



HAL
open science

Développements en électrochimiluminescence en vue d'imager la perméabilisation membranaire de liposomes géants

Fatma Ben Trad

► **To cite this version:**

Fatma Ben Trad. Développements en électrochimiluminescence en vue d'imager la perméabilisation membranaire de liposomes géants. Chimie théorique et/ou physique. Université Paris sciences et lettres, 2023. Français. NNT: 2023UPSLE014 . tel-04877062

HAL Id: tel-04877062

<https://theses.hal.science/tel-04877062v1>

Submitted on 9 Jan 2025

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 DE DOCTORAT

DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à l'Ecole Normale Supérieure

**Développements en Electrochimiluminescence en vue
d'Imager la Perméabilisation Membranaire de Liposomes
Géants**

Soutenue par

Fatma BEN TRAD

Le 27 Février 2023

Ecole doctorale n° 388

**L'école doctorale de Chimie
Physique et Chimie**

Analytique de Paris Centre

Spécialité

**Chimie physique et chimie
Analytique**

Composition du jury :

Fabienne Burlina DR- CNRS – Sorbonne Université	<i>Président</i>
Laurent Bouffier DR CNRS ISM Bordeaux	<i>Rapporteur</i>
Florence Geneste DR CNRS Université de Rennes	<i>Rapporteur</i>
Neso Sojic PR – ENSMAC Bordeaux	<i>Examineur</i>
Sophie Griveau Maître de conférences Chimie ParisTech - PSL	<i>Examineur</i>
Eric Labbé PR Sorbonne Université	<i>Examineur (co-encadrant)</i>
Olivier Buriez DR CNRS-ENS	<i>Directeur de thèse</i>



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Rodolphe Vuilleumier, directeur du département de chimie et du laboratoire PASTEUR et Anne Boutin, l'ancienne directrice du département de chimie, de m'avoir accueilli pour que je puisse effectuer cette thèse.

Je ne sais pas si un remerciement suffit pour exprimer ma gratitude et ma reconnaissance à mon directeur de thèse, Olivier Buriez, qui est toujours présent pour m'accompagner et m'aider à avancer. Je ne sais pas aussi si les mots peuvent décrire toute l'énergie positive qu'il me transmet chaque jour avec son sourire et son sens de l'humour. Merci beaucoup Olivier d'avoir rendu cette thèse la plus agréable possible.

Je remercie chaleureusement Eric Labbé, mon co-encadrant de thèse pour sa disponibilité, ses conseils constructifs et le temps qu'il m'a consacré pour m'aider à mener, au mieux, ce travail.

J'adresse mes remerciements aussi aux membres de jury présents à ma soutenance pour avoir accepté de juger mon travail. Je remercie tout particulièrement, Docteur Laurent Bouffier de l'université de Bordeaux et Docteur Florence Geneste de l'université de Rennes, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Mes remerciements vont également au Docteur Sophie Griveau pour avoir accepté d'être examinatrice de cette thèse. Un immense merci au Professeur Neso Sojic et Docteur Fabienne Burlina d'avoir accepté d'être dans le jury de ma thèse en tant qu'examineurs et surtout d'avoir participé à l'avancement de ce projet par leurs conseils et compétences scientifiques.

Mes remerciements vont également au Docteur Stéphane Arbault pour sa rigueur scientifique et pour avoir suivi et participé à ce projet.

Je tiens à remercier Mathieu Morel de m'avoir aidé à développer la méthode de fabrication des liposomes par microfluidique et je remercie sincèrement Jérôme Delacotte pour sa disponibilité et pour ces compétences qui m'ont permis de mieux avancer.

Un grand remerciement à Frédéric Lemaitre et Manon Guille pour l'intérêt qu'ils portent à mon travail, leurs disponibilités pour suivre l'avancement de ma thèse et leurs compétences scientifiques.

Je souhaite adresser mes remerciements à Aurélie Pierret qui m'a consacré son temps pour me former à la déposition du graphène et à Ayako Yamada de m'avoir aidé à fabriquer des nouveaux dispositifs microfluidiques.

Un immense merci à Bixente Carré, mon stagiaire, pour tout l'énorme travail réalisé pendant un mois de stage et qui m'a permis d'avancer plus rapidement.

Un grand remerciement au Professeur Laurent Gaillon et Professeur Yannick Millot pour leurs aides pour les enseignements de TP à Sorbonne Université. Je profite aussi pour remercier tout le personnel des plateformes de TP.

Un chaleureux remerciement à Thomas de m'avoir accompagné pendant mes 4 ans dans le laboratoire et à l'extérieur du laboratoire, merci Thotho pour tous les moments, les soirées et les repas qu'on a partagés ensemble, merci pour ton soutien pendant les moments difficiles. Tout simplement, merci pour ta présence.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes que j'ai rencontré dans le laboratoire et qui ont participé à rendre cette thèse agréable : Aurélien, Justine, Yumeng, Thuvaraka, Karen et Reina.

Un remerciement spécial à Antoine et Aude et une pensée particulière à Léna.

Je souhaite exprimer mes sincères remerciements au Professeur Christian Amatore, à Laurent Thouin, Cathrine Sella, Alexander Oleinick et Irina Svir pour toutes les discussions et la bonne humeur dégagee.

Je remercie Xiaochen, Haoyue, et Boxin, mes collègues de bureau. Mes remerciements vont également à toute l'équipe de l'administration.

Enfin, je veux exprimer ma reconnaissance et mon amour à ma mère pour son soutien et ses efforts pour m'aider à avancer et j'offre cette thèse à mon père et je lui dis que je pense toujours à lui.

Sommaire

Liste des abréviations.....	1
Introduction Générale.....	7
1- Premier chapitre – Etat de l’art sur la méthodologie mise en œuvre (électrochimiluminescence) et sur les objets étudiés (liposomes géants).....	15
I. Introduction.....	15
II. L’électrochimiluminescence : histoire, fondamentaux et applications.....	15
1. Rappels sur les différents phénomènes à l’origine de l’émission de lumière (la luminescence).....	16
2. L’électrochimiluminescence.....	18
3. Mécanismes de l’électrochimiluminescence.....	19
3.1. Approche dite « d’annihilation ».....	20
3.2. Approche par co-réactif.....	21
4. Applications.....	28
III. Les liposomes : généralités et applications.....	34
1. Introduction.....	34
2. Composition des liposomes : les phospholipides.....	35
3. Classification des liposomes.....	41
4. Différentes méthodes de préparation et d’encapsulation dans les liposomes.....	42
4.1. Electroformation.....	43
4.2. Méthode de transfert de phase.....	44
5. Différentes applications des liposomes.....	45
5.1. Applications thérapeutiques : vectorisation de médicaments.....	45
5.2. Applications biochimiques et modèles biophysiques.....	46
5.3. Utilisation dans les produits cosmétiques.....	47

5.4. Utilisation dans l'industrie alimentaire.....	48
IV. Conclusion.....	48
2- Deuxième chapitre – Développement d'une méthodologie d'électrochimiluminescence pour imager l'ouverture de liposomes géants	51
I. Contexte de l'étude.....	51
II. Préparation des liposomes : encapsulation des réactifs et stabilité.....	52
1. L'osmolalité : généralité et calcul	53
2. Choix de phospholipides.....	54
3. Fabrication de liposomes.....	54
3.1. Préparation de l'émulsion : formation de la première monocouche.....	55
3.2. Formation de la deuxième monocouche	56
4. Visualisation des liposomes.....	56
III. Effet du matériau d'électrode sur la réponse électrochimique des espèces électroactives.....	58
1. Les matériaux utilisés pour la fabrication des électrodes.....	58
1.1. Les matériaux carbonés : les plus compatibles avec l'ECL.....	58
1.2. Electrode en ITO	59
2. Comportement électrochimique du luminophore.....	59
3. Comportement électrochimique du co-réactif.....	62
4. Détection synchronisée du courant d'oxydation et du signal luminescent	64
IV. Détection électrochimique de l'évènement de l'ouverture à la surface d'une électrode polarisée.....	66
1. Cellule électrochimique utilisée pour la détection de l'ouverture du liposome et expérience réalisée.....	66
2. Résultats obtenus suite à la perméabilisation de la bicouche lipidique	67
2.1. Mise en évidence électrochimique de la perméabilisation de liposomes ne contenant que du sucrose dans du PBS.....	67

2.2.	Détection électrochimique de l'évènement d'ouverture des liposomes contenant le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et la TPrA	68
3.	Etude statistique	75
V.	Triple détection de l'évènement d'ouverture des liposomes : couplage de l'électrochimie, de la photoluminescence et de l'électrochimiluminescence.....	77
1.	Dispositif utilisé pour coupler les trois techniques	77
2.	Acquisition et collections des informations.....	79
3.	Résultats et interprétation : étude visuelle et quantitative	80
3.1.	Etude visuelle.....	80
3.2.	Etude quantitative	81
VI.	Caractérisation de la dispersion du luminophore par électrochimiluminescence.....	82
VII.	Conclusion.....	84
3-	Troisième chapitre – Perméabilisation de liposomes géants imagée par électrochimiluminescence négative (i.e., par contraste optique négatif).....	87
I.	Introduction.....	87
II.	Contexte bibliographique.....	87
III.	Perméabilisation membranaire de liposomes géants imagée par contraste optique négatif.....	90
1.	Stratégie – Hypothèse de départ	90
2.	Choix de conditions expérimentales appropriées.....	91
3.	Imagerie – Résultats	92
3.1.	En absence de liposomes	92
3.2.	En présence de liposomes contenant une solution de sucrose.....	94
3.3.	Caractérisation de la dispersion de la solution encapsulée et de la diffusion des réactifs	97
3.4.	En présence de liposomes contenant un quencher	99
IV.	Conclusion.....	101

4- Quatrième chapitre – Imagerie ECL de la perméabilisation de la membrane lipidique de liposomes géants par des peptides anti-microbiens ou pénétrants	105
I. Introduction et contexte.....	105
II. Propriétés structurales des peptides antimicrobiens et interactions avec les membranes lipidiques	107
1. Aspects structuraux.....	107
1.1. Mécanismes conduisant à la formation de pores membranaires	108
2. Approches/Méthodologies décrites pour l'étude de la perméabilisation membranaire de liposomes géants par des peptides anti-microbiens	111
III. Imagerie par électrochimiluminescence de la perméabilisation membranaire de liposomes géants par un peptide antimicrobien : la mélittine.....	114
1. Choix des conditions expérimentales.....	114
2. Combinaison de photoluminescence (PL) et d'électrochimiluminescence (ECL) pour imager la perméabilisation de la membrane lipidique de liposomes géants par la mélittine.....	118
3. Combinaison photoluminescence (PL) et électrochimiluminescence (ECL) pour imager la perméabilisation de la membrane lipidique de liposomes géants par des peptides pénétrants.....	127
IV. Conclusion.....	129
5- Cinquième chapitre – ECL issue de la réalisation d'une réaction enzymatique au sein de liposomes.....	133
I. Introduction et contexte.....	133
II. Etude bibliographique	134
1. Rôle du NADH dans le métabolisme cellulaire et les différentes méthodes de sa détection.....	134
2. Utilisation de liposomes comme bioréacteurs.....	135
III. Résultats / Discussions.....	137

1. Etude électrochimique de la formation du NADH provenant de la dégradation du glucose.....	137
2. Mise en évidence d'un signal d'électrochimiluminescence combinant le complexe [Ru(bpy) ₃] ²⁺ et le NADH comme co-réactif.....	141
3. Mise en évidence, par imagerie ECL, de la présence de NADH authentique à l'intérieur d'un liposome	142
4. Mise en évidence par imagerie ECL de la formation de NADH issu de l'oxydation enzymatique du glucose à l'intérieur d'un liposome.....	146
IV. Conclusion.....	150
Conclusion Générale & Perspectives.....	153
Partie expérimentale	159
I. Préparation des dispositifs.....	159
1. Fabrication de la cellule électrochimique utilisée pour la détection de la perméabilisation de la bicouche lipidique.....	159
2. Préparation des cellules électrochimiques utilisées pour la caractérisation électrochimique des espèces électroactives	160
3. Dépôt de l'ITO et du graphène sur une lame de verre	161
3.1. Le graphène.....	161
3.2. Fabrication de l'électrode d'ITO (ITO préparé au laboratoire).....	164
4. Préparation de dispositif microfluidique.....	165
II. Préparation des liposomes	167
1. Préparation des solutions nécessaires pendant l'étape de la fabrication des liposomes.....	167
1.1. Solution lipidique en phase organique.....	167
1.2. Préparation des solutions intra et extra-vésiculaires.....	168
1.3. Etape de la fabrication des liposomes.....	169
III. Fabrication des peptides.....	171

IV. Déroulement des expériences.....	173
1. La caractérisation électrochimique	173
2. L'étude par électrochimiluminescence.....	173
3. La détection de la perméabilisation de la bicouche lipidique.....	173
Liste des figures	179
Liste des tableaux	191
Bibliographie.....	195

Liste des abréviations

AA	Acide Aminé
AcOH	Acide acétique
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
Ala ou A	Alanine
AMP	AntiMicrobial Peptide pour peptide antimicrobien
Arg ou R	Arginine
Asn ou N	Asparagine
Asp ou D	Aspartate
B	Biotine
BLM	Bilayer Lipid Membrane pour bicouche lipidique
Bpy	2,2-bipyridine
CE	Contre Electrode
CNT	Carbon Nano-Tube pour nanotube de carbone
CPP	Cell Penetrating Peptide pour peptide pénétrant
CRP	C Reactive Protein
Cys ou C	Cystéine
DOPC	1,2-di-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine
DOPG	1, 2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)
DOTAP	1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane
DPPE-NBD	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)

ECL	ElectriChimiLuminescence
FcMeOH	Ferrocène Méthanol
GDH	Glucose Déshydrogénase
GFP	Green Fluorescent Protein
Gln ou Q	Glutamine
Glu ou E	Glutamate
Gly ou G	Glycine
GUV	Giant Unilamellar Vesicles pour les vésicules unilamellaires géantes
His ou H	Histamine
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
Ile ou I	Isoleucine
ITO	Indium Tin Oxide
L	Liposome
Leu ou L	Leucine
LUV	Large Unilamellar Vesicles pour vésicules unilamellaires de grande taille
Lys ou K	Lysine
M	Microbilles magnétiques
Met ou M	Méthionine
MLV	Multi Lamellar vesicles pour vésicules multilamellaires
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
NAD⁺	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NBD	7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole
PBD	Phosphate Buffer Saline

PDMS	Polydiméthylsiloxane
pH	potentiel Hydrogène
Phe ou F	Phénylalanine
Pro ou P	Proline
RIE	Reactive Ion Etching
S	Stréptavidine
SECL	Shadow ECL
Ser ou S	Sérine
SUV	Small Unilamellar Vesicles pour vésicules unilamellaires de petite taille
Thr ou T	Thréonine
Trp ou w	Tryptophane

Introduction générale

Introduction Générale

L'idée d'associer l'électrochimie et la luminescence date du début des années 1990 avec des travaux initiés par des électrochimistes de renom comme A.J. Bard aux USA [1], R.G. Compton au Royaume-Uni [2], mais aussi C. Amatore en France [3]. Une quinzaine d'années plus tard, un réel essor est observé avec le développement de nombreux travaux de recherche dédiés à l'électrochimiluminescence (ECL), allant de l'électrofluorochromisme aux instruments d'analyse en passant par les études mécanistiques. en vue d'applications dans des domaines aussi variés que la chimie analytique, la physique et la biologie [4].

L'équipe dans laquelle j'ai réalisé mon travail de thèse s'intéresse depuis quelques années au développement de méthodologies originales combinant l'électrochimie et la luminescence pour apporter une dimension analytique et idéalement quantitative à des processus mettant en jeu notamment le passage transmembranaire de biomolécules ou la perméabilisation de membranes lipidiques.

A mon arrivée sur ce projet de thèse, l'équipe s'intéressait déjà à la problématique de la caractérisation du passage de molécules à travers des membranes lipidiques. La détection électrochimique n'offrant pas une sensibilité suffisante, les méthodologies ont évolué dans le sens d'une association de l'électrochimie à la fluorescence. Plus concrètement, elles se sont attachées à contrôler l'émission de fluorescence par électrochimie, grâce à l'utilisation de fluorophores possédant des propriétés rédox. Le schéma ci-dessous illustre cette évolution :

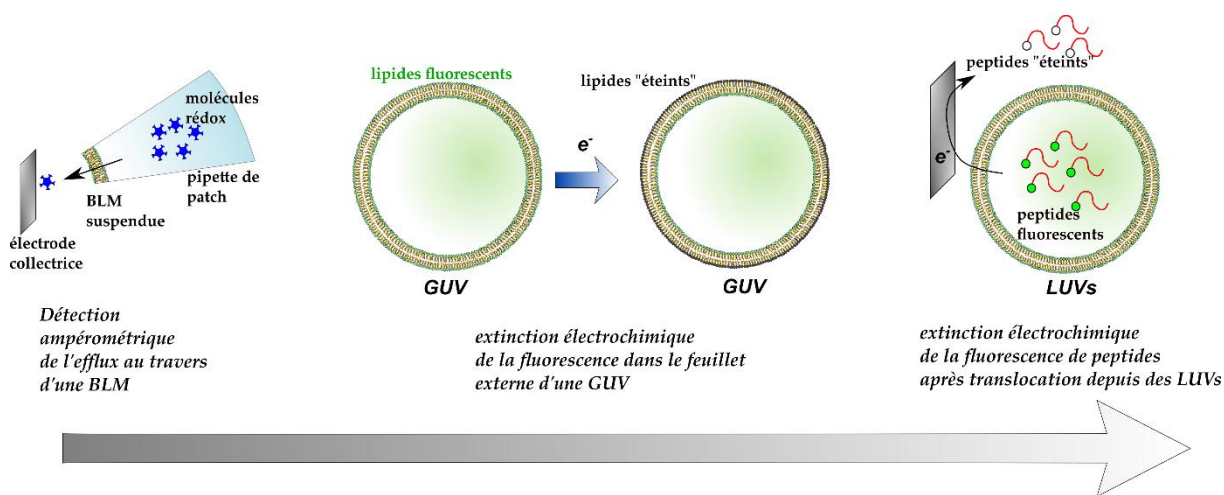


Figure 1: Evolution des approches associant électrochimie et luminescence (fluorescence) permettant d'étudier le passage transmembranaire de biomolécules ou de distinguer les propriétés physico-chimiques des deux feuillet d'une bicouche lipidique.

Dans cette thématique générale, des approches permettant de quantifier la fraction de peptides pénétrants (CPP pour "Cell Penetrating Peptide" en anglais) ayant traversé la membrane de vésicules nanométriques a pu être développée grâce à l'extinction électrochimique de la fluorescence des peptides situés à l'extérieur des vésicules [5]. Une approche similaire d'extinction électrochimique de la fluorescence a permis de discriminer les deux feuillet d'une bicouche lipidique de liposomes micrométriques (GUV) permettant ainsi de distinguer les propriétés physico-chimiques de chacun des deux feuillet comme, par exemple, le coefficient de diffusion des phospholipides. [6].

Les résultats obtenus dans ce cadre ont incité l'équipe à développer ensuite une méthodologie permettant d'imager en temps réel la perméabilisation de membranes lipidiques. La stratégie utilisée jusqu'alors en présence de membranes lipidiques s'attachait à mesurer l'intensité de fluorescence de molécules consécutif à la « sortie » des molécules fluorescentes d'un espace de volume réduit (une vésicule) à un volume extérieur beaucoup plus grand, avec l'effet de dilution associé. Cette approche ne paraissait pas pertinente en termes de sensibilité. Dans le but de gagner en sensibilité, l'idée a donc été de remplacer la fluorescence par un autre type de luminescence : l'électrochimiluminescence (abréviation ECL) ou chimiluminescence électrogénérée. Comparée à la fluorescence, l'électrochimiluminescence permet de gagner en sensibilité car aucune source de lumière excitatrice extérieure n'est nécessaire conduisant ainsi à un meilleur rapport signal/bruit. Plus particulièrement, en ECL, l'émission de lumière est

initiée par un transfert d'électron se produisant à la surface d'une électrode. Cette technique, est également intéressante par le caractère hétérogène des réactions électrochimiques, mettant en jeu une réaction exclusivement à la surface d'une électrode, permettant d'établir une discrimination entre les réactifs ECL localisés à l'électrode et ceux confinés dans d'autres compartiments du système étudié. Dans la majorité des travaux développés jusqu'à présent, et comme décrit dans le chapitre bibliographique de ce manuscrit (Chapitre 1), un luminophore (ex. $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$) est utilisé en combinaison avec un co-réactif sacrificiel (ex. tri-*n*-propylamine). Dans une première étape, les deux réactifs sont oxydés à la surface d'une électrode. Les espèces électrogénérées réagissent ensuite ensemble via une réaction chimique exergonique conduisant le luminophore à un état excité. Enfin, le retour à l'état fondamental du complexe de coordination conduit à l'émission d'un photon et à la régénération du luminophore de départ (Figure 2).

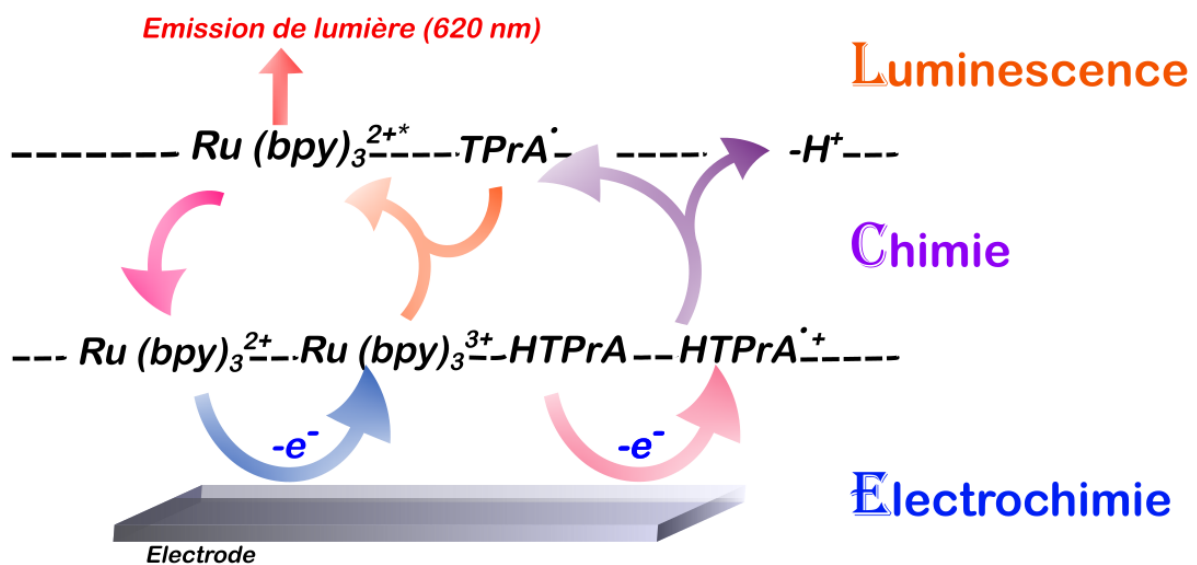


Figure 2 : Principe de l'électrochimiluminescence basée sur l'oxydation concomitante d'un luminophore et d'un co-réactif sacrificiel.

Me basant sur le mécanisme décrit dans la Figure 2, mon premier objectif a été de développer une méthodologie permettant d'imager par ECL, en temps réel, la perméabilisation de membranes de liposomes géants (Chapitre 2). Pour ce faire, un premier défi a été d'encapsuler à la fois le luminophore et le co-réactif à l'intérieur de liposomes micrométriques. Suite à cela, j'ai pu démontrer que la mise en contact de ce type de liposomes avec une électrode polarisée permet de perméabiliser la membrane lipidique et de libérer son contenu (Figure 3) qui, au

contact de l'électrode, subit un processus d'oxydation générant un signal lumineux selon le mécanisme décrit dans la Figure 2 .

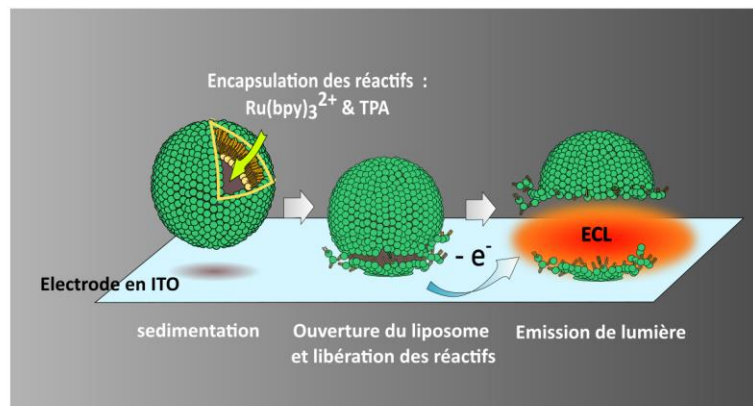


Figure 3 : Description de l'approche permettant d'imager la perméabilisation membranaire d'un liposome géant par électrochimiluminescence.

Ce premier travail a révélé que le point de contact entre le liposome et l'électrode se matérialise par une tâche noire circulaire du fait du blocage de l'électrode par les lipides. Cette observation expérimentale nous a conduit à développer une approche inverse de celle décrite dans le chapitre précédent et consistant à imager les zones non-luminescentes associées à la perméabilisation membranaire de liposomes. Par analogie à la photographie, on peut parler d'ECL négative (ou "shadow ECL" (SECL)) par comparaison à l'ECL positive (production de lumière). Pour ce faire, le luminophore et le co-réactif ont été directement mis en solution (et non plus encapsulés dans les liposomes) de façon à générer de la lumière sur toute la surface de l'électrode dès que cette dernière était polarisée. Dans ces conditions, nous avons pu montrer que la mise en contact d'un liposome avec la surface d'une électrode sous polarisation génère une tâche noire dont la taille grandit à mesure que la solution intra-vésiculaire s'écoule (du fait de la perméabilisation) vers le milieu luminescent extra-vésiculaire. En outre, nous avons pu montrer que ce phénomène est d'autant plus marqué que le liposome contient un extincteur de luminescence.

Suite aux développements méthodologiques présentés dans les Chapitres 2 et 3, notre objectif a été ensuite de les valoriser au travers d'applications bio-analytiques.

Tout d'abord, dans le Chapitre 4 nous montrerons comment la génération de lumière peut être directement reliée à la perméabilisation de la membrane de liposomes géants par des peptides

anti-microbiens (AMP pour "Anti-Microbial Peptides en anglais) dont l'intérêt ne cesse de croître en raison de l'espoir qu'ils suscitent pour lutter contre la résistance aux antibiotiques.

Enfin, dans le Chapitre 5, nous montrerons que l'approche par ECL positive peut également servir à analyser indirectement une réaction-modèle du vivant ayant eu lieu en milieu confiné. Plus précisément, nous montrerons comment l'approche ECL a pu être utilisée pour mettre en évidence la réduction du NAD^+ en NADH , catalysée par l'enzyme glucose déshydrogénase, à l'intérieur de liposomes géants. Dans ce cas, le principal défi a été la préparation de liposomes stables contenant l'enzyme, le co-enzyme (NAD^+), le substrat (glucose), et le luminophore ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$). Dans ces conditions, la production de NADH à l'intérieur des liposomes a pu être révélée par ECL après perméabilisation de leurs membranes. En effet, le NADH produit lui permet de jouer le rôle de co-réactif ECL et d'être, par conséquent, à l'origine d'un signal luminescent.

**Premier chapitre – Etat de
l’art sur la méthodologie
mise en œuvre
(électrochimiluminescence)
et sur les objets étudiés
(liposomes géants)**

1- Premier chapitre – Etat de l’art sur la méthodologie mise en œuvre (électrochimiluminescence) et sur les objets étudiés (liposomes géants)

I. Introduction

L’objectif central du travail présenté dans ce manuscrit est la mise au point d’une méthode d’électrochimiluminescence (ECL) pour imager la perméabilisation de membranes de liposomes micrométriques. Le choix de mettre en œuvre une technique d’ECL et de privilégier les liposomes plutôt que d’autres architectures lipidiques se fonde sur plusieurs propriétés spécifiques à cette technique et à ces objets, dont nous allons exposer les points saillants dans la suite de ce chapitre.

Nous allons dans un premier temps présenter l’origine et l’évolution du concept d’électrochimiluminescence, puis rappeler les propriétés des liposomes pour souligner les possibilités qu’offre l’implémentation de l’ECL dans la mise en évidence de la perméabilisation des liposomes.

II. L’électrochimiluminescence : histoire, fondamentaux et applications

La chimiluminescence électrogénérée ou électrochimiluminescence (ECL) est une technique analytique basée sur la détection de la lumière générée suite à une réaction électrochimique initiée à la surface d’une électrode polarisée.

Dans ce projet, nous avons eu recours à cette technique parce qu’elle associe la sélectivité de l’électrochimie à la sensibilité de la luminescence. Cette association fait de l’électrochimiluminescence une méthode puissante capable de croiser deux types de signaux : i) un courant d’origine faradique et ii) une émission lumineuse. Nous verrons tout l’intérêt de cette double détection dans la suite du manuscrit.

1. Rappels sur les différents phénomènes à l'origine de l'émission de lumière (la luminescence)

La luminescence, découverte en 1888 par Eilhard Wiedemann, se définit comme l'émission d'un rayonnement électromagnétique qui n'est pas d'origine thermique. [7] Elle se déroule en deux phases : une phase d'excitation suivie par une phase de relaxation matérialisée par l'émission de photons.

Chaque typologie de luminescence possède son mode d'excitation propre et son domaine d'application, comme le résume le Tableau 1 :

Tableau 1: Définitions des différents types de luminescence et exemples de leurs applications.

Type de luminescence	Mode d'excitation	Applications
Photoluminescence	L'excitation est la conséquence d'un évènement d'absorption de photons (Interaction matière – Lumière).	Analyses bio-médicales [8] Analyses chimiques et physico-chimiques [9].
Radioluminescence	Excitation des atomes ou des molécules par absorption de rayons X ou de particules de haute énergie comme les rayonnement α , β et γ (Interaction matière – rayonnement ionisant).	Diagnostic médical : surveillance de la radiothérapie [10].
Cathodoluminescence	L'état excité est issu de l'interaction d'électrons accélérés avec la matière (Interaction matière – électron).	Domaine de la géologie et plus précisément la branche minéralogie [11].

Electroluminescence	L'excitation est la conséquence d'une interaction de la matière avec un champ électrique.	Ce type de luminescence est utilisé dans l'éclairage des vaisseaux spatiaux [12].
Chimiluminescence	Génération de l'état excité des molécules par une réaction chimique.	Diagnostic médical et criminologie [13].
Bioluminescence	L'état excité est la conséquence d'une réaction chimique catalysée par une enzyme dans un organisme vivant.	Domaine de la biomédecine : thérapie photodynamique et contrôle des neurones [14].
Triboluminescence	Dans ce type de luminescence, l'émission de la lumière est due à un frottement ou cassure de la matière.	Capteurs de fissures et de dégâts dans la construction industrielle [15].
Sonoluminescence	Lumière émise suite à la soumission de bulles à des ondes acoustiques.	Sonochimie [16].
Thermoluminescence	Emission de la lumière consécutive à une irradiation thermique.	Domaine de la datation archéologique et géologique. [17]
Electrochimiluminescence	Emission de lumière obtenue suite à une réaction électrochimique.	Diagnostic médical (voir paragraphe application de l'électrochimiluminescence).

2. L'électrochimiluminescence

L'électrochimiluminescence (ECL) ou chimiluminescence électrogénérée est donc une émission de lumière observée suite à une réaction électrochimique initiée à la surface d'une électrode polarisée.

Pour comprendre l'intérêt de l'ECL dans une problématique analytique, il est intéressant de rappeler succinctement son histoire.

L'apparition de l'électrochimiluminescence remonte aux années 1920. Elle a été observée pour la première fois en 1927 au cours d'une réaction d'électrolyse des organomanésiens mixtes, appelés également les composés de Grignard, dans un milieu anhydre, par Dufford et al. [18]. En 1929, Harvey a démontré que l'émission de lumière au cours d'une électrolyse est observée aussi dans un milieu aqueux [19]. Après ces deux observations, ce phénomène d'émission de lumière par initiation électrochimique n'a été repris que dans les années 1960 où son mécanisme a été exploré, de l'excitation à l'émission. Les premières études ont été réalisées par Hercules [20] et Chandross [21] en 1964 qui ont constaté que les produits d'électrolyse d'hydrocarbures aromatiques comme le 9,10-diphenylanthracene (DPA), formellement notés R^+ et R^- , réagissent l'un avec l'autre selon :

$R^+ + R^- \rightarrow R + R^*$ où R^* représente la molécule photoexcitée qui se désexcite en émettant un photon.

L'électrochimiluminescence a réellement pris son essor en 1972 dans le groupe d'Allen Bard, lorsque le complexe de Tris (2,2'-bipyridine) ruthenium(II) s'est avéré générer de la lumière sous un balayage de potentiel [22].

En 1977, une nouvelle approche de la réaction d'ECL a été découverte, toujours dans l'équipe de Bard, basée sur l'utilisation d'un co-réactif, pour générer la lumière grâce à l'électro-oxydation simultanée de ce dernier et d'un luminophore [23]. Dix ans plus tard, les amines aliphatiques et en particulier la tri-*n*-propylamine se sont révélées être des co-réactifs plus efficaces [24] [25].

A partir des années 1990, l'ECL a commencé à être utilisée dans les tests biologiques, donnant lieu à l'émergence d'une instrumentation commercialisée, en 1994, par Roche Diagnostic [26].

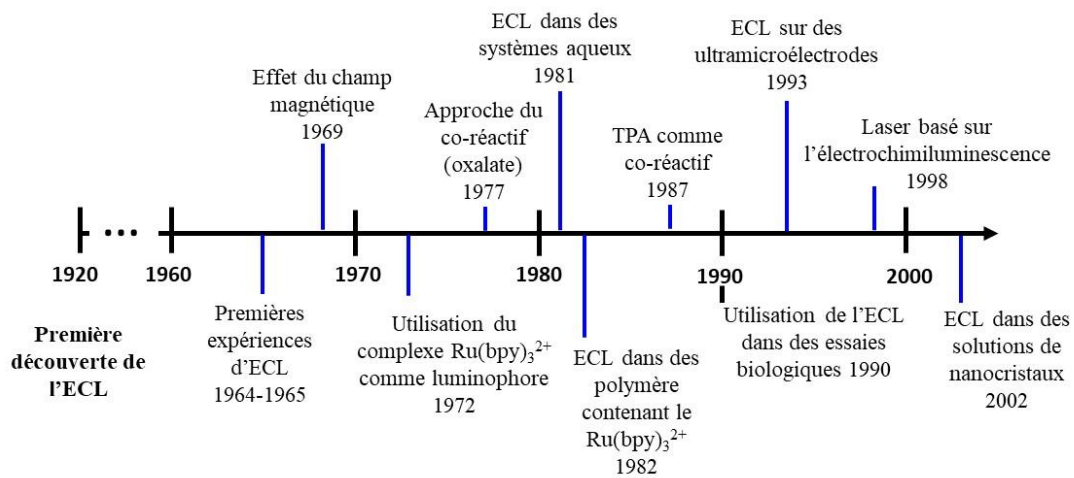


Figure 4 : Frise chronologique de l'évolution des expériences d'électrochimiluminescence au cours du temps inspiré de la référence [26].

Ainsi l'ECL, qui était à l'origine d'un phénomène physico-chimique assez « confidentiel » tend donc à devenir une méthode analytique en développement grâce à plusieurs qualités parmi lesquelles nous notons :

- (a) Le bon rapport signal/ bruit par rapport à la fluorescence lié à un mode d'excitation non-photonique : contrairement à la fluorescence, l'ECL ne nécessite pas une excitation par une source lumineuse ce qui permet d'avoir un bruit de fond très faible [27] ;
- (b) l'intensité de l'émission dépend de la concentration des réactifs engagés dans la réaction ;
- (c) il n'y a pas besoin d'utiliser une sonde fluorescente qui peut être spécifique pour chaque réactif ;
- (d) la bonne limite de détection qui peut atteindre des $\text{pg}/\mu\text{L}$;
- (e) le temps d'analyse court, la grande stabilité des réactifs et le faible volume d'échantillon qui sont des critères de base dans les applications biologiques ;

3. Mécanismes de l'électrochimiluminescence.

Le phénomène d'électrochimiluminescence résulte souvent d'une réaction entre une ou des espèces électrogénérées à la surface d'une électrode polarisée. Le produit instable formé se

désexcite en émettant un photon, le processus partant donc d'une réaction électrochimique pour aboutir à un évènement de nature radiative. [28]

Cette réaction de génération de lumière peut être obtenue selon différents modes que nous présentons dans le paragraphe suivant.

3.1. Approche dite « d'annihilation »

Cette approche repose sur la réaction entre une espèce oxydée et une espèce réduite à la surface d'une électrode consécutive à une impulsion alternée du potentiel appliqué à cette électrode.

Comme on le voit dans le mécanisme ci-dessous, une espèce A, en contact avec une électrode, génère deux types d'intermédiaires : un cation radicalaire $A^{\bullet+}$, produit d'une réaction d'oxydation, et un anion radicalaire $A^{\bullet-}$, obtenu par réduction. Ces deux espèces formées α réagissent ensemble pour générer l'état excité A^* qui va émettre de la lumière au cours de la relaxation.

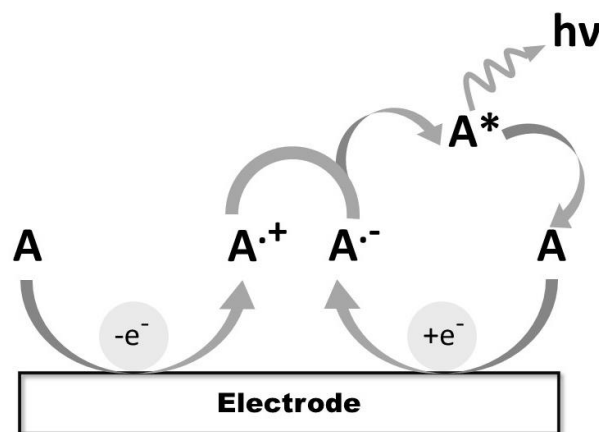
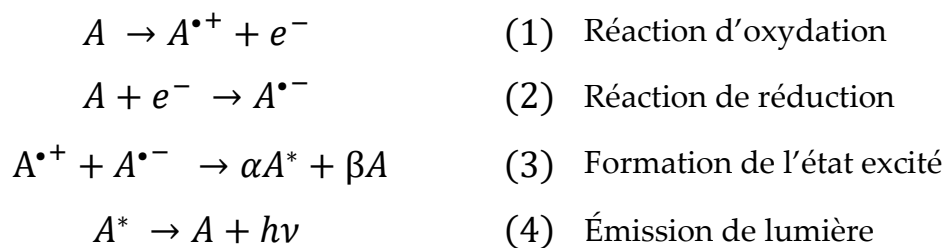


Figure 5 : Mécanisme d'électrochimiluminescence selon l'approche d'annihilation

Cette réaction peut également se produire dans des systèmes mixtes où le cation radicalaire et l'anion radicalaire proviennent de différentes molécules [29].

Au cours de la réaction de l'équation (3), le transfert d'électron entre les deux espèces électrogénérées est un processus favorisé par la thermodynamique de la réaction (l'enthalpie libre de cette réaction est négative $\Delta G^\circ \ll 0$) mais il est cinétiquement lent ($\Delta G^\circ < -\lambda$, λ est l'enthalpie libre standard de réorganisation). Dans ces conditions, la réaction d'annihilation et la formation de l'état excité (A^*) est spontanée. Ici, on parle de région inverse de Marcus que, au cours de laquelle, une réaction est d'autant plus lente que cette dernière est facilitée thermodynamiquement. L'électrochimiluminescence est un phénomène qui met en évidence la théorie de Marcus.

3.2. Approche par co-réactif

3.2.1. Définition

L'ECL, selon son approche du co-réactif, met en jeu l'utilisation d'un luminophore et d'un co-réactif pour lesquels l'état excité est issu de l'oxydation ou la réduction directe, à la surface de l'électrode, d'au moins l'un des réactifs. Le co-réactif utilisé dans cette approche est une espèce qui, suite à une réduction ou oxydation, produit un intermédiaire réactif qui peut réagir avec le luminophore pour générer l'état excité [28].

Nous devons faire remarquer que, dans cette approche, nous n'avons pas besoin d'une polarisation par impulsion alternée du potentiel ce qui présente un avantage par rapport à l'approche d'annihilation car cela nous permet de travailler dans des solvants possédant une fenêtre de potentiel réduite ainsi que dans des solutions aqueuses non-désaérées.

Nous reviendrons plus loin sur ce point, mais signalons déjà que selon la nature du co-réactif, la réaction d'électrochimiluminescence peut être obtenue soit par oxydation du co-réactif à la surface de l'électrode [30], soit par sa réduction [31]. Il s'ensuit des réactions qui dépendent de plusieurs facteurs comme la concentration des réactifs et le potentiel d'oxydation.

3.2.2. Exemples de systèmes mettant en jeu un co-réactif

- $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+} / \text{Oxalate}$

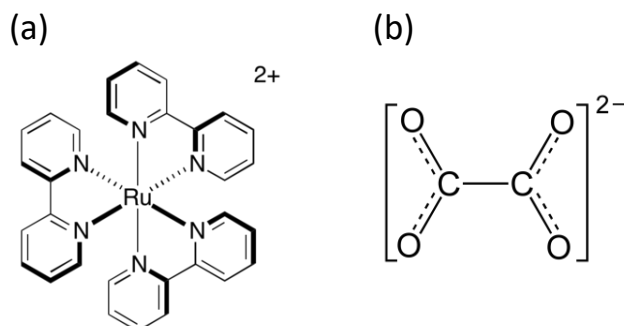
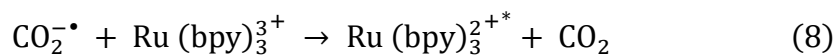
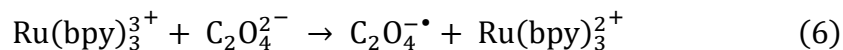
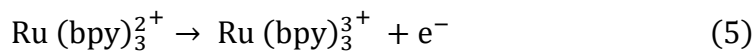


Figure 6 : Formules chimiques des deux réactifs engagés dans la réaction d'électrochimiluminescence le complexe de ruthénium (a) et l'oxalate (b).

L'oxalate est le premier co-réactif découvert et utilisé dans cette approche [32]. C'est un système dans lequel l'oxalate est oxydé en milieu aqueux pour former un radical qui réagit avec le luminophore oxydé pour générer l'état excité selon le mécanisme suivant :



- $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+} / \text{S}_2\text{O}_8^{2-}$

C'est un système qui met en jeu le peroxydisulfate comme co-réactif [33].

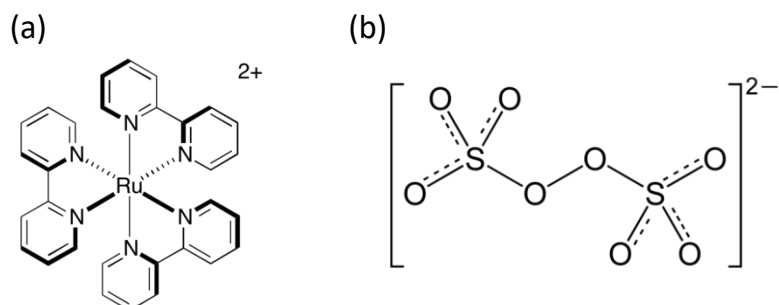
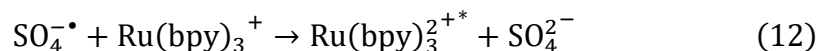
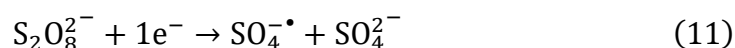


Figure 7 : Formules chimiques des deux réactifs engagés dans la réaction d'électrochimiluminescence : le complexe de ruthénium (a) et le peroxydisulfate (b).



- $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+} / \text{Tri-}n\text{-propylamine}$

La tri-*n*-propylamine est considérée comme un co-réactif important parce qu'elle permet de travailler dans des milieux aqueux et à un pH physiologique, ce qui explique son utilisation dans les applications biologiques.

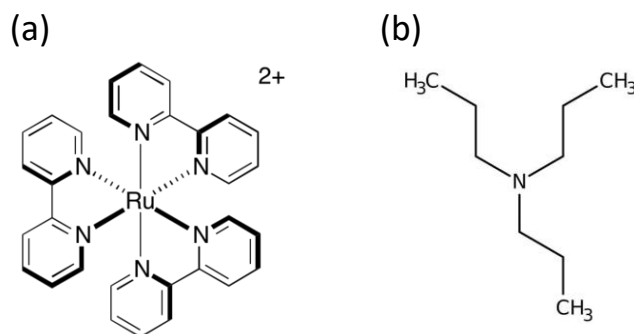


Figure 8 : Formules chimiques des deux réactifs engagés dans la réaction d'électrochimiluminescence : (a) le complexe de ruthénium et (b) la tri-*n*-propylamine.

Le luminophore de ce couple aussi est très utilisé dans le domaine biologique parce qu'il offre la possibilité de fonctionnalisation de ses ligands bipyridine par des agents biologiques comme

les anticorps. Cette combinaison est d'ailleurs appliquée dans plusieurs domaines, comme nous allons le voir dans la suite.

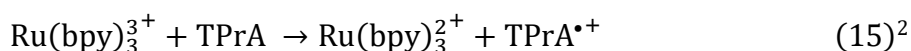
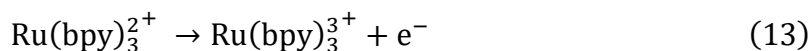
3.2.3. Mécanismes d'ECL du couple $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{Tri-}n\text{-propylamine}$

Le couple $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{tri-}n\text{-propylamine}$ est un système « oxydatif-réductif ¹ » dans lequel le co-réactif est oxydé pour former un intermédiaire qui réagit avec le luminophore pour générer l'état excité.

Comme nous l'avons mentionné, la concentration des réactifs et le potentiel d'oxydation déterminent le mécanisme aboutissant à l'état excité pour ce luminophore.

Le luminophore et le co-réactif sont oxydés à la surface de l'électrode

Dans ce mécanisme, l'état excité provient d'une oxydation simultanée du luminophore et du co-réactif à la surface de l'électrode polarisée. L'espèce formée de l'oxydation de l'amine est un intermédiaire qui libère un proton pour former un radical (TPrA•). Ce radical réagit avec le luminophore oxydé pour former l'état excité. Et lors du retour à l'état fondamental, le luminophore émet un photon à une longueur d'onde de l'ordre de 620 nm.



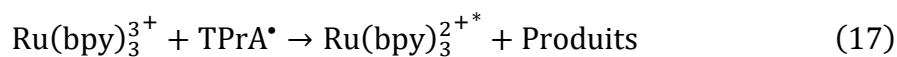
Réaction de déprotonation



¹ Un système « oxydatif-réductif » est un système au cours duquel le co-réactif est oxydé pour former un ion radicalaire.

² L'équation de la réaction (15) correspond à un autre mécanisme (seul le luminophore est oxydé à la surface de l'électrode) mais elle est présentée ici parce que la réaction peut avoir lieu si les deux espèces sont présentes, dans le milieu réactionnel.

Formation de l'état excité



Emission de la lumière

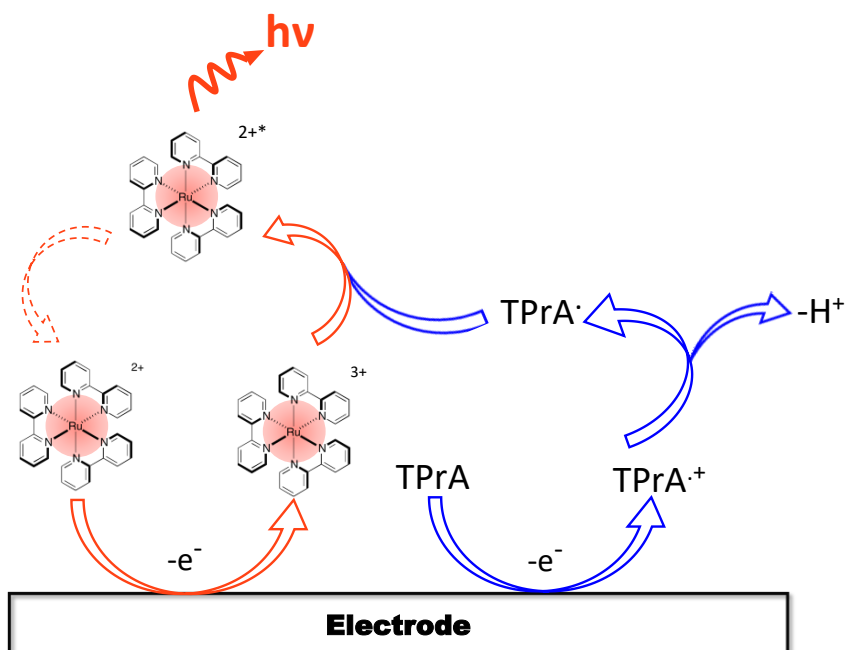
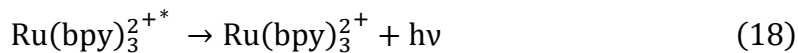
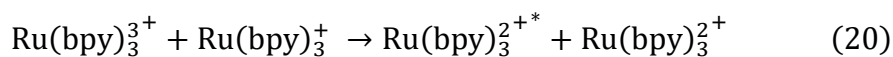
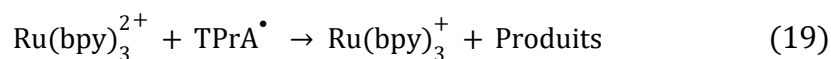


Figure 9 : Mécanisme d'électrochimiluminescence selon l'approche du co-réactif en utilisant le couple $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{Tri-}n\text{-propylamine}$ - Mécanisme 1.

Il faut mentionner qu'au cours de ce mécanisme, un autre chemin de génération de l'état excité est possible qui consiste à réduire $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ en $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^+$ par le radical cation formé. Cette étape est suivie par la génération de l'état excité selon un processus annihilation, comme le montre le mécanisme suivant :



Seul le co-réactif est oxydé à la surface de l'électrode

Dans plusieurs travaux, il a été montré que l'intermédiaire réactionnel issu de l'oxydation de l'amine tertiaire TPrA a une durée de demi vie estimée à 0,2 ms [34] ce qui le rend suffisamment stable pour jouer le rôle de médiateur rédox pour la génération de l'état excité, selon le mécanisme suivant :

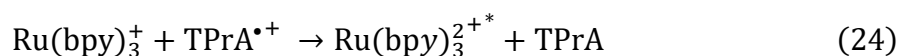
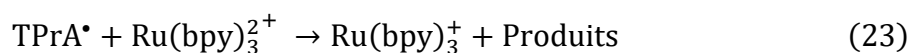
Réaction d'oxydation du co-réactif à la surface d'une électrode polarisée



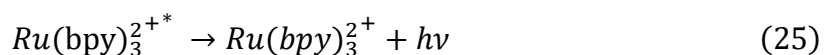
Réaction de déprotonation



Formation de l'état excité



Emission de la lumière



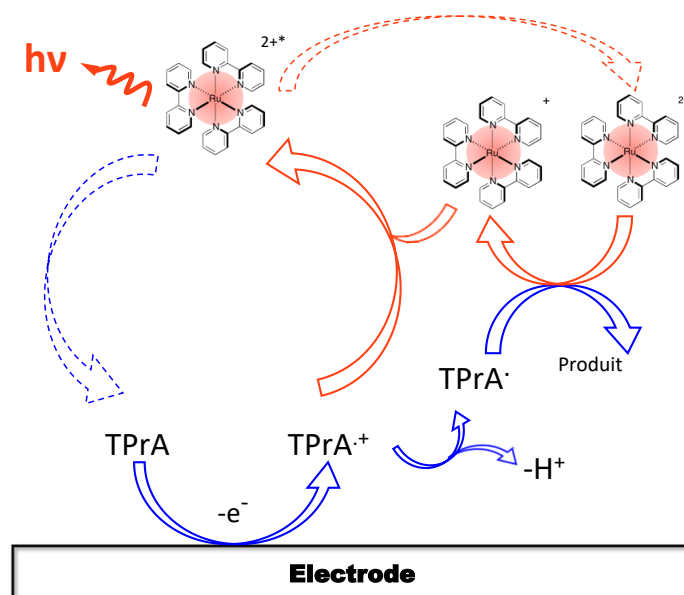
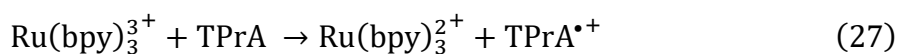
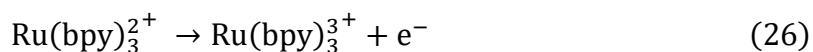


Figure 10 : Mécanisme d'électrochimiluminescence selon l'approche du co-réactif en utilisant le couple $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Tri-n-propylamine}$ - Mécanisme 2

Seul le luminophore est oxydé à la surface de l'électrode

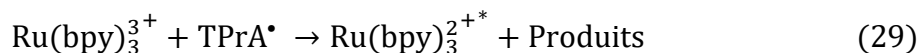
Un dernier mécanisme de la réaction d'électrochimiluminescence est proposé dans plusieurs travaux [34], mécanisme au cours duquel la formation du radical cation, responsable de la génération de l'état excité, est réalisée par transfert d'électron homogène par le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$ obtenu suite à l'oxydation de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à l'électrode.



Réaction de déprotonation



Formation de l'état excité



Emission de la lumière

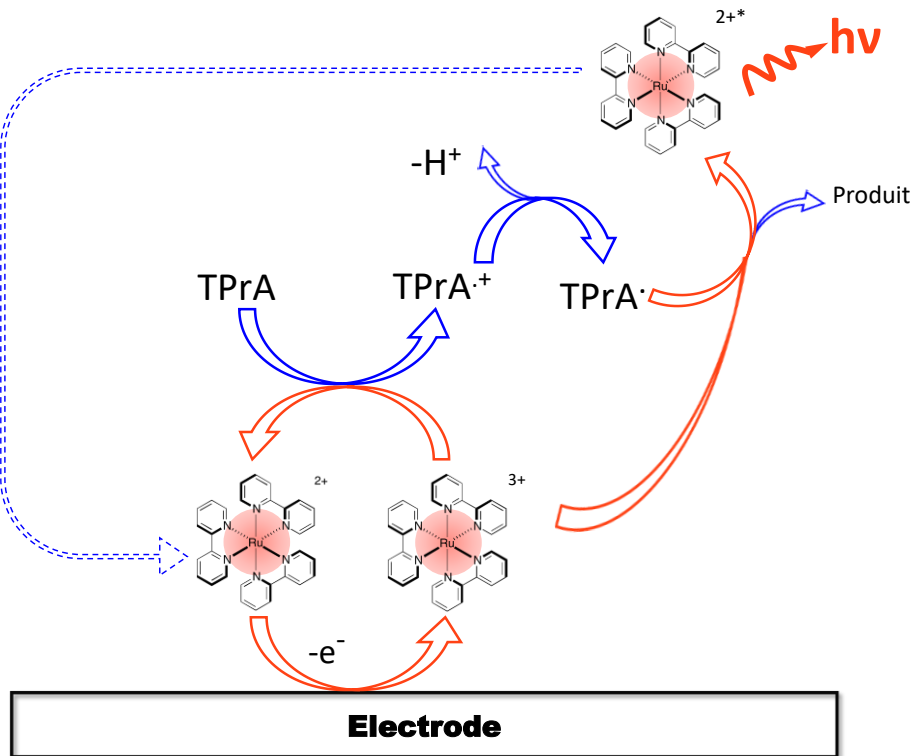
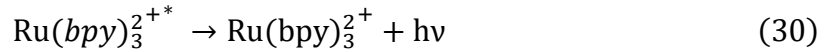


Figure 11 : Mécanisme d'électrochimiluminescence selon l'approche du co-réactif en utilisant le couple $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{Tri-}n\text{-propylamine}$ - Mécanisme 3

4. Applications

Comme nous venons de le voir, l'électrochimiluminescence, littéralement définissable comme la génération électrochimique d'un évènement de luminescence, permet d'envisager d'associer de l'imagerie à une mesure de courant faradique.

Elle offre à ce titre deux types d'information dont la superposition permet de délimiter l'évènement de luminescence dans le temps et de le quantifier du point de vue faradique. D'autre part et comme nous l'avons déjà mentionné, cette méthode offre un meilleur rapport signal/bruit que par exemple la fluorescence, du fait d'une génération de la lumière dans un milieu sombre.

Comme nous pouvons le voir sur la Figure 12, l'utilisation de l'électrochimiluminescence pour faire de l'imagerie n'a commencé qu'en 1987 [35], vingt ans après les premières expériences d'ECL.

Au début, l'imagerie ECL a été utilisée pour analyser les surfaces d'électrodes et elle a continué à évoluer en termes de résolution jusqu'à l'observation d'objets microscopiques, notamment de la dimension de cellules vivantes, cette propriété constituant le socle de mon travail de thèse.

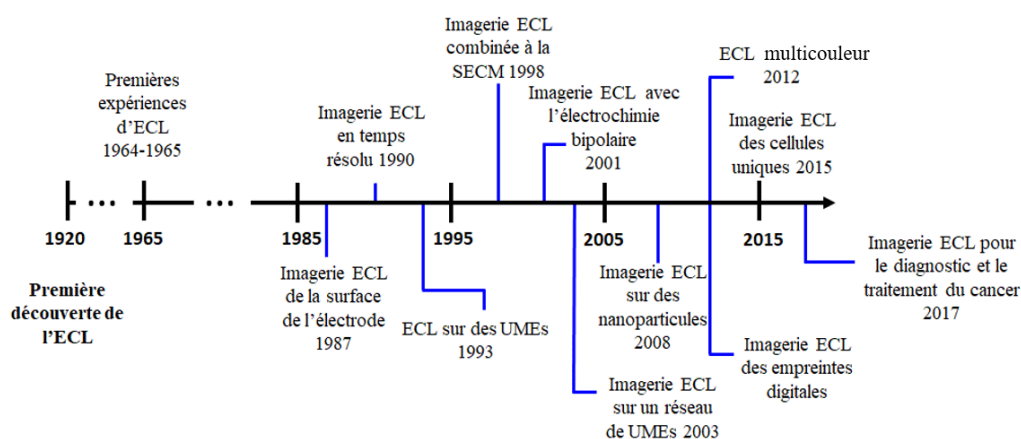


Figure 12 : Frise chronologique de l'évolution de l'imagerie en électrochimiluminescence au cours du temps [36]

Dans ce paragraphe, nous allons donner quelques exemples de l'utilisation de l'imagerie ECL dans des différents domaines.

Imagerie dans le domaine de l'analyse biologique

L'électrochimiluminescence a été utilisée, en 2007, par A. Bard pour le dosage d'une protéine humaine, la CRP (C Reactive Protein) [37]. Dans cet exemple, la mesure de l'intensité de lumière générée suite à une réaction d'ECL permet de quantifier la CRP, cette dernière étant associée au fluorophore, comme schématisé ci-dessous, grâce à un système streptavidine-biotine qui constitue un lien très solide pour accrocher des biomolécules. La force de ce système est dû à la grande affinité de la streptavidine pour la biotine, qui peut être complexée à plusieurs molécules biologiques (Figure 13).

Cette association entre le système streptavidine-biotine et les réactifs ECL a facilité l'utilisation de l'ECL dans les diagnostics médicaux par les laboratoires d'analyses.

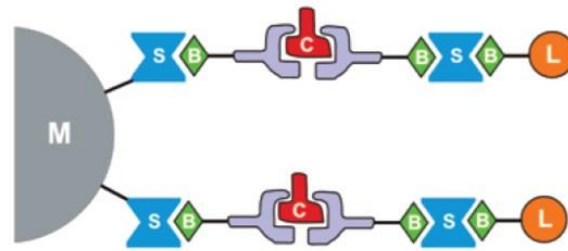


Figure 13 : Forme sandwich de l'immunodosage de la protéine humaine CRP composé par : B, biotine; L, liposomes; S, streptavidine; C, protéine (analyte); et M, microbilles magnétiques [37].

L'électrochimiluminescence permet d'imager des cellules vivantes dans l'objectif de comprendre des phénomènes biologiques et aussi de réaliser des tests immunologiques pour identifier des maladies graves [36].

L'ECL a été utilisée pour analyser des lipides comme le cholestérol, intermédiaire fondamental dans la régulation hormonale et métabolique, [38] dans la membrane plasmique. elle a permis de suivre l'activation de ce lipide sur les membranes cellulaires et de mettre en évidence l'hétérogénéité cellulaire associée aux différents phénomènes d'activation du cholestérol membranaire [39].

La figure ci-dessous montre un exemple d'étude de l'activation du cholestérol, par électrochimiluminescence en utilisant le peroxyde d'hydrogène et le luminol comme couple de réactifs.

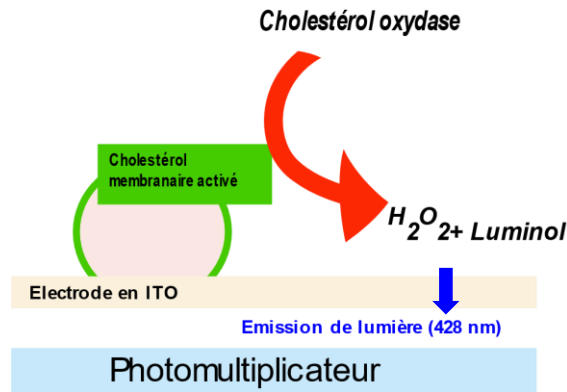


Figure 14 : Utilisation du luminol pour l'analyse du cholestérol de la membrane plasmique de la cellule. Le peroxyde d'hydrogène est un produit de l'oxydation du cholestérol membranaire en présence de l'enzyme cholestérol oxydase. La réaction d'ECL du couple H_2O_2 /Luminol génère de la lumière bleue à 428 nm (Schéma reproduit de la référence [40]).

Dans le même contexte, un surdosage d'un marqueur tumoral protéique dans l'organisme pourrait être une indication précoce de la présence d'un cancer. En outre, ce taux de protéine peut être estimé par plusieurs techniques dont des tests immunologiques type ELISA d'immunoabsorption enzymatique utilisé par les laboratoires de biologie médicale, des dosages radio-immunologiques, des dosages par électrophorèse des protéines ou encore la spectrométrie de masse. Mais ces techniques présentent des limites et des désavantages (coût élevé, difficulté de multiplexage, la lenteur du dosage et la limite de détection).

