



HAL
open science

Étude de la fusion de liposomes magnétiques avec des systèmes modèles et des cellules

Marine Sagastuy

► **To cite this version:**

Marine Sagastuy. Étude de la fusion de liposomes magnétiques avec des systèmes modèles et des cellules. Biophysique [physics.bio-ph]. Sorbonne Université, 2025. Français. ⟨NNT : 2025SORUS282⟩. ⟨tel-05583414⟩

HAL Id: tel-05583414

<https://theses.hal.science/tel-05583414v1>

Submitted on 7 Apr 2026

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.



HAL Authorization



THESE DE DOCTORAT DE SORBONNE UNIVERSITE

Ecole doctorale : Chimie physique et Chimie Analytique de Paris Centre
(ED388)

Étude de la fusion de liposomes magnétiques avec des systèmes modèles et des cellules

Présenté par :

Marine Sagastuy

Pour obtenir le grade de :

Docteur de Sorbonne Université

Soutenue le 1 octobre 2025

Devant le jury composé de :

Valérie Marchi	Directrice de Recherche	Rapporteuse
Igor Chourpa	Professeur des Universités	Rapporteur
Stéphanie Descroix	Directrice de Recherche	Présidente du jury
Jean-François Berret	Directeur de Recherche	Examineur
Christine Ménager	Professeure des Universités	Directrice de thèse

Remerciements

Ce travail de thèse marque l'aboutissement de plusieurs années de recherche, d'apprentissage et de découvertes, tant scientifiques qu'humaines. Il n'aurait pu voir le jour sans le soutien, la bienveillance et les encouragements de nombreuses personnes que je tiens ici à remercier chaleureusement. J'ai eu la chance de réaliser ces trois années de thèse au sein du laboratoire PHENIX, dirigé par Laurent Michot et Marie Jardat, puis plus récemment par Marie Jardat et Christine Ménager, qui se sont toujours montrés à l'écoute des doctorants.

Je remercie tout d'abord les membres du jury de cette thèse, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer mes travaux et de faire partie du jury : Valérie Marchi et Igor Chourpa, en tant que rapporteurs, ainsi que Stéphanie Descroix et Jean-François Berret, en tant qu'examineurs. Je les remercie vivement pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail ainsi que pour leurs commentaires constructifs.

Je tiens à adresser ma plus profonde gratitude à Christine Ménager, ma directrice de thèse. Ces trois années passées à ses côtés ont été marquées par sa bienveillance, sa pédagogie et son humanité. Christine m'a offert l'espace nécessaire pour grandir, prendre confiance en moi et trouver pleinement ma place dans ce projet de recherche. Toujours à l'écoute, elle m'a accompagnée tant sur le plan scientifique que personnel, présente dans les moments de doute comme dans les réussites, avec un soutien constant et rassurant. Son accompagnement, empreint de bonne humeur et d'humour, a rendu cette aventure bien plus riche que je ne l'aurais imaginé. En repensant à ce parcours, je sais que je n'aurais pas pu rêver mieux. Un immense merci, Christine.

Je souhaite également remercier chaleureusement Aude, Jérôme, Émilie et Delphine pour leur expertise scientifique et leur disponibilité sans faille. Aude, merci pour ta joie de vivre, ton écoute précieuse et ta présence constante, même dans les périodes plus difficiles. Jérôme, merci pour ta sollicitude, ton souci du bien-être de tous et ton implication au quotidien. Émilie, tu as été incroyablement présente tout au long de cette dernière année : merci pour ton écoute, ta bienveillance, ton aide précieuse et ton humour. Delphine, merci pour ta gentillesse, ta bienveillance et ta constante disponibilité. Tu es un véritable pilier du labo, toujours prête à aider, à remonter le moral, souvent avec une touche d'humour bien à toi.

Merci à Frédéric pour son aide précieuse avec l'hyperthermie magnétique et pour toutes les petites discussions parallèles que nous avons pu partager au fil du temps. Finalement, le petit chat noir que je suis est allé jusqu'au bout, et l'hyperthermie fonctionne toujours : mission accomplie ! Merci également à Laurent Michot pour la découverte et l'apprentissage des grands instruments. Ce furent des expériences marquantes, que je garderai longtemps en mémoire, même si, il faut bien l'admettre, les liposomes n'ont pas été très coopératifs !

Je remercie chaleureusement les personnes de la plateforme d'imagerie de l'IBPS, en particulier France Lam et Chloé Chaumeton, présentes depuis presque le début de ma thèse. Merci pour tout le temps consacré, pour votre patience lors de mon apprentissage des microscopes, pour vos conseils, votre disponibilité, et surtout pour la bonne humeur toujours au rendez-vous. Un grand merci à Michaël Trichet pour son aide précieuse lors des manipulations sur cellules. Merci pour ta réactivité, ton implication et ta patience face aux nombreuses péripéties (oui, les fameuses boîtes Ibidi !). Grâce à toi, j'ai pu obtenir des résultats essentiels à ce projet.

Merci également à Jean-François Gilles, David Hrabovsky et Jean-Michel Guigner pour leur aide sur les analyses en imagerie confocale, la caractérisation magnétique et les images de cryo-TEM.

Je tiens à remercier Sofia Liz Basteiro et Carlos Pizzaro, qui ont participé au projet lors de leur stage de master. Sofia Liz, merci pour ta bonne humeur permanente et ton travail acharné. Carlos, même si tu es arrivé pendant l'écriture de la thèse, nos échanges ont été très sympathiques. Bon courage pour la fin de ce stage, assez tumultueux, et j'ai hâte de suivre à la trace ces NPM fluorescents !

Je remercie également Sophie et Adam pour cette belle collaboration, qui m'a permis de faire mes premiers pas, certes timides mais curieux, dans le monde de la simulation. Merci à Adam pour ses programmes efficaces, qui m'ont fait gagner un temps précieux ; et également pour son humour et sa gentillesse.

Un grand merci à tous les membres du laboratoire, permanents comme non-permanents, que j'ai eu la chance de croiser au fil de ces trois années. Merci pour les échanges, l'entraide et l'ambiance partagée. Merci aux autres permanents que j'ai eu le plaisir de côtoyer au quotidien : Jean-Michel, les deux Sophie(s), Ali, Nebewia, Agnès et Sébastien.

Merci aux nombreux doctorants et post-doctorants. Aux plus anciens : Perla, Olifie, Aurélia, Maylis et Mélody, qui m'ont aidée à prendre mes marques et à me sentir bien dès le début. Merci à Alexis et Huiyin, compagnons de thèse du début à la fin, avec qui nous avons pu rire de nos galères et fêter nos réussites. Puis à Anupong, Victor, Tieu ; des personnes incroyables avec qui j'ai énormément aimé échanger. Merci tout particulièrement à Anupong et Victor, devenus de véritables amis, pour les rires partagés et votre soutien constant. Je vous souhaite le meilleur pour la suite, et je continuerai bien sûr à prendre de vos nouvelles. Enfin, merci aux derniers arrivés : Ludivine, Basile, Laurie, Salah et Tristan, qui ont apporté un vent de fraîcheur et de gaieté indéniable au laboratoire. Vous vous êtes intégrés si rapidement que j'ai parfois l'impression que vous avez toujours été là. Merci pour votre bonne humeur permanente, vos discussions joyeuses et votre bienveillance. Je garderai un excellent souvenir de vous et j'espère sincèrement vous revoir. Très belle continuation à vous.

Et maintenant, Perla et Alexis, venons-en à vous. Dire *merci* semble bien insuffisant pour exprimer toute ma reconnaissance. Votre rencontre a été l'une des plus belles choses de cette thèse : celle d'amis précieux, de soutiens indéfectibles, avec qui j'ai partagé bien plus que des expériences de labo. Ces trois années vécues ensemble nous ont permis d'affronter chaque étape côte à côte. Aucun de nous n'a eu à affronter les galères seul, et c'est une chance inestimable d'avoir pu compter sur votre écoute, votre bienveillance et votre présence dans les moments bons comme difficiles. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté, pour tous ces instants partagés et pour toutes ces anecdotes qu'on gardera en mémoire. J'ai hâte de vivre les chapitres à venir, au-delà de la thèse. Je sais que vous auriez préféré un paragraphe chacun, mais vous avez été mes deux piliers... il va falloir partager ces remerciements !

Je souhaite également remercier mes amis en dehors du laboratoire, qui ont été très présents. Merci d'avoir pris le temps de m'écouter, de vous soucier de l'avancement de cette thèse, mais aussi, et surtout, de mon bien-être personnel.

Enfin, je souhaite exprimer toute ma reconnaissance à mes parents. Vous êtes le point central sans lequel rien de tout cela n'aurait été possible. Toutes mes réussites sont aussi les vôtres, car vous vous êtes toujours assurés que je puisse vivre ces aventures dans les meilleures conditions. Merci pour votre amour inconditionnel, votre présence indéfectible et votre soutien à chaque étape de ma vie.

Table des matières

Liste des abréviations	13
Introduction générale.....	19
Chapitre 1 : État de l'art	23
1. La fusion : un processus biologique fondamental	24
a. Généralités sur les cellules eucaryotes	24
b. La membrane plasmique des cellules eucaryotes	25
c. Quelques exemples de fusion membranaire en biologie	28
d. Modèle théorique de la fusion	31
2. Les liposomes	35
a. Définition et structure des liposomes	35
b. Classification des liposomes et méthodes de synthèse	38
c. Propriétés biophysiques des membranes liposomales	41
i. Fluidité membranaire	41
ii. Perméabilité membranaire	43
iii. Courbures de membranes	44
3. Les liposomes fusogènes	46
a. Définition et propriétés	46
b. Différentes stratégies de fusogénicité.....	47
c. Les phospholipides fusogènes	48
d. Exemples d'utilisation de liposomes fusogènes en santé	49
4. Les propriétés magnétiques des oxydes de fer et leurs applications en santé	54
a. Les propriétés superparamagnétiques des nanoparticules d'oxydes de fer	54
b. Intérêt des NPM en santé.....	57
i. Les NPM en imagerie par résonance magnétique : IRM et MPI.....	58
ii. Vectorisation magnétique ou ciblage magnétique	61
iii. Hyperthermie magnétique.....	62
5. Voie d'entrée naturelle des NPM dans les cellules et conséquences	64
6. Contexte et objectif de la thèse.....	66
a. Stratégies de libération des SPION dans le cytosol cellulaire.....	66
b. Objectif de la thèse	71

Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation des liposomes fusogènes magnétiques.....	73
1. Synthèse et caractérisation des nanoparticules magnétiques	75
2. Mise au point de la synthèse des MFL par REV	78
a. Choix de la formulation	78
b. Optimisation de la REV.....	79
i. Influence de la température du bain à ultrasons lors de la formation de l'émulsion	80
ii. Influence de la température du bain marie lors de l'évaporation des solvants	82
iii. Influence du ratio fer/lipides	83
c. Mise au point de la purification des MFL	84
i. Séparation magnétique classique	84
ii. Séparations magnétiques fractionnées	85
iii. Fractionnement de la centrifugation	89
iv. Filtration sur filtre seringue.....	92
d. Synthèse optimisée des liposomes fusogènes magnétiques	94
3. Caractérisation des liposomes fusogènes magnétiques	95
a. Taille, charge et stabilité des MFL par des méthodes de diffusion de la lumière	95
b. Taille, morphologie et structure des MFL par microscopies.....	98
c. Caractérisations magnétiques des liposomes fusogènes magnétiques.....	100
i. Spectroscopie d'absorption atomique	100
ii. SQUID : courbes d'aimantation et ZFC/FC	101
4. Conclusion sur la structure et les propriétés des MFL	102
5. Matériel	102
6. Méthodes	103
a. Synthèse des nanoparticules magnétiques citratées.....	103
i. Synthèse des nanoparticules de γ -Fe ₂ O ₃	103
ii. Trie en taille	104
iii. Citratation	104
b. Préparation des MFL par REV	105
c. Caractérisation des NPM et des MFL.....	106
i. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	106
ii. Analyse de suivi de nanoparticules (NTA).....	106
iii. Microscopie électronique à transmission (MET).....	107

iv.	Microscopie électronique cryo (cryo-MET)	107
v.	Microscopie électronique à transmission en coloration négative	107
vi.	Microscopie confocale	107
vii.	Spectroscopie d'absorption atomique (AAS).....	108
viii.	SQUID.....	108
Chapitre 3 : Étude de la fusion des liposomes magnétiques fusogènes sur système modèle.		109
1.	Synthèse des LUV anioniques et cationiques	110
a.	Synthèse des LUV par extrusion	110
b.	Caractérisations des différentes formulations de LUV.....	112
i.	Mesure des diamètres hydrodynamiques et des potentiels zêta.....	112
ii.	Analyse des tailles et concentration par NTA.....	114
iii.	Observation en microscopie confocale	115
2.	Impact de la composition lipidique sur les propriétés fusogéniques des LUV	117
a.	Evolution de la taille et de la charge suivie par titrage en DLS	117
b.	Données thermodynamiques de l'interaction entre LUV fusogènes et LUV accepteurs.....	120
c.	Étude de l'interaction entre LUV cationiques et accepteurs en microscopie confocale 126	
i.	Colocalisation des LUV cationiques et accepteurs en microscopie confocale	126
ii.	Expériences de transfert de fluorescence	128
3.	Interaction des MFL avec les LUV accepteurs	133
a.	Titrage des MFL par les liposomes accepteurs en DLS	133
b.	Titrage des MFL par les liposomes accepteurs en ITC	134
c.	Suivie de la fusion des MFL avec des LUV accepteurs par microscopie confocale	136
i.	Colocalisation des MFL avec les LUV accepteurs	136
ii.	Transfert de fluorescence des MFL avec les LUV accepteurs.....	139
iii.	Optimisation de la fusion entre MFL et LUV accepteurs.....	142
iv.	Magnétophorèse	143
4.	Conclusion de l'étude de la fusion des MFL sur système modèle	145
5.	Matériel et méthodes	146
a.	Matériel.....	146
b.	Préparation des LUV cationiques, anioniques et zwitterioniques	146
c.	Caractérisation des LUV cationiques, anioniques, zwitterioniques	147

i.	Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	147
ii.	Analyse de suivi de nanoparticules (NTA)	147
iii.	Microscopie confocale	147
d.	Titration des liposomes cationiques suivie par diffusion dynamique de la lumière (DLS)	148
e.	Titration des liposomes cationiques suivie par calorimétrie	149
f.	Microscopie confocale des MFL avec les LUV accepteurs	149
i.	Colocalisation	149
ii.	Transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET)	150
iii.	Magnétophorèse	151
Chapitre 4 : Étude de la fusion des liposomes magnétiques fusogènes avec des cellules		153
1.	Stabilité des MFL dans le milieu de culture DMEM/F12	156
2.	Étude de la fusion entre les MFL et les cellules par microscopie confocale	158
a.	Mise au point des conditions d'observation des cellules.....	158
i.	Choix du délai avant observation.....	158
ii.	Observations sur cellules fixées.....	160
iii.	Choix du temps d'incubation des MFL avec les cellules CHO-K1.....	161
b.	Fusion des cellules CHO-K1 avec les MFL	162
i.	Influence de la température et de la concentration lipidique	162
ii.	Comparaison avec d'autres formulations liposomales.....	164
c.	Fusion des cellules SH-SY5Y avec les MFL	166
d.	Conclusion sur les études de fusion par microscopie confocale.....	167
3.	Mesure de la toxicité des MFL.....	168
4.	Etude de la fusion des MFL avec des cellules par microscopie électronique à transmission	171
a.	Observation des cellules incubées avec des MFL, des LUM et des NPM	171
b.	Evènements observés dans les cellules incubées avec les MFL.....	173
c.	Conclusion de l'étude menée en microscopie électronique à transmission.....	176
5.	Hyperthermie magnétique sur cellules après fusion avec les MFL	177
a.	Mise au point de l'expérience d'hyperthermie magnétique	177
i.	Contexte de l'expérience.....	177
ii.	Choix de la fréquence et de l'intensité du champ magnétique	178
iii.	Pouvoir chauffant des NPM dans les conditions expérimentales.....	180

b.	Hyperthermie magnétique sur les cellules CHO-K1	182
i.	CHO-K1 incubées avec des MFL, des LUM et des LUV cationiques	182
ii.	CHO-K1 incubées avec les MFL à différentes concentrations lipidiques et en augmentant le nombre de cycles de CMA	184
c.	Hyperthermie sur les cellules SH-SY5Y	187
d.	Conclusion et perspectives des résultats d'hyperthermie magnétique	189
6.	Matériel et Méthodes	191
a.	Matériel	191
b.	Stabilité des MFL dans le milieu de culture DMEM/F12	191
c.	Culture cellulaire	191
d.	Microscopie confocale à fluorescence	192
e.	Test de viabilité des cellules CHO-K1 traitées	192
f.	Microscopie électronique à transmission des CHO-K1 incubées avec les MFL	193
g.	Test d'hyperthermie magnétique	194
i.	Choix de l'intensité	194
ii.	SLP des NPM	195
iii.	Test d'hyperthermie magnétique sur cellules CHO-K1 et SH-SY5Y	195
	Conclusion et perspectives	197
	Bibliographie	203

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
AG	Acide gras
ADN	Acide désoxyribonucléique
AAS	Atomic absorption spectroscopy
ARN	Acide ribonucléique
ARNm-Cy5	ARN messenger marqué avec de la cyanine 5
ARPE-19	Cellules épithéliales rétinienne humaines
ASCT2	Alanine, Serine, Cysteine Transporter 2
ATP	Adénosine triphosphate
AuNCs	Nanoclusters d'or luminescents
β-BODIPY C12-HPC	2-(4,4-difluoro-5,7-diméthyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène-3-dodécanyloxy)-1-hexadécanyloxy-sn-glycéro-3-phosphocholine
BMDC	Bone Marrow-Derived Dendritic Cell
BL	Box-Lucas
BSA	Bovine serum albumin
CA4P	Combretastatine A4 phosphate
CD9	Cluster of differentiation 9 (tetraspanines)
CD81	Cluster of differentiation 81 (tetraspanines)
CEACAM1	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1
CHO-K1 / CHO	Chinese Hamster ovary
Cl ⁻	Chlorure
CMA	Champ magnétique alternatif
CMVEC	Cellule endothéliale microvasculaire cérébrale
CO ₂	Dioxyde de carbone
Cx43	Connexin-43
DAG	Diacylglycérol
DiR	1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-Tétraméthylindotricarbocyanine iodure
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium / Ham's F-12 Nutrient Mixture

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
DLS	Dynamic Light Scattering
DODMA	N,N-diméthyl-N-dioctadécyl-ammonium
DOPC	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DOPE	1,2-Dioleoyl-sn-glycéro-3-phosphoethanolamine
DOPE-PEG(2000) azide	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N- [azido(polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt)
DOTAP	1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium-propane (chloride salt)
DOTMA	1,2-di-O-octadecenyl-3-triméthylammonium propane (chloride salt)
EE	Endosome précoce
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EV	Extracellular vesicle
FBS	Fetal bovine serum
FC	Field-cooled
FDA	Food and Drug Administration
Fe ₃ O ₄	Magnétite
γ-Fe ₂ O ₃	Maghémite
FIRE	Fluorescence intensity rendering enhancement
FRET	Förster resonance energy transfer
Gp41	Glycoprotéine 41 kDa
GUV	Giant unilamellar vesicles
HA	Héماغlutinine
HI-FBS	Heat-inactivated fetal bovine serum
HIFU	High-intensity focused ultrasound
HPLC	High performance liquid chromatography
HSP27	Heat shock protein 27
HEPES	N-2-Hydroxyéthylpiperazine-N'-2-éthanesulfonique
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
IRM	Imagerie par résonance magnétique

Abréviation	Signification
ITC	Isothermal titration calorimetry
K ⁺	Potassium
K _b	Constante de liaison
LNP	Lipid nanoparticle
LPC	Lysophosphatidylcholine
LUV	Large unilamellar vesicles
MET	Microscopie électronique à transmission
MFL	Magnetic fusogenic liposome
MFSD2A	Major Facilitator Superfamily Domain-containing protein 2A
MLV	Multilamellar vesicle
MPI	Magnetic particules imaging
MVB	Corps multivésiculaires
n	stoechiométrie
N ₂	Diazote
Na ⁺	Sodium
Nd-Fe-B	Néodyme – Fer – Bore
NPM	Nanoparticule magnétique
NTA	Nanoparticle Tracking Analysis
NR	Nanorod
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2–related factor 2
O ₂	Dioxygène
OH ⁻	Hydroxyle
OVA-Cy5.5	Ovalbumine marquée au fluorochrome Cyanine 5.5
P	Paramètre d'empilement
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PC	Phosphatidylcholine
PCC	Pearson correlation coefficient
PDI	Polydispersity index

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
PE	Phosphatidyléthanolamine
PEG	Polyéthylène Glycol
Pen/strep	Penicilline/Streptomycine
PG	Phosphatidylglycérol
PHENIX	Physicochimie des électrolytes et nanosystème interfaciaux
PI	Phosphatidylinositol
PIP3	Phosphatidylinositol triphosphate
PFA	Paraformaldéhyde
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine
POPG	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt)
PPH	Peptide polyhistidine
PS	Phosphatidylsérine
PVA	Poly (vinyl alcohol)
REV	Reverse-phase Evaporation of Vesicles
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
Egg Liss Rhod PE	L- α -Phosphatidyléthanolamine N-(lissamine rhodamine B sulfonyl)
v-SNARE	Vesicular SNAP-receptor
SH-SY5Y	Cellules humaines cancéreuses de neuroblastome
SPACA6	Sperm-Acrosome Associated 6
SPION	Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles
SQUID	Superconducting Quantum Interference Device
SUV	Small Unilamellar Vesicles
SLP	Specific Loss Power
STEM	Scanning Transmission Electron Microscopy
T _B	Température de blocage
T _{eb}	Température d'ébullition
TLH	Thin Layer Hydratation

Abréviation	Signification
TopFluorPE	1-Palmitoyl-2-(dipyrométhénébore difluorure) undécanyl - sn - glycéro - 3 – phosphoethanolamine fluorescent
t-SNARE	Target-SNAP-receptor
T_m	Température de transition de phase
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
LUM	Liposomes ultramagnétiques
LUT	Look-up table
UV-Vis	Ultraviolet-visible
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
ZFC	Zero-field-cooled
ΔG	Enthalpie libre
ΔH	Enthalpie de réaction
ΔS	Entropie

Introduction générale

Dans le domaine de la recherche biomédicale, l'un des enjeux majeurs actuels consiste à acheminer efficacement des molécules bioactives à l'intérieur des cellules, qu'il s'agisse de médicaments, d'ARN, d'ADN ou encore de molécules capables d'activer des voies intracellulaires spécifiques. Il est, cependant, nécessaire de protéger ces molécules de la dégradation par le système immunitaire et d'assurer leur libération dans le cytosol, en évitant qu'elles ne soient piégées et dégradées dans les endosomes après endocytose. Au fil des années, différentes stratégies ont été développées pour contourner l'endocytose, telles que l'utilisation de peptides pénétrants, de vecteurs viraux modifiés ou de nanostructures sensibles à l'environnement endosomal (notamment au pH). Cependant, ces approches présentent souvent des limites en termes de spécificité ou de stabilité.

Parmi les mécanismes naturels pouvant être exploités pour contourner l'endocytose, la fusion membranaire apparaît comme une stratégie particulièrement prometteuse. Processus fondamental du vivant, la fusion intervient dans des événements biologiques essentiels tels que la fécondation, la formation du placenta ou encore le trafic intracellulaire. La fusion membranaire permet le transfert de molécules d'un compartiment à un autre de manière contrôlée et ciblée. Ce phénomène naturel a été reproduit de manière artificielle à l'aide de systèmes biomimétiques, les liposomes fusogènes en sont un exemple. Ces liposomes sont capables de fusionner directement avec la membrane plasmique des cellules, assurant la libération de leur contenu dans le cytosol tout en évitant les voies d'endocytose classiques. Les liposomes, de manière générale, sont des vésicules sphériques formées d'une bicouche lipidique entourant un cœur aqueux. Leur nature biomimétique et biocompatible leur permet d'encapsuler des molécules hydrophiles dans le cœur et des composés hydrophobes dans la membrane. Leur composition lipidique peut être optimisée pour améliorer leur stabilité, leur furtivité vis-à-vis du système immunitaire ou pour les rendre fusogènes.

Les liposomes fusogènes ont permis la délivrance cytosolique efficace de nombreux agents thérapeutiques, ARN, ADN, protéines, antioxydants, médicaments avec une bonne efficacité, mais peu d'études proposent d'utiliser ces liposomes fusogènes dans le but de contourner la voie d'endocytose des nanoparticules.

En ce qui concerne les nanoparticules magnétiques, leur accès au cytosol permettrait de pouvoir les utiliser pour cibler des organites, pour recruter des protéines ou pour chauffer localement par hyperthermie magnétique.

Introduction générale

L'objectif de ce travail de thèse est de valider une nouvelle voie d'accès des nanoparticules magnétiques (NPM) dans le cytosol des cellules. L'approche proposée est d'utiliser la technologie des liposomes fusogènes qui permet d'éviter le piégeage endosomal des NPM et de permettre ainsi leur relargage directement dans le cytosol. Du point de vue applicatif, l'objectif est de pouvoir chauffer les cellules beaucoup plus efficacement et localement par hyperthermie magnétique ce qui ouvrirait la porte à de nouvelles stratégies de traitement notamment dans le cas de la thérapie anticancéreuse. D'un point de vue fondamental, les NPM peuvent être un outil précieux de suivi des différentes étapes de la fusion permettant ainsi une meilleure compréhension de ce phénomène complexe qu'est la fusion membranaire.

Ce manuscrit est structuré en quatre chapitres. Le premier chapitre présente le principe de la fusion membranaire, ses étapes clés et son intérêt pour la vectorisation intracellulaire. Il décrit ensuite les propriétés des liposomes fusogènes, leur capacité à fusionner avec des bicouches lipidiques et à libérer leur contenu dans les cellules. Une attention particulière est portée aux mécanismes d'internalisation cellulaire et aux stratégies actuelles pour atteindre le cytosol. Enfin, les applications biomédicales des NPM sont détaillées.

Le chapitre 2 décrit la synthèse des liposomes fusogènes magnétiques (MFL) composés du mélange lipidique cationique (DOTAP/DOPE) et encapsulant dans leur cœur aqueux des nanoparticules de maghémite stabilisées à pH7. La méthode choisie est la synthèse par évaporation en phase inverse (REV), les différents paramètres de synthèse (ratio fer/lipides, température d'évaporation des solvants, étapes de purification) sont discutés puis une caractérisation physico-chimique complète des MFL est ensuite présentée.

Le chapitre 3 est consacré à l'étude de la fusion des MFL avec des liposomes accepteurs, anioniques ou zwitterioniques, choisis comme systèmes modèles de membranes cellulaires. Au préalable, l'impact de la composition lipidique sur le processus de fusion est étudié en mettant au point les techniques d'analyse les plus appropriées : titrage en diffusion dynamique de la lumière, titrage calorimétrique en ITC, expériences de transfert de fluorescence en microscopie confocale (FRET).

Le dernier chapitre est dédié à l'étude de la fusion des MFL avec des cellules vivantes (CHO-K1 et SH-SY5Y). Dans un premier temps, la fusion des MFL est étudiée en microscopie confocale par l'observation du transfert de fluorescence à la membrane plasmique. Les conditions expérimentales (concentration lipidique, température, temps d'incubation, type de liposomes) sont évaluées en parallèle de la mesure de la toxicité des MFL. Dans un deuxième temps, le suivi des NPM, après fusion des MFL avec les cellules, est réalisé en microscopie électronique à transmission à 4 °C, où l'endocytose est bloquée. Les cellules incubées avec des MFL sont ensuite soumises à un champ magnétique alternatif afin de déterminer la mortalité cellulaire induite par un échauffement local dû à la présence des NPM dans le cytosol.

Chapitre 1 : État de l'art

1. La fusion : un processus biologique fondamental

a. Généralités sur les cellules eucaryotes

Plus de 200 types de cellules eucaryotes existent, elles se distinguent par leur forme, leur taille et leur fonction. Malgré cette grande variété, elles peuvent être regroupées en catégories selon leur fonction principale : cellules épithéliales, osseuses, graisseuses, sanguines, nerveuses, musculaires et germinales.¹⁻⁴

Toutes les cellules eucaryotes sont néanmoins constituées de la même manière, elles possèdent un noyau et un cytoplasme contenant des organites cytoplasmiques (mitochondrie, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, ribosomes, lysosomes, peroxydosome) maintenus par un cytosquelette, et le tout délimité par une membrane plasmique¹⁻⁴ (*Figure 1.1*). Le principal constituant de la cellule est le noyau, avec un diamètre d'environ 5-10 μm , il contient l'ADN qui représente le support de l'information génétique de la cellule.²⁻⁴ Les organites remplissent diverses fonctions essentielles pour le bon fonctionnement de la cellule. La mitochondrie permet de produire de l'ATP, source d'énergie de l'organisme.¹⁻⁵ Les réticulums endoplasmiques jouent un rôle dans la synthèse de protéines destinées aux membranes et à la sécrétion, via les ribosomes qui traduisent l'ARN, mais ils sont également responsables de la synthèse des lipides, de la détoxification des cellules et du stockage du calcium.^{1,2,4} À l'aide de petites vésicules issues du réticulum endoplasmique, les protéines sont transportées vers l'appareil de Golgi, et les lipides sont intégrés à la membrane plasmique. L'appareil de Golgi qui récupère les protéines achève leur maturation et leur tri avant de les guider vers leur emplacement final (lysosomes, membrane plasmique ou milieu extracellulaire).^{1-4,6,7} Outre ce rôle dans le transport des protéines, l'appareil de Golgi est aussi un site de synthèse lipidique.^{1,7} Les lysosomes sont quant à eux en charge de la dégradation et du recyclage des composants cellulaires^{1,4,8} tandis que les peroxydosomes dégradent les acides gras très longs, détoxifient le peroxyde d'hydrogène et participent à la synthèse de certains lipides essentiels, protégeant ainsi la cellule des dommages oxydatifs.^{1,4,9} Pour donner sa forme à la cellule, soutenir le cytoplasme et permettre le déplacement des organites et des chromosomes au moment de la mitose, le cytoplasme des cellules eucaryotes est constitué d'un réseau de filaments protéiques, appelé cytosquelette, il correspond à l'échafaudage de la cellule.¹⁻⁴

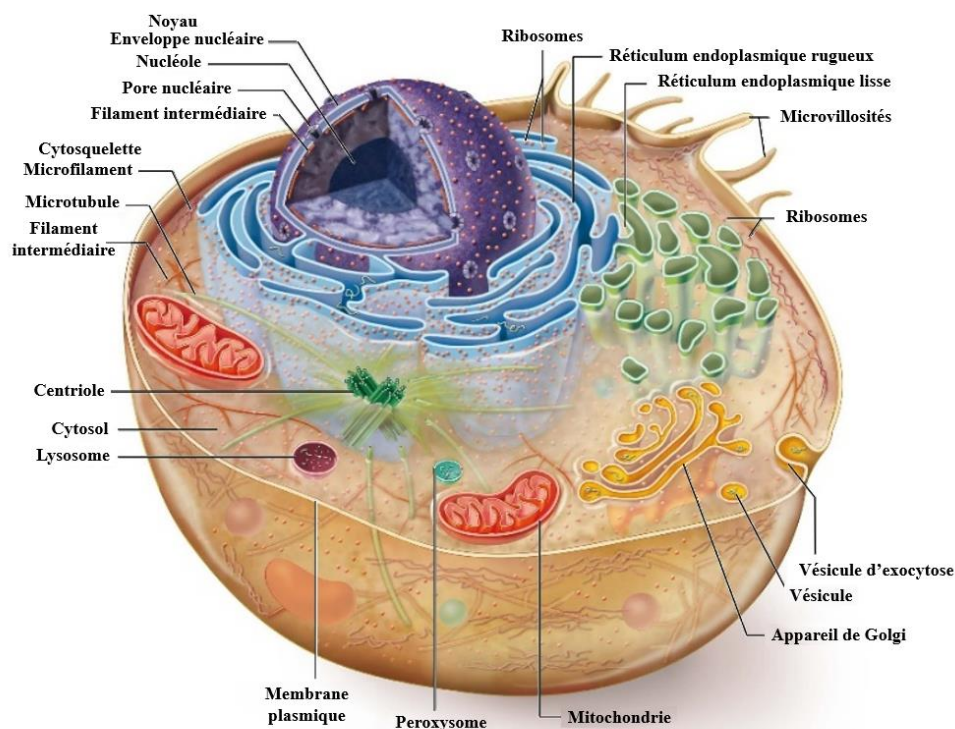


Figure 1.1 : Structure de la cellule eucaryote délimitée par une membrane plasmique et contenant un noyau, un cytosquelette et de nombreux organites cytoplasmiques.¹⁰

b. La membrane plasmique des cellules eucaryotes

Les différents niveaux de compartimentation et de spécialisation de la cellule sont rendus possibles grâce à la présence de membranes. Si l'environnement extérieur et le cytoplasme de la cellule sont séparés par la membrane plasmique, des membranes internes vont également délimiter les compartiments intérieurs des cellules eucaryotes, qui sont le noyau et les organites cytoplasmiques.^{1-3,10,11} Chez les eucaryotes, le rôle des membranes biologiques est crucial puisque ce sont des barrières semi-perméables qui interviennent dans la régulation de l'environnement cellulaire, la communication, la protection et le transport des molécules.

Ces fonctions sont possibles grâce à la structure particulière des membranes biologiques. En effet, si la membrane plasmique a tout d'abord été décrite par Singer et Nicholson en 1972¹², comme une membrane homogène totalement fluide, la description actuelle est celle d'une membrane complexe, organisée en microdomaines appelés radeaux lipidiques (**Figure 1.2**).¹³⁻¹⁵ Ces domaines sont enrichis en phospholipides saturés, sphingolipides, glycolipides, cholestérol et protéines. Ces radeaux lipidiques jouent un rôle dans la signalisation cellulaire, le trafic des protéines, ainsi que l'exocytose et l'endocytose.

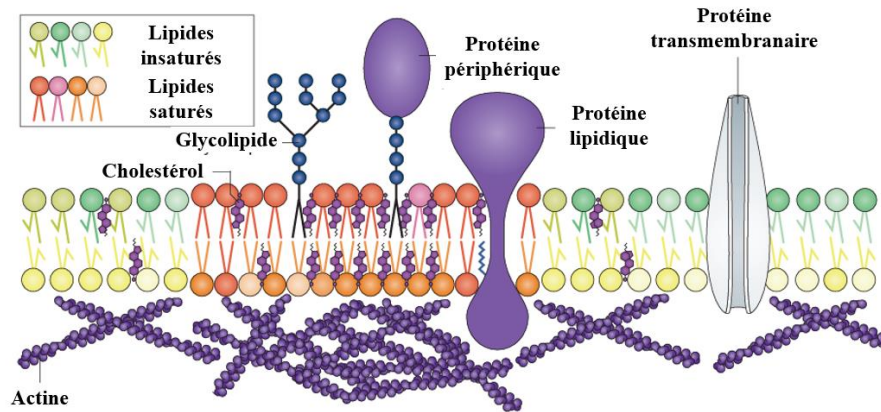


Figure 1.2 : Schéma de la membrane plasmique adapté de Sezgin et *al.*¹⁴, composée de différents lipides, protéines, glycolipides, et cholestérol. Certains domaines peuvent former des radeaux lipidiques (rouge).

Les phospholipides (glycérophospholipides et sphingolipides) sont les composants majoritaires des membranes cellulaires. Les glycérophospholipides sont composés de glycérol estérifié par deux chaînes d'acide gras hydrophobes, et le glycérol est également lié à un groupe hydrophile contenant un phosphate (**Figure 1.3**).^{1,2,4}

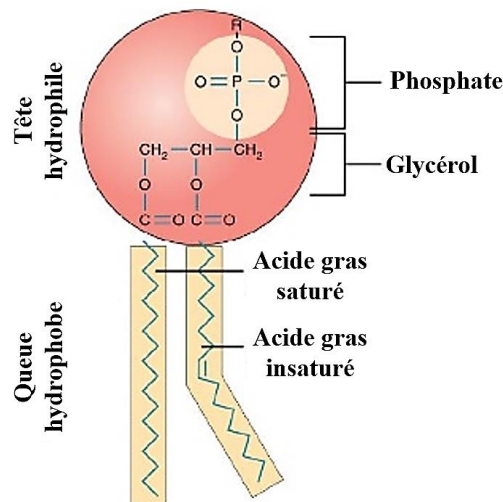


Figure 1.3 : Schéma général de la structure d'un phospholipide.

Ce groupement phosphate étant chargé négativement à pH physiologique (pK 1-2), la nature du groupement qui lui est associé au niveau de la tête polaire va conférer à la molécule différentes propriétés.¹⁶ La tête polaire pourra être anionique dans le cas des phosphatidylsérine (PS) et phosphatidylinositol (PI) ou zwitterionique dans le cas des phosphatidylcholine (PC) et phosphatidyléthanolamine (PE) (**Figure 1.4**).^{1,10}

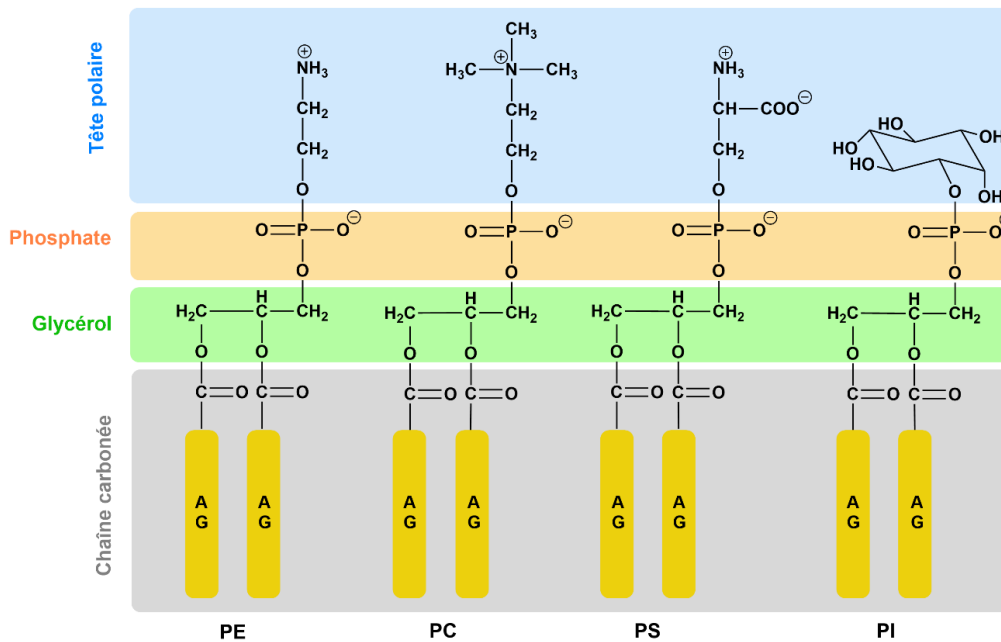


Figure 1.4 : Structure des principaux glycérophospholipides de la membrane plasmique, avec la phosphatidyléthanolamine (PE) et la phosphatidylcholine (PC) qui sont zwitterioniques et la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (PI) qui sont chargés négativement. (AG = acide gras).¹⁷

Les lipides zwitterioniques représentent plus de 50% des phospholipides de la membrane des cellules eucaryotes et sont principalement situés sur le feuillet externe. Le feuillet interne est quant à lui plus riche en PE et PS créant ainsi une dysmétrie de répartition entre les deux feuillets.¹⁸ En plus des phospholipides, la membrane plasmique des cellules eucaryotes contient du cholestérol (**Figure 1.5**) qui est un élément essentiel des membranes cellulaires. Cette molécule amphiphile s'insère dans les chaînes d'acides gras, le groupement hydroxyle se retrouvant au niveau des têtes polaires des phospholipides.^{13,19}

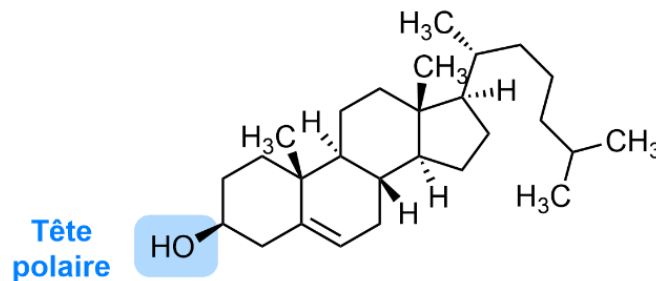


Figure 1.5 : Structure du cholestérol.

Ces lipides vont s'assembler en une bicouche lipidique ayant un rôle de barrière semi-perméable entre le milieu externe et le milieu intracellulaire. De plus, ils sont responsables de la fluidité membranaire, un processus nécessaire à de nombreux aspects du fonctionnement cellulaire, comme le transport de molécules, la signalisation, la formation de structures membranaires et l'adaptation aux conditions environnementales.^{2,4,12,20} La fluidité de la membrane est un paramètre essentiel de la fusion car ce processus dépend de la capacité des membranes à se déformer et à s'adapter de manière dynamique.²¹

Les protéines sont les seconds constituants majoritaires en masse de la membrane plasmique, contenus ou supportés par la bicouche lipidique. À l'instar des lipides, il existe une grande diversité de protéines, qui peuvent être classées en fonction de leur emplacement dans la bicouche lipidique^{1,4,10,22} (**Figure 1.2**). Les protéines transmembranaires, qui possèdent une région hydrophobe et une région hydrophile, leur permettent respectivement d'interagir avec les queues ou les têtes des lipides et ainsi de traverser complètement la membrane cellulaire.^{4,12,22} Ces protéines vont plutôt avoir un rôle de signalisation externe de la cellule et de transport sélectif de molécules, ions ou électrons à travers la membrane.²² Les protéines dites périphériques vont, quant à elles, être reliées soit à la monocouche lipidique interne et être orientées vers le cytoplasme, soit être reliées à la monocouche externe et donc être localisées dans la matrice extracellulaire. Elles vont être impliquées dans la signalisation interne de la cellule et la stabilisation de la membrane.

La membrane plasmique des cellules eucaryotes est également composée de glycoprotéines et de glycolipides (**Figure 1.2**), les molécules glycosylées sont liées soit à des lipides soit à des protéines et sont exposées uniquement du côté extracellulaire. Un rôle de protection, à la fois chimique et mécanique, face au milieu extracellulaire, ainsi qu'un rôle dans la reconnaissance cellule-cellule, pouvant conduire à l'adhésion cellulaire, à la signalisation et à la réponse immunitaire, leur est attribué.^{1,4,10,22,23}

c. Quelques exemples de fusion membranaire en biologie

Dans le corps humain, la fusion membranaire est un processus crucial, impliquant la réunion de deux membranes distinctes en une seule structure et entraînant la formation d'un pore, permettant le mélange du contenu des entités délimitées initialement par leur membrane. La fusion peut se produire entre cellules, ou entre une cellule et un virus, dans ces deux cas on parle de fusion extracellulaire, mais elle peut aussi se produire entre les organites de la cellule,

on parle alors de fusion intracellulaire. La fusion est un processus essentiel dans de nombreux contextes biologiques, allant de l'infection virale à la communication cellulaire, la formation de tissus ou la fonction des organites.

Malgré cette grande variété biologique, la fusion de deux membranes peut être décrite par des étapes communes. Pour illustrer ce propos, nous allons prendre quelques exemples de fusion membranaire extracellulaire comme l'infection virale, la formation du placenta, ou la fécondation, et un exemple de fusion intracellulaire qu'est l'exocytose des cellules synaptiques. Les étapes communes à la fusion des membranes sont les suivantes :

(i) Les deux membranes doivent d'abord se rapprocher l'une de l'autre. Ce rapprochement est souvent facilité par des protéines de surface ou des protéines d'adhésion. Par exemple, l'hémagglutinine (HA), une protéine de surface du virus de la grippe, se lie spécifiquement aux résidus d'acide sialique des glycoprotéines et glycolipides de la cellule cible.²⁴ De même, des protéines d'adhésion, les cadhérines (E-cadhérine, E-cad) et les connexines (connexin-43, Cx43), sont également présentes sur les membranes cellulaires du placenta (trophoblastes) afin de permettre l'adhésion et la communication entre ces cellules.^{25,26} Lors de la fécondation, ce sont les protéines IZUMO1 et JUNO qui permettent respectivement l'adhésion du spermatozoïde avec l'ovocyte.²⁷ Enfin, à l'échelle de la fusion intracellulaire, des protéines d'adhésion v-SNARE et t-SNARE qui sont respectivement ancrées sur la vésicule d'exocytose et sur la membrane plasmique de la cellule cible (ex : cellule synaptique), vont permettre l'adhésion entre les deux (*Figure 1.6 A*).²⁸

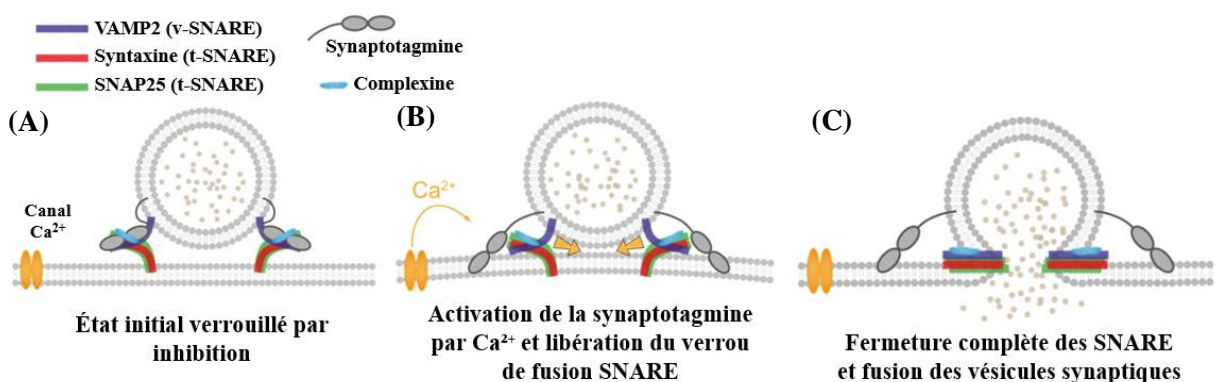


Figure 1.6 : Schéma adapté de Norman et *al.*²⁸, du mécanisme de fusion membranaire des vésicules synaptiques médiée par les protéines SNARE.

(ii) Une structure intermédiaire où les membranes sont en contact étroit est alors formée afin de favoriser la mise en œuvre de la fusion. Cette étape est généralement induite grâce à un changement de conformation des protéines d'adhésion et à la réquisition de certaines molécules. Dans le cas du virus de la grippe, à la suite de l'acidification du pH dans les endosomes tardifs, la protéine d'hémagglutinine subit un changement de conformation permettant au peptide de fusion de HA de se trouver très proche de la membrane de l'endosome.²⁴ Dans le cas des trophoblastes (cellules du placenta), la syncytine-1 et la syncytine-2, des glycoprotéines de fusion issues d'un gène viral, vont se lier respectivement aux récepteurs ASCT2 et MFSD2A, induisant une série d'évènements moléculaires conduisant à la fusion membranaire.^{25,26} Dans le cas de la fusion des gamètes, à la suite de l'adhésion des protéines IZUMO1 et JUNO, des acteurs tels que les protéines CD9, CD81 et SPACA6, entre autres, sont réquisitionnés afin d'amorcer la fusion effective des membranes.^{27,29} Dans le cas de l'exocytose synaptique, un changement de conformation des protéines SNARE va induire une traction, rapprochant les membranes l'une de l'autre ; la fusion des membranes est ensuite déclenchée lorsque la synaptotagmine capte des ions Ca^{2+} , ce qui lève l'inhibition exercée par la complexine (**Figure 1.6 B**).²⁸

(iii) Une fois que les membranes ont fusionné, il y a ouverture d'un pore. Dans le cas de la fusion virus-cellule, le matériel génétique viral pénètre dans la cellule hôte via ce pore.²⁴ La fusion des trophoblastes entraîne la formation du syncytiotrophoblaste, un réseau de cellules avec plusieurs noyaux dans un seul cytoplasme, ce qui favorise une communication cellulaire fluide et plus rapide essentielle au bon fonctionnement du placenta.^{25,26} Pour la fusion des gamètes cela permet l'union de deux génomes haploïdes (n chromosomes chacun) pour former une cellule diploïde ($2n$ chromosomes).²⁷ Dans le cas de l'exocytose des cellules synaptiques, cela permet la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique (**Figure 1.6 C**).²⁸

Néanmoins, si ces différents types de fusion extra et intracellulaires partagent des étapes communes, il y a des variations significatives. En effet, la surface de contact entre les membranes, la distance les séparant, ou la nature des acteurs protéiques mis en jeu sont très différentes en fonction des types cellulaires.¹⁰ De plus, les vitesses de fusion sont également très différentes et dépendent du mécanisme moléculaire impliqué et des besoins de régulation dans chaque contexte biologique.

d. Modèle théorique de la fusion

De nombreux groupes composés de physiciens et de chimistes se sont intéressés à la modélisation du processus de fusion des bicouches lipidiques.^{10,21,30-37} Ces études s'accordent à dire que la fusion est un phénomène complexe procédant en plusieurs étapes et s'accompagnant de changements dans la structure membranaire. Les modèles se sont également attachés à calculer ou simuler l'énergie d'activation liée à ces différents intermédiaires.

Afin de modéliser le processus de fusion, deux grandes stratégies ont été utilisées. La première, historiquement la plus ancienne, repose sur la modélisation des membranes comme des films continus macroscopiques décrits par les méthodes de la physique classique. Cette approche permet d'analyser les conditions favorisant la fusion des membranes, d'identifier les transformations structurelles impliquées, d'évaluer le coût énergétique des états intermédiaires et de déterminer si ces intermédiaires constituent des obstacles énergétiques au processus de fusion.^{10,21} La seconde stratégie repose sur des simulations informatiques du processus de fusion membranaire. Ces simulations pouvant se faire avec différents degrés de précision en prenant en compte les atomes individuellement (simulation tout atome) ce qui est très précis mais aussi très coûteux en temps de calcul ou en prenant en compte des groupes d'atomes (simulation gros grains) ce qui permet une approche moins précise mais plus rapide et adaptée à de grands systèmes.²¹ Contrairement aux approches théoriques, les simulations ne reposent sur aucune hypothèse prédéfinie concernant les intermédiaires de fusion, mais les résultats dépendent du modèle utilisé et des limitations techniques, telles que la durée des simulations et le nombre de molécules considérées.

Tous les modèles convergent maintenant sur une description de la fusion membranaire en quatre étapes principales qui sont dans un premier temps l'apposition des bicouches lipidiques puis la formation d'un intermédiaire de fusion nommé « stalk » (tige en anglais) et enfin la formation d'un pore qui est quelquefois précédée par une étape d'hémifusion (*Figure 1.7*). Nous allons décrire un peu plus en détail ces étapes.

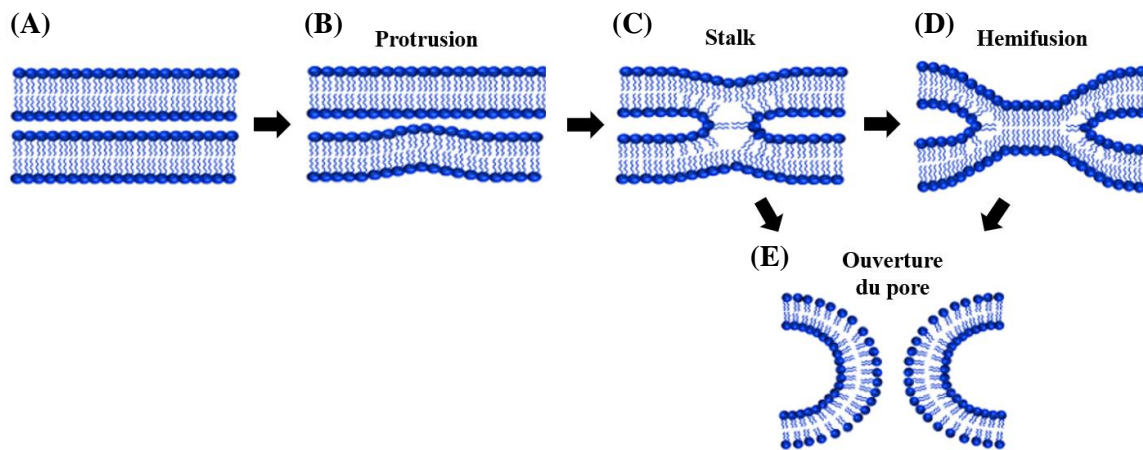


Figure 1.7 : Schéma adapté des travaux de Joardar et *al.*³⁰, du modèle mécanistique de la fusion membranaire.

❖ L'apposition des membranes

La distance séparant deux membranes est d'environ 10 à 20 nanomètres (**Figure 1.7 A**) en raison des répulsions électrostatiques et des répulsions stériques dues à la présence de protéines membranaires et aux fluctuations thermiques de la membrane.¹⁰ Pour que deux bicouches lipidiques fusionnent, elles doivent d'abord se rapprocher. In vivo, ce rapprochement est rendu possible grâce à l'action de protéines d'adhésion (comme les protéines SNARE ou les hémagglutinines virales), qui fournissent l'énergie nécessaire au processus. Cependant, lorsque les membranes atteignent une très courte distance l'une de l'autre (quelques nanomètres), une nouvelle force entre en jeu : la répulsion d'hydratation. Cette répulsion est causée par les molécules d'eau fortement liées aux têtes polaires des lipides, qui s'opposent à l'approche des bicouches.^{10,30,32} En 1987, Leikin et *al.*³² ont proposé un mécanisme pour initier la fusion malgré la répulsion. Une protubérance ponctuelle se formerait sur l'une des membranes, tandis que l'autre resterait plane. Cette déformation, causée par les fluctuations thermiques de la membrane, permettrait un rapprochement local des deux bicouches jusqu'à une distance de l'ordre de 0,5 nm.³² Il est important de noter que la force de répulsion d'hydratation dépend fortement de la composition lipidique des membranes.³⁰

❖ Formation du stalk

Le stalk est un pont métastable joignant les deux membranes, composé de lipides provenant des feuillettes externes des membranes sur le point de fusionner tandis que les monocouches internes sont intactes (**Figure 1.8**).^{10,21,30-32} À ce stade, les contenus des deux compartiments demeurent donc séparés.

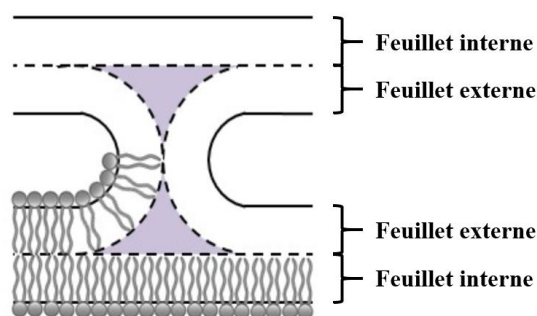


Figure 1.8 : Schéma de la structure du *stalk* composé des feuillets externes des deux membranes plasmiques qui ont fusionné. Les feuillets internes restent intacts, ce qui crée des zones «vides» (surfaces violettes) très coûteuses en énergie.¹⁰

Le *stalk* est sûrement l'intermédiaire de fusion le plus étudié, son existence a été confirmée expérimentalement dans des systèmes lipidiques multicouches et a été prédite par des simulations numériques.^{21,38} Cette structure se forme à partir de la protrusion. En effet, lors du rapprochement des deux membranes, les répulsions d'hydratation très élevées ont pour conséquence d'éloigner les têtes polaires de la zone de contact la plus étroite. Les têtes s'écarteraient alors les unes des autres créant ainsi des zones d'accès aux chaînes hydrophobes des lipides³² (**Figure 1.9**). Il apparaîtrait alors une force d'attraction hydrophobe entre ces régions, induisant la fusion de la protrusion ponctuelle avec le feuillet externe de la bicouche opposée (**Figure 1.7 C**). Ce réarrangement conduirait à la formation d'une structure continue aboutissant à un intermédiaire métastable en forme de sablier, c'est le *stalk*. Il est établi que la formation de cette protrusion, essentielle au développement de l'intermédiaire *stalk*, est favorisée par les lipides en forme de cône inverse qui induisent localement une courbure négative.³³ En revanche, la formation du *stalk* est généralement entravée par la présence de lipides induisant une courbure positive, tels que certains lipides coniques, ainsi que par des lipides à chaînes acyles saturées, des groupes polaires anioniques ou des acides gras déprotonés, qui stabilisent des structures membranaires moins favorables à la fusion.^{30,31,34}

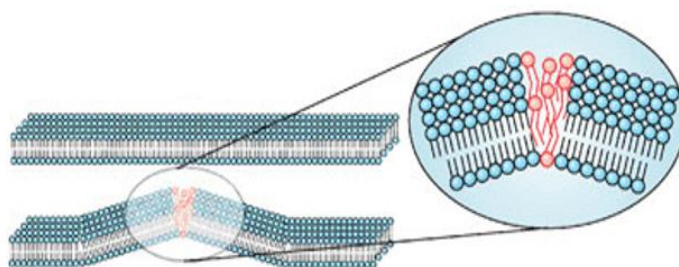


Figure 1.9 : Schéma du mécanisme de formation du *stalk* adapté des travaux de Kamp et al.³⁹.

❖ Diaphragme d'hémifusion

La transition entre l'état de *stalk* et la formation du pore de fusion reste aujourd'hui sujette à débat, deux scénarios principaux sont envisagés. Le premier suppose une expansion radiale du *stalk*, menant à la formation d'un diaphragme d'hémifusion, et le second envisage un passage direct du *stalk* à l'ouverture du pore de fusion, initié par un contact localisé entre les deux monocouches internes.³⁶ Dans le premier scénario, l'expansion du *stalk* induit une tension dans les feuillettes externes, tandis que l'excès local de lipides dans le feuillet interne provoque un écartement des lipides, facilitant ainsi cette expansion.³⁶ Ce processus s'accompagne d'un réarrangement lipidique, au cours duquel les queues hydrophobes des monocouches internes entrent en contact, formant une nouvelle bicouche qui est décrite comme étant le diaphragme d'hémifusion (**Figure 1.7 D**). Cette structure intermédiaire a été visualisée par microscopie confocale à fluorescence⁴⁰ et par cryo-microscopie électronique⁴¹. Dans cet état, les feuillettes internes des membranes restent intacts, et aucun échange de contenu entre les compartiments fusionnants n'a encore eu lieu. Des simulations de dynamique moléculaire ont par ailleurs montré que ce diaphragme d'hémifusion est une structure métastable, dont la durée de vie est extrêmement brève, de l'ordre de quelques nanosecondes seulement.³⁵

❖ Ouverture du pore

Dans la plupart des modèles, l'ouverture du pore de fusion est décrite comme une étape consécutive à la formation du diaphragme d'hémifusion. Par définition, la fusion complète est atteinte lorsque l'ouverture d'un pore permet le mélange des contenus aqueux des deux compartiments délimités par les membranes.^{10,30} Au bord du diaphragme d'hémifusion, une forte tension mécanique est présente, en particulier à l'interface entre les deux membranes (**Figure 1.7 D**). Cette tension résulte de la courbure membranaire et de la pression exercée par les lipides dans cette zone de contact.^{10,30,33} Lorsque cette tension devient suffisante, les queues hydrophobes des lipides, déjà rapprochées dans la région du diaphragme, peuvent provoquer des ruptures localisées dans la zone de contact. Ces ruptures permettent à l'eau ou à d'autres molécules de traverser temporairement la membrane, bien que cela expose transitoirement des régions hydrophobes à l'eau, une situation thermodynamiquement défavorable. Pour que le pore puisse s'étendre et se stabiliser, il est alors nécessaire de surmonter l'énergie de tension de surface, qui s'oppose naturellement à la fusion. Des protéines spécialisées ou des lipides imposant une courbure favorable peuvent faciliter cette transition en réduisant l'énergie requise.^{31,36,41} À mesure que le pore s'agrandit, la courbure locale diminue, ce qui entraîne une réduction de la tension au niveau du diaphragme. Une fois cette structure stabilisée, les parties

hydrophobes des lipides peuvent s'assembler complètement, assurant la fusion totale des membranes et permettant un échange libre des contenus (*Figure 1.7 E*). Enfin, la taille du pore dépend de la tension mécanique au bord du diaphragme : Une faible tension conduit à des pores petits, instables ou transitoires, tandis qu'une forte tension favorise l'ouverture d'un pore plus large.^{37,38}

En conclusion, les interactions hydrophobes jouent un rôle fondamental non seulement dans l'organisation initiale des lipides mais aussi dans la manière dont les bicouches se réarrangent lors de la formation des intermédiaires de fusion, ce qui explique les similitudes observées dans les différents mécanismes de fusion en biologie.^{10,30,36} Néanmoins, même si le *stalk* et l'ouverture du pore sont des modèles approuvés par la communauté scientifique, des simulations ont également mis en évidence d'autres voies de fusion.^{10,35,42} Il est également important de rappeler que, les bicouches lipidiques étant en phase fluide, tout fluctue et la « forme » des intermédiaires correspond en réalité à un agencement moyen de molécules.⁴¹

2. Les liposomes

a. Définition et structure des liposomes

Les liposomes, décrits pour la première fois par D. Bangham⁴³ en 1964, sont des vésicules sphériques constituées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques entourant un cœur aqueux.⁴⁴⁻⁴⁷ De par leur structure, les liposomes ont la capacité de retenir des molécules hydrophiles dans leur cœur (*Figure 1.10 A*) et des molécules hydrophobes dans leur membrane (*Figure 1.10 B*). Certaines molécules peuvent également être chimiquement liées aux feuillettes externes et/ou internes du liposome par fonctionnalisation des lipides.⁴⁷

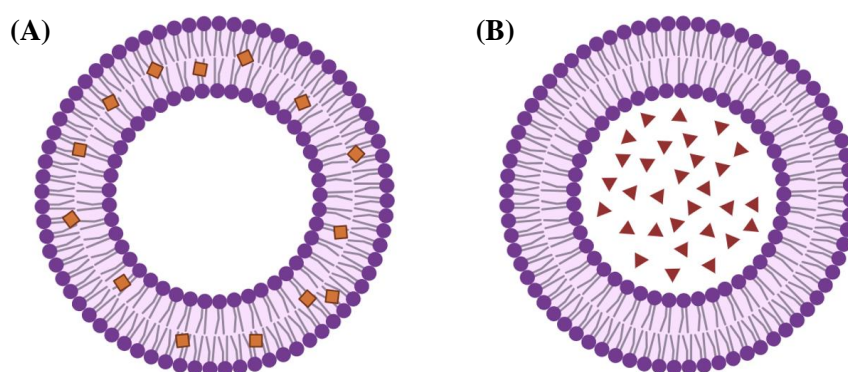


Figure 1.10 : Liposomes encapsulant (A) des molécules hydrophobes dans la bicouche lipidique ou (B) des molécules hydrophiles dans le cœur aqueux.

Les liposomes sont principalement composés de phospholipides, qui, comme décrit précédemment, sont des molécules amphiphiles possédant une tête hydrophile et deux chaînes apolaires hydrophobes. Il existe une grande variété de phospholipides synthétiques ayant des têtes polaires de nature chimique très variée (**Tableau 1.1**) et des longueurs de chaînes variables, avec un nombre d'insaturations pouvant aller jusqu'à 6 doubles liaisons.^{47,48} Les phospholipides formés à partir de tête choline, éthanolamine ou sérine sont les plus utilisés pour la préparation des liposomes.^{49,50} Du cholestérol peut également être ajouté au mélange afin de modifier la fluidité et la perméabilité membranaire.

Lipides	Nom complet	Structure
DOPC	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	
DOTMA	1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium propane (chloride salt)	
POPG	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt)	
DOPE-PEG (2000) Azide	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[azido(polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt)	

Tableau 1.1 : Exemples de phospholipides synthétiques, avec des têtes polaires variées, très utilisés dans la littérature : zwitterionique (DOPC), cationique (DOTMA), anionique (POPG), et dérivé avec du PEG (DOPE-PEG(2000) azide).

En milieu aqueux, les phospholipides s'auto-assemblent car d'une part, leurs têtes polaires préfèrent interagir avec le milieu aqueux et d'autre part, leurs longues chaînes aliphatiques apolaires favorisent leur interaction mutuelle par interaction hydrophobe.^{44-48,51} Le paramètre d'empilement (P) introduit par Israelachvili et al.⁵¹ en 1976 permet de décrire et prédire l'auto-assemblage des lipides à partir de leur paramètre de forme. Le paramètre d'empilement est défini par la relation suivante⁵² :

$$P = \frac{v}{l \cdot a}$$

où v est le volume occupé par les chaînes hydrocarbonées, l est la longueur des chaînes hydrocarbonées et a est l'aire occupée par la tête polaire du lipide à l'interface avec l'eau.

Chapitre 1 : État de l'art

À partir de la valeur de ce paramètre d'empilement, il est possible de prédire les structures formées par les différents lipides (forme cylindrique, conique ou conique inversée) (**Figure 1.11 A**). Les phospholipides de forme cylindrique auront des paramètres d'empilement dont la valeur est proche de 1 et formeront des bicouches. En revanche, des lipides de forme conique avec des paramètres d'empilement beaucoup plus faibles ($p < 1$) s'organiseront en micelles directes. Des lipides avec des chaînes hydrophobes très encombrantes ($p > 1$) favoriseront la formation de micelles inverses ou de phase hexagonale inverse (**Figure 1.11 B**). Ce modèle ne repose que sur des considérations géométriques^{47,51}, une modification de composition, température, pH et force ionique du milieu peut entraîner des changements dans la valeur du paramètre d'empilement.

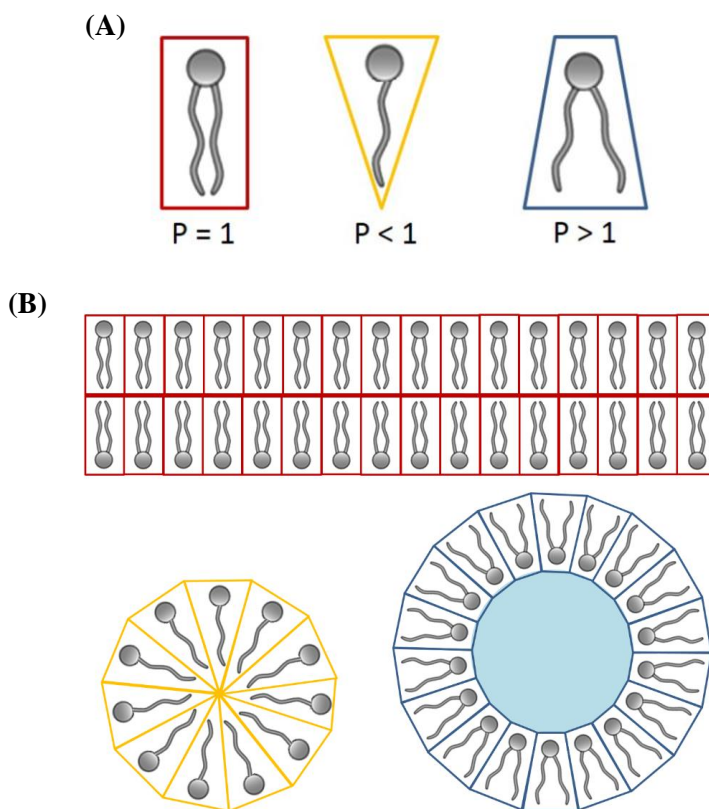


Figure 1.11 : Schéma issu de la thèse de Claire François-Martin¹⁰ qui montre (A) les structures de phospholipides en forme de cylindre, cône ou cône inversé avec la valeur du paramètre d'empilement correspondant et (B) l'auto-organisation des phospholipides en bicouche plane (rouge), micelle directe (jaune) et micelle inverse (bleu).

b. Classification des liposomes et méthodes de synthèse

Les liposomes peuvent être classés en fonction de leur taille et de leur nombre de bicouches, appelé lamellarité, en quatre groupes. Les liposomes constitués de plusieurs bicouches concentriques avec de l'eau emprisonnée entre elles sont appelés vésicules multilamellaires (MultiLamellar Vesicles - MLV) et ont un diamètre variant de 0,5 à 5 μm alors que ceux constitués d'une seule bicouche lipidique concentrique sont dits vésicules unilamellaires. Le critère de taille permet de les classer en Small Unilamellar Vesicles (SUV) avec une taille comprise entre 20 et 100 nm, en Large Unilamellar Vesicles (LUV) avec une taille variant entre 100 et 1000 nm et en Giant Unilamellar Vesicles (GUV) avec une taille supérieure au micron (*Figure 1.12*).⁴⁴⁻⁴⁷

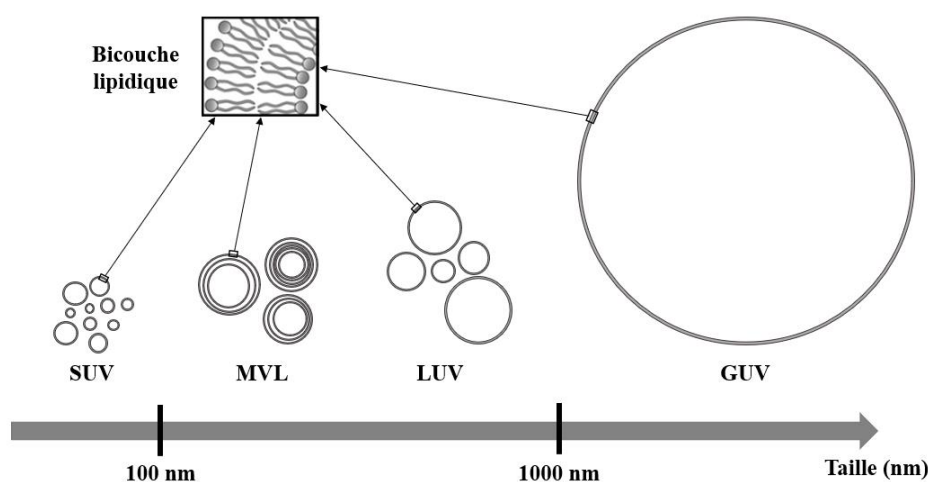


Figure 1.12 : Schéma adapté de la thèse de Claire François-Martin¹⁰ montrant la classification des liposomes en fonction de leur taille et de leur lamellarité.

La formation de vésicules unilamellaires ou multilamellaires dépend essentiellement des méthodes de synthèse et des traitements post-synthèse utilisés pour leur préparation.^{44,46} Les techniques conventionnelles comprennent généralement quatre étapes principales : le séchage des lipides à partir de solvants organiques, la dispersion des lipides dans un milieu aqueux, la purification des liposomes obtenus et éventuellement des post-traitements. La méthode de l'hydratation en couche mince (TLH) ou méthode de Bangham est la première méthode de préparation des liposomes décrite dans la littérature et est la technique la plus utilisée (*Figure 1.13*).^{46,48,53} La préparation des liposomes commence généralement par la dissolution des lipides dans un solvant organique, suivie de l'évaporation de ce solvant. On obtient ainsi un film lipidique sec, qui est ensuite hydraté avec une solution aqueuse. Ce processus conduit à la

formation de MLV, de tailles hétérogènes et à une structure non uniforme. Des traitements supplémentaires sont nécessaires pour réduire la taille des vésicules et obtenir des vésicules unilamellaires homogènes. Parmi les techniques les plus courantes utilisées pour fragmenter les MLV, on retrouve la sonication, l'extrusion à travers des membranes poreuses et l'homogénéisation à haute pression. Pour obtenir spécifiquement des LUV à partir de MLV, l'extrusion membranaire est souvent privilégiée. Cette méthode consiste à faire passer les liposomes à travers une membrane filtrante de porosité définie, ce qui permet de contrôler et réduire leur taille (*Figure 1.13*).

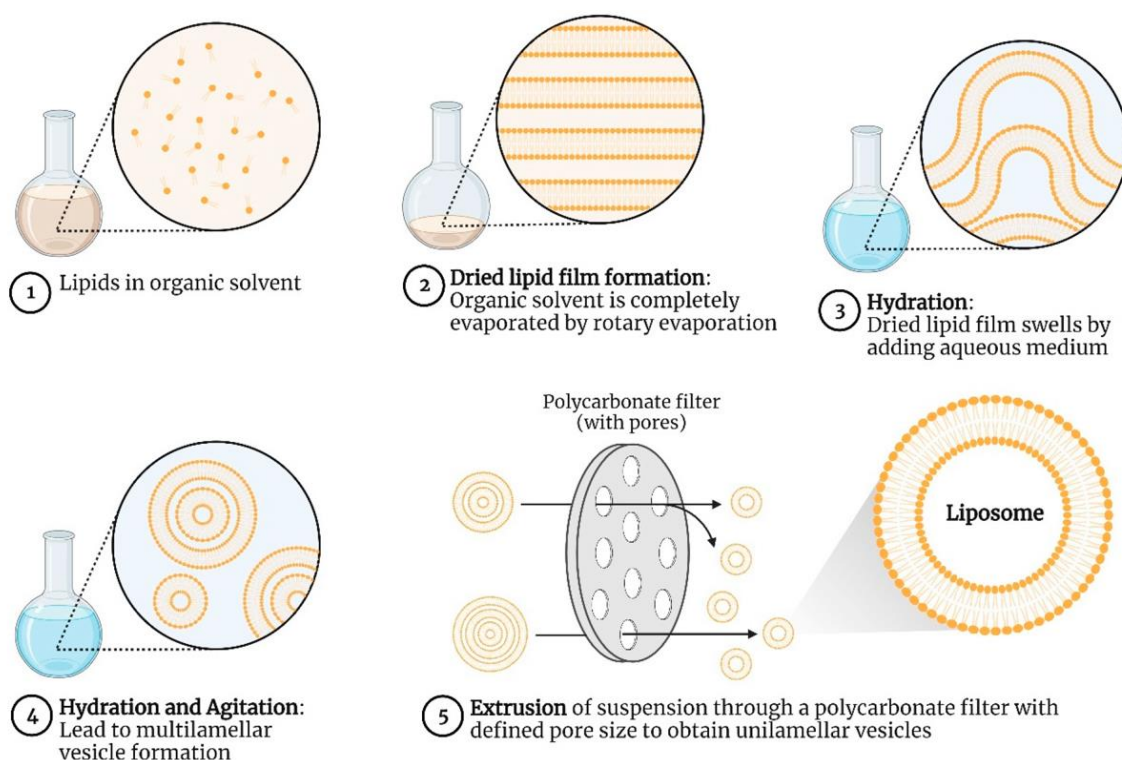


Figure 1.13 : Schéma issu de la publication de Karunakaran et *al.*⁵³, illustrant la méthode d'hydratation en couche mince utilisée pour la fabrication de liposomes.

D'autres méthodes existent pour synthétiser des LUV comme les méthodes d'évaporation en phase inverse (REV), d'injection de solvant, la technique de déshydratation-réhydratation, ou les méthodes micro-fluidiques qui représentent une technologie émergente pour la synthèse de liposomes.⁴⁸

En ce qui concerne les GUV, les méthodes de préparation sont légèrement différentes (*Figure 1.14*). La méthode la plus utilisée est l'électroformation qui consiste à déposer une solution lipidique en phase organique sur des électrodes conductrices puis à hydrater le film sous champ électrique pour former progressivement les GUV.⁵⁴⁻⁵⁶ Il existe également une

alternative plus simple qui est la formation spontanée assistée par gel. Cela consiste à laisser sécher du PVA (alcool polyvinylique) sur une lamelle de verre, pour y déposer le mélange lipidique, après séchage du film lipidique sous vide, il est réhydraté lentement avec le solvant adéquat pour laisser les GUV se former naturellement.^{55,56}

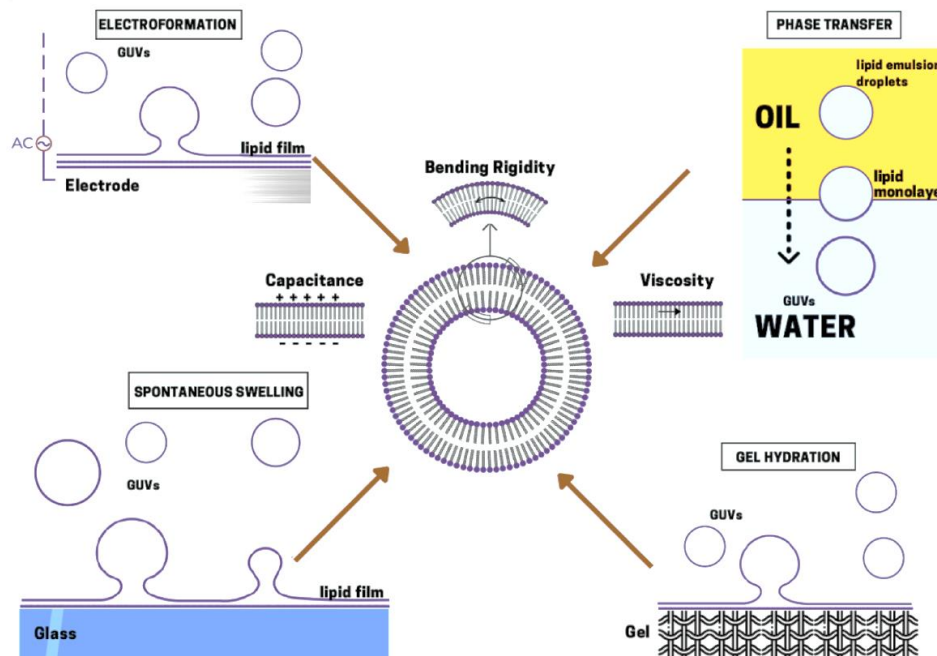


Figure 1.14 : Schéma issu de la publication de Faizi et *al.*⁵⁶ des méthodes de préparation des GUV qui sont le gonflement spontané, l'électroformation, l'hydratation sur gel et la méthode de transfert de phase.

La taille et la lamellarité des liposomes influencent fortement leur champ d'application spécifique. Les MLV sont principalement utilisées dans des études biophysiques, en particulier pour analyser l'organisation des bicouches lipidiques et les propriétés mécaniques ou thermodynamiques des membranes.^{44,48} Les LUV possèdent un grand volume aqueux interne, ce qui les rend particulièrement adaptées à l'encapsulation de composés hydrophiles, comme certains médicaments. Une application emblématique est celle du Doxil®, utilisée dans le traitement de certains cancers.⁵⁷ Le principal avantage des LUV est de réduire la toxicité systémique de la doxorubicine, tout en améliorant son ciblage tumoral. Les GUV sont surtout utilisées comme modèles cellulaires, en raison de leur taille comparable à celle des cellules eucaryotes. Elles sont particulièrement utiles pour l'étude des protéines membranaires et des phénomènes d'interaction membrane/protéine.^{44,45}

c. Propriétés biophysiques des membranes liposomales

i. Fluidité membranaire

La fluidité membranaire est définie comme l'aptitude des composants de la membrane cellulaire (principalement les lipides et les protéines) à se mouvoir au sein de la membrane.^{2,12,45} La fluidité de la membrane permet à ses constituants de diffuser et de se réorganiser suite à des changements de l'environnement.

Les phospholipides présentent une température de transition de phase correspondant à des changements conformationnels de leurs chaînes hydrocarbonées. Cette transition est un phénomène réversible, correspondant au passage d'un état ordonné (phase L_{β} , ou gel) à un état désordonné (phase L_{α} , ou fluide) (**Figure 1.15**).^{44,45} À une température inférieure à la température de transition (T_m), les chaînes hydrocarbonées sont principalement en conformation trans, ce qui les rend étirées et parallèles les unes aux autres (**Figure 1.15 A**). Dans cette phase gel, la bicouche lipidique est rigide, les molécules sont peu mobiles, et la fluidité membranaire est faible.^{44,45} Lorsque la température dépasse T_m , les chaînes deviennent plus flexibles et adoptent des conformations désordonnées. Elles s'étendent latéralement, ce qui augmente la distance entre les phospholipides (**Figure 1.15 B**). Dans cette phase fluide, les chaînes lipidiques gagnent en mobilité, ce qui améliore la fluidité membranaire, facilite les échanges de molécules, et favorise les phénomènes de fusion membranaire.⁵⁸

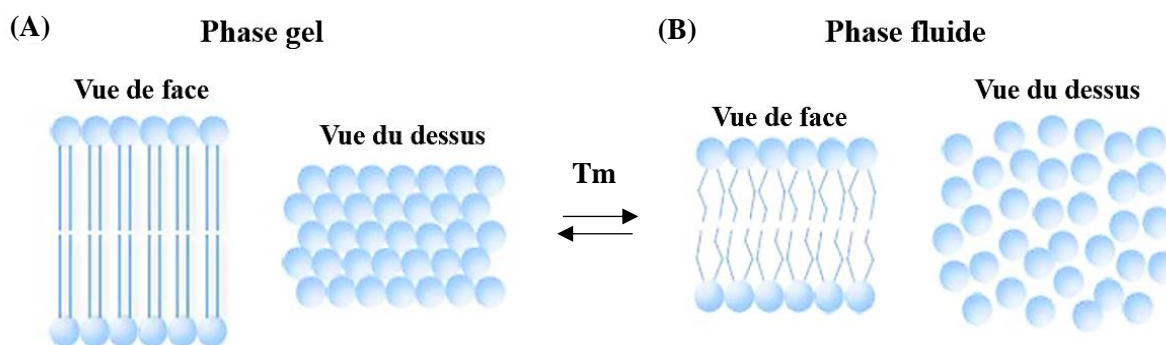


Figure 1.15 : Illustration de la bicouche lipidique dans (A) la phase gel (état ordonné) et (B) la phase fluide (état désordonné), issus de la publication de Sassaroli *et al.*⁵⁹.

La composition lipidique influence fortement la température de transition de phase des membranes, et par conséquent leur fluidité. Cette température dépend principalement de deux facteurs structuraux des phospholipides : la longueur et le degré d'insaturation des chaînes d'acides gras. Plus les chaînes sont longues, plus les interactions de Van der Waals entre elles

sont importantes, ce qui augmente la température de transition. À l'inverse, un plus grand nombre de liaisons insaturées introduit des coudes dans les chaînes, augmentant le désordre et réduisant les interactions entre lipides, ce qui diminue la température de transition.^{44,45,58} Le cholestérol joue également un rôle majeur dans la régulation de la fluidité membranaire puisqu'en phase gel, il perturbe l'empilement rigide des chaînes lipidiques, ce qui augmente la fluidité. Alors qu'en phase fluide, il limite les mouvements latéraux des lipides, contribuant ainsi à rigidifier la membrane. Le cholestérol a pour effet global d'élargir la plage de température où coexistent des zones en phase gel et fluide, sans modifier significativement la température de transition elle-même.^{19,60} Enfin, des paramètres environnementaux comme le pH peuvent également influencer le comportement des membranes lipidiques. Des variations de pH modifient les interactions électrostatiques entre les têtes polaires, ce qui peut à son tour affecter la température de transition de phase.⁶¹

La fluidité membranaire joue un rôle essentiel dans la dynamique des lipides et des protéines au sein des membranes lipidiques (*Figure 1.16*). Elle permet notamment le déplacement latéral des lipides dans le plan de la bicouche, un phénomène rapide, avec des vitesses de diffusion de l'ordre de quelques $\mu\text{m}^2/\text{s}$.⁶² En revanche, le passage des lipides d'une monocouche à l'autre (appelé flip-flop) est beaucoup plus lent, car il implique le transfert du groupe polaire à travers le cœur hydrophobe de la membrane, ce qui est énergétiquement défavorable. Sans assistance enzymatique, ce processus peut prendre jusqu'à 24 heures.^{63,64}

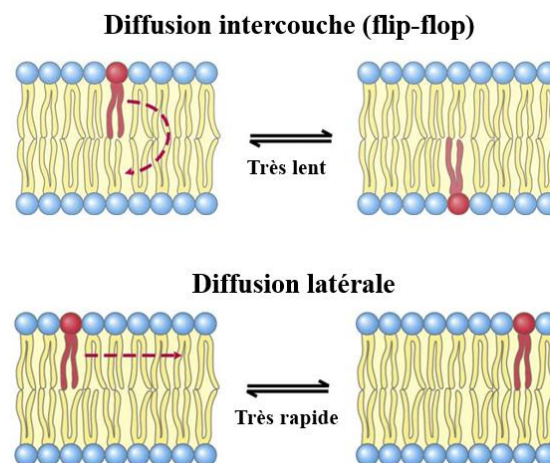


Figure 1.16 : Schéma issu des travaux de Nelson et al.⁶⁵, de la diffusion des phospholipides dans une bicouche fluide.

ii. Perméabilité membranaire

La perméabilité membranaire est une propriété essentielle, qui désigne la capacité d'une membrane à réguler le passage des solutés et des solvants vers l'intérieur et l'extérieur des cellules. La bicouche lipidique constitue une barrière semi-perméable dont la capacité à laisser passer des molécules dépend fortement de leur taille, de leur charge, de leur polarisabilité et de leur hydrophobicité. En l'absence de protéines ou de pores, la perméabilité passive repose essentiellement sur le mécanisme de solubilité-diffusion, dans lequel le soluté doit d'abord s'insérer dans la région hydrophobe centrale de la membrane pour ensuite diffuser à travers celle-ci.^{66,67}

L'eau traverse la bicouche malgré sa polarité, probablement grâce à des pores transitoires induits par les fluctuations thermiques.⁶⁸ Les gaz neutres comme O₂, CO₂ et N₂, du fait de leur petite taille et de leur bonne solubilité dans la phase lipidique, diffusent rapidement à travers la membrane.⁶⁹ En revanche, les ions inorganiques comme Na⁺, K⁺ ou Cl⁻ traversent difficilement la membrane en raison de leur forte hydratation, rendant leur passage dans la phase hydrophobe thermodynamiquement défavorable.⁷⁰ La perméabilité élevée des protons, et dans une moindre mesure des ions OH⁻, pourrait s'expliquer par des mécanismes spécifiques de transfert via des liaisons hydrogène.⁶⁸ Les petites molécules neutres, telles que l'urée, l'éthanol ou le glycérol, présentent une perméabilité intermédiaire, fortement corrélée à leur solubilité lipidique et à leur taille. Il a été démontré que cette perméabilité diminue avec l'augmentation du volume moléculaire et du nombre de groupes polaires.^{66,71} La perméabilité de ces molécules est résumée dans la **Figure 1.17**.

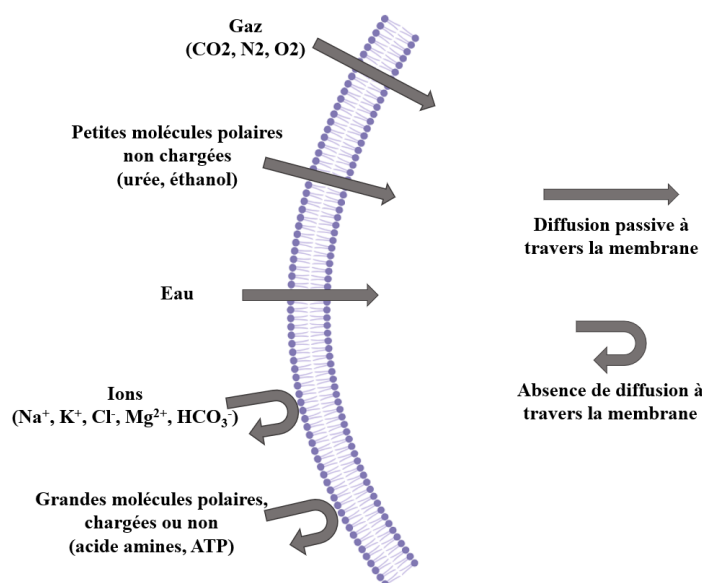


Figure 1.17 : Schéma de la perméabilité de la bicouche lipidique, adapté de Lingappa et al.⁷².

Enfin, la perméabilité des membranes est modulée par la composition lipidique : la longueur des chaînes d'acides gras, leur degré d'insaturation, ainsi que la présence de cholestérol exercent un impact direct sur les propriétés de diffusion à travers la bicouche.^{73,74} Il existe une relation directe entre fluidité membranaire et perméabilité. En dessous de la température de transition (T_m) une bicouche est globalement imperméable même à l'eau. En revanche, au-dessus de T_m , la membrane devient fluide et la perméabilité augmente.⁷³ Enfin, le cholestérol agit comme un régulateur de la fluidité. La présence de cholestérol rend généralement la bicouche moins perméable.⁷⁵

iii. Courbures de membranes

La courbure d'une bicouche lipidique est définie comme étant la déformation de celle-ci hors de son plan. Lors de cette déformation, les lipides des feuillettes internes et externes ne subissent pas la même contrainte ; dans un des feuillettes, les têtes polaires des lipides vont s'écarter ; dans l'autre, elles vont se comprimer. Le terme de courbure positive ou négative est associé à la direction dans laquelle la membrane se courbe. Si la membrane se courbe vers l'extérieur des queues hydrophobes, on parle de courbure positive (**Figure 1.18, vert**). Si la membrane se bombe vers l'intérieur des queues hydrophobes, la courbure est dite négative (**Figure 1.18, violet**).^{10,76}

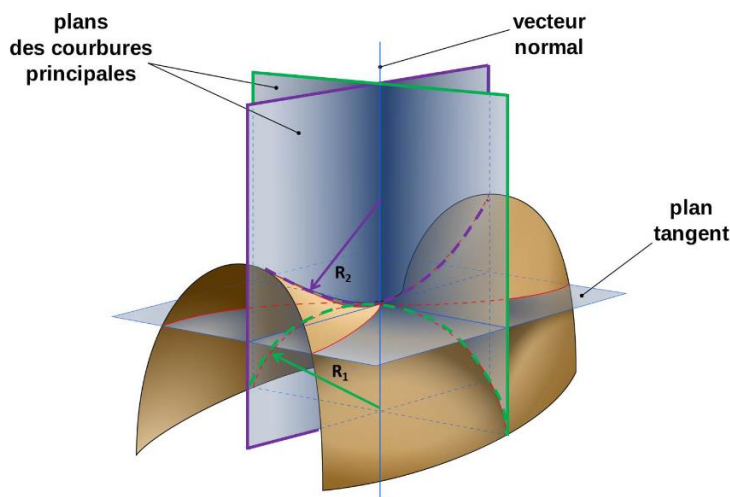


Figure 1.18 : Modèle de la selle de cheval, permettant d'illustrer une courbure positive (vert) et une courbure négative (violet), issu de la thèse de Claire François-Martin¹⁰.

La courbure membranaire est fortement influencée par la géométrie des lipides qui composent la bicouche. En fonction du rapport entre la taille de la tête polaire et celle des

Chapitre 1 : État de l'art

chaînes hydrophobes, les lipides adoptent différentes formes moléculaires, cylindrique, conique, ou cône inversé, qui conditionnent leur comportement dans les membranes.^{42,51,77}

Les liposomes classiques sont généralement constitués de lipides cylindriques, comme la phosphatidylcholine (PC) ou la phosphatidylsérine (PS), dans lesquels la tête polaire est de taille comparable aux queues hydrophobes. Ces lipides ont une courbure préférentielle proche de zéro, ce qui favorise la formation de bicouches planes et stables, comme celles observées dans les membranes biologiques (**Figure 1.19 A**).²⁰ En revanche, certains lipides, tels que la phosphatidyléthanolamine (PE) ou le dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE), ont une forme de cône inversé (petite tête, larges queues), ce qui induit une courbure négative lorsqu'ils sont localisés sur le feuillet interne de la bicouche (**Figure 1.19 B**). À l'opposé, des lipides comme les lysolipides ou le phosphatidylinositol triphosphate (PIP3), à géométrie de cône (grande tête et une seule queue), favorisent une courbure positive lorsqu'ils sont situés sur le feuillet externe (**Figure 1.19 C**).^{21,78,79}

Ce couplage entre forme lipidique et courbure membranaire est au cœur de nombreux processus cellulaires comme la fusion, la fission, ou le bourgeonnement vésiculaire. Des études théoriques et de simulation⁷⁷ ont montré que ces lipides se distribuent préférentiellement dans les zones où la courbure locale correspond à leur géométrie : les lipides à courbure négative s'accumulent dans les zones concaves (comme les cols de fusion), et ceux à courbure positive dans les zones convexes (bourgeonnements). Ainsi, la composition asymétrique en lipides d'un liposome ou d'une membrane permet de moduler finement sa courbure, et par conséquent sa capacité à initier ou faciliter la fusion membranaire, un mécanisme particulièrement exploité dans le cadre des liposomes fusogènes.

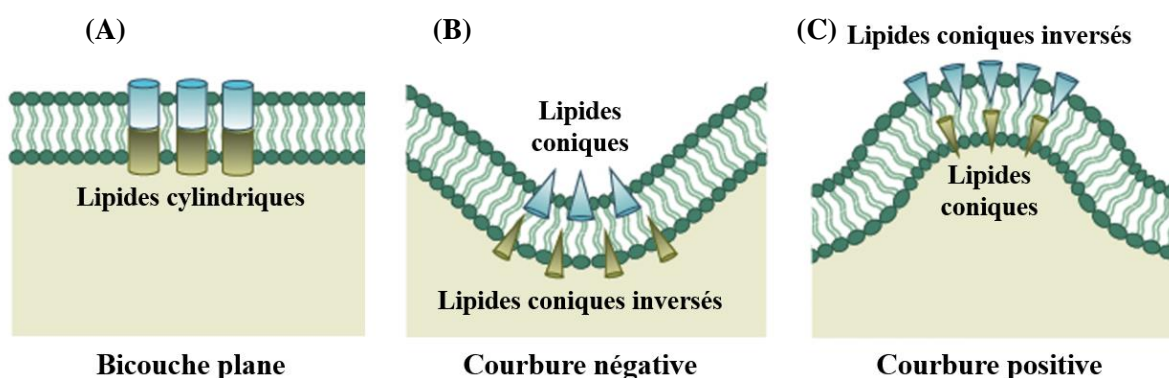


Figure 1.19 : Schéma des courbures de membranes (A) plane, (B) négative et (C) positive induite par la présence de lipides cylindriques, coniques inversés et coniques.⁸⁰

En résumé, la courbure des bicouches lipidiques est un phénomène dynamique influencé par la géométrie des lipides. C'est une propriété essentielle des structures lipidiques, qui influence leur stabilité, leur dynamique et leurs fonctions biologiques. Cette courbure membranaire va avoir par exemple une importance dans la fusion des liposomes.

3. Les liposomes fusogènes

a. Définition et propriétés

La structure initiale des liposomes, constituée d'une simple bicouche lipidique, a été enrichie au fil du temps par des éléments capables d'améliorer leurs fonctions d'administration ou de ciblage (*Figure 1.20*). Ainsi, la nouvelle génération de liposomes, dont la surface peut être modifiée de diverses manières : fixation d'un polymère protecteur (avec un anticorps à son extrémité), ajout d'un marqueur diagnostique, introduction de lipides chargés positivement, incorporation de lipides ou polymères sensibles aux stimuli, inclusion de peptides pénétrant les cellules ou encore intégration de composants viraux, a vu le jour.^{44,48,81-83}

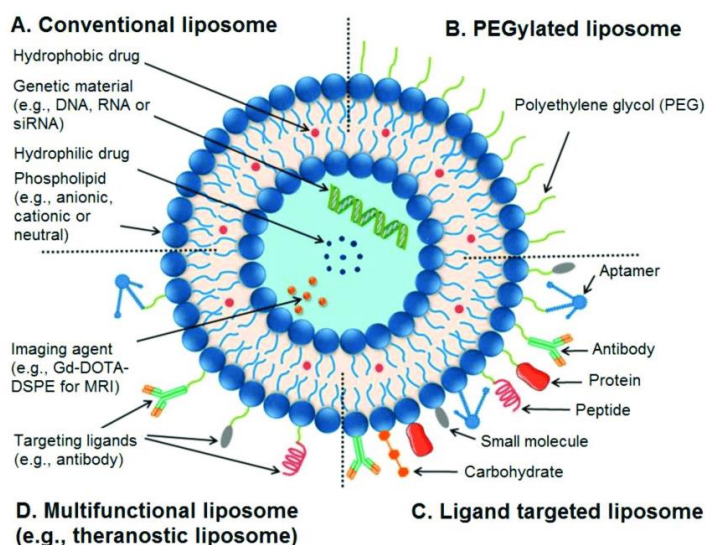


Figure 1.20 : Structure des liposomes (A) conventionnels constitués de phospholipides ; (B) PEGylés / furtifs contenant une couche de polyéthylène glycol (PEG) ; (C) ciblés, contenant un ligand spécifique permettant de viser un site tumoral ; (D) multifonctionnels, pouvant être utilisés à la fois pour le diagnostic et le traitement des tumeurs solides. Schéma issu des travaux de Olusanya et al.⁸¹

Les liposomes fusogènes ont, quant à eux, été conçus pour permettre aux liposomes de fusionner avec des membranes biologiques. Leur principal avantage réside dans leur capacité à libérer leur contenu directement dans le cytoplasme des cellules, améliorant ainsi l'efficacité,

la biodisponibilité et le ciblage des médicaments anticancéreux, thérapies géniques et vaccins et réduisant la perte de principe actif.^{46,82,83} Contrairement aux liposomes classiques, qui libèrent leur contenu par endocytose, les liposomes fusogènes vont fusionner directement avec la membrane cellulaire grâce à des modifications spécifiques de leur bicouche lipidique^{39,40}, qui peuvent consister soit en l'ajout de molécules fusogènes biomimétiques dans la bicouche lipidique, soit en utilisant des lipides à caractère fusogène.⁸⁴⁻⁸⁸

b. Différentes stratégies de fusogénicité

Une première stratégie développée pour induire la fusion membranaire de liposomes repose sur l'intégration de molécules fusogènes biomimétiques dans leur bicouche lipidique. Ces molécules, inspirées des mécanismes de fusion naturels observés dans le vivant, permettent de reproduire ou de stimuler artificiellement le processus de fusion.

Parmi les plus étudiées figurent les peptides dérivés de protéines virales de fusion, telles que la protéine gp41 du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou l'hémagglutinine (HA) du virus de la grippe. Ces peptides sont capables de perturber localement la bicouche lipidique et de favoriser la transition vers des états intermédiaires de fusion, notamment la formation du stalk lipidique.^{42,86,89} Les peptides dérivés de gp41, par exemple, adoptent une conformation en hélice α qui s'insère profondément dans la membrane cible, réduisant ainsi l'énergie d'activation de la fusion.^{86,87} De même, les fragments de l'hémagglutinine virale (HA2) déclenchent une déformation locale de la membrane en réponse à une baisse de pH, mimant le processus de fusion dans les endosomes.⁸⁸

Outre ces peptides, l'introduction de protéines SNARE dans les liposomes permet de reproduire les mécanismes de fusion synaptique observés dans les cellules eucaryotes.^{84,85} Les protéines SNARE interagissent de manière hautement spécifique et dirigent l'accolement et la fusion des membranes via la formation d'un complexe tétramérique SNARE, générant une force mécanique suffisante pour surmonter la barrière énergétique de la fusion lipidique.^{41,84,85}

Enfin, des stratégies plus récentes impliquent l'utilisation de peptides coiled-coil modifiés capables de s'insérer dans les membranes lipidiques et de déclencher la fusion via des interactions hydrophobes ou électrostatiques modulées.^{90,91} Ces peptides coiled-coil, caractérisés par leur structure hélicoïdale enroulée favorisant une reconnaissance spécifique, sont souvent greffés à une ancre lipidique permettant leur insertion stable dans la bicouche des liposomes (*Figure 1.21*). Une fois insérés, ils favorisent la fusion membranaire en rapprochant

les membranes cibles par appariement complémentaire, une stratégie démontrée efficace pour la fusion liposome–liposome ou liposome–cellule.^{90,91}

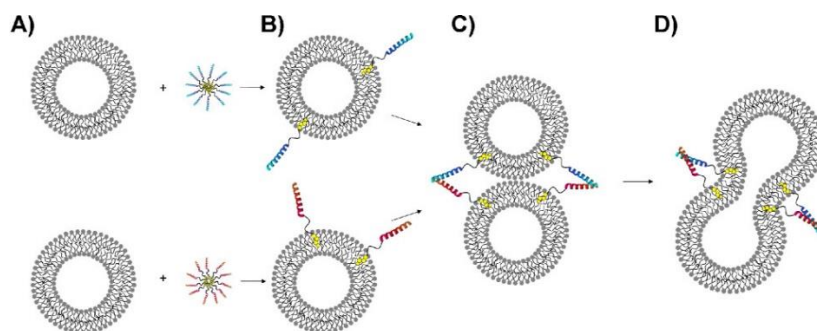


Figure 1.21 : Schéma de la fusion membranaire induite par les coiled coils.⁹⁰ (A) Des liposomes simples sont modifiés avec des peptides amphiphiles pour former des liposomes fusogènes. (B) Ces peptides s'insèrent dans la membrane des liposomes. (C) Les peptides complémentaires s'associent ensuite en coiled-coils. (D) Cette interaction déclenche la fusion des membranes.

La deuxième stratégie consiste à utiliser directement des lipides fusogènes pour constituer la bicouche des liposomes. Ces lipides, capables de favoriser les courbures négatives ou induire des transitions de phase non lamellaires, réduisent l'énergie de formation des intermédiaires de fusion (stalk, diaphragme d'hémifusion, pore) et facilitent ainsi le processus de fusion membranaire.^{21,61,77,78} Même si cette approche ne permet pas une fusion ciblée ou sensible à un stimulus (pH, reconnaissance cellulaire) et comporte un risque de fusion non spécifique, potentiellement problématique pour des applications thérapeutiques ciblées^{86,88}, cette stratégie, qui sera au cœur de notre thèse, présente plusieurs avantages. La formulation liposomale basée sur des lipides est plus facile à produire, moins onéreuse, et les liposomes sont généralement plus stables physiquement que ceux intégrant des peptides ou protéines fusogènes.⁴⁶ La composition lipidique permet de moduler la rigidité, la fluidité et la facilité de courbure de manière précise, influençant directement la dynamique de fusion.⁹²

c. Les phospholipides fusogènes

L'aspect fusogène des phospholipides est principalement lié à leurs propriétés physiques et chimiques, qui leur permettent de faciliter la fusion des membranes. Ainsi, la température de transition de phase des lipides, la fluidité et la courbure de la bicouche lipidique sont des propriétés essentielles au mécanisme de fusion.²¹ Tous ces processus sont régis par la nature des lipides utilisés (géométrie, charges), mais également par le milieu environnant (hydratation, température).⁹³ Pour des conditions de fusion optimales, il est nécessaire que plusieurs paramètres physico-chimiques soient bien ajustés.

Idéalement, la membrane doit être en phase fluide. Pour cela, la température de transition de phase (T_m) des lipides doit être inférieure ou proche de la température physiologique (37 °C). Les lipides insaturés, à chaînes courtes, ou portant des têtes polaires volumineuses ou chargées, présentent généralement une faible T_m et sont donc plus susceptibles d'être en phase fluide à 37 °C.⁹³ Ensuite, la composition des bicouches lipidiques joue un rôle crucial dans la fusion. Même si les liposomes sont souvent constitués de lipides à géométrie cylindrique formant des phases lamellaires stables, l'introduction de lipides coniques ou coniques inversés, qui, seuls, ne formeraient pas de phase lamellaire, permet de générer des défauts dans la bicouche, facilitant la formation des intermédiaires de fusion comme le *stalk*.^{21,30,36,94} Un lipide en forme de cône inversé, situé sur le feuillet externe, va induire une courbure négative, favorable à l'apparition du *stalk*. C'est le cas, par exemple, du DOPE (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), des phosphatidyléthanolamines (PE), des acides phosphatidiques (PA), du cholestérol, ou encore des diacylglycérols (DAGs).⁹⁵ À l'inverse, des lipides en forme de cône, comme la phosphatidylinositol (PI) ou la lysophosphatidylcholine (LPC), induisent une courbure positive.⁹⁶ Bien que leur présence sur le feuillet externe ne favorise pas la formation du *stalk*, leur incorporation dans le feuillet interne facilite la dernière étape de la fusion : la formation du pore de fusion.^{97,98}

Dans la littérature, de nombreux exemples montrent que les liposomes cationiques présentent également des propriétés fusogènes.⁹⁹ Cette stratégie a d'abord été exploitée pour la mise au point de lipoplexes, des complexes formés entre des lipides cationiques et des acides nucléiques (ADN ou ARN) via des interactions électrostatiques.¹⁰⁰⁻¹⁰³ Les lipides cationiques les plus fréquemment utilisés sont le DOTAP (1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium-propane) et le DOTMA (N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium chloride).¹⁰⁴

d. Exemples d'utilisation de liposomes fusogènes en santé

Ces dernières années, les formulations à base d'ARN ou de protéines sont devenues des modalités thérapeutiques de premier ordre pour le traitement du cancer, des maladies inflammatoires ou des vaccins en raison de leur spécificité.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ Néanmoins, ces formulations doivent faire face à un obstacle majeur qui est le passage de la membrane plasmique et l'emprisonnement endosomal, limitant leur délivrance dans le cytosol. Les liposomes fusogènes de composition lipidique variée peuvent être une solution pour délivrer ces molécules directement dans le cytosol des cellules en fusionnant avec leur membrane plasmique.¹⁰⁵⁻¹⁰⁸

Dans l'article de Kube et *al.*¹⁰⁵, des liposomes fusogènes, constitués de DOTAP, ont été utilisés pour délivrer des protéines hydrosolubles dans le cytoplasme de cellules vivantes, par fusion des membranes (**Figure 1.22 A**). Par microscopie confocale, ils ont prouvé que les cellules ovariennes de hamster (CHO) incubées avec des liposomes fusogènes encapsulant des protéines entraînent la fusion des liposomes fusogènes avec les cellules (traceur lipidique DiR à la membrane des CHO), ainsi que l'internalisation des protéines dans les cellules (**Figure 1.22 B**). La taille (2,3 kDa, 27 kDa et 240 kDa), la charge et la concentration des protéines ont également été modifiées, afin d'élucider l'impact de ces paramètres sur la délivrance cytoplasmique des protéines. Les résultats indiquent que les différentes tailles des protéines testées n'influencent pas leur délivrance dans le cytoplasme ; néanmoins, plus les protéines ont des poids moléculaires élevés, plus la concentration délivrée est faible. Concernant la charge des protéines, les auteurs ont montré que les liposomes fusogènes chargés positivement encapsulent davantage de protéines chargées négativement, en raison de l'interaction électrostatique favorable entre les liposomes cationiques et les protéines chargées négativement. Pour finir, ils ont démontré que seuls les liposomes fusogènes conservant un potentiel de surface positif suffisant (ici +25 mV) pouvaient se fixer efficacement à la surface cellulaire chargée négativement, pour ensuite fusionner et délivrer leur contenu.

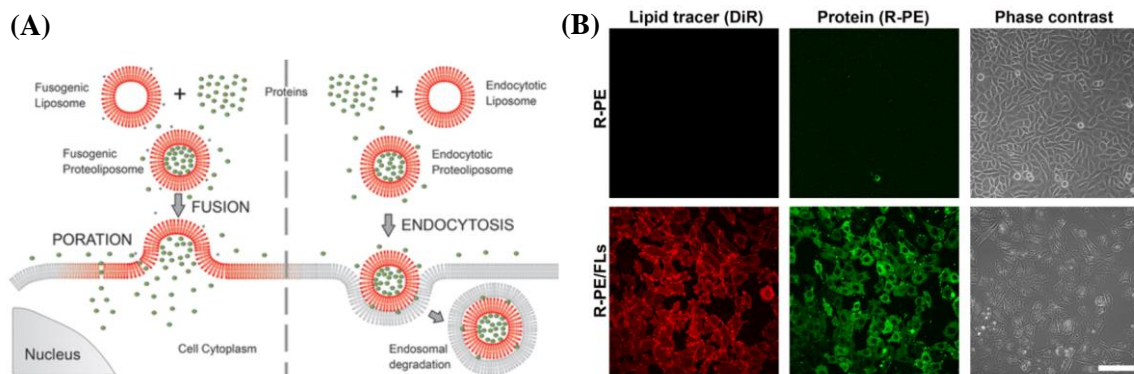


Figure 1.22: (A) Comparaison de la délivrance potentielle de protéines par des liposomes fusogènes et par endocytose, (B) Cellules CHO incubées avec une solution de protéines (ligne du haut) ou avec des protéines encapsulées dans des liposomes fusogènes (ligne du bas), à la même concentration. La microscopie optique a enregistré le traceur lipidique DiR (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetraméthylindotricarbocyanine Iodide) (colonne de gauche), la fluorescence de la protéine (colonne du milieu), ainsi que l'aspect général des cellules en contraste de phase (colonne de droite). L'échelle (100 μm) est valable pour toutes les images.

L'étude de Zhao *et al.*¹⁰⁶ fait intervenir des liposomes fusogènes (MF-LNV), constitués de lipide DSPE-Arg5 (1,2-Distearoyl-snglycero-3-phosphoethanolamine-NH-succinic anhydride-Arg-Arg-Arg-Arg), afin de délivrer de l'ARNm et des protéines (ovalbumine) directement dans le cytoplasme de cellules dendritiques (BMDC). Les liposomes fusogènes se rapprochent de la membrane cellulaire à l'aide d'une voie médiée par la clathrine, puis, l'oligoarginine présent à la surface des liposomes fusogènes se lie au récepteur membranaire CEACAM1 avec une forte affinité, induisant l'insertion et la fusion des liposomes avec la membrane cellulaire. Finalement, le contenu des liposomes est délivré dans le cytoplasme, libérant l'ARNm ou la protéine, en contournant les endosomes et les lysosomes (**Figure 1.23 A**). La fusion de ces liposomes (MF-LNV) incubés avec les cellules dendritiques a été montrée par imagerie confocale avec transfert de fluorophores membranaires, et absence de colocalisation avec les endosomes (**Figure 1.23 B**). De plus, la microscopie montre le relargage de l'ARNm (**Figure 1.23 C**) et de l'ovalbumine (**Figure 1.23 D**) dans le cytosol cellulaire. Les expériences ont montré que les liposomes fusogènes chargés en ARNm induisent une expression antigénique robuste, capable de déclencher une réponse immunitaire humorale significative. Par ailleurs, l'encapsulation de l'ovalbumine dans les MF-LNV entraîne une activation marquée des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques, supérieure à celle obtenue avec des nanoparticules lipidiques classiques.

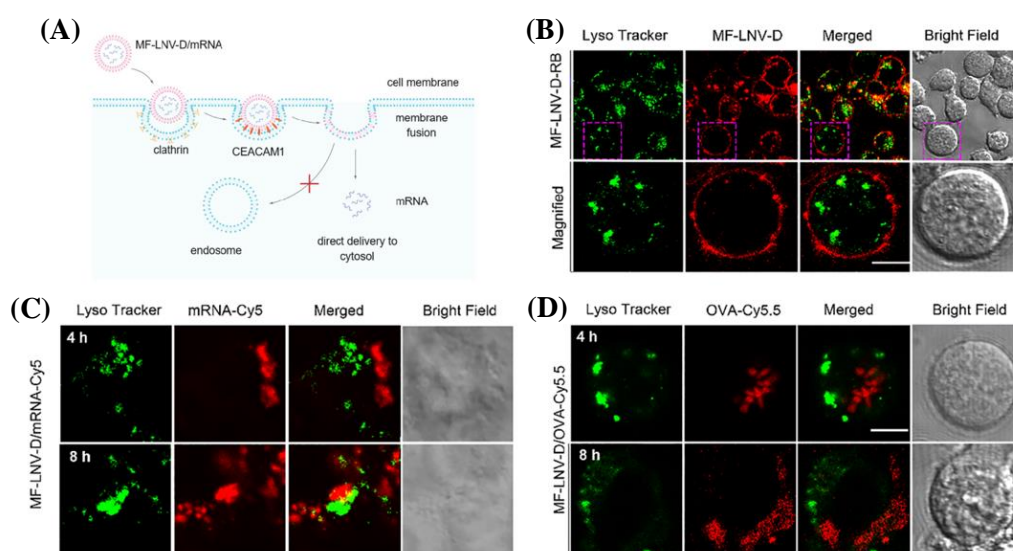


Figure 1.23: (A) Schéma du mécanisme de la fusion membranaire des liposomes fusogènes d'oligoarginine, (B) Observations en microscopie confocale de cellules dendritiques incubées avec des liposomes fusogènes composés d'oligoarginine et marqués à la rhodamine B. Images des cellules incubées avec les liposomes fusogènes contenant (C) de l'ARNm-Cy5 ou (D) de l'OVA-Cy5.5 (barre d'échelle : 20 µm).

Dans l'article de Csiszar et *al.*¹⁰⁷, les chercheurs ont conçu de nouveaux liposomes fusogènes contenant du DOTAP, du DOPE et du resvératrol, un antioxydant d'origine végétale. Le resvératrol est situé dans la bicouche lipidique, mais une partie se retrouve également dans le milieu intracellulaire des liposomes. Le resvératrol contient des électrons π délocalisés et conjugués, qui, associés à des lipides chargés positivement (DOTAP) dans la bicouche lipidique, augmentent la fusogénicité des liposomes. L'hypothèse est que cela permet la délivrance intracellulaire du resvératrol (milieu aqueux) dans des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales (CMVEC) de rats âgés, et ceci par fusion membranaire entre les liposomes et la membrane plasmique des cellules (**Figure 1.24 A**). Dans cette étude, les résultats de cytométrie en flux (**Figure 1.24 B**) et de microscopie à balayage laser (**Figure 1.24 C**) prouvent que l'incubation des cellules avec les liposomes fusogènes contenant du resvératrol (FL-RSV) entraîne une fusion membranaire entre les deux, contrairement aux liposomes non fusogènes contenant du resvératrol. Par chromatographie liquide haute performance (HPLC) (**Figure 1.24 D**), ils démontrent que le resvératrol est efficacement internalisé lorsqu'il est encapsulé dans les liposomes fusogènes (PC-RSV). L'internalisation du resvératrol, lui permet d'activer rapidement certains mécanismes de défense comme ceux médiés par Nrf2, en diminuant la production cellulaire d'espèces réactives de l'oxygène et en inhibant l'apoptose.

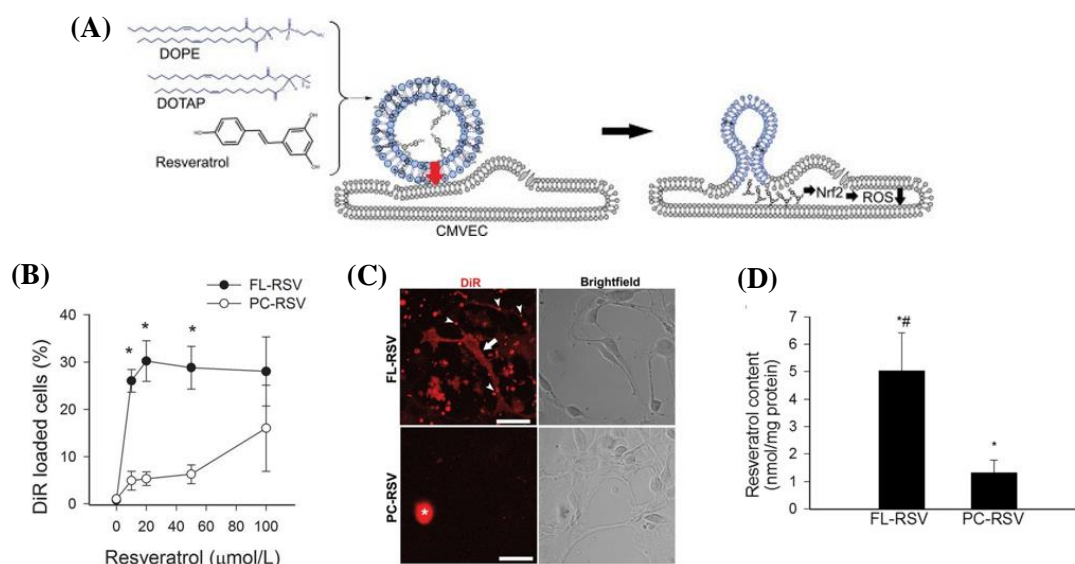


Figure 1.24 : (A) Modèle proposé pour une fusion membranaire améliorée entre des liposomes fusogènes contenant du resvératrol et des cellules CMVEC. (B) Pourcentage de cellules âgées chargées en DiR en fonction de la concentration de resvératrol dans les liposomes fusogènes (noir) ou des liposomes conventionnels (blanc). (C) Images de microscopie confocale de cellules âgées incubées avec des liposomes fusogènes (haut) ou conventionnels (bas), marqués

Chapitre 1 : État de l'art

par du DiR, contenant du resvératrol. **(D)** Contenu cellulaire en resvératrol normalisé après chargement des cellules âgées avec des liposomes fusogènes ou des liposomes conventionnels.

Dans cette étude de Butera et *al.*¹⁰⁸, des nanoclusters d'or luminescents (AuNCs) stabilisés par des peptides spécifiques ont été synthétisés puis encapsulés dans des liposomes unilamellaires afin de les fusionner à des vésicules extracellulaires (EVs) (**Figure 1.25 A**). L'efficacité de l'encapsulation a été confirmée par spectrométrie de masse (ICP-MS), révélant une incorporation de 26 à 42 mol % d'or selon le peptide utilisé. La fusion entre ces liposomes chargés en AuNCs et les EVs a ensuite été démontrée par une augmentation concomitante de la taille et de la fluorescence des EVs, en cytométrie en flux, témoignant de l'intégration des AuNCs. Ces résultats ont été confirmés par cryo-TEM, avec la mise en évidence des états intermédiaires de fusion (**Figure 1.25 B**) et l'augmentation significative de la taille des vésicules après 2 h d'incubation (**Figure 1.25 C**). Enfin, la séparation par chromatographie d'exclusion de taille et les analyses ICP ont démontré que 17 % des AuNCs étaient libérés lors de la fusion, confirmant l'efficacité du processus de fusion pour encapsuler les AuNCs dans les EVs sans rupture de membrane.

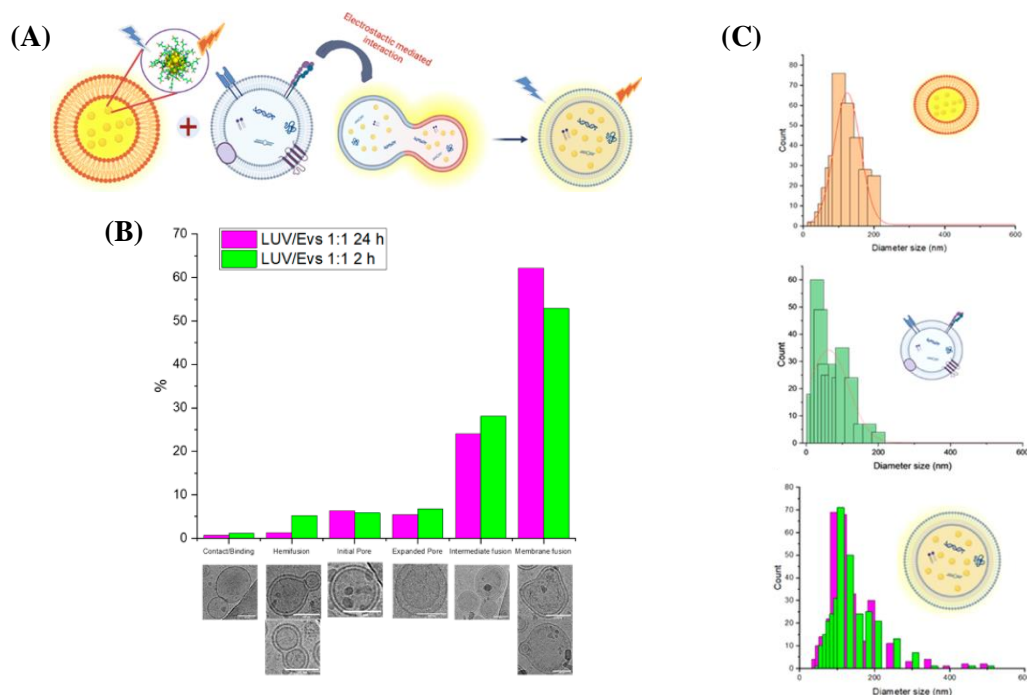


Figure 1.25 : **(A)** Schéma de la fusion entre les liposomes fusogènes contenant les nanoclusters d'or luminescents et les vésicules extracellulaires humaines (EV). **(B)** Histogramme montrant la fréquence des différents intermédiaires observés pour le mélange LUV:EV, ainsi que les intermédiaires classiques de la fusion membranaire : contact/liaison, hémifusion, pore initial, pore élargi, et fusion complète des membranes. **(C)** Histogrammes de taille extraits des images

cryo-TEM de LUV purs (haut), de vésicules extracellulaires (milieu), du mélange LUV:EV (bas) après 2 heures (en vert, diamètre moyen de 175 ± 65 nm) et après 24 heures (en rose, diamètre moyen de 138 ± 74 nm). La barre d'échelle représente 100 nm.

4. Les propriétés magnétiques des oxydes de fer et leurs applications en santé

a. Les propriétés superparamagnétiques des nanoparticules d'oxydes de fer

Les nanoparticules magnétiques (NPM) ont fait l'objet de nombreuses recherches pour des applications biomédicales durant ces dernières décennies.^{109,110} Il existe un grand nombre de NPM, qui peuvent être classées en trois catégories : oxydes métalliques, métaux purs et nanocomposites magnétiques.¹⁰⁹ Les nanoparticules d'oxyde de fer de type magnétite (Fe_3O_4) ou maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) font partie des NPM les plus étudiées en raison de leur faible toxicité et de leurs propriétés magnétiques spécifiques.^{109,110}

La magnétite, comme la maghémite, possède une structure spinelle inverse. Dans la magnétite, les cations métalliques occupent les sites tétraédriques et octaédriques de la maille cubique faces centrées formée par les ions oxygène (**Figure 1.26 A**).¹¹¹⁻¹¹³ Les cations Fe^{2+} occupent uniquement des sites octaédriques (B) et les cations Fe^{3+} sont répartis entre des sites tétraédriques (A) et octaédriques (B), ce qui conduit à la formule $[\text{Fe}^{3+}]_A[\text{Fe}^{3+}\text{Fe}^{2+}]_B\text{O}_4$. La maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) est le produit d'oxydation de la magnétite, elle contient uniquement des ions Fe^{3+} et possèdent des lacunes dans les sites octaédriques $[\text{Fe}^{3+}]_A[\text{Fe}_{5/3}^{3+}\square_{1/3}]_B\text{O}_4$.¹¹¹ Grâce au couplage antiferromagnétique non compensé entre les sites octaédriques et tétraédriques ces matériaux sont ferrimagnétiques (**Figure 1.26 B**).¹¹⁰⁻¹¹³

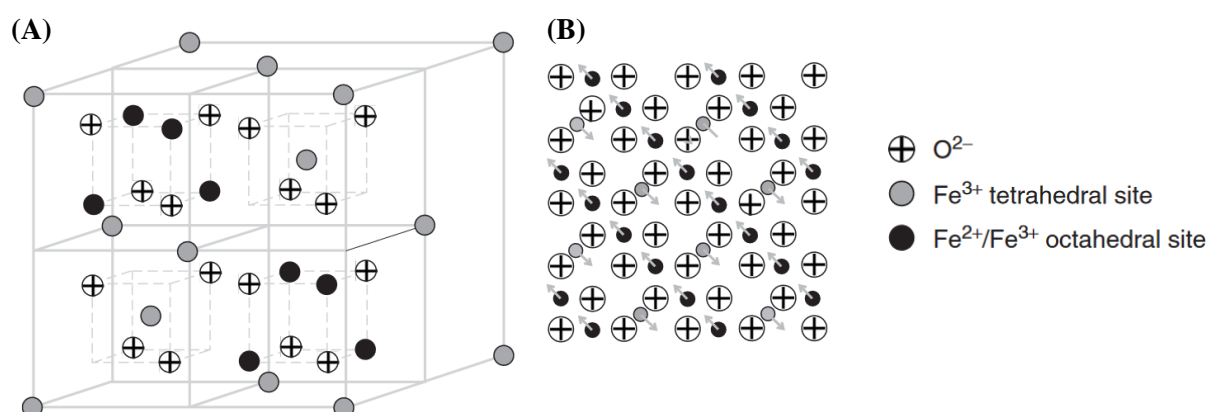


Figure 1.26 : Illustration (A) de la face avant de la maille cubique de la structure spinelle inverse de la magnétite, et (B) organisation ferrimagnétique dans la magnétite (plan [1,1,1]).¹¹¹

Chapitre 1 : État de l'art

Dans le matériau massif, les spins d'un groupe d'atomes s'alignent parallèlement entre eux et forment ce que l'on appelle un domaine magnétique de Weiss, le matériau étant constitué de plusieurs domaines de Weiss qui s'orientent dans des directions différentes (**Figure 1.27 A**).^{114,115} La taille d'un domaine de Weiss dans la magnétite (ou la maghémite) est d'environ $0,1 \mu\text{m}^{13}$, par conséquent plus la taille du matériau diminue, moins il y a de domaines magnétiques (**Figure 1.27 B**). En dessous d'une certaine taille, qui est d'environ 20 nm pour les oxydes de fer, les nanoparticules sont des monodomaines magnétiques (**Figure 1.27 C**).^{110,111,116} Dans ces monodomaines magnétiques, un moment magnétique permanent représenté par une flèche blanche sur la **Figure 1.27 D** est obtenu et correspond à la résultante de tous les spins atomiques symbolisés par les flèches jaunes qui sont alignés parallèlement les uns aux autres.¹¹⁶ L'intensité du moment magnétique est proportionnelle à l'aimantation à saturation du matériau (M_s), et au volume de la particule (V), soit : $\mu = M_s \times V$

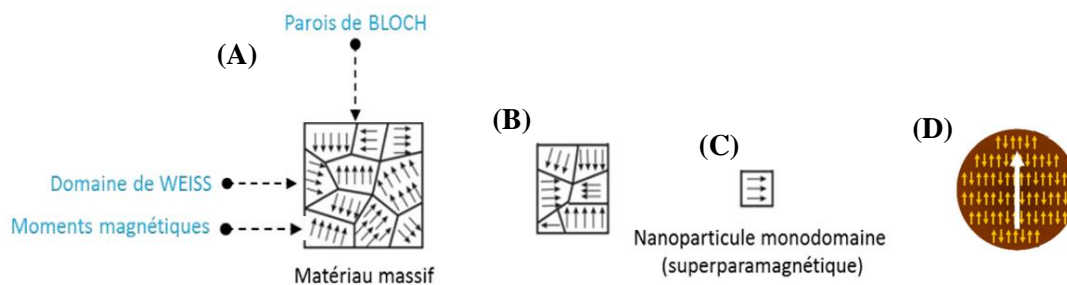


Figure 1.27 : (A), (B) et (C) Représentation des domaines magnétiques de Weiss d'un matériau massif dont la taille diminue. (D) Schéma d'une nanoparticule monodomaine magnétique avec les moments magnétiques atomiques (flèches jaunes) et le moment magnétique résultant des particules (flèche blanche).¹¹⁷

Dans une particule monodomaine, ce moment magnétique global est orienté dans une direction préférentielle appelée axe de facile aimantation, définie par la structure cristalline du matériau.¹¹¹ Ce moment magnétique reste stable dans une direction grâce à l'énergie d'anisotropie (E_a), et dépend de K_{eff} qui est la constante d'anisotropie effective (liée à la nature du matériau et à sa forme), et V qui est le volume de la nanoparticule, selon la formule suivante^{111,115,116,118} :

$$E_a = K_{\text{eff}} \times V$$

Il suffit de fournir une énergie supérieure à E_a pour faire basculer le moment magnétique global d'une direction de facile aimantation à l'autre (**Figure 1.28**).¹¹⁹ L'énergie nécessaire à ce basculement peut être fournie par l'application d'un champ magnétique ou par l'agitation thermique ($k_B T$).^{116,119}

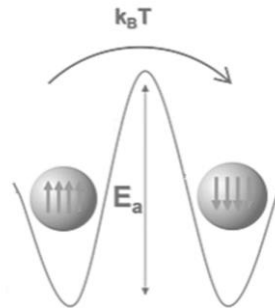


Figure 1.28 : Représentation de la barrière d'énergie E_a à franchir pour renverser l'orientation du macrospin. Thèse de Sirine El Mousli Saada¹¹⁷

À température ambiante, les particules sont soumises à une agitation thermique dont l'énergie est notée $k_B T$ (k_B est la constante de Boltzmann, T la température absolue). Si l'énergie thermique $k_B T$ est inférieure à l'énergie d'anisotropie E_a , le moment magnétique reste « bloqué » dans sa direction. Si $k_B T$ devient comparable ou supérieur à E_a , le moment magnétique peut basculer librement d'une direction à l'autre, sous l'effet des fluctuations thermiques, la particule est dite superparamagnétique.¹²⁰ La température à laquelle l'énergie thermique peut surpasser l'énergie d'anisotropie d'une nanoparticule est appelée température de blocage (T_B).¹¹⁹ On peut ainsi introduire la température de blocage correspondant à la température à laquelle une particule passe de l'état bloqué (ferromagnétique à l'échelle nanométrique) à l'état superparamagnétique. La T_B dépend de plusieurs facteurs, comme le volume de la nanoparticule (plus c'est petit, plus la T_B est basse), l'anisotropie magnétique du matériau, ou les interactions entre particules (si elles sont proches, elles peuvent s'influencer).¹²¹ Elle dépend de deux choses, l'énergie d'anisotropie magnétique (K) liée à la forme, la taille et la nature de la particule et le volume (V) de la nanoparticule selon la formule suivante^{120,122} :

$$T_B = \frac{K * V}{k_B * \ln\left(\frac{\tau_m}{\tau_0}\right)}$$

avec K : constante d'anisotropie, V : volume de la particule, k_B : constante de Boltzmann, τ_m : temps de mesure et τ_0 : temps caractéristique ($\approx 10^{-9}$ à 10^{-12} s). Ainsi plus la particule est grosse ou anisotrope, plus la température de blocage est élevée.

Dans le cas de la maghémite que nous utiliserons dans ce travail, le moment magnétique n'est pas bloqué car à température ambiante, l'énergie thermique est plus forte que l'énergie d'anisotropie, le moment magnétique μ peut donc librement basculer d'une orientation à l'autre.^{116,120,121} Cette réorientation ayant lieu à des fréquences très rapides, plus rapides que la fréquence de la mesure magnétique, aucune aimantation n'est mesurée à température ambiante. En d'autres termes, en l'absence de champ magnétique, l'aimantation est nulle. En présence d'un champ magnétique externe, la courbe d'aimantation est caractéristique d'un comportement superparamagnétique (*Figure 1.29*).¹²⁰ Les moments magnétiques portés par les nanoparticules d'oxyde de fer s'alignent dans la direction du champ magnétique appliqué et atteignent la saturation pour de faibles valeurs de champ.¹²¹ En conclusion, les nanoparticules d'oxyde de fer ne sont pas magnétiques mais le deviennent sous champ magnétique. Les particules utilisées dans ce travail seront toujours dispersées dans un solvant porteur, en l'occurrence de l'eau sous la forme d'un ferrofluide ionique.

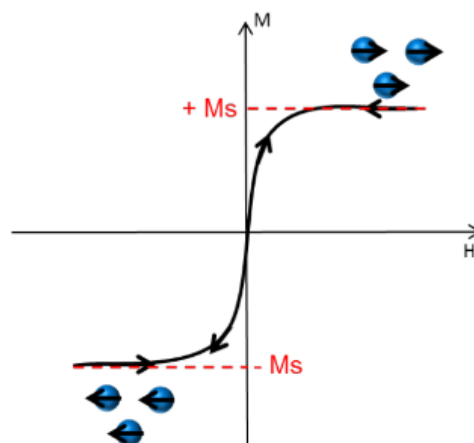


Figure 1.29 : Courbe d'aimantation caractéristique de nanoparticule superparamagnétique.

b. Intérêt des NPM en santé

Les principales applications des nanoparticules magnétiques en santé sont liées à leur propriété superparamagnétique. En effet, les nanoparticules d'oxyde de fer sont des agents de contraste en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), ou sont utilisées en Imagerie de Particules Magnétiques (MPI). Associées à d'autres structures (nanogels, liposomes, polymerosomes), elles peuvent être accumulées sous champ magnétique dans une tumeur ou un tissu (vectorisation magnétique), elles peuvent aussi délivrer de la chaleur sous champ magnétique alternatif (hyperthermie magnétique).^{110,123}

i. Les NPM en imagerie par résonance magnétique : IRM et MPI

L'imagerie par résonance magnétique est une technique d'imagerie médicale non invasive reposant sur les propriétés de la résonance magnétique nucléaire (RMN), en particulier celles des noyaux d'hydrogène présents en abondance dans les tissus biologiques. En 1971, Raymond V. Damadian fut le premier à démontrer que les tissus cancéreux présentent des temps de relaxation RMN (T1 et T2) significativement différents de ceux des tissus sains, posant ainsi les bases physiques d'une méthode de détection non invasive des anomalies tissulaires.¹²⁴ En 1973, Paul C. Lauterbur introduit le concept fondamental d'imagerie RMN en utilisant des gradients de champ magnétique pour spatialiser les signaux, permettant ainsi la formation des premières images en deux dimensions.¹²⁵ Enfin, Peter Mansfield optimise cette approche en développant des méthodes mathématiques de reconstruction rapide des images, et rend la technique applicable à la pratique clinique.¹²⁶ Ensemble, leurs travaux ont conduit au développement de l'IRM telle qu'elle est utilisée aujourd'hui, un outil essentiel au diagnostic médical moderne, notamment en neurologie, en oncologie et en cardiologie.

L'IRM standard, basée sur les différences naturelles de temps de relaxation (T1 et T2) des tissus, possède une excellente résolution, cependant les images IRM manquent parfois de contraste pour distinguer certaines structures ou lésions.^{110,116} Malgré l'augmentation des valeurs de champ magnétique des IRM cliniques, actuellement de 7 Tesla, il est souvent nécessaire d'utiliser des agents de contraste, qui modifient les propriétés de relaxation des protons (H^+) dans leur voisinage, pour améliorer la sensibilité de cette technique.^{110,116} Ces agents de contraste accélèrent le retour à l'équilibre des spins des protons (relaxation T1 ou T2), modifiant la luminosité des tissus sur les images IRM. Les nanoparticules d'oxyde de fer lorsqu'elles s'accumulent dans des zones spécifiques par ciblage passif ou actif, modifient efficacement le temps de relaxation T2 (transverses) provoquant ainsi un assombrissement de la zone où les NPM sont accumulées (agents de contraste négatif), par opposition aux agents de contraste T1 qui rendent l'image plus claire (**Figure 1.30**).^{111,116,121,127} Parmi les nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer, approuvées en 1996 par la Food and Drug Administration (FDA), on peut citer Resovist® et Feridex® aux Etats-Unis ou Endorem® en Europe.¹⁰⁹

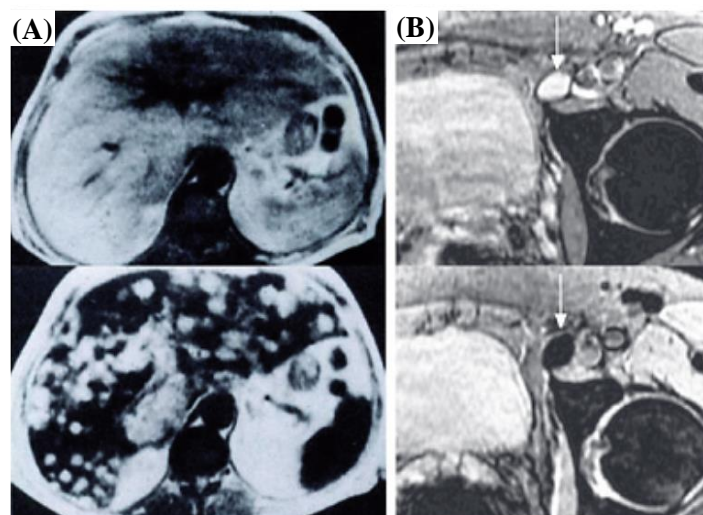


Figure 1.30 : (A) Images hépatiques pondérées en T2 d'un patient atteint d'un carcinome rénal métastatique avant l'administration (en haut) et 15 minutes après l'administration d'AMI-25 (en bas). (B) Images IRM pondérées en T2 d'un ganglion lymphatique prélevé chez un patient atteint de cancer de la prostate, avant l'administration (en haut) et 24 heures après l'administration de Combidex (en bas). Les images sont issues des travaux de Qiao et *al.*¹¹⁶.

L'imagerie par particules magnétiques (MPI) est une technique d'imagerie innovante introduite par Bernhard Gleich et Jürgen Weizenecker au sein des laboratoires de recherche de Philips à Hambourg, en 2005.¹²⁸ La MPI permet l'acquisition quantitative et spatiale de la distribution des nanoparticules d'oxyde de fer injectées *in vivo*. Contrairement à l'imagerie par résonance magnétique (IRM), qui visualise principalement les tissus biologiques, la MPI cible exclusivement les propriétés magnétiques des nanoparticules, offrant ainsi une sensibilité et une spécificité remarquablement élevées.¹¹⁰ Le principe de la MPI repose sur l'application d'un champ magnétique oscillant qui excite sélectivement les nanoparticules situées dans une zone donnée, générant un signal mesurable. Seules les particules situées dans cette zone réagissent à l'excitation et génèrent un signal mesurable. En déplaçant cette zone tridimensionnellement, il devient possible d'obtenir une cartographie précise et dynamique de la localisation des nanoparticules dans l'organisme.¹²⁹

Parmi ses nombreux avantages, cette technique se distingue par un rapport signal sur bruit élevé, une capacité d'imagerie dynamique permettant le suivi en temps réel des particules, est totalement non invasive et ne nécessite qu'une faible dose de particules. Ces caractéristiques font de la MPI une méthode prometteuse pour diverses applications biomédicales, notamment dans le domaine du ciblage thérapeutique et du diagnostic.^{110,129} Des efforts récents ont porté

sur le design de nanoparticules spécifiquement conçues pour optimiser la réponse en MPI. Par exemple, Wang *et al.*¹³⁰ ont développé des nanoparticules d'oxyde de fer cubiques, présentant une forte aimantation, une réponse harmonique amplifiée, et une excellente biocompatibilité, démontrant des performances supérieures pour le suivi *in vivo* de cellules souches. Ces avancées ouvrent la voie à une nouvelle génération de traceurs hautement performants dédiés à l'imagerie par particules magnétiques.

Le premier appareil pré-clinique offrant la possibilité de faire de l'imagerie 3D *in vivo* par MPI a été développé par Bruker, en 2013, en collaboration avec Philips.¹³¹ Cet appareil a notamment été utilisé dans une étude de Mohn *et al.*¹²⁹, afin d'évaluer les propriétés magnétiques du traceur Resotran®, un oxyde de fer superparamagnétique (SPION), dans le contexte de l'imagerie par particules magnétiques (MPI) en le comparant d'une part à d'autres traceurs IRM à base de SPION tels que Resovist, Ferrotran et d'autre part avec le traceur dédié à l'imagerie par particules magnétiques (MPI) Perimag. Les quatre types de SPIONS comparés dans l'étude diffèrent par leur taille (allant de 10 à 30 nm), leur revêtement (polymères ou dextran pour assurer la stabilité et la biocompatibilité), ainsi que par leurs propriétés magnétiques intrinsèques, Resotran se distinguant par une taille moyenne d'environ 20 nm et un revêtement dextran optimisé pour une meilleure performance et sécurité clinique en MPI. Les résultats, obtenus via le système Bruker, montrent que Perimag, Resotran et Resovist présentent des caractéristiques magnétiques qui leur permettent d'être utilisés en tant que traceur MPI viable, même si le plus efficace reste Perimag (*Figure 1.31*).

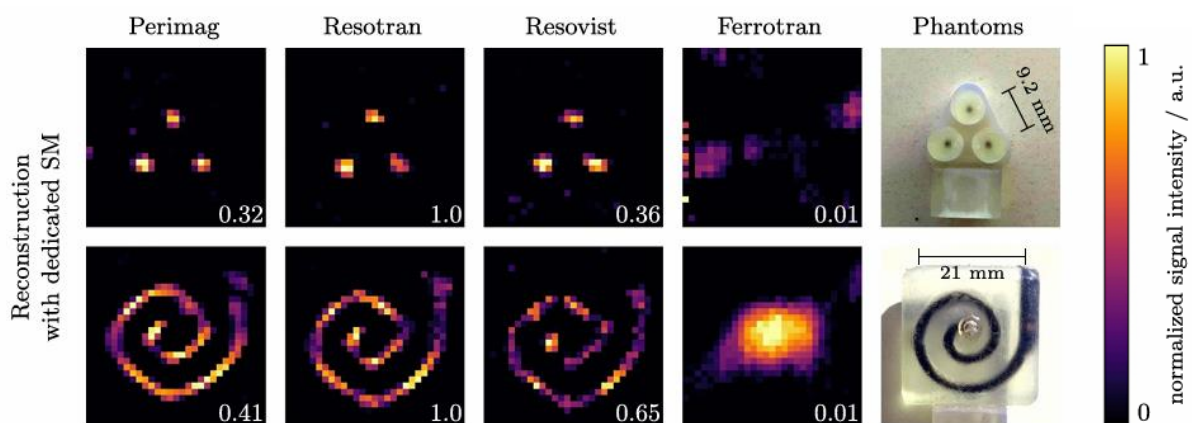


Figure 1.31 : Les résultats des quatre types de nanoparticules superparamagnétiques (Perimag, Resotran, Resovist, Ferrotran) dans deux fantômes différents sont présentés, chacun ayant une concentration en fer de 8,5 mg/ml. L'intensité du signal est normalisée individuellement pour chaque image, et l'image reconstruite a une taille de $29 \times 29 \text{ mm}^2$.¹²⁹

ii. Vectorisation magnétique ou ciblage magnétique

Le ciblage magnétique est une technique utilisée en médecine, en particulier dans le traitement ciblé de maladies comme le cancer, les infections ou les troubles cardiovasculaires. Cette technique très étudiée par Lübke et *al.*¹³² consiste à utiliser un champ magnétique externe pour diriger et accumuler des vecteurs magnétiques liés à des médicaments vers une zone spécifique du corps, pour une libération localisée du médicament. Pour que le ciblage magnétique soit effectif *in vivo*, il est nécessaire de contrebalancer les forces visqueuses, la pression péristaltique du sang et l'atténuation du champ dans les zones profondes du corps, c'est pourquoi le moment magnétique global du vecteur ainsi que le gradient de champ magnétique doivent être forts. Actuellement, cette technique est principalement efficace pour les tumeurs situées à proximité de la surface corporelle.

Thébault et *al.*¹²⁷ ont développé une approche théranostique innovante reposant sur l'utilisation de liposomes ultra-magnétiques encapsulant à la fois des nanoparticules de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) et le combretastatine A4 phosphate (CA4P), un agent anti-vascularisation, pour les injecter chez la souris (**Figure 1.32**). L'objectif était d'utiliser des liposomes ultramagnétiques (LUM) pour diriger le CA4P vers la tumeur, puis de déclencher le relargage du médicament à l'aide d'ultrasons (HIFU), et finalement de suivre en temps réel la distribution et l'efficacité du traitement par IRM. Les résultats montrent une libération efficace du CA4P après exposition aux HIFU, entraînant une régression du volume tumoral observée par IRM à 7 Tesla. Après relargage de la molécule thérapeutique par ultrasons, une efficacité accrue du traitement d'un facteur 150 a été observée dans le cas du ciblage magnétique de la zone tumorale comparé à une accumulation systémique passive des particules.

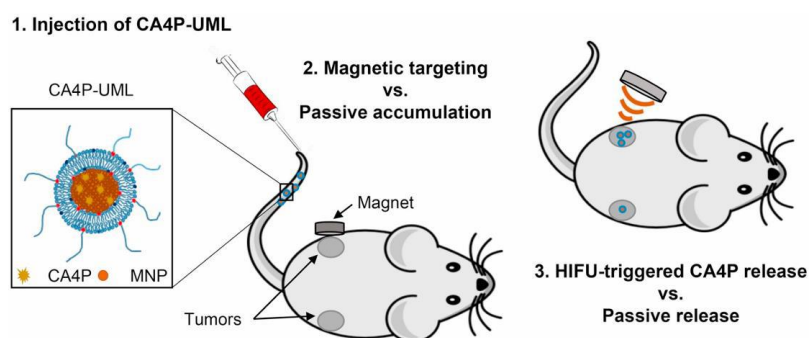


Figure 1.32 : Représentation schématique adaptée de Thébault et *al.*¹²⁷, du traitement de LUM-CA4P par ciblage magnétique puis d'un relargage par ultrasons HIFU.

iii. Hyperthermie magnétique

Au-delà de l'utilisation des nanoparticules d'oxyde de fer pour l'imagerie médicale, ce type de particules convient également pour la destruction de cellules cancéreuses par hyperthermie magnétique¹³³ ou encore pour la délivrance contrôlée de médicaments.¹¹⁰ L'hyperthermie magnétique est un processus au cours duquel une dispersion de NPM soumise à un champ magnétique alternatif (AMF) va générer de la chaleur.

Contrairement à l'IRM, le champ magnétique est de faible intensité (quelques dizaines de milli Tesla), mais de haute fréquence (quelques centaines de kilo Hertz).¹³⁴ Lorsqu'un champ magnétique alternatif (ou hyperfréquence) est appliqué à une dispersion de nanoparticules magnétiques, celles-ci s'alignent sur le champ magnétique mais avec un certain retard, ce qui crée des pertes énergétiques sous forme de chaleur. Il existe deux principaux mécanismes de relaxation, la relaxation de Néel (*Figure 1.33 A*), qui correspond au retournement du moment magnétique dans la nanoparticule, avec un retard causé par la barrière d'anisotropie à surmonter induisant une hystérésis dynamique ; et la relaxation de Brown (*Figure 1.33 B*) qui correspond à la rotation physique de la NP créant du retard par frottement visqueux de la particule qui tourne dans son environnement.^{17,134,135} Dans les deux cas, c'est ce retard entre l'aimantation et le champ appliqué qui conduit à une accumulation d'énergie qui sera dissipée sous forme de chaleur.¹³⁴

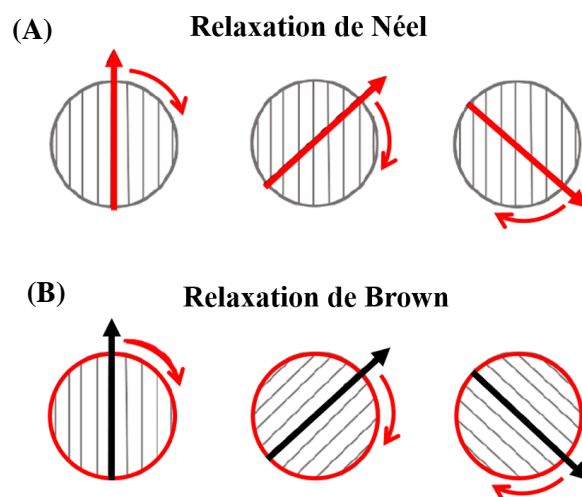


Figure 1.33 : Schéma illustrant les deux types de relaxation avec en rouge l'élément en rotation. (A) La relaxation de Néel, où le macrospin (en rouge) effectue une rotation interne dans une particule fixe, et (B) la relaxation de Brown, où la particule entière (en rouge) effectue une rotation dans le milieu, le macrospin restant fixe par rapport à la particule.¹³⁵

Chapitre 1 : État de l'art

Les deux mécanismes de relaxation des nanoparticules magnétiques, Néel et Brown, ont chacun un temps caractéristique de relaxation, noté τ , dont les formules sont les suivantes :

$$\tau_N = \tau_0 e^{\frac{E_a}{k_B T}} \quad \tau_B = \frac{3\eta V}{k_B T}$$

Avec pour la relaxation de Néel (τ_N) (en seconde) : τ_0 le temps d'essai d'une valeur comprise entre 10^{-9} à 10^{-10} s (valeur empirique), E_a l'énergie d'anisotropie magnétique (J), k_B la constante de Boltzmann (1.38×10^{-23} J/K) et T la température absolue (K). Pour la relaxation de Brown (τ_B) (en secondes), η la viscosité dynamique du liquide (Pa·s), V le volume de la particule.

D'après les formules associées à ces temps de relaxation, le mécanisme de Néel augmente exponentiellement avec l'anisotropie cristalline du matériau considéré, tandis que le mécanisme brownien est plutôt influencé par la viscosité du milieu.^{136,137} Shliomis et *al.*¹³⁶ ont calculé qu'il existe une taille de particule caractéristique, qui est inférieure à 15 nm de diamètre pour les NP de maghémite, où la relaxation de Néel prévaut généralement sur la relaxation brownienne. L'agrégation de NPM et la viscosité du milieu peuvent modifier les propriétés d'hyperthermie car la rotation mécanique peut être inhibée, ce qui peut considérablement réduire la chaleur dissipée par relaxation brownienne.^{135,138} La relaxation de Néel est également impactée par l'agrégation des NP du fait des interactions dipolaires entre elles, empêchant la rotation des moments magnétiques et donc limitant la production de chaleur. Lorsque E_a devient grand par rapport à $k_B T$, la relaxation de Néel est bloquée et les pertes sont principalement dues aux fluctuations de Brown des nanoparticules elles-mêmes, avec un temps caractéristique.^{136,138}

La chaleur libérée lors de l'échauffement magnétique peut être quantifiée par la puissance de perte spécifique (Specific Loss power, SLP), qui se définit comme la puissance électromagnétique délivrée par unité de masse de matériau magnétique, exprimée en watts par gramme (W/g). Ce paramètre permet de déterminer l'efficacité de différents systèmes, et est défini suivant la formule^{134,136} :

$$SLP = \frac{\text{puissance dissipée}}{\text{masse magnétique}} = \frac{C_P m_{tot}}{m_{mag}} \cdot \left. \frac{dT}{dt} \right|_{t \rightarrow 0}$$

avec C_P la capacité thermique spécifique du solvant, m_{tot} la masse totale de l'échantillon, m_{mag} la masse de matériel magnétique dans l'échantillon et dT/dt la pente à l'origine.¹⁷

5. Voie d'entrée naturelle des NPM dans les cellules et conséquences

Ces nanoparticules magnétiques, comme la plupart des nanoparticules, entrent dans les cellules par la voie d'endocytose. Ce processus implique l'adsorption des nanoparticules du milieu extracellulaire sur la membrane cellulaire (*Figure 1.34 A*), suivie de l'invagination de la membrane plasmique qui forme une vésicule endocyttaire englobant les oxydes de fer (*Figure 1.34 B*). Cette vésicule endocyttaire, est transportée dans le milieu intracellulaire vers les endosomes précoces (*Figure 1.34 C*), tardifs, puis les lysosomes où elles seront stockées ou dégradées à long terme (*Figure 1.34 D*).^{139,140}

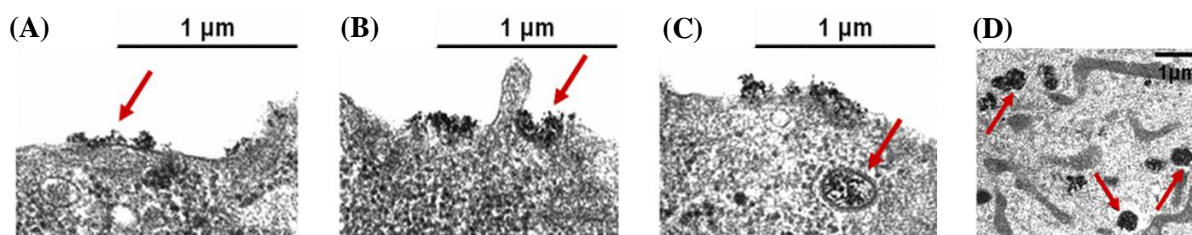


Figure 1.34 : Observation de l'endocytose des nanoparticules magnétiques en microscopie électronique : (A) adsorption des nanoparticules du milieu extracellulaire sur la membrane cellulaire, (B) invagination de la membrane encapsulant les nanoparticules, (C) transport des nanoparticules dans les endosomes précoces, puis (D) les lysosomes.^{139,140}

Après leur internalisation par endocytose, les NPM sont donc acheminées vers les lysosomes, où elles sont, dans un premier temps, séquestrées, puis elles subissent des transformations physico-chimiques.¹⁴¹ Sous l'effet du pH acide et des enzymes lysosomales, les NPM se dégradent progressivement, libérant des ions fer qui sont ensuite captés par des protéines de stockage telles que la ferritine. Ce fer est redistribué de manière contrôlée, minimisant ainsi la toxicité potentielle du fer libre.¹⁴¹

Cependant, d'un point de vue physique, le confinement subcellulaire des NPM, où leur mobilité est fortement réduite, influence profondément les propriétés magnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer. En effet, Di Corato et al.¹³⁸ ont mis en évidence une baisse systématique de la capacité de chauffage d'une large gamme de NPM de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ présentant différentes tailles et formes (sphériques, nanocubes, nanofleurs et liposomes encapsulant des nanoparticules $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), une fois ces NPM adsorbées à la membrane cellulaire ou internalisées dans les cellules tumorales (*Figure 1.35*). Ce déclin est particulièrement marqué pour les nanoparticules dont la dissipation thermique repose sur la relaxation brownienne, cette dernière étant fortement altérée par l'immobilisation des NPM dans le

cytoplasme.^{138,141} La relaxation de Néel sera quant-à-elle affectée, car le confinement induit une augmentation des interactions dipolaires magnétiques entre particules due à leur proximité.^{138,141}

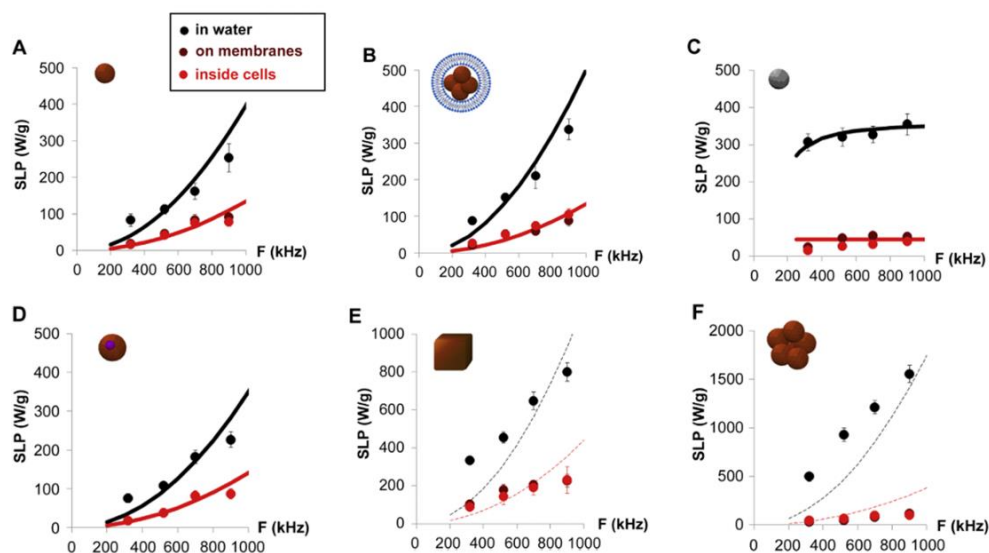


Figure 1.35 : Mesure du pouvoir chauffant (en W/g) en solution aqueuse et dans des systèmes modèles cellulaire pour différents nanomatériaux : (A) des nanoparticules de maghémite, (B) des nanoparticules de maghémite encapsulées dans des liposomes, (C) des nanoparticules de ferrite de cobalt, (C) des dimères oxyde de fer/or, (D) des nanocubes d'oxyde de fer et (E) des nanofleurs d'oxyde de fer (F).¹³⁸

Les nanomatériaux à forte anisotropie et aimantation, comme les nanocubes et nanofleurs, qui ont une SLP élevée en solution (>1000 W/g), et pour lesquels la relaxation impliquée est de type brownien, voient leur SLP chuter drastiquement en milieu cellulaire : environ 200 W/g pour les nanocubes et seulement 50 W/g pour les nanofleurs. Ces valeurs deviennent inférieures ou comparables à celles des nanoparticules classiques de maghémite γ -Fe₂O₃ (150 W/g en milieu cellulaire). Ce constat montre que les matériaux les plus prometteurs en solution peuvent perdre toute supériorité une fois dans l'environnement cellulaire complexe. Ces résultats soulignent la nécessité de concevoir des nanomatériaux optimisés spécifiquement pour les conditions biologiques, et non seulement en solution, afin de garantir une efficacité réelle en hyperthermie thérapeutique.¹³⁸

6. Contexte et objectif de la thèse

a. Stratégies de libération des SPION dans le cytosol cellulaire

Lorsque les NPM sont internalisées par endocytose, elles se retrouvent piégées dans des vésicules (endosomes ou lysosomes). Dans ces compartiments acides, elles peuvent être dégradées et avoir une mobilité restreinte, ce qui peut diminuer l'effet de l'hyperthermie, et rendre impossible la libération cytoplasmique d'agents actifs.^{138,142} L'une des stratégies consiste à favoriser l'échappement endosomal des NPM pour optimiser leur performance thérapeutique, notamment pour la thérapie par hyperthermie magnétique et la libération intracellulaire d'agents actifs.

S'il existe plusieurs stratégies d'échappement endosomal dans la littérature^{143,144}, les exemples spécifiques aux nanoparticules d'oxyde de fer sont plus rares. On retrouve des méthodes physiques, telles que la micro-injection ou l'électroporation, qui restent cependant difficiles à mettre en œuvre.¹⁷ Les méthodes physico-chimiques sont donc privilégiées, notamment l'effet « éponge à protons » induisant une rupture endosomale par pression osmotique. D'autres stratégies reposent sur la fusion ou la perturbation directe de la membrane, facilitée parfois par des lipides fusogènes ou des peptides spécifiques.¹⁴⁵

Mathilde Le Jeune durant sa thèse¹⁷ a travaillé sur la fonctionnalisation des NPM avec des peptides cationiques contenant des séquences poly-histidines, afin de permettre l'échappement des endosomes après leur internalisation par endocytose. Le mécanisme d'échappement endosomal impliqué est appelé le mécanisme de « l'éponge à protons ». Il repose sur la capacité des poly-histidines à se protoner lorsque le pH diminue à l'intérieur des vésicules (endosomes). Cette acidification est causée par une enzyme, l'ATPase, qui pompe activement des protons (H^+) du cytosol vers la vésicule (**Figure 1.36 A**). Les poly-histidines tamponnent alors ce milieu acide, forçant l'endosome à faire entrer encore plus de protons pour maintenir un pH bas. Cela provoque aussi une entrée de chlorures (Cl^-) pour équilibrer la charge, ce qui augmente la pression osmotique. L'eau pénètre alors dans l'endosome, entraînant son gonflement. Ce gonflement finit par rompre la membrane endosomale par effet osmotique, libérant ainsi les vecteurs (comme les nanoparticules) et leur contenu dans le cytosol (**Figure 1.36 B**).^{17,146,147}

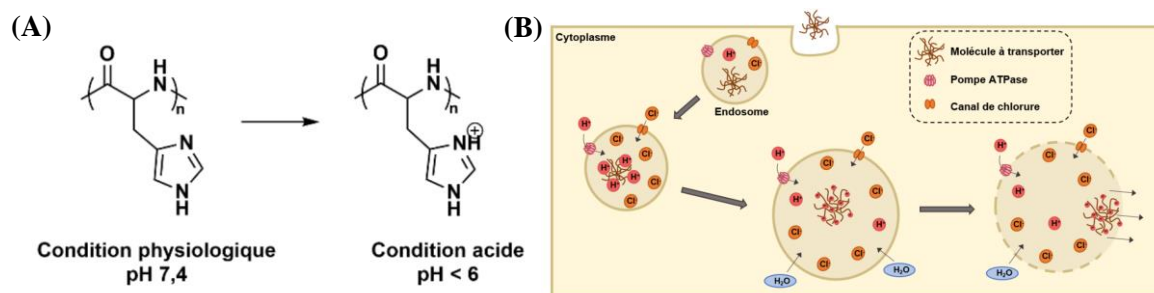


Figure 1.36 : (A) Protonation de l'oligo-histidine pour l'échappement des endosomes et (B) schéma du mécanisme d'éponge à protons.¹⁷

Les résultats ont démontré que les NPM de type cœur-coquille ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$) fonctionnalisées avec des peptides pénétrants (**Figure 1.37 A**) peuvent, une fois internalisées par endocytose, favoriser un échappement des endosomes par effet « éponge à protons » et atteindre le cytosol, contournant ainsi le piégeage endosomal (**Figure 1.37 B**). Un comptage des événements en microscopie électronique a permis de mettre en évidence un plus grand nombre d'événements de rupture de l'endosome dans le cas des nanoparticules fonctionnalisées avec les polyhistidines (CF-H4-CC1) en comparaison des nanoparticules sans peptide (CC1) (**Figure 1.37 C**).

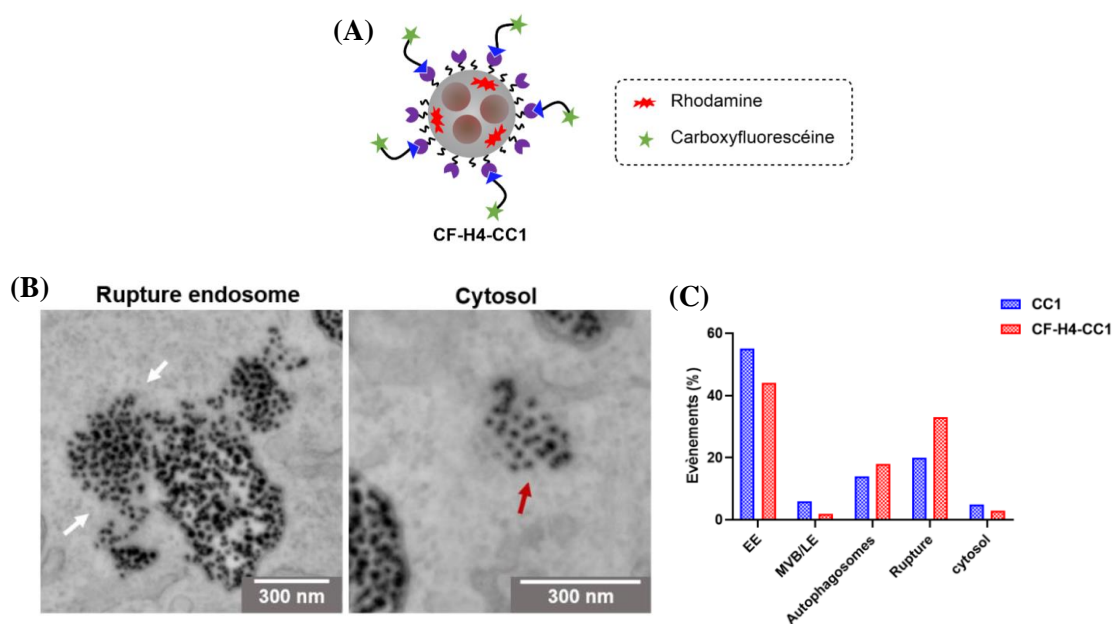


Figure 1.37 : (A) Conjugaison de peptides poly-histidine avec les nanoparticules cœur-coquilles. (B) Images obtenues en STEM de cellules CHO-K1 après incubation avec ces nanoparticules cœur-coquilles CC1 ou CF-H4-CC1 (0,56 mM en fer) pendant 6 h à 37 °C. (C) Résumé du comptage manuel en pourcentage d'événements cellulaires correspondant à la localisation des nanoparticules cœur-coquilles sur les images de STEM (EE = endosome précoce, MVB = corps multivésiculaires, LE = endosome tardif).

Cette stratégie s'est révélée efficace pour cibler des protéines intracellulaires lors de la thèse de Mélody Perret.¹³⁵ L'objectif principal dans ce cas était de permettre aux NPM fonctionnalisées avec des anticorps de cibler précisément les protéines intracytosoliques. Les résultats ont montré que les NPM bifonctionnalisées (**Figure 1.38 A**) ciblent efficacement les protéines intracellulaires HSP27 comme on peut le voir en microscopie confocale (**Figure 1.38 B**).

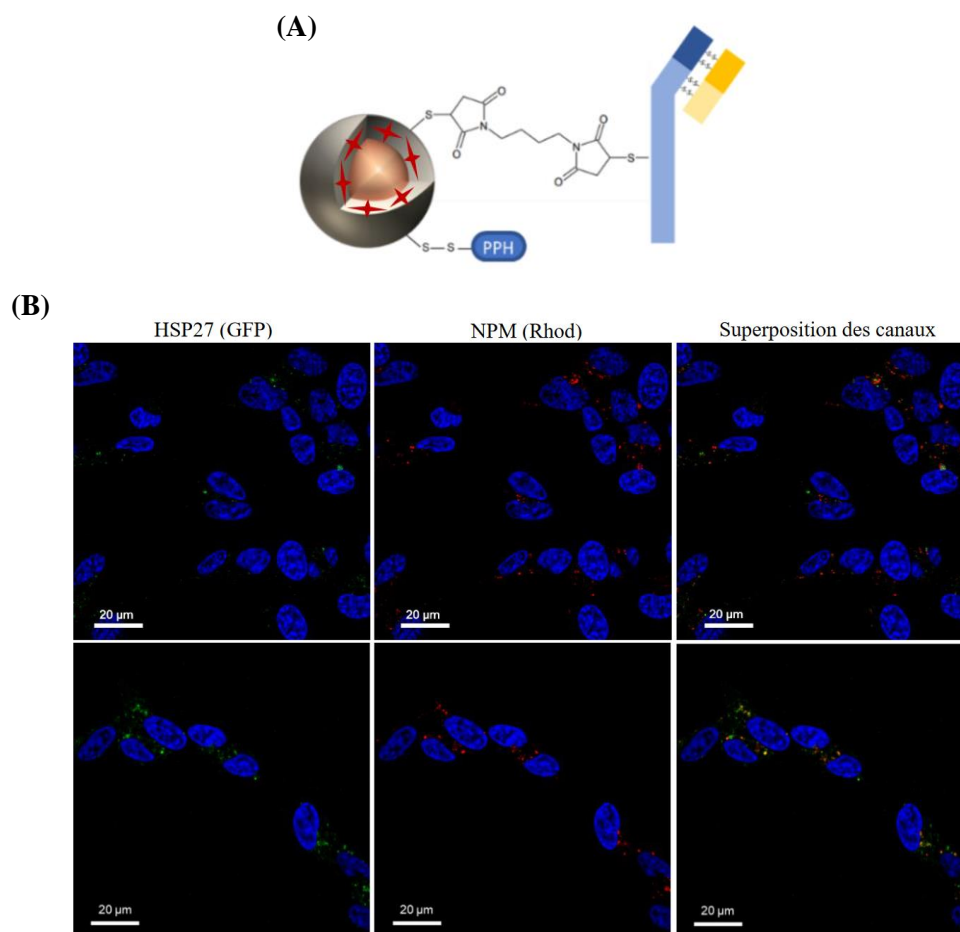


Figure 1.38 : (A) Schéma réactionnel de double fonctionnalisation des NPM avec le peptide polyhistidine et l'anticorps ciblant les protéines HSP27. (B) Images de microscopie confocale des cellules SH-SY5Y vivantes, incubées 4 h avec les particules possédant des anticorps (images de la ligne supérieure) et des peptides polyhistidine (PPH) en plus des anticorps (images de la ligne inférieure). Noyaux des cellules en bleu (Hoechst).

Une autre stratégie d'internalisation des oxydes de fer a consisté à utiliser leur morphologie afin de permettre leur translocation directement à travers la membrane des cellules. Lors de la thèse de Sirine El Mousli-Saada¹¹⁷, l'objectif principal était de comprendre comment la forme anisotrope des nanoparticules magnétiques, comme les nano-bâtonnets ou les nano-fils (*Figure 1.39 A*), influence leur internalisation par les cellules. Les résultats suggèrent que l'anisotropie de forme des nanoparticules magnétiques influence significativement leur mode d'entrée dans les cellules (*Figure 1.39 B*). La forme allongée peut induire une déformation locale de la membrane, favorisant une sorte de "glissement" ou insertion directe dans la bicouche lipidique.

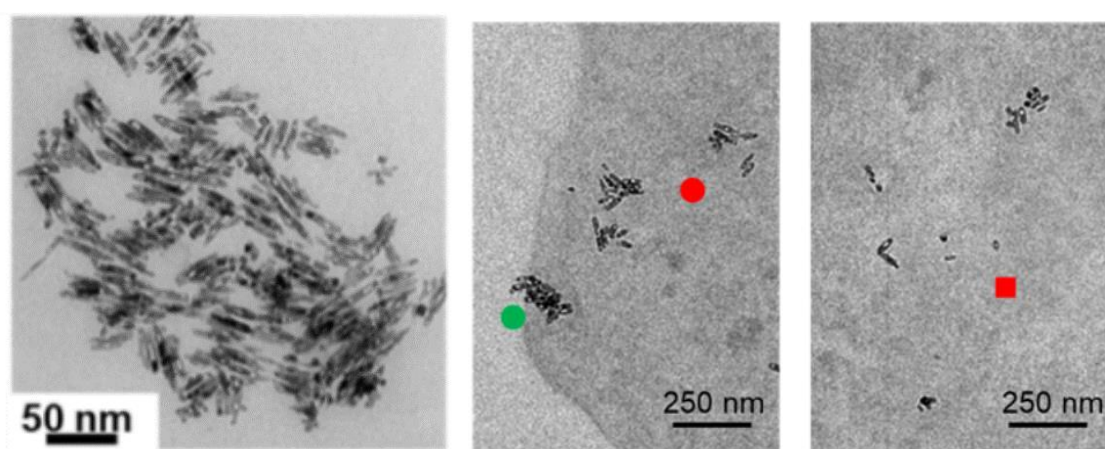


Figure 1.39 : (A) Clichés de MET des nanoparticules anisotropes de Fe_3O_4 après réduction dans l'oleylamine. (B) Clichés de MET montrant divers événements d'internalisation cellulaire dans le cas des nanoparticules anisotropes Fe_3O_4 (symboles rouges : Nanorod (NR) libres dans le cytosol, symboles verts : pénétration des NR en mode fusée). L'image de droite correspond à un zoom de celles de gauche.

Les propriétés de fusion membranaire des liposomes ont été mises à profit par Chen et *al.*¹⁴⁸ pour délivrer des NPM dans le cytosol. Lors de l'incubation avec des cellules ARPE-19, les NPM encapsulées dans des liposomes (DOTAP/DOPE) (**Figure 1.40 A**) montrent un contournement massif de l'endocytose (colocalisation <15 %), contrastant avec plus de 85 % pour les MNPs non encapsulées, indiquant une efficacité significative dans l'évitement du piégeage endosomal (**Figure 1.40 B**). Des expériences de suivi en temps réel sous champ magnétique démontrent la capacité des MNPs cytosoliques à se déplacer librement à l'intérieur de la cellule, suggérant une distribution fonctionnelle et une intégration réussie dans le cytoplasme.

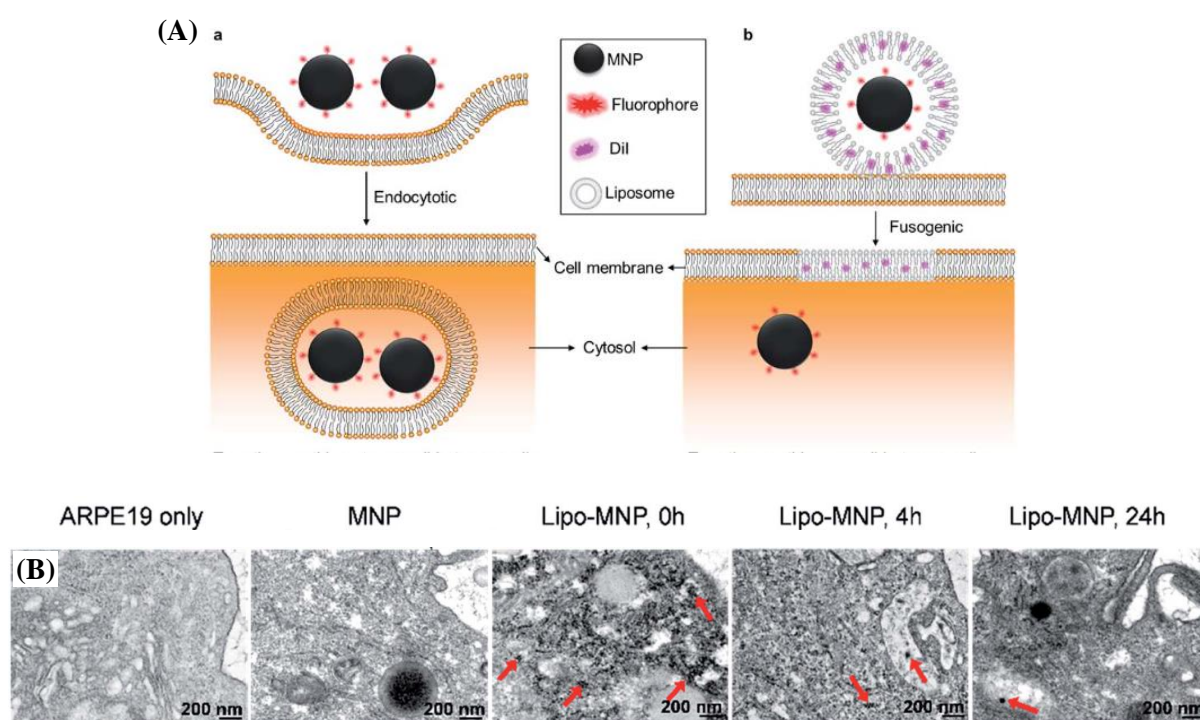


Figure 1.40 : (A) Illustration (a) de l'endocytose et (b) du principe d'internalisation par liposomes fusogènes des NPM. (B) Images TEM à fort grossissement montrant la distribution des nanoparticules magnétiques dans les cellules ARPE-19 non traitées (image 1), celles traitées avec des MNPs seules (image 2), celles traitées avec des MNPs encapsulées dans des liposomes à 0 h (image 3), 4 h (image 4) et 24 h (image 5).

b. Objectif de la thèse

L'objectif principal de cette thèse est de favoriser la délivrance cytosolique de nanoparticules magnétiques par le biais d'un mécanisme de fusion membranaire, en s'appuyant sur une stratégie basée sur l'utilisation de liposomes fusogènes. Pour ce faire, une première étape a consisté en l'encapsulation de nanoparticules de maghémite citratées, présentant un comportement superparamagnétique, au sein de liposomes formulés à partir d'un mélange lipidique optimisé. Cette composition comprend un lipide cationique (DOTAP), assurant une interaction électrostatique favorable avec les membranes cibles, un lipide fusogène (DOPE), favorisant les courbures membranaires négatives propices à la fusion, un lipide pégylé (PEG-2000-PE), stabilisant la structure colloïdale et limitant les interactions non spécifiques, ainsi qu'un traceur fluorescent (TopFluor-PE) permettant la visualisation par microscopie.

Les liposomes fusogènes magnétiques (MFL) ainsi générés ont ensuite été évalués quant à leur capacité à fusionner avec des membranes cibles, en utilisant des modèles biomimétiques tels que des liposomes dont la bicouche lipidique est zwitterionique ou anionique, mimant les propriétés physicochimiques des membranes cellulaires.

La fusion membranaire entre les MFL et les membranes cibles est supposée permettre une libération directe des NPM dans le cytosol, contournant ainsi partiellement le piégeage endosomal induit par l'endocytose classique. Cette localisation cytoplasmique est essentielle pour préserver les propriétés de dissipation thermique des NPM lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique alternatif (CMA). Une telle stimulation magnétique entraînerait une augmentation localisée de la température intracellulaire, conduisant potentiellement à une hyperthermie létale ciblée et, in fine, à l'induction de la mort cellulaire.

Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation des liposomes fusogènes magnétiques

Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation des liposomes fusogènes magnétiques

La première méthode de préparation des liposomes magnétiques développée au laboratoire PHENIX en collaboration avec le laboratoire de Physico-chimie des Systèmes Polyphasés de Châtenay-Malabry reposait sur l'hydratation d'un film lipidique au contact d'une solution de nanoparticules magnétiques.¹⁴⁹ Des étapes d'extrusion et de séparation sur colonne permettaient ensuite de réduire la taille des liposomes et d'éliminer les nanoparticules non encapsulées. Cette méthode permettait de produire des liposomes homogènes en taille, encapsulant des nanoparticules magnétiques mais avec des fractions volumiques nettement moins importantes que celles obtenues par la méthode par évaporation en phase inverse (REV), qui a été mise au point ultérieurement lors de la thèse de Gaëlle Béalle.¹⁵⁰ La génération des liposomes ultramagnétiques est alors née ! Cette dénomination vient du fait que la fraction volumique en nanoparticules magnétiques encapsulées dans les liposomes est 100 fois supérieure à celle obtenue par hydratation d'un film lipidique. Ces liposomes ont fait l'objet, par la suite, de nombreuses études relevant du domaine de la nanomédecine. La synthèse par REV permettant aussi de coencapsuler des molécules thérapeutiques.¹⁵¹ Cependant, la principale innovation reposait sur la possibilité de vectoriser magnétiquement ces liposomes *in vivo*.¹⁵²

L'étude des liposomes magnétiques dits « fusogènes » est récente et s'inscrit dans un contexte plus large au laboratoire PHENIX qui est de délivrer des nanoparticules magnétiques dans le cytosol des cellules de manière à pouvoir les manipuler pour recruter des protéines ou restaurer leur propriété d'hyperthermie qui s'effondre lorsque les nanoparticules sont piégées dans les endosomes.¹³⁸ Le cahier des charges était de choisir :

- ❖ Une synthèse permettant d'encapsuler efficacement les NPM.
- ❖ Une formulation lipidique relativement simple et bien décrite dans la littérature, au moins dans un premier temps. Étant donné qu'il y avait beaucoup de mises au point à faire, il fallait aussi choisir une formulation lipidique qui ne soit pas trop coûteuse.

Concernant le choix de la synthèse, il a semblé important de conserver la REV, étant donné l'expertise du laboratoire dans cette technique. Concernant la formulation lipidique, notre choix s'est rapidement tourné vers les lipides cationiques qui sont très bien décrits pour la formulation des lipoplexes.^{102,153} Cependant, la présence d'un lipide cationique a compliqué le choix des nanoparticules magnétiques. En effet, à pH 7, nous avons la possibilité d'utiliser des nanoparticules stabilisées par des charges négatives apportées par des molécules de citrate ou des particules stabilisées stériquement avec de la BSA (bovine sérum albumine) par exemple.

En amont de cette thèse, le choix s'est dans un premier temps tourné vers des nanoparticules stabilisées par de la BSA. Ces particules avaient déjà été utilisées au laboratoire dans le cadre d'autres études, elles présentaient l'avantage d'avoir une charge modulable en fonction du pH. Namita John, durant son stage de Master 2 intitulé « Fusogenic liposomes for the efficient delivery of magnetic nanoparticles », a étudié la formation de liposomes cationiques avec des nanoparticules stabilisées par de la BSA à pH 7. Néanmoins, plusieurs problèmes ont été rencontrés, le plus important étant lié à la reproductibilité des expériences, ce qui a amené à reconsidérer le choix des NPM utilisées. Les NPM citratées ont alors été privilégiées.

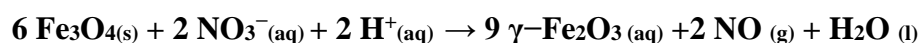
Le travail décrit dans ce chapitre a donc consisté à optimiser la synthèse de liposomes cationiques encapsulant des nanoparticules magnétiques par la méthode d'évaporation en phase inverse qui sera décrite et en optant pour une formulation à base de DOTAP afin de conférer aux liposomes une forte charge positive.

1. Synthèse et caractérisation des nanoparticules magnétiques

Les nanoparticules de maghémite ont été obtenues par la méthode de co-précipitation alcaline décrite par Massart et al.^{154,155} (**Figure 2.1**). La première étape correspond à la co-précipitation en milieu basique de sels de Fe²⁺ et Fe³⁺, formant un précipité noir de magnétite (Fe₃O₄). (**Figure 2.1 A**)



La seconde étape consiste en l'oxydation des ions Fe²⁺ en Fe³