cells can be activated, leading to a remodelling of their membrane, and after blebbing to the release of microvesicles in the extracellular environment. These microvesicles display phosphatidylserine at the outer leaflet of their membrane contrarily to the healthy cells. Founded in the body fluids, the microvesicles are involved in numerous diseases (diabetes, hypertension, thrombosis…), so there's a real interest in studying them as biomarkers for the early monitoring of body dysfunction. The work reported in this manuscript concerns the development of an original method where microvesicles are captured by bimetallic complexes immobilized on a surface. Two sets of zinc(II) and copper(II) complexes have been prepared and characterized by several spectroscopic methods. Then, they have been used for interaction studies with phospholipids organized in structures of complexity with : 1) monomers of short-chain phospholipids, 2) vesicle models of known size and composition and finally 3) with microvesicles isolated from blood sample. These studies have confirmed the complexes/phosphatidylserine interaction in solution, by phosphorus Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and fluorescence as well as in supported phase by surface plasmon resonance (SPR) and biolayer interferometry (BLI).

Keywords : microvesicles, phosphatidylserine, zinc complexes, copper complexes, biomolecular interaction