Sur cette même problématique, une approche basée sur l'électrochimiluminescence (Figure 15) a été utilisée. Celle-ci a permis de doser les marqueurs tumoraux protéiques avec une simplicité de mesure et une bonne limite de détection (de l'ordre du pg/mL) [41].

Cette technique a attiré l'intérêt des laboratoires d'analyse comme Roche Diagnostics et Meso Scale discovery pour réaliser des tests immunologiques (anticorps SARS-CoV-2, les marqueurs de l'anémie, les maladies infectieuses, les soins de grossesse...).

Le principe général de ces immunoanalyses par ECL est présenté sur le schéma suivant :

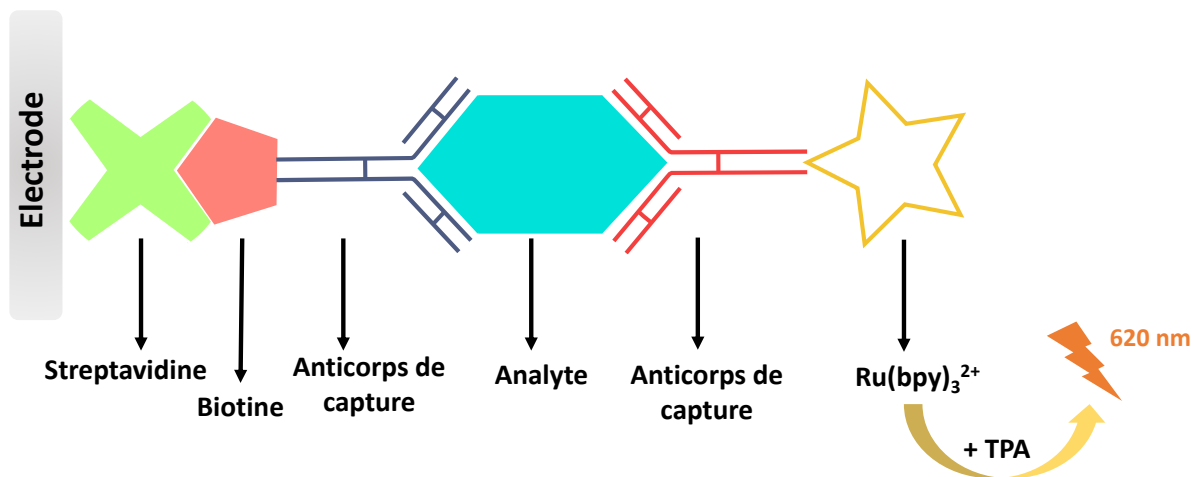


Figure 15 : Représentation de la méthode d'immunodosage par ECL basée sur une association Streptavidine- Biotine et anticorps- luminophore.

L'ECL pour imager les objets uniques

Les avantages de l'électrochimiluminescence ont permis son utilisation pour faire de l'imagerie à l'échelle des objets uniques [42] comme l'imagerie des nanoparticules d'un polymère conjugué qui, en présence d'un co-réactif, peut générer de la lumière [43].

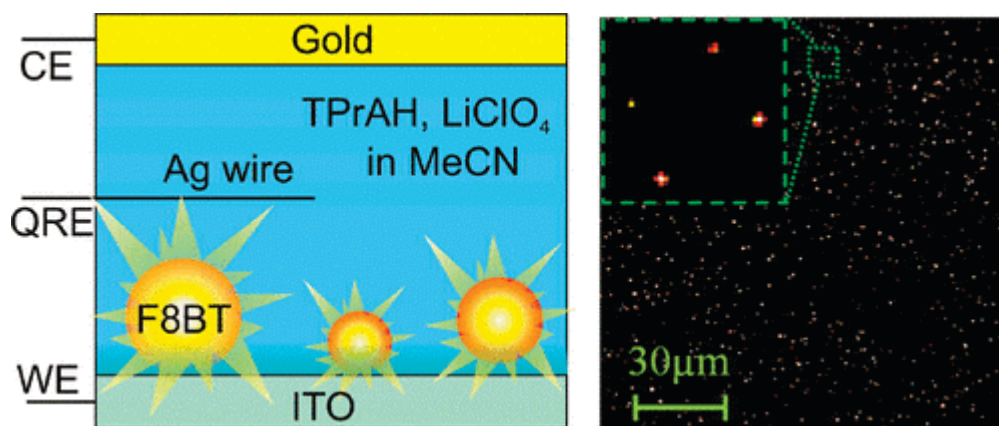


Figure 16 : La figure est issue de la référence [43]. Elle représente le dispositif utilisé pour imager les nanoparticules de polymère conjugué F8BT (à gauche) et le résultat obtenu suite à une émission de lumière due à une réaction d'électrochimiluminescence entre la TPrA et le F8BT.

L'ECL a été utilisée pour imager les surfaces d'électrodes et les processus électrochimiques qui se déroulent sur cette surface. En 2015, Willets et al. ont imagé une nanofibre d'or dans le but d'étudier l'activité électrochimique et d'analyser l'hétérogénéité des particules d'or plasmoniques quand elles sont utilisées comme électrode nanométrique [44].

La sensibilité de l'électrochimiluminescence a permis de l'utiliser pour réaliser des mesures optiques à l'échelle de la cellule unique comme, par exemple, l'analyse de glucose qui se trouve dans le cytosol (milieu intra-cellulaire), lieu de déroulement de la réaction de glycolyse. La génération de la lumière est observée, au niveau d'une cellule unique, suite à une réaction entre le luminol et le peroxyde d'hydrogène qui est le produit d'une réaction d'oxydation de glucose en présence d'une enzyme « glucose oxydase » (Figure 17) [45].

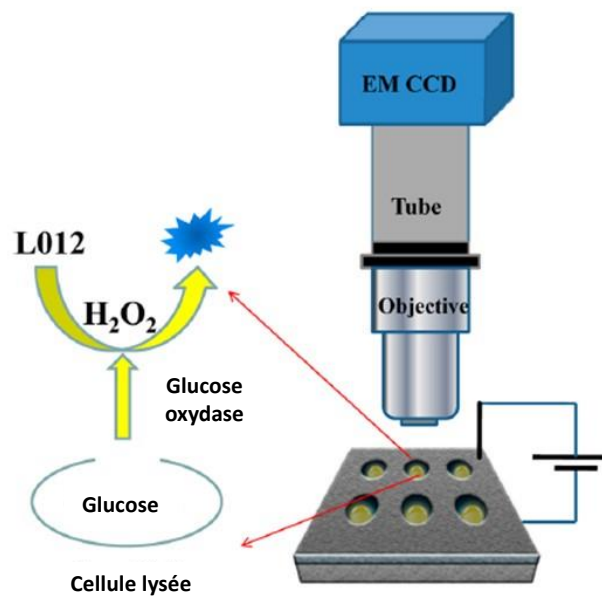


Figure 17 : Imagerie ECL de la détection de glucose intra-cellulaire sur des cellules individuelles. Le couple de réactifs ECL utilisé dans ce cas est le L012/H₂O₂. Le peroxyde d'hydrogène est obtenu suite à une réaction d'oxydation de glucose en présence d'enzyme [45].

Dans le même contexte de l'imagerie des cellules unique, l'ECL a été utilisé pour imager les protéines membranaires des cellules vivantes [46], les adhésions et les liaisons cellulaires [47] et même des organelles comme les mitochondries [48].

III. Les liposomes : généralités et applications

Si l'ECL est la technique retenue pour notre étude, les liposomes en constituent les objets. Nous allons succinctement en rappeler les propriétés essentielles.

1. Introduction

Les liposomes sont des vésicules formées par une ou plusieurs couches phospholipidiques qui séparent deux milieux aqueux. Cette architecture lipidique en fait le premier modèle artificiel et pertinent pour mimer des cellules vivantes. Ils peuvent encapsuler des substances hydrophiles dans le milieu aqueux intérieur (lumen) et hydrophobes dans l'espace inter-feuillets de la membrane, comme le montre le schéma ci-dessous [49].

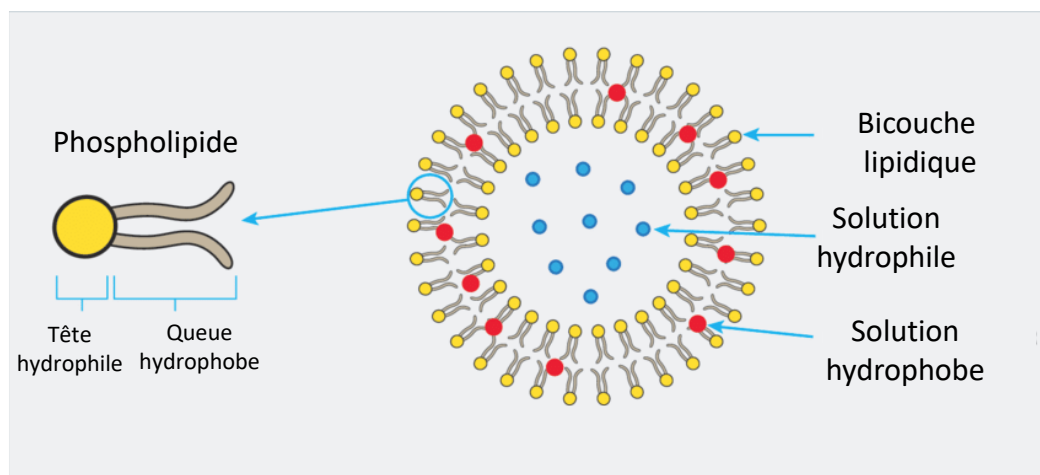


Figure 18 : Possibilités d'encapsulation dans un liposome [50]

Les liposomes ont été décrits pour la première fois en 1965 par Bangham et al. qui ont montré qu'en présence d'une solution aqueuse, les phospholipides ont tendance à se réorganiser pour former des objets sphériques [51].

Ces structures sont largement utilisées en tant que modèle de la membrane cellulaire pour explorer leur perméabilité, le potentiel de la membrane ou encore le mécanisme d'action des anesthésiques locaux ... [52]

Les liposomes ont commencé à être utilisés dans plusieurs applications comme des bioréacteurs en biologie moléculaire [53] et des vecteurs de molécules en pharmacologie [54], en biologie cellulaire, biochimie moléculaire afin de réaliser des libérations programmées de

médicaments et dans l'industrie alimentaire pour l'encapsulation des enzymes [55], [56] comme nous le verrons plus en détail par la suite. Ces structures phospholipidiques sont aussi utilisées dans le domaine des biocapteurs grâce à leur capacité d'encapsuler plusieurs éléments qui permet d'avoir des limites de détection faibles [57] et pour étudier des réactions de catalyse enzymatique comme par exemple la réaction d'oxydation de glucose. [58], [59] Cela explique l'intérêt que nous portons aux liposomes dans notre projet.

Dans cette partie du chapitre, nous allons présenter des généralités sur les liposomes en commençant par leur composition et la classification de ces structures, puis nous intéresser aux différentes méthodes de préparation et enfin nous détaillerons les domaines d'application et nous expliquerons nos choix de composition de liposome et les méthodes de préparation retenues pour notre projet.

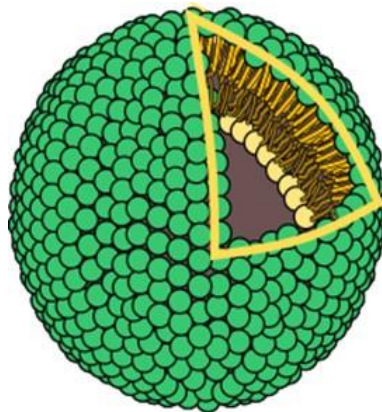


Figure 19 : Structure générale d'un liposome.

2. Composition des liposomes : les phospholipides

2.1. Différents types de phospholipides

Les liposomes sont composés essentiellement de phospholipides au sein de la bicouche lipidique. Les phospholipides sont des molécules amphiphiles : une extrémité est polaire et l'autre est apolaire. Un glycérophospholipide est composé d'une base de glycérol sur laquelle sont condensés par estérification deux acides gras en position 1 et 2, formant ainsi la partie hydrophobe (apolaire) de la molécule. La troisième position porte un groupement phosphorylé fonctionnalisé par un groupement $-R$. Un phospholipide est nommé selon la nature de ce résidu $-R$ [60].

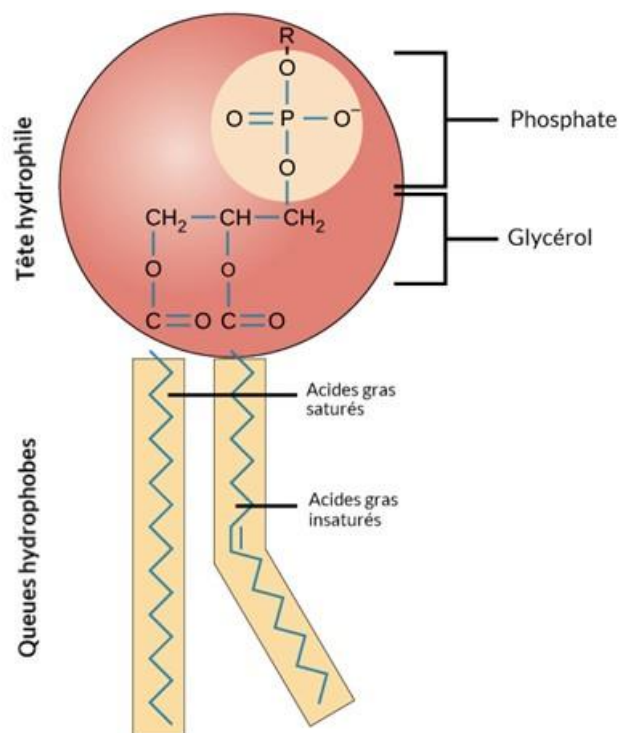
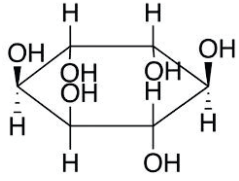


Figure 20 : Exemple de structure d'un phospholipide [61].

Tableau 2 : Nom du phospholipide selon la nature du résidu.

Résidu -R	Nom du phospholipide
-H	Acide phosphatidique (PA)
-CH ₂ CHOH-CH ₂ OH	Phosphatidylglycérol (PG)
-CH ₂ -CH-(COO)NH ₃ ⁺	Phosphatidylsérine (PS)
-CH ₂ -CH ₂ -NH ₃ ⁺	Phosphatidyléthanolamine (PE)
	Phosphatidylinositol (PI)
-CH ₂ -CH ₂ -N(CH ₃) ₃ ⁺	Phosphatidylcholine (PC)

La deuxième partie apolaire est une chaîne carbonée qui peut être saturée ou insaturée et qui peut contenir entre 14 et 18 atomes de carbone. Ces molécules de phospholipides sont d'origine soit naturelle, soit synthétique. Dans le tableau ci-dessous, nous avons présenté les phospholipides les plus couramment utilisés dans la fabrication de liposomes [60], [61].

Tableau 3: Différents types de phospholipides.

	Nom de phospholipide	Nombre d'atome de carbone sur la chaîne apolaire : insaturation
Phospholipides synthétiques	Dipalmitoylphosphatidylcholine DPPC	16 :0
	Distéaroylphosphatidylcholine DSPC	18 :0
	Dipalmitoylphosphatidyléthanolamine DPPE	16 :0
	Dipalmitoylphosphatidylsérine DPPS	16 :0
	Dipalmitoyl acide phosphatidique DPPA	16 :0
	Dipalmitoylphosphatidylglycérol DPPG	16 :0
	Dimyristoylphosphatidylcholine DMPC	14 :0
	Dimyristoylphosphatidyléthanolamine DMPE	14 :0
	Distéaroylphosphatidyléthanolamine DSPE	18 :0

	Dimyristoylphosphatidylglycérol DMPG	14 : 0
	Dioleoylphosphatidylcholine DOPC	18 : 1
	Dioleoylphosphatidylglycérol DOPG	18 : 1
	Dioleoylphosphatidyléthanolamine DOPE	18 : 1
Phospholipides naturels	Phosphatidylcholine de jaune d'oeuf EPC	Pas d'insaturation
	Phosphatidylcholine de soja SPC	Pas d'insaturation

2.2. Choix des phospholipides composant les liposomes pour notre projet

Le choix des phospholipides tient compte de leur température de transition de phase T_g (*melting Temperature*). Au-delà de cette température, les phospholipides passent d'une phase gel ($L\beta$), ordonnée, vers une phase fluide désordonnée ($L\alpha$). La valeur de la température de transition varie avec la longueur de la chaîne et avec le degré d'insaturation des chaînes d'acide gras.

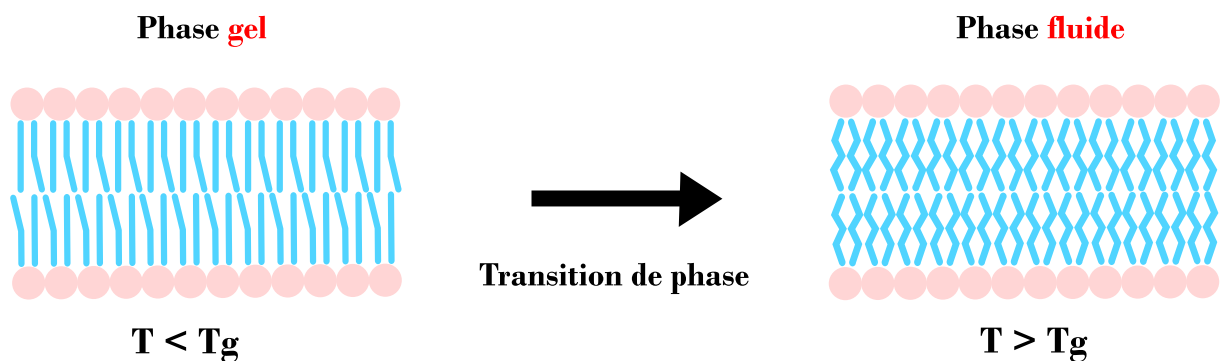


Figure 21 : Changement de phase d'un phospholipide suite à un changement de température.

Dans le contexte de notre étude, nous observerons et favoriserons des événements d'éclatement ou de perméation de liposomes. Dans cette optique, nous avons choisi de travailler avec des phospholipides s'associant au sein de phases fluides à température ambiante. Plus spécifiquement, nous avons choisi le DOPG (=Dioléyl phosphatidylglycérol) comme phospholipide, qui présente une température de transition de phase très basse égale à -18°C . Ce phospholipide contient, dans sa partie polaire, un groupement phosphatidylglycérol (PG). C'est un des composants principaux des membranes de cellules bactériennes mais aussi dans les membranes de cellules animales et végétales à plus faibles concentrations. Le PG est chargé négativement à pH physiologique [62].

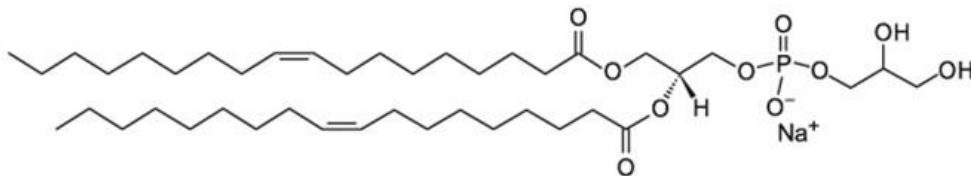


Figure 22 : Structure du DOPG 1, 2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt) avec des chaînes en C18 et une température de transition de phase $T_g = -18^{\circ}\text{C}$

Nous utilisons également le DOPC qui est un phospholipide zwitterionique et qui a une température de transition de phase également très basse (-17°C). Ce phospholipide est une phosphatidylcholine (PC) qui représente environ 50% de la composition de toutes les membranes cellulaires du corps humain.

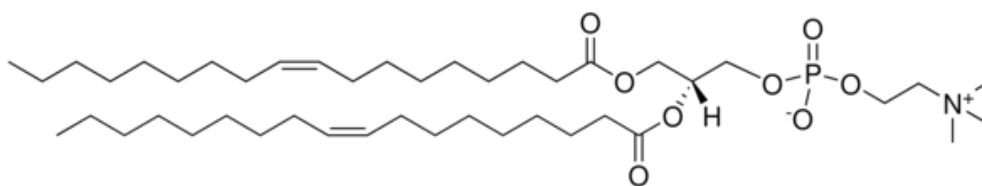


Figure 23 : 1,2-di-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (sodium salt) avec des chaînes en C18 et une température de transition de phase $T_g = -17^{\circ}\text{C}$.

Afin de mieux visualiser les vésicules par microscopie, nous avons également ajouté des lipides marqués par du NBD (NitroBenzoxaDiazole) qui est une petite sonde fluorescente (2-3% de DPPE-NBD avec $\lambda_{ex} = 460 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} = 535 \text{ nm}$).

Le DPPE dispose d'un groupement phosphatidyléthanolamine (PE) qui est généralement le phospholipide le plus abondant dans les cellules eucaryotes mais également dans les cellules bactériennes [63].

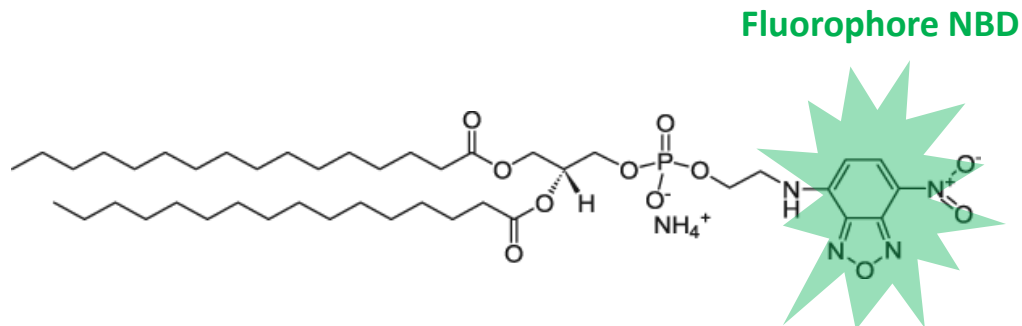


Figure 24 : Structure du DPPE-NBD 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoéthanolamine-N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) (ammonium Salt) avec des chaînes en C16 et un fluorophore nitobenzoxadiazole.

2.3. Autres composants

Il existe une grande variété de composants pouvant entrer dans la composition d'une membrane d'un liposome :

-Les sphingolipides : qui contiennent des complexes de saccharide et des résidus d'acide sialique, dans leur partie polaire, et qui assure la rigidité des liposomes. Ces molécules sont chargées négativement à pH neutre [60].

-Les stérols : le cholestérol (Figure 25 : Structure du cholestérol. et ses dérivés composent une majorité des membranes cellulaires comme les membranes plasmiques. Ces molécules sont ajoutées dans la composition de la membrane d'un liposome pour assurer sa bonne organisation, [39]diminuer sa perméabilité à l'eau et diminuer également sa fluidité [60]. D'ailleurs, les membranes qui contiennent un pourcentage élevé de cholestérol sont les plus faciles à manipuler (car elles sont plus rigides) en culture cellulaire [39].

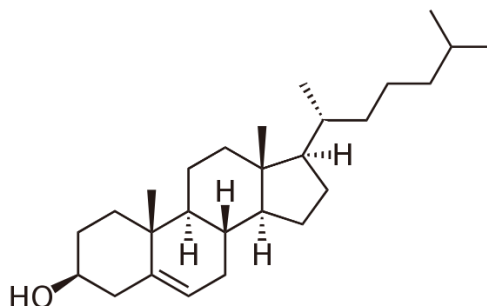


Figure 25 : Structure du cholestérol.

-Autres composants : dans la membrane d'un liposome, on peut aussi trouver des lipides cationiques comme le DOTAP et des polymères.

3. Classification des liposomes

Selon le protocole de fabrication utilisé, les liposomes peuvent avoir des tailles différentes allant de 10 nanomètres de diamètre à plusieurs dizaines de micromètres et un nombre de feuillet variable. Selon ces deux critères, les liposomes sont classés en 5 catégories : [64]

- Les SUV (Small Unilamellar Vesicles) ou vésicules unilamellaires de petite taille où le diamètre est inférieur à 100 nm ;
- Les LUV (Large Unilamellar Vesicles) ou vésicules unilamellaires de grande taille où le diamètre varie entre 100 et 1000 nm ;
- Les GUV (Giant Unilamellar vesicles) ou vésicules unilamellaires géantes de diamètre supérieur à 1000 nm ;
- Les MLV (Multi Lamellar vesicles) ou vésicules multilamellaires
- Les vésicules multivésiculaires.

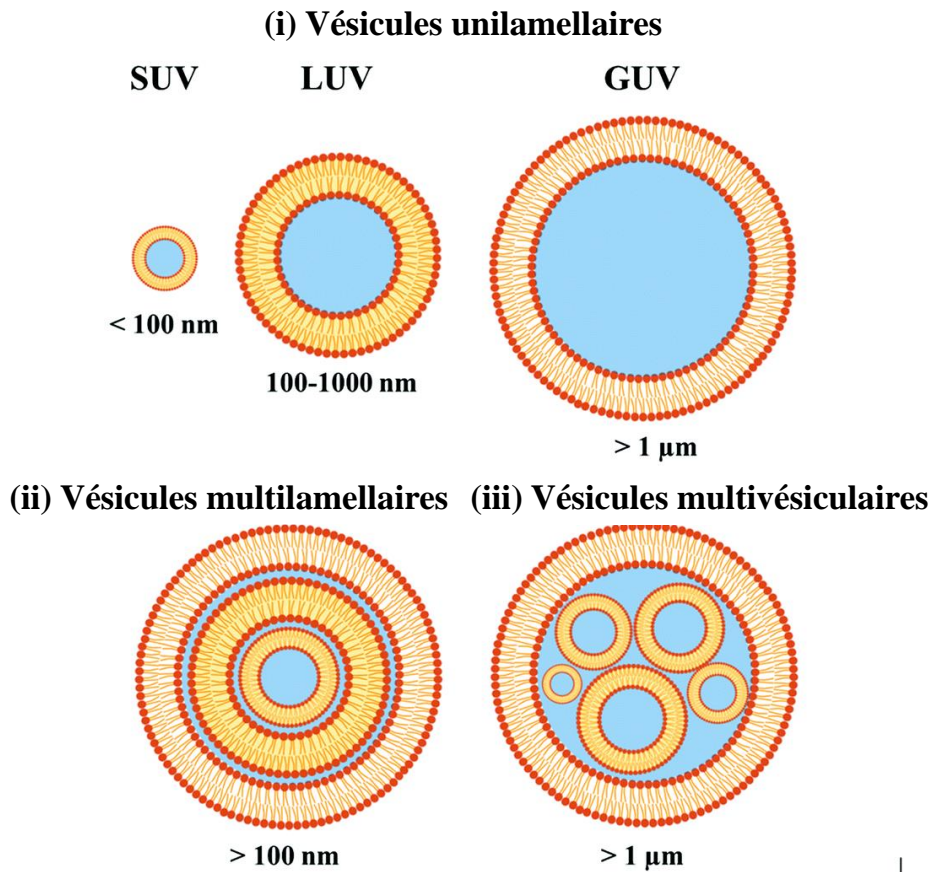


Figure 26 : Classification des liposomes [65].

4. Différentes méthodes de préparation et d'encapsulation dans les liposomes

Après avoir étudié de plus près les différents types de liposomes et les principaux composants qui constituent leurs membranes, venons-en maintenant aux différentes méthodes utilisées pour les préparer.

Le procédé de préparation de liposomes est généralement choisi selon les spécificités et les propriétés attendues des liposomes que nous voulons préparer : Taille, nombre de bicouches, solution encapsulée...

Dans le cadre de notre projet, nous sommes intéressés par les liposomes qui ont une taille proche de celle d'une cellule réelle (entre quelques micromètres et des dizaines de micromètres). Pour préparer ces liposomes, dits géants, il existe deux types de procédure : électroformation ou transfert de phase [66].

4.1. Electroformation

Cette technique de fabrication de liposomes géants a été développée en 1986 par Angelova et Dimitrov [67] et elle est basée sur un gonflement de vésicules dans un milieu aqueux en présence d'un champ électrique alternatif (de l'ordre de 2V-10Hz).

L'avantage de l'électroformation est qu'elle permet d'obtenir un nombre très important de liposomes, néanmoins, cette méthode nécessite l'utilisation d'une faible concentration en sel donc, elle ne permet pas de travailler dans les conditions physiologiques et aussi elle ne permet pas de fabriquer des liposomes dissymétriques avec une composition de phospholipide différente sur chaque feuillet, interne et externe. Parce que nous devons travailler dans des conditions physiologiques et nous serons amenés à préparer des liposomes dissymétriques, nous n'avons pas utilisé cette technique d'électroformation dans ce projet et nous lui avons préféré la méthode de transfert de phase.

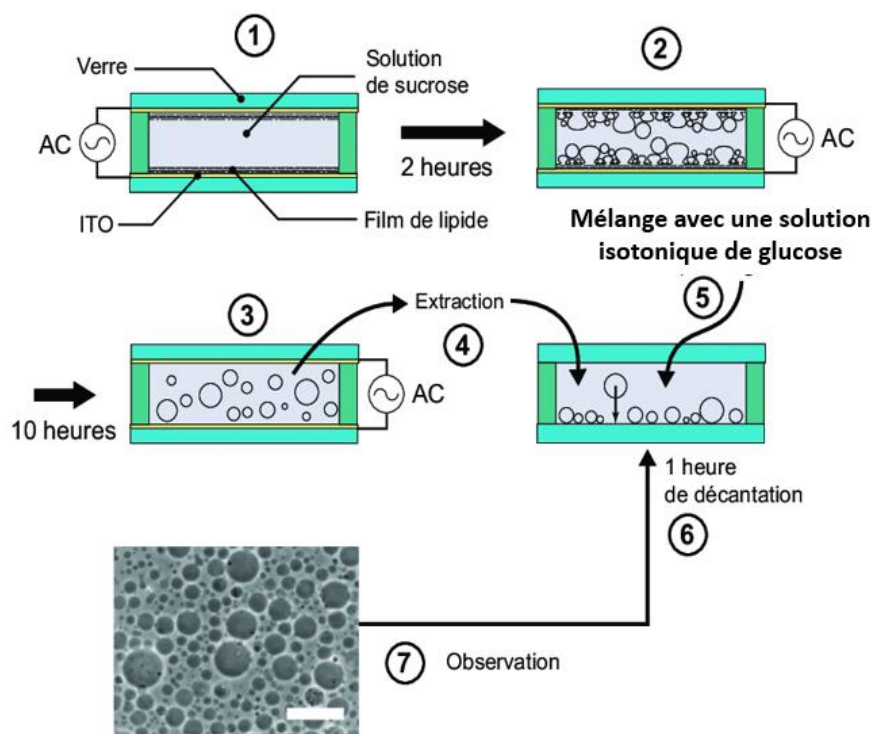


Figure 27 : Schéma de principe de l'électroformation et observation des liposomes obtenus [68].

4.2. Méthode de transfert de phase

La méthode de transfert de phase est un processus qui se déroule en deux étapes au cours desquelles des monocouches individuelles sont transformées en bicouches. Cette méthode permet de préparer des liposomes [69]. La première étape consiste à former des micelles inversées contenant un petit volume de solution aqueuse entourée d'une monocouche de phospholipides.

Dans ce travail, nous utilisons un dispositif microfluidique à deux entrées, destiné à la génération de gouttes, pour préparer des micelles inversées. Comme nous pouvons le voir dans la Figure 28, ces micelles inversées sont formées suite au passage des gouttes aqueuses dans un canal qui contient une solution de phospholipides dissous dans l'huile.

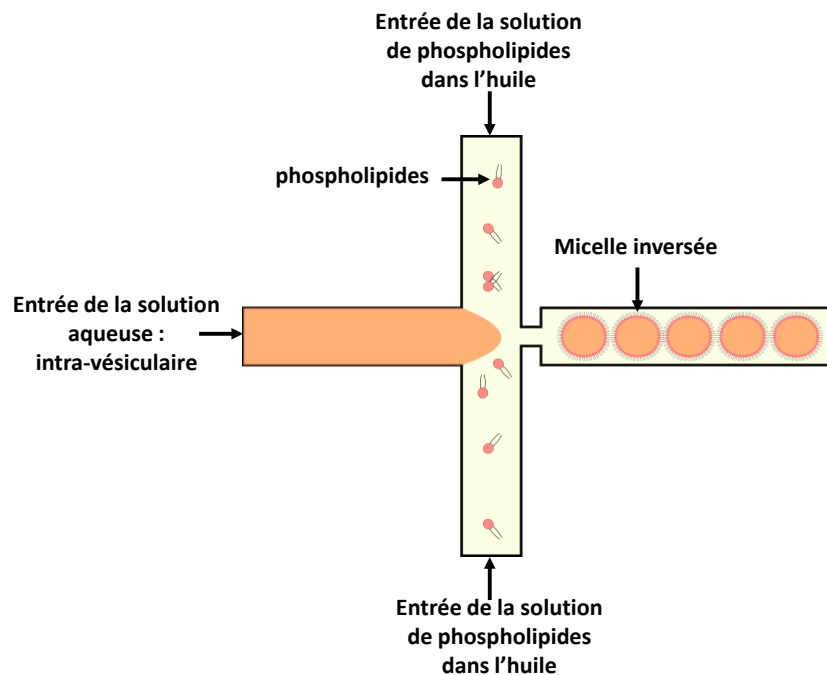


Figure 28 : Schéma d'un dispositif microfluidique générateur de gouttes : étape de la formation des micelles inversées.

Quant à la deuxième étape, grâce à une différence de densité entre le milieu intra-vésiculaire (sucrose) et le milieu extra-vésiculaire (glucose), les gouttelettes d'eau enrobées de phospholipides passent à travers une interface eau/huile où des phospholipides sont arrangés. Cela transforme les micelles inversées en liposomes [69].

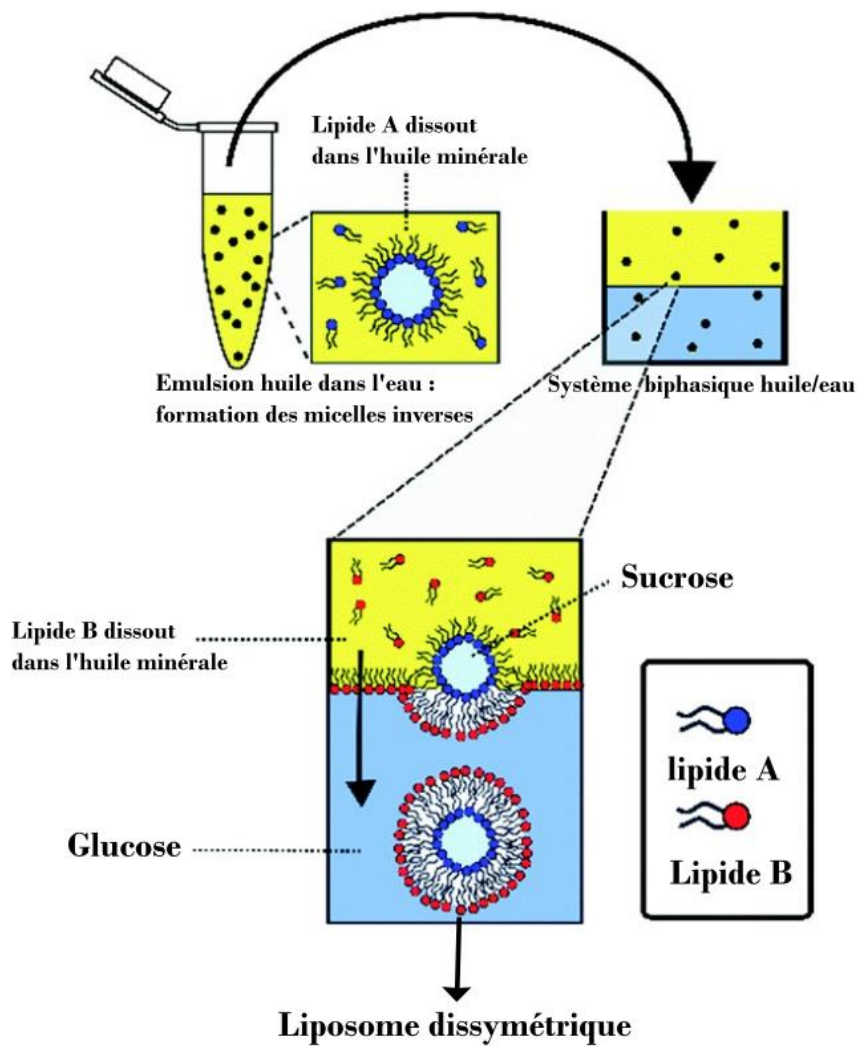


Figure 29 : Formation des liposomes par transfert de phase (figure prise de la référence [70]).

5. Différentes applications des liposomes

5.1. Applications thérapeutiques : vectorisation de médicaments

Dans l'objectif de garder l'efficacité d'un médicament et éviter les transformations possibles d'un principe actif qui peuvent avoir lieu pendant son trajet dans l'organisme vers l'endroit cible, les liposomes ont été utilisés comme un moyen de ciblage de médicament.

L'encapsulation d'un principe actif dans un liposome permet de réaliser une libération programmée qui va protéger d'une part le principe actif d'une dégradation prématurée et d'autre part protéger les cellules saines de l'effet d'un médicament qui pourrait être toxique.

[71] La libération programmée ou ciblée est utilisée dans les traitements du cancer où les

liposomes jouent le rôle de « véhicule » qui transportent le médicament vers les cellules cancéreuses. Ce ciblage de cellule dépend de plusieurs caractéristiques : d'une part, les cellules cancéreuses modifient localement l'environnement dans le corps en modifiant, par exemple, le pH (inférieur au pH physiologique) et en possédant des marqueurs biologiques qui permettent de les repérer par les liposomes. D'autre part, les liposomes sont guidés, dans le corps, vers les cellules cancéreuses selon trois chemins : i)- Après leurs injections, ils sont reconnu par le corps comme des éléments « étrangers » et donc ils sont capturés par le foie où ils seront détruits. Cette méthode est utilisée pour viser le foie. ii)- Pour aller plus loin dans le corps et s'échapper du foie, les liposomes peuvent être camouflés par un greffage d'un polymère pour qu'ils ne soient pas reconnus par le corps. iii)- Dans le but d'avoir une libération plus précise, un greffage de molécules capables de reconnaître les cellules cancéreuses, sur le polymère de camouflage, est utilisé.

Cette méthode est efficace non seulement pour vectoriser le traitement du cancer [72] mais aussi pour l'administration d'antibiotiques et d'anti-inflammatoires [54].

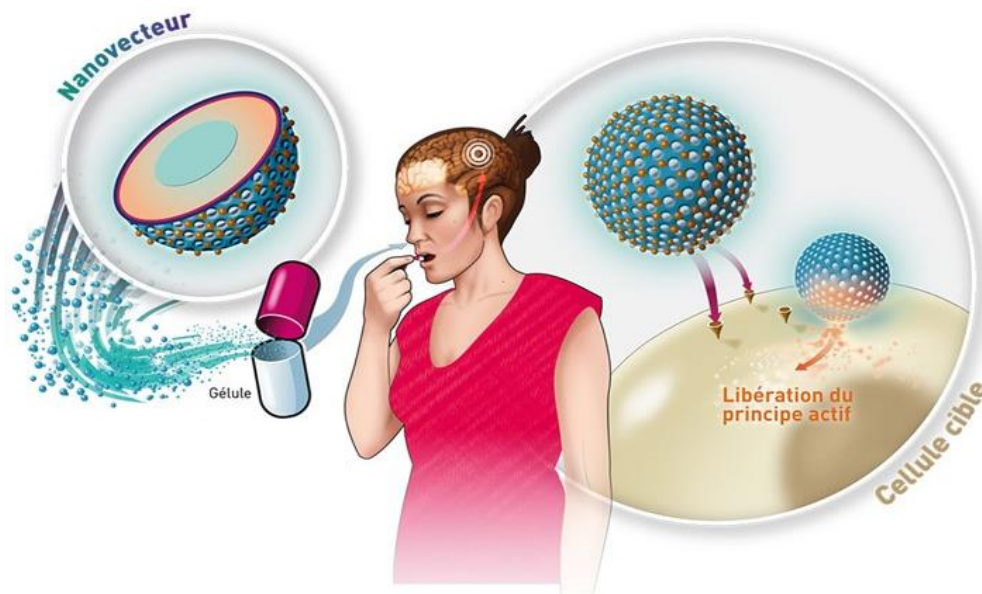


Figure 30 : Schéma explicatif des bénéfices des nanovecteurs ou liposomes dans le domaine de la vectorisation des médicaments [73].

5.2. Applications biochimiques et modèles biophysiques

Les liposomes sont utilisés en tant que modèles biophysiques simples de cellules, débarrassés de la complexité de la cellule vivante et de ses composants tout en gardant une structure

membranaire comparable à celle des membranes cellulaires. Donc les liposomes géants ont attiré l'attention de plusieurs chercheurs pour étudier les phénomènes qui peuvent avoir lieu sur les membranes biologiques vu leur taille (diamètre supérieur à 1 μm) qui facilite l'observation par microscopie optique. Ils étaient utilisés pour étudier les phénomènes transmembranaires ou intracellulaires qui peuvent avoir lieu au cours des échanges entre les différents composants de la cellule comme, par exemple, la fusion (Figure 31), la migration, la perméabilisation... ou les interactions qui peuvent avoir lieu entre les membrane de ces structures et des molécules biologiques comme les protéines [74].

Toutes ces caractéristiques des liposomes nous ont permis de constater qu'ils sont le modèle biophysique le plus favorable pour étudier en premier lieu l'événement de la libération liposomale et la perméabilisation membranaire par des peptides (chapitre 4).

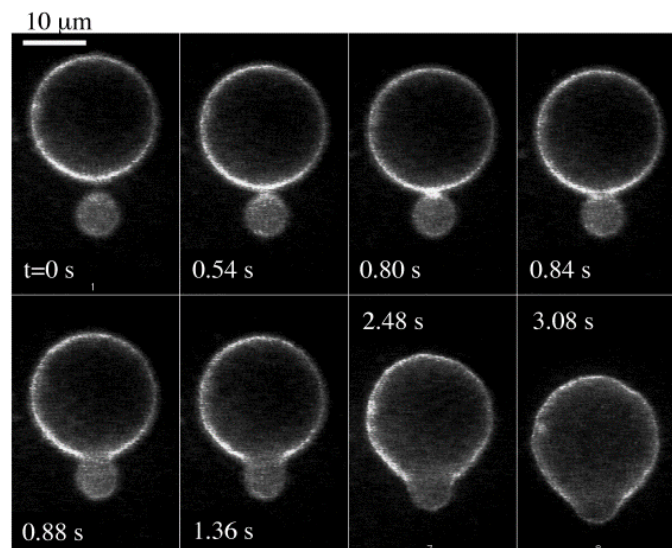


Figure 31 : fusion de deux vésicules en présence d'un tensio-actif (Tween 20) par ouverture simultanée de deux pores [75].

Ces structures font aussi fonction de micros-réacteurs pour des processus biologiques comme la réplication de l'ADN. [53]

5.3. Utilisation dans les produits cosmétiques

L'encapsulation des substances cosmétiques dans les liposomes présente plusieurs avantages tels que :

- Amélioration de l'absorption percutanée et la perméation des substances dans la peau ce qui augmente leur efficacité [76] ;
- Eviter l'huile et l'alcool qui sont utilisés comme excipients dans plusieurs produits cosmétiques et qui pourraient endommager la peau [77].

5.4. Utilisation dans l'industrie alimentaire

Dans le secteur agroalimentaire, les enzymes jouent un rôle central dans la conservation des produits. Afin d'augmenter la durée de conservation de produits alimentaires, ces enzymes sont encapsulées dans des liposomes.

Cette technique offre la possibilité d'augmenter la quantité de production des produits alimentaires en gardant toujours la bonne qualité des produits sur toute la durée de conservation [78].

IV. Conclusion

Ces rappels bibliographiques avaient pour ambition de rappeler d'une part les principes fondamentaux de l'ECL en soulignant les bénéfices de cette technique en imagerie et d'autre part les propriétés des liposomes en tant que structures lipidiques fluides et dynamiques en 3D qui en font des modèles adaptés au suivi du passage de substances du milieu intravésiculaire au milieu extérieur.

La stratégie retenue pour mon projet a ainsi consisté à utiliser l'électrochimiluminescence pour imager le passage transmembranaire issu de la perméabilisation d'une membrane lipidique à partir de liposomes.

**Deuxième chapitre –
Développement d'une
méthodologie
d'électrochimiluminescence
pour imager l'ouverture de
liposomes géants**

2- Deuxième chapitre – Développement d’une méthodologie d’électrochimiluminescence pour imager l’ouverture de liposomes géants

I. Contexte de l’étude

La détection électrochimique de la libération du contenu liposomal suite à une perméabilisation de la membrane phospholipidique a été reportée pour la première fois en 2014 dans le groupe de Compton [79]. Les auteurs ont quantifié, par chronoampérométrie, la vitamine C libérée à la surface d’une microélectrode de carbone en encapsulant ce principe actif dans des liposomes. Une année plus tard, en 2015, Ewing et al. ont quantifié par chronoampérométrie la libération d’une catécholamine (Figure 32)[80].

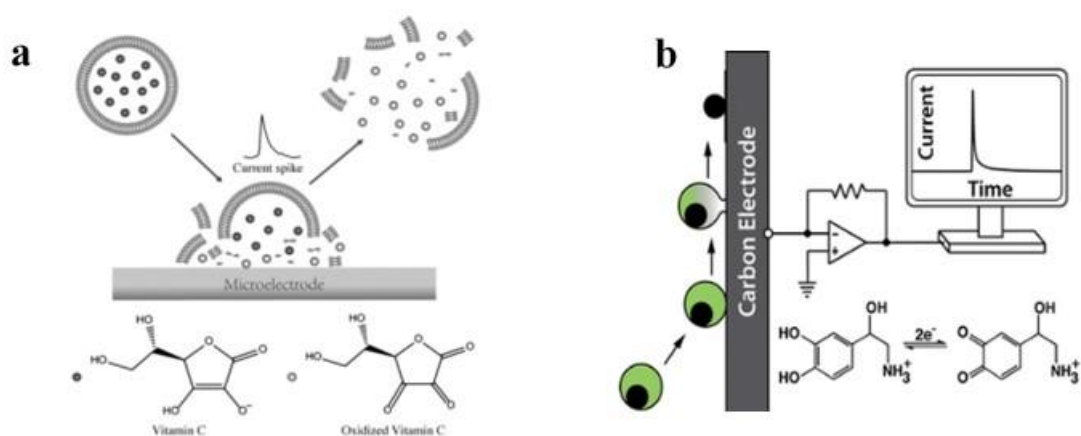


Figure 32 : Détection de la libération liposomale par électrochimie de la vitamine C (a) [79] et de la cathécholamine (b) [81].

Dans ces travaux, l’ampérométrie est la méthode utilisée pour quantifier le contenu libéré, ce qui présente l’avantage d’une très bonne résolution en temps, mais d’une sensibilité réduite. L’implémentation d’une approche par ECL dans la révélation et la quantification d’un efflux depuis le milieu intravésiculaire permet, en plus d’une sensibilité accrue, d’envisager une imagerie de l’évènement.

Pour ce faire, nous avons décidé de nous baser sur l’approche ECL la plus populaire consistant à oxyder simultanément un luminophore ($[Ru(bpy)_3]^{2+}$) et un co-réactif (Tri-*n*-propylamine ; TPrA).

Dans ce cadre, la stratégie a consisté, tout d'abord, à encapsuler le luminophore et le co-réactif dans des liposomes géants. Dans ces conditions, c'est-à-dire tant que le liposome reste intact, les réactifs ECL ne peuvent être oxydés à la surface de l'électrode car ils sont séparés de l'électrode et du milieu extérieur par la membrane lipidique. Néanmoins, en cas de rupture de la bicouche phospholipidique, par un stimulus externe (polarisation de l'électrode dans notre cas), le contenu vésiculaire entre en contact avec la surface de l'électrode polarisée et déclenche un signal lumineux dont l'intensité doit varier de façon synchronisée avec l'intensité du courant faradique associée à l'oxydation des réactifs.

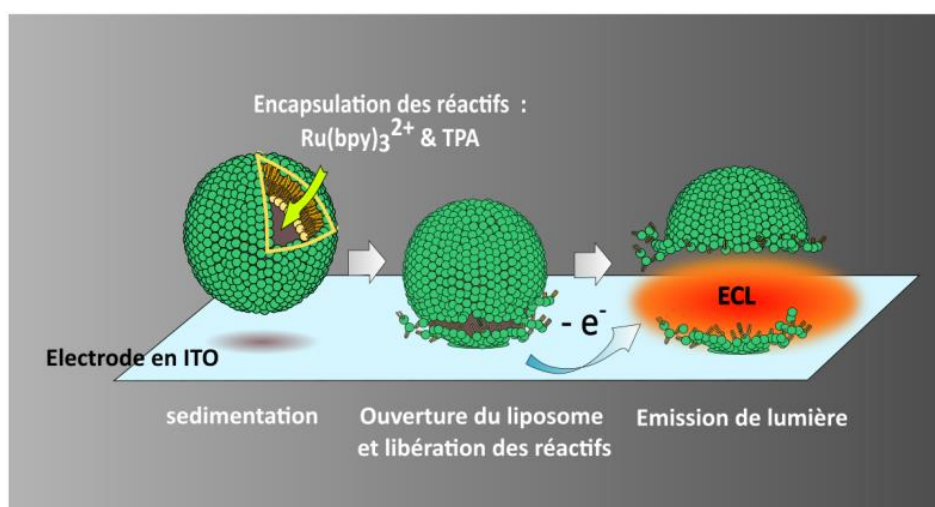


Figure 33 : Stratégie adoptée pour imager l'ouverture d'un liposome par électrochimiluminescence.

En nous inspirant de l'électroporation ou électroperméabilisation utilisée pour augmenter la perméabilité des membranes cellulaires [82], nous avons choisi de déclencher la perméabilisation de la membrane par la seule polarisation de l'électrode à + 1,2 V/ Ag/AgCl. Dans cet objectif de mettre en évidence l'ouverture d'un liposome par électrochimiluminescence, nous avons commencé par fabriquer des liposomes géants contenant le co-réactif et le luminophore selon la méthode de transfert de phase évoquée dans le chapitre bibliographique et détaillée pour nos conditions dans le paragraphe suivant.

II. Préparation des liposomes : encapsulation des réactifs et stabilité

Ce paragraphe aborde la méthodologie utilisée pour préparer des liposomes stables contenant le luminophore et le co-réactif.

Les principaux points à contrôler pour assurer la stabilité des liposomes sont :

- L'osmolalité (ou osmolarité) des solutions intra et extra vésiculaire
- Le choix des phospholipides qui répond à deux contraintes : 1) éviter les interactions électrostatiques entre les phospholipides et les réactifs ECL qui pourraient déstabiliser la membrane phospholipidique donc empêcher la formation des liposomes et 2) favoriser l'instabilité des liposomes sur une surface d'électrode polarisée pour permettre la libération de la solution encapsulée.

1. L'osmolalité : généralité et calcul

L'osmolalité est le nombre d'osmoles de soluté par kilogramme de solvant. Il ne faut pas la confondre avec l'osmolarité qui est le nombre d'osmoles de soluté par litre de solution. La différence d'osmolalité entre deux milieux se traduit par la pression osmotique Π selon l'équation suivante :

$$\Pi = \Pi_{int} - \Pi_{ext} = R T \Delta C_{osm} \quad (31)$$

Les liposomes sont stables tant que la pression osmotique ne dépasse pas la pression de LAPLACE $\Delta P_{Laplace} = \frac{4\gamma}{r}$ avec r le rayon de la vésicule (prenant $10 \mu\text{m}$ comme le rayon de la plus petite vésicule) et $\gamma \sim 50 \text{ mJ.cm}^{-2}$ la tension de surface entre l'eau et un milieu phospholipidique : [83]

$$\Delta P_{Laplace} \approx \Pi \quad (32)$$

$$\Delta C_{osm} \approx \frac{4\gamma}{rRT} \quad (33)$$

$$\Delta C_{osm} \approx 10 \text{ mosmol.L}^{-1} \quad (34)$$

Donc la différence d'osmolalité entre le milieu intra vésiculaire et le milieu extra vésiculaire ne doit pas dépasser 10 mosmol.L^{-1} pour avoir des liposomes stables.

Pour obtenir des valeurs d'osmolalité extérieure et intérieure proches, on a utilisé des solutions aqueuses de glucose et de sucrose. Ce sont deux solutions électrochimiquement inertes permettant de conférer des densités différentes à concentrations osmotiques égales.

$$\gamma \text{ osm glucose} \approx \gamma \text{ osm sucrose} \quad (35)$$

$$M \text{ sucrose} \approx 2 M \text{ glucose} \quad (36)$$

La différence de densité est un enjeu à prendre en compte dès la fabrication des vésicules afin de permettre la sédimentation des vésicules (qui contiennent le luminophore et le co-réactif à l'intérieur) et qui sont placées dans une solution de glucose.

2. Choix de phospholipides

Au début de ce travail, nous avons tenté de préparer des liposomes constitués exclusivement de phospholipides DOPG (phospholipide négatif qui compose 98% des phospholipides de la solution lipidique) sur les deux feuillets interne et externe des liposomes. Avec cette composition, nous avons remarqué que les liposomes ne se formaient pas.

Notre interprétation est que l'instabilité de liposomes provient d'interactions électrostatiques entre le phospholipide chargé négativement et le co-réactif (TPrA) chargé positivement (pKa du co-réactif égal à 10,65 et le pH de la solution est autour de 7,4) présent à l'intérieur des liposomes et donc directement en contact avec le feuillet interne. Nous avons donc décidé de remplacer le phospholipide négatif par un phospholipide zwitterionique, globalement neutre, sur le feuillet interne qui est en contact direct avec la solution de luminophore et du co-réactif.

In fine, le feuillet interne globalement neutre ne donne lieu à aucune association électrostatique avec le co-réactif. D'autre part, conserver sur le feuillet externe un phospholipide chargé négativement comme le DOPG est très important pour la suite de notre projet afin de favoriser l'association de peptides, chargés positivement. Cette interaction électrostatique initiale est à l'origine des processus de perméation ou de passage de peptides dans ces couches lipidiques.

3. Fabrication de liposomes

Pour la fabrication de liposomes dissymétriques de type DOPG/DOPC (feuillet externe/feuillet interne), nous avons utilisé la méthode de transfert de phase qui est basée sur deux grandes étapes. La première étape consiste à préparer des micelles inversées qui préfigurent la solution intra-vésiculaire entourée par une monocouche de phospholipides. La deuxième étape a pour objectif la formation de la monocouche externe de lipides.

3.1. Préparation de l'émulsion : formation de la première monocouche

Pour préparer l'émulsion, nous avons, tout d'abord, utilisé une méthode manuelle qui consiste à la préparation de l'émulsion de micelles inversées en utilisant une micropipette qui sert à mélanger un volume de la solution aqueuse à encapsuler dans un volume de la solution de phospholipides (phospholipides dissous dans du *n*-dodécane). Néanmoins, avec cette méthode, le nombre de liposomes obtenu s'est avéré trop faible pour pouvoir réaliser les expériences et leur distribution en taille hétérogène.

Pour augmenter le nombre et homogénéiser la taille des liposomes, nous avons fait appel à une méthode microfluidique permettant de générer un grand nombre de gouttes de taille homogène (rayon = 50 μm). Comme montré dans la partie expérimentale de ce manuscrit, ce dispositif contient deux voies :

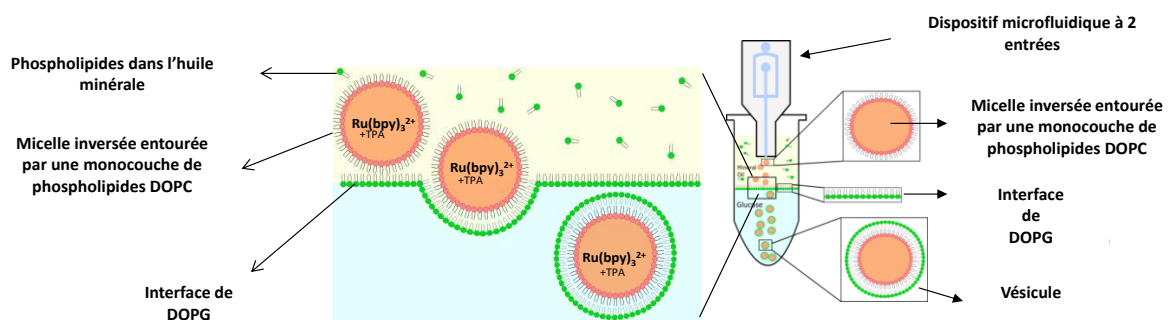


Figure 34 : Fabrication de liposomes par la méthode de transfert de phase et la préparation de l'émulsion par microfluidique

Une voie amène la solution des phospholipides dissous dans l'huile minérale (98% du DOPC + 2% DPPE-NBD qui permet de visualiser les liposomes en photoluminescence), l'autre voie amène la solution aqueuse intra-vésiculaire composée par le luminophore à une concentration égale à $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ et le co-réactif à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, les deux dissous dans une solution de sucrose à $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$ dans du PBS à $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$. Le pH de cette solution a été ajusté à 7.4 (valeur du pH physiologique).

Après la préparation de l'émulsion, nous passons à l'étape suivante qui consiste à la formation de la deuxième monocouche.

3.2. Formation de la deuxième monocouche

Dans un système biphasique composé par une solution de glucose de concentration égale à $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$ et une solution de phospholipide (98% DOPG + 2% DPPE-NBD), les phospholipides composés d'une tête polaire et d'une queue apolaire ont tendance, à une température plus élevée que leur température de transition de phase, à s'organiser de façon à ce que la partie polaire soit dirigée vers le milieu aqueux et la partie apolaire vers le milieu organique (Figure 34).

Grâce à la différence de densité entre le glucose et le sucrose, les micelles inversées formées peuvent traverser la monocouche de phospholipides et être enrobées par une deuxième monocouche.

Les liposomes obtenus sont observés par microscopie comme illustré ci-dessous.

4. Visualisation des liposomes

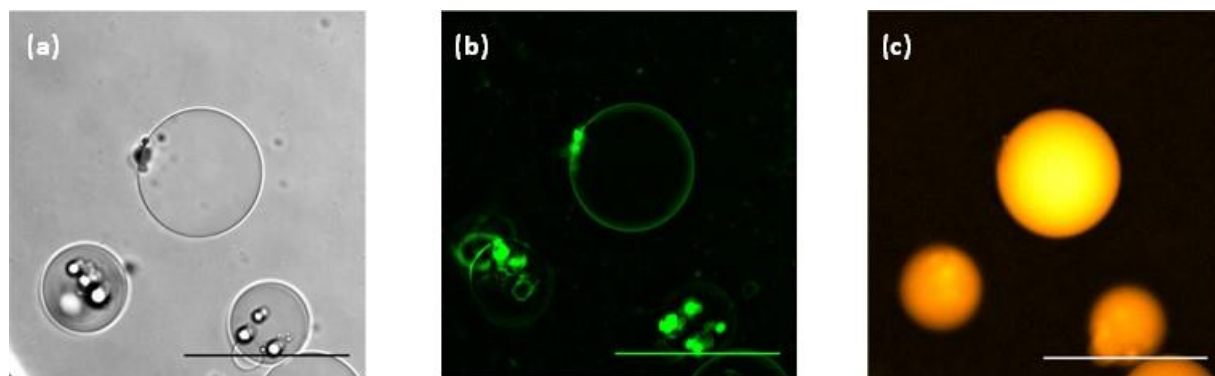


Figure 35 : Observation microscopique de vésicules contenant $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ainsi que le co-réactif TPrA à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, et posées sur une surface en polystyrène. Observation (a) en contraste de phase, (b) avec un filtre GFP et (c) avec un filtre rhodamine. Barre d'échelle : $300 \mu\text{m}$.

a) En contraste de phase

Nous avons tout d'abord observé les liposomes en contraste de phase grâce à la différence d'indice de réfraction entre le glucose ($1,3635$ à 20°C) présent dans la solution extra-vésiculaire et le sucrose ($1,38115$ à 20°C) présent dans la solution intra-vésiculaire.

b) Avec un filtre GFP (Green Fluorescent Protein)

C'est un filtre qui possède une longueur d'onde d'excitation comprise entre 465-495 nm et une longueur d'onde d'émission comprise entre 515-555 nm, ce qui est adéquat avec les caractéristiques de la sonde fluorescente NBD (Figure 36) greffée sur le DPPE (phospholipide qui constitue 2 % de la membrane lipidique)

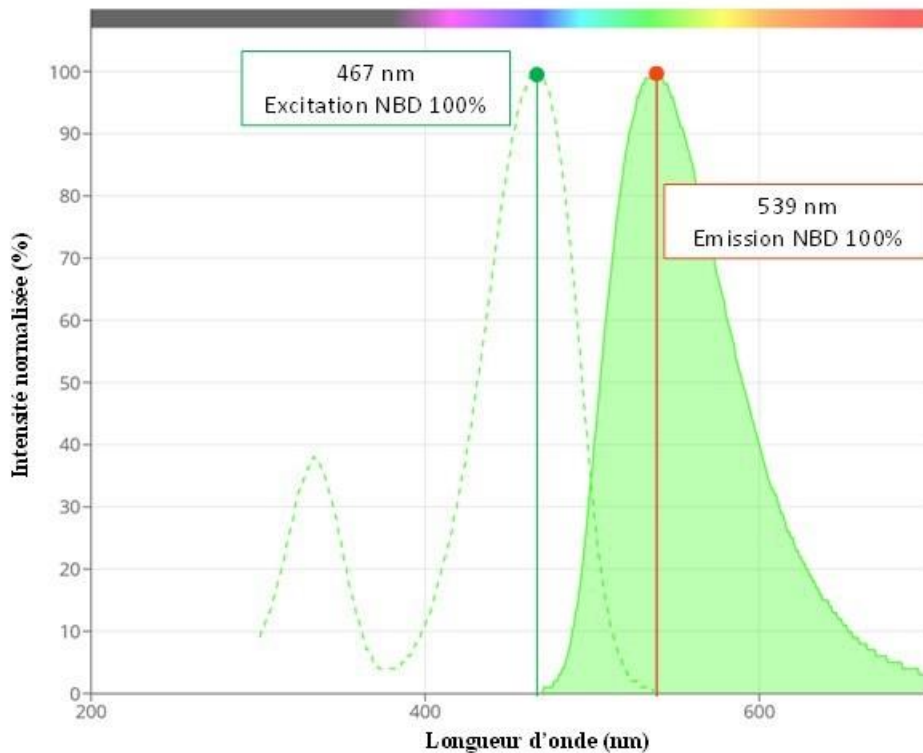


Figure 36 : Longueur d'onde d'excitation et d'émission du NBD

c) Avec un filtre Rhodamine : un jeu de filtre 74 HE

Ce filtre possède les caractéristiques suivantes :

Longueur d'onde d'excitation = Filtre passe bande DBP 480 / 30 – DBP 525 / 31

Longueur d'onde d'émission = Filtre passe bande DBP 525 / 31 – DBP 616 / 57

Ces caractéristiques sont adéquates avec le complexe de ruthénium sous sa forme cationique ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) qui est de couleur jaune-orangée et donc absorbe à $\lambda_{\text{abs}} = 454 \text{ nm}$ pour une émission située à environ $\lambda_{\text{em}} = 620 \text{ nm}$.

Notre expérience de ces liposomes a montré qu'ils éclatent spontanément sous polarisation de l'électrode à 1,2 V. La polarisation de l'électrode sera donc, dans un premier temps, notre stimulus permettant de déstabiliser les liposomes et d'étudier le phénomène de la libération liposomale.

III. Effet du matériau d'électrode sur la réponse électrochimique des espèces électroactives

A ce stade et avant de commencer la détection électrochimique de l'événement d'ouverture, il était important d'étudier le comportement électrochimique des différentes espèces qui interviennent dans l'évènement d'ECL afin de choisir le matériau d'électrode le plus adapté et d'identifier le potentiel à appliquer pour avoir un maximum d'intensité faradique et lumineuse.

1. Les matériaux utilisés pour la fabrication des électrodes

1.1. Les matériaux carbonés : les plus compatibles avec l'ECL

Les différents matériaux d'électrode à base de carbone ont des caractéristiques intéressantes pour notre étude, parmi lesquelles nous retenons :

- Une grande inertie chimique ;
- Une forte conductivité pour les carbones ayant une hybridation sp^2 ;
- Un large domaine d'électro-activité ;
- Un coût faible ;
- Une résistance mécanique et une conservation des propriétés lors de l'immersion prolongée dans des milieux aqueux.

1.1.1. Le carbone vitreux (Glassy carbone GC)

Le carbone vitreux est un matériau amorphe dont les premières voies d'élaboration ont été brevetées dans les années 1960 [84]. Ce matériau possède de bonnes propriétés électriques mais aussi mécaniques, une large fenêtre de potentiel, une certaine inertie chimique et une bonne reproductibilité nécessaire pour les analyses électrochimiques. Mais l'opacité de ce matériau constitue un obstacle pour une utilisation avec un microscope et le développement d'électrodes transparentes en carbone vitreux reste pour l'heure non-abouti.

En effet, un dépôt transparent de carbone vitreux par pulvérisation cathodique entraîne une perte de la conduction du carbone vitreux.

1.1.2. Le graphène

Le graphène est un cristal de carbone bidimensionnel, il est composé de cellules hexagonales en forme de nid d'abeilles. La liaison C-C qui la forme mesure 0,142 nm.

Contrairement au carbone vitreux, le graphène est un matériau compatible avec une utilisation en microscopie d'autant plus qu'il peut être utilisé en monocouche.

1.1.3. Les nanotubes de carbone (CNT)

Les nanotubes de carbone sont des tubes de très faible diamètre (nanométrique), le plus petit détecté est de l'ordre de 3Å. Leur longueur est de l'ordre de cent à plus de dix millions de fois le diamètre dont le plus long détecté est de l'ordre de 18,5 cm [85], [86].

Avec leur structure en feuillets de graphène, les nanotubes de carbone présentent un matériau conducteur et transparent compatible avec l'utilisation électrochimique et microscopique.

1.2 Electrode en ITO

L'oxyde mixte d'indium-étain ou l'ITO (Indium Tin Oxide) est un semi-conducteur composé d'un mélange de deux oxydes avec une proportion massique de 10% d'oxyde d'étain SnO₂ et 90% d'oxyde d'indium In₂O₃.

C'est un matériau qui combine conductivité et transparence. Au cours de ma thèse j'ai travaillé avec de l'ITO commercial et de l'ITO préparé au sein du laboratoire.

2. Comportement électrochimique du luminophore

L'analyse des propriétés électrochimique du tris(bipyridine)ruthénium (II), [Ru(bpy)₃]²⁺, a été réalisé par voltampérométrie cyclique à des vitesses de balayage de l'ordre égale à 50 mV.s⁻¹ en mettant dans le puit de l'électrode 20 µL d'une solution aqueuse de ruthénium à 0,02 mol.L⁻¹ avec 380µL d'une solution de tampon phosphate PBS à 1.10⁻² mol.L⁻¹. La concentration finale du complexe de ruthénium dans le puits est de l'ordre de 1 mM.

Cette expérience a été effectuée sur des électrodes en carbone vitreux, en ITO commercial et préparé au laboratoire ainsi que sur une électrode en graphène.

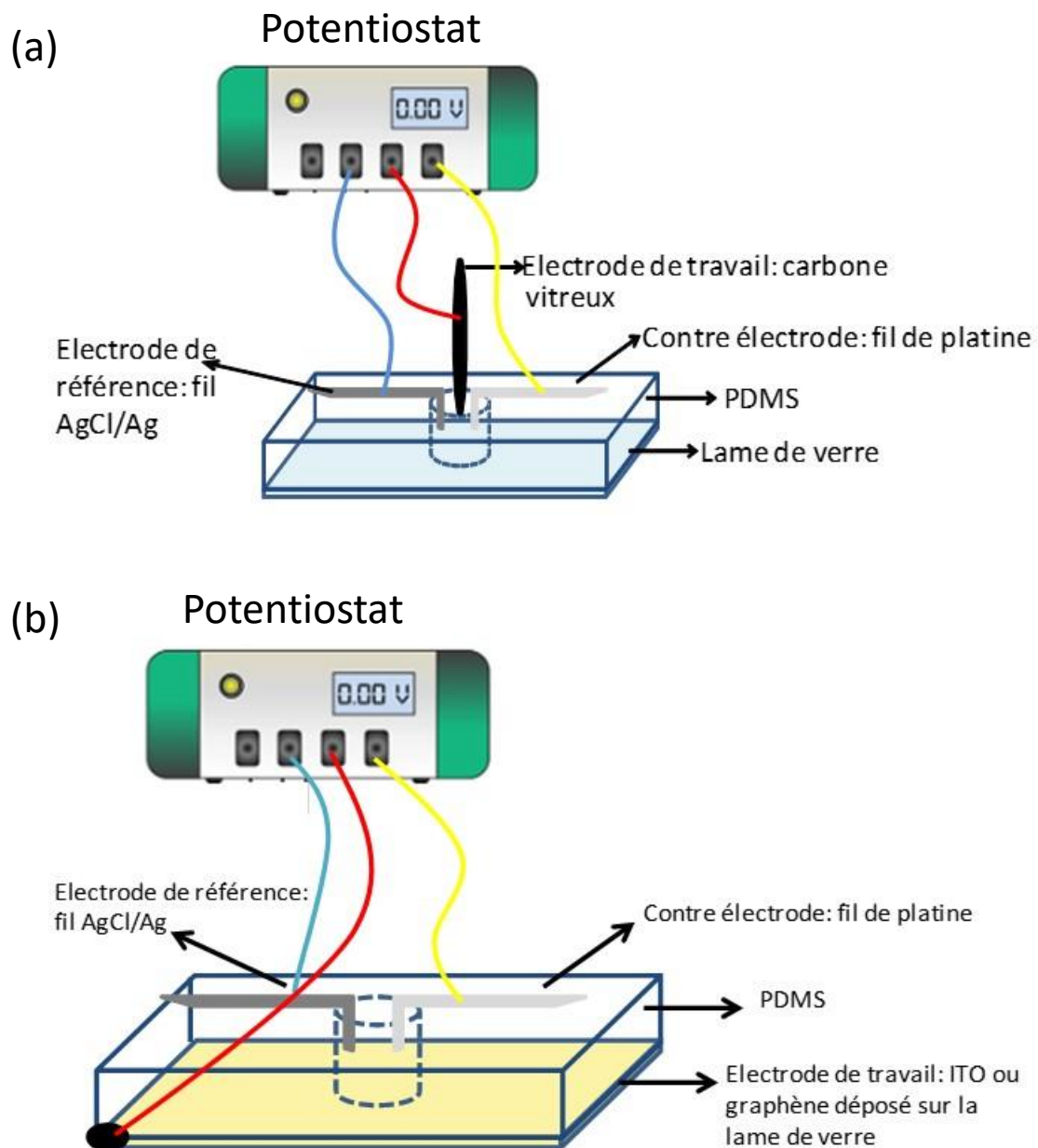


Figure 37 : Dispositif électrochimique pour l'enregistrement des voltampérogrammes avec une électrode de travail en carbone vitreux (a) et une autre transparente déposée à la surface de la lamelle de verre(b) (l'électrode est en ITO ou graphène).

La caractérisation électrochimique du luminophore a été réalisée par voltampérométrie cyclique pour quatre types de matériaux d'électrode différents.

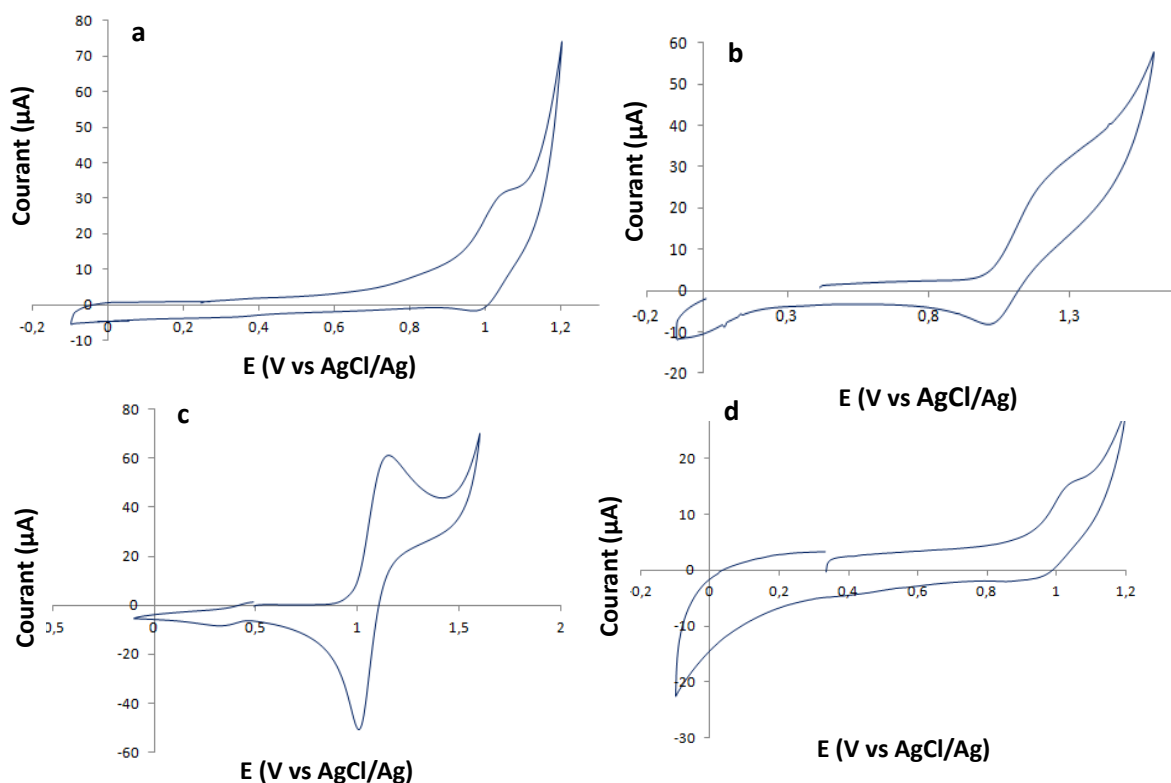


Figure 38 : Voltampérométrie cyclique d'une solution de complexe $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ à 1 mmol.L^{-1} dans un milieu tampon phosphate à 10 mmol.L^{-1} et $\text{pH} = 7,54$, sur différents matériaux d'électrode. Nature de l'électrode de travail : (a) carbone vitreux de diamètre $d = 3\text{mm}$, (b) oxyde d'indium-étain commercial de diamètre $d = 7 \text{ mm}$, (c) oxyde d'indium-étain préparé au laboratoire et $d= 7 \text{ mm}$, (d) graphène de diamètre $d= 7 \text{ mm}$. Vitesse de balayage $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$. L'électrode de référence est en Ag/AgCl et la contre électrode est un fil de platine de diamètre 1 mm et de longueur 1 cm .

Lorsque l'électrode de travail est immergée dans une solution de ruthénium, on constate l'apparition d'une vague d'oxydation entre $+1$ et $+1,2 \text{ V}$ selon la nature du matériau d'électrode utilisé correspondant à l'oxydation du Ru^{II} en Ru^{III} .

L'intensité de pic de cette vague d'oxydation diffère également d'un matériau à l'autre car les électrodes présentent des aires géométriques différentes. De façon à pouvoir comparer correctement les résultats obtenus, les intensités de courant ont donc été transformées en densité de courant sachant que les diamètres des électrodes utilisés étaient de 3mm (carbone vitreux) et de 7 mm (ITO et graphène).

$$\text{La densité de courant } J \text{ en } \text{A/m}^2 = \frac{\text{l'intensité en } A}{\text{la surface de l'électrode en } \text{m}^2}$$

Tableau 4 : comparaison des densités de courant de pic d'oxydation (obtenu par lecture directe sur les voltampérogrammes) du complexe du ruthénium (bpyridine) (II) sur différents matériaux d'électrode.

Matériau	Surface (m ²)	Densité (A/m ²)
Carbone vitreux	7.10 ⁻⁶	5.71
ITO commercial	4.10 ⁻⁵	1
ITO « maison »	4.10 ⁻⁵	1.5
Graphène (Monocouche)	4.10 ⁻⁵	0.5

D'après les résultats regroupés dans le tableau ci-dessus, on peut observer que la densité de courant d'oxydation du complexe de ruthénium est meilleure sur une électrode en carbone vitreux.

La voltampérométrie cyclique révèle également que l'oxydation du complexe [Ru(bpy)₃]²⁺ est réversible (existence d'une vague de réduction lors du balayage retour). Pour l'ITO préparé au laboratoire, on a constaté une cinétique de transfert d'électron plus rapide, ce que matérialise une largeur de pic beaucoup plus faible que sur les autres voltampérogrammes rendant la vague de réduction plus visible au balayage retour.

3. Comportement électrochimique du co-réactif

Sur les mêmes matériaux utilisés précédemment, nous avons réalisé une étude électrochimique de la tris-*n*-propylamine à une concentration de 0,1 mol.L⁻¹.

Les voltampérogrammes sont présentés dans la Figure 39 :

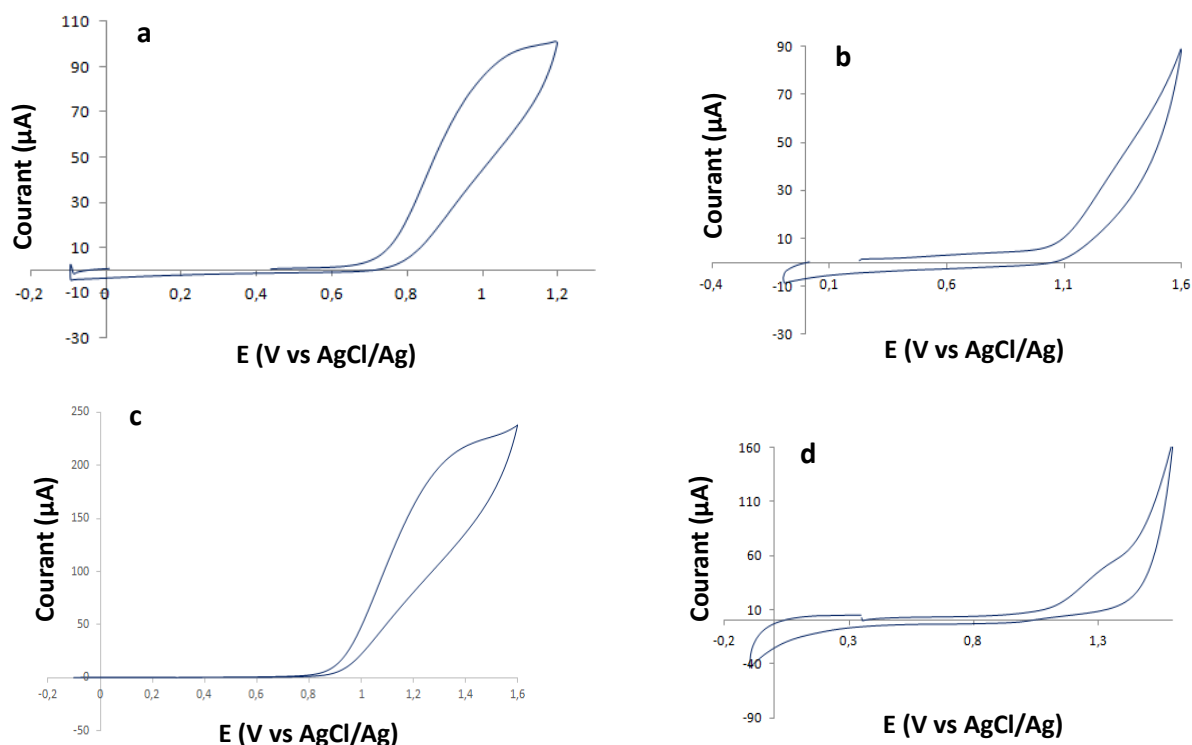


Figure 39 : Voltampérométrie cyclique d'une solution de tri-*n*-propylamine à 0,1 mol.L⁻¹ dans un milieu tampon phosphate à 10 mmol.L⁻¹ et pH = 7,54, sur différents matériaux d'électrode. Electrode de travail : (a) carbone vitreux de diamètre d = 3 mm, (b) oxyde d'indium-étain commercial de diamètre d= 7 mm, (c) oxyde d'indium-étain préparé au laboratoire et d = 7 mm, (d) graphène de diamètre d = 7 mm. Vitesse de balayage $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$. L'électrode de référence est en Ag/AgCl et la contre électrode est un fil de platine de diamètre 1mm et de longueur 1cm.

Les voltampérogrammes montrent que la tris-*n*-propylamine présente une vague d'oxydation irréversible entre +1 et +1,4 V selon la nature du matériau. En calculant les densités de courant, on a obtenu le tableau suivant :

Tableau 5 : Comparaison des densités de courant de pic d'oxydation (obtenu par lecture directe sur les voltampérogramme) de la tri-*n*-propylamine sur différents matériaux d'électrode.

Matériau	Surface (m ²)	Densité (A/m ²)
Carbone vitreux	7.10^{-6}	12,8
ITO commercial	4.10^{-5}	1,25
ITO « maison »	4.10^{-5}	5
Graphène (monocouche)	4.10^{-5}	1,25

L'oxydation de la TPrA est mieux marquée sur le carbone vitreux et sur l'ITO préparé au laboratoire.

Cette étude électrochimique, effectuée sur le luminophore et le co-réactif, montre que la vitesse de transfert de charge est importante sur l'électrode de carbone vitreux mais aussi sur l'ITO préparé au laboratoire pour les deux espèces réactives utilisés.

Les résultats obtenus sont très différents selon le type de matériau, la densité de courant est beaucoup plus élevée sur l'électrode de carbone vitreux que sur les autres matériaux et cette différence est très vraisemblablement liée à la surface réellement active de l'électrode. Cette surface ne correspond pas à la surface géométrique mais plutôt à la surface conductrice de l'électrode. Sur ITO ou sur graphène, les défauts en surface donnent des valeurs de densité de courant « apparentes » peu reproductibles. Ce qui veut dire aussi que la densité de courant représente au final les défauts de phase (graphène) ou les hétérogénéités des surfaces d'électrode.

4. Détection synchronisée du courant d'oxydation et du signal lumineux

Le couplage des enregistrements du signal faradique (courant) et du signal électrochimiluminescent a été réalisé lors du balayage voltampérométrique.

Cette expérience a été mise en œuvre sur les électrodes en carbone vitreux, en ITO et en graphène. Pour chaque expérience on a mis dans le puits de la cellule électrochimique 20 μL de la solution de ruthénium de concentration $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ et 380 μL de la solution de tri-*n*-propylamine de concentration $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ et $\text{pH} = 7,3$.

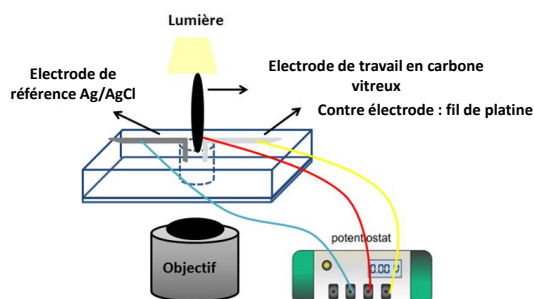


Figure 40 : Dispositif du couplage électrochimiluminescent avec une électrode de travail en carbone vitreux.

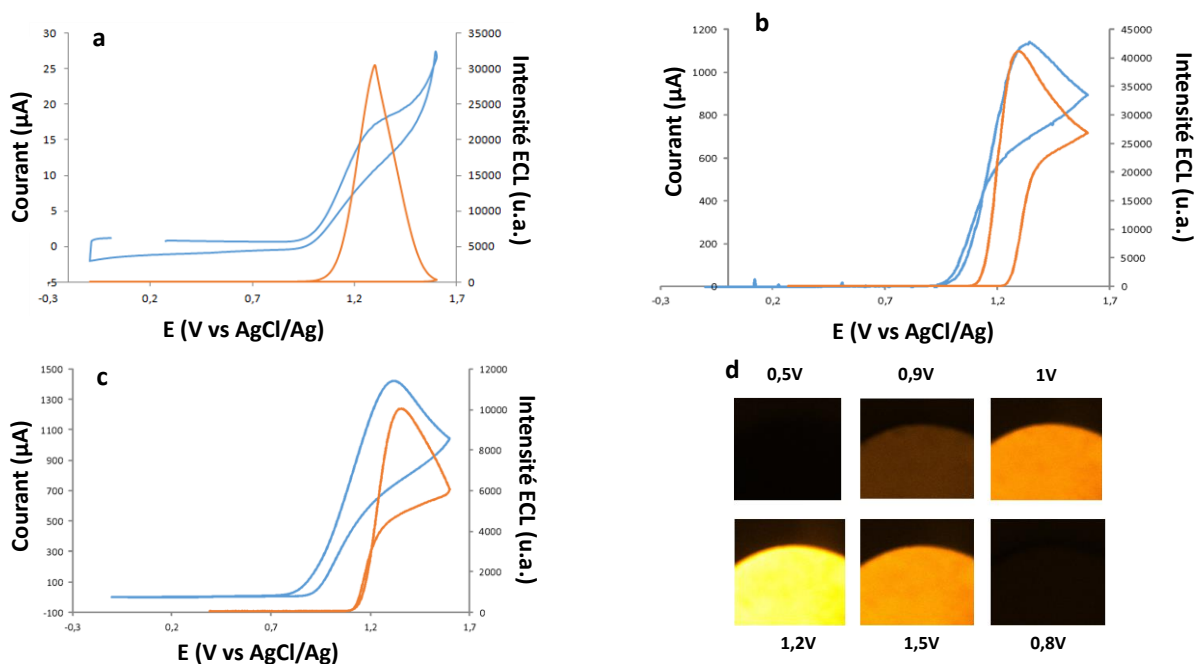


Figure 41 : Propriétés électrochimiluminescentes du système $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et tri-*n*-propylamine. Voltampérogrammes cycliques (en bleu) et intensité d'électrochimiluminescence (en orange) enregistrés sur différents matériaux d'électrode. (a) carbone vitreux (b) ITO commercial (c) ITO préparés au laboratoire. Vitesse de balayage $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. (d) Image en microscopie optique en absence d'irradiation sur une électrode de carbone vitreux. Conditions : $380 \mu\text{L}$ d'une solution de tri-*n*-propylamine ($C = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) et de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($C = 1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) dans un tampon phosphate à $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,54$). L'électrode de référence est en Ag/AgCl et la contre électrode est un fil de platine de diamètre 1mm et de longueur 1 cm.

Le couplage entre l'électrochimie et la luminescence montre que l'intensité de la lumière varie de façon synchronisée avec le potentiel avec un maximum vers +1,2 V. A ce potentiel, on oxyde donc à la fois le co-réactif et le luminophore en accord avec le mécanisme dit du « co-réactif ».

Cette étude permet d'identifier le potentiel à appliquer pour obtenir un maximum d'émission lumineuse. Vers 1,2 V on a une intensité lumineuse maximale synchronisée avec le courant faradique, lié principalement à l'oxydation de la TPrA qui est introduite en excès par rapport au complexe de ruthénium.

Nous avons enregistré l'apparition d'un signal lumineux sur tous les matériaux d'électrode mais la transparence de l'ITO en fait un matériau plus adapté pour le reste du travail.

L'identification du potentiel auquel apparaissent simultanément un maximum d'intensité de courant et d'émission de lumière établit les conditions optimales pour détecter, par

électrochimiluminescence, la perméabilisation de la membrane et la libération du contenu d'un liposome à la surface d'une électrode polarisée.

IV. Détection électrochimique de l'évènement de l'ouverture à la surface d'une électrode polarisée

Avant d'arriver à la détection de l'ouverture des liposomes par électrochimiluminescence, nous avons décidé de mettre en évidence cette ouverture, d'abord, par électrochimie, comme décrit dans les travaux de Compton et Ewing.

1. Cellule électrochimique utilisée pour la détection de l'ouverture du liposome et expérience réalisée

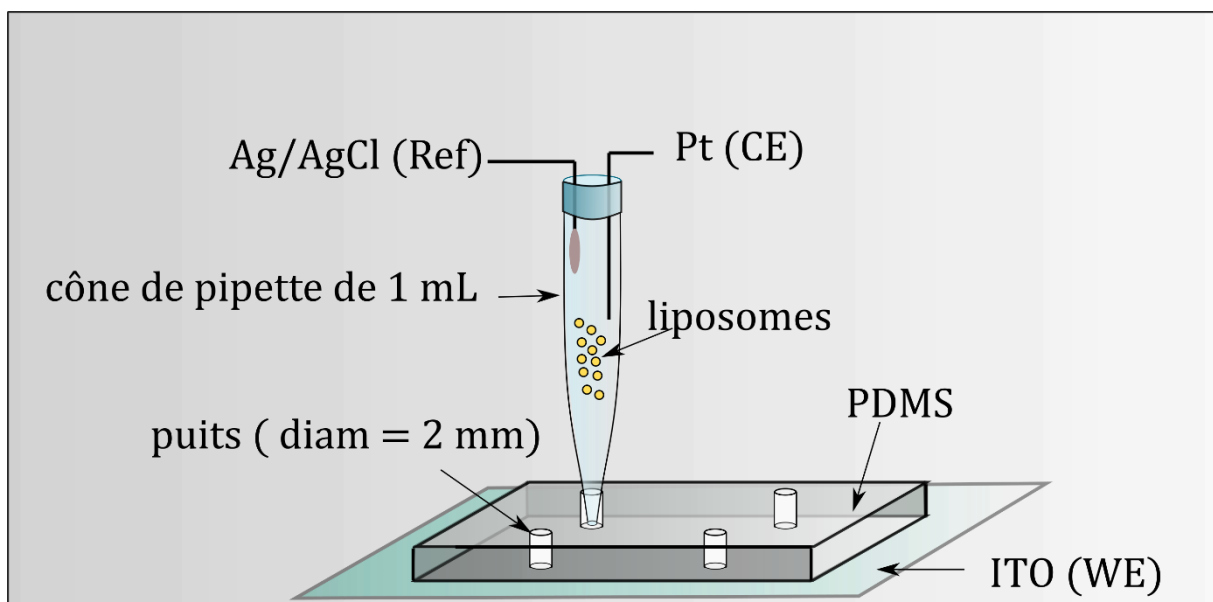


Figure 42 : Cellule électrochimique préparée au laboratoire et utilisée pour la détection de l'ouverture des liposomes par électrochimie. L'électrode de travail est une lamelle de verre d'épaisseur $e_1 = 130 \mu\text{m}$ couverte par une couche d'ITO d'épaisseur $e_2 = 150 \text{ nm}$. L'électrode de référence est un fil d'Ag/AgCl et la contre électrode est un fil de platine de diamètre égal à 1mm et de longueur égale à 1 cm.

Cette cellule électrochimique préparée au laboratoire est percée de « puits » de diamètre millimétrique, ce qui nous a permis d'avoir un bon rapport signal/bruit pour l'enregistrement faradique.

Plus précisément, la partie inférieure de la cellule est constituée de puits en PDMS (polydiméthylsiloxane), de diamètre $D = 2 \text{ mm}$, collés sur une lame de microscope en verre,

d'épaisseur égale à 130 μm , recouverte d'une fine couche d'oxyde d'indium et d'étain (ITO, 150 nm d'épaisseur).

La partie supérieure est un cône de micropipette (1 mL de volume) qui est inséré verticalement dans le puit en PDMS au contact de la surface verre/ ITO, délimitant ainsi une électrode de travail dont la taille est proche du diamètre intérieur de la pointe de la micropipette (environ 800 μm mesuré par microscopie). Une électrode en Ag/AgCl et un fil de platine ont été utilisés comme électrode de référence et contre électrode respectivement placés dans la partie supérieure du cône.

2. Résultats obtenus suite à la perméabilisation de la bicouche lipidique

2.1. Mise en évidence électrochimique de la perméabilisation de liposomes ne contenant que du sucrose dans du PBS

En utilisant la méthode de préparation des liposomes décrite au début de ce chapitre, nous avons préparé des liposomes ne contenant qu'une solution de sucrose (0,7 M) dans du PBS. Ces liposomes sont ajoutés dans la cellule électrochimique tandis que l'électrode de travail est polarisée à un potentiel de 1,2 V.

Le courant est alors enregistré en fonction du temps et parallèlement, les images observées par microscopie montrent l'ouverture des liposomes à la surface de l'électrode. Cette expérience joue le rôle d'expérience de contrôle.

Dans ces conditions on a obtenu le graphique ci-dessous qui montre l'absence de courant faradique, preuve de l'oxydation de la solution encapsulée dans les liposomes.

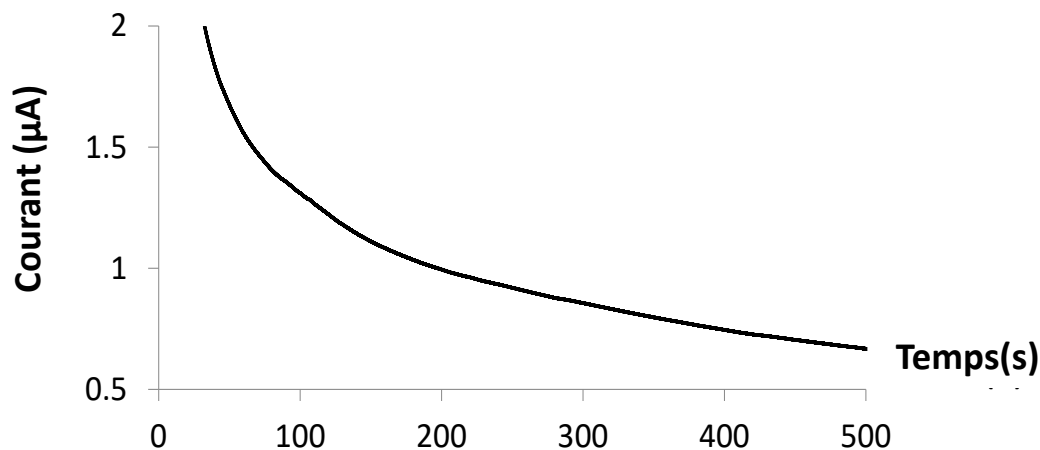


Figure 43 : Trace chronoampérométrique typique obtenue suite à l'ouverture des liposomes contenant une solution de sucrose de concentration $C_{\text{sucrose}} = 0,7\text{M}$, à la surface d'une électrode de travail en ITO polarisée à $1,2\text{ V vs. Ag/AgCl}$.

2.2. Détection électrochimique de l'évènement d'ouverture des liposomes contenant le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et la TPrA

Suite à l'introduction des liposomes dans la cellule formée par le cône de pipette et la surface d'ITO, la libération de la solution intra-vésiculaire d'une partie de la population de vésicules sur l'électrode de travail en ITO, polarisée à $+1,2\text{ V}$ ³, fournit la trace chronoampérométrique suivante (Figure 44).

³ A noter que quand l'électrode était polarisée à $+0,5\text{ V}$, nous n'avons pas observé des ouvertures sur les bicouches lipidiques et les liposomes sont restés stables.

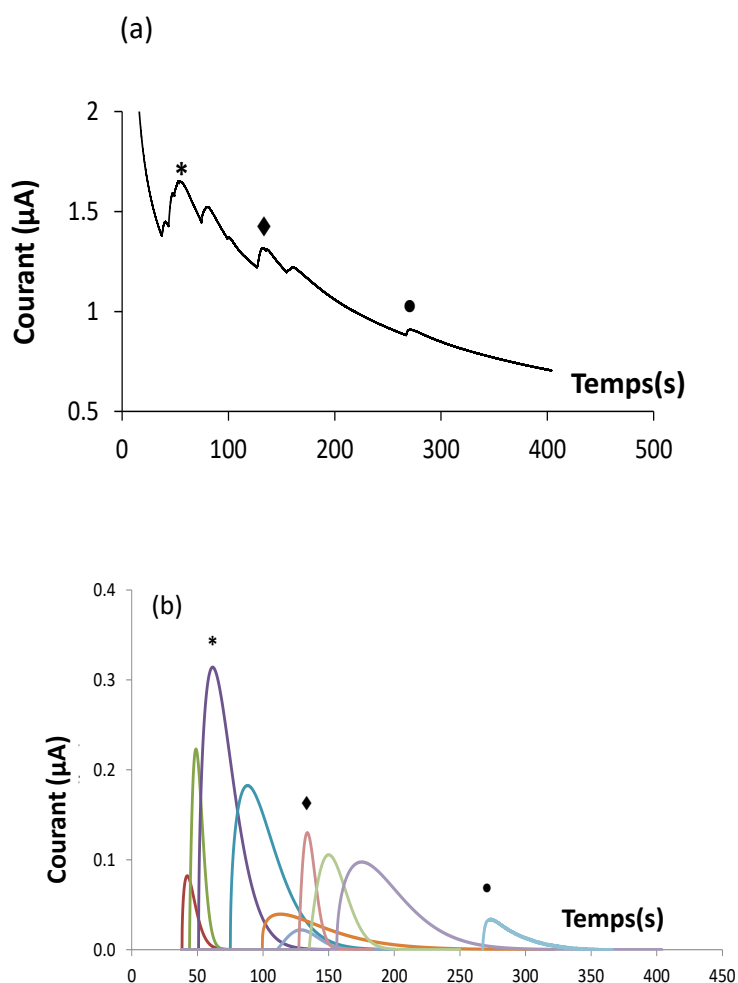


Figure 44 : Signal chronoampérométrique typique montrant l'oxydation de la solution intra-vésiculaire ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($C = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) et TPrA ($C = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$)) à la surface d'une électrode polarisée à un potentiel égal à 1,2 V vs AgCl/Ag (a). La figure (b) montre les pics ampérométriques après déconvolution.

Dans cette expérience, les liposomes arrivent à la surface de l'électrode de façon erratique, par cela nous voulons dire que nous ne contrôlons pas l'échelonnement de la sédimentation des liposomes sur la surface d'ITO. Cela est très visible sur la trace chronoampérométrique obtenue (Figure 44a) où l'arrivée simultanée de plusieurs liposomes se traduit par des pics de courant d'oxydation superposés.

Pour pouvoir séparer ces pics chronoampérométriques et obtenir la Figure 44 b, nous sommes passés par une étape d'analyse décrite et expliquée dans le paragraphe suivant.

2.2.1 Traitement déconvolutif du signal ampérométrique

Ce traitement se déroule en deux étapes principales, à savoir la soustraction de la ligne de base puis la déconvolution des pics superposés.

Première étape : soustraction du courant capacitif

Cette étape consiste, en premier lieu à simuler, à partir de la trace chronoampérométrique obtenue, la décroissance du courant capacitif qui représente la ligne de base des chronoampérogrammes.

Nous avons dans ce contexte utilisé une méthode développée au laboratoire, par le Dr. Yann Bouret et intégrée à un logiciel de simulation (« MultiExponentialFit ») qui consiste à modéliser la ligne de base d'un chronoampérogramme en se basant sur ses deux portions (au début et à la fin) qui ne contiennent pas de pics de courant faradique (Figure 45 a) par l'intermédiaire de l'équation suivante mettant en jeu la somme de plusieurs exponentielles décroissantes :

$$i_{baseline} = Ae^{-k_1t} + Be^{-k_2t} + Ce^{-k_3t}$$

A, B, C, k1, k2 et k3 sont des constantes adaptées pour obtenir la meilleure simulation possible. Dans notre cas, le coefficient de régression linéaire est toujours excellent ($R^2 > 0,99$) pour les différentes traces traitées.

Le courant capacitif modélisé est alors soustrait de la trace chronoampérométrique brute et nous obtenons un chronoampérogramme avec une ligne de base proche de zéro et dont les pics, extraits de la trace brute, correspondent en totalité à la contribution faradique du courant. Ils restent toutefois, à ce stade, superposés pour la plupart et donc restent inexploitable.

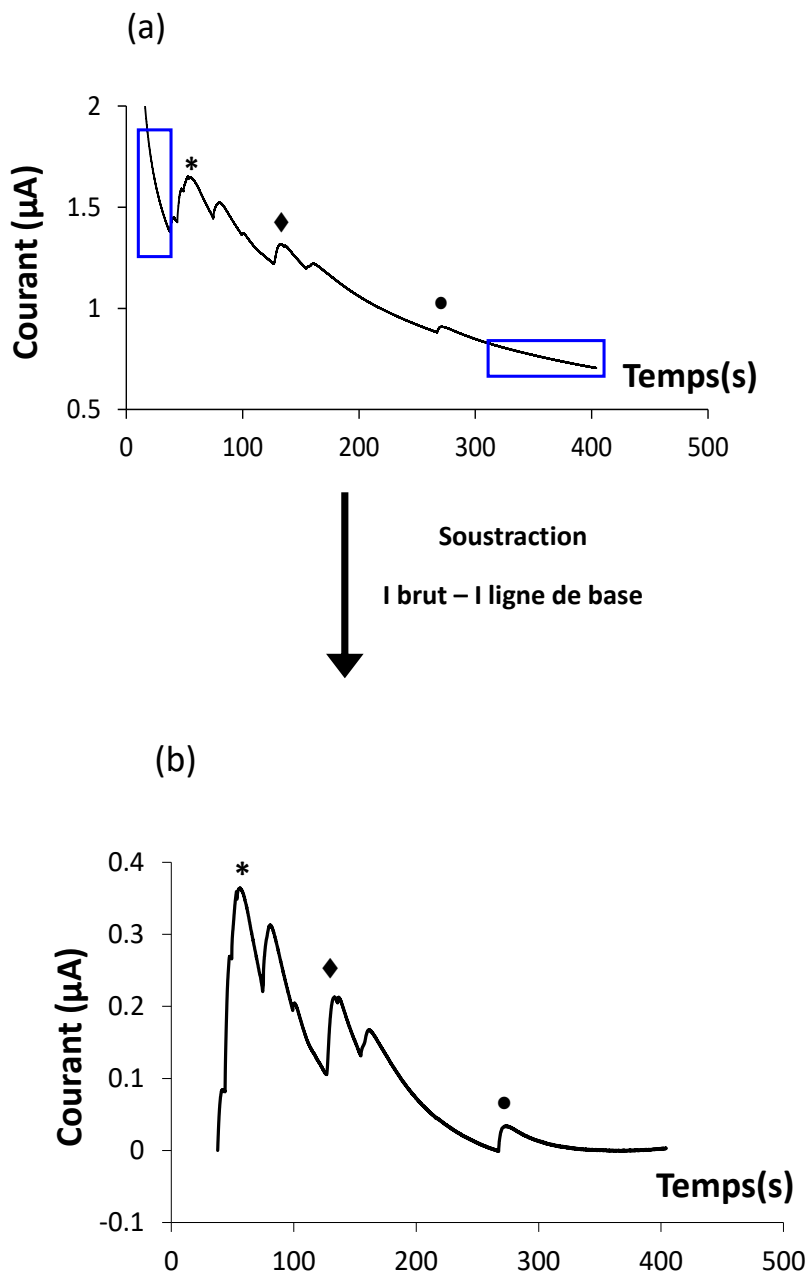


Figure 45 : Signal chronoampérométrique de l'oxydation de la solution intra-vésiculaire ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($C= 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) et TPrA ($C= 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$), à la surface d'une électrode d'ITO polarisée à un potentiel égal à $1,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, avant (a) et après (b) la soustraction du courant capacitif.

Deuxième étape : traitement du signal par déconvolution

Après avoir extrait les signaux faradiques de la trace chronoampérométrique brute, nous passons au traitement du signal afin de séparer les pics. Le principe de cette méthode de déconvolution consiste à modéliser chaque pic en n'ayant accès qu'à une partie de ce pic (i.e. la partie chevauchée avec un autre pic). Le principe est de pouvoir extrapoler ce fragment de pic pour l'extraire ensuite de la trace. Pour ce faire, il faut trouver la fonction qui modélise au mieux nos pics.

Comme nous pouvons le voir sur la figure, et malgré la présence de nombreux pics de courant superposés, il existe un seul pic bien isolé des autres (le dernier pic vers 270 s). Ce pic est donc mis à profit en tant que modèle représentatif pour définir la fonction qui les modélise le mieux.

Sigma Plot 12.0 (Systat Software Inc.) est un logiciel d'analyse et de traitement de données qui offre la possibilité de modéliser des pics par de nombreuses fonctions. Parmi ces dernières (Gauss, Lorentz, Voigt...), nous avons constaté, comme le montre la Figure 46, que la loi de Weibull à cinq paramètres était bien adaptée avec un R^2 dépassant toujours 0,99 quel que soit le pic isolé et analysé. Cette loi présente un intérêt en lien avec son expression mathématique « flexible » où 5 constantes (a, b, c, t_0, x_0) permettent, ensemble ou séparément, de définir pour un pic donné son amplitude (a, c), sa montée (b, t_0), ainsi que sa largeur et son centrage (b, c, x_0) [87].

$$i_{pic} = i_0 + a \left(\frac{c-1}{c} \right)^{\frac{1-c}{c}} \left[\frac{t-t_0}{b} + \left(\frac{c-1}{c} \right)^{1/c} \right]^{c-1} e^{- \left[\frac{t-t_0}{b} + \left(\frac{c-1}{c} \right)^{1/c} \right]^c + \frac{c-1}{c}}$$

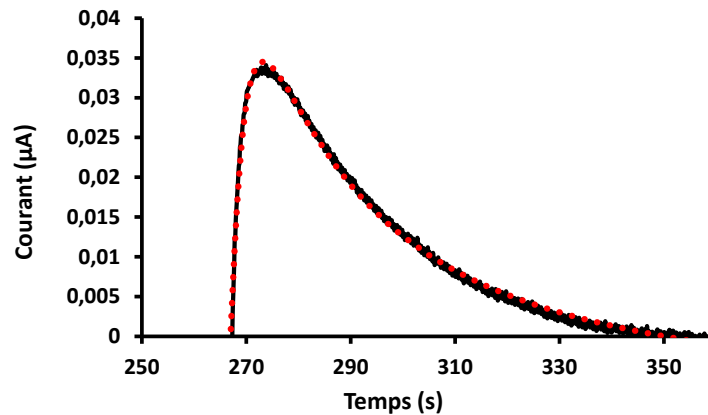


Figure 46 : La loi de Weibull et la superposition d'un pic isolé du chronoampérogramme obtenu (en noir) et de la modélisation du pic par la loi de Weibull (en pointillé rouge) qui montre que cette loi offre la meilleure modélisation pour nos pics.

Nous traitons, ici, un exemple de traitement mathématique pour séparer des pics superposés et les étapes suivies lors de cette analyse sont schématisées et expliquées sur la figure.

- a) Le premier pic isolé (Figure 47 c) est extrait de la trace après la soustraction du courant capacitif (Figure 47 b)
- b) Cette dernière est alors modélisée puis extrapolée par la fonction de Weibull (Figure 47 d)
- c) Le pic reconstitué est alors extrait par soustraction du mélange de pics (Figure 47 f)
- d) La procédure est alors répétée sur le pic suivant jusqu'à séparation de tous les pics de la trace.

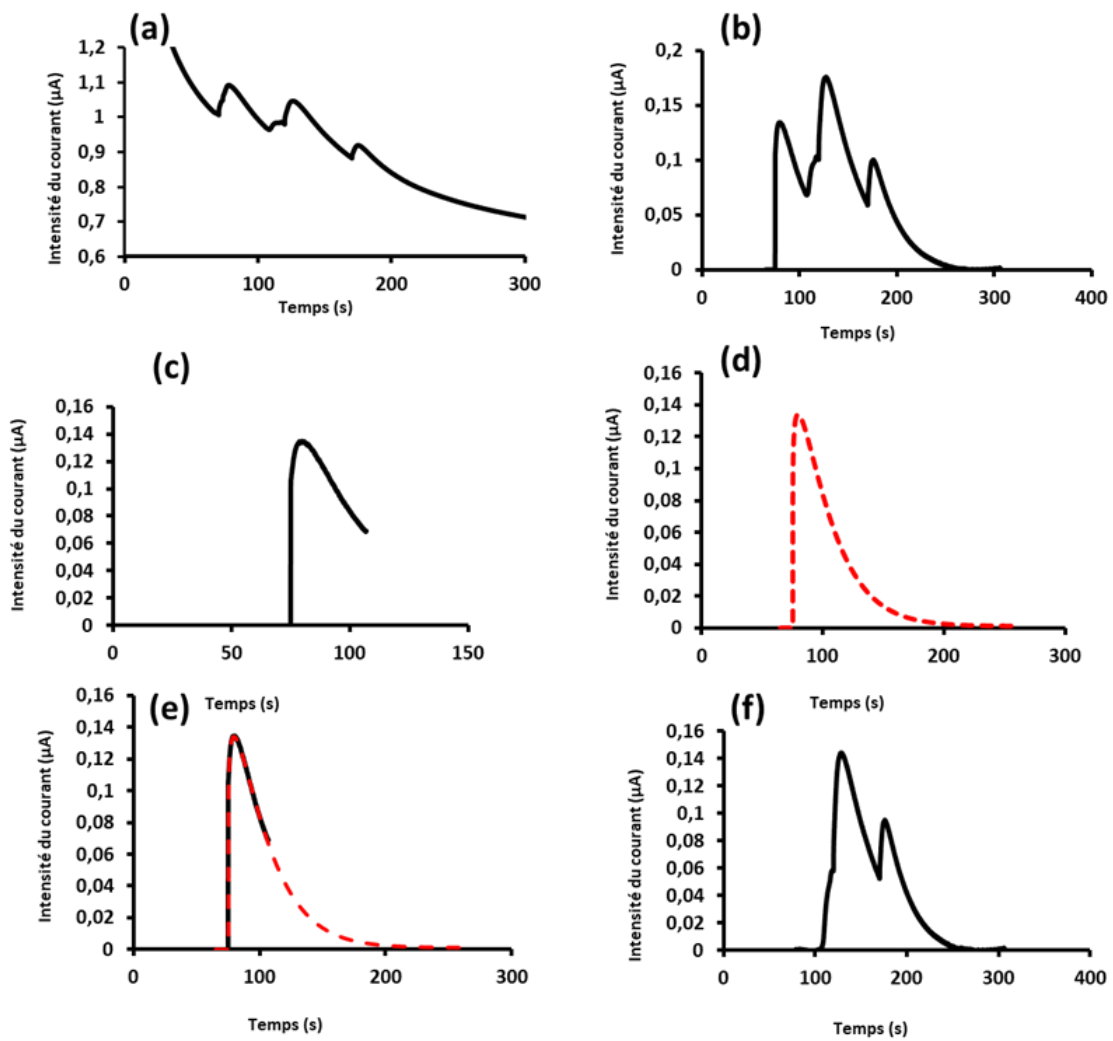


Figure 47 : Les étapes suivies lors du traitement mathématique au cours de l'étape de déconvolution.

Cette méthode d'analyse tire sa force du fait qu'elle repose sur une approche robuste et rigoureuse en lien avec les points suivants :

- Il s'agit d'une analyse « semi-automatisée » en ce sens qu'elle permet de garder le contrôle sur le modèle et de faire les vérifications nécessaires entre les étapes. La partie automatique est donc réduite aux modélisations individuelles des pics

- En électrochimie, le courant capacitif en chronoampérométrie est généralement modélisé par une équation mono-exponentielle de forme $i = Ae^{-kt}$ résultant de la décharge de la double couche électrochimique. Toutefois, des matériaux d'électrodes plus complexes (semi-conducteurs ou surfaces non homogènes) conduisent à des lois moins triviales et nécessitent de prendre en compte des régions d'électrodes hétérogènes avec des constantes de temps distribuées qui sont modélisées par plusieurs contributions et donc par plusieurs exponentielles, en accord avec l'équation que nous avons utilisée ;

- La fonction de Weibull a été choisie pour son adéquation mathématique avec la morphologie des pics étudiés et sa facilité à modéliser une grande variété de courbes ayant la morphologie d'un pic. Il est à noter qu'elle n'est pas dénuée de sens physico-chimique. En effet, son expression mathématique est la convolution d'une fonction polynomiale croissante et d'une exponentielle décroissante. Ce type de comportement est en accord avec un mécanisme de libération de type « ouverture/diffusion » qui a été observé au sein de plusieurs travaux qui étudient la libération vésiculaire par électrochimie dans des phénomènes biologiques comme l'exocytose et le stress oxydant [88].

3. Etude statistique

Après déconvolution, chaque pic traduit la quantité d'espèces électroactives libérées et oxydées d'un seul liposome. Donc cela nous donne la possibilité de déterminer la charge Q de chaque pic, par intégration. En se basant sur la loi de Faraday et sur la concentration d'origine des réactifs dans le liposome, on peut alors relier cette charge au volume et donc au rayon des vésicules impliquées. Ainsi, nous avons déterminé le rayon de chaque liposome ouvert et tracé la courbe statistique qui montre la distribution de taille des liposomes.

$$Q = nF \times CV = \frac{4}{3}\pi nFCR^3$$

Exemple d'application numérique : Pour un liposome de 50 μm de rayon

$$Q = \frac{4}{3} \times \pi \times 1 \times 96500 \times 100 \times 10^{-3} \times (50 \times 10^{-6})^3 \times 10^3 = 5.10^{-6} \text{ C C}$$

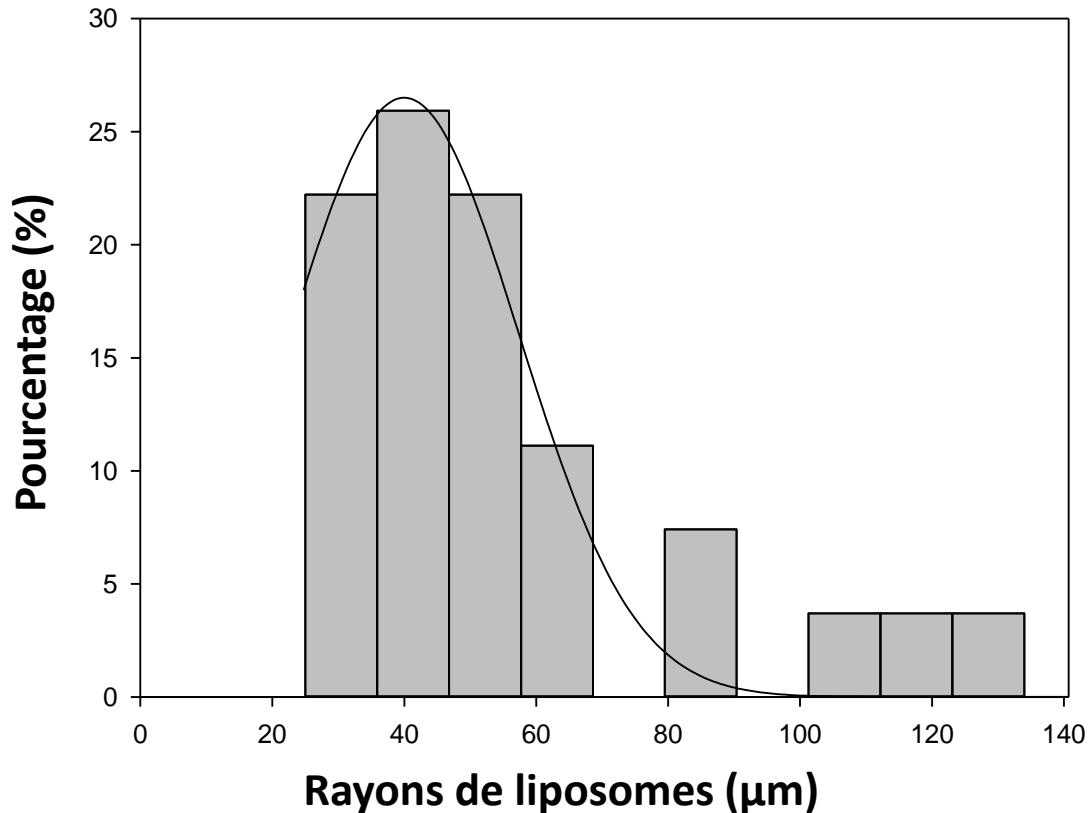


Figure 48 : Etude de la distribution de tailles de liposomes obtenues à partir des pics d'oxydation de la solution encapsulée dans ces liposomes contient le $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($C = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) et la TPrA ($C = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$). La figure représente le pourcentage de liposomes en fonction des valeurs de rayons obtenues par intégration, pour 27 évènements d'oxydation.

Sur le graphique ci-dessus, nous constatons que le rayon moyen des liposomes se situe autour de 50 μm , ce qui correspond bien au rayon des gouttes formées dans le canal microfluidique. Cette correspondance atteste de l'oxydation de la totalité du contenu des liposomes concernés. Sur la même figure, nous remarquons que l'intégration des pics a donné des valeurs de rayons inférieurs et supérieurs à 50 μm .

Dans le cas des rayons inférieurs à 50 μm , nous pouvons dire que cela correspond à une oxydation partielle de la solution encapsulée. Cette oxydation partielle est due probablement

à la temporalité d'ouverture du liposome et à la localisation de la zone de perméabilisation par rapport à l'électrode. Plus le pore formé est proche de la surface de l'électrode, plus grande est la quantité de matière oxydée.

Pour les rayons recalculés supérieurs à 50 μm , une explication rationnelle est une fusion des gouttes lors de la première étape de fabrication des liposomes. Idéalement, la valeur du rayon augmente avec le nombre n de gouttes fusionnées selon la formule suivante :

$R = r\sqrt[3]{n}$, Avec R : le rayon de la goutte obtenue de la fusion et r : rayon d'une goutte individuelle.

Après avoir établi l'ouverture de liposomes par électrochimie nous nous sommes tournés vers l'observation des événements d'ouverture de vésicules par photoluminescence et par électrochimiluminescence.

V. Triple détection de l'évènement d'ouverture des liposomes : couplage de l'électrochimie, de la photoluminescence et de l'électrochimiluminescence

1. Dispositif utilisé pour coupler les trois techniques

Pour coupler l'électrochimie à la photoluminescence et l'électrochimiluminescence, nous avons réalisé le dispositif suivant :

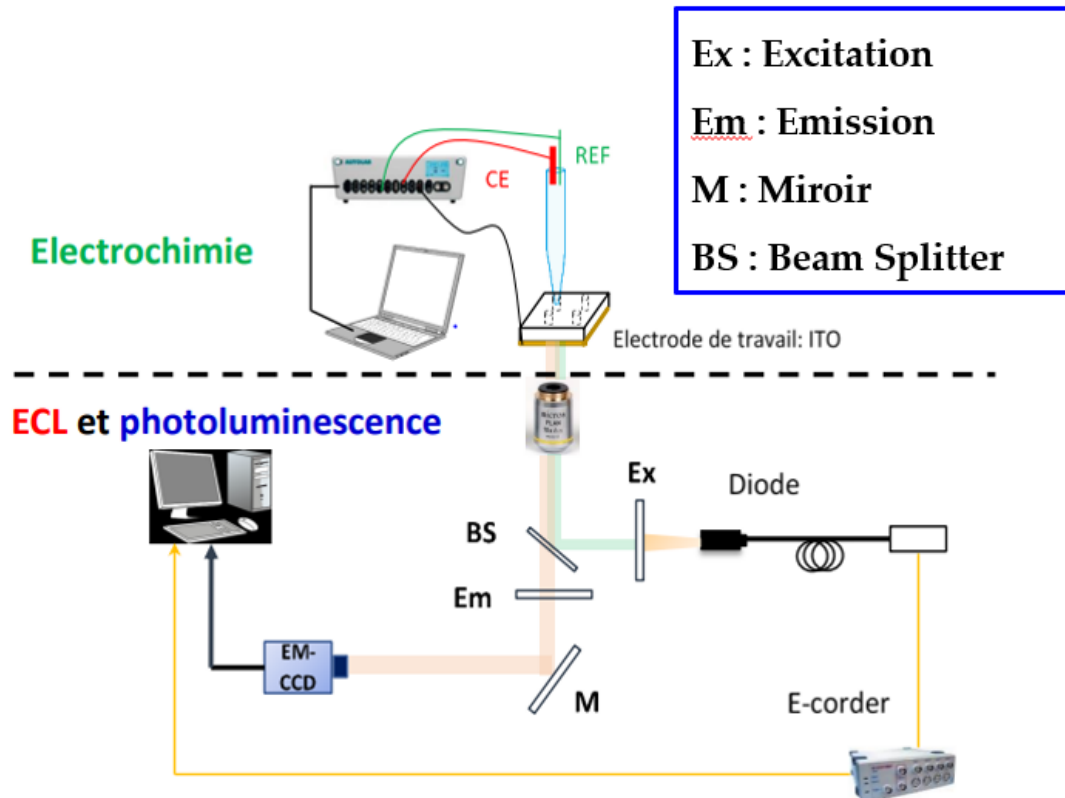


Figure 49 : Dispositif utilisé pour le couplage de l'ECL avec l'électrochimie et la photoluminescence.

Ce dispositif est composé de deux parties :

- Une première partie destinée aux mesures électrochimiques constituée par la cellule électrochimique, utilisée dans la partie précédente, reliée à un potentiostat et posée sur un microscope inversé.
- Une deuxième partie permet d'enregistrer les images en photoluminescence et en électrochimiluminescence grâce à une caméra EM-CCD. Les deux types d'images sont collectées par la même caméra à la faveur d'un échantillonnage réalisé à partir d'une diode clignotante et un jeu de filtre 43 HE (excitation à BP 550/25 (HE) et émission à BP 605/70 (HE). Ce filtre correspond au filtre d'excitation Ex sur la Figure 49) qui permet d'exciter à la fois le ruthénium encapsulé et le NBD dans les membranes.

2. Acquisition et collections des informations

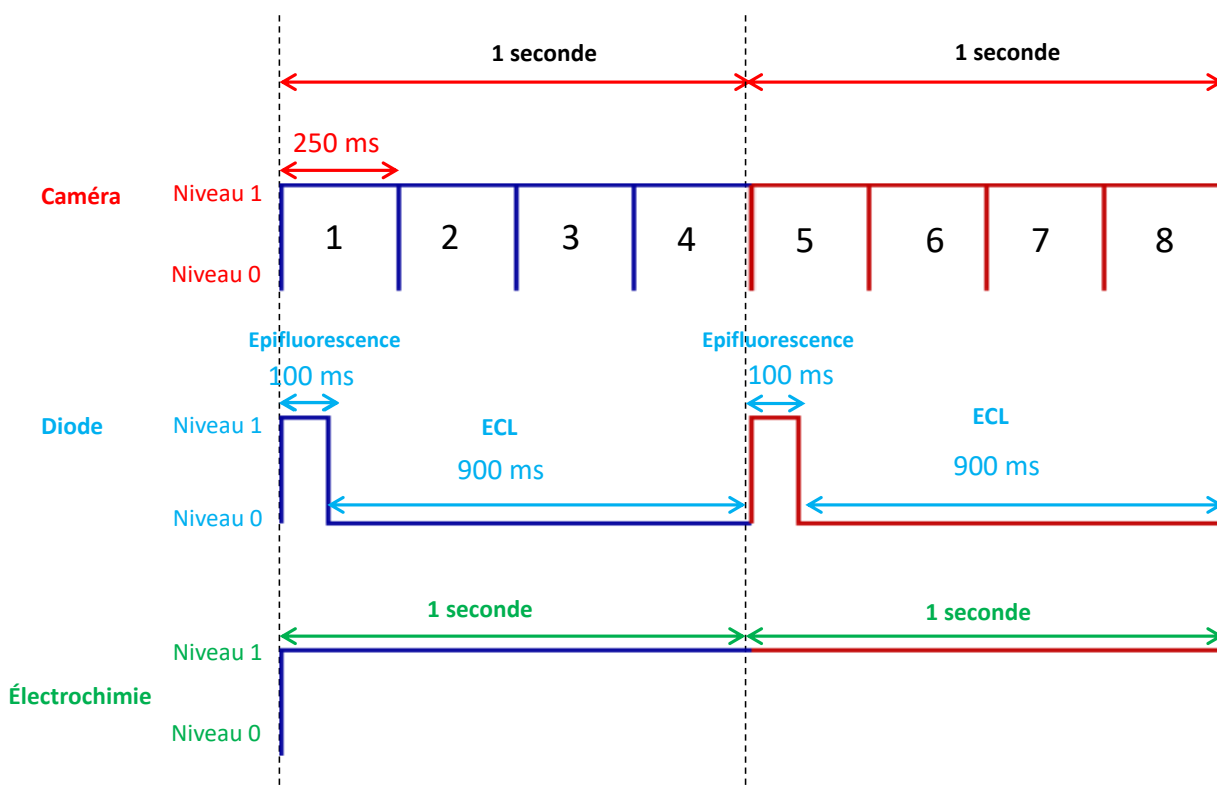


Figure 50 : Acquisition utilisée pour la collection simultanée des données en électrochimie, ECL et photoluminescence. La figure correspond à l'acquisition pendant 2 secondes.

Comme nous pouvons le voir sur la Figure 50, la caméra enregistre les images, de façon échantillonnée, avec un temps d'exposition égal à 250 ms ce qui a permis d'obtenir quatre images par seconde.

Sous le contrôle d'un système d'enregistrement de données (e-corder), la diode est programmée pour être allumée pendant 100 ms pour permettre l'excitation des fluorophores qui sont dans la membrane et à l'intérieur des liposomes et éteinte pendant 900 ms pour faciliter la détection de la lumière générée par ECL.

Les images en photoluminescence correspondent aux temps d'exposition au cours desquels la diode est allumée (exemple : images 1 et 5 sur la Figure 50) et les images en ECL sont sélectionnées quand la diode est éteinte (exemple : les images 3 et 7 sur la même figure sont les images en ECL sélectionnées pour éviter les chevauchements avec la photoluminescence).

3. Résultats et interprétation : étude visuelle et quantitative

3.1. Etude visuelle

Après la séparation des images, nous avons construit deux séries d'images, comme le montre la Figure 51.

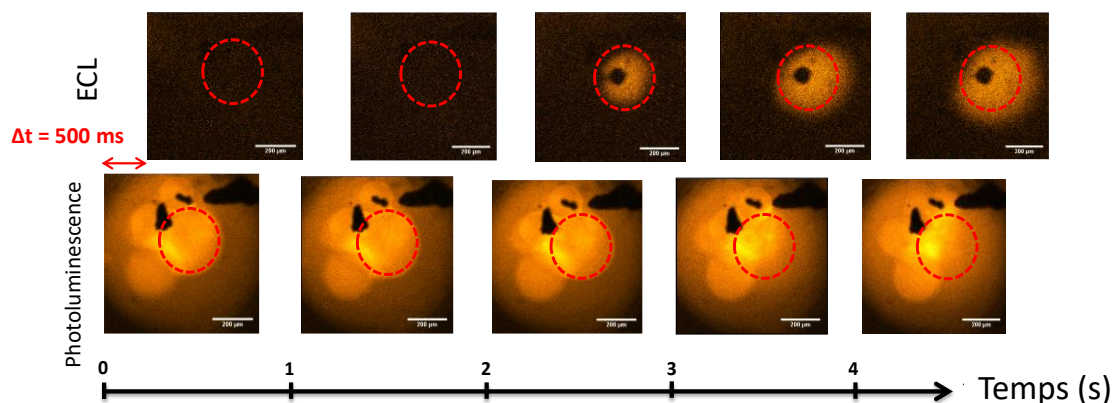


Figure 51 : Images obtenues en ECL et en photoluminescence qui montrent l'ouverture d'un liposome (cercle en traits pointillés rouge) à la surface d'une électrode et la détection d'ECL. Barre d'échelle : 200 μm . Le $t = 0 \text{ s}$ correspond au moment de déclenchement de la mesure.

Avant 2 secondes : nous remarquons que le liposome cercle est intact et nous ne détectons aucun signal d'électrochimiluminescence. Cette constatation montre sans ambiguïté qu'en absence d'ouverture ou de déformation du liposome, aucune fuite de la solution encapsulée n'est détectée.

Entre 2 et 3 secondes : nous notons une déformation du liposome et l'apparition d'un signal lumineux dû à un évènement d'ECL.

Après 3 secondes, le cercle lumineux s'élargit indiquant une libération plus importante de la solution encapsulée et à la dispersion des réactifs.

Sur la série d'images en électrochimiluminescence, nous constatons l'existence d'une tache noire au milieu du cercle lumineux qui correspond au point de contact entre le liposome et la surface de l'électrode de travail. A ce point de contact, l'électrode est couverte de phospholipides et se trouve donc bloquée, ce qui empêche l'oxydation des réactifs et la génération de la lumière.

3.2. Etude quantitative

Nous avons superposé les 3 signaux collectés pour un seul liposome pour mieux caractériser l'évènement d'ouverture du liposome.

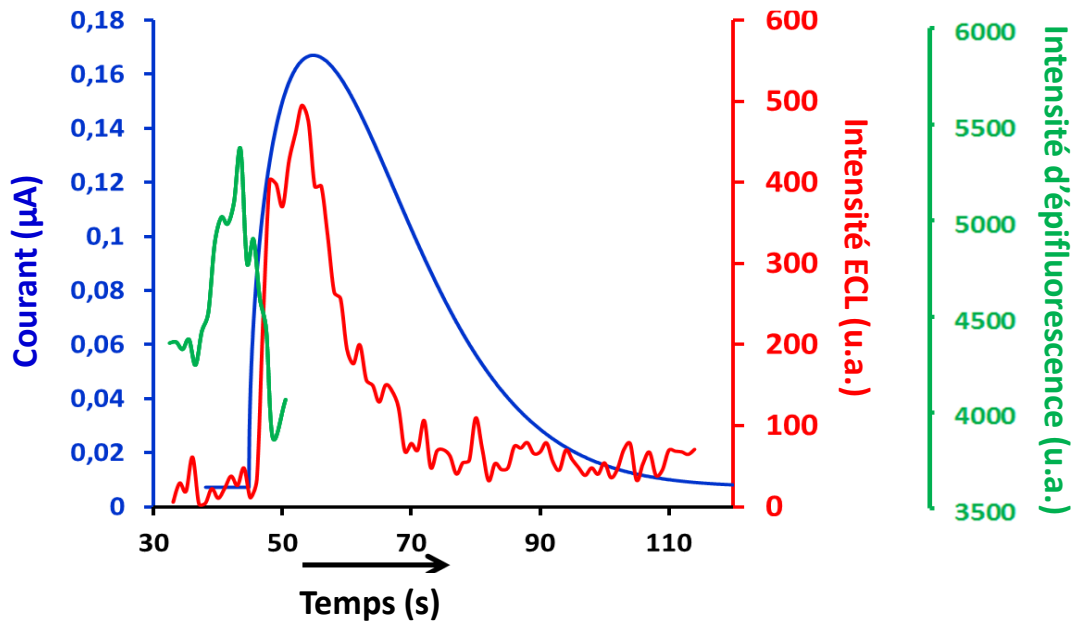


Figure 52 : Combinaison typique des signaux obtenu en ampérométrie (bleu), photoluminescence (vert) et ECL (rouge) suite à la perméabilisation de la membrane d'un liposome (montré dans la Figure 53) à la surface d'une électrode polarisée.

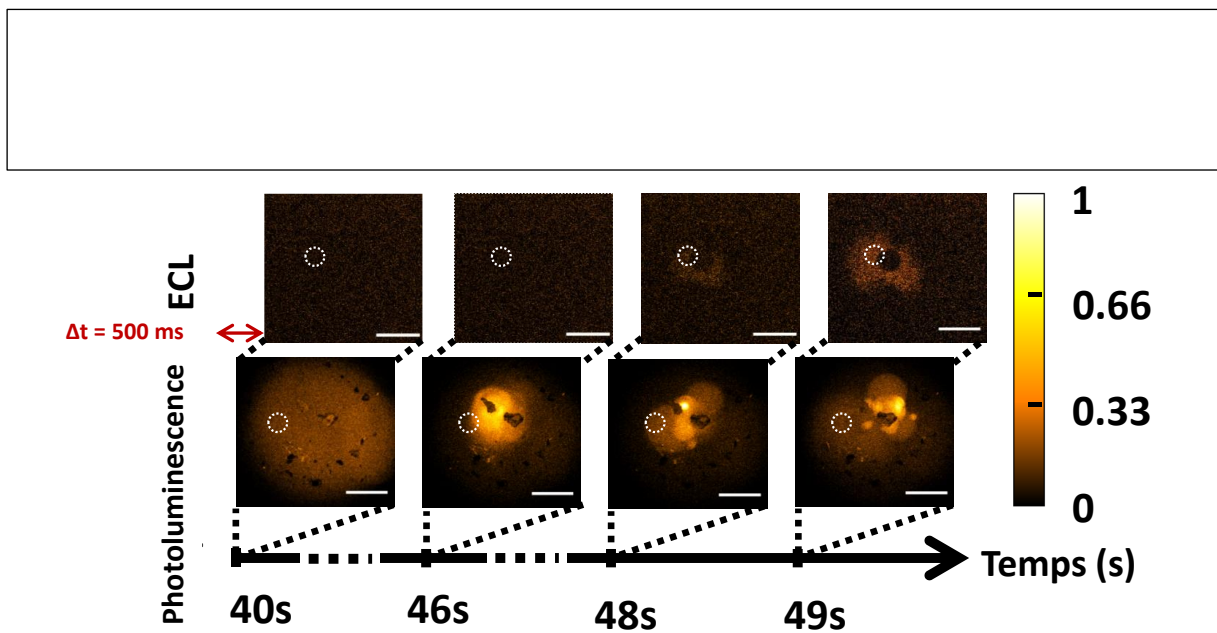


Figure 53 : Images en photoluminescence et en ECL qui mettent en évidence la perméabilisation d'un liposome. Barre d'échelle = 200 μ m. La région d'intérêt (ROI) correspond aux cercles en pointillé blanc.

La courbe verte correspond au signal de photoluminescence. Son intensité augmente quand le liposome se rapproche de la surface de l'électrode et elle est maximale quand le liposome touche la surface d'ITO (plan focal localisé à la surface de l'électrode). La diminution rapide de cette intensité, vers 48 secondes, est due à l'instabilité du liposome à la surface de l'électrode polarisée ce qui entraîne la libération de la solution encapsulée et sa dilution dans le milieu. Cette libération permet de déclencher une réaction d'électrochimiluminescence suite à l'oxydation du luminophore et du co-réactif en accord avec l'apparition d'un signal de courant suivi d'un signal lumineux. Les intensités de ces deux signaux augmentent, tout d'abord, avec l'enrichissement du milieu en réactifs puis diminuent du fait de la dispersion des réactifs en solution.

VI. Caractérisation de la dispersion du luminophore par électrochimiluminescence

A partir des images obtenues, on voit que l'imagerie ECL permet aussi de suivre la dispersion du luminophore au cours du temps.

L'évolution de la limite apparente en distance (δ) de la propagation de la tache lumineuse par rapport au point de contact du liposome avec l'électrode (centre de la tache noire) a été suivie en fonction du temps pour plusieurs liposomes (une dizaine de liposomes).

Pour tous les liposomes, sur la courbe $\delta^2 = f(t)$, nous avons observé un changement de pente qui marque un changement de régime de transport de la matière (Figure 54).

Aux temps courts l'allure obtenue correspond à un régime convectif de transport de la matière dû aux mouvements de solution générés lors de l'événement d'ouverture, notamment sous l'effet de la différence de densité entre le glucose (solution extra-vésiculaire) et le sucrose (solution intra-vésiculaire) [89].

Aux temps longs : l'évolution devient linéaire et indique l'établissement d'un régime de transport essentiellement diffusionnel. La valeur de cette pente correspond bien à celle attendue pour la diffusion de petites molécules dans les mêmes conditions.

La frontière entre les deux régimes s'établit entre 0,5 s et 4,5 s et dépend de la quantité de réactifs libérée à la surface de l'électrode et donc de la taille du liposome.

Sur la Figure 54, avant 4,5 s, le transport de la matière est d'origine principalement convective.

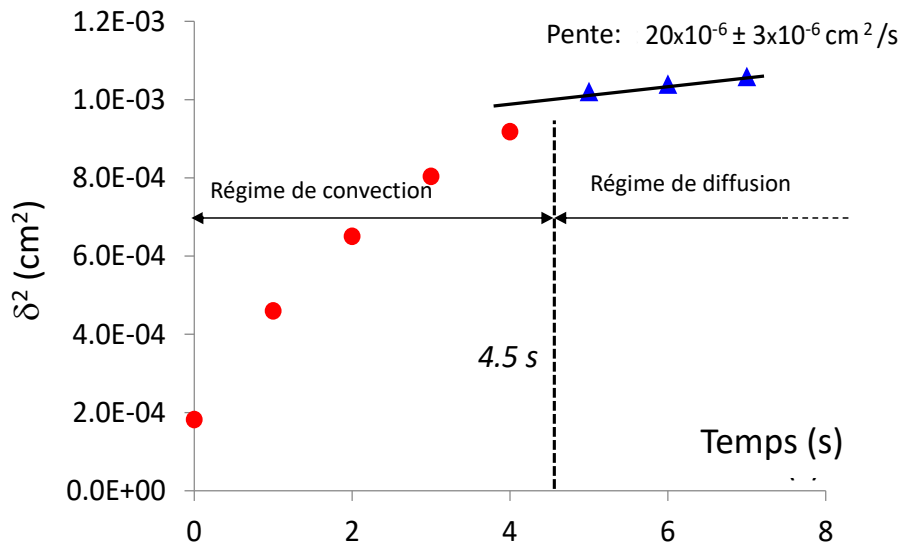


Figure 54 : Variation typique de la distance apparente δ^2 de la propagation du signal lumineux de la réaction d'électrochimiluminescence en fonction du temps. L'étude a été réalisée sur 7 liposomes et nous avons obtenu une valeur moyenne de pente ($4D$) égale à $20.10^{-6} \pm 3.10^{-6} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$.

VII. Conclusion

Cette première approche d'électrochimiluminescence nous a permis d'imager, en temps réel, l'évènement de libération du contenu d'un liposome avec une bonne résolution spatiale (de l'ordre de micro-mètre) et temporelle (de l'ordre de la ms). Ensuite, le couplage de l'ECL avec la photoluminescence et l'ampérométrie nous a permis de compléter l'information collectée notamment autour de :

- La quantification de tri-*n*-propylamine libérée par chaque liposome grâce au suivi chronoampérométrique de l'évènement d'ouverture,
- Le suivi de l'état du liposome avant et après l'évènement de la libération et l'attribution de chaque signal à son liposome d'origine. Cela a été assuré par la technique de photoluminescence.

Enfin, l'ECL permet d'imager la dispersion de la solution et informe sur les régimes de transport de la matière au début et au cours de la libération liposomale.

A partir de ces résultats et des travaux récemment réalisés dans le domaine de l'électrochimiluminescence, nous avons eu la curiosité d'explorer une nouvelle approche considérée comme l'approche négative de celle développée dans ce chapitre et appelée électrochimiluminescence négative. Cette méthode sera étudiée en détail, dans le chapitre suivant.

**Troisième chapitre –
Perméabilisation de
liposomes géants imagée par
electrochimiluminescence
négative (i.e., par contraste
optique négatif)**

3- Troisième chapitre – Perméabilisation de liposomes géants imagée par électrochimiluminescence négative (i.e., par contraste optique négatif)

I. Introduction

Dans le chapitre précédent, la perméabilisation de membranes de liposomes géants a été mise en évidence grâce à une émission de lumière ayant pour origine l'oxydation de réactifs ECL (un luminophore combiné à un co-réactif) s'écoulant vers le milieu extra-vésiculaire. Au cours de ces expériences, nous avons également remarqué que le point de contact entre les liposomes et l'électrode apparaissait comme une tache noire circulaire. A cet endroit, en effet, l'électrode est dite bloquée car aucun transfert d'électron ne peut se produire à travers l'épaisseur de la membrane lipidique.

Ces observations expérimentales sont à mettre en relation avec des travaux récemment publiés consistant à imager un objet par contraste optique négatif grâce au blocage de l'oxydation des réactifs ECL et donc de la lumière électrogénérée. Cette approche est d'ailleurs dénommée SECL pour "Shadow ElectroChemiLuminescence".

Partant de nos propres observations expérimentales et des exemples décrits dans la littérature au sujet de la SECL, nous avons tenté une approche inverse à celle décrite dans le chapitre précédent. Celle-ci consiste à imager la perméabilisation de membranes de liposomes géants par contraste optique négatif, autrement dit par ECL négative ou SECL en anglais.

II. Contexte bibliographique

L'électrochimiluminescence négative est une technique basée sur une « imagerie de l'ombre » d'un objet en contact avec une surface d'électrode associé au blocage de la surface de l'électrode par l'objet. Autrement dit, quand un objet est en contact avec la surface de l'électrode, il empêche le transfert d'électron entre l'électrode et les espèces électroactives responsables de la génération du signal électrochimiluminescent, générant ainsi une zone sombre si le reste de l'électrode est en situation de produire de l'ECL.

Cette technique a été initiée par le Prof. Su en 2012 [90] pour imager des empreintes digitales. Le contact de la peau des doigts, généralement un peu grasse, avec une surface lisse, comme par exemple une électrode de travail, permet de déposer des traces qui correspondent aux empreintes digitales : les bosses laissent des traces et les creux laissent des espaces vides. Donc la réalisation d'une réaction d'électrochimiluminescence sur cette électrode permet d'observer une génération de la lumière au niveau des espaces vides (qui ne contiennent pas le gras laissé par les doigts) et une absence de la lumière au niveau des traces laissées par les bosses du dermatoglyphe (Figure 55).

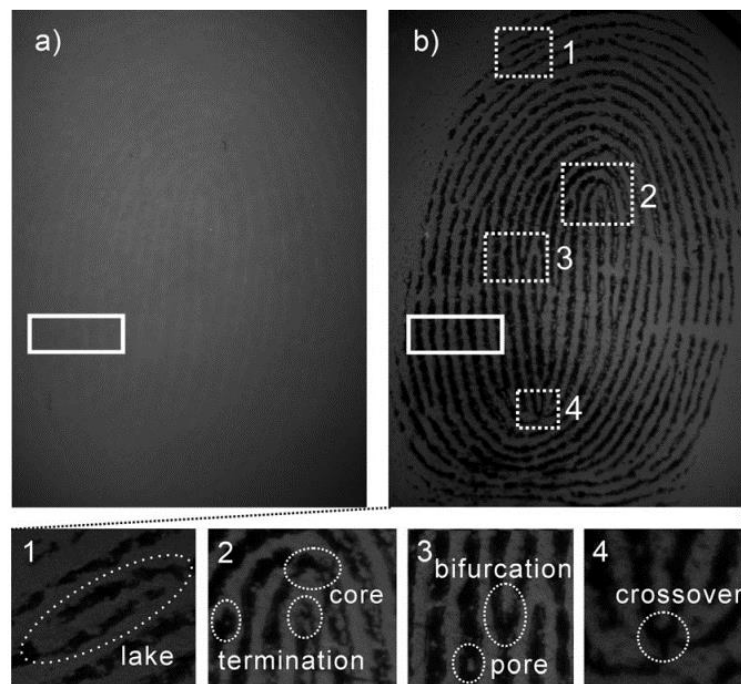


Figure 55 : Observation de l'empreinte digitale sur une électrode en ITO, par microscopie à fond clair (a) et ECL négative (b) en présence d'un potentiel positif (1,13 V vs. Ag/Ag/Cl). Le luminophore est le $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($C = 5.10^{-4}$ M) et le co-réactif TPrA ($C = 50.10^{-3}$ M) dans du PBS à 0,01 M et pH = 7,4. Les images numérotées de 1 à 4 montrent qu'avec l'approche d'ECL négative, il est possible d'observer les irrégularités de l'empreinte digitale. Figure issue de la référence [90].

Le même groupe a également réussi à imager et étudier l'adhésion de la matrice cellulaire des cellules vivantes, à la surface d'une électrode en ITO modifiée, par une membrane en silice [47]. Le contact entre les cellules et la surface est matérialisé, sur la Figure 56, par des zones noires où l'ECL n'est pas générée parce que le passage des réactifs vers l'électrode est bloqué par la cellule. Dans ce travail, ils ont mis en évidence que l'électrochimiluminescence révèle

plus d'informations par rapport à la technique de microscopie à fond clair parce qu'elle met en relief les zones d'adhérence et l'orientation des cellules au cours de la migration.

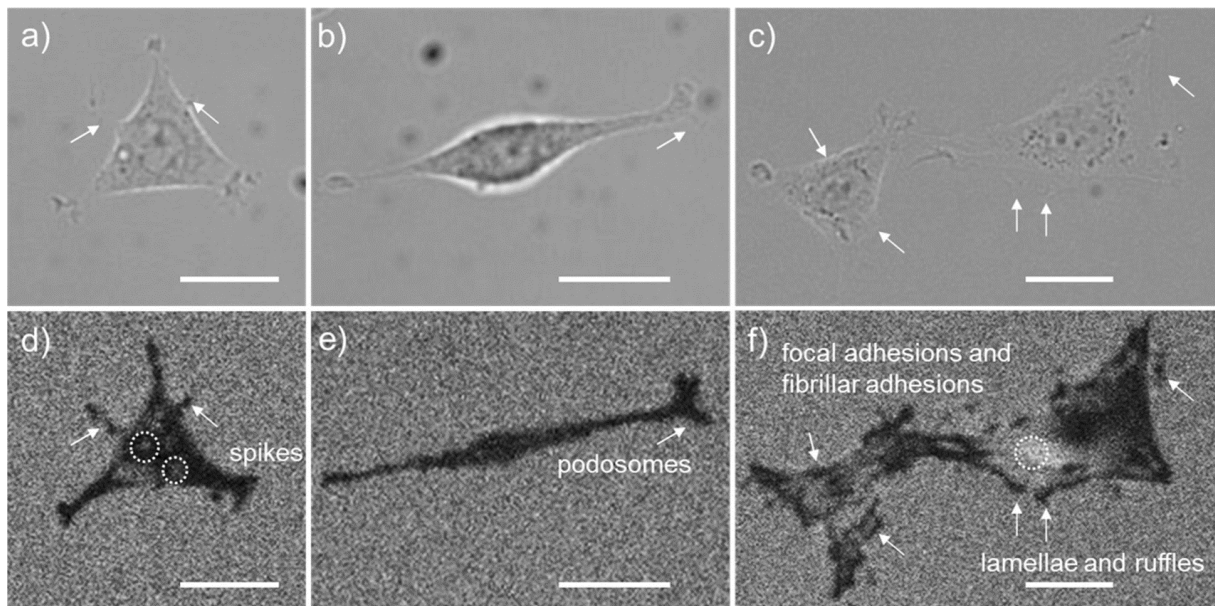


Figure 56 : La figure présente deux séries d'images en microscopie à fond clair de (a) à (c) et en ECL négative de (d) à (f) de cellules vivantes PC12. Le luminophore est le $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ est à $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ et HEPES à $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans du PBS à 0,01 M et pH = 7,4. L'ECL est obtenue par application d'un potentiel positif égal à 1,3 V (vs. Ag/Ag/Cl) à une électrode en ITO couverte par une membrane en silice. La barre d'échelle : 20 μm . La figure vient de la référence [2] et elle a été modifiée par rapport à la figure d'origine.

Très récemment, le groupe du Prof. N. Sojic a montré qu'avec cette approche il est possible de visualiser des objets plus petits que les cellules vivantes telles que des mitochondries déposées à la surface d'une électrode. La stratégie est basée sur le confinement spatial de la couche réactive émettrice d'ECL. Autrement dit, la présence des mitochondries bloque d'une part la production de lumière à l'endroit où elles se situent et restreint, d'autre part, la diffusion du luminophore et du co-réactif. Cela permet d'imager chacune des mitochondries avec un contraste optique négatif remarquable. Finalement, cette approche reflète l'empreinte négative de chaque mitochondrie qui joue le rôle d'obstacle local à l'oxydation électrochimique des réactifs ECL [48].

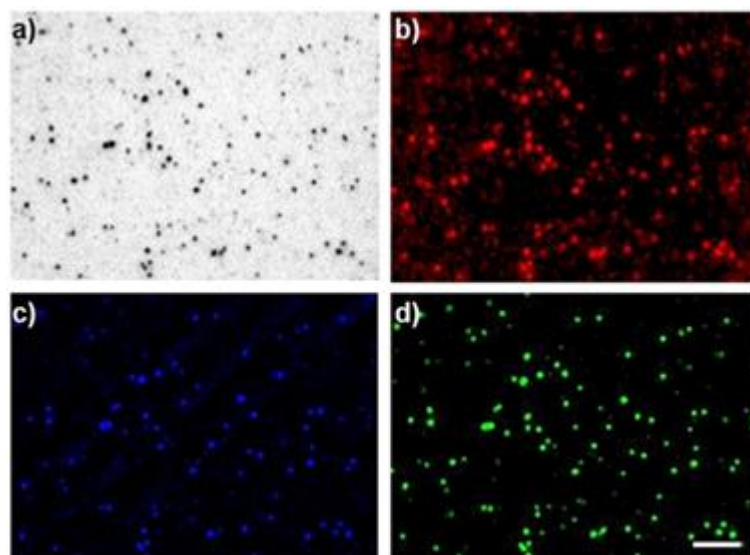


Figure 57 : Une image de mitochondries déposées à la surface d'une électrode de carbone vitreux obtenue en ECL négative (a), en ECL négative avec inversion de couleur (b), en photoluminescence de NADH (c) et du MitoTracker rouge (d). L'électrochimiluminescence négative a été réalisée avec le $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à $30 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ et la TPrA à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. L'électrode était polarisée à $+1,45 \text{ V}$. La barre d'échelle : 10 mm [48].

Dans ce travail, à partir de cette figure, ils ont montré que l'ECL négative permet d'observer un nombre important de mitochondries, avec un bon contraste, même les plus petites qui ne sont pas détectables par photoluminescence. Cette constatation confirme que l'approche de l'électrochimiluminescence négative permet d'avoir plus d'informations que la microscopie optique classique.

III. Perméabilisation membranaire de liposomes géants imagée par contraste optique négatif

1. Stratégie – Hypothèse de départ

Comme décrit dans le paragraphe précédent au travers de plusieurs exemples, l'approche SECL consiste à imager un objet par contraste optique négatif grâce au blocage de l'électrode qui empêche tout transfert d'électron et, par conséquent, de lumière électrogénérée à l'endroit où il se situe.

Par ailleurs, durant les expériences présentées dans le chapitre précédent, nous avons observé un phénomène similaire mais se produisant uniquement après le processus de perméabilisation membranaire. En effet, aucune lumière électrogénérée ne pouvait être émise tant que les réactifs ECL se trouvaient à l'intérieur des liposomes car protégés par la bicouche

lipidique. A partir du moment où les réactifs ECL commencent à s'écouler vers le milieu extra-vésiculaire, une lumière d'origine électrochimique pouvait être alors émise autour du liposome perméabilisé. Dans ces conditions, le point de contact entre le liposome et l'électrode apparaissait comme une tâche circulaire noire par contraste optique négatif.

Partant des exemples décrits dans la littérature et de nos propres observations expérimentales, notre hypothèse de départ était que la présence d'un liposome à la surface d'une électrode polarisée et baignant dans une solution contenant les réactifs ECL (et donc illuminée) devrait conduire, non seulement, à une empreinte négative du liposome (i.e. présence d'une tache noire au point de contact entre le liposome et l'électrode) mais aussi à une propagation de l'extinction de la lumière en cas de perméabilisation membranaire. En effet, dans ces conditions, on s'attend à ce que l'écoulement du milieu intra- vers le milieu extra-vésiculaire conduise à une dilution des réactifs ECL présents à proximité de la fuite membranaire permettant ainsi d'imager le processus de perméabilisation par contraste optique négatif.

Cette approche est résumée dans le schéma suivant :

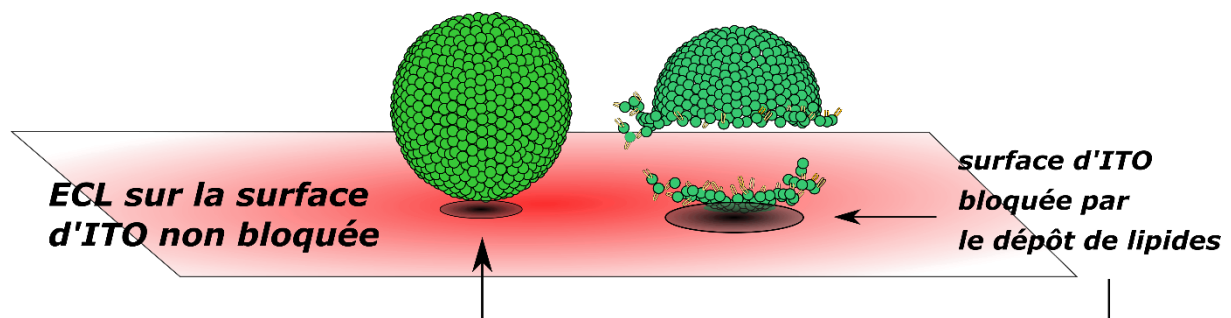


Figure 58 : Schéma de la stratégie adoptée pour détecter la perméabilisation de la bicouche lipidique par ECL négative.

2. Choix de conditions expérimentales appropriées

Contrairement à l'approche présentée dans le chapitre précédent, les réactifs ECL doivent être ici présents en solution, dès le début de l'expérience, de façon à illuminer la surface de l'électrode avant l'arrivée des liposomes. Compte tenu de cela, l'utilisation de liposomes dissymétriques constitués de DOPG au niveau de leurs feuillets externes n'est donc plus appropriée. En effet, dans le chapitre précédent, nous avons montré que le co-réactif tri-propylamine (TPrA) déstabilise les feuillets fabriqués à partir de phospholipides chargés

négalement comme le DOPG. Une telle déstabilisation empêcherait donc les liposomes d'arriver intacts à la surface de l'électrode. Par contre, nous avons également montré que les phospholipides de type DOPC sont compatibles avec la TPrA (d'où leur utilisation au niveau du feuillet interne pour encapsuler la TPrA). Par conséquent, nous avons décidé de travailler avec des liposomes symétriques et constitués de DOPC au niveau des feuillets interne et externe des liposomes.

Comparé aux liposomes dissymétriques DOPG/DOPC, la fabrication des liposomes symétriques DOPC/DOPC est simplifiée pour deux raisons : 1) la première étape consistant à la fabrication de gouttes d'eau (contenant du tampon phosphate, PBS, et du sucrose) recouvertes d'une monocouche de phospholipides ne nécessite plus l'encapsulation du luminophore et du co-réactif (qui seront désormais présent en solution et non plus confinés à l'intérieur des liposomes), et 2) la seconde étape consistant à la fabrication du feuillet externe des liposomes implique le même type de phospholipide (i.e., DOPC) que celui utilisé au cours de la première étape.

La cellule électrochimique, quant à elle, est identique à celle fabriquée et décrite dans le chapitre précédent.

3. Imagerie – Résultats

3.1. En absence de liposomes

Pour commencer, il était important de vérifier, en absence de liposomes, que la présence du luminophore ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$) et du co-réactif (TPrA) au contact d'une électrode conductrice et transparente (ITO) génère bien de la lumière quand l'électrode est sous polarisation.

Comme le montre la Figure 59, l'imposition d'un potentiel suffisamment positif pour oxyder à la fois le luminophore et le co-réactif (+1.2 V vs. Ag/AgCl) génère de la lumière au niveau de la surface de l'électrode (cela est indiqué par la différence du niveau d'intensité entre la Figure 59 (a) avant et (b) après l'application du potentiel. Comme déjà étudié, dans ces conditions la diffusion de la lumière est restreinte à une épaisseur d'environ 10 μm et est liée à la vitesse de diffusion et la stabilité du radical TPrA électrogénéré ($t_{1/2} \approx 700 \mu\text{s}$ sur des distances supérieures à 1 μm avec un coefficient de diffusion $D = 7,4 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) [91].

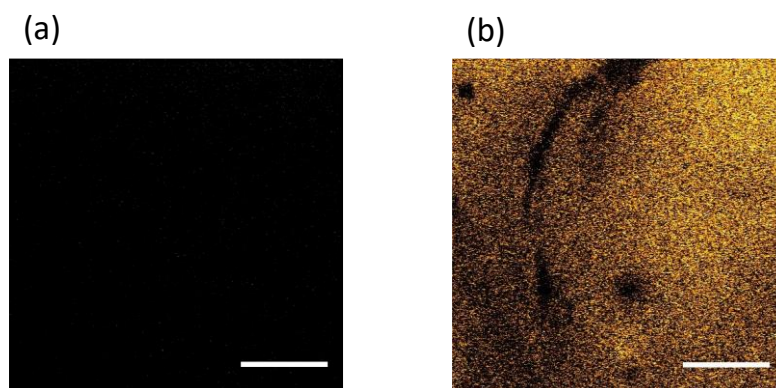


Figure 59 : Surface d'une électrode en ITO de diamètre $d = 0,8$ mm non polarisée (a) et polarisée (b) à un potentiel de $+1,2$ V (vs. Ag/AgCl). Le milieu est une solution de PBS à 1.10^{-2} mol.L⁻¹ et un pH = 7,54 contenant le luminophore [Ru(bpy)₃]²⁺ à 30.10^{-6} mol.L⁻¹ et le co-réactif TPrA à 20.10^{-3} mol.L⁻¹. la barre d'échelle : 200 μ m.

Contrairement à l'approche décrite dans le chapitre précédent, les concentrations en luminophore et TPrA sont égales à 30 μ M et 20 mM, respectivement, pour que l'extinction de la lumière soit plus efficace (dilution des réactifs plus efficace) et que le contraste soit plus important. En effet, une intensité de lumière trop élevée pourrait camoufler les objets déposés à la surface de l'électrode.

De façon intéressante, l'image de la Figure 59(b) montre que la lumière électrogénérée n'est pas homogène sur la totalité de la surface de l'électrode. Autrement dit, la présence de zones non illuminées témoigne d'une inhomogénéité de l'électrode sur l'aspect conductivité/transfert de charge. Ce type d'expérience est finalement un bon moyen de vérifier l'état de surface de notre électrode avant l'ajout de liposomes.

Du point de vue quantitatif, nous avons pu montrer que l'intensité ECL générée à la surface de l'électrode augmente très fortement et instantanément au moment de la polarisation de l'électrode puis diminue de façon proportionnelle à $1/t^{(1/2)}$ en accord avec un régime diffusionnel de transport des réactifs (Figure 60). Cette évolution de la lumière en fonction du temps et de la polarisation de l'électrode (Off vs. On) est tout à fait analogue à une expérience de chronoampérométrie avec l'avantage de pouvoir quantifier le processus à partir d'images lumineuses obtenues par microscopie.

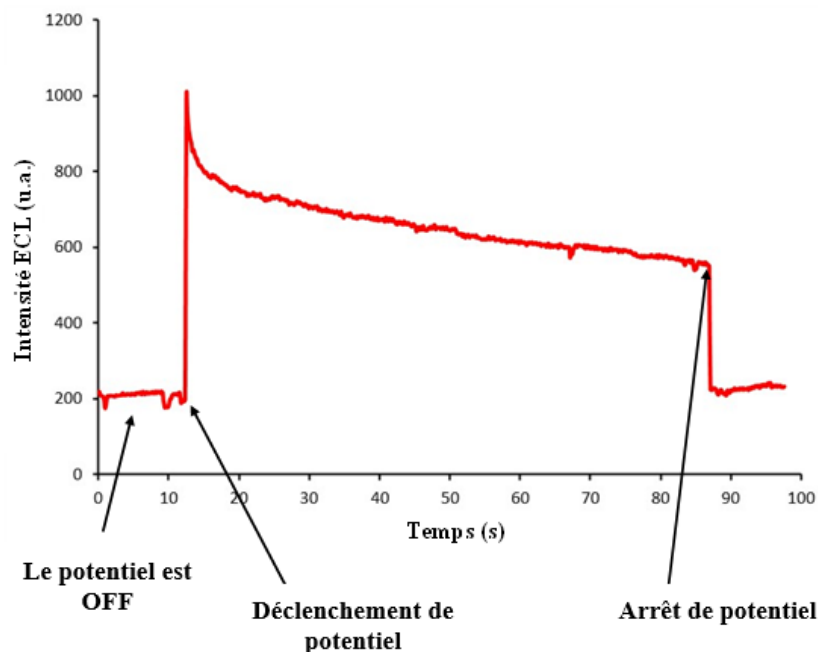


Figure 60 : Intensité d'électrochimiluminescence en fonction du temps avant et après déclenchement du potentiel. L'expérience a été réalisée sur une surface d'électrode d'ITO de diamètre $d = 0,8$ mm. Le potentiel appliqué est $+1,2$ V (vs. Ag/AgCl). La solution contient le luminophore $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à $30 \cdot 10^{-6}$ mol.L $^{-1}$ et le co-réactif TPrA à $20 \cdot 10^{-3}$ mol.L $^{-1}$ dans du PBS à $1 \cdot 10^{-2}$ mol.L $^{-1}$ et pH = 7,54.

3.2. En présence de liposomes contenant une solution de sucrose

Après avoir vérifié la présence de lumière électrogénérée au moment de la polarisation d'une électrode en ITO, des liposomes géants, contenant une solution de sucrose à 0,7 M, sont ajoutés en haut de la cellule électrochimique et laissés à sédimenter. Comme montré sur les images prises à $t = 191$ et 450 secondes (Figure 61), l'arrivée de liposomes à la surface de l'électrode entraîne clairement une diminution de l'intensité lumineuse.

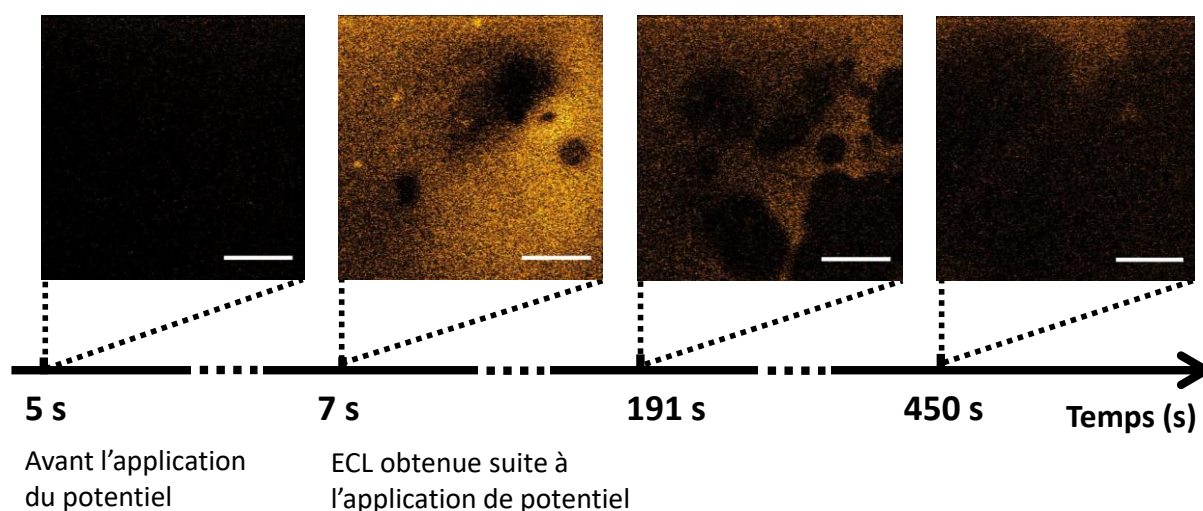


Figure 61 : la figure représente une série d'images du signal électrochimiluminescent obtenu à la surface d'une électrode de travail en ITO ($d=0,8$ mm) suite à l'application d'un potentiel égal à $1,2V$ (vs. $Ag/Ag/Cl$) et en présence d'une solution de luminophore $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ à 30.10^{-6} mol.L $^{-1}$ et le co-réactif TPrA à 20.10^{-3} mol.L $^{-1}$ dans du glucose à $0,7$ mol.L $^{-1}$ dissout dans une solution de PBS à 1.10^{-2} mol.L $^{-1}$ et $pH=7,54$. Les liposomes contiennent une solution de sucrose à $0,7$ mol.L $^{-1}$ dans du PBS. La figure montre l'apparition de la lumière suite à l'application du potentiel à 7 secondes, les tâches noires, sur l'image à 7 secondes, sont des défauts à la surface de l'électrode. A noter que l'enregistrement d'images en photoluminescence n'est pas pertinent ici car le luminophore est présent dans tout le milieu extérieur. Barre d'échelle : $200 \mu m$. Ici, la région d'intérêt correspond à toute l'image.

Plus précisément, l'image réalisée à $t = 191$ secondes montre bien l'apparition de taches noires de forme circulaire indiquant que des liposomes sont bien entrés en contact avec la surface de l'électrode bloquant ainsi tout transfert électronique à cet endroit et empêchant ainsi l'émission de lumière par voie électrochimique. Cependant, en y regardant de plus près, et contrairement à ce qui avait été observé dans le chapitre précédent, les taches noires ne semblent pas adopter de forme définie. Cette déformation pourrait s'expliquer par une perméabilisation de la membrane des liposomes (comme vérifié par ailleurs) conduisant à une dilution des réactifs ECL présents à proximité de la ou des zones de fuite. Aux temps longs ($t = 450$ sec.) la surface de l'électrode n'est quasiment plus illuminée à cause des phénomènes conjoints d'accumulation de liposomes et de la dilution des réactifs ECL.

Suite à cette analyse qualitative, il était important de réaliser une étude quantitative en essayant de restreindre les images au niveau d'un liposome isolé.

La Figure 62(a) montre une planche d'images obtenue pour la même expérience mais focalisée sur une zone de l'électrode où est venu se déposer un unique liposome.

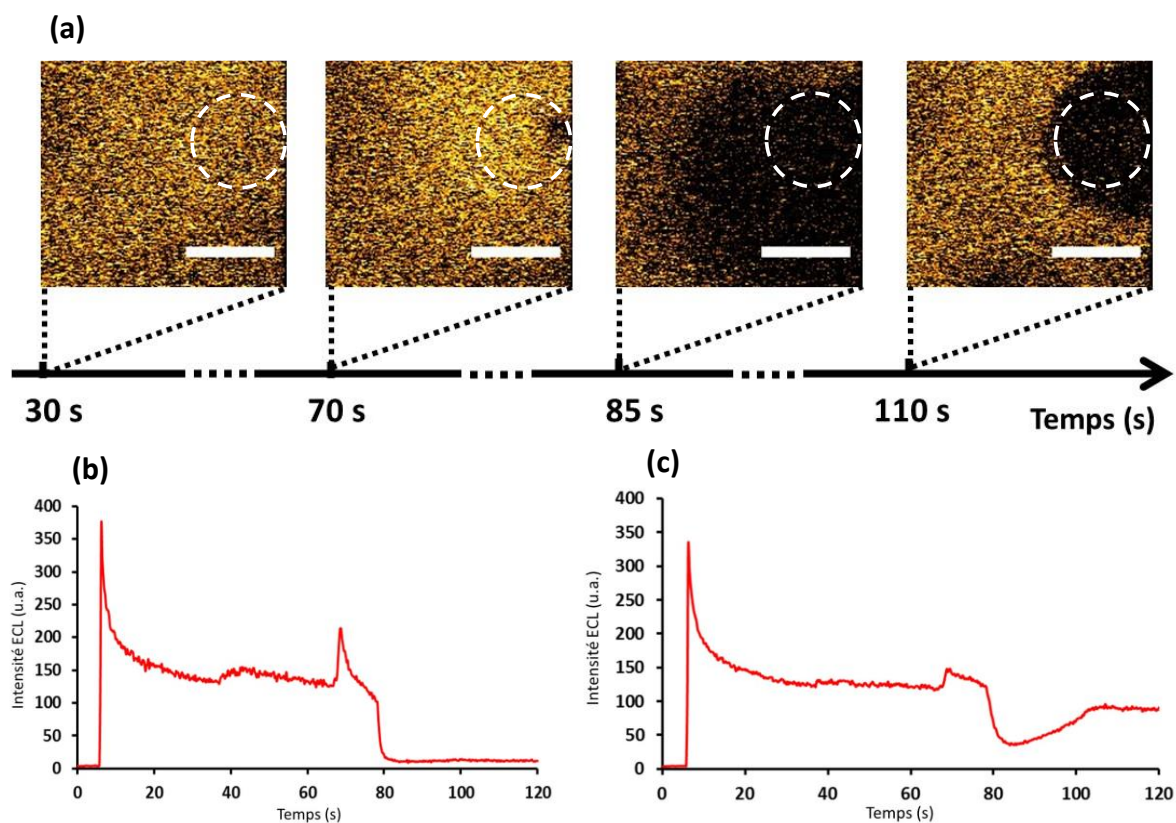


Figure 62 : Série d'images obtenues en ECL (a) et courbes représentant la variation de l'intensité ECL en fonction du temps au niveau du cercle blanc (b) et sur toute l'image (c). L'expérience a été réalisée sur une électrode en ITO en présence d'un potentiel égal à 1,2 V (vs. Ag/Ag/Cl). Le milieu extérieur est composé d'une solution de luminophore $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à $30 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ et du co-réactif TPrA à $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans du glucose à $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$ dissout dans du PBS à $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ et $\text{pH} = 7,54$. Les liposomes contiennent une solution de sucrose à $0,7 \text{ M}$ dans le PBS.

Comparée à une analyse globale de la surface de l'électrode, l'analyse d'une zone plus restreinte et focalisée sur un seul liposome apporte des informations supplémentaires et pertinentes. Tout d'abord, et du point de vue qualitatif, l'arrivée d'un liposome à la surface de l'électrode (avant d'entrer en contact avec la surface de l'électrode) entraîne une augmentation de l'intensité ECL (comparer les images prises à $t = 30 \text{ sec.}$ et $t = 70 \text{ sec.}$). Ce phénomène peut s'expliquer par un effet transitoire de confinement des réactifs ECL qui se retrouvent en quelque sorte piégés entre la surface de l'électrode et le liposome. Autrement dit, les réactifs ECL ne peuvent plus diffuser aussi librement qu'avant l'arrivée du liposome concentrant ainsi la lumière électrogénérée dans un espace restreint. Bien évidemment, ce phénomène disparaît dès que le liposome entre en contact avec la surface de l'électrode entraînant ainsi l'apparition d'une tache noire.

Comme observé précédemment, la taille de cette tache devient beaucoup plus grande que la zone de contact entre le liposome et l'électrode (image à $t = 85$ sec.) suggérant une dilution des réactifs ECL suite à une perméabilisation de la membrane du liposome. D'ailleurs, l'image obtenue à $t = 110$ sec. montre clairement un retour de la lumière dans la zone ayant subi une extinction de luminescence (comparez avec l'image prise à $t = 70$ sec.). Ce phénomène rend compte d'une diffusion des réactifs ECL vers la zone préalablement diluée confirmant ainsi la perméabilisation du liposome. Néanmoins, cette diffusion se retrouve bloquée à l'endroit où s'est posé le liposome en accord avec la réapparition d'une tache noire circulaire.

Cette analyse qualitative a été suivie d'une analyse quantitative en prenant comme région d'intérêt soit l'image totale (Figure 62(c)), soit le liposome représenté par le cercle en pointillés blanc (Figure 62(b)).

Concernant l'image entière, l'évolution de l'intensité ECL suit parfaitement la description qualitative esquissée précédemment : en absence de potentiel (quelques premières secondes), l'intensité est nulle et après, elle augmente brutalement, au moment de l'application de potentiel. Cette intensité diminue, ensuite, de façon proportionnelle à $t^{-1/2}$, jusqu'à 70 secondes (nous observons une légère augmentation vers $t = 40$ secondes qui correspond à un artefact, pendant l'expérience). Le rapprochement du liposome de la surface de l'électrode entraîne une augmentation de l'intensité ECL (vers 70 secondes) et la libération de la solution encapsulée diminue cette intensité à cause d'une dilution locale des réactifs. Puis, nous remarquons une ré-augmentation de l'intensité ECL entre 85 et 110 secondes qui est due à la diffusion du luminophore et du co-réactif de la zone la plus concentrée vers la zone la moins concentrée. Sur la Figure 62 (b), nous retrouvons la même allure que la Figure 62 (c) mais avec l'absence de la ré-augmentation de l'intensité d'ECL et donc l'absence de la diffusion des réactifs, comme observé sur l'image à $t = 110$ secondes, parce que cette diffusion est bloquée par les phospholipides déposés à la surface de l'électrode.

3.3. Caractérisation de la dispersion de la solution encapsulée et de la diffusion des réactifs

A partir des résultats discutés dans le paragraphe précédent, nous remarquons qu'il est possible, non seulement, d'étudier la dispersion de la solution libérée mais aussi la diffusion des réactifs du milieu extérieur (le plus concentré) vers la solution libérée (milieu le moins concentré).

La figure ci-dessous présente l'évolution typique de la distance apparente (δ) de la tache noire, due à l'extinction de la lumière générée dans le milieu, en fonction du temps et montre deux types de pente (croissante puis décroissante) qui marque un changement de sens de propagation de la tache noire et un changement de mode majoritaire de transport de la matière : la libération de la solution, suite au contact avec la surface de l'électrode polarisée, est traduite sur la Figure 63 par les points rouge qui correspondent à un régime convectif de transport de la matière dû aux mouvements de solution générés lors de l'événement d'ouverture, notamment sous l'effet de la différence de densité entre le glucose (solution extra-vésiculaire) et le sucrose (solution intra-vésiculaire). La deuxième partie de la courbe, représentée par les points bleus, montre une pente décroissante plus faible que la première qui indique le passage des réactifs du milieu le plus concentré vers le milieu le moins concentré selon un régime essentiellement diffusif. La valeur de cette pente correspond bien à celle attendue pour la diffusion de petites molécules dans les mêmes conditions.

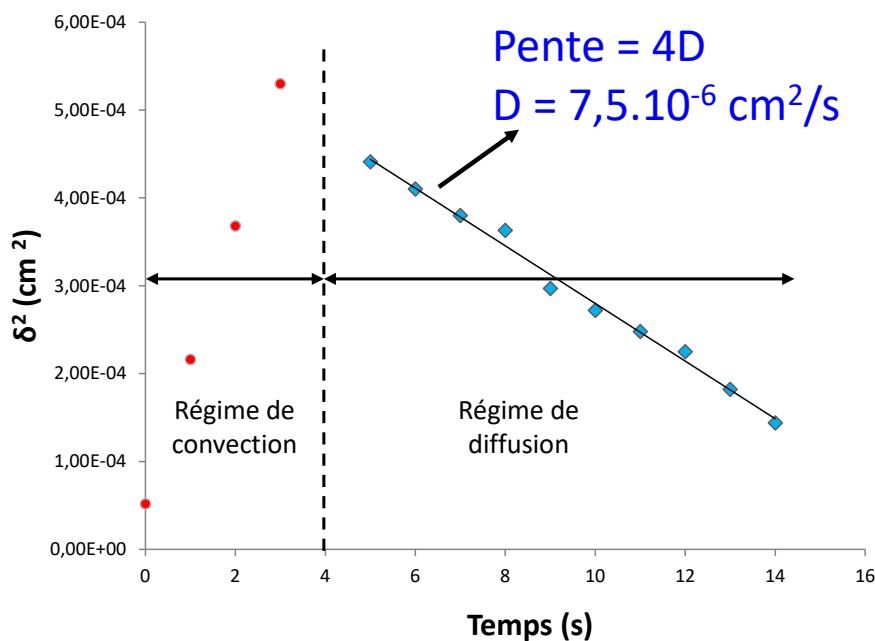


Figure 63 : Variation typique de la distance apparente δ^2 de la propagation de la tâche noire due à la dilution des réactifs du milieu extérieur (une solution de luminophore $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à $30 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ et du co-réactif TPrA à $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans du glucose à $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$ dissout dans une solution de PBS à $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ et $\text{pH} = 7,54$) en fonction du temps.

La solution encapsulée est une solution de sucrose à 0,7 M dans du PBS. Le liposome étudié sur cette figure correspond au liposome montré sur la Figure 62.

3.4. En présence de liposomes contenant un quencher

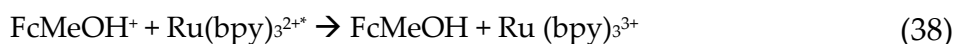
3.4.1. Comment fonctionne un quencher

L'extinction ou l'atténuation du signal lumineux généré au cours de la réaction d'électrochimiluminescence est dû à une désactivation de l'état excité du luminophore qui peut se dérouler selon plusieurs manières dont nous notons l'utilisation d'une molécule chimique appelée « quencher ». Parmi les quencher les plus utilisés dans la littérature, il y a le ferrocène et ses dérivés qui pourraient réagir selon un processus de transfert d'énergie ou de transfert d'électron pour désactiver l'état excité du complexe de ruthénium [92], [93].

Ces molécules de ferrocène ont montré une meilleure efficacité de quenching par rapport aux autres molécules utilisées habituellement [94].

Dans ce chapitre, le dérivé du ferrocène utilisé est le ferrocène méthanol (FcMeOH) qui, à une concentration de l'ordre de 500 μM , est capable d'éteindre plus de 99% de l'intensité d'ECL produite dans le milieu réactionnel [94].

Cette molécule agit sur la molécule de ruthénium à l'état excité $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ selon un mécanisme de transfert d'électron comme présenté ci-dessous : [95]



3.4.2. Expérience et résultat

Dans cette partie, les liposomes sont aussi symétriques DOPC/DOPC et la solution encapsulée contient du sucrose à 0,7 M ainsi que le quencher FcMeOH à 500 μM . Le milieu extérieur est toujours composé d'une solution de glucose contenant le luminophore $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}]$ à 30 μM et le co-réactif TPRA à 20 mM. La cellule électrochimique, décrite précédemment, est déposée sur un microscope inversé et les images sont enregistrées avec une caméra EM-CCD. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure ci-dessous :

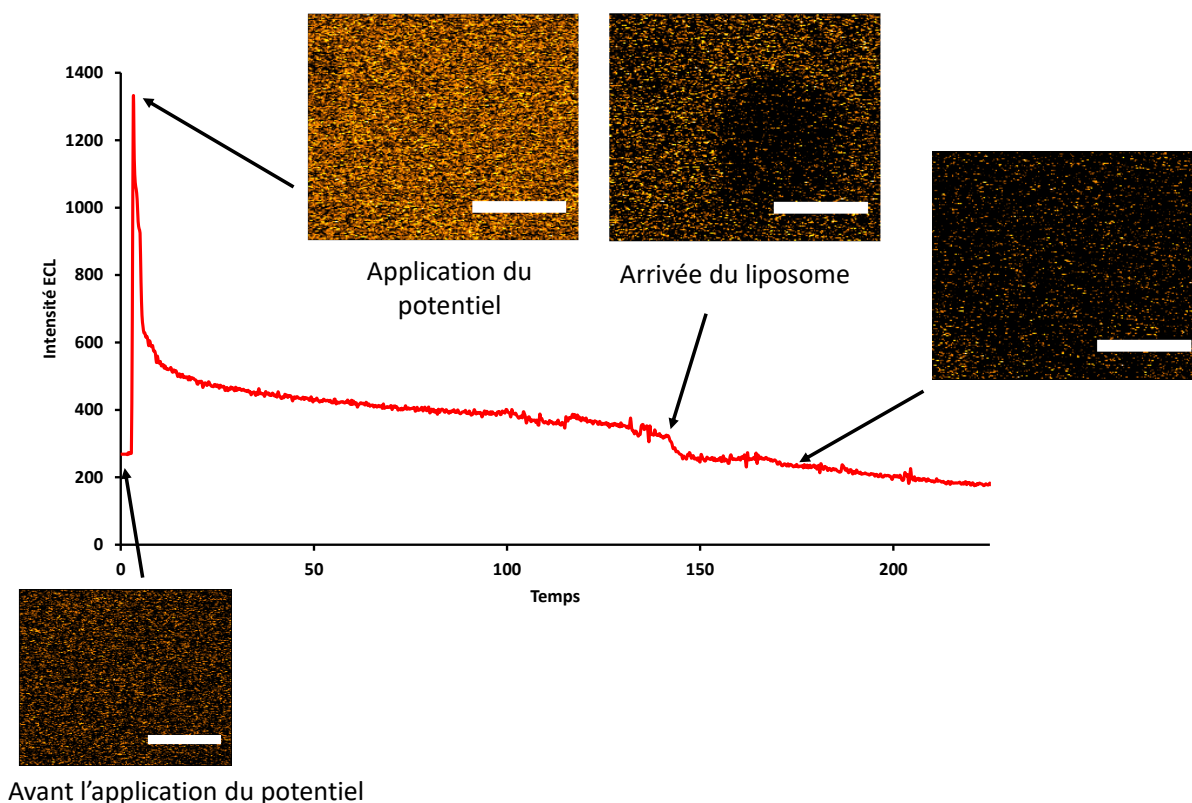


Figure 64 : Variation de l'intensité ECL en fonction du temps sur une électrode d'ITO en présence de potentiel (1,2 V vs. Ag/AgCl). Le milieu extérieur est composé du luminophore $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à $30 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, du co-réactif TPrA à $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, et de glucose à $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$ dissout dans une solution de PBS à $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ et $\text{pH} = 7,54$. Les liposomes contiennent une solution de sucrose à $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$ dans le PBS ainsi que le quencher FcMeOH à $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. La zone d'intérêt correspond à la totalité de l'image. Barre d'échelle : $120 \mu\text{m}$.

La Figure 64 représente la variation de l'intensité ECL en fonction du temps. Elle montre d'abord l'augmentation de cette intensité suite à l'application du potentiel qui permet de générer un signal électrochimiluminescent. Ce dernier diminue ensuite selon un régime diffusionnel ($t^{-1/2}$). Puis, l'arrivée d'un liposome à la surface de l'électrode entraîne une deuxième diminution (vers 140 secondes) qui indique la libération de la solution encapsulée. Cette diminution est due non seulement à une dilution locale des réactifs mais aussi à un effet du « quencher » encapsulé dans le liposome. D'ailleurs, l'intensité ECL ne ré-augmente pas, comme dans le paragraphe précédent, mais elle continue à diminuer parce que la lumière apportée par la diffusion inverse des réactifs est éteinte par le FcMeOH.

IV. Conclusion

Nous avons réussi à mettre en évidence l'événement de l'ouverture de liposomes par l'électrochimiluminescence négative qui est, contrairement à la première approche, basée sur la disparition de la lumière générée par ECL. Par dilution des réactifs ou par désactivation de l'état excité (quencher), l'ECL négative donne des informations sur l'événement d'ouverture de liposomes qui sont en bon accord avec l'approche positive de cette méthode : nous avons retrouvé une valeur de coefficient de diffusion très proche de la valeur déterminée dans le chapitre précédent et qui est en bonne adéquation avec celle attendue pour la diffusion d'une petite molécule.

Après le développement des deux approches de détection de la perméabilisation de la membrane lipidique, notre objectif suivant a été d'utiliser notre approche pour caractériser des phénomènes d'intérêt biologique comme la détection de la perméabilisation membranaire par des peptides ou pour suivre et contrôler des réactions enzymatiques. Cela sera développé dans les deux prochains chapitres.

**Quatrième chapitre –
Imagerie ECL de la
perméabilisation de la
membrane lipidique de
liposomes géants par des
peptides anti-microbiens ou
pénétrants**

4- Quatrième chapitre – Imagerie ECL de la perméabilisation de la membrane lipidique de liposomes géants par des peptides anti-microbiens ou pénétrants

I. Introduction et contexte

Les deux chapitres précédents développaient la méthodologie permettant d'imager par ECL la perméabilisation de membranes de liposomes géants mis au contact d'une électrode polarisée. Ce chapitre, ainsi que le suivant, portent sur la valorisation de cette approche ECL au travers d'applications bio-analytiques. Ainsi, dans ce quatrième chapitre, nous explorons l'effet d'une incubation de peptides décrits comme actifs vis-à-vis de la perméabilisation de membranes (AMPs et CPPs) sur des liposomes géants contenant les réactifs de l'ECL, l'émission de lumière au contact de l'électrode en ITO constituant la signature de l'efflux du contenu intra-vésiculaire vers le milieu extérieur.

Les peptides qui interagissent avec les membranes, désignés dans la littérature par la terminologie « membrane active peptides », constituent une classe de peptides qui « perturbent » localement les membranes lipidiques, pouvant *in fine* induire la rupture (lyse) de la membrane ou simplement sa restructuration transitoire pour permettre la translocation du peptide au travers de la bicouche lipidique [96]. Le passage d'espèces chargées (cationiques pour les peptides) au travers de membranes lipidiques a été considérée comme improbable jusqu'à la fin des années 1980. La membrane plasmique était en effet considérée comme infranchissable pour toutes les molécules hydrophiles ou les ions. Le caractère hydrophobe des chaînes grasses des phospholipides était supposé empêcher tout passage passif, induit par des gradients de concentration notamment, de composés tels que des peptides ou des oligonucléotides. Réciproquement, il était admis que plus une molécule est hydrophobe, plus elle passe facilement au travers une membrane.

Pourtant, en 1988, puis en 1991, les propriétés de pénétration de deux protéines (Tat et Antennapedia) ont été mises en évidence expérimentalement [97]–[99]. Ces résultats ont profondément remis en cause le quasi-dogme de l'imperméabilité membranaire aux ions, en particulier lorsqu'il a été démontré que l'internalisation n'impliquait pas d'interaction

spécifique avec un récepteur membranaire [100]. L'identification des séquences nécessaires et suffisantes pour autoriser l'internalisation de ces protéines fut non moins surprenantes puisqu'il s'agit de séquences polycationiques, la Pénétratine et Tat (Pénétratine: **RQIKIWFQNRRMKWKK**, Tat : **YGRKKRRQRRR**, les résidus cationiques (R = arginine, K=lysine) sont en rouge [101]. La Pénétratine et Tat jouent donc le rôle de vecteurs naturels pour ces protéines. Les peptides constitués par ces seules séquences, les CPP ("Cell Penetrating Peptides", en français "les peptides pénétrants") sont aussi capables d'induire leur propre internalisation.

Depuis, de nombreux CPP ont été identifiés ou synthétisés. Généralement, les CPP sont de petits peptides constitués de 30 acides aminés ou moins et sont capables de franchir la membrane cellulaire à des concentrations de l'ordre du micromolaire, *in vivo* ou *in vitro*, sans provoquer la rupture de la membrane. Cette propriété fait des CPP des candidats de choix pour la vectorisation ciblée de molécules et de nanoparticules [102], [103]. Un exemple représentatif de vectorisation d'un agent thérapeutique grâce à une association entre un peptide et un liposome contenant le médicament a été décrit pour le paclitaxel®, l'association peptide-liposome pouvant franchir la barrière hémato-encéphalique pour traiter des cellules cancéreuses de patients atteints de gliome [104]. La délivrance d'acides nucléiques dans le milieu intracellulaire, tels des plasmides (thérapie génique) ou de petits ARN interférents (siRNA), est également facilitée par l'association avec des peptides [105]. Cette stratégie consiste à intégrer dans les cellules des séquences de nucléotides modulant ou supprimant l'expression de gènes de protéines responsables de la maladie.

Comme les CPP, les peptides anti-microbiens (AMP pour "Anti-Microbial Peptide" en anglais) constituent une classe de peptides cationiques possédant une grande affinité pour les membranes. Les AMP sont notamment envisagés en tant qu'alternative aux antibiotiques du fait du développement de résistances des bactéries à ces derniers. Contrairement aux CPP, les AMP interagissent avec les membranes chargées négativement pour en modifier localement la structure, générant des défauts ou des pores et pouvant conduire *in fine* à la lyse des bactéries [106]–[110].

Cette capacité de certains peptides à rendre les membranes lipidiques perméables ou poreuses en fait des promoteurs très intéressants d'électrochimiluminescence dans des systèmes où les

liposomes encapsulent les réactifs de l'ECL et que l'on incube dans un milieu contenant ces peptides actifs. Dans ce contexte, nous nous sommes demandés si l'approche méthodologique initiée et décrite dans le chapitre 2 permet de mettre en évidence et surtout d'imager des événements de perméabilisation de la membrane lipidique en présence de peptides actifs (CPP ou AMP) vis-à-vis des membranes.

II. Propriétés structurales des peptides antimicrobiens et interactions avec les membranes lipidiques

1. Aspects structuraux

Les peptides antimicrobiens comprennent entre 12 et 50 acides aminés. La structure secondaire issue du repliement de cet enchainement peptidique sur lui-même voit notamment s'établir des liaisons hydrogène entre un groupement carbonyle C=O et un groupement amide N-H. Les structures secondaires rencontrées sont l'hélice α et le feuillet β . L'hélice α est caractérisée par des liaisons hydrogène parallèles à l'axe de l'hélice entre un acide aminé en position « n » et un consécutif espacé à la position « n+4 ». Dans cette structure, les résidus sont orientés vers l'extérieur de l'hélice. Le repliement en feuillet β est lui aussi une conséquence de liaisons hydrogène établies entre la chaîne peptidique d'un segment donné et celle d'un segment voisin pour construire une forme en « accordéon ». Dans ce type de structure, nous parlons de feuillet β parallèle si les segments de la chaîne peptidique vont dans le même sens et de feuillet β antiparallèle si les segments sont de sens opposés.

Pour ce qui relève des interactions intermoléculaires, qui gouvernent à la fois les associations entre peptides et les associations peptide-lipide, la distribution des charges portées par certains acides aminés le long de la chaîne peptidique doit être raccordée à la structure secondaire des peptides. En effet, les peptides antimicrobiens sont cationiques à pH physiologique du fait la protonation des acides aminés azotés (arginine, histidine, lysine). Ces charges peuvent s'engager dans des interactions de nature électrostatique avec les phospholipides possédants des têtes polaires chargées négativement [111]. Le caractère potentiellement amphiphile des peptides cationiques découle de la distribution des charges : les peptides amphiphiles primaires voient les résidus cationiques concentrés d'un seul côté de la chaîne peptidique, l'autre extrémité étant plus hydrophobe et constituée d'acides aminés neutres. Sous forme agrégée, cette première classe de peptide peut former des micelles.

Les amphipathiques secondaires génèrent des régions cationiques et d'autres hydrophobes à l'issue de leur repliement en feuillet β . Cette amphipathicité constitue le socle de la séquence d'interactions aboutissant soit à la perméabilisation de la membrane lipidique, soit à la translocation du peptide.

1.1. Mécanismes conduisant à la formation de pores membranaires

Les modes d'internalisation de peptides au sein de cellules se répartissent entre des processus qualifiables d'actifs et d'autres passifs. Les premiers mettent en jeu des étapes de reconnaissance spécifique au niveau de la membrane et mobilisent la « machinerie » cellulaire, qui met en jeu des étapes où des métabolites riches en énergie sont dégradés (par exemple l'ATP). Les seconds suivent les gradients de potentiel chimique et électrochimique et peuvent être modélisés sur des liposomes, sans assistance énergétique supplémentaire. Les modes actifs sont pour l'essentiel associés à l'endocytose de vésicules lipidiques ou à la macropinocytose (invagination de la membrane). Les modes passifs mettent tous en jeu une étape préliminaire d'association électrostatique entre le peptide et la tête polaire du lipide. Ensuite, les mécanismes diffèrent en fonction de la nature des peptides, leur concentration, entre autres conditions initiales. La figure suivante schématise les trois grands mécanismes gouvernant la perméation de membranes par des peptides classés dans la catégorie des AMP :

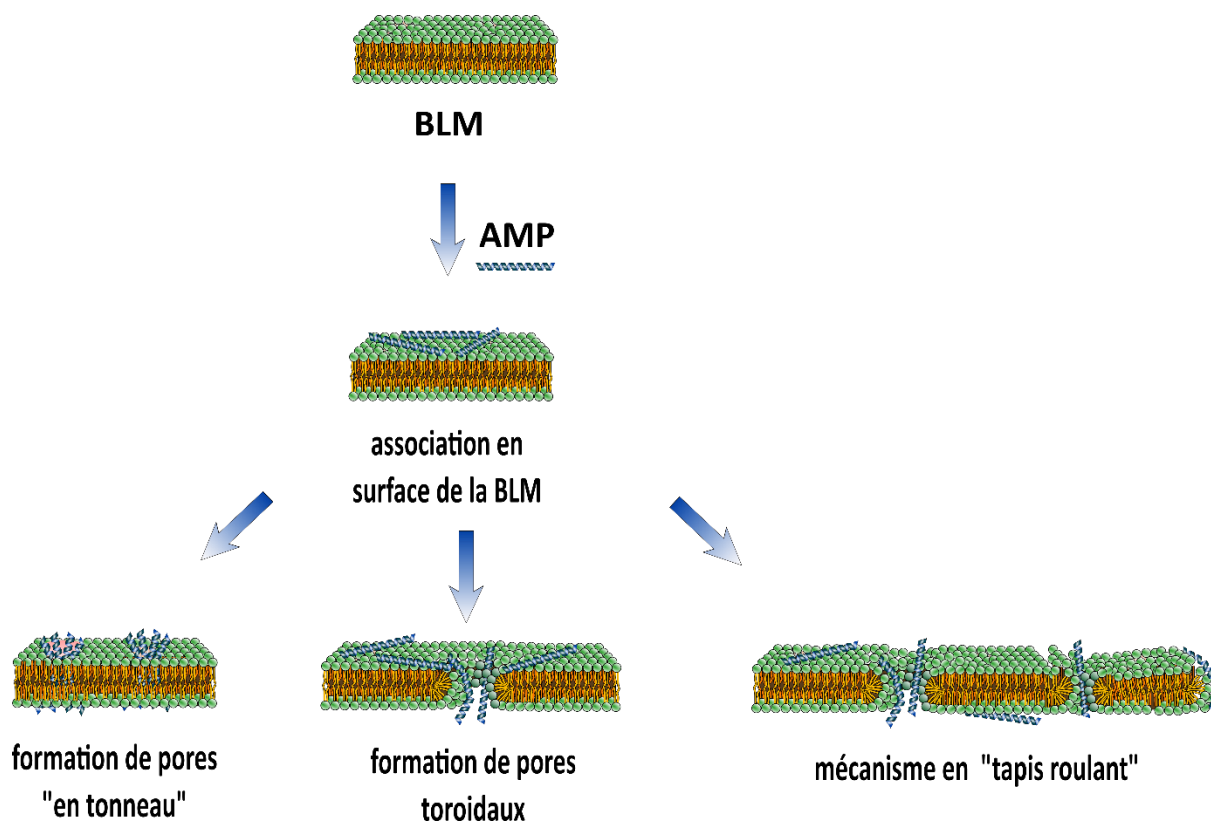


Figure 65 : Les différents mécanismes qui expliquent comment un peptide antimicrobien peut déstabiliser la membrane lipidique.

Les trois modèles mécanistiques majeurs décrits pour expliquer la formation de pores dans les membranes lipidiques sont : (i) le modèle des pores en tonneaux ("barrel-stave model"), (ii) le modèle des pores toroïdaux ("toroidal-pore model"), et (iii) le modèle du tapis ("carpet-like model"). [112]–[114].

Dans le modèle en tonneaux ("barrel-stave model"), les peptides vont se positionner perpendiculairement à la membrane de façon à former des pores ayant l'apparence de tonneaux (ici, les peptides représentent les parois du tonneau) [112]. Dans ce modèle, le caractère amphipathique des peptides est essentiel pour l'interaction avec la membrane. Ainsi, la face externe du tonneau (i.e. du peptide), elle-même hydrophobe, est orientée vers les chaînes hydrophobes de la membrane tandis que la face interne hydrophile est orientée vers le centre du pore qui délimite un compartiment aqueux [115]–[117]. A noter que le nombre de résidus (acides aminés) pour « perforer » la membrane dépendra de la structure secondaire du peptide. Ainsi, 22 résidus seront nécessaires pour les peptides adoptant une structure en hélice α , alors que 8 acides aminés suffisent pour les peptides ayant une structure en feuillets [113].

Les AMP connus pour former des pores selon ce mécanisme sont la pardaxine [118]–[120], l’alaméthicine et la dermcidine [121].

Le modèle du tapis ("carpet-like model") a été suggéré initialement pour décrire le mécanisme d’action de la dermaseptine S [122] et a ensuite été envisagé pour expliquer le mode d’action de la cécropine P1 [123]. Ce modèle est basé sur une disposition rigoureusement parallèle des peptides par rapport à la membrane [124]. En effet, les AMP agissant suivant ce modèle vont commencer par se déposer parallèlement à la bicouche phospholipidique en disposant leurs acides aminés hydrophobes en direction des chaînes lipidiques de la membrane et leurs acides aminés hydrophiles au contact des têtes polaires des phospholipides (Figure 65) [125]. Les peptides s’enfouissent partiellement dans la membrane et ne sont pas en contact avec le cœur hydrophobe de la bicouche. Après un accroissement considérable de la concentration en peptides (concentration seuil), la membrane est recouverte d’amas peptidiques à l’apparence d’un tapis provoquant des perturbations de l’agencement des phospholipides [116], [123], [126]–[128]. Cette altération engendre des perforations de la membrane qui induisent la libération des métabolites du cytoplasme puis une rupture complète de la membrane [112], [124].

Le modèle des pores toroïdaux ("toroidal-pore model") présente un mécanisme ressemblant à celui du modèle en tonneau à la différence que la membrane se retrouve courbée au niveau du pore. Dans ce cas de figure, les peptides sont en permanence liés aux têtes hydrophiles des phospholipides. [129] Autrement dit, les phospholipides de la bicouche s’intercalent avec les structures peptidiques dans le canal transmembranaire et font donc partie intégrante du pore (Figure 65) [112]. Dans la première étape de ce modèle, les peptides se lient à la membrane avec une orientation parallèle à la bicouche phospholipidique [130]. Puis, ils interagissent via leurs domaines hydrophobes ce qui induit un déplacement des têtes polaires des phospholipides provoquant de ce fait une courbure de la membrane. Lorsque la concentration seuil est atteinte, les peptides vont s’auto-assembler puis s’orienter perpendiculairement à la membrane et s’insérer à l’intérieur de celle-ci aboutissant ainsi à la formation des pores toroïdaux [116]. L’intérieur du pore est alors constitué du domaine polaire des structures peptidiques et des têtes polaires des phospholipides [112], [129], [131]. A noter que la charge peptidique diminue la stabilité des pores toroïdaux en raison de la répulsion électrostatique. Les temps de demi-vies des pores toroïdaux diminuent avec l’augmentation du nombre de

résidus chargés positivement [112], [116], [132]. La magainine 2 [133]–[135] ainsi que la mélittine [129], [136] sont deux AMP typiques formant des pores toroïdaux. A noter que la mélittine est l'archétype des AMP ; c'est donc cet AMP que nous avons sélectionné pour cette étude.

2. Approches/Méthodologies décrites pour l'étude de la perméabilisation membranaire de liposomes géants par des peptides anti-microbiens

De nombreuses techniques biophysiques ont été développées pour étudier la perméabilisation des membranes par les AMP [115]. La fluorescence a été utilisée pour mettre en évidence la perméabilisation de la membrane par les peptides antimicrobiens et dimensionner les pores formés par une mesure de fuite d'une sonde fluorescente libérée à travers ces pores [137]–[139]. Le dichroïsme circulaire est une autre technique biophysique capable de déterminer l'orientation et les structures secondaires des peptides (hélice α , feuillet β ...) grâce à une absorption différente de la lumière en fonction de la chiralité et de la structure secondaire d'un peptide. Dans le même contexte, la spectroscopie RMN du solide a été utilisée pour analyser en détail l'interaction phospholipide-peptide et la pénétration des peptides dans la membrane lipidique. La diffractométrie de neutrons, la diffraction des rayons X et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier sont aussi des méthodes d'analyse qui ont permis d'analyser le phénomène de la perméabilisation membranaire par les AMPs.

L'emploi de ces techniques se fait généralement en présence d'architectures phospholipidiques modèles comme les vésicules unilamellaires grandes / géantes (LUV/GUV pour "Large Unilamellar Vesicles" et "Giant Unilamellar Vesicles" en anglais) ou les bicouches lipidiques planes supportées. Néanmoins, l'utilisation de vésicules géantes est particulièrement intéressante car leur grande taille permet de les manipuler et de les visualiser aisément par microscopie optique [140]–[143].

Puisque mon travail met en jeu des liposomes géants, je vais maintenant présenter les principales approches utilisées actuellement pour étudier leur perméabilisation par des peptides antimicrobiens.

L'approche la plus populaire est la méthode dite de "suspension". Cette méthode, consiste à suspendre des vésicules géantes (GUV) dans une solution contenant une sonde fluorescente

hydrosoluble et imperméable à la membrane [144]–[148]. En présence d'un peptide actif vis-à-vis de la membrane, la fluorescence du contenu vésiculaire évolue et la fluorescence à l'extérieur des vésicules est alors mesurée et analysée par microscopie confocale tout au long du processus de perméabilisation. Une alternative consiste à encapsuler la sonde fluorescente hydrosoluble à l'intérieur des GUV. Dans ce cas, c'est la fuite de la sonde fluorescente qui est analysée via la perte de fluorescence à l'intérieur de la vésicule. Là encore, l'intensité de la fluorescence des GUV est observée en continu tout au long du processus par contraste de phase et par microscopie confocale de fluorescence [149]–[154]. Très récemment, la fuite des GUV a été étudiée en utilisant une méthode originale appelée "photo-voltage" qui consiste à suivre l'évolution temporelle des impulsions de charge/décharge des électrons photoinduits suite à la perméabilisation de la membrane par le peptide Tat et la détection du passage de la calcéine par les pores formés [155]. Cette approche a également été combinée à des observations par microscopie à fluorescence pour imager la fuite de GUV.

Dans ce contexte, l'approche méthodologique développée dans le chapitre 2 (basée sur l'ECL positive) peut se révéler intéressante et complémentaire des approches basées sur la fluorescence compte tenu notamment de la meilleure sensibilité de l'électrochimiluminescence.

Les mécanismes mis en jeu lors de la perméabilisation de liposomes géants (GUV) sont très difficiles à rationaliser. En effet, les processus dépendent de la contribution de nombreux paramètres expérimentaux comme la nature et la concentration du peptide, la composition lipidique, la température, la force ionique, le pH, etc... Malgré tout, les GUV ont été très utilisées pour étudier les processus mécanistiques impliqués dans leur perméabilisation au contact d'AMP tels que la magainine 2, la mélittine, le LL37, ou la lactoferricine B [153], [156]–[159]. Ces études soulignent le caractère stochastique de la perméabilisation, associé à la fuite de la sonde fluorescente (initialement présente à l'intérieur des GUV). Concrètement, il est impossible de définir à quel moment et à quel endroit de la GUV la fuite aura lieu. Malgré cela, un évènement de perméabilisation se matérialise par une vésicule qui se vide rapidement (1 à 2 secondes).

Puisque la mélittine est un AMP typique, nous avons donc décidé de focaliser notre travail sur la perméabilisation de membranes de liposomes géants par ce peptide antimicrobien.

La mélittine, qui est le principal composant du venin de l'abeille européenne, est un peptide linéaire cationique composé de 26 acides aminés. Elle est souvent utilisée comme système modèle pour étudier la structure, le repliement et la fonction des peptides et des protéines dans les membranes [160]. Elle a également fait l'objet d'études précliniques en tant qu'agent anticancéreux pour ses effets lytiques étendus sur plusieurs types de tumeurs [161], [162]. Malgré de nombreuses recherches, les mécanismes de perméabilisation membranaire déclenchés par la mélittine font toujours débat car ils peuvent être multiples [163], [164]. Dans des conditions spécifiques, il a été suggéré que la mélittine puisse s'assembler en faisceaux hélicoïdaux transmembranaires stables pour former des pores [129]. Cependant, dans les bicouches synthétiques, la mélittine adopte généralement une orientation d'équilibre qui est parallèle à la surface de la membrane [165], [166]. Cela conduit à une perméabilisation transitoire des membranes avec un pic de fuite survenant assez rapidement après l'ajout du peptide (< 1 minute). Il est intéressant de noter qu'après cette "explosion" initiale, la fuite ralentit ou s'arrête généralement [163], [164], [167], [168].

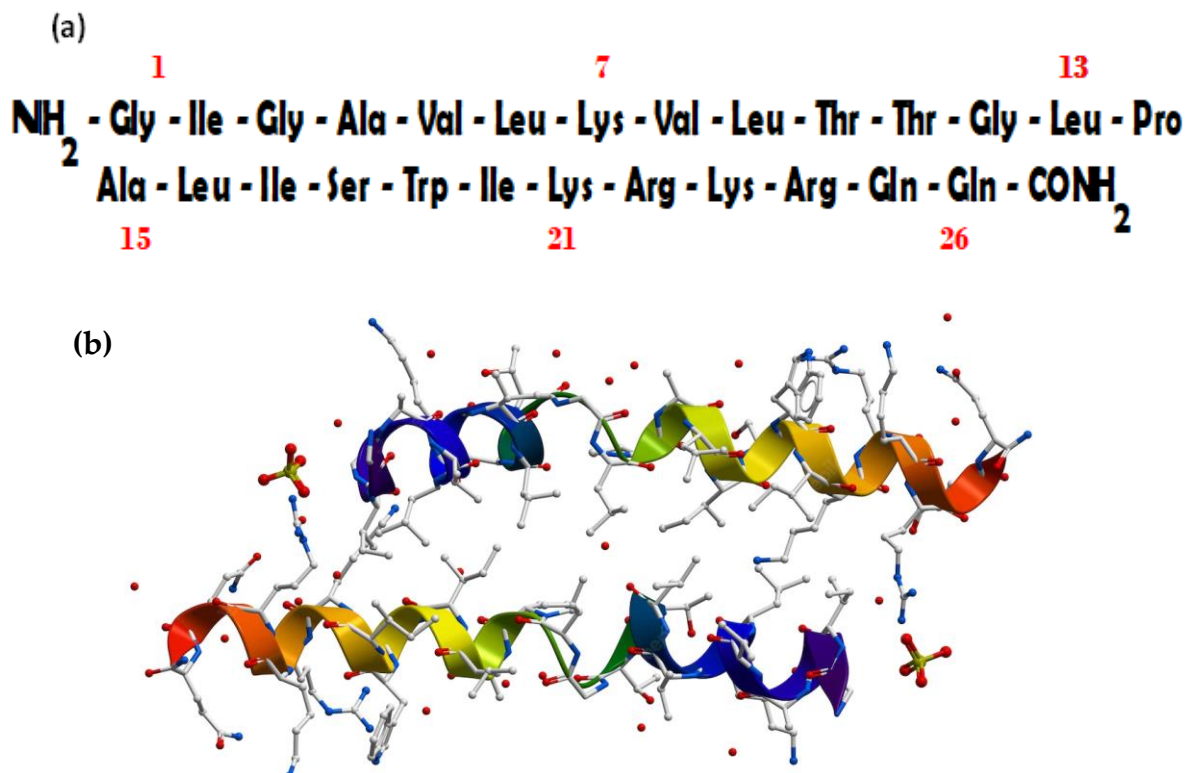


Figure 66 : séquence de la mélittine (a) et un dessin schématique en 3d (b) [169]

III. Imagerie par électrochimiluminescence de la perméabilisation membranaire de liposomes géants par un peptide antimicrobien : la mélittine

1. Choix des conditions expérimentales

Afin d'imager par électrochimiluminescence la perméabilisation de liposomes géants par la mélittine, il était important de définir les conditions expérimentales appropriées. Pour rappel, la stratégie décrite dans le chapitre 2 consiste à encapsuler le luminophore ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$) et le co-réactif (TPrA) de façon à générer de la lumière en cas de perméabilisation membranaire via l'oxydation des réactifs à la surface de l'électrode.

Le choix des phospholipides a été dicté non seulement par leur capacité à maintenir les liposomes imperméables tant qu'ils ne sont pas en contact avec le peptide antimicrobien (AMP), mais aussi pour leur pertinence dans l'exploration de la perméabilisation membranaire par les AMP [170], [171]. Comme montré dans le chapitre 2, l'utilisation d'un phospholipide zwitterionique de la série des phosphocholines, tel que le DOPC, sur le feuillet interne est nécessaire pour former des liposomes stables dont les lipides n'interagissent pas avec la tri-propylamine (TPrA) à l'intérieur des liposomes. En second lieu, considérant que les AMP sont globalement chargés positivement et que les principales forces motrices mises en jeu lors de l'interaction peptides/lipides sont l'attraction électrostatique et l'interaction hydrophobe [127], l'utilisation de DOPG chargé négativement sur le feuillet externe est apparu comme pertinent.

Cependant, comme nous l'avons montré dans le chapitre 2, les liposomes asymétriques de type $\text{DOPC}_{\text{int}}/\text{DOPG}_{\text{ext}}$ éclatent au contact avec une surface polarisée [172]. L'objectif ici étant la caractérisation de la perméabilisation de la membrane par la mélittine, il était donc crucial de s'affranchir de tout effet de l'électrode sur la stabilité de la membrane. Cet écueil a été contourné avec succès en couvrant la surface de l'électrode en ITO avec de la poly-L-lysine. Dans ces conditions, et comme montré en Figure 67, les liposomes se sont révélés être stables pendant au moins 30 minutes.

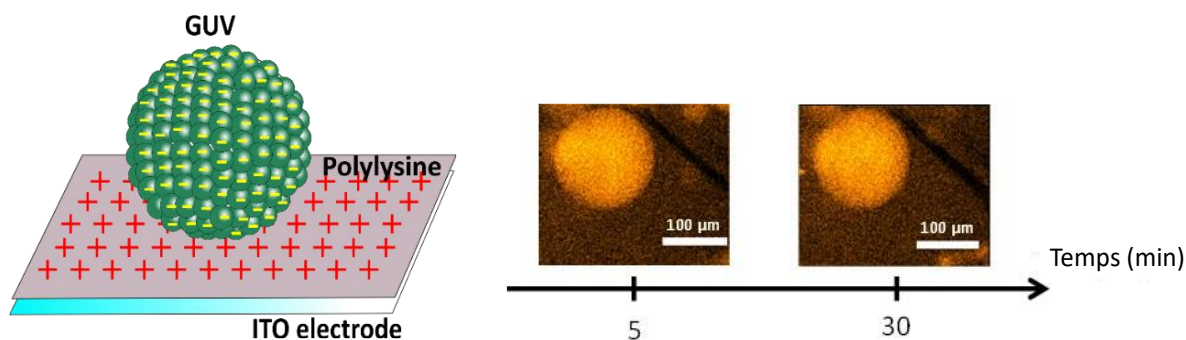


Figure 67 : Images photoluminescentes d'un liposome géant asymétrique composé de DOPG et de DOPC sur ses feuillets externe et interne, respectivement. Le liposome contient les réactifs ECL ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) et TPrA ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$)) et repose sur une surface en ITO recouverte de poly-L-lysine polarisée à $+1,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. Images enregistrées à $t = 5 \text{ min.}$ et $t = 30 \text{ min.}$ de polarisation. Ces images de microscopie obtenues en photoluminescence (PL) révèlent clairement la localisation du complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à l'intérieur du liposome avec une lumière excitatrice à $\lambda_{\text{ex}} = 455 \text{ nm.}$

La présence de la poly-L-lysine à la surface de l'électrode polarisée permet bien de stabiliser les liposomes géants. Il nous restait à nous assurer qu'en cas de perméabilisation membranaire par la mélittine, la présence de poly-lysine ne bloquera pas les processus d'oxydation du luminophore et du co-réactif. Pour répondre à ces questions, nous avons comparé des études réalisées par voltamétrie cyclique sur des électrodes en ITO recouvertes ou non de poly-L-lysine.

La Figure 68 et la Figure 69 montrent les voltamogrammes obtenus pour le luminophore seul et en présence du co-réactif sur une électrode en ITO non modifiée (courbe bleue) ou modifiée par la poly-L-lysine (courbe rouge). Il apparaît que la présence du polymère ne bloque pas les processus rédox des réactifs ECL (allure et intensité du processus faradique quasi-identiques dans les deux cas).

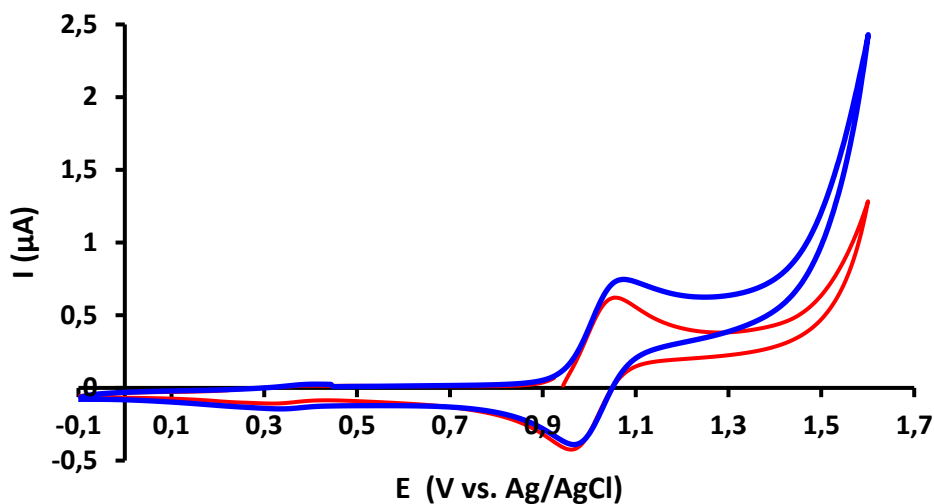


Figure 68 : Voltampérogramme cyclique d'une solution de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ dans une solution de glucose à $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$, dissout dans du PBS à $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ et $\text{pH} = 7,5$. L'expérience est réalisée sur une électrode de travail en ITO, couverte (rouge) et non- couverte (bleu) par de la poly-L-lysine, polarisée à $+1,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. La vitesse de balayage égale à 50 mV.s^{-1} .

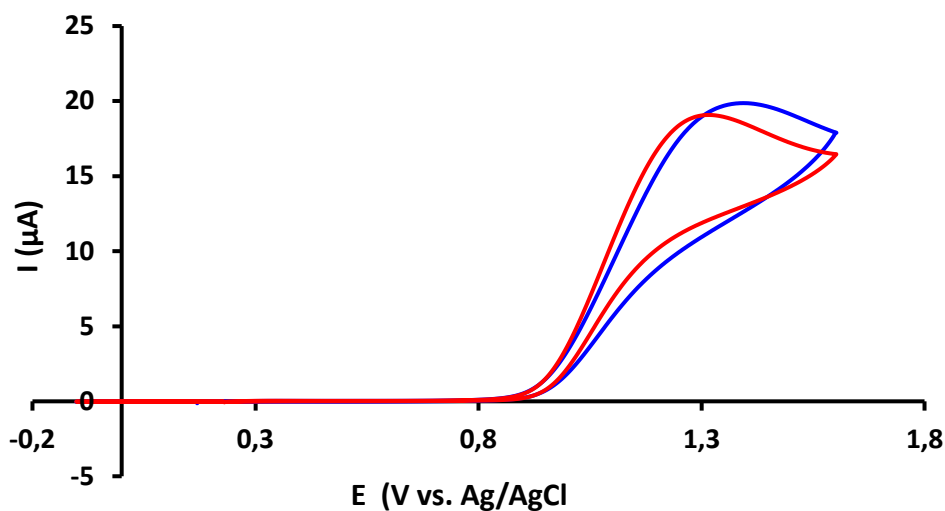


Figure 69 : Voltampérogramme cyclique d'une solution de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ et tri-*n*-propylamine à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ dans une solution de glucose à $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$, dissout dans du PBS à $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ et $\text{pH} = 7,5$. L'expérience est réalisée sur une électrode de travail en ITO, couverte (rouge) et non couverte (bleu) par de la poly-L-lysine, et polarisée à $+1,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. La vitesse de balayage égale à 50 mV.s^{-1} .

De la même façon, l'intensité ECL générée à partir d'une solution contenant le luminophore ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}] = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) et le co-réactif ($[\text{TPrA}] = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) n'est que très légèrement affectée. Comme montrée dans la Figure 70, une perte de luminescence d'environ 10 % est observée en présence du polymère indiquant que ce dernier ne forme pas un film opaque à la surface de l'électrode.

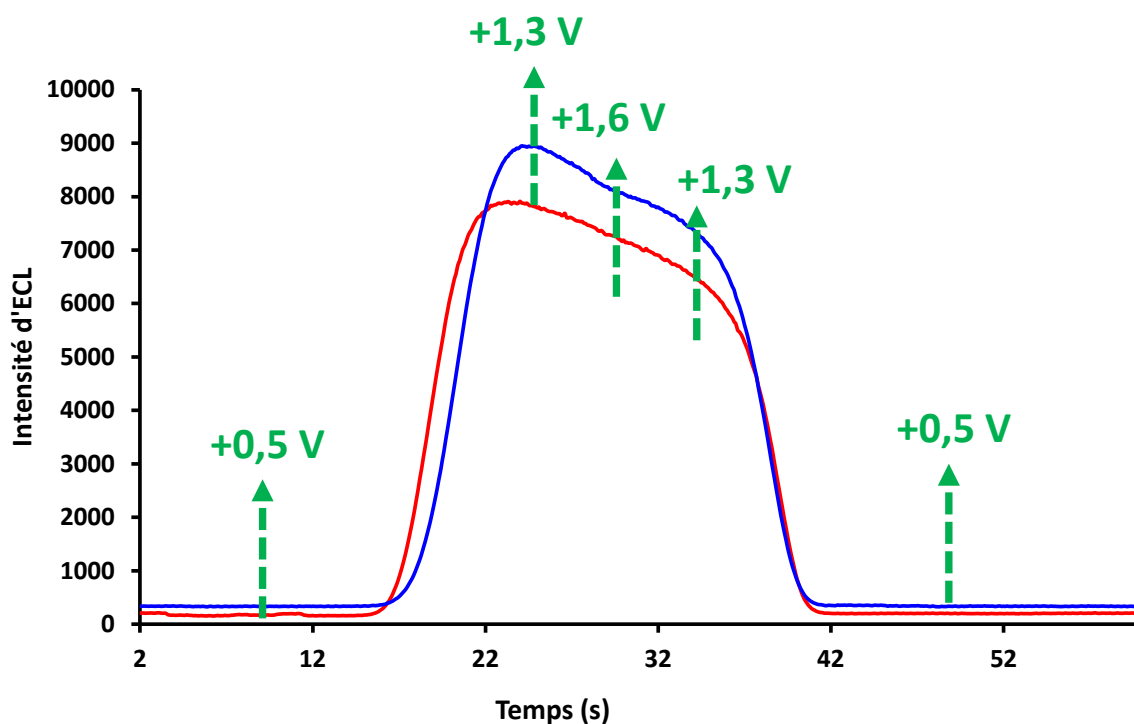


Figure 70 : Variation de l'intensité ECL en fonction du temps d'un mélange comprenant le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), la tri-*n*-propylamine ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$), et du glucose ($0,7 \text{ mol.L}^{-1}$), dissouts dans du PBS (10 mmol.L^{-1} , $\text{pH} = 7,5$). L'expérience est réalisée sur une électrode de travail en ITO avec un balayage de potentiel de $-0,1 \text{ V}$ à $+1,6 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, couverte (rouge) et non-couverte (bleu) par de la poly-L-lysine.

Pour conclure cet état des lieux sur la possibilité d'observer de l'ECL dans une configuration d'électrode permettant de stabiliser les GUVs, l'utilisation de liposomes géants de type DOPC/DOPG et d'une électrode en ITO recouverte de poly-L-lysine semble robuste et appropriée pour étudier la perméabilisation de membranes par la mélittine.

2. Combinaison de photoluminescence (PL) et d'électrochimiluminescence (ECL) pour imager la perméabilisation de la membrane lipidique de liposomes géants par la mélittine

Après s'être assuré que la poly-L-lysine permet d'éviter une électroporation des liposomes et n'empêche pas de générer un signal ECL, nous avons étudié la perméabilisation de la membrane lipidique de liposomes géants par la mélittine. Comme dans le Chapitre 2, l'approche ECL a été combinée à la photoluminescence de façon à obtenir des informations complémentaires sur l'état du liposome avant et pendant sa perméabilisation (localisation, forme géométrique, dynamique de fuite). Malheureusement, l'ampérométrie n'est pas ici une méthode quantitative du fait d'efflux trop faibles et/ou éloignés de la surface de l'électrode conduisant ainsi à des courants faradiques non-significatifs par rapport au courant capacitif.

Du point de vue expérimental, les liposomes géants sont tout d'abord ajoutés dans la cellule électrochimique (la même que celle utilisée dans les chapitres précédents). Après sédimentation des liposomes à la surface de l'électrode en ITO recouverte de poly-L-lysine, la mélittine est alors ajoutée tout en faisant attention à garder constante l'osmolalité de la solution (environ 1000 mosol.kg⁻¹). Les premières expériences ont été réalisées à une concentration de mélittine de 10 μM (concentration finale dans la cellule électrochimique). Dans ces conditions, les processus de perméabilisation des membranes des liposomes ont été observés, à la fois par photoluminescence (PL) et par ECL (acquisition dans la Figure 71), après seulement quelques dizaines de secondes suivant l'ajout des peptides. La Figure 72 (a) montre deux planches d'images ECL et PL enregistrées avant et pendant la perméabilisation de la membrane d'un liposome (cf. liposome situé dans le carré blanc en pointillés).

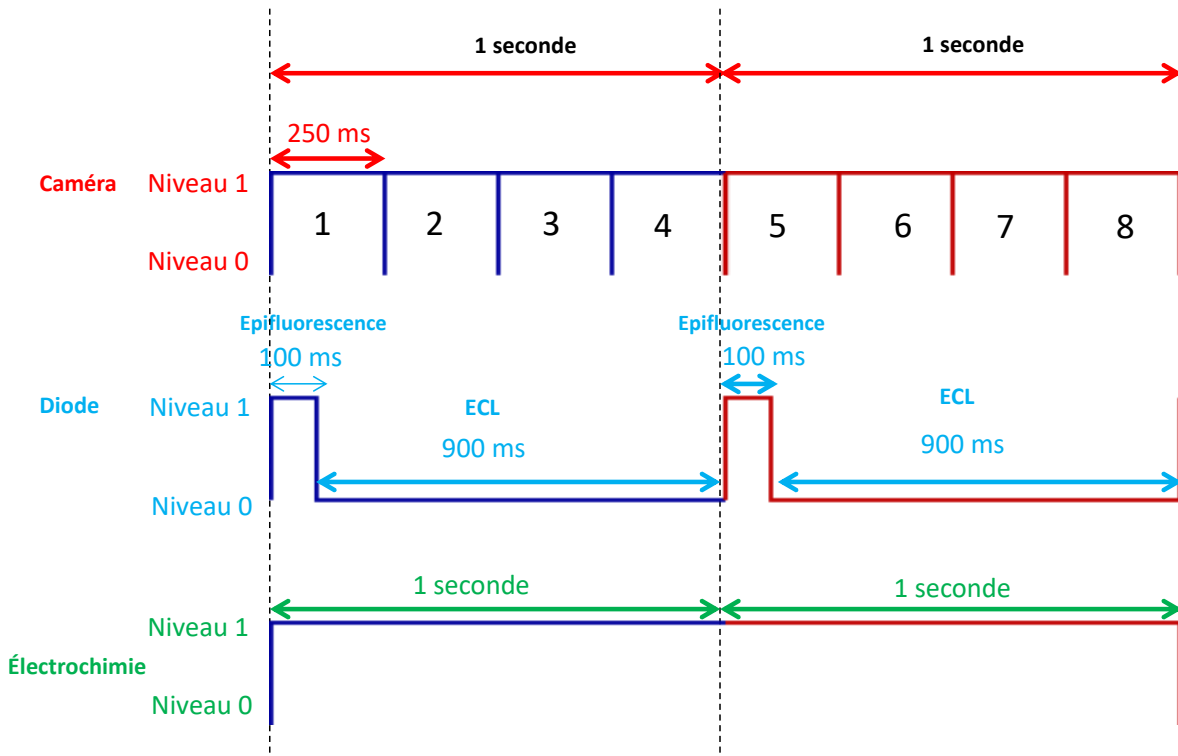


Figure 71 : Protocole d'acquisition échantillonnée utilisé pour l'enregistrement simultané des données en électrochimie, ECL et photoluminescence. La figure correspond à une durée totale d'acquisition de 2 secondes.

Comme expliqué dans le deuxième chapitre de ce manuscrit, l'enregistrement des images est réalisé d'une manière échantillonnée qui donne la possibilité d'avoir deux types d'images : des images en photoluminescence obtenues grâce à la présence d'une diode clignotante allumée que pendant 100 ms par seconde et des images collectées quand cette diode est éteinte.

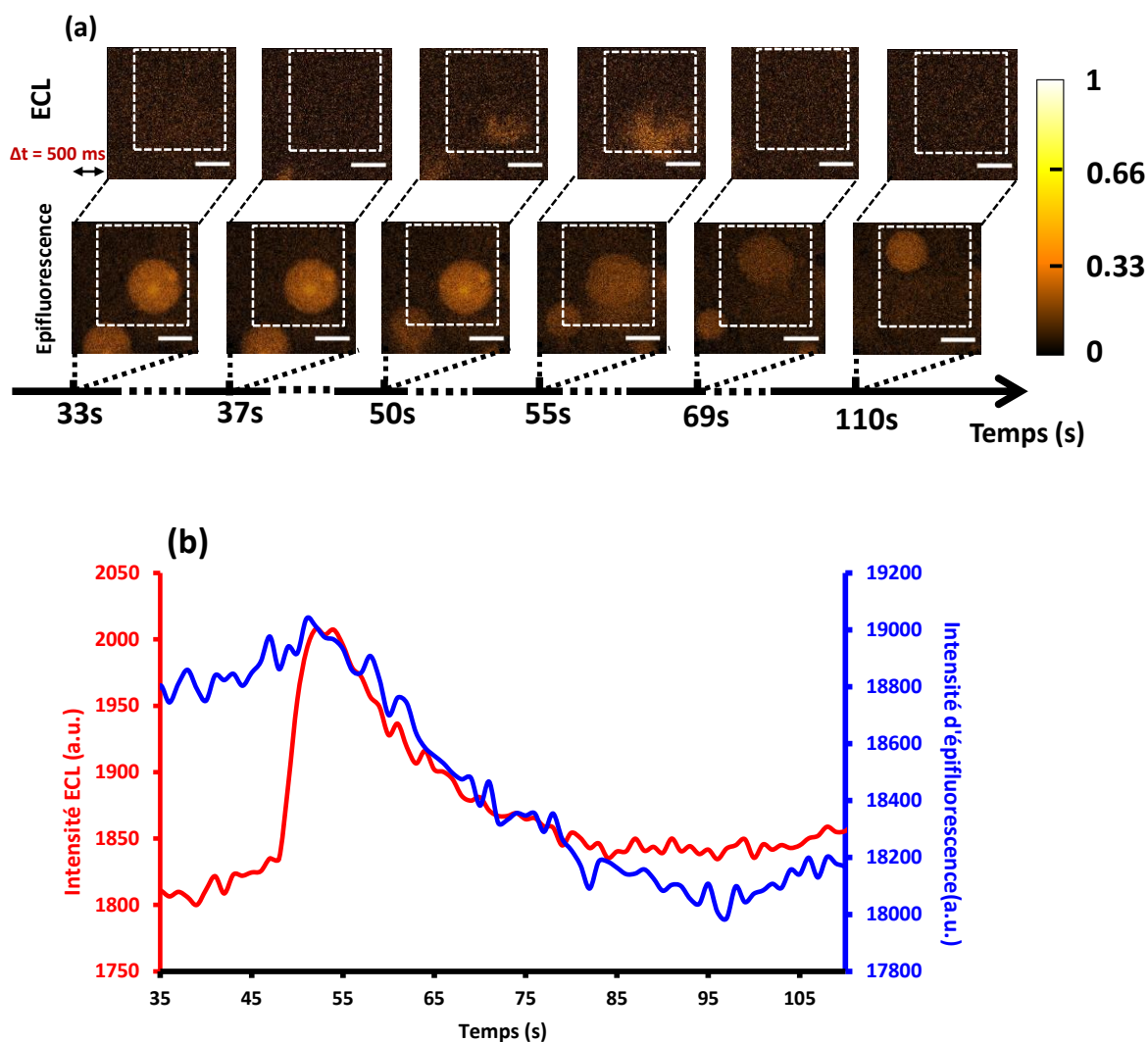


Figure 72 : (a) Superposition d'images ECL (en haut) et PL (en bas) montrant la perméation d'un liposome DOPC/DOPG par la mélittine à 1.10^{-5} mol.L⁻¹. Le liposome contenant le complexe $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ à $2,5.10^{-4}$ mol.L⁻¹ et le co-réactif TPrA à 0,1 mol.L⁻¹ repose sur une électrode en ITO polarisée (+1,2 V vs. Ag/AgCl) et modifiée par de la poly-L-lysine. Pour éviter tout chevauchement entre les deux types d'informations visuelles, les images ECL et PL présentent une différence de temps d'acquisition initiale de 500 ms. La mise au point a été faite à la surface de l'électrode ITO pendant l'imagerie ECL et PL. Les carrés blancs en pointillés dans les images PL et ECL représentent la région d'intérêt (ROI) typique prise en compte pour les analyses quantitatives des intensités correspondantes. Barre d'échelle : 100 μ m. (b) Évolution des signaux PL (courbe bleue) et ECL (courbe rouge) obtenus en fonction du temps pour un seul liposome [présenté en (A)] perméabilisé par la mélittine.

Avant l'action des peptides sur la membrane ($t < 50$ s), les images obtenues en PL montrent un liposome intact. En accord avec cela, les images correspondantes de la planche ECL sont « noires », entendez sans détection d'aucune émission lumineuse.

Pour $50 < t < 69$ secondes, un signal ECL est détecté en bas de l'image, révélant une fuite des réactifs ECL depuis l'intérieur du liposome. Ceci est confirmé par les images PL qui montrent, de façon concomitante, une forte décroissance de la fluorescence suivie d'un déplacement du liposome dans la direction opposée à la fuite (c'est-à-dire vers le haut de l'image). Ce mouvement peut être expliqué par un effet de propulsion du liposome consécutif à la libération d'une partie du contenu vésiculaire vers l'extérieur.

A $t = 110$ secondes, le liposome est redevenu immobile et sa taille a fortement diminué en accord avec la fuite observée. L'absence de signal ECL montre que l'étape de libération du contenu vésiculaire est terminée.

A ce stade, il est important de noter que ce comportement montrant une "perméabilisation transitoire" est assez atypique. En effet, dans la plupart de nos expériences nous observons une fuite totale et complète aboutissant à une disparition de l'image du liposome en photoluminescence.

Ces observations qualitatives, tant en ECL qu'en PL, indiquent clairement une perméabilisation de la membrane par la mélittine ajoutée, en accord avec l'apparition d'un signal ECL résultant de la libération et de l'oxydation du contenu vésiculaire. Cela confirme i) que la couche de polylysine déposée sur l'électrode ITO permet le transfert d'électrons entre le luminophore/co-réactif libéré et l'électrode et ii) que la perméabilisation de la membrane est bien générée par la mélittine.

Nous avons reporté les intensités PL et ECL en fonction du temps en prenant comme zone d'intérêt celle délimitée par les tirets blanc pointillés (Figure 72 (a)). Comme le montre la Figure 72 (b), la combinaison des deux signaux permet un suivi complet de la perméabilisation d'un seul liposome et de la libération de son contenu. Ainsi, à $t = 50$ sec., la perméabilisation du liposome conduit tout d'abord à une augmentation très rapide (quelques secondes) du signal ECL alors que dans le même temps l'intensité du signal PL diminue en accord avec une fuite du liposome. Puis, l'intensité des deux signaux diminue avec la même cinétique confirmant que les deux réponses proviennent bien du même liposome. En outre, la durée et la forme du signal sont similaires pour l'ECL et le PL en accord avec le fait que ces deux types d'émission de lumière dépendent des caractéristiques du même luminophore (concentration, diffusion). On remarque également que les signaux lumineux diminuent pendant plusieurs

dizaines de secondes (environ 30 secondes), fenêtre de temps en accord avec celles observées dans d'autres études [88] révélant une fuite plutôt lente. L'ouverture brutale (éclatement) des liposomes observés sur une électrode non modifiée (Chapitre 2) permettait une mesure ampérométrique et une quantification du contenu vésiculaire, ce que n'autorise pas le flux trop faible déclenché par la mélittine.

Bien que la fuite observée sur la Figure 72 soit incomplète dans la fenêtre de temps explorée (arrêt de la fuite à $t = 110$ sec.), le liposome nouvellement formé s'est mis à fuir de nouveau environ deux minutes plus tard suite, vraisemblablement, au processus de perméabilisation par de nouveaux peptides arrivés au contact de la membrane. Les images PL et ECL des deux fuites successives se produisant sur le même liposome sont rassemblées sur la Figure 73.

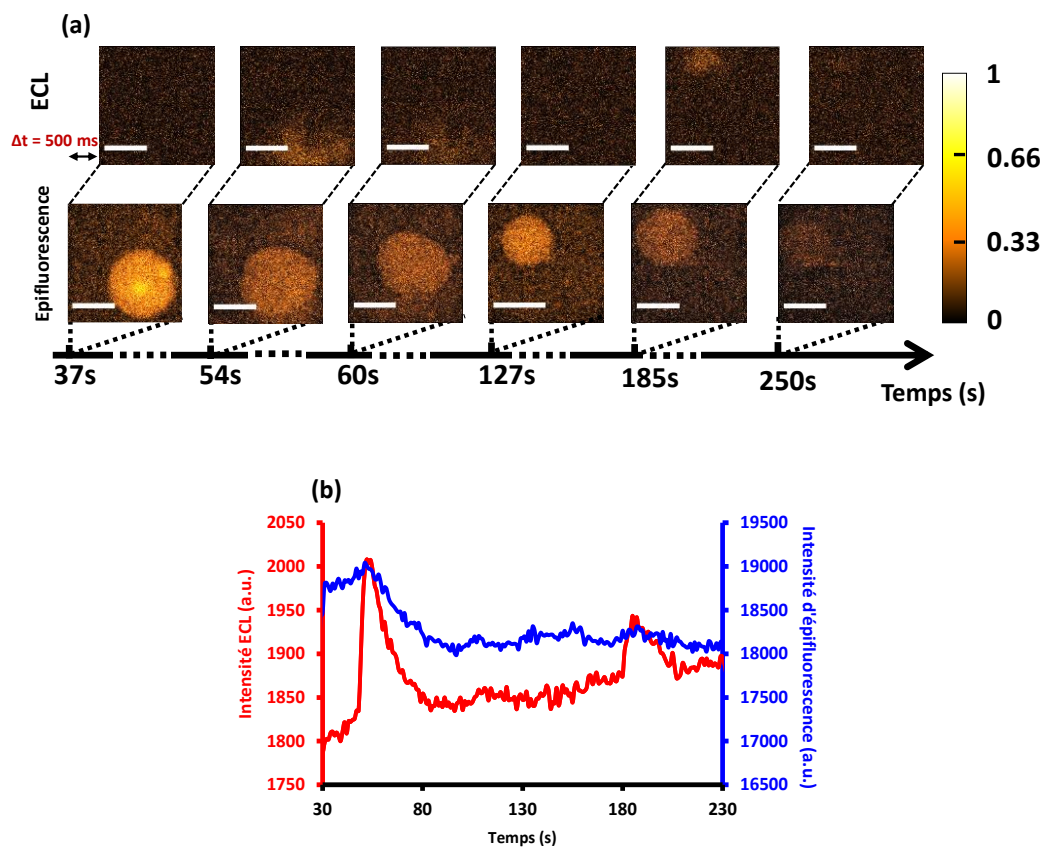


Figure 73 : (a) Combinaison d'imagerie ECL (en haut) et PL (en bas) montrant deux processus successifs de perméation d'un liposome unique par la mélittine en fonction du temps. Dans ce cas, la région d'intérêt (ROI) correspond à l'image entière. Barre d'échelle : 100 μm. (b) Évolution de l'intensité PL (courbe bleue) et ECL (courbe rouge) en fonction du temps pour un seul liposome [présenté en (a)]. Mêmes conditions expérimentales que dans la précédente.

Par rapport à la première fuite, et comme le montre la désynchronisation entre les images PL et ECL, la seconde apparaît sur la face opposée du liposome (haut de l'image), le liposome restant immobile dans ce cas. La deuxième fuite est, cette fois, complète en accord avec la disparition de l'image du liposome (voir l'image PL à $t = 250$ s). Du point de vue quantitatif (cf. Figure 73 (b)), en prenant l'image complète comme zone d'intérêt, le second signal ECL (courbe rouge) apparaît moins intense que le premier indiquant que la plus grande partie du contenu du liposome a fuité durant le premier événement. De la même façon, en PL, la baisse d'intensité du second signal est beaucoup plus faible que le premier et se confond presque avec le bruit de fond indiquant une moins bonne sensibilité par rapport à l'ECL.

Les résultats encourageants obtenus en présence de mélattine, utilisée à une concentration de $10 \mu\text{M}$, nous ont conduits ensuite à tester la sensibilité de notre approche en travaillant avec des concentrations plus petites en peptide même si le ratio peptide/lipide ne peut être contrôlé strictement dans nos conditions expérimentales. Aussi, une série d'expériences a été réalisée à $1 \mu\text{M}$ et 100 nM en AMP (Figure 74 et Figure 75).

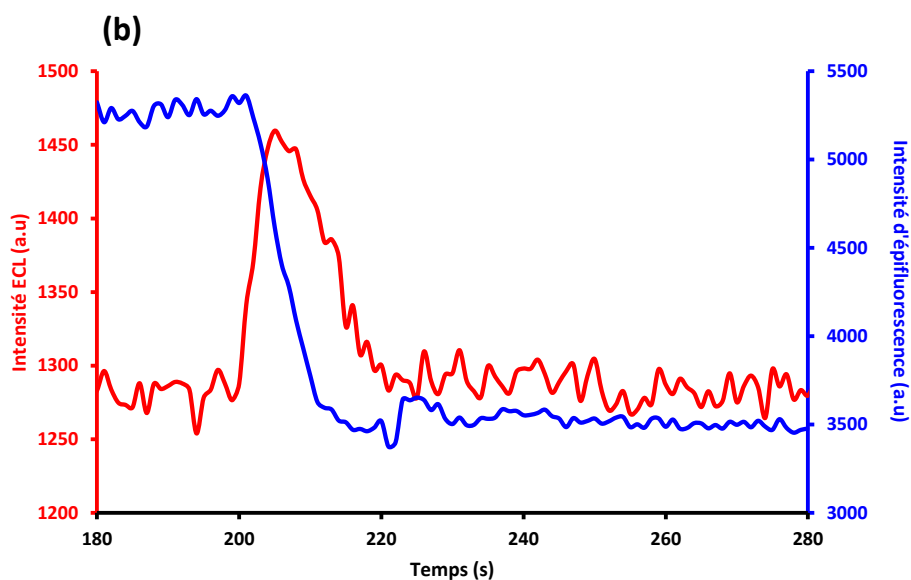
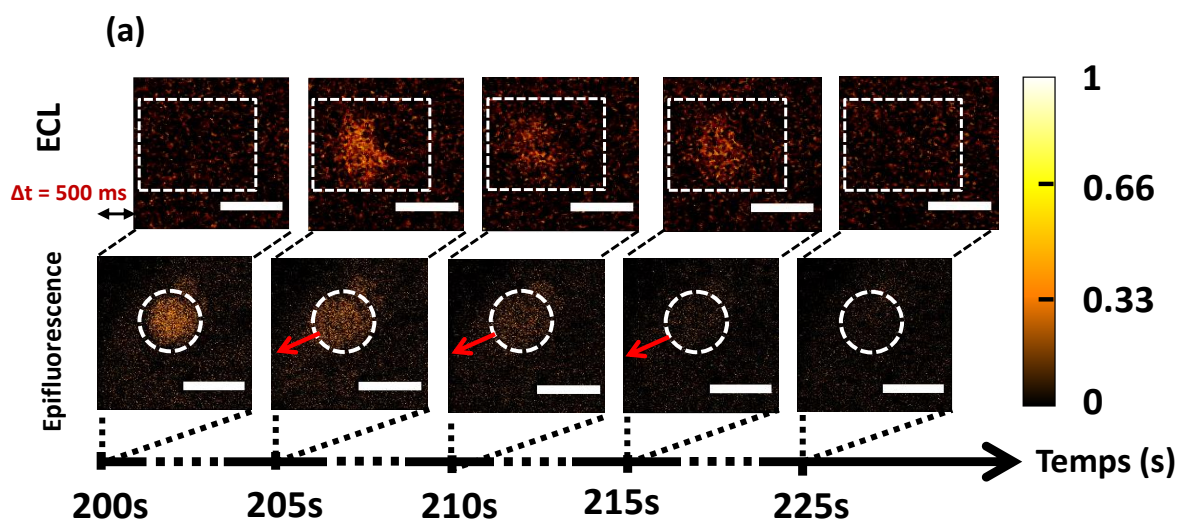


Figure 74 : (a) Combinaison d'imagerie ECL (en haut) et PL (en bas) montrant un processus de perméation d'un liposome unique par la mélistine (1.10^{-6} mol.L $^{-1}$) en fonction du temps. Barre d'échelle : 100 μ m. (b) Évolution de l'intensité PL (courbe bleue) et ECL (courbe rouge) en fonction du temps pour un seul liposome [présenté en (a)]. Mêmes conditions expérimentales que dans la Figure 73 précédente sauf pour la concentration en mélistine (1.10^{-6} mol.L $^{-1}$). Les régions d'intérêt sont représentées en traits pointillés blanc. Les flèches rouges indiquent l'emplacement de la fuite.

Globalement, quelle que soit la concentration en AMP, des comportements similaires ont été observés tant en PL qu'en ECL. De manière générale, plus la concentration en peptide est faible, plus le délai entre l'ajout du peptide et le processus de perméabilisation est long et en conséquence plus l'intensité de l'ECL est faible. Plus précisément, à une concentration de 1 μ M en mélistine (Figure 74), il est encore possible de localiser l'emplacement de la fuite par ECL

(des flèches rouges ont été ajoutées sur les images PL pour matérialiser la fuite), alors que cela est quasi-impossible par PL (comparer les images ECL et PL de la Figure 74(a)). La grande sensibilité de l'ECL par rapport à la PL trouve ici toute son utilité.

La perméabilisation des vésicules a pu être quantifiée non seulement par ECL, mais aussi par PL, à condition de sélectionner une zone d'intérêt ad-hoc (voir Figure 74(a) et Figure 74(b)). Comme nous l'avons observé à une concentration de 10 μM en AMP, la concomitance de la diminution de l'intensité PL et de l'augmentation de l'intensité ECL montre que les deux signaux proviennent du même liposome. En outre, la durée du signal ECL se situe dans la même gamme de temps que celle observée précédemment et, dans tous les cas étudiés, une fuite complète s'est produite.

Enfin, nous nous sommes demandés si l'imagerie ECL permettait encore de visualiser la perméation des liposomes si on diminue d'un facteur 10 la concentration en mélittine. La Figure 75 montre deux planches d'images obtenues en ECL et PL ainsi que l'analyse quantitative de ces images en prenant des zones d'intérêt adéquates (cf. traits pointillés blanc) obtenues pour une concentration de 100 nM en mélittine. A cette concentration, le signal ECL devient trop diffus pour localiser précisément la partie du liposome qui fuit (comparer les Figure 74(a) et Figure 75 (a)). La zone d'intérêt a dû être élargie de façon à pouvoir extraire le signal ECL du bruit de fond (Figure 75 (b)). Néanmoins, les signaux ECL et PL sont toujours concomitants et la durée du signal ECL se situe toujours dans la même fenêtre de temps que celles observées précédemment.

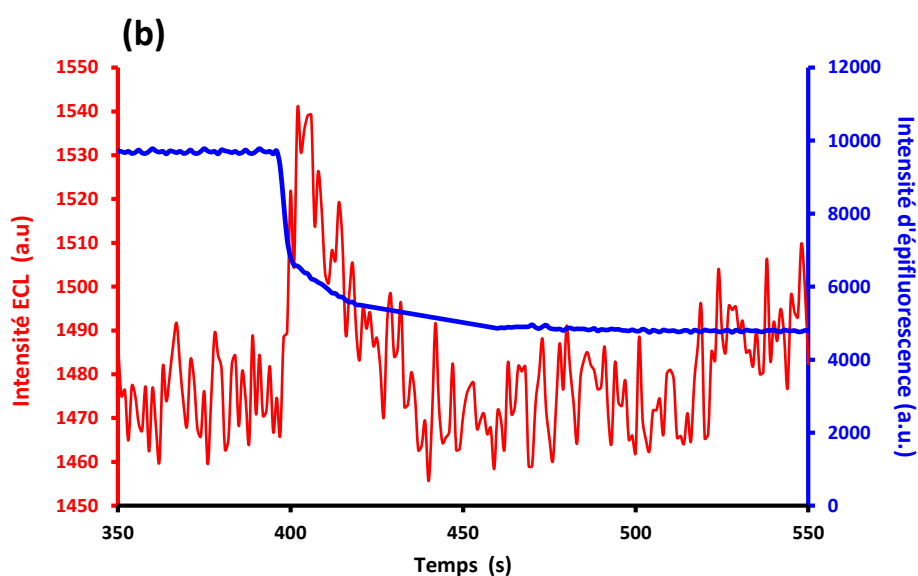
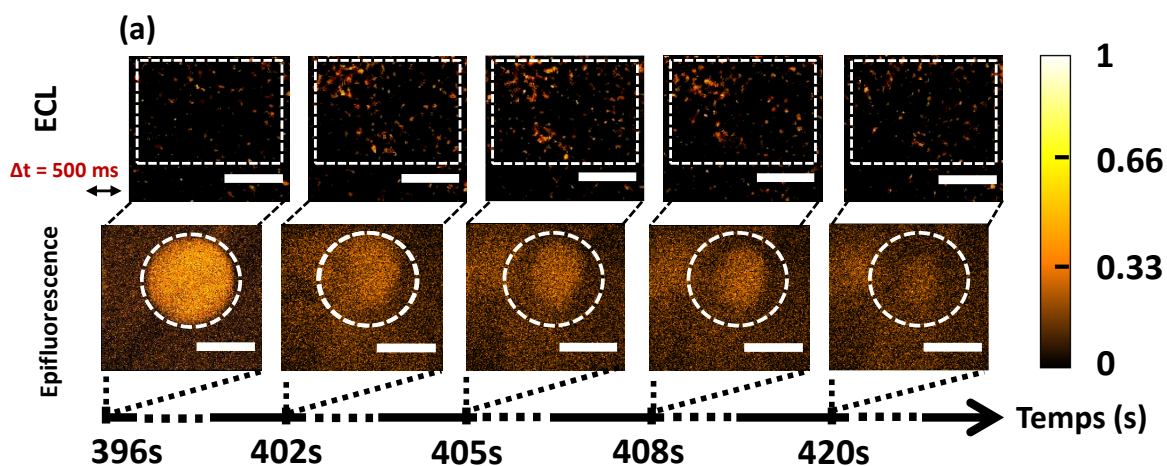


Figure 75 : (a) Combinaison d'imagerie ECL (en haut) et PL (en bas) montrant deux processus successifs de perméation d'un liposome unique par la méltinine (1.10^{-7} mol.L $^{-1}$) en fonction du temps. Barre d'échelle : 100 μ m. (B) Évolution de l'intensité PL (courbe bleue) et ECL (courbe rouge) en fonction du temps pour un seul liposome [présenté en (a)]. Mêmes conditions expérimentales que dans la Figure 74 précédente sauf pour la concentration en méltinine (1.10^{-6} mol.L $^{-1}$). Les régions d'intérêt sont représentées en traits pointillés blanc.

3. Combinaison photoluminescence (PL) et électrochimiluminescence (ECL) pour imager la perméabilisation de la membrane lipidique de liposomes géants par des peptides pénétrants

Les résultats obtenus avec la mélittine nous ont incités à étudier de possibles effets de perméabilisation de liposomes géants par des peptides pénétrants (CPP pour "Cell Penetrating Peptide" en anglais). Contrairement aux AMP, les CPP peuvent être considérés comme des peptides « neutres » du point de vue de la rupture (même locale) des membranes lipidiques. Néanmoins, sous certaines conditions (ex. concentration élevée en peptide), les CPP peuvent se comporter comme des AMP c'est-à-dire conduire à la lyse des liposomes [173].

Pour ce travail, plusieurs CPP ont été synthétisés au sein du Laboratoire des Molécules (LBM – UMR 7203) par Dr F. Burlina et des anciens étudiants. Pour ce faire, notre choix s'est porté sur les peptides suivants : Ac-pénétratine (Ac-RQIKIWFQNRRM(O₂)KWKK-NH₂) ; Ac-tat (Ac-YGRKKRRQRRR-NH₂) ; R9 (apa-RRRRRRRRR-NH₂) ; Ac-Rw9 (RRWWRRWRR-NH₂).

En transposant les conditions d'étude mises au point pour les AMP, nous avons étudié la perméabilisation de la membrane lipidique par les peptides pénétrants, à trois concentrations différentes : 10 μM, 1 μM et 100 nM.

Les résultats obtenus, à partir de différents peptides et différentes concentrations, ont montré une disparition des liposomes, détectée par photoluminescence, traduisant une perméabilisation membranaire par les CPP. Ce résultat préliminaire, obtenu pour une concentration relativement élevée de peptides induit une perméation de la membrane lipidique.

Néanmoins, ces observations n'étaient pas associées à un enregistrement des signaux ECL. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce comportement : (i) la libération du contenu se déroule trop loin de la surface de l'électrode pour permettre une oxydation significative du luminophore et du co-réactif. Les pores ou défauts formés par les CPP ne sont pas nombreux, ce qui diminue la quantité de solution libérée.

Ces résultats valident néanmoins notre méthodologie expérimentale pour imager le comportement de CPPs pour lesquels la concentration serait suffisante pour générer transitoirement et localement un efflux significatif du contenu vésiculaire.

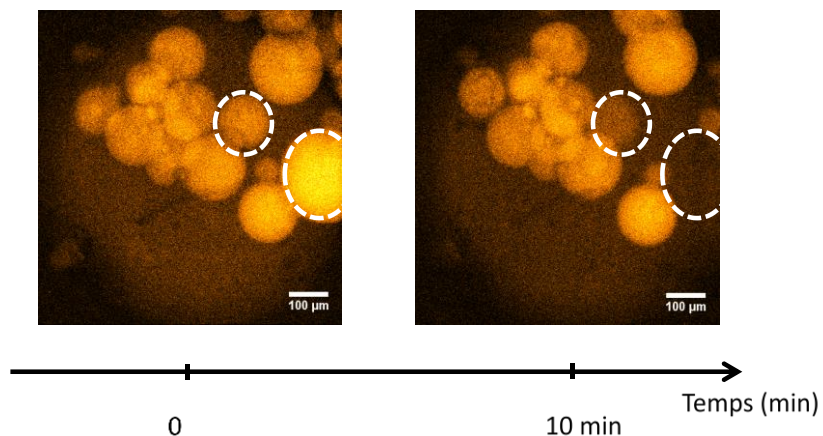


Figure 76 : Images photoluminescentes (lumière d'excitation à 455 nm) de plusieurs liposomes géants asymétriques composés de DOPG et de DOPC sur leurs feuillets externe et interne, respectivement. Les liposomes contiennent les réactifs ECL ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) et TPrA ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$)) et repose sur une surface en ITO recouverte de poly-L-lysine polarisée à +1,2 V vs. Ag/AgCl. Images enregistrées à $t = 5 \text{ min.}$ et $t = 30 \text{ min.}$ de polarisation. Les images montrent la disparition de deux liposomes suite à un ajout d'une solution contenant des peptides à $t = 0 \text{ s.}$ La solution ajoutée est une solution de glucose contenant des CPP (R9 dans ce cas) à $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$. Une mesure de l'osmolalité de la solution de peptide a été réalisée, avant l'ajout dans la cellule électrochimique.

IV. Conclusion

L'objectif du travail présenté dans ce chapitre était de mettre en évidence la perméabilisation de liposomes engendrée par la présence de peptides actifs vis-à-vis des membranes lipidiques en adaptant la méthodologie ECL mise au point au chapitre 2.

En présence d'un AMP emblématique (mélittine) l'ECL apparaît constituer une approche sensible et pertinente pour étudier en temps réel les évènements de perméabilisation. Pour ce qui concerne les CPPs étudiés, dont les mécanismes de passage transmembranaire ne sont pas systématiquement associés à la formation de pores, il faudra pour devenir significative que la méthode soit améliorée dans le sens d'un contrôle fin du rapport peptide/lipide. Une telle amélioration permettrait à terme de discriminer rapidement les peptides se comportant comme des AMP de ceux se comportant comme des CPP.

Afin de mieux maîtriser ce rapport peptide/phospholipide l'évolution que nous retenons est de travailler sur un liposome unique (i.e., un seul liposome au contact de l'électrode). Une option serait de mettre au point un dispositif microfluidique permettant d'isoler et de déplacer sans altération un liposome unique dans un canal micrométrique et de le positionner au niveau d'une électrode transparente. En outre, ce type de dispositif devrait également permettre d'améliorer, du point de vue électrochimique, le rapport signal/bruit et de rendre quantitatif le signal ampérométrique en plus des signaux PL et ECL.

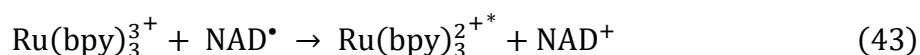
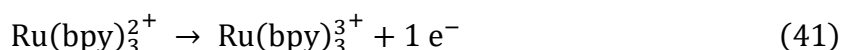
**Cinquième chapitre – ECL
issue de la réalisation d'une
réaction enzymatique au
sein de liposomes**

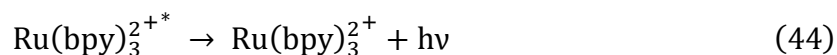
5- Cinquième chapitre – ECL issue de la réalisation d'une réaction enzymatique au sein de liposomes.

I. Introduction et contexte

Dans les chapitres précédents, nous avons montré que l'ECL constitue une approche expérimentale adaptée à la caractérisation de la perméabilisation de vésicules lipidiques, dont la conséquence physique est un efflux du contenu de la vésicule (contenu intégrant les réactifs de l'ECL) vers le milieu extérieur. L'objectif de ce dernier chapitre est de tenter de générer des événements d'électrochimiluminescence à l'issue d'une réaction enzymatique menée dans le milieu confiné que constitue la vésicule lipidique. Les prérequis et étapes à respecter dans ce contexte sont i) de s'assurer qu'au moins un réactif de l'ECL soit formé durant la réaction étudiée et ii) de parvenir à « exfiltrer » ces réactifs vers une électrode polarisée. Le système que nous avons sélectionné pour l'inclure dans la vésicule est constitué de α -D glucose, de glucose déshydrogénase (GDH), de NAD^+ (nicotinamide adénine dinucléotide) comme agent oxydant et de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ comme précurseur du luminophore. Sous sa forme réduite (NADH), ce cofacteur de la réaction enzymatique peut en effet devenir le co-réactif d'une réaction d'électrochimiluminescence engageant le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$.

Jusqu'ici, l'ECL a été générée à partir de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et de TPrA. Cette amine tertiaire tripropylée n'est pas le seul co-réactif possible pour générer de l'ECL et peut être remplacée par d'autres composés comportant des amines tertiaires, comme le NADH. [174] Avec ce co-réactif, la séquence d'ECL est obtenue selon le mécanisme suivant :





Ainsi, un produit de la réaction enzymatique (NADH) peut compléter le système chimique à l'origine de l'évènement d'électrochimulinescence, comme cela a été décrit dans plusieurs réactions métaboliques qui font intervenir des enzymes déshydrogénases [175].

Nous allons succinctement rappeler d'une part l'importance du système NAD⁺/NADH dans les voies métaboliques du vivant et d'autre part l'état de l'art sur l'utilisation des liposomes en tant que bioréacteurs et/ou cellule artificielle.

II. Etude bibliographique

1. Rôle du NADH dans le métabolisme cellulaire et les différentes méthodes de sa détection

Le couple NAD⁺/NADH est un « coenzyme » présent dans toutes les cellules du vivant et il intervient dans de nombreuses réactions métaboliques à caractère rédox et à ce titre, est associé aux réactions de dégradation de molécules riches en énergie (par exemple les sucres). C'est le cas des réactions catalysées par des déshydrogénases, NAD⁺ jouant alors le rôle d'accepteur d'électrons. Parmi les réactions enzymatiques d'intérêt pouvant donner lieu à des évènements d'ECL grâce à la conversion de NAD⁺ en NADH, nous pouvons citer : le catabolisme oxydatif du glucose, le métabolisme oxydatif de l'éthanol ou encore la conversion du pyruvate en CO₂ dans le cycle de Krebs [176].

Différentes méthodes analytiques ont été développées pour caractériser la formation ou la présence de NADH : la fluorescence [175], par exemple, grâce à la capacité de la molécule de NADH à émettre de la lumière à 460 ± 50 nm quand elle est excitée à 340 ± 30 nm [177]. Dans ce même champ, le NADH a été détecté par bioluminescence suite à un dosage d'une coenzyme luminescente FMNH₂. [178] L'électrochimie reste la méthode analytique la plus utilisée pour la détection du NADH parce qu'elle offre plusieurs avantages dont la simplicité de mise en oeuvre, le faible coût des appareils et le faible volume des échantillons [179], [180]. L'électrochimiluminescence trouve maintenant sa place en tant que méthode analytique de détection de NADH [181] [182].

2. Utilisation de liposomes comme bioréacteurs

Le compartiment aqueux des liposomes, isolé du milieu extérieur par une membrane lipidique, a permis d'envisager leur utilisation en tant que micro-réacteurs clos [58] essentiellement pour mimer les conditions rencontrées dans les cellules réelles et ainsi mettre en œuvre et étudier des processus biochimiques et biologiques *in vitro* [183] mettant en jeu des réactions enzymatiques [184] [58]. Très récemment, les fonctionnalités propres à certaines cellules végétales, dont la réduction photochimique de CO₂ ont été reproduites au sein de GUVs [185]. La vésicule contient une cyanobactérie capable de convertir le CO₂ en glucose sous photo-stimulation, étape suivie de l'oxydation du glucose par le système enzymatique NAD⁺-GDH. Un second exemple récent a montré que l'encapsulation de mitochondries au sein de d'hydrogels à base de gélatine permet de conserver la fonctionnalité de synthèse d'ATP des mitochondries [186].

Cette quête de la reconstitution de cellules artificielles possédant l'essentiel des fonctionnalités métaboliques du vivant est un champ de recherche très actif. Récemment, Yewdall a publié dans Nature un article intitulé « Life brought to artificial cells » montrant l'état d'avancement des projets de reconstitution de fonctions métaboliques et de transcription génomique dans des assemblages mimant ceux des cellules réelles [187] [188].

La figure suivante illustre de façon synthétique les compartiments et organelles constitutifs d'assemblages ayant été récemment proposés dans le contexte de la réalisation de cellules artificielles :

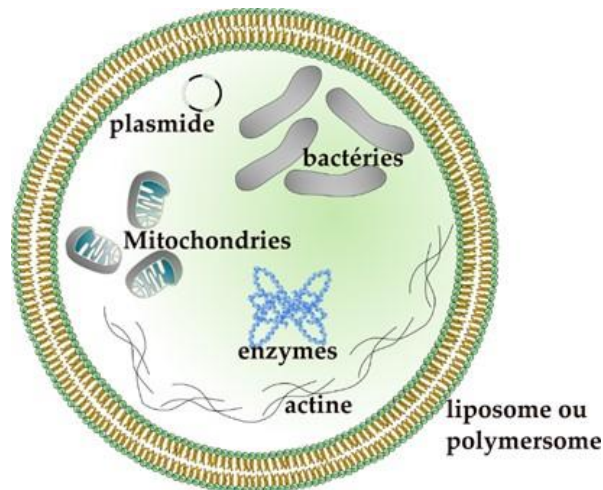


Figure 77 : Illustration non exhaustive des micro-organismes, organelles et enzymes encapsulés au sein de liposomes ou polymersomes pour intégrer des métabolismes et fonctionnalités mimant les cellules du vivant.

Stratégie

Pour ce qui se rapporte à nos objectifs dans le cadre de ce projet de thèse, nous avons réduit le système d'étude à une seule réaction enzymatique menée au sein de liposomes.

Ainsi, nous avons décidé d'étudier la réaction de dégradation de glucose en glucono- δ -lactone qui est catalysée par l'enzyme glucose déshydrogénase (GDH) et met en jeu le couple NAD^+/NADH comme co-enzyme. Au cours de cette réaction, le NAD^+ est réduit en NADH qui peut jouer le rôle d'un co-réactif, dans une réaction d'électrochimiluminescence, pour générer un signal lumineux. Cette approche est illustrée dans la figure suivante :

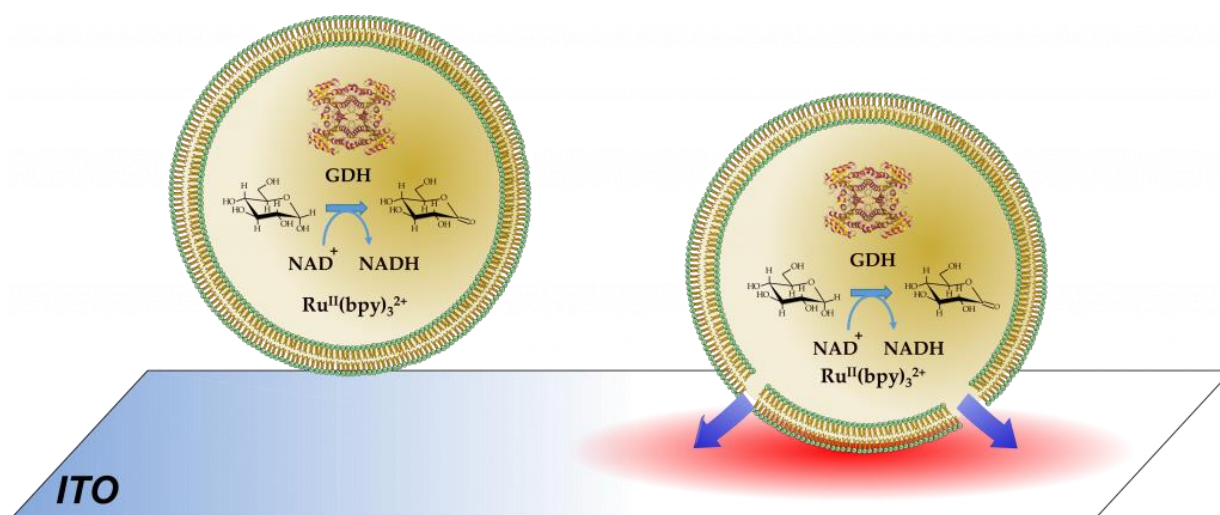


Figure 78 : Représentation schématique du processus ECL issu de l'oxydation du glucose par le système NAD⁺, GDH et de l'ouverture des liposomes à l'électrode.

Dans ce contexte, notre stratégie consiste à encapsuler dans des liposomes géants les réactifs nécessaires à un processus enzymatique unique, celui correspondant à la réaction de dégradation de glucose. Ce système est complété par le luminophore de la réaction d'électrochimiluminescence. Ensuite, au cours de la réaction de la transformation du glucose en glucono-δ-lactone qui se déroulera à l'intérieur des liposomes, le NAD⁺ sera réduit en NADH (co-réactif de la réaction d'ECL). Notre objectif est de mettre en évidence par ECL et de façon très préliminaire la formation de NADH à l'issue de l'oxydation du glucose dans le liposome, après ouverture de ce dernier à la surface d'une électrode polarisée. Nous reprenons donc la stratégie ECL décrite au chapitre 2, dans laquelle la rupture de la membrane lipidique du liposome est réalisée au contact de l'électrode polarisée.

III. Résultats / Discussions

1. Etude électrochimique de la formation du NADH provenant de la dégradation du glucose

Pour commencer, il était important de réaliser une étude par voltammétrie cyclique du co-enzyme authentique dans le but d'identifier sa signature électrochimique et ses propriétés rédox. La Figure 79 montre un voltamogramme typique du NADH obtenu en milieu tampon phosphate (PBS) sur une électrode de platine. Dans ces conditions, le NADH s'oxyde de

manière irréversible à un potentiel de 0,7 V *vs.* Ag/AgCl ce qui correspond bien à la valeur trouvée dans la littérature (0,7 V).

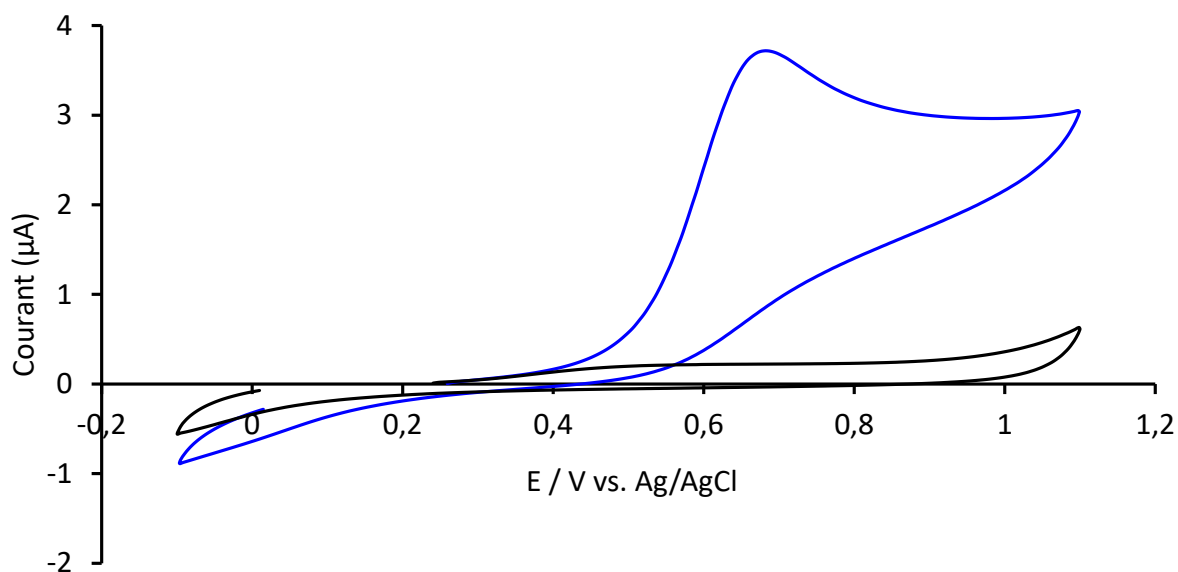


Figure 79 : voltampérométrie cyclique d'une solution tampon phosphate salin (PBS ; C = 10 mM ; pH = 7,5) réalisée en absence (noir) et présence (bleu) de NADH (C = 10 mM) sur une électrode de platine (diam. 0,5 mm) et à $v = 50$ mV/s. Contre électrode : fil de platine de diamètre égal à 1mm et de longueur égale à 1cm. Expérience réalisée à température ambiante.

En vue des études à réaliser par microscopie dans la suite de ce travail, nous avons également tenté d'obtenir la signature électrochimique du NADH sur une électrode en ITO. Malheureusement cela s'est avéré infructueux à cause d'une passivation de la surface de l'électrode par le co-enzyme. Pour des raisons pratiques (impossibilité de nettoyer la surface en ITO sans abimer le matériau), la formation du NADH provenant de la dégradation du glucose a donc été étudiée avec une électrode en platine en milieu PBS. Dans ces conditions, le mélange des trois réactifs (NAD^+ à 10 mM, l'enzyme GDH à 80 U/mL, et le glucose à 0.7 M) conduit très rapidement (moins de cinq minutes), à une vague d'oxydation possédant les mêmes caractéristiques que celle observée précédemment pour l'oxydation du NADH authentique. En outre, l'absence de l'un des trois réactifs en solution n'engendre aucune vague d'oxydation (Figure 80). La vague obtenue en présence des trois réactifs peut donc être attribuée à l'oxydation du NADH provenant de la dégradation enzymatique du glucose.

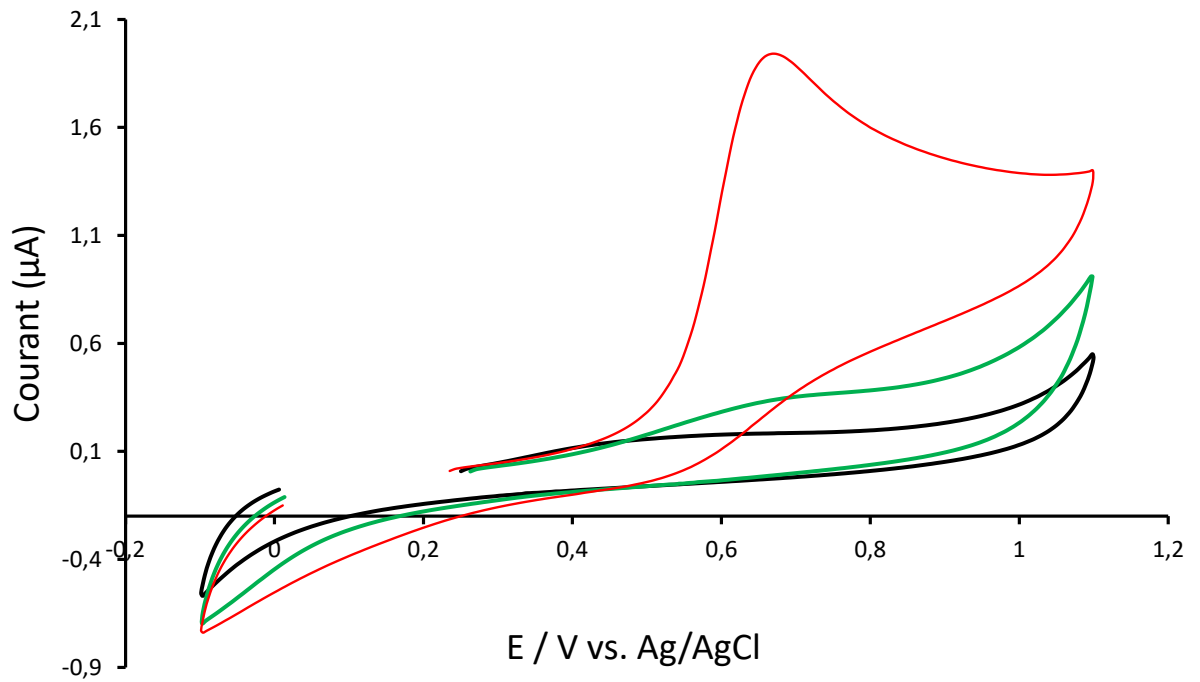


Figure 80 : Etude voltampérométrique montrant, en couleur rouge, la formation de NADH cinq minutes après avoir mélangé les trois réactifs suivants : NAD^+ ($10 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$), GDH (80 U/mL) et glucose ($0,7 \text{ mol.L}^{-1}$). Les voltamogrammes en noir et vert ont été obtenus respectivement en absence de GDH et de glucose. Conditions expérimentales : solvant PBS (10 mM, pH = 7.54), électrode de travail en platine (diamètre : 0.5 mm) et contre électrode en platine (fil de platine). Température : 20 °C.

Suite à ce résultat, il nous a semblé intéressant d'estimer le temps nécessaire pour une production maximale de NADH à partir de nos conditions expérimentales. Pour ce faire, nous avons suivi en fonction du temps, et par voltammétrie cyclique, la formation de NADH à partir d'une solution PBS contenant les trois réactifs nécessaires : NAD^+ (10 mM), GDH (80 U/mL) et glucose (0,7 M) (Figure 81).

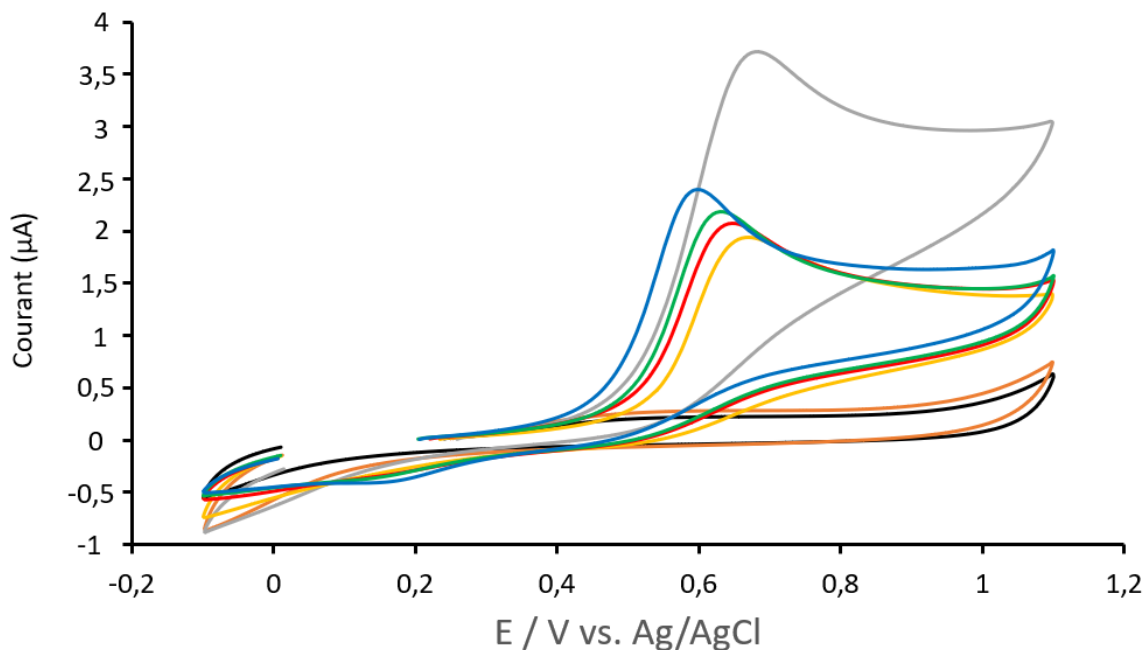


Figure 81 : Etude voltampérométrique montrant la formation de NADH en fonction du temps à partir d'une solution de PBS (1.10^{-2} mol.L⁻¹, pH = 7.54) contenant du NAD⁺ (1.10^{-2} mol.L⁻¹), l'enzyme GDH (80 U/mL), et du glucose (0,7 mol.L⁻¹). Courbe noire (PBS), courbe orange (t = 0 min.), courbe jaune (5 min.), courbe rouge (20 min.), courbe verte (30 min.), courbe bleu (60 min.). La courbe en couleur grise correspond à une solution contenant du NADH authentique à une concentration de 1.10^{-2} mol.L⁻¹. Conditions : électrode de travail en Pt (diam. 0.5 mm), et contre électrode en Pt (fil). Vitesse de balayage : $v = 50$ mV/s. Température ambiante (20 °C).

La Figure 81 montre que la production de NADH est très rapide aux temps courts ($t < 5$ minutes) mais devient plus lente aux temps longs ($5 < t < 60$ minutes). Au-delà de 60 minutes, l'intensité de la vague d'oxydation du NADH n'augmente plus mais diminue légèrement indiquant très vraisemblablement un début de dégradation du NADH produit ou/et de l'enzyme (non montré dans la Figure 81). Par comparaison avec le voltamogramme obtenu à partir d'une solution de NADH authentique (à $C = 10$ mM) on peut dire que dans nos conditions la dégradation enzymatique du glucose a permis de transformer près de 75 % du NAD⁺ de départ en une heure. Autrement dit, nos conditions expérimentales ont permis de produire, en une heure, du NADH à une concentration de 7.5 mM. Cette concentration devrait être suffisante pour générer un signal ECL.

2. Mise en évidence d'un signal d'électrochimiluminescence combinant le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et le NADH comme co-réactif.

Après avoir montré que le NADH peut être formé par oxydation enzymatique du glucose dans nos conditions expérimentales, il était également important de montrer que l'oxydation de ce co-enzyme, combinée à celle d'un luminophore tel que le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, peut conduire à une émission de lumière.

Pour ce faire, le couplage des enregistrements du signal faradique (courant) et du signal électrochimiluminescent a été réalisé lors du balayage voltampérométrique d'une solution contenant le luminophore ($C = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) et le NADH ($C = 10 \text{ mM}$). Cette expérience a été mise en œuvre sur une électrode en ITO (diamètre : 7 mm) combiné à un microscope inversé lui-même relié à une caméra EM-CCD.

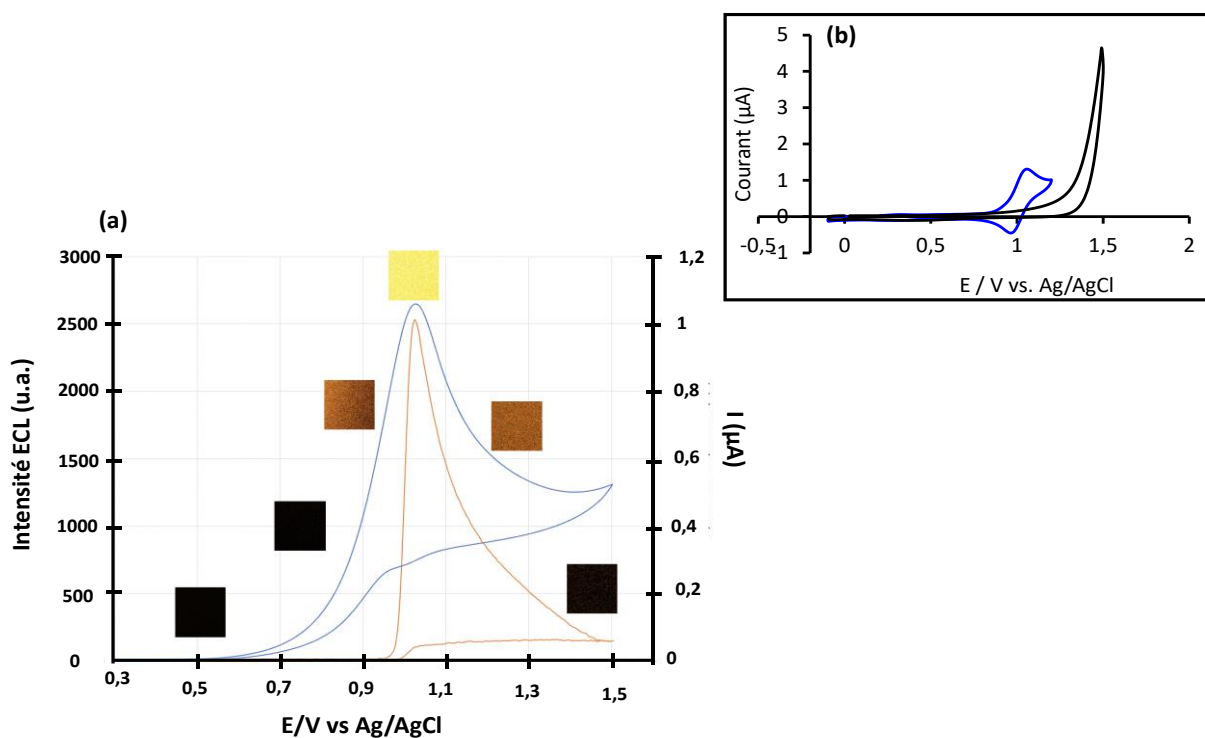


Figure 82 : (a) Evolution du signal électrochimiluminescent en fonction du potentiel appliqué. Conditions expérimentales : milieu PBS ($1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$; $\text{pH} = 7.54$) ; $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($C = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) ; NADH ($C = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$) ; électrode de travail en ITO (diam. : 7 mm) ; contre-électrode : fil de platine. Les images montrent l'intensité lumineuse observée à la surface de l'électrode à différentes valeurs du potentiel. La figure (b) montre voltampérométrie cyclique d'une solution de PBS réalisée en absence (noir) et présence (bleu) de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($C = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) sur une électrode en ITO (diam. 0.9 mm).

Le couplage entre l'électrochimie et la luminescence (Figure 82) montre que l'intensité de la lumière varie de façon synchronisée avec le potentiel avec un maximum vers +1,05 V. A ce potentiel, on oxyde donc à la fois le co-réactif (NADH) et le luminophore en accord avec le mécanisme dit du « co-reactif ».

Cette étude permet d'identifier le potentiel à appliquer pour obtenir un maximum d'émission lumineuse. Vers 1,05 V on a une intensité lumineuse maximale synchronisée avec le courant faradique, lié principalement à l'oxydation du NADH qui est introduit en excès par rapport au ruthénium. Mais dans la suite de ce chapitre, nous avons utilisé un potentiel égal à +1,2 V parce que les expériences ont montré que, en présence de liposomes, l'intensité maximale d'ECL est obtenue à +1,2V.

3. Mise en évidence, par imagerie ECL, de la présence de NADH authentique à l'intérieur d'un liposome

Nous venons de montrer qu'un signal électrochimiluminescent peut être émis à partir d'une solution, contenant du NADH et le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, directement en contact avec une électrode. L'étape suivante consiste maintenant à vérifier qu'un signal luminescent peut également être obtenu quand les deux réactifs, préalablement encapsulés dans des liposomes géants, sont libérés dans le milieu extérieur par perméabilisation de la membrane lipidique. Pour réaliser cela, nous reprenons la stratégie ECL décrite dans le chapitre 2, dans laquelle la rupture de la membrane lipidique du liposome est réalisée au contact de l'électrode polarisée.

Comme dans le second chapitre, nous avons opté pour des liposomes dissymétriques DOPC/DOPG (feuillet interne / feuillet externe). Le mode de préparation de ces liposomes est identique à celui décrit dans le chapitre 2 (cf. Chapitre 2 et Partie Expérimentale). De la même façon, nous avons gardé la même concentration en luminophore ($C([\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}) = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) mais avons divisé par dix la concentration en co-réactif ($[\text{NADH}] = 10 \text{ mM}$). Une étude réalisée par microscopie optique montre clairement la présence de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et de NADH à l'intérieur des liposomes grâce à l'utilisation de longueurs d'onde excitatrices et de filtres adéquats ($\lambda_{\text{exc.}} = 450$ et 340 nm , respectivement associé à des filtres "Rhodamine" et "DAPI").

Afin de déclencher et d'imager la perméabilisation membranaire des liposomes contenant le NADH et le luminophore, nous avons repris le même dispositif décrit dans le chapitre 2

permettant de coupler l'électrochimiluminescence, l'ampérométrie et la photoluminescence. Pour rappel, le dispositif est à nouveau montré dans la Figure 83.

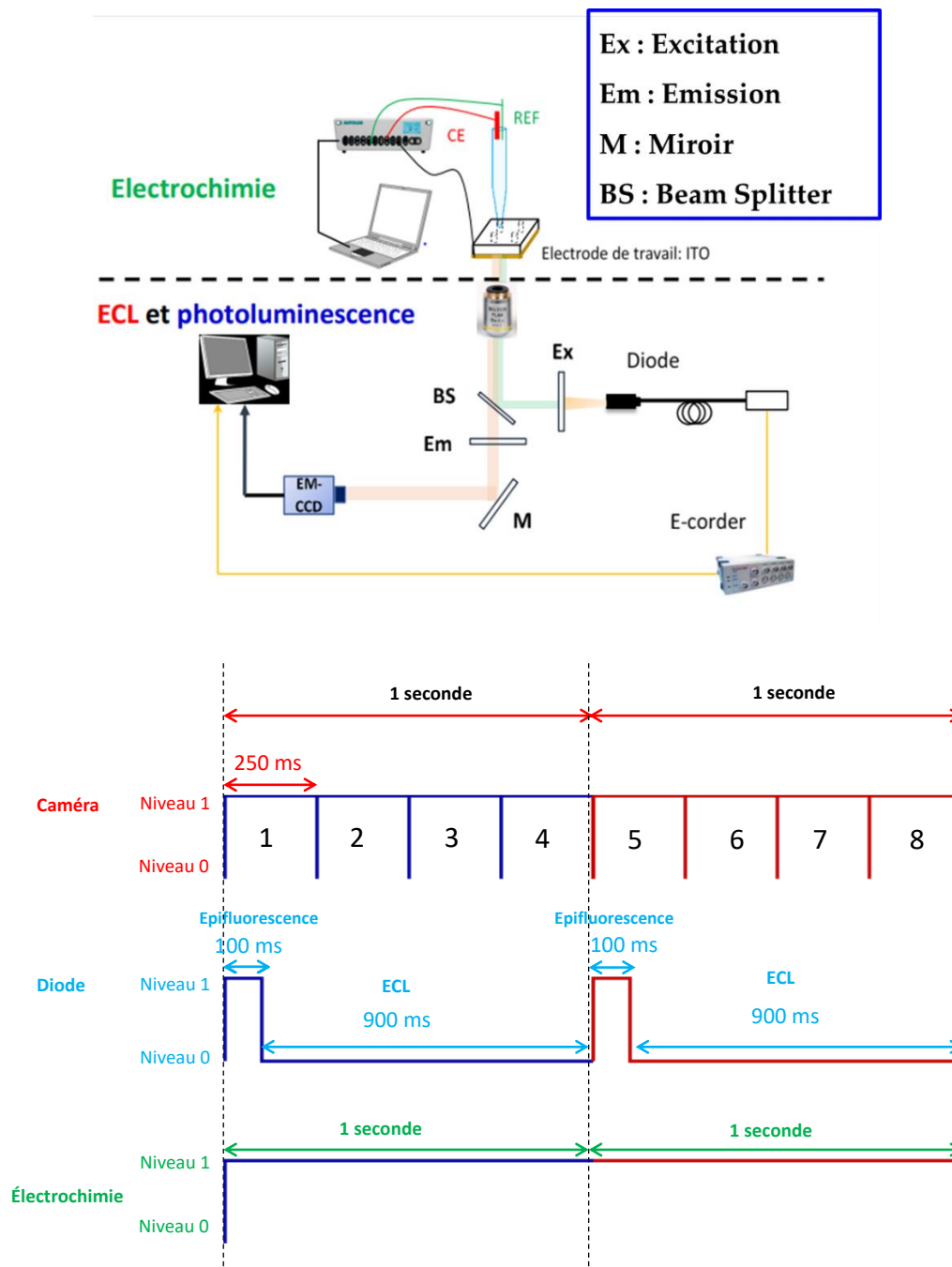


Figure 83 : Dispositif et acquisition utilisés pendant le couplage de l'ECL à l'électrochimie et à la photoluminescence.

Comme réalisé jusqu'ici, les liposomes contenant le luminophore et le co-réactif NADH ont été déposés en haut de la cellule électrochimique de façon à les laisser sédimenter à la surface de l'électrode en ITO polarisée ($E = +1,2V$ vs. Ag/AgCl). Cette polarisation est susceptible de

déclencher la perméabilisation membranaire des liposomes et d'oxyder, par conséquent, les réactifs ECL libérés dans le milieu extra-vésiculaire. La Figure 84 regroupe deux planches d'images obtenues en ECL et en photoluminescence (Figure 84 (a)), ainsi que les études quantitatives correspondantes en électrochimie, photoluminescence (PL) et ECL (Figure 84 (B)).

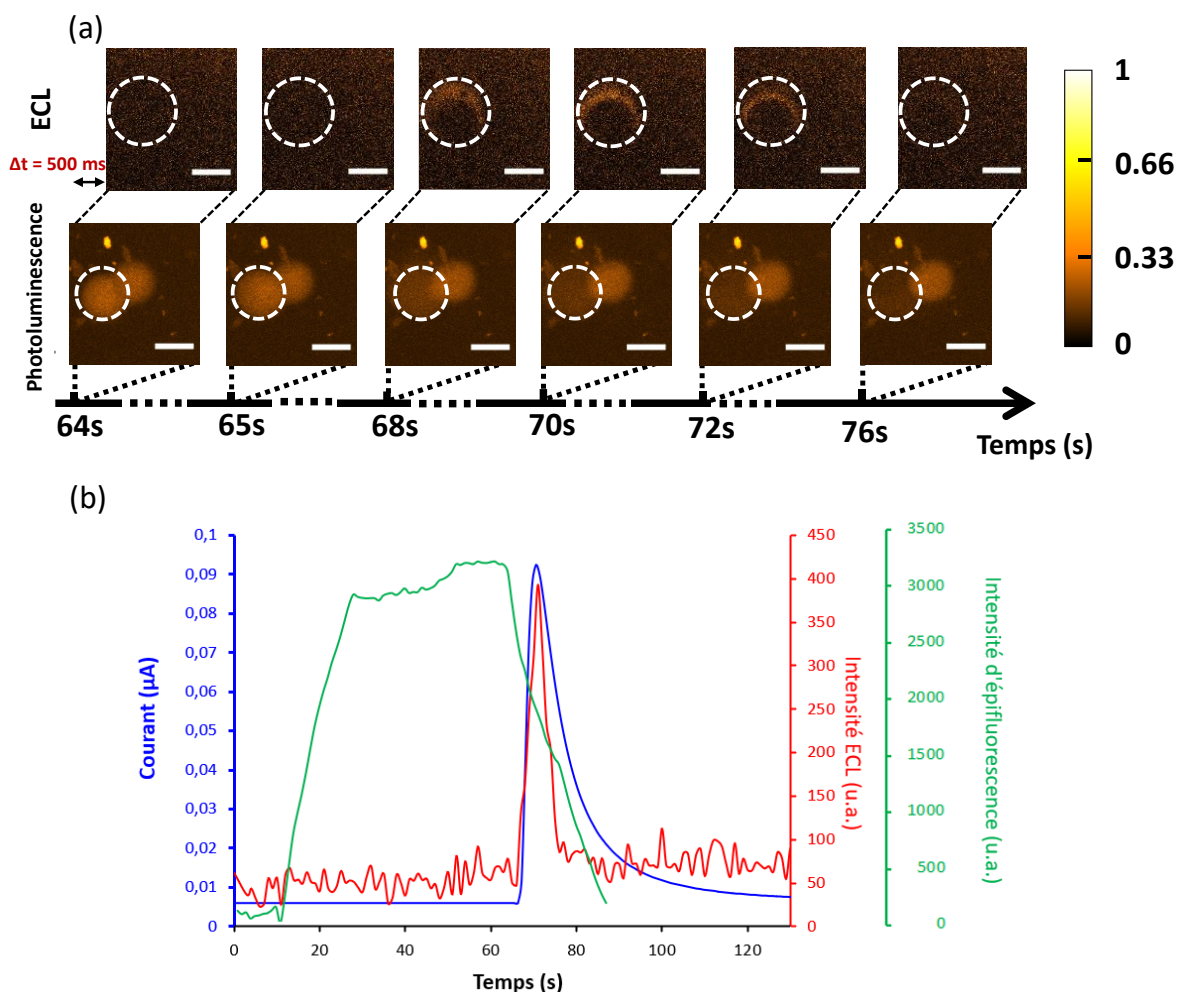


Figure 84 : (a) Images obtenues en ECL et PL montrant la perméabilisation d'un liposome de type DOPC/DOPG. Le liposome, qui repose sur une surface en ITO polarisée ($E = + 1.2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$) contient initialement du NADH (10 mM) et le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$). Afin d'éviter tout chevauchement entre les deux types d'informations visuelles, les images ECL et PL ont une différence de temps d'acquisition initiale de 500 ms. Pendant l'imagerie ECL et PL la mise au point a été faite au niveau de la surface de l'électrode en ITO. Les traits blancs en pointillés dans les images PL et ECL représentent la région d'intérêt (ROI) typique prise en compte pour les analyses quantitatives des intensités correspondantes (cf. (b)). (b) Évolution des signaux PL (courbe verte), ECL (courbe rouge) et ampérométrie (courbe bleue) obtenus en fonction du temps pour un seul liposome [indiqué en (A)] perméabilisé par polarisation de la surface en ITO. Barre d'échelle : 100 μm . Note : $t = 0 \text{ sec.}$ correspond à l'ajout des liposomes dans la cellule électrochimique.

La planche d'images en PL montre la présence de deux vésicules proches l'une de l'autre (cf. images prises à $t = 64$ et 65 secondes). Pour $t \leq 65$ secondes, aucun signal ECL n'est visible indiquant l'absence de fuite au niveau des liposomes observés en PL. Puis, entre 65 et 68 secondes un signal ECL en forme d'arc de cercle apparaît au niveau du liposome situé le plus à gauche de l'image. Dans le même temps, la lumière émise en PL par ce liposome devient

diffuse et moins intense. Ces deux évènements, observés dans la même gamme de temps en PL et ECL, indiquent clairement une fuite du liposome. Cependant, et contrairement aux observations faites en présence du co-réactif TPrA, le signal ECL ne se propage pas très loin de l'endroit d'où vient la fuite. Cela peut s'expliquer par une différence des coefficients de diffusion des co-réactifs (plus petit dans le cas du NADH). En outre, et comme déjà observé jusqu'ici, aucun signal ECL n'est émis à l'endroit où est posé le liposome en accord avec le fait qu'aucun transfert de charge ne peut avoir lieu à cet endroit, c'est-à-dire au travers de la bicouche lipidique.

De façon à mieux rationaliser ce phénomène de perméabilisation, une zone d'intérêt correspondant au liposome en question a été définie. Les intensités correspondantes en ECL et PL ont été reportées sur la Figure 84(b). En outre, l'intensité du signal électrochimique obtenue en fonction du temps a également été ajoutée sur cette figure. Entre 0 et 60 secondes, le signal PL est le seul dont l'intensité varie. Plus particulièrement, l'augmentation de l'intensité du signal PL entre 15 et 20 secondes correspond à l'arrivée (par gravité) du liposome à la surface de l'électrode car, dans nos expériences, la mise au point du microscope est faite au niveau de la surface de l'électrode en ITO. Puis, en accord avec les observations précédentes, le liposome se met à fuir entre 65 et 68 secondes entraînant une forte diminution du signal PL dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en luminophore. Dans la même gamme de temps, l'intensité ECL ainsi que le courant faradique augmentent très rapidement en accord avec l'oxydation des réactifs fuyant du liposome.

Contrairement aux études réalisées en présence de TPrA comme co-réactif, les signaux ECL et électrochimique diminuent ici très rapidement en intensité (une quinzaine de secondes) reflétant une diffusion moins rapide du co-réactif NADH.

4. Mise en évidence par imagerie ECL de la formation de NADH issu de l'oxydation enzymatique du glucose à l'intérieur d'un liposome

Après avoir vérifié que l'on peut imager par ECL la perméabilisation membranaire de liposomes géants contenant du NADH comme co-réactif, l'objectif final était de mettre en évidence (toujours par ECL) la formation de NADH à l'issue de l'oxydation du glucose dans un liposome, après ouverture de ce dernier à la surface d'une électrode polarisée.

L'approche est analogue à celle détaillée dans le paragraphe précédent à la différence que le NADH (10 mM) a été remplacé par la forme oxydée du co-enzyme ($[NAD^+] = 10 \text{ mM}$). Afin de transformer le NAD^+ en NADH, il a fallu également encapsuler dans les liposomes l'enzyme GDH (80 U/mL) ainsi que du glucose (0,35 M) en plus du complexe de ruthénium ($2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$). A noter que du sucrose (0,35 M) a aussi été ajouté de façon à faciliter la sédimentation des liposomes vers la surface de l'électrode. Dans ces conditions, nous avons réussi à préparer en une heure (temps requis pour une production maximale de NADH ; cf. § précédents) des liposomes stables et en quantité suffisante pour nos expériences d'imagerie.

La Figure 85 regroupe deux planches d'images obtenues en ECL et en photoluminescence (PL) (Figure 85 (A)) ainsi que les études quantitatives correspondantes en électrochimie, photoluminescence (PL) et ECL (Figure 85 (B)).

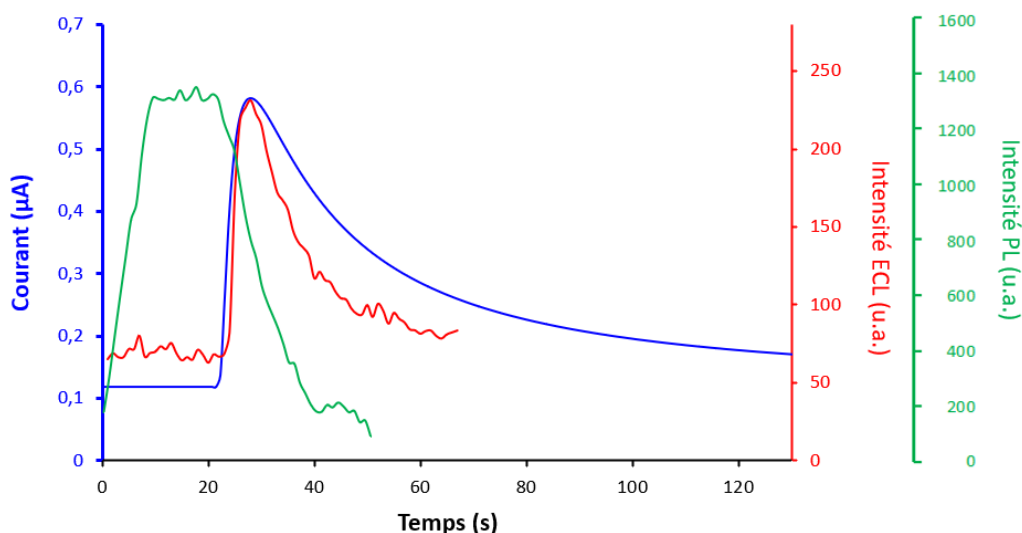
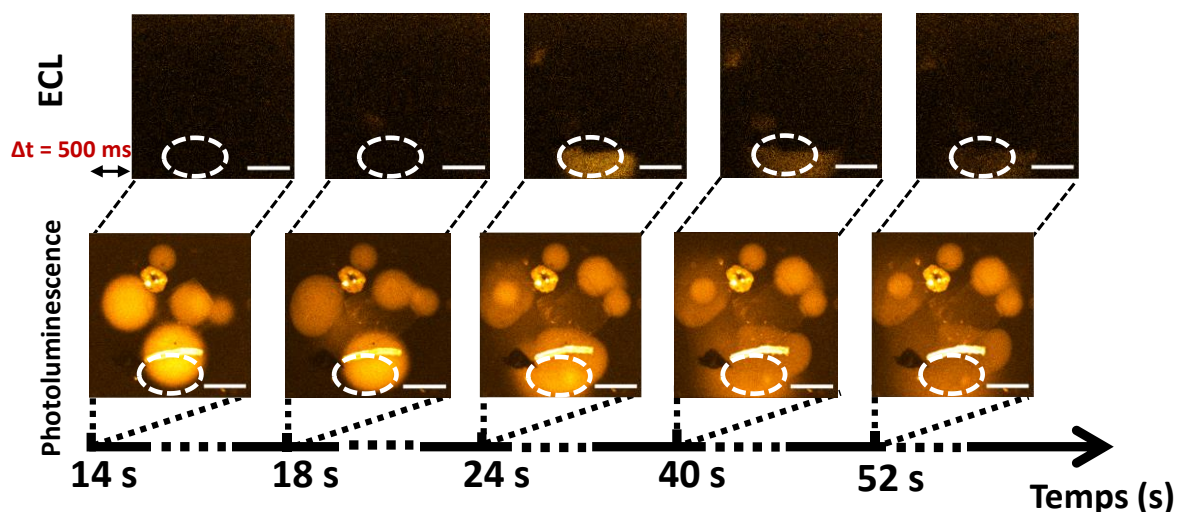


Figure 85 : (A) Images obtenues en ECL et PL montrant la perméabilisation d'un liposome ayant joué le rôle d'un microréacteur pour la dégradation du glucose par l'enzyme GDH en présence de NAD^+ . Le liposome, qui repose sur une surface en ITO polarisée ($E = +1.2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$) contient initialement : NAD^+ (10 mM), $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), GDH (80 U/mL), glucose ($0,35 \text{ mol.L}^{-1}$). La réaction enzymatique conduit à la production de NADH qui est utilisé comme co-réactif dans le processus ECL. Les traits blancs en pointillés dans les images PL et ECL représentent la région d'intérêt (ROI) typique prise en compte pour les analyses quantitatives des intensités correspondantes (cf. (B)). (B) Évolution des signaux PL (courbe verte), ECL (courbe rouge) et ampérométrie (courbe bleue) obtenus en fonction du temps pour un seul liposome [indiqué en (A)] perméabilisé par polarisation de la surface en ITO. Barre d'échelle : $100 \mu\text{m}$. Note : $t = 0 \text{ sec.}$ correspond à l'ajout des liposomes dans la cellule électrochimique.

Parmi les liposomes observés dans la Figure 85(A) et dans la fenêtre de temps comprise entre 14 et 52 secondes, seule celui positionné en bas et au centre de l'image est pertinent en termes de perméabilisation (liposome encerclé par un trait pointillé).

Pour $t < 24$ secondes, ce liposome apparaît intact en photoluminescence (PL) ; d'ailleurs, les images correspondantes obtenues en ECL ne montrent aucun signal lumineux dans cette gamme de temps. Par contre, les images obtenues en PL à partir de 24 secondes montrent une déformation du liposome couplée à une diffusion de la lumière dans l'espace situé à proximité de la vésicule. Dans la même gamme de temps, les images en ECL montrent l'apparition d'un signal lumineux (en bas des images) dont l'intensité diminue au cours du temps (cf. les 3 images ECL prises entre 24 et 52 secondes). D'une part, les observations faites en PL montrent que le liposome observé subit une perméabilisation membranaire. D'autre part, la présence d'un signal ECL indique sans ambiguïté que du NADH a bien été formé par oxydation enzymatique du glucose à l'intérieur du liposome et avant la perméabilisation de ce dernier.

Parallèlement à ces observations, nous avons également tracé en fonction du temps l'évolution des intensités lumineuses (PL et ECL) et du courant faradique pour le liposome en question (cf. zone d'intérêt en pointillée). L'évolution de ces trois signaux est tout à fait similaire à celle observée en présence de NADH authentique. Tout d'abord (pour $0 < t < 10$ secondes), l'intensité PL augmente en accord avec l'arrivée du liposome à la surface de l'électrode et au niveau de laquelle est faite la mise au point. Puis, l'intensité reste constante une dizaine de secondes indiquant que le liposome est posé à la surface de l'électrode et reste intact pendant ce laps de temps. Aux alentours de $t = 20$ secondes, l'intensité du signal PL diminue (pendant 20 secondes environ) en accord avec une « électro-perméabilisation » de la membrane du liposome. Cette perméabilisation libère dans le milieu extérieur une partie du contenu du liposome qui peut alors être oxydé au contact de la surface en ITO. Cette oxydation se traduit non seulement par une augmentation du courant faradique mais aussi par l'apparition d'un signal ECL dont l'intensité suit celle du courant.

En termes d'intensité de courant, il est intéressant de noter que la valeur obtenue ici est environ cinq fois plus intense que celle observée avec du NADH authentique (pour une même concentration en co-enzyme). Se basant sur nos études électrochimiques présentées au début de ce chapitre dédiées à la production de NADH par voie enzymatique, ce résultat montre tout simplement que la fuite du liposome étudié ici est plus importante que celle observée avec le liposome contenant du NADH authentique.

IV. Conclusion

L'objectif de ce chapitre était de mettre en évidence par imagerie ECL la formation de NADH à l'issue de l'oxydation du glucose dans un liposome géant, après ouverture de ce dernier à la surface d'une électrode polarisée. Les résultats obtenus montrent clairement que cette approche expérimentale est parfaitement adaptée à ce type d'étude. Comparée aux méthodes basées sur la fluorescence, notre approche peut apparaître comme « destructive » puisqu'il faut perméabiliser le liposome pour obtenir un signal ECL. Cependant, il ne faut pas oublier la plus grande sensibilité de l'approche ECL par rapport à celles basées sur la fluorescence. En outre, la perméabilisation du liposome permet d'obtenir d'autres informations précieuses comme la quantité de réactifs libérés et donc produits à l'intérieur du microréacteur. Finalement, considérant les nombreuses réactions fonctionnant avec le couple NADH/NAD⁺, ce travail ouvre des perspectives intéressantes pour l'analyse de réactions enzymatiques ayant lieu en milieu confiné.

Conclusion Générale

&

Perspectives

Conclusion Générale & Perspectives

Ce travail de thèse s'inscrit dans la continuité des travaux initiés dans l'équipe sur le développement de méthodologies associant l'électrochimie et la luminescence en vue d'analyser des processus de passage transmembranaire de biomolécules ou la perméabilisation de membranes lipidiques.

Dans ce cadre, je me suis attachée à mettre au point les conditions expérimentales permettant d'imager par électrochimiluminescence (ECL) la perméabilisation de membranes de liposomes géants (Chapitre 2). La stratégie a consisté à encapsuler préalablement les réactifs ECL (la tripropylamine et le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$) à l'intérieur de liposomes, puis de déclencher leur perméabilisation membranaire au contact d'une surface polarisée et transparente en ITO permettant ainsi d'oxyder et de visualiser l'écoulement des réactifs vers le milieu extra-vésiculaire. Cela nous a permis d'imager, en temps réel, l'évènement de libération du contenu d'un liposome avec une bonne résolution spatiale (de l'ordre du micromètre) et temporelle (de l'ordre de la ms). La dispersion spatiale du signal ECL après l'éclatement des vésicules a confirmé la nature diffusionnelle de l'efflux des réactifs de l'ECL au cours de la libération liposomale. Par ailleurs, le couplage de l'ECL avec la photoluminescence et l'ampérométrie nous a permis d'obtenir des informations complémentaires comme (i) le suivi de l'état du liposome avant et après l'évènement de la libération, (ii) l'attribution de chaque signal à son liposome d'origine, ainsi que (iii) la quantité de tri-*n*-propylamine libérée par chaque liposome.

A partir de ces résultats et de travaux récemment réalisés dans le domaine de l'ECL, nous avons eu ensuite la curiosité d'explorer une nouvelle approche considérée comme l'approche inverse de celle qui vient d'être décrite et appelée ECL négative (Chapitre 3). Cette seconde approche consiste à imager un objet par contraste optique négatif grâce au blocage de l'électrode par l'objet d'intérêt (le liposome). Contrairement à l'approche "ECL positive", le luminophore et le co-réactif sont ici directement mis en solution (et non plus encapsulés dans les liposomes) de façon à générer de la lumière sur toute la surface de l'électrode dès que cette

dernière est polarisée. Dans ces conditions, nous avons pu montrer que la mise en contact d'un liposome avec la surface d'une électrode sous polarisation génère une tache noire (disparition de la lumière) dont la taille grandit à mesure que la solution intra-vésiculaire s'écoule vers le milieu extra-vésiculaire luminescent. Par dilution des réactifs ou par désactivation de l'état excité grâce à l'utilisation d'un "quencher", l'ECL négative donne des informations sur l'événement d'ouverture de liposomes en accord avec ceux révélés par l'approche positive de cette méthode. A titre d'exemple, nous avons retrouvé une valeur du coefficient de diffusion du luminophore très proche de la valeur déterminée dans le chapitre précédent et qui correspond à la valeur attendue pour une molécule de la taille de la tripropylamine.

Il nous a ensuite semblé intéressant d'explorer de façon très préliminaire quelques applications bio-analytiques possibles. Cette valorisation s'est faite exclusivement en s'appuyant sur la première approche consistant à imager une génération de lumière (ECL positive).

Ainsi, la première application (décrite dans le chapitre 4) visait à mettre en évidence la perméabilisation de liposomes engendrée par la présence de peptides actifs vis-à-vis des membranes lipidiques en adaptant la méthodologie ECL mise au point au chapitre 2. En présence d'un peptide anti-microbien (AMP) emblématique (la mélittine), l'ECL apparaît constituer une approche sensible et pertinente pour révéler en temps réel les événements de perméabilisation. Pour ce qui concerne les peptides pénétrants (CPP) étudiés, dont les mécanismes de passage transmembranaire ne sont pas systématiquement associés à la formation de pores, il faudra pour devenir significative que la méthode soit améliorée dans le sens d'un contrôle fin du rapport peptide/lipide que ne permet pas notre première approche.

La seconde application, décrite dans le chapitre 5, visait à mettre en évidence la formation de NADH à l'issue de l'oxydation enzymatique du glucose dans un liposome géant, après ouverture de ce dernier à la surface d'une électrode polarisée. Là encore, les résultats obtenus ont pu montrer la pertinence de cette approche expérimentale pour ce type d'étude impliquant des "microréacteurs". Comparée aux méthodes basées sur la fluorescence, notre approche peut apparaître comme « destructive » et *a posteriori* puisqu'il faut perméabiliser le liposome pour analyser son contenu. Malgré tout on observe une plus grande sensibilité apportée par l'approche ECL par rapport aux méthodes basées sur la fluorescence. En outre, la perméabilisation du liposome permet d'obtenir d'autres informations précieuses comme la

quantité de réactifs libérés et donc générés à l'intérieur du microréacteur. Enfin, compte tenu du grand nombre de réactions fonctionnant avec le couple NADH/NAD⁺, ce travail ouvre des perspectives intéressantes pour l'analyse et le bilan réactionnel du système chimique constitué par la solution interne du liposome.

Finalement, imager par ECL la perméabilisation membranaire de liposomes géants apparaît être une approche intéressante pour caractériser l'avancement de réactions mettant en jeu la conversion de NAD⁺ en NADH au sein de ce type d'architecture lipidique. Néanmoins, la variabilité associée à la taille des liposomes et à leur ouverture ont fait émerger un axe d'amélioration au niveau du dispositif électrochimique. Plus précisément, à l'avenir, l'enjeu va consister à concevoir des dispositifs expérimentaux permettant d'analyser un liposome unique au contact de l'électrode. Une première piste serait de mettre au point un dispositif microfluidique permettant d'isoler et de déplacer sans altération un liposome unique dans un canal micrométrique et de le positionner au niveau d'une électrode transparente. Une autre option serait de garder le principe du dispositif actuel mais de réduire suffisamment la surface de l'électrode de travail en ITO (800 μm de diamètre actuellement) de façon à n'avoir qu'un seul liposome à la fois à sa surface. Par contre, contrairement à la première option où l'immobilisation du liposome à la surface de l'électrode serait gérée par des pompes microfluidiques, il faudrait ici pouvoir immobiliser le liposome à la surface de l'électrode *via* une approche adossée à la reconnaissance moléculaire comme, par exemple, la formation de complexes streptavidine-biotine. Pour reprendre l'exemple des peptides, ces améliorations permettrait d'analyser plus finement l'action de peptides actifs vis-à-vis des membranes lipidiques pour deux raisons. Tout d'abord, cela permettrait de mieux contrôler le rapport peptide/lipide et, à terme, de pouvoir discriminer rapidement les peptides se comportant comme des AMP de ceux se comportant comme des CPP. Ensuite, ces nouveaux dispositifs devraient également permettre d'améliorer, du point de vue électrochimique, le rapport signal/bruit (i.e., courant faradique/courant capacitif) et de rendre plus quantitatif le signal ampérométrique obtenu en plus des signaux PL et ECL.

Partie expérimentale

Partie expérimentale

I. Préparation des dispositifs

1. Fabrication de la cellule électrochimique utilisée pour la détection de la perméabilisation de la bicouche lipidique

La cellule électrochimique est composée d'une lamelle d'ITO (90% In_2O_3 /10% SnO_2 , ACM, Villiers Saint Fredéric, France) de dimensions 22 mm × 22 mm × 0,13 mm et d'épaisseur d'ITO égale à 150 nm. Sur cette lame est collée un bloc de PDMS d'épaisseur 5 mm, par plasma.

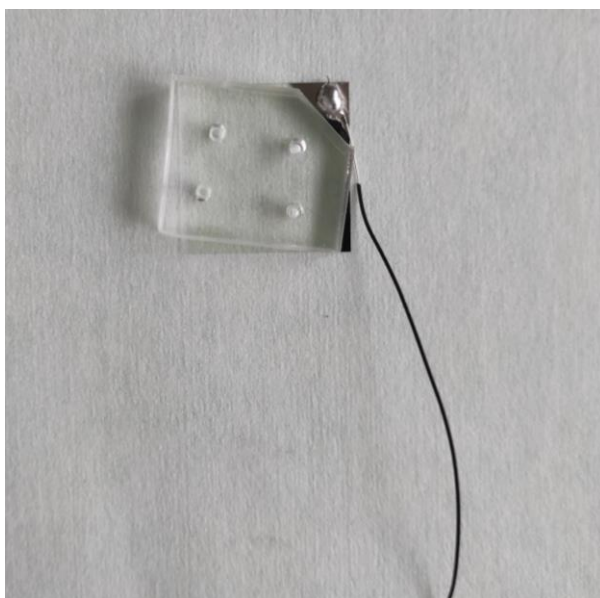


Figure 86 : Cellule électrochimique composée par un bloc de PDMS troué et collé sur une lamelle d'ITO (22 mm × 22 mm × 0,13 mm), par plasma.

Sur la lamelle d'ITO, une couche de platine a été déposée à l'aide d'un métalliseur (Leica) par pulvérisation cathodique en utilisant une cible de platine et en appliquant les paramètres suivants : 125 mA, deux cycles de 1min30.

Le PDMS (Le polydiméthylsiloxane $-\text{[O-Si(CH}_3\text{)}_2\text{]}_n-$) est un polymère fluide qui devient dur quand il est mélangé avec un agent réticulent et mis à l'étuve. Pour rendre ce polymère utilisable pour la fabrication de nos cellules électrochimiques, nous avons mélangé le PDMS avec l'agent réticulent et une partie de ce mélange est coulé dans un moule (boite de pétri). Le mélange coulé dans le moule est mis à dégazer par une pompe à vide et placé, après, à l'étuve pendant

1h30 min à 80°C. Après, nous obtenons le PDMS sous sa forme solide et il ne nous reste plus que couper des carrés du PDMS ont les mêmes dimensions que les lames de verre/ITO et faire quatre trous, à l'aide d'un emporte pièces de 2 mm pour délimiter la surface de l'électrode à utiliser. Ces trous nous permettent d'avoir des électrodes de travail de 0,8 mm de diamètre.

L'étape de collage par plasma d'air (Electronic diener- Femto) consiste à placer les matériaux à traiter dans une chambre sous vide d'air, dans laquelle on injecte un gaz de procédé comme l'argon, l'oxygène ou l'air (dans notre cas), à une pression de 0,46 mbar. Par l'application d'un champ électrique externe le gaz se décompose partiellement : c'est l'état de plasma. Les espèces issues de cette décomposition, et plus particulièrement les radicaux, vont réagir avec la pièce à traiter pour modifier ses propriétés de surface. A la fin de cette étape, nous collons les deux faces, qui ont subi le traitement de surface par plasma, l'une sur l'autre.

Après, un fil électrique est fixé sur le dépôt de platine à l'aide d'une soudure à l'étain, afin de permettre le contact électrique avec le potentiostat.

2. Préparation des cellules électrochimiques utilisées pour la caractérisation électrochimique des espèces électroactives

Les dispositifs préparés sont des cellules électrochimiques constituées par des puits en polydiméthylsiloxane (PDMS), d'épaisseur d'environ 1cm, collés (par plasma) à la surface d'une lame de verre et dans lesquels la solution de réactif à étudier est mise.

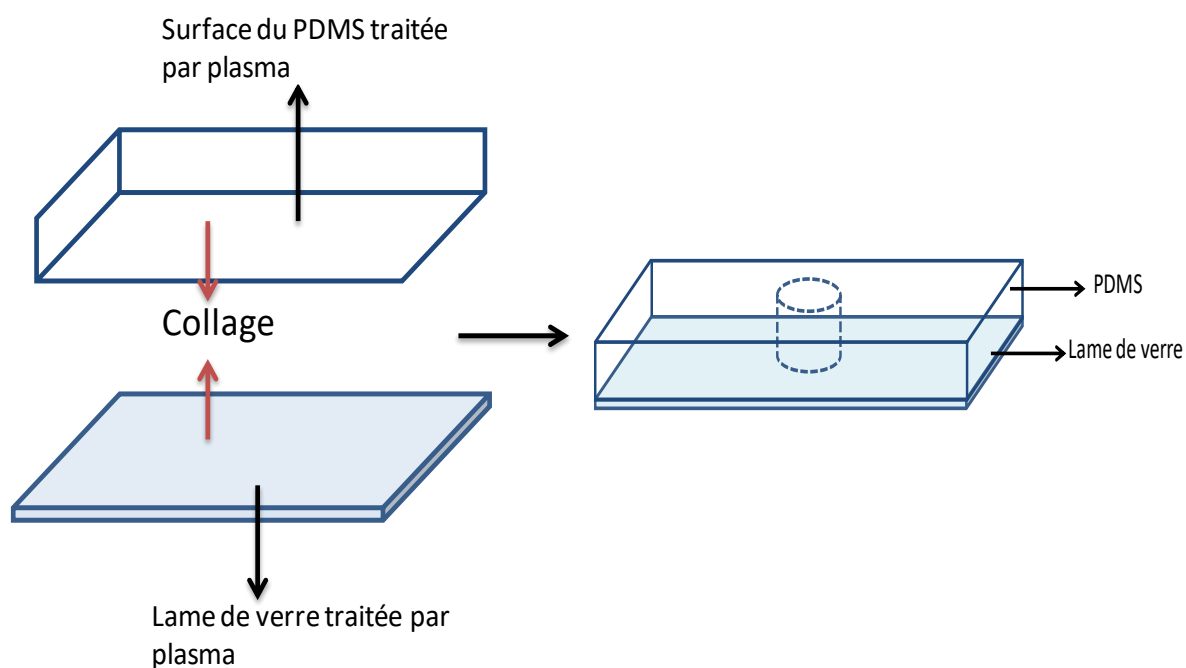


Figure 87 : Collage d'un bloc de PDMS sur une lame de verre afin d'obtenir la cellule électrochimique.

Quand l'électrode de travail est une électrode de carbone vitreux (une électrode de 3 mm de diamètre tenue par une tige en verre), elle est plongée dans le puit de PDMS rempli de solution mais dans le cas d'une électrode de travail en ITO ou graphène, le matériau transparent est déposé sur la surface de verre.

3. Dépôt de l'ITO et du graphène sur une lame de verre

3.1. Le graphène

Le dépôt de graphène a été réalisé au département de physique de l'ENS à l'aide d'Aurélien PIERRET. Le graphène est commercialisé sur des substrats en cuivre sous forme d'un disque de 4 pouces de diamètre (10,16 cm) avec une fine couche du graphène au-dessous.

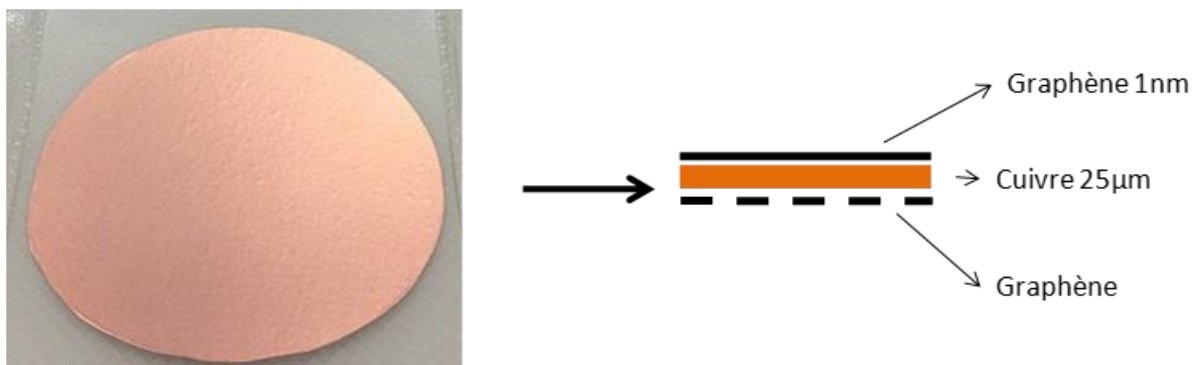


Figure 88 : Photo d'un disque de graphène commercial et schéma de sa composition.

Le dépôt du film du graphène à la surface du substrat en verre se fait en plusieurs étapes :

Dépôt d'une couche de Al_2O_3

On coupe des morceaux de graphène sur lesquels on va déposer une fine couche de Al_2O_3 par ALD (Atomic Layer Deposition).

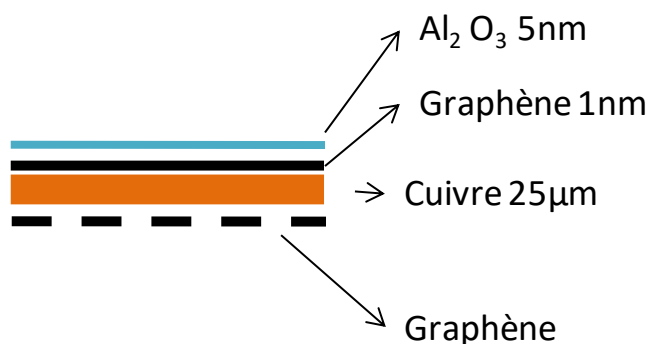


Figure 89 : Composition des morceaux de graphène après le dépôt de Al_2O_3

Dépôt d'une couche du Le poly (méthacrylate de méthyle) (PMMA)

On dépose les morceaux obtenus sur une plaque tournante et on ajoute sur chaque morceau 3 à 4 gouttes d'une solution de PMMA. On utilise une tournette (Spin coating) pendant 30 s à une vitesse de rotation de 4000 tr/min pour évaporer le solvant contenu dans la solution PMMA. Après, on déplace les échantillons sur une plaque chauffante pendant 10 min à 160°C. On obtient une couche de PMMA de 500 nm d'épaisseur.

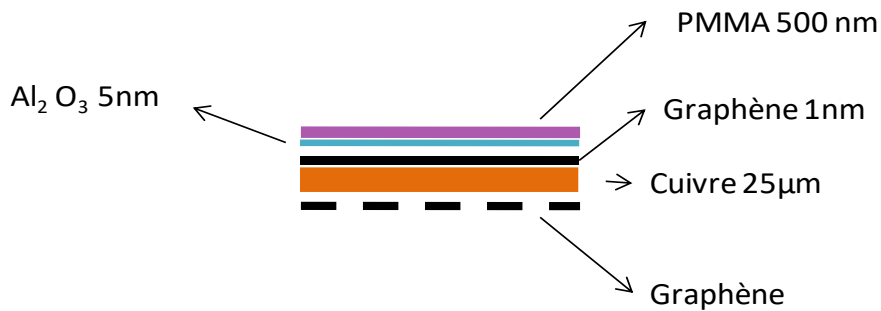


Figure 90 : Composition des morceaux de graphène après le dépôt du PMMA

Le PMMA et le Al_2O_3 jouent le rôle d'un support mécanique protecteur du graphène contre sa rupture lors du transfert (Nous pouvons utiliser le PMMA seul sans alumine).

Plasma pour attaquer le graphène qui est en dessous et dissolution du cuivre

Le graphène qui est au-dessous des échantillons est attaqué par gravure ionique réactive RIE (Reactive Ion Etching) et les échantillons sont, ensuite, mis dans des béciers contenant une solution du persulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) à 0.05 M durant toute la nuit.

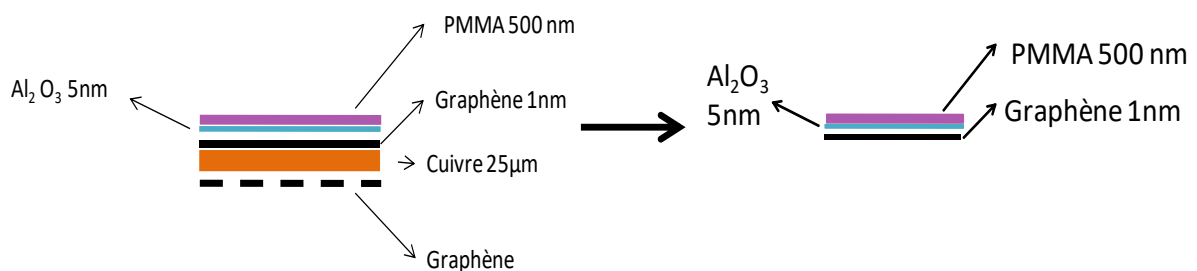


Figure 91 : Composition des morceaux de graphène après la dissolution du cuivre

Nettoyage des substrats

Nous mettons les lames de verres dans de l'acétone sous ultrasons pendant 5 min (On refait la même étape dans l'isopropanol). Il ne nous reste que la fonctionnalisation de la surface (pour la rendre hydrophobe prête au collage du graphène) en mettant les substrats sous un environnement de plasma oxygène.

Dépôt du graphène

-Nous chassons le graphène, flottant à la surface de l'eau, en mettant les substrats au-dessous du graphène pour déposer ce dernier à la surface. Nous mettons les lames obtenues avec le graphène à la surface sur une plaque chauffante à 110°C pendant 3 min.

-Nous enlevons le PMMA en chauffant les substrats dans l'acétone à 50°C pendant 15min.

-L'oxyde d'aluminium est éliminé en mettant les échantillons dans l'acide phosphorique à 50°C pendant 1min30.

-Nous rinçons à l'eau et on sèche à l'air comprimé.

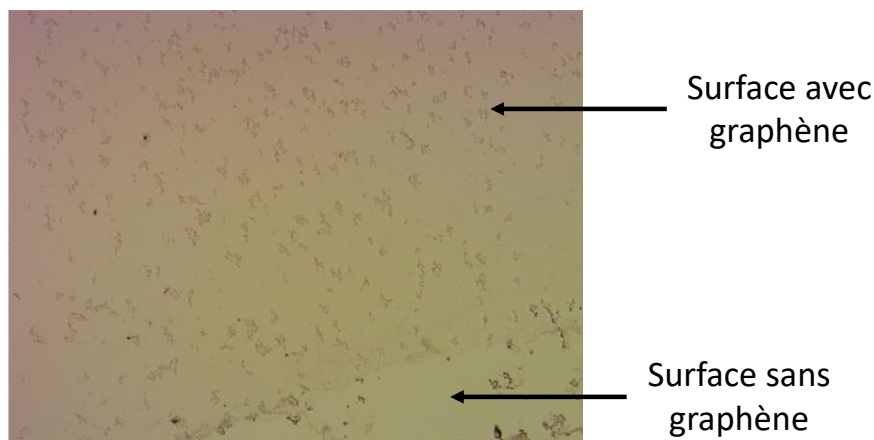


Figure 92 : Graphène déposé sur une lamelle de verre et observé par microscopie optique.

3.2. Fabrication de l'électrode d'ITO (ITO préparé au laboratoire)

La métallisation est effectuée à l'aide d'un métalliseur « Leica » qui permet de déposer un matériau sur un substrat par pulvérisation cathodique.

- 1) Mise en place des échantillons dans le métalliseur sur le plateau tournant.
- 2) Lancement du programme de métallisation (Pour l'ITO : Courant 150 mA, 84 s et 10 cycles), la durée de la métallisation est d'environ 45 minutes pour 150 nm d'épaisseur.

L'étape suivante est une étape de recuit, dans un four classique, capable de monter à 300°C, à l'air et sous pression atmosphérique. Nous avons utilisé un programme de température en 3 étapes : 1- rampe de température de 1H30 pour passer de 0 à 290 °C. 2- plateau de température de 3H15 à 290°C. 3- Arrêt du four. L'ITO obtenu a une transparence de 80% et une conductivité 25-35 Ohms.

Pour préparer la cellule électrochimique, nous faisons, d'abord, le dépôt de platine qui permet le contact électrique. Ensuite, il faut passer la lame d'ITO et le PDMS au plasma pour faire le collage et, enfin, nous réalisons le point de contact à l'aide d'un fil électrique. Dans le cas du graphène, seul le PDMS est passé au plasma (pour ne pas abimer la couche de graphène).

4. Préparation de dispositif microfluidique

Pour préparer le dispositif microfluidique nous commençons par un dessin sur le logiciel Clewin qui est transféré, après, sur un masque en chrome ou en plastique. Ce masque est utilisé pour fabriquer le moule, par lithographie, qui contient le dessin en relief.

Sur une plaque en silicium, nous déposons une couche de résine négative avec la bonne épaisseur qui va décider la hauteur des canaux microfluidiques. Nous passons après à la polymérisation par UV, cette étape permet de polymériser les zones transparentes sur le masque qui correspondent à la forme de notre dispositif. L'étape suivante est appelée « le développement » et elle consiste à un traitement de la surface par un solvant qui enlève la résine qui n'était pas exposé à l'UV (le résine qui était protégé par les zones sombres du masque). Donc sur le moule final nous avons le schéma du dispositif, en relief.

L'étape d'après consiste à couler du PDMS dans le moule, dégazer et mettre le tout à l'étuve à 80°C pendant, au moins, 1 heure. Le décollage du PDMS dur permet d'obtenir le schéma de notre dispositif creusé dans le bloc de PDMS. A l'aide d'un emporte-pièce, nous perçons le PDMS pour permettre l'insertion des tuyaux en plastique dans lesquels circulent les solutions. Ce bloc de PDMS est, ensuite, collé, par plasma, sur une couche en PDMS d'épaisseur 0,5 mm afin de former des canaux dans lesquels les solutions peuvent circuler. Après son passage au plasma, le PDMS hydrophobe devient hydrophile, donc il faut le mettre sur une plaque chauffante pendant, au moins, 2 heures pour augmenter son hydrophobicité, ce qui est nécessaire pour la formation des gouttes.

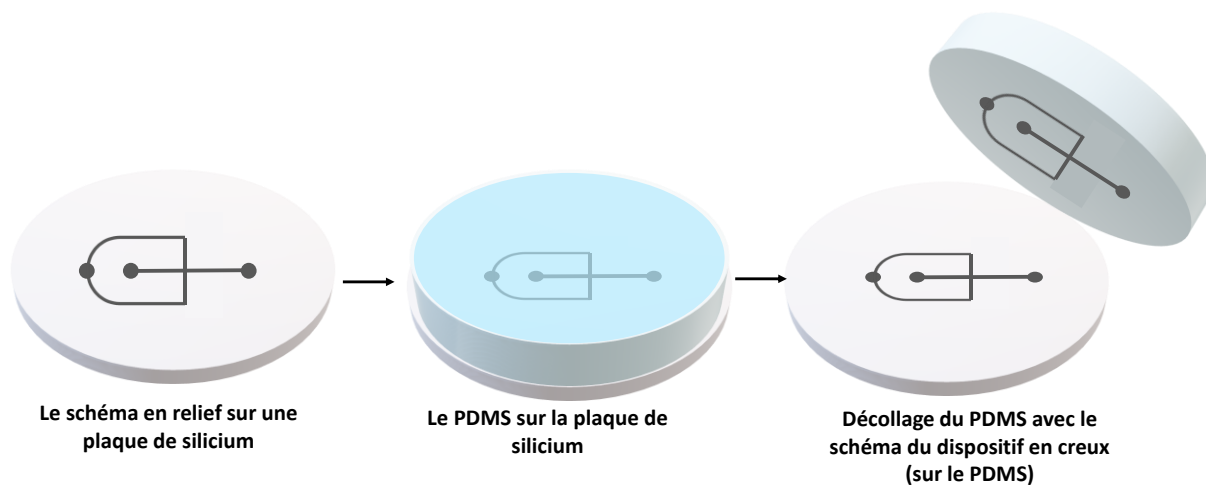


Figure 93 : Schéma des étapes de récupération du dispositif microfluidique sur le PDMS

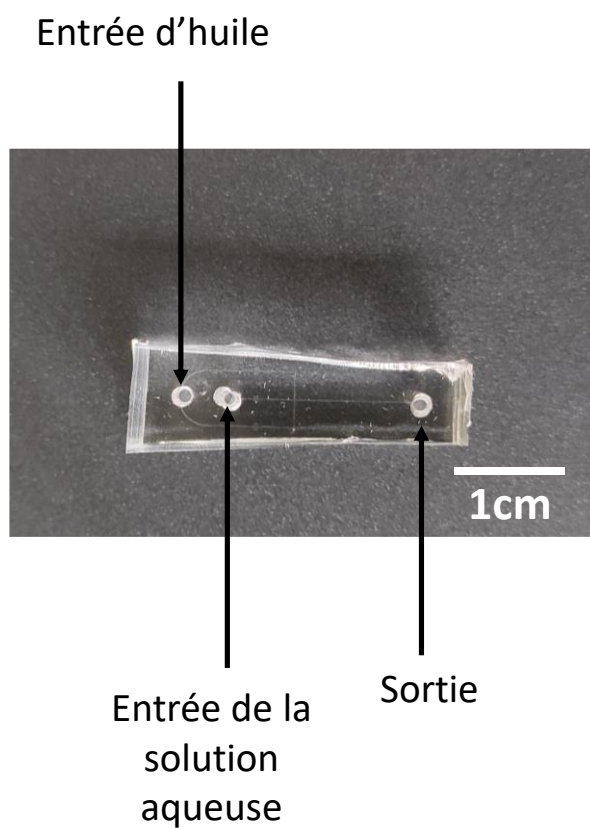


Figure 94 : Dispositif microfluidique collé.

II. Préparation des liposomes

1. Préparation des solutions nécessaires pendant l'étape de la fabrication des liposomes

1.1. Solution lipidique en phase organique

1.1.1. Pour la fabrication manuelle des liposomes

Pour observer les vésicules géantes en microscopie optique, la composition lipidique de la bicouche intègre des lipides marqués.

Le ratio molaire lipides non marqués/ lipides marqués est fixé à 98/2 de sorte à ne pas modifier le comportement dynamique de la membrane dictée par le lipide majoritaire.

1- A l'aide d'une seringue HAMILTON®, nous prélevons un volume de la solution de phospholipides dans le chloroforme et nous l'introduisons dans un pilulier en verre. Nous répétons le prélèvement des autres lipides d'intérêt de sorte à atteindre le ratio molaire 98/2 $V_1 = 19,53 \mu\text{L}$ (Phospholipide non marqué DOPG) $V_2 = 4,65 \mu\text{L}$ (Phospholipide marqué DPPE-NBD).

2-Sous vide, nous évaporons le chloroforme en imprimant un mouvement de rotation au pilulier pour répartir uniformément les lipides sur les parois de verre de pilulier. L'évaporation du solvant doit être lente de sorte à limiter les éclaboussures de la solution sur les parois. On laisse le pilulier sous vide pendant deux heures.

3-Nous solubilisons les lipides déposés sur les parois par l'ajout de n-dodécane (sigma Aldrich) de sorte à atteindre une concentration massique lipidique totale de $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Nous mettons la solution sous l'effet des ultrasons pendant une heure pour assurer l'homogénéisation de la solution.

4-Nous conservons la solution à 4°C .

1.1.2. Pour la préparation de l'émulsion dans des dispositif microfluidique

Pour cette méthode, la solution de phospholipides à 0.5 mg/mL dans l'huile minérale (Mineral oil, Sigma Aldrich). Nous commençons par un prélèvement, à l'aide d'une seringue HAMILTON®, de $121 \mu\text{L}$ de la solution des phospholipides dissouts dans du chloroforme et

ce volume est mis dans un pilulier en verre. Sous vide, nous évaporons le chloroforme. Nous laissons le pilulier sous vide pendant deux heures. Après, nous solubilisons les lipides déposés sur les parois par l'ajout de 2 mL de l'huile minérale de sorte à atteindre une concentration massique lipidique totale de 0,5 mg. mL⁻¹. Nous mettons la solution sous l'effet des ultrasons pendant une heure pour assurer l'homogénéisation de la solution. La solution est conservée à 4°C.

Ces étapes sont utilisées pour la préparation des différentes solutions phospholipidiques. Nous prélevons 121 µL du DOPC (18 :1(Δ9-cis)PC(DOPC) dans du chloroforme à 10 mg.mL⁻¹, Avanti Polar Lipids) pour préparer la solution qui permet de former la monocouche interne et nous remplaçons ce phospholipide par du DOPG(18 :1(Δ9-Cis)PG dans du chloroforme à 10mg.mL⁻¹ , Avanti Polar Lipids) pour préparer la solution phospholipidique qui intervient dans la formation de la monocouche externe. Pour observer par microscopie optique la bicouche lipidique, il faut ajouter un phospholipide marqué avec un ratio molaire lipides non marqués/ lipides marqués à 98/2 de sorte à ne pas modifier le comportement dynamique de la membrane dictée par le lipide majoritaire. Le phospholipide marqué choisi est le DPPE-NBD (16 :0 NBD PE à 1 mg.mL⁻¹, Avanti Polar Lipids).

1.2. Préparation des solutions intra et extra-vésiculaires

Les solutions sont préparées dans un tampon phosphate PBS à 10 mM à un pH autour de 7,4. La solution extra-vésiculaire est une solution de glucose de concentration 0,7 M obtenu par dissolution de 1,261 g de de glucose (D- (+) - Glucose, Sigma Aldrich) dans 10 mL de PBS (Phosphate Buffer Saline tablet, Sigma Aldrich).

Pour préparer la solution intra-vésiculaire, pour les chapitres 2 et 4, nous préparons, d'abord, une solution de sucrose à 0,7 M (2,4 g de sucrose dans 10 mL de PBS). Ensuite, nous ajoutons dans cette solution 190 µL de Tri-*n*-propylamine et nous ajustons le pH avec une solution d'acide phosphorique H₃PO₄ à 1M afin d'obtenir une solution de TPrA à 100 mM et un pH autour de 7,4. Enfin, nous utilisons 1 mL de la solution obtenue pour dissoudre 1,84 mg du complexe de ruthénium [Ru(bpy)₃]²⁺ pour préparer une solution à 2,5 mM et nous réalisons une dilution par 10, afin d'obtenir une concentration égale à 250 µM.

Pour le chapitre 3, la solution intra-vésiculaire est, dans la première partie, une solution de sucrose à 0,7 M et, dans la deuxième partie, une solution de FcMeOH (ferrocenemethanol, Acros Organics) à 500 μM dans le sucrose. Dans le chapitre 5, nous utilisons deux solutions intra-vésiculaires, une première solution de sucrose à 0,7 M contenant du NADH (β -Nicotinamide adenine dinucleotide réduit, Merck) à 10 mM (14,19 mg dans 2 mL de sucrose) et cette solution permet de préparer une solution de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à 250 μM . La deuxième solution est aussi une solution de sucrose à 0,7 M qui contient le NAD^+ (β -Nicotinamide adenine dinucleotide, Merck) à 10 mM (13,7 mg dans 2 mL de sucrose). Nous utilisons après cette solution (NAD^+ dans le sucrose) pour diluer une masse d'enzyme Glucose DéshydroGénase GDH (Glucose dehydrogenase from Pseudomonas sp, Merck) pour obtenir 80 unités dans le volume totale de la solution (l'enzyme est à 236 U/mg). Cette deuxième solution qui contient le NAD^+ et l'enzyme GDH va servir à dissoudre une masse de la poudre du complexe de ruthénium $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (1,87 mg dans 1 mL) et faire une dilution afin d'obtenir une concentration finale égale à 250 μM de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$.

Avant de commencer la fabrication des liposomes, les osmolalités des deux solutions (intra et extra-vésiculaire) sont contrôlées et ajustées pour avoir des valeurs proches avec une différence qui ne dépasse pas 10 mosmol.kg⁻¹.

1.3. Etape de la fabrication des liposomes

1.3.1 Fabrication manuelle

1-Dans un Eppendorf® de 1,5 mL, nous introduisons 200 μL de la solution externe et 200 μL de la solution lipidique dans le n-dodécane et nous fermons l'Eppendorf®.

2-Nous plaçons l'échantillon diphasique à l'étuve à 45°C pendant au moins 4 heures pour permettre la mise en place d'une monocouche lipidique à l'interface entre les 2 phases.

3-Dans un Eppendorf® de 1,5 mL, nous introduisons 10 μL de la solution interne et 100 μL de la solution lipidique dans le n-dodécane.

4-nous réglons la pipette à 30 μL et nous réalisons une émulsion par aspirations/refoulements rapides à la pipette pendant environ une minute. Nous prélevons 30 μL à l'issue de la dernière aspiration

5-Nous injecte ce volume dans la phase organique surnageante de l'Eppendorf® contenant la phase lipidique dans le n-dodécane et la solution externe. L'injection doit être brève et nette car la coalescence de l'émulsion dans le cône est rapide.

6-Après la sédimentation, il faut centrifuger l'échantillon à une accélération de 67 g, c'est-à-dire 1000 tours/min en utilisant la centrifugeuse MiniSpin® de rotor r = 6 cm, pendant 1minute.

7-Nous éliminons la phase organique surnageante et nous prélevons la solution externe contenant les vésicules géantes pour une utilisation directe.

1.3.2 La fabrication des liposomes à l'aide du dispositif microfluidique

Dans un Eppendorf® de 0,5 mL, nous introduisons 250 μ L de la solution externe et 250 μ L de la solution phospholipidique du DOPG (ou DOPC dans le chapitre 3) dans l'huile minérale et on ferme l'Eppendorf®. Nous plaçons le système diphasique à l'étuve à 45°C pendant au moins 4 heures pour permettre la mise en place d'une monocouche lipidique à l'interface entre les 2 phases.

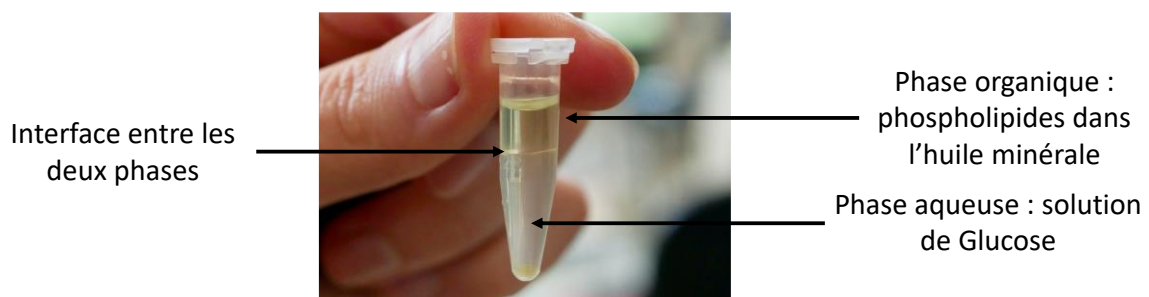


Figure 95 : Eppendorf contenant le système biphasique : une solution de phospholipide (DOPG) dans l'huile minérale et une solution de glucose

Pour préparer l'émulsion des micelles inversées, nous utilisons le dispositif microfluidique à deux entrées : dans la première, nous mettons la solution de phospholipide dans l'huile minérale et dans la deuxième la solution à encapsuler (qui est différente selon la partie du projet). A l'aide d'un système de régulation de pression lié à une pompe et en ajustons les pressions des deux entrées à des valeurs qui permettent de former des gouttes sphériques, nous générons les micelles inversées. Ces micelles passent, ensuite, dans le système diphasique en mettons la sortie du dispositif microfluidique dans la phase organique (la phase d'huile) et

grâce à la différence de densité entre le glucose et le sucrose, les micelles traversent l'interface, afin de former la deuxième monocouche.

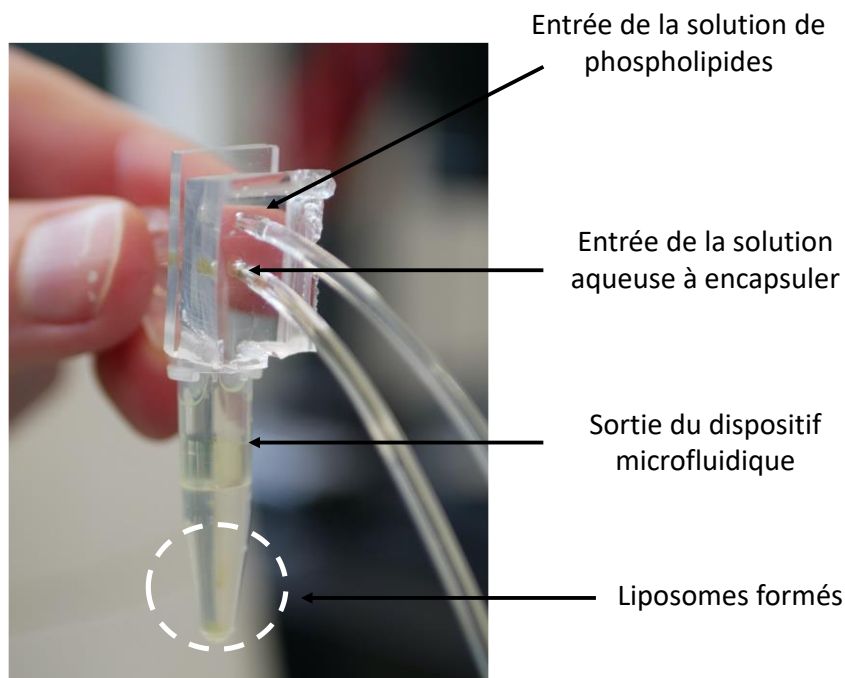


Figure 96 : Système utilisé pour la fabrication des liposomes : le dispositif microfluidique est inséré dans le système biphasique.

III. Fabrication des peptides

Dans notre projet, nous avons utilisé la mélittine synthétisée dans le laboratoire de Biomolécules à Sorbonne Université, avec Dr. Fabienne Burlina. La synthèse de ce peptide a été effectuée sur support solide, en stratégie Fmoc (les acides aminés sont protégés par un groupement fluorénylméthoxycarbone Fmoc) avec une résine Rink Amide AM et un taux de substitution de 0,26 mmol/g sur une échelle de synthèse fixée à 0,1 mmol ce qui nous a amené à peser 385 g de résine. L'étape de synthèse est effectuée dans un synthétiseur automatique et les acides aminés, protégé par le groupement Fmoc, sont activés avec une solution DIC/HOBt dans du DMF. A la fin de cette étape, nous avons récupéré 850 mg de peptide couplé à la résine. Après, nous avons effectué un clivage (séparer la résine du peptide) en ajoutant une solution de clivage (10 mL pour un gramme de résine) composé par TFA/TIS/H₂O MQ avec les ratios 95 : 2,5 : 2,5 (v/v) et nous avons laissé le mélange pendant au moins 2 heures. Après, nous avons récupéré le surnageant qui contient que le peptide, en filtrant le mélange et en rinçant la résine, avec la solution de clivage, afin de récupérer un

maximum de peptide. Le TFA est, ensuite, évaporé sous argon, pendant 1 heure, et nous avons ajouté de l'éther froid (200 mL pour 1g de peptide-résine) et nous avons centrifugé la solution obtenue pour favoriser la précipitation du peptide. Après, nous avons enlevé l'éther pour solubiliser les peptides dans un mélange de AcOH/eau milli Q (10%/90%) et passer à l'étape de lyophilisation.

La deuxième grande étape, pendant la synthèse d'un peptide est la purification qui permet de récupérer le peptide pur. La purification a été réalisée par HPLC sur une colonne RP-C18 (ACE 5 C18-300 250 x 10 mm) avec un gradient d'analyse de 35% à 60% de B dans A, pendant 30 minutes, (A est une solution d'eau avec 0,1% de TFA et B est une solution D'ACN avec 0,1% de TFA) et un débit fixé à 6 mL/min. Avant de commencer la purification, le peptide a été solubilisé dans un mélange de 70% de la solution A et 30% de la solution B et filtré avant l'injection dans l'appareil de HPLC. La longueur d'onde de détection a été fixée à 220 nm. Pendant chaque injection, nous avons récupéré la partie de la solution qui correspond au pic détecté et les échantillons obtenus ont été analysés par HPLC sur une colonne RP-C18 (ACE C18-300, 100 x 4.6 mm) pendant 10 min et un débit fixé à 1 mL/min avec un gradient d'analyse de 40% à 65% de B dans A. Selon leurs puretés, les échantillons ont été rassemblés et lyophilisés (après une congélation dans de l'azote liquide). La masse finale obtenue est égale à 37,7 mg. Le peptide a été caractérisé par spectrométrie de masse (Maldi-TOF) en mode ion positif réflecteur en utilisant une matrice CHCA à 10 mg/mL in CH₃CN/H₂O/TFA, 50:50:0.1 et nous avons obtenu le résultat ci-dessous qui montre un bon accord entre le pic trouvé (de masse 2845,4) et la valeur de m/z calculée (2845,7).

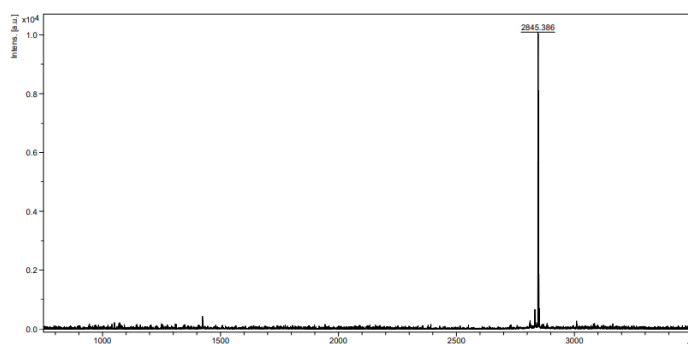


Figure 97 : spectrométrie de masse (Maldi-TOF) du peptide pur en mode ion positif réflecteur en utilisant une matrice CHCA à 10 mg/mL in CH₃CN/H₂O/TFA, 50:50:0.1.

IV. Déroulement des expériences

1. La caractérisation électrochimique

Les études par Voltampérométrie cyclique ont été réalisées à l'aide d'un potentiostat Autolab et l'enregistrement des données a été réalisé par le logiciel NOVA 2.2.

La cellule électrochimique composé par un puit en PDMS collé sur une lamelle de verre ou sur l'électrode de travail, est directement branchée au potentiostat.

2. L'étude par électrochimiluminescence

Cette étude a été effectuée sur les mêmes cellules électrochimiques en enregistrant à la fois le signal électrochimique et le signal luminescent.

La détection luminescente a été réalisée par un microscope inversé ZEISS (Allemagne) couplé à une caméra EM-CCD Digital Camera de HAMAMATSU (Japon) reliée au logiciel HCImage Live. Le traitement des images a été fait par le logiciel Imagej.

3. La détection de la perméabilisation de la bicouche lipidique

Cette partie consiste à coupler l'électrochimiluminescence à l'ampérométrie et à la photoluminescence. Pour réaliser ce couplage, nous utilisons le dispositif ci-dessous :

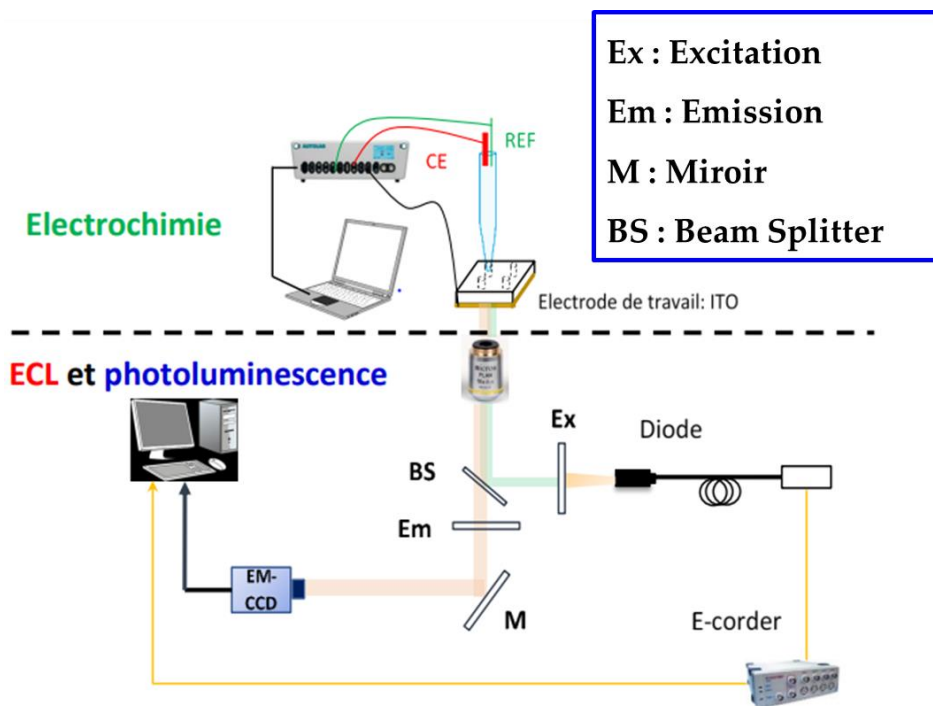


Figure 98 : Montage utilisé pendant le couplage

Ce dispositif est composé d'une cellule électrochimique reliée à un potentiostat (mini Autolab) et déposée sur un microscope inversé ZEISS (Allemagne) couplé à une caméra EM-CCD Digital Camera de HAMAMATSU (Japon) reliée au logiciel HImage Live. Une diode a été mise en place pour permettre l'excitation de luminophore et grâce à un système de synchronisation E-corder, nous avons réussi à contrôler cette diode : elle s'allume pendant 100 ms et elle s'éteint pendant 900 ms.

La pointe de pipette est remplie par une solution de glucose, dans les chapitres 2, 4 et 5. Dans le chapitre 3, la pointe est remplie par une solution de glucose à 0,7 M contenant Le co-réactif TPrA (tripropylamine, Sigma Aldrich) à 20 mM (38 μL de TPrA dans 10 mL de Glucose) et en ajustant le pH de la solution à 7,4. Après, la solution obtenue est utilisée pour dissoudre une masse de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (Tris(2,2'-bipyridyl)dichloro-ruthenium(II) hexahydrate, Sigma Aldrich). Afin d'obtenir une concentration égale à 30 μM , il faut d'abord préparer une solution à 2,5 mM en solubilisant 9,36 mg dans 5 mL de la solution déjà préparée. Après, une dilution est nécessaire pour obtenir une solution à 30 μM (60 μL de la solution à 2,5 mM dans 4940 μL de la solution de TPrA à 20 mM).

Les liposomes sont ajoutés en haut de la cellule électrochimique et les images sont enregistrer avec une sensibilité maximale de la caméra (255) et un temps d'exposition égal à 250 ms.

Listes des figures et des tableaux

Liste des figures

Figure 1 : Evolution des approches associant électrochimie et luminescence (fluorescence) permettant d'étudier le passage transmembranaire de biomolécules ou de distinguer les propriétés physico-chimiques des deux feuilletts d'une bicouche lipidique.	8
Figure 2 : Principe de l'électrochimiluminescence basée sur l'oxydation concomitante d'un luminophore et d'un co-réactif sacrificiel.	9
Figure 3 : Description de l'approche permettant d'imager la perméabilisation membranaire d'un liposome géant par électrochimiluminescence.	10
Figure 4 : Frise chronologique de l'évolution des expériences d'électrochimiluminescence au cours du temps inspiré de la référence [26].	19
Figure 5 : Mécanisme d'électrochimiluminescence selon l'approche d'annihilation	20
Figure 6 : Formules chimiques des deux réactifs engagés dans la réaction d'électrochimiluminescence le complexe de ruthénium (a) et l'oxalate (b).....	22
Figure 7 : Formules chimiques des deux réactifs engagés dans la réaction d'électrochimiluminescence : le complexe de ruthénium (a) et le peroxydisulfate (b).	23
Figure 8 : Formules chimiques des deux réactifs engagés dans la réaction d'électrochimiluminescence : (a) le complexe de ruthénium et (b) la tri- <i>n</i> -propylamine.	23
Figure 9 : Mécanisme d'électrochimiluminescence selon l'approche du co-réactif en utilisant le couple $[Ru(bpy)_3]^{2+}/Tri-n-propylamine$ - <i>Mécanisme 1</i>	25
Figure 10 : Mécanisme d'électrochimiluminescence selon l'approche du co-réactif en utilisant le couple $Ru(bpy)_3^{2+}/Tri-n-propylamine$ - <i>Mécanisme 2</i>	27
Figure 11 : Mécanisme d'électrochimiluminescence selon l'approche du co-réactif en utilisant le couple $[Ru(bpy)_3]^{2+}/Tri-n-propylamine$ - <i>Mécanisme 3</i>	28
Figure 12 : Frise chronologique de l'évolution de l'imagerie en électrochimiluminescence au cours du temps [36].....	29
Figure 13 : Forme sandwich de l'immunodosage de la protéine humaine CRP composé par : B, biotine; L, liposomes; S, streptavidine; C, protéine (analyte); et M, microbilles magnétiques [37].	30

Figure 14 : Utilisation du luminol pour l'analyse du cholestérol de la membrane plasmique de la cellule. Le peroxyde d'hydrogène est un produit de l'oxydation du cholestérol membranaire en présence de l'enzyme cholestérol oxydase. La réaction d'ECL du couple H_2O_2 /Luminol génère de la lumière bleue à 428 nm (Schéma reproduit de la référence [40]).	31
Figure 15 : Représentation de la méthode d'immunodosage par ECL basée sur une association Streptavidine- Biotine et anticorps- luminophore.	32
Figure 16 : La figure est issue de la référence [43]. Elle représente le dispositif utilisé pour imager les nanoparticules de polymère conjugué F8BT (à gauche) et le résultat obtenu suite à une émission de lumière due à une réaction d'électrochimiluminescence entre la TPrA et le F8BT.	32
Figure 17 : Imagerie ECL de la détection de glucose intra-cellulaire sur des cellules individuelles. Le couple de réactifs ECL utilisé dans ce cas est le L012/ H_2O_2 . Le peroxyde d'hydrogène est obtenu suite à une réaction d'oxydation de glucose en présence d'enzyme [45].	33
Figure 18 : Possibilités d'encapsulation dans un liposome [50].	34
Figure 19 : Structure générale d'un liposome.	35
Figure 20 : Exemple de structure d'un phospholipide [61].	36
Figure 21 : Changement de phase d'un phospholipide suite à un changement de température.	38
Figure 22 : Structure du DOPG 1, 2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt) avec des chaînes en C18 et une température de transition de phase $T_g = -18^\circ C$.	39
Figure 23 : 1,2-di-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (sodium salt) avec des chaînes en C18 et une température de transition de phase $T_g = -17^\circ C$.	39
Figure 24 : Structure du DPPE-NBD 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (ammonium Salt) avec des chaînes en C16 et un fluorophore nitobenzoxadiazole.	40
Figure 25 : Structure du cholestérol.	41
Figure 26 : Classification des liposomes [65].	42
Figure 27 : Schéma de principe de l'électroformation et observation des liposomes obtenus [68].	43

Figure 28 : Schéma d'un dispositif microfluidique générateur de gouttes : étape de la formation des micelles inversées.....	44
Figure 29 : Formation des liposomes par transfert de phase (figure prise de la référence [70]).	45
Figure 30 : Schéma explicatif des bénéfices des nanovecteurs ou liposomes dans le domaine de la vectorisation des médicaments [73]......	46
Figure 31 : fusion de deux vésicules en présence d'un tensio-actif (Tween 20) par ouverture simultanée de deux pores [75]......	47
Figure 32 : Détection de la libération liposomale par électrochimie de la vitamine C (a) [79] et de la cathécholamine (b) [81]......	51
Figure 33 : Stratégie adoptée pour imager l'ouverture d'un liposome par électrochimiluminescence.	52
Figure 34 : Fabrication de liposomes par la méthode de transfert de phase et la préparation de l'émulsion par microfluidique.....	55
Figure 35 : Observation microscopique de vésicules contenant $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ainsi que le co-réactif TPrA à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, et posées sur une surface en polystyrène. Observation (a) en contraste de phase, (b) avec un filtre GFP et (c) avec un filtre rhodamine. Barre d'échelle : $300 \mu\text{m}$	56
Figure 36 : Longueur d'onde d'excitation et d'émission du NBD.....	57
Figure 37 : Dispositif électrochimique pour l'enregistrement des voltampérogrammes avec une électrode de travail en carbone vitreux (a) et une autre transparente déposée à la surface de la lamelle de verre(b) (l'électrode est en ITO ou graphène).	60
Figure 38 : Voltampérométrie cyclique d'une solution de complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à 1 mmol.L^{-1} dans un milieu tampon phosphate à 10 mmol.L^{-1} et $\text{pH} = 7,54$, sur différents matériaux d'électrode. Nature de l'électrode de travail : (a) carbone vitreux de diamètre $d = 3 \text{ mm}$, (b) oxyde d'indium-étain commercial de diamètre $d = 7 \text{ mm}$, (c) oxyde d'indium-étain préparé au laboratoire et $d = 7 \text{ mm}$, (d) graphène de diamètre $d = 7 \text{ mm}$. Vitesse de balayage $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$. L'électrode de référence est en Ag/AgCl et la contre électrode est un fil de platine de diamètre 1 mm et de longueur 1 cm	61
Figure 39 : Voltampérométrie cyclique d'une solution de tri- <i>n</i> -propylamine à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ dans un milieu tampon phosphate à 10 mmol.L^{-1} et $\text{pH} = 7,54$, sur différents matériaux d'électrode.	

Electrode de travail : (a) carbone vitreux de diamètre $d = 3$ mm, (b) oxyde d'indium-étain commercial de diamètre $d = 7$ mm, (c) oxyde d'indium-étain préparé au laboratoire et $d = 7$ mm, (d) graphène de diamètre $d = 7$ mm. Vitesse de balayage $v = 50$ mV.s ⁻¹ . L'électrode de référence est en Ag/AgCl et la contre électrode est un fil de platine de diamètre 1mm et de longueur 1cm.	63
Figure 40 : Dispositif du couplage électrochimiluminescent avec une électrode de travail en carbone vitreux.	64
Figure 41 : Propriétés électrochimiluminescentes du système [Ru(bpy) ₃] ²⁺ et tri- <i>n</i> -propylamine. Voltampérogrammes cycliques (en bleu) et intensité d'électrochimiluminescence (en orange) enregistrés sur différents matériaux d'électrode. (a) carbone vitreux (b) ITO commercial (c) ITO préparés au laboratoire. Vitesse de balayage $v = 50$ mV.s ⁻¹ . (d) Image en microscopie optique en absence d'irradiation sur une électrode de carbone vitreux. Conditions : 380 μ L d'une solution de tri- <i>n</i> -propylamine ($C = 0,1$ mol.L ⁻¹) et de [Ru(bpy) ₃] ²⁺ ($C = 1$ mmol.L ⁻¹) dans un tampon phosphate à 10 mmol.L ⁻¹ (pH = 7,54). L'électrode de référence est en Ag/AgCl et la contre électrode est un fil de platine de diamètre 1mm et de longueur 1 cm.....	65
Figure 42 : Cellule électrochimique préparée au laboratoire et utilisée pour la détection de l'ouverture des liposomes par électrochimie. L'électrode de travail est une lamelle de verre d'épaisseur $e_1 = 130$ μ m couverte par une couche d'ITO d'épaisseur $e_2 = 150$ nm. L'électrode de référence est un fil d'Ag/AgCl et la contre électrode est un fil de platine de diamètre égal à 1mm et de longueur égale à 1 cm.....	66
Figure 43 : Trace chronoampérométrique typique obtenue suite à l'ouverture des liposomes contenant une solution de sucrose de concentration $C_{\text{sucrose}} = 0,7M$, à la surface d'une électrode de travail en ITO polarisée à 1,2 V vs. Ag/AgCl.....	68
Figure 44 : Signal chronoampérométrique typique montrant l'oxydation de la solution intra-vésiculaire ([Ru(bpy) ₃] ²⁺ ($C = 2,5 \cdot 10^{-4}$ mol.L ⁻¹) et TPrA ($C = 0,1$ mol.L ⁻¹)) à la surface d'une électrode polarisée à un potentiel égal à 1,2 V vs AgCl/Ag (a). La figure (b) montre les pics ampérométriques après déconvolution.	69
Figure 45 : Signal chronoampérométrique de l'oxydation de la solution intra-vésiculaire ([Ru(bpy) ₃] ²⁺ ($C = 2,5 \cdot 10^{-4}$ mol.L ⁻¹) et TPrA ($C = 0,1$ mol.L ⁻¹)), à la surface d'une électrode d'ITO polarisée à un potentiel égal à 1,2 V vs. Ag/AgCl, avant (a) et après (b) la soustraction du courant capacitif.	71

Figure 46 : La loi de Weibull et la superposition d'un pic isolé du chronoampérogramme obtenu (en noir) et de la modélisation du pic par la loi de Weibull (en pointillé rouge) qui montre que cette loi offre la meilleure modélisation pour nos pics.....	73
Figure 47 : Les étapes suivies lors du traitement mathématique au cours de l'étape de déconvolution.	74
Figure 48 : Etude de la distribution de tailles de liposomes obtenues à partir des pics d'oxydation de la solution encapsulée dans ces liposomes contient le $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($C = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) et la TPrA ($C = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$). La figure représente le pourcentage de liposomes en fonction des valeurs de rayons obtenues par intégration, pour 27 évènements d'oxydation.	76
Figure 49 : Dispositif utilisé pour le couplage de l'ECL avec l'électrochimie et la photoluminescence.....	78
Figure 50 : Acquisition utilisée pour la collection simultanée des données en électrochimie, ECL et photoluminescence. La figure correspond à l'acquisition pendant 2 secondes.....	79
Figure 51 : Images obtenues en ECL et en photoluminescence qui montrent l'ouverture d'un liposome (cerclé en traits pointillés rouge) à la surface d'une électrode et la détection d'ECL. Barre d'échelle : 200 μm . Le $t = 0 \text{ s}$ correspond au moment de déclenchement de la mesure.	80
Figure 52 : Combinaison typique des signaux obtenu en ampérométrie (bleu), photoluminescence (vert) et ECL (rouge) suite à la perméabilisation de la membrane d'un liposome (montré dans la Figure 53) à la surface d'une électrode polarisée.	81
Figure 53 : Images en photoluminescence et en ECL qui mettent en évidence la perméabilisation d'un liposome. Barre d'échelle = 200 μm . La région d'intérêt (ROI) correspond aux cercles en pointillé blanc.	82
Figure 54 : Variation typique de la distance apparente δ^2 de la propagation du signal lumineux de la réaction d'électrochimiluminescence en fonction du temps. L'étude a été réalisée sur 7 liposomes et nous avons obtenu une valeur moyenne de pente (4D) égale à $20 \cdot 10^{-6} \pm 3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	83
Figure 55 : Observation de l'empreinte digitale sur une électrode en ITO, par microscopie à fond clair (a) et ECL négative (b) en présence d'un potentiel positif (1,13 V vs. Ag/Ag/Cl). Le luminophore est le $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($C = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) et le co-réactif TPrA ($C = 50 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) dans du PBS à 0,01 M et pH = 7,4. Les images numérotées de 1 à 4 montrent qu'avec l'approche d'ECL	

négative, il est possible d'observer les irrégularités de l'empreinte digitale. Figure issue de la référence [90]. 88
 Figure 56 : La figure présente deux séries d'images en microscopie à fond clair de (a) à (c) et en ECL négative de (d) à (f) de cellules vivantes PC12. Le luminophore est le $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ est à $5.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ et HEPES à $20.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans du PBS à 0,01 M et pH = 7,4. L'ECL est obtenue par application d'un potentiel positif égal à 1,3 V (vs. Ag/Ag/Cl) à une électrode en ITO couverte par une membrane en silice. La barre d'échelle : 20 μm . La figure vient de la référence [2] et elle a été modifiée par rapport à la figure d'origine. 89
 Figure 57 : Une image de mitochondries déposées à la surface d'une électrode de carbone vitreux obtenue en ECL négative (a), en ECL négative avec inversion de couleur (b), en photoluminescence de NADH (c) et du MitoTracker rouge (d). L'électrochimiluminescence négative a été réalisée avec le $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à $30.10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ et la TPrA à 0,1 mol.L⁻¹. L'électrode était polarisée à +1,45 V. La barre d'échelle : 10 mm [48]. 90
 Figure 58 : Schéma de la stratégie adoptée pour détecter la perméabilisation de la bicouche lipidique par ECL négative. 91
 Figure 59 : Surface d'une électrode en ITO de diamètre $d = 0,8 \text{ mm}$ non polarisée (a) et polarisée (b) à un potentiel de +1,2 V (vs. Ag/AgCl). Le milieu est une solution de PBS à $1.10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ et un pH = 7,54 contenant le luminophore $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à $30.10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ et le co-réactif TPrA à $20.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. la barre d'échelle : 200 μm 93
 Figure 60 : Intensité d'électrochimiluminescence en fonction du temps avant et après déclenchement du potentiel. L'expérience a été réalisée sur une surface d'électrode d'ITO de diamètre $d = 0,8 \text{ mm}$. Le potentiel appliqué est +1,2 V (vs. Ag/AgCl). La solution contient le luminophore $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à $30.10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ et le co-réactif TPrA à $20.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans du PBS à $1.10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ et pH = 7,54. 94
 Figure 61 : la figure représente une série d'images du signal électrochimiluminescent obtenu à la surface d'une électrode de travail en ITO ($d=0,8 \text{ mm}$) suite à l'application d'un potentiel égal à 1,2V (vs. Ag/Ag/Cl) et en présence d'une solution de luminophore $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à $30.10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ et le co-réactif TPrA à $20.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans du glucose à 0,7 mol.L⁻¹ dissout dans une solution de PBS à $1.10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ et pH= 7,54. Les liposomes contiennent une solution de sucrose à 0,7 mol.L⁻¹ dans du PBS. La figure montre l'apparition de la lumière suite à l'application du potentiel à 7 secondes, les tâches noires, sur l'image à 7 secondes, sont des défauts à la surface

de l'électrode. A noter que l'enregistrement d'images en photoluminescence n'est pas pertinent ici car le luminophore est présent dans tout le milieu extérieur. Barre d'échelle : 200 μm . Ici, la région d'intérêt correspond à toute l'image..... 95

Figure 62 : Série d'images obtenues en ECL (a) et courbes représentant la variation de l'intensité ECL en fonction du temps au niveau du cercle blanc (b) et sur toute l'image (c). L'expérience a été réalisée sur une électrode en ITO en présence d'un potentiel égal à 1,2 V (vs. Ag/Ag/Cl). Le milieu extérieur est composé d'une solution de luminophore $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à $30 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ et du co-réactif TPrA à $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans du glucose à $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$ dissout dans du PBS à $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ et $\text{pH} = 7,54$. Les liposomes contiennent une solution de sucrose à 0,7 M dans le PBS. 96

Figure 63 : Variation typique de la distance apparente δ^2 de la propagation de la tâche noire due à la dilution des réactifs du milieu extérieur (une solution de luminophore $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à $30 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ et du co-réactif TPrA à $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans du glucose à $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$ dissout dans une solution de PBS à $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ et $\text{pH} = 7,54$) en fonction du temps. La solution encapsulée est une solution de sucrose à 0,7 M dans du PBS. Le liposome étudié sur cette figure correspond au liposome montré sur la Figure 62. 98

Figure 64 : Variation de l'intensité ECL en fonction du temps sur une électrode d'ITO en présence de potentiel (1,2 V vs. Ag/AgCl). Le milieu extérieur est composé du luminophore $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à $30 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, du co-réactif TPrA à $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, et de glucose à $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$ dissout dans une solution de PBS à $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ et $\text{pH} = 7,54$. Les liposomes contiennent une solution de sucrose à $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$ dans le PBS ainsi que le quencher FcMeOH à $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. La zone d'intérêt correspond à la totalité de l'image. Barre d'échelle : 120 μm 100

Figure 65 : Les différents mécanismes qui expliquent comment un peptide antimicrobien peut déstabiliser la membrane lipidique..... 109

Figure 66 : séquence de la mélittine (a) et un dessin schématique en 3d (b) [169] 113

Figure 67 : Images photoluminescentes d'un liposome géant asymétrique composé de DOPG et de DOPC sur ses feuillet externe et interne, respectivement. Le liposome contient les réactifs ECL ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) et TPrA ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$)) et repose sur une surface en ITO recouverte de poly-L-lysine polarisée à +1,2 V vs. Ag/AgCl. Images enregistrées à $t = 5 \text{ min}$. et $t = 30 \text{ min}$. de polarisation. Ces images de microscopie obtenues en photoluminescence (PL)

rèvent clairement la localisation du complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à l'intérieur du liposome avec une lumière excitatrice à $\lambda_{\text{ex}} = 455 \text{ nm}$	115
Figure 68 : Voltampérogramme cyclique d'une solution de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ dans une solution de glucose à $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$, dissout dans du PBS à $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ et $\text{pH} = 7,5$. L'expérience est réalisée sur une électrode de travail en ITO, couverte (rouge) et non- couverte (bleu) par de la poly-L-lysine, polarisée à $+1,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. La vitesse de balayage égale à 50 mV.s^{-1}	116
Figure 69 : Voltampérogramme cyclique d'une solution de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ et tri- <i>n</i> -propylamine à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ dans une solution de glucose à $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$, dissout dans du PBS à $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ et $\text{pH} = 7,5$. L'expérience est réalisée sur une électrode de travail en ITO, couverte (rouge) et non couverte (bleu) par de la poly-L-lysine, et polarisée à $+1,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. La vitesse de balayage égale à 50 mV.s^{-1}	116
Figure 70 : Variation de l'intensité ECL en fonction du temps d'un mélange comprenant le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), la tri- <i>n</i> -propylamine ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$), et du glucose ($0,7 \text{ mol.L}^{-1}$), dissouts dans du PBS (10 mmol.L^{-1} , $\text{pH} = 7,5$). L'expérience est réalisée sur une électrode de travail en ITO avec un balayage de potentiel de $-0,1 \text{ V}$ à $+1,6 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, couverte (rouge) et non-couverte (bleu) par de la poly-L-lysine.....	117
Figure 71 : Protocole d'acquisition échantillonnée utilisé pour l'enregistrement simultané des données en électrochimie, ECL et photoluminescence. La figure correspond à une durée totale d'acquisition de 2 secondes.....	119
Figure 72 : (a) Superposition d'images ECL (en haut) et PL (en bas) montrant la perméation d'un liposome DOPC/DOPG par la méliittine à $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Le liposome contenant le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ et le co-réactif TPrA à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ repose sur une électrode en ITO polarisée ($+1,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$) et modifiée par de la poly-L-lysine. Pour éviter tout chevauchement entre les deux types d'informations visuelles, les images ECL et PL présentent une différence de temps d'acquisition initiale de 500 ms. La mise au point a été faite à la surface de l'électrode ITO pendant l'imagerie ECL et PL. Les carrés blancs en pointillés dans les images PL et ECL représentent la région d'intérêt (ROI) typique prise en compte pour les analyses quantitatives des intensités correspondantes. Barre d'échelle : $100 \mu\text{m}$. (b) Évolution des signaux PL (courbe bleue) et ECL (courbe rouge) obtenus en fonction du temps pour un seul liposome [présenté en (A)] perméabilisé par la méliittine.	120

Figure 73 : (a) Combinaison d'imagerie ECL (en haut) et PL (en bas) montrant deux processus successifs de perméation d'un liposome unique par la méliittine en fonction du temps. Dans ce cas, la région d'intérêt (ROI) correspond à l'image entière. Barre d'échelle : 100 μm . (b) Évolution de l'intensité PL (courbe bleue) et ECL (courbe rouge) en fonction du temps pour un seul liposome [présenté en (a)]. Mêmes conditions expérimentales que dans la précédente. 122

Figure 74 : (a) Combinaison d'imagerie ECL (en haut) et PL (en bas) montrant un processus de perméation d'un liposome unique par la méliittine ($1.10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) en fonction du temps. Barre d'échelle : 100 μm . (b) Évolution de l'intensité PL (courbe bleue) et ECL (courbe rouge) en fonction du temps pour un seul liposome [présenté en (a)]. Mêmes conditions expérimentales que dans la Figure 73 précédente sauf pour la concentration en méliittine ($1.10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$). Les régions d'intérêt sont représentées en traits pointillés blanc. Les flèches rouges indiquent l'emplacement de la fuite..... 124

Figure 75 : (a) Combinaison d'imagerie ECL (en haut) et PL (en bas) montrant deux processus successifs de perméation d'un liposome unique par la méliittine ($1.10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$) en fonction du temps. Barre d'échelle : 100 μm . (B) Évolution de l'intensité PL (courbe bleue) et ECL (courbe rouge) en fonction du temps pour un seul liposome [présenté en (a)]. Mêmes conditions expérimentales que dans la Figure 74 précédente sauf pour la concentration en méliittine ($1.10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$). Les régions d'intérêt sont représentées en traits pointillés blanc. 126

Figure 76 : Images photoluminescentes (lumière d'excitation à 455 nm) de plusieurs liposomes géants asymétriques composés de DOPG et de DOPC sur leurs feuillettes externe et interne, respectivement. Les liposomes contiennent les réactifs ECL ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($2,5.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) et TPrA ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$)) et repose sur une surface en ITO recouverte de poly-L-lysine polarisée à +1,2 V vs. Ag/AgCl. Images enregistrées à $t = 5 \text{ min.}$ et $t = 30 \text{ min.}$ de polarisation. Les images montrent la disparition de deux liposomes suite à un ajout d'une solution contenant des peptides à $t = 0 \text{ s.}$ La solution ajoutée est une solution de glucose contenant des CPP (R9 dans ce cas) à $1.10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$. Une mesure de l'osmolalité de la solution de peptide a été réalisée, avant l'ajout dans la cellule électrochimique. 128

Figure 77 : Illustration non exhaustive des micro-organismes, organelles et enzymes encapsulés au sein de liposomes ou polymersomes pour intégrer des métabolismes et fonctionnalités mimant les cellules du vivant. 136

Figure 78 : Représentation schématique du processus ECL issu de l'oxydation du glucose par le système NAD ⁺ , GDH et de l'ouverture des liposomes à l'électrode.....	137
Figure 79 : voltampérométrie cyclique d'une solution tampon phosphate salin (PBS ; C = 10 mM ; pH = 7,5) réalisée en absence (noir) et présence (bleu) de NADH (C = 10 mM) sur une électrode de platine (diam. 0,5 mm) et à $v = 50$ mV/s. Contre électrode : fil de platine de diamètre égal à 1mm et de longueur égale à 1cm. Expérience réalisée à température ambiante.	138
Figure 80 : Etude voltampérométrique montrant, en couleur rouge, la formation de NADH cinq minutes après avoir mélangé les trois réactifs suivants : NAD ⁺ ($10 \cdot 10^{-3}$ mol.L ⁻¹), GDH (80 U/mL) et glucose ($0,7$ mol.L ⁻¹). Les voltamogrammes en noir et vert ont été obtenus respectivement en absence de GDH et de glucose. Conditions expérimentales : solvant PBS (10 mM, pH = 7.54), électrode de travail en platine (diamètre : 0.5 mm) et contre électrode en platine (fil de platine). Température : 20 °C.	139
Figure 81 : Etude voltampérométrique montrant la formation de NADH en fonction du temps à partir d'une solution de PBS ($1 \cdot 10^{-2}$ mol.L ⁻¹ , pH = 7.54) contenant du NAD ⁺ ($1 \cdot 10^{-2}$ mol.L ⁻¹), l'enzyme GDH (80 U/mL), et du glucose ($0,7$ mol.L ⁻¹). Courbe noire (PBS), courbe orange (t = 0 min.), courbe jaune (5 min.), courbe rouge (20 min.), courbe verte (30 min.), courbe bleu (60 min.). La courbe en couleur grise correspond à une solution contenant du NADH authentique à une concentration de $1 \cdot 10^{-2}$ mol.L ⁻¹ . Conditions : électrode de travail en Pt (diam. 0.5 mm), et contre électrode en Pt (fil). Vitesse de balayage : $v = 50$ mV/s. Température ambiante (20 °C).	140
Figure 82 : (a) Evolution du signal électrochimiluminescent en fonction du potentiel appliqué. Conditions expérimentales : milieu PBS ($1 \cdot 10^{-2}$ mol.L ⁻¹ ; pH = 7.54) ; [Ru(bpy) ₃] ²⁺ (C = $2,5 \cdot 10^{-4}$ mol.L ⁻¹) ; NADH (C = $1 \cdot 10^{-2}$ mol.L ⁻¹) ; électrode de travail en ITO (diam. : 7 mm) ; contre-électrode : fil de platine. Les images montrent l'intensité lumineuse observée à la surface de l'électrode à différentes valeurs du potentiel. La figure (b) montre voltampérométrie cyclique d'une solution de PBS réalisée en absence (noir) et présence (bleu) de [Ru(bpy) ₃] ²⁺ (C = $2,5 \cdot 10^{-4}$ mol.L ⁻¹) sur une électrode en ITO (diam. 0.9 mm).....	141
Figure 83 : Dispositif et acquisition utilisés pendant le couplage de l'ECL à l'électrochimie et à la photoluminescence.	143

Figure 84 : (a) Images obtenues en ECL et PL montrant la perméabilisation d'un liposome de type DOPC/DOPG. Le liposome, qui repose sur une surface en ITO polarisée ($E = + 1.2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$) contient initialement du NADH (10 mM) et le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$). Afin d'éviter tout chevauchement entre les deux types d'informations visuelles, les images ECL et PL ont une différence de temps d'acquisition initiale de 500 ms. Pendant l'imagerie ECL et PL la mise au point a été faite au niveau de la surface de l'électrode en ITO. Les traits blancs en pointillés dans les images PL et ECL représentent la région d'intérêt (ROI) typique prise en compte pour les analyses quantitatives des intensités correspondantes (cf. (b)). (b) Évolution des signaux PL (courbe verte), ECL (courbe rouge) et ampérométrique (courbe bleue) obtenus en fonction du temps pour un seul liposome [indiqué en (A)] perméabilisé par polarisation de la surface en ITO. Barre d'échelle : 100 μm . Note : $t = 0 \text{ sec.}$ correspond à l'ajout des liposomes dans la cellule électrochimique..... 145

Figure 85 : (A) Images obtenues en ECL et PL montrant la perméabilisation d'un liposome ayant joué le rôle d'un microréacteur pour la dégradation du glucose par l'enzyme GDH en présence de NAD^+ . Le liposome, qui repose sur une surface en ITO polarisée ($E = + 1.2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$) contient initialement : NAD^+ (10 mM), $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), GDH (80 U/mL), glucose ($0,35 \text{ mol.L}^{-1}$). La réaction enzymatique conduit à la production de NADH qui est utilisé comme co-réactif dans le processus ECL. Les traits blancs en pointillés dans les images PL et ECL représentent la région d'intérêt (ROI) typique prise en compte pour les analyses quantitatives des intensités correspondantes (cf. (B)). (B) Évolution des signaux PL (courbe verte), ECL (courbe rouge) et ampérométrique (courbe bleue) obtenus en fonction du temps pour un seul liposome [indiqué en (A)] perméabilisé par polarisation de la surface en ITO. Barre d'échelle : 100 μm . Note : $t = 0 \text{ sec.}$ correspond à l'ajout des liposomes dans la cellule électrochimique..... 148

Figure 86 : Cellule électrochimique composée par un bloc de PDMS troué et collé sur une lamelle d'ITO (22 mm \times 22 mm \times 0,13 mm), par plasma. 159

Figure 87 : Collage d'un bloc de PDMS sur une lame de verre afin d'obtenir la cellule électrochimique..... 161

Figure 88 : Photo d'un disque de graphène commercial et schéma de sa composition. 162

Figure 89 : Composition des morceaux de graphène après le dépôt de Al_2O_3 162

Figure 90 : Composition des morceaux de graphène après le dépôt du PMMA 163

Figure 91 : Composition des morceaux de graphène après la dissolution du cuivre.....	163
Figure 92 : Graphène déposé sur une lamelle de verre et observé par microscopie optique.	164
Figure 93 : Schéma des étapes de récupération du dispositif microfluidique sur le PDMS..	166
Figure 94 : Dispositif microfluidique collé.....	166
Figure 95 : Eppendorf contenant le système biphasique : une solution de phospholipide (DOPG) dans l'huile minérale et une solution de glucose	170
Figure 96 : Système utilisé pour la fabrication des liposomes : le dispositif microfluidique est inséré dans le système biphasique.	171
Figure 97 : spectrométrie de masse (Maldi-TOF) du peptide pur en mode ion positif réflecteur en utilisant une matrice CHCA à 10 mg/mL in CH ₃ CN/H ₂ O/TFA, 50:50:0.1.	172
Figure 98 : Montage utilisé pendant le couplage	174

Liste des tableaux

Tableau 1: Définitions des différents types de luminescence et exemples de leurs applications.	16
Tableau 2 : Nom du phospholipide selon la nature du résidu.	36
Tableau 3: Différents types de phospholipides.....	37
Tableau 4 : comparaison des densités de courant de pic d'oxydation du complexe du ruthénium (bpyridine) (II) sur différents matériaux d'électrode.....	62
Tableau 5 : Comparaison des densités de courant de pic d'oxydation de la tri- <i>n</i> -propylamine sur différents matériaux d'électrode.	63

Références Bibliographiques

Bibliographie

- [1] P. McCord et A. J. Bard, « Electrogenerated chemiluminescence », *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, vol. 318, n° 1-2, p. 91-99, nov. 1991, doi: 10.1016/0022-0728(91)85296-2.
- [2] R. G. Compton, A. C. Fisher, et R. G. Wellington, « A thin-layer electrode cell for fluorescence. Measurements on electrogenerated intermediates », *Electroanalysis*, vol. 3, n° 1, p. 27-29, janv. 1991, doi: 10.1002/elan.1140030105.
- [3] Christian. Amatore, Bruno. Fosset, K. M. Maness, et R. Mark. Wightman, « Theory of electrochemical luminescence at double band electrodes. An examination of “steady-state” diffusion at ultramicroelectrodes », *Anal. Chem.*, vol. 65, n° 17, p. 2311-2316, sept. 1993, doi: 10.1021/ac00065a024.
- [4] F. Miomandre et P. Audebert, Éd., *Luminescence in Electrochemistry*. Cham: Springer International Publishing, 2017. doi: 10.1007/978-3-319-49137-0.
- [5] R. de Oliveira et al., « Electrochemical quenching of the fluorescence produced by NBD-labelled cell penetrating peptides: A contribution to the study of their internalization in large unilamellar vesicles », *J. Electroanal. Chem.*, vol. 788, p. 225-231, mars 2017, doi: 10.1016/j.jelechem.2017.02.006.
- [6] A. I. Perez Jimenez, L. Challier, E. Aït-Yahiatène, J. Delacotte, E. Labbé, et O. Buriez, « Selective Electrochemical Bleaching of the Outer Leaflet of Fluorescently Labeled Giant Liposomes », *Chem. - Eur. J.*, vol. 23, n° 28, p. 6781-6787, mai 2017, doi: 10.1002/chem.201605786.
- [7] P. Audebert et F. Miomandre, Éd., *Luminescence in Electrochemistry: Applications in Analytical Chemistry, Physics and Biology*, 1st ed. 2017. Cham: Springer International Publishing : Imprint: Springer, 2017. doi: 10.1007/978-3-319-49137-0.
- [8] L. Marcu, « Fluorescence Lifetime Techniques in Medical Applications », *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 40, n° 2, p. 304-331, févr. 2012, doi: 10.1007/s10439-011-0495-y.
- [9] F. Zu et al., « The quenching of the fluorescence of carbon dots: A review on mechanisms and applications », *Microchim. Acta*, vol. 184, no 7, p. 1899-1914, juill. 2017, doi: 10.1007/s00604-017-2318-9
- [10] J. S. Klein, C. Sun, et G. Pratz, « Radioluminescence in biomedicine: physics, applications, and models », *Phys. Med. Biol.*, vol. 64, n° 4, Art. n° 4, févr. 2019, doi: 10.1088/1361-6560/aaf4de.
- [11] G. Remond, « Applications of cathodoluminescence in mineralogy », *J. Lumin.*, vol. 15, n° 2, Art. n° 2, juin 1977, doi: 10.1016/0022-2313(77)90015-1.
- [12] H. Degenhardt, « Principles and applications of electroluminescence », *Sci. Nat.*, vol. 63, n° 12, Art. n° 12, déc. 1976, doi: 10.1007/BF00622787.
- [13] zainab jabarrah, I. Mahdi, et wurood jaafer, « Lumonil Compounds in Criminal Chemistry (A review part I) », *Egypt. J. Chem.*, vol. 0, n° 0, Art. n° 0, avr. 2019, doi: 10.21608/ejchem.2019.9697.1651.
- [14] A. J. Syed et J. C. Anderson, « Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond », *Chem. Soc. Rev.*, vol. 50, n° 9, Art. n° 9, 2021, doi: 10.1039/D0CS01492C.
- [15] Y. Xie et Z. Li, « Triboluminescence: Recalling Interest and New Aspects », *Chem*, vol. 4, n° 5, Art. n° 5, mai 2018, doi: 10.1016/j.chempr.2018.01.001.

- [16] Tandiono, Siew-Wan Ohl, Dave S. W. Ow, Evert Klaseboer, Victor V. Wong, Rainer Dumke, and Claus-Dieter Ohl., « Sonochemistry and sonoluminescence in microfluidics », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no 15, p. 5996-5998, avr. 2011, doi: 10.1073/pnas.1019623108.
- [17] S. St. J. Warne, « Thermoluminescence in the earth sciences and archeology », *J. Therm. Anal.*, vol. 48, n° 1, Art. n° 1, janv. 1997, doi: 10.1007/BF01978964.
- [18] R. T. Dufford, D. Nightingale, et L. W. Gaddum, « Luminescence of grignard compounds in electric and magnetic fields, and related electrical phenomena », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 49, no 8, Art. no 8, août 1927, doi: 10.1021/ja01407a002.
- [19] N. Harvey, « Luminescence during Electrolysis », *J. Phys. Chem.*, vol. 33, n° 10, Art. n° 10, oct. 1929, doi: 10.1021/j150304a002.
- [20] D. M. Hercules, « Chemiluminescence Resulting from Electrochemically Generated Species », *Science*, vol. 145, n° 3634, p. 808-809, août 1964, doi: 10.1126/science.145.3634.808.
- [21] R. E. Visco et E. A. Chandross, « Electroluminescence in Solutions of Aromatic Hydrocarbons », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 86, n° 23, Art. n° 23, déc. 1964, doi: 10.1021/ja01077a073.
- [22] N. E. Tokel et A. J. Bard, « Electrogenerated chemiluminescence. IX. Electrochemistry and emission from systems containing tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) dichloride », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 94, n° 8, Art. n° 8, avr. 1972, doi: 10.1021/ja00763a056.
- [23] M.-M. Chang, T. Saji, et A. J. Bard, « Electrogenerated chemiluminescence. 30. Electrochemical oxidation of oxalate ion in the presence of luminescers in acetonitrile solutions », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 99, n° 16, Art. n° 16, août 1977, doi: 10.1021/ja00458a028.
- [24] J. B. Noffsinger et N. D. Danielson, « Generation of chemiluminescence upon reaction of aliphatic amines with tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(III) », *Anal. Chem.*, vol. 59, n° 6, Art. n° 6, mars 1987, doi: 10.1021/ac00133a017.
- [25] J. K. Leland et M. J. Powell, « Electrogenerated Chemiluminescence: An Oxidative-Reduction Type ECL Reaction Sequence Using Tripropyl Amine », *J. Electrochem. Soc.*, vol. 137, n° 10, Art. n° 10, oct. 1990, doi: 10.1149/1.2086171.
- [26] W. Miao, « Electrogenerated Chemiluminescence and Its Biorelated Applications », *Chem. Rev.*, vol. 108, n° 7, Art. n° 7, juill. 2008, doi: 10.1021/cr068083a.
- [27] L. Bouffier, S. Arbault, A. Kuhn, et N. Sojic, « L'électrochimiluminescence : une méthode de choix pour la bioanalyse », *Innov. Technol.*, mai 2018, doi: 10.51257/a-v1-p156.
- [28] M. M. Richter, « Electrochemiluminescence (ECL) », *Chem. Rev.*, vol. 104, n° 6, Art. n° 6, juin 2004, doi: 10.1021/cr020373d.
- [29] S. P. Forry et R. M. Wightman, « Electrogenerated Chemiluminescence Detection in Reversed-Phase Liquid Chromatography », *Anal. Chem.*, vol. 74, n° 3, Art. n° 3, févr. 2002, doi: 10.1021/ac0110193.
- [30] G. Valenti, A. Fiorani, H. Li, N. Sojic, et F. Paolucci, « Essential Role of Electrode Materials in Electrochemiluminescence Applications », *ChemElectroChem*, vol. 3, n° 12, Art. n° 12, déc. 2016, doi: 10.1002/celec.201600602.
- [31] E. Rampazzo., Bonacchi., Genovese., Juris., Marcaccio., Montalti., Paolucci., Sgarzi., Valenti., Zaccheroni., Prodi « Nanoparticles in metal complexes-based electrogenerated chemiluminescence for highly sensitive applications », *Coord. Chem. Rev.*, vol. 256, no 15-16, Art. no 15-16, août 2012, doi: 10.1016/j.ccr.2012.03.021.

- [32] I. Rubinstein et A. J. Bard, « Electrogenerated chemiluminescence. 37. Aqueous ecl systems based on tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(2+) and oxalate or organic acids », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 103, n° 3, Art. n° 3, févr. 1981, doi: 10.1021/ja00393a006.
- [33] F. Bolletta, A. Rossi, et V. Balzani, « Chemiluminescence on oxidation of tris(2,2'-bipyridine)chromium(II): Chemical generation of a metal centered excited state », *Inorganica Chim. Acta*, vol. 53, p. L23-L24, janv. 1981, doi: 10.1016/S0020-1693(00)84729-5.
- [34] W. Miao, J.-P. Choi, et A. J. Bard, « Electrogenerated Chemiluminescence 69: The Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II), (Ru(bpy)₃²⁺)/Tri-*n*-propylamine (TPrA) System Revisited A New Route Involving TPrA^{•+} Cation Radicals », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, n° 48, Art. n° 48, déc. 2002, doi: 10.1021/ja027532v.
- [35] R. C. Engstrom, K. W. Johnson, et Scott. Desjarlais, « Characterization of electrode heterogeneity with electrogenerated chemiluminescence », *Anal. Chem.*, vol. 59, n° 4, p. 670-673, févr. 1987, doi: 10.1021/ac00131a028.
- [36] T. H. Fereja, F. Du, C. Wang, D. Snizhko, Y. Guan, et G. Xu, « Electrochemiluminescence Imaging Techniques for Analysis and Visualizing », *J. Anal. Test.*, vol. 4, n° 2, Art. n° 2, avr. 2020, doi: 10.1007/s41664-020-00128-x.
- [37] W. Zhan et A. J. Bard, « Electrogenerated Chemiluminescence. 83. Immunoassay of Human C-Reactive Protein by Using Ru(bpy)₃²⁺-Encapsulated Liposomes as Labels », *Anal. Chem.*, vol. 79, n° 2, Art. n° 2, janv. 2007, doi: 10.1021/ac061336f.
- [38] Parick Delmas, Françoise Padilla, et Corinne Poilbout, « Le cholestérol cellulaire, un régulateur important de la douleur inflammatoire », p. 115-118.
- [39] F. R. Maxfield et I. Tabas, « Role of cholesterol and lipid organization in disease », *Nature*, vol. 438, n° 7068, Art. n° 7068, déc. 2005, doi: 10.1038/nature04399.
- [40] G. Ma, J. Zhou, C. Tian, D. Jiang, D. Fang, et H. Chen, « Luminol Electrochemiluminescence for the Analysis of Active Cholesterol at the Plasma Membrane in Single Mammalian Cells », *Anal. Chem.*, vol. 85, n° 8, Art. n° 8, avr. 2013, doi: 10.1021/ac303304r.
- [41] N. P. Sardesai, J. C. Barron, et J. F. Rusling, « Carbon Nanotube Microwell Array for Sensitive Electrochemiluminescent Detection of Cancer Biomarker Proteins », *Anal. Chem.*, vol. 83, n° 17, Art. n° 17, sept. 2011, doi: 10.1021/ac201292q.
- [42] J. Zhang, S. Arbault, N. Sojic, et D. Jiang, « Electrochemiluminescence Imaging for Bioanalysis », *Annu. Rev. Anal. Chem.*, vol. 12, n° 1, p. 275-295, juin 2019, doi: 10.1146/annurev-anchem-061318-115226.
- [43] Y.-L. Chang, R. E. Palacios, F.-R. F. Fan, A. J. Bard, et P. F. Barbara, « Electrogenerated Chemiluminescence of Single Conjugated Polymer Nanoparticles », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, n° 28, p. 8906-8907, juill. 2008, doi: 10.1021/ja803454x.
- [44] A. J. Wilson, K. Marchuk, et K. A. Willets, « Imaging Electrogenerated Chemiluminescence at Single Gold Nanowire Electrodes », *Nano Lett.*, vol. 15, n° 9, Art. n° 9, sept. 2015, doi: 10.1021/acs.nanolett.5b02383.
- [45] J. Xu, P. Huang, Y. Qin, D. Jiang, et H. Chen, « Analysis of Intracellular Glucose at Single Cells Using Electrochemiluminescence Imaging », *Anal. Chem.*, vol. 88, n° 9, Art. n° 9, mai 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.6b01073.
- [46] G. Valenti., Scarabino., Goudeau., Lesch., Jović., Villani., Sentic., Rapino., Arbault., Paolucci., Sojic., « Single Cell Electrochemiluminescence Imaging: From the Proof-of-Concept to Disposable Device-Based Analysis », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 139, no 46, p. 16830-16837, nov. 2017, doi: 10.1021/jacs.7b09260.

- [47] H. Ding, W. Guo, et B. Su, « Imaging Cell-Matrix Adhesions and Collective Migration of Living Cells by Electrochemiluminescence Microscopy », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 59, n° 1, p. 449-456, janv. 2020, doi: 10.1002/anie.201911190.
- [48] Y. Ma, C. Colin, J. Descamps, S. Arbault, et N. Sojic, « Shadow Electrochemiluminescence Microscopy of Single Mitochondria », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 60, n° 34, p. 18742-18749, août 2021, doi: 10.1002/anie.202105867.
- [49] A. Gonzalez Gomez et Z. Hosseinidoust, « Liposomes for Antibiotic Encapsulation and Delivery », *ACS Infect. Dis.*, vol. 6, n° 5, Art. n° 5, mai 2020, doi: 10.1021/acsinfecdis.9b00357.
- [50] G. Hussein, Y. Abbas, et N. Awad, « The Potential of Ultrasound Technology and Chemotherapy Carriers in Breast Cancer Treatment », *Al Qasimi Found.*, mai 2018, doi: 10.18502/aqf.0059.
- [51] A. D. Bangham, M. M. Standish, et J. C. Watkins, « Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids », *J. Mol. Biol.*, vol. 13, n° 1, Art. n° 1, août 1965, doi: 10.1016/S0022-2836(65)80093-6.
- [52] Carine Sebaaly, « Préparation à petite et grande échelle des liposomes encapsulant l'huile essentielle de clou de girofle libre et sous forme de complexe d'inclusion dans l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine : caractérisation des nanostructures et évaluation de leur effet antioxydant », 2016. [En ligne]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01359588/document>
- [53] H. Pick, A. C. Alves, et H. Vogel, « Single-Vesicle Assays Using Liposomes and Cell-Derived Vesicles: From Modeling Complex Membrane Processes to Synthetic Biology and Biomedical Applications », *Chem. Rev.*, vol. 118, n° 18, Art. n° 18, sept. 2018, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00777.
- [54] T. M. Allen et P. R. Cullis, « Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, n° 1, Art. n° 1, janv. 2013, doi: 10.1016/j.addr.2012.09.037.
- [55] M. Reza Mozafari, C. Johnson, S. Hatziantoniou, et C. Demetzos, « Nanoliposomes and Their Applications in Food Nanotechnology », *J. Liposome Res.*, vol. 18, n° 4, Art. n° 4, janv. 2008, doi: 10.1080/08982100802465941.
- [56] T. M. Taylor, J. Weiss, P. M. Davidson, et B. D. Bruce, « Liposomal Nanocapsules in Food Science and Agriculture », *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 45, n° 7-8, Art. n° 7-8, oct. 2005, doi: 10.1080/10408390591001135.
- [57] Q. Liu et B. J. Boyd, « Liposomes in biosensors », *The Analyst*, vol. 138, n° 2, Art. n° 2, 2013, doi: 10.1039/C2AN36140J.
- [58] P. Walde et S. Ichikawa, « Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications », *Biomol. Eng.*, vol. 18, n° 4, Art. n° 4, oct. 2001, doi: 10.1016/S1389-0344(01)00088-0.
- [59] M. Yoshimoto, Y. Miyazaki, M. Sato, K. Fukunaga, R. Kuboi, et K. Nakao, « Mechanism for High Stability of Liposomal Glucose Oxidase to Inhibitor Hydrogen Peroxide Produced in Prolonged Glucose Oxidation », *Bioconjug. Chem.*, vol. 15, n° 5, Art. n° 5, sept. 2004, doi: 10.1021/bc049909n.
- [60] Kant Shashi, Kumar Satinder, et Prashar Bharat, « A complete review on : liposomes », *International Research Journal of Pharmacy*, vol. 3, no 7, Art. no 7, 2012. ISSN 2230 – 8407
- [61] « Components and Structure - Biology - OpenStax CNX.html » publié à <https://cnx.org>. at <https://github.com/cnx-user-books/derived-from-osbooks-biology-bundle>

- [62] « Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes - Google Livres.htm ». Editeurs Neale D. Ridgway et Roger S. McLeo <https://doi.org/10.1016/C2013-0-18457-7>
- [63] « Manual on Membrane Lipids - Rajendra Prasad - Google Livres.htm ».
- [64] G. Gregoriadis et Y. Perrie, « Liposomes », in *eLS*, 1^{re} éd., John Wiley & Sons, Ltd, Éd. Wiley, 2010. doi: 10.1002/9780470015902.a0002656.pub2.
- [65] A. Jash, A. Ubeyitogullari, et S. S. H. Rizvi, « Liposomes for oral delivery of protein and peptide-based therapeutics: challenges, formulation strategies, and advances », *J. Mater. Chem. B*, vol. 9, n° 24, p. 4773-4792, 2021, doi: 10.1039/D1TB00126D.
- [66] H. A. H. Rongen, A. Bult, et W. P. van Bennekom, « Liposomes and immunoassays », *J. Immunol. Methods*, vol. 204, n° 2, Art. n° 2, mai 1997, doi: 10.1016/S0022-1759(97)00041-0.
- [67] M. I. Angelova et D. S. Dimitrov, « Liposome Electroformation », p. 13.
- [68] A.-M. Cazabat *et al.*, « Dépôt de matière et formation de motifs sur une surface solide : Méthodes microfluidiques, Contrôle par forces capillaires et Génération de vésicules géantes », p. 250.
- [69] S. Pautot, B. J. Frisken, et D. A. Weitz, « Engineering asymmetric vesicles », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, n° 19, p. 10718-10721, sept. 2003, doi: 10.1073/pnas.1931005100.
- [70] Y. Elani *et al.*, « Measurements of the effect of membrane asymmetry on the mechanical properties of lipid bilayers », *Chem. Commun.*, vol. 51, no 32, Art. no 32, 2015, doi: 10.1039/C5CC00712G.
- [71] G. H. Bobo, « L' utilisation des liposomes comme vecteurs médicamenteux », p. 61.
- [72] V. P. Torchilin, « Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers », *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 4, n° 2, Art. n° 2, févr. 2005, doi: 10.1038/nrd1632.
- [73] « Vectorisation de médicaments __ Onconano.html ».
- [74] J. Zimmerberg et M. M. Kozlov, « How proteins produce cellular membrane curvature », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 7, n° 1, p. 9-19, janv. 2006, doi: 10.1038/nrm1784.
- [75] E. Karatekin, O. Sandre, et F. Brochard-Wyart, « Transient pores in vesicles », *Polym. Int.*, vol. 52, n° 4, p. 486-493, avr. 2003, doi: 10.1002/pi.1007.
- [76] D. Lasic, « Novel applications of liposomes », *Trends Biotechnol.*, vol. 16, n° 7, Art. n° 7, juill. 1998, doi: 10.1016/S0167-7799(98)01220-7.
- [77] A. Lorin, C. Flore, A. Thomas, et R. Bresseur, « Les liposomes : description, fabrication et applications », p. 14.
- [78] « encapsulation des enzymes.html ».
- [79] W. Cheng et R. G. Compton, « Investigation of Single-Drug-Encapsulating Liposomes using the Nano-Impact Method », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 53, n° 50, Art. n° 50, déc. 2014, doi: 10.1002/anie.201408934.
- [80] J. Dunevall, H. Fathali, N. Najafinobar, J. Lovric, J. Wigstrom, A. S. Cans, and A. G. Ewing, « Characterizing the Catecholamine Content of Single Mammalian Vesicles by Collision-Adsorption Events at an Electrode », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 137, n° 13, p. 4344-4346, avr. 2015, doi: 10.1021/ja512972f.
- [81] X. Li, J. Dunevall, L. Ren, et A. G. Ewing, « Mechanistic Aspects of Vesicle Opening during Analysis with Vesicle Impact Electrochemical Cytometry », *Anal. Chem.*, vol. 89, n° 17, Art. n° 17, sept. 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.7b02226.
- [82] E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, et P. H. Hofschneider, « Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. », *EMBO J.*, vol. 1, n° 7, p. 841-845, juill. 1982, doi: 10.1002/j.1460-2075.1982.tb01257.x.
- [83] « Intermolecular and Surface Forces - Jacob N. Israelachvili - Google Livres.txt ».

- [84] B. Redfera et G. Nortoia, « resole type phenol formaldehyde resin ratio 1:1.2, sodium hydroxide catalysed having a viscosity at 25° C. of 20 poises, was cured in a glass mould for 24 hours at 90° C. », p. 3.
- [85] X. Wang *et al.*, « Fabrication of Ultralong and Electrically Uniform Single-Walled Carbon Nanotubes on Clean Substrates », *Nano Lett.*, vol. 9, n° 9, Art. n° 9, sept. 2009, doi: 10.1021/nl901260b.
- [86] X. Zhao, Y. Liu, S. Inoue, T. Suzuki, R. O. Jones, et Y. Ando, « Smallest Carbon Nanotube Is 3 Å in Diameter », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 92, n° 12, Art. n° 12, mars 2004, doi: 10.1103/PhysRevLett.92.125502.
- [87] W. Weibull, « A Statistical Distribution Function of Wide Applicability », *J. Appl. Mech.*, vol. 18, n° 3, p. 293-297, sept. 1951, doi: 10.1115/1.4010337.
- [88] C. Amatore, S. Arbault, M. Guille, et F. Lemaître, « Electrochemical Monitoring of Single Cell Secretion: Vesicular Exocytosis and Oxidative Stress », *Chem. Rev.*, vol. 108, n° 7, p. 2585-2621, juill. 2008, doi: 10.1021/cr068062g.
- [89] D. J. Walls, S. J. Haward, A. Q. Shen, et G. G. Fuller, « Spreading of miscible liquids », *Phys. Rev. Fluids*, vol. 1, n° 1, Art. n° 1, mai 2016, doi: 10.1103/PhysRevFluids.1.013904.
- [90] L. Xu, Y. Li, S. Wu, X. Liu, et B. Su, « Imaging Latent Fingerprints by Electrochemiluminescence », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 51, n° 32, p. 8068-8072, août 2012, doi: 10.1002/anie.201203815.
- [91] A. Zanut *et al.*, « Insights into the mechanism of coreactant electrochemiluminescence facilitating enhanced bioanalytical performance », *Nat. Commun.*, vol. 11, n° 1, p. 2668, mai 2020, doi: 10.1038/s41467-020-16476-2.
- [92] F. Li, Y. Yu, Q. Li, M. Zhou, et H. Cui, « A Homogeneous Signal-On Strategy for the Detection of *rpoB* Genes of Mycobacterium tuberculosis Based on Electrochemiluminescent Graphene Oxide and Ferrocene Quenching », *Anal. Chem.*, vol. 86, n° 3, p. 1608-1613, févr. 2014, doi: 10.1021/ac403281g.
- [93] L. Hu, M. Lei, J. Zhang, et Y. Dong, « An “off-on-off” mode ECL sensor for drug detection based on the host-guest interaction of cucurbit[7]uril », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 344, p. 130328, oct. 2021, doi: 10.1016/j.snb.2021.130328.
- [94] W. Cao, J. P. Ferrance, J. Demas, et J. P. Landers, « Quenching of the Electrochemiluminescence of Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) by Ferrocene and Its Potential Application to Quantitative DNA Detection », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, n° 23, p. 7572-7578, juin 2006, doi: 10.1021/ja060162g.
- [95] T. Wang, S. Fan, R. Erdmann, et C. Shannon, « Detection of Ferrocenemethanol and Molecular Oxygen Based on Electrogenenerated Chemiluminescence Quenching at a Bipolar Electrode », *Langmuir*, vol. 29, n° 51, p. 16040-16044, déc. 2013, doi: 10.1021/la4037698.
- [96] F. G. Avci, B. S. Akbulut, et E. Ozkirimli, « Membrane Active Peptides and Their Biophysical Characterization », *Biomolecules*, vol. 8, n° 3, p. 77, août 2018, doi: 10.3390/biom8030077.
- [97] A. D. Frankel et C. O. Pabo, « Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus », *Cell*, vol. 55, n° 6, p. 1189-1193, déc. 1988, doi: 10.1016/0092-8674(88)90263-2.
- [98] M. Green et P. M. Loewenstein, « Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein », *Cell*, vol. 55, n° 6, p. 1179-1188, déc. 1988, doi: 10.1016/0092-8674(88)90262-0.

- [99] A. Joliot, C. Pernelle, H. Deagostini-Bazin, et A. Prochiantz, « Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 88, n° 5, p. 1864-1868, mars 1991, doi: 10.1073/pnas.88.5.1864.
- [100] D. Derossi, S. Calvet, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassaing, et A. Prochiantz, « Cell Internalization of the Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Is Receptor-independent », *J. Biol. Chem.*, vol. 271, n° 30, p. 18188-18193, juill. 1996, doi: 10.1074/jbc.271.30.18188.
- [101] E. Vivès, P. Brodin, et B. Lebleu, « A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus », *J. Biol. Chem.*, vol. 272, n° 25, p. 16010-16017, juin 1997, doi: 10.1074/jbc.272.25.16010.
- [102] S. M. Farkhani, A. Valizadeh, H. Karami, S. Mohammadi, N. Sohrabi, et F. Badrzadeh, « Cell penetrating peptides: Efficient vectors for delivery of nanoparticles, nanocarriers, therapeutic and diagnostic molecules », *Peptides*, vol. 57, p. 78-94, juill. 2014, doi: 10.1016/j.peptides.2014.04.015.
- [103] F. Wang, Y. Wang, X. Zhang, W. Zhang, S. Guo, et F. Jin, « Recent progress of cell-penetrating peptides as new carriers for intracellular cargo delivery », *J. Controlled Release*, vol. 174, p. 126-136, janv. 2014, doi: 10.1016/j.jconrel.2013.11.020.
- [104] Y. Liu *et al.*, « Dual Receptor Recognizing Cell Penetrating Peptide for Selective Targeting, Efficient Intratumoral Diffusion and Synthesized Anti-Glioma Therapy », *Theranostics*, vol. 6, n° 2, p. 177-191, 2016, doi: 10.7150/thno.13532.
- [105] J. Hoyer et I. Neundorff, « Peptide Vectors for the Nonviral Delivery of Nucleic Acids », *Acc. Chem. Res.*, vol. 45, n° 7, p. 1048-1056, juill. 2012, doi: 10.1021/ar2002304.
- [106] M. Zasloff, « Antimicrobial peptides of multicellular organisms », *Nature*, vol. 415, n° 6870, p. 389-395, janv. 2002, doi: 10.1038/415389a.
- [107] N. Mookherjee, M. A. Anderson, H. P. Haagsman, et D. J. Davidson, « Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential », *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 19, n° 5, p. 311-332, mai 2020, doi: 10.1038/s41573-019-0058-8.
- [108] M. Magana *et al.*, « The value of antimicrobial peptides in the age of resistance », *Lancet Infect. Dis.*, vol. 20, n° 9, p. e216-e230, sept. 2020, doi: 10.1016/S1473-3099(20)30327-3.
- [109] B. H. Gan, J. Gaynord, S. M. Rowe, T. Deingruber, et D. R. Spring, « The multifaceted nature of antimicrobial peptides: current synthetic chemistry approaches and future directions », *Chem. Soc. Rev.*, vol. 50, n° 13, p. 7820-7880, 2021, doi: 10.1039/D0CS00729C.
- [110] Q.-Y. Zhang *et al.*, « Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential », *Mil. Med. Res.*, vol. 8, n° 1, p. 48, déc. 2021, doi: 10.1186/s40779-021-00343-2.
- [111] Z. Oren et Y. Shai, « Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides », *Biopolymers*, vol. 47, n° 6, p. 451-463, 1998, doi: 10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:6<451::AID-BIP4>3.0.CO;2-F.
- [112] M. R. Yeaman et N. Y. Yount, « Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance », *Pharmacol. Rev.*, vol. 55, n° 1, p. 27-55, mars 2003, doi: 10.1124/pr.55.1.2.
- [113] Y. Shai, « Mode of action of membrane active antimicrobial peptides », *Biopolymers*, vol. 66, n° 4, p. 236-248, 2002, doi: 10.1002/bip.10260.
- [114] M. Pushpanathan, P. Gunasekaran, et J. Rajendhran, « Antimicrobial Peptides: Versatile Biological Properties », *Int. J. Pept.*, vol. 2013, p. 1-15, juin 2013, doi: 10.1155/2013/675391.
- [115] K. A. Brogden, « Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? », *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 3, n° 3, p. 238-250, mars 2005, doi: 10.1038/nrmicro1098.

- [116] T.-H. Lee, K. N. Hall, et M.-I. Aguilar, « Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure », *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 16, n° 1, p. 25-39, sept. 2015, doi: 10.2174/1568026615666150703121700.
- [117] G. Ehrenstein et H. Lecar, « Electrically gated ionic channels in lipid bilayers », *Q. Rev. Biophys.*, vol. 10, n° 1, p. 1-34, févr. 1977, doi: 10.1017/S0033583500000123.
- [118] F.-Y. Chen, M.-T. Lee, et H. W. Huang, « Evidence for Membrane Thinning Effect as the Mechanism for Peptide-Induced Pore Formation », *Biophys. J.*, vol. 84, n° 6, p. 3751-3758, juin 2003, doi: 10.1016/S0006-3495(03)75103-0.
- [119] M. S. P. Sansom, « Alamethicin and related peptaibols? model ion channels », *Eur. Biophys. J.*, vol. 22, n° 2, juin 1993, doi: 10.1007/BF00196915.
- [120] K. He, S. J. Ludtke, D. L. Worcester, et H. W. Huang, « Neutron scattering in the plane of membranes: structure of alamethicin pores », *Biophys. J.*, vol. 70, n° 6, p. 2659-2666, juin 1996, doi: 10.1016/S0006-3495(96)79835-1.
- [121] C. Song *et al.*, « Crystal structure and functional mechanism of a human antimicrobial membrane channel », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, n° 12, p. 4586-4591, mars 2013, doi: 10.1073/pnas.1214739110.
- [122] Y. Pouny, D. Rapaport, A. Mor, P. Nicolas, et Y. Shai, « Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogs with phospholipid membranes », *Biochemistry*, vol. 31, n° 49, p. 12416-12423, déc. 1992, doi: 10.1021/bi00164a017.
- [123] E. Gazit, I. R. Miller, P. C. Biggin, M. S. P. Sansom, et Y. Shai, « Structure and Orientation of the Mammalian Antibacterial Peptide Cecropin P1 within Phospholipid Membranes », *J. Mol. Biol.*, vol. 258, n° 5, p. 860-870, mai 1996, doi: 10.1006/jmbi.1996.0293.
- [124] N. Sitaram et R. Nagaraj, « Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1462, n° 1-2, p. 29-54, déc. 1999, doi: 10.1016/S0005-2736(99)00199-6.
- [125] D. I. Fernandez, A. P. Le Brun, T. C. Whitwell, M.-A. Sani, M. James, et F. Separovic, « The antimicrobial peptide aurein 1.2 disrupts model membranes via the carpet mechanism », *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 14, n° 45, p. 15739, 2012, doi: 10.1039/c2cp43099a.
- [126] Y. Shai et Z. Oren, « From "carpet" mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides », *Peptides*, vol. 22, n° 10, p. 1629-1641, oct. 2001, doi: 10.1016/S0196-9781(01)00498-3.
- [127] K. Matsuzaki, « Membrane Permeabilization Mechanisms », in *Antimicrobial Peptides*, vol. 1117, K. Matsuzaki, Éd. Singapore: Springer Singapore, 2019, p. 9-16. doi: 10.1007/978-981-13-3588-4_2.
- [128] K. Matsuzaki *et al.*, « Relationship of Membrane Curvature to the Formation of Pores by Magainin 2 », *Biochemistry*, vol. 37, n° 34, p. 11856-11863, août 1998, doi: 10.1021/bi980539y.
- [129] L. Yang, T. A. Harroun, T. M. Weiss, L. Ding, et H. W. Huang, « Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores », *Biophys. J.*, vol. 81, n° 3, p. 1475-1485, sept. 2001, doi: 10.1016/S0006-3495(01)75802-X.
- [130] T. Hara *et al.*, « Effects of peptide dimerization on pore formation: Antiparallel disulfide-dimerized magainin 2 analogue », *Biopolymers*, vol. 58, n° 4, p. 437-446, avr. 2001, doi: 10.1002/1097-0282(20010405)58:4<437::AID-BIP1019>3.0.CO;2-I.
- [131] H. Jensen, P. Hamill, et R. E. W. Hancock, « Peptide Antimicrobial Agents », *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 19, n° 3, p. 491-511, juill. 2006, doi: 10.1128/CMR.00056-05.

- [132] K. Matsuzaki, « Why and how are peptide–lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1462, n° 1-2, p. 1-10, déc. 1999, doi: 10.1016/S0005-2736(99)00197-2.
- [133] S. J. Ludtke, K. He, W. T. Heller, T. A. Harroun, L. Yang, et H. W. Huang, « Membrane Pores Induced by Magainin », *Biochemistry*, vol. 35, n° 43, p. 13723-13728, janv. 1996, doi: 10.1021/bi9620621.
- [134] K. Murzyn et M. Pasenkiewicz-Gierula, « Construction of a toroidal model for the magainin pore », *J. Mol. Model.*, vol. 9, n° 4, p. 217-224, août 2003, doi: 10.1007/s00894-003-0127-z.
- [135] H. Leontiadou, A. E. Mark, et S. J. Marrink, « Antimicrobial Peptides in Action », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, n° 37, p. 12156-12161, sept. 2006, doi: 10.1021/ja062927q.
- [136] M.-T. Lee, F.-Y. Chen, et H. W. Huang, « Energetics of Pore Formation Induced by Membrane Active Peptides », *Biochemistry*, vol. 43, n° 12, p. 3590-3599, mars 2004, doi: 10.1021/bi036153r.
- [137] A. S. Ladokhin, M. E. Selsted, et S. H. White, « Sizing membrane pores in lipid vesicles by leakage of co-encapsulated markers: pore formation by melittin », *Biophys. J.*, vol. 72, n° 4, p. 1762-1766, avr. 1997, doi: 10.1016/S0006-3495(97)78822-2.
- [138] K. Matsuzaki, S. Yoneyama, et K. Miyajima, « Pore formation and translocation of melittin », *Biophys. J.*, vol. 73, n° 2, p. 831-838, août 1997, doi: 10.1016/S0006-3495(97)78115-3.
- [139] K. Matsuzaki, O. Murase, et K. Miyajima, « Kinetics of Pore Formation by an Antimicrobial Peptide, Magainin 2, in Phospholipid Bilayers », *Biochemistry*, vol. 34, n° 39, p. 12553-12559, oct. 1995, doi: 10.1021/bi00039a009.
- [140] F. M. Menger et J. S. Keiper, « Chemistry and physics of giant vesicles as biomembrane models », *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 2, n° 6, p. 726-732, janv. 1998, doi: 10.1016/S1367-5931(98)80110-5.
- [141] H.-G. Döbereiner, « Properties of giant vesicles », *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 5, n° 3-4, p. 256-263, juill. 2000, doi: 10.1016/S1359-0294(00)00064-9.
- [142] P. Messina *et al.*, « Monitoring and Quantifying the Passive Transport of Molecules Through Patch-Clamp Suspended Real and Model Cell Membranes », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 53, n° 12, p. 3192-3196, mars 2014, doi: 10.1002/anie.201308990.
- [143] A. I. Perez Jimenez, L. Challier, E. Aït-Yahiatène, J. Delacotte, E. Labbé, et O. Buriez, « Selective Electrochemical Bleaching of the Outer Leaflet of Fluorescently Labeled Giant Liposomes », *Chem. - Eur. J.*, vol. 23, n° 28, p. 6781-6787, mai 2017, doi: 10.1002/chem.201605786.
- [144] E. E. Ambroggio, F. Separovic, J. H. Bowie, G. D. Fidelio, et L. A. Bagatolli, « Direct Visualization of Membrane Leakage Induced by the Antibiotic Peptides: Maculatin, Citropin, and Aurein », *Biophys. J.*, vol. 89, n° 3, p. 1874-1881, sept. 2005, doi: 10.1529/biophysj.105.066589.
- [145] A. Mishra *et al.*, « Translocation of HIV TAT peptide and analogues induced by multiplexed membrane and cytoskeletal interactions », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, n° 41, p. 16883-16888, oct. 2011, doi: 10.1073/pnas.1108795108.
- [146] S. A. Wheaten, F. D. O. Ablan, B. L. Spaller, J. M. Trieu, et P. F. Almeida, « Translocation of Cationic Amphipathic Peptides across the Membranes of Pure Phospholipid Giant Vesicles », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, n° 44, p. 16517-16525, nov. 2013, doi: 10.1021/ja407451c.

- [147] P. Schön, A. J. García-Sáez, P. Malovrh, K. Bacia, G. Anderluh, et P. Schwille, « Equinatoxin II Permeabilizing Activity Depends on the Presence of Sphingomyelin and Lipid Phase Coexistence », *Biophys. J.*, vol. 95, n° 2, p. 691-698, juill. 2008, doi: 10.1529/biophysj.108.129981.
- [148] B. Apellániz, J. L. Nieva, P. Schwille, et A. J. García-Sáez, « All-or-None versus Graded: Single-Vesicle Analysis Reveals Lipid Composition Effects on Membrane Permeabilization », *Biophys. J.*, vol. 99, n° 11, p. 3619-3628, déc. 2010, doi: 10.1016/j.bpj.2010.09.027.
- [149] J. Md. Alam, T. Kobayashi, et M. Yamazaki, « The Single-Giant Unilamellar Vesicle Method Reveals Lysenin-Induced Pore Formation in Lipid Membranes Containing Sphingomyelin », *Biochemistry*, vol. 51, n° 25, p. 5160-5172, juin 2012, doi: 10.1021/bi300448g.
- [150] Md. Z. Islam, J. Md. Alam, Y. Tamba, M. A. S. Karal, et M. Yamazaki, « The single GUV method for revealing the functions of antimicrobial, pore-forming toxin, and cell-penetrating peptides or proteins », *Phys Chem Chem Phys*, vol. 16, n° 30, p. 15752-15767, 2014, doi: 10.1039/C4CP00717D.
- [151] Y. Tamba et M. Yamazaki, « Single Giant Unilamellar Vesicle Method Reveals Effect of Antimicrobial Peptide Magainin 2 on Membrane Permeability », *Biochemistry*, vol. 44, n° 48, p. 15823-15833, déc. 2005, doi: 10.1021/bi051684w.
- [152] Md. Z. Islam, S. Sharmin, V. Levadnyy, S. U. Alam Shibly, et M. Yamazaki, « Effects of Mechanical Properties of Lipid Bilayers on the Entry of Cell-Penetrating Peptides into Single Vesicles », *Langmuir*, vol. 33, n° 9, p. 2433-2443, mars 2017, doi: 10.1021/acs.langmuir.6b03111.
- [153] M.-T. Lee, T.-L. Sun, W.-C. Hung, et H. W. Huang, « Process of Inducing Pores in Membranes by Melittin », *Biophys. J.*, vol. 106, n° 2, p. 293a, janv. 2014, doi: 10.1016/j.bpj.2013.11.1710.
- [154] J. Liu, S. Xiao, J. Li, B. Yuan, K. Yang, et Y. Ma, « Molecular details on the intermediate states of melittin action on a cell membrane », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1860, n° 11, p. 2234-2241, nov. 2018, doi: 10.1016/j.bbamem.2018.09.007.
- [155] S. Sun., Xia., Liu., Dou., Yang., Yuan., Kang., « Real-time monitoring the interfacial dynamic processes at model cell membranes: Taking cell penetrating peptide TAT as an example », *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 609, p. 707-717, mars 2022, doi: 10.1016/j.jcis.2021.11.076.
- [156] H. W. Huang, « Action of Antimicrobial Peptides: Two-State Model », *Biochemistry*, vol. 39, n° 29, p. 8347-8352, juill. 2000, doi: 10.1021/bi000946l.
- [157] C.-C. Lee, Y. Sun, S. Qian, et H. W. Huang, « Transmembrane Pores Formed by Human Antimicrobial Peptide LL-37 », *Biophys. J.*, vol. 100, n° 7, p. 1688-1696, avr. 2011, doi: 10.1016/j.bpj.2011.02.018.
- [158] M.-T. Lee, W.-C. Hung, F.-Y. Chen, et H. W. Huang, « Mechanism and kinetics of pore formation in membranes by water-soluble amphipathic peptides », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, n° 13, p. 5087-5092, avr. 2008, doi: 10.1073/pnas.0710625105.
- [159] Md. Moniruzzaman, J. Md. Alam, H. Dohra, et M. Yamazaki, « Antimicrobial Peptide Lactoferricin B-Induced Rapid Leakage of Internal Contents from Single Giant Unilamellar Vesicles », *Biochemistry*, vol. 54, n° 38, p. 5802-5814, sept. 2015, doi: 10.1021/acs.biochem.5b00594.

- [160] S. Guha *et al.*, « Applications and evolution of melittin, the quintessential membrane active peptide », *Biochem. Pharmacol.*, vol. 193, p. 114769, nov. 2021, doi: 10.1016/j.bcp.2021.114769.
- [161] J. Zhou, C. Wan, J. Cheng, H. Huang, J. F. Lovell, et H. Jin, « Delivery Strategies for Melittin-Based Cancer Therapy », *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 13, n° 15, p. 17158-17173, avr. 2021, doi: 10.1021/acsami.1c03640.
- [162] A. Wang, Y. Zheng, W. Zhu, L. Yang, Y. Yang, et J. Peng, « Melittin-Based Nano-Delivery Systems for Cancer Therapy », *Biomolecules*, vol. 12, n° 1, p. 118, janv. 2022, doi: 10.3390/biom12010118.
- [163] W. C. Wimley et K. Hristova, « The Mechanism of Membrane Permeabilization by Peptides: Still an Enigma », *Aust. J. Chem.*, vol. 73, n° 3, p. 96, 2020, doi: 10.1071/CH19449.
- [164] W. C. Wimley, « How Does Melittin Permeabilize Membranes? », *Biophys. J.*, vol. 114, n° 2, p. 251-253, janv. 2018, doi: 10.1016/j.bpj.2017.11.3738.
- [165] S. Frey et L. K. Tamm, « Orientation of melittin in phospholipid bilayers. A polarized attenuated total reflection infrared study », *Biophys. J.*, vol. 60, n° 4, p. 922-930, oct. 1991, doi: 10.1016/S0006-3495(91)82126-9.
- [166] K. Hristova, C. E. Dempsey, et S. H. White, « Structure, Location, and Lipid Perturbations of Melittin at the Membrane Interface », *Biophys. J.*, vol. 80, n° 2, p. 801-811, févr. 2001, doi: 10.1016/S0006-3495(01)76059-6.
- [167] G. Wiedman, K. Herman, P. Searson, W. C. Wimley, et K. Hristova, « The electrical response of bilayers to the bee venom toxin melittin: Evidence for transient bilayer permeabilization », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1828, n° 5, p. 1357-1364, mai 2013, doi: 10.1016/j.bbamem.2013.01.021.
- [168] A. S. Ladokhin, W. C. Wimley, et S. H. White, « Leakage of membrane vesicle contents: determination of mechanism using fluorescence reequenching », *Biophys. J.*, vol. 69, n° 5, p. 1964-1971, nov. 1995, doi: 10.1016/S0006-3495(95)80066-4.
- [169] « Mélittine, Principal Composant Actif De L'apitoxine (venin D'abeille). Structure 3d ». https://img.freepik.com/photos-premium/melittine-principal-composant-actif-apitoxine-venin-abeille-structure-3d_261932-5307.jpg?w=1380
- [170] G. Guidotti, L. Brambilla, et D. Rossi, « Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics », *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 38, n° 4, p. 406-424, avr. 2017, doi: 10.1016/j.tips.2017.01.003.
- [171] C. Bechara et S. Sagan, « Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? », *FEBS Lett.*, vol. 587, n° 12, p. 1693-1702, juin 2013, doi: 10.1016/j.febslet.2013.04.031.
- [172] F. Ben Trad *et al.*, « Dynamic Electrochemiluminescence Imaging of Single Giant Liposome Opening at Polarized Electrodes », *Anal. Chem.*, vol. 94, n° 3, p. 1686-1696, janv. 2022, doi: 10.1021/acs.analchem.1c04238.
- [173] K. Splith et I. Neundorff, « Antimicrobial peptides with cell-penetrating peptide properties and vice versa », *Eur. Biophys. J.*, vol. 40, n° 4, p. 387-397, avr. 2011, doi: 10.1007/s00249-011-0682-7.
- [174] Y. Yuan, S. Han, L. Hu, S. Parveen, et G. Xu, « Coreactants of tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) Electrogenenerated Chemiluminescence », *Electrochimica Acta*, vol. 82, p. 484-492, nov. 2012, doi: 10.1016/j.electacta.2012.03.156.
- [175] A. Mayevsky et E. Barbiro-Michaely, « Use of NADH fluorescence to determine mitochondrial function in vivo », *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 41, n° 10, p. 1977-1988, oct. 2009, doi: 10.1016/j.biocel.2009.03.012.

- [176] X. Chen, B. Su, X. Song, Q. Chen, X. Chen, et X. Wang, « Recent advances in electrochemiluminescent enzyme biosensors », *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 30, n° 5, p. 665-676, mai 2011, doi: 10.1016/j.trac.2010.12.004.
- [177] T. S. Blacker *et al.*, « Separating NADH and NADPH fluorescence in live cells and tissues using FLIM », *Nat. Commun.*, vol. 5, n° 1, p. 3936, sept. 2014, doi: 10.1038/ncomms4936.
- [178] T. C. Selig, K. A. Drozda, et J. A. Evans, « Detection of ATP and NADH: A bioluminescent experience », *J. Chem. Educ.*, vol. 61, n° 10, p. 918, oct. 1984, doi: 10.1021/ed061p918.
- [179] M. Musameh, J. Wang, A. Merkoci, et Y. Lin, « Low-potential stable NADH detection at carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes », *Electrochem. Commun.*, vol. 4, n° 10, p. 743-746, oct. 2002, doi: 10.1016/S1388-2481(02)00451-4.
- [180] S. Kumar et S.-M. Chen, « Electroanalysis of NADH Using Conducting and Redox Active Polymer/Carbon Nanotubes Modified Electrodes-A Review », *Sensors*, vol. 8, n° 2, p. 739-766, janv. 2008, doi: 10.3390/s8020739.
- [181] M. Milutinovic, S. Sallard, D. Manojlovic, N. Mano, et N. Sojic, « Glucose sensing by electrogenerated chemiluminescence of glucose-dehydrogenase produced NADH on electrodeposited redox hydrogel », *Bioelectrochemistry*, vol. 82, n° 1, p. 63-68, août 2011, doi: 10.1016/j.bioelechem.2011.05.005.
- [182] A. Devadoss, L. Dennany, C. Dickinson, T. E. Keyes, et R. J. Forster, « Highly sensitive detection of NADH using electrochemiluminescent nanocomposites », *Electrochem. Commun.*, vol. 19, p. 43-45, juin 2012, doi: 10.1016/j.elecom.2012.03.003.
- [183] M. Michel *et al.*, « Giant Liposome Microreactors for Controlled Production of Calcium Phosphate Crystals », *Langmuir*, vol. 20, n° 15, p. 6127-6133, juill. 2004, doi: 10.1021/la049862u.
- [184] P. Lefrançois, B. Goudeau, et S. Arbault, « Dynamic monitoring of a bi-enzymatic reaction at a single biomimetic giant vesicle », *The Analyst*, vol. 145, n° 24, p. 7922-7931, 2020, doi: 10.1039/D0AN01273D.
- [185] B. Yang, S. Li, W. Mu, Z. Wang, et X. Han, « Light-Harvesting Artificial Cells Containing Cyanobacteria for CO₂ Fixation and Further Metabolism Mimicking », *Small*, p. 2201305, juill. 2022, doi: 10.1002/smll.202201305.
- [186] I. N. Westensee, E. Brodskij, X. Qian, T. F. Marcelino, K. Lefkimmatis, et B. Städler, « Mitochondria Encapsulation in Hydrogel-Based Artificial Cells as ATP Producing Subunits », *Small*, vol. 17, n° 24, p. 2007959, juin 2021, doi: 10.1002/smll.202007959.
- [187] N. A. Yewdall, « Life brought to artificial cells », *Nature*, p. d41586-022-02231-8, sept. 2022, doi: 10.1038/d41586-022-02231-8.
- [188] C. Xu, N. Martin, M. Li, et S. Mann, « Living material assembly of bacteriogenic protocells », *Nature*, vol. 609, n° 7929, p. 1029-1037, sept. 2022, doi: 10.1038/s41586-022-05223-w.

RÉSUMÉ

Ce travail de thèse s'intéresse à mettre au point les conditions expérimentales permettant d'imager par électrochimiluminescence (ECL) la perméabilisation de membranes de liposomes géants. La stratégie retenue consiste à encapsuler les réactifs ECL (tri-*n*-propylamine et complexe [Ru(bpy)₃]²⁺) à l'intérieur de liposomes, puis de déclencher leur perméabilisation membranaire au contact d'une surface polarisée et transparente en ITO permettant ainsi d'oxyder et de visualiser l'écoulement des réactifs vers le milieu extra-vésiculaire. La mesure simultanée de l'ECL avec la photoluminescence et l'ampérométrie nous a permis d'obtenir des informations comme le suivi de l'état du liposome avant et après l'évènement de la libération, l'attribution de chaque signal à son liposome d'origine, ainsi que la quantité de tri-*n*-propylamine libérée par chaque liposome. Une seconde approche par ECL négative a consisté à imager un objet par contraste optique négatif grâce au blocage de l'électrode par l'objet d'intérêt (le liposome). Nous avons pu montrer que la mise en contact d'un liposome avec la surface d'une électrode sous polarisation génère alors une tâche noire, alors que les autres régions de la surface d'électrode polarisée restent luminescentes. Nous avons ensuite exploré quelques applications bio-analytiques par ECL positive. En présence d'un peptide antimicrobien (la mélittine), l'ECL a permis d'imager les évènements de perméabilisation. Enfin, nous avons révélé par ECL la formation de NADH dans une réaction d'oxydation du glucose catalysée par la GDH à l'intérieur du liposome, ouvrant des perspectives pour utiliser l'ECL dans le suivi de l'avancement de métabolismes rédox du vivant réalisés dans des cellules artificielles.

MOTS CLÉS

Electrochimiluminescence - Liposomes Géants – Imagerie – Peptides à activité membranaire (AMP et CPP).

ABSTRACT

This PhD work deals with the development of experimental conditions allowing the implementation of an electrochemiluminescence (ECL) imaging of the permeabilization of liposomes. Our strategy features the encapsulation of ECL substrates (tri-*n*-propylamine and [Ru(bpy)₃]²⁺) in the lipid vesicle and then to promote their permeabilization at the surface of a polarized transparent ITO electrode, allowing the electrochemical oxidation of the content and the visualization of the leaking process. The simultaneous ECL, photoluminescent and amperometric monitoring provides information on the liposome shape during permeabilization, the assignment of the corresponding signals to a specific liposome, as well as the quantification of the tri-*n*-propylamine released. An alternative approach has been carried out from « negative/shadow ECL », i.e. through the absence of luminescence at regions of the electrode electrochemically blocked by the lipid layer of liposomes in contact with ITO. Under these conditions, the deposition of liposomes at the polarized electrode yields a black spot while the rest of the electrode surface remains luminescent. Then we have explored some bio-analytical applications by classical (positive) ECL. First, ECL allowed the imaging of the permeabilization of liposomes by melittin, a representative antimicrobial peptide (AMP). Finally, we have monitored the intravesicular completion of a simple metabolism, the oxidation of glucose catalyzed by GDH, where the formation of NADH promotes the ECL process, opening avenues for the monitoring of in vivo redox metabolisms achieved in artificial cells.

KEYWORDS

Electrochemiluminescence – Giant Liposomes - Imaging – Membrane Active Peptide (AMP and CPP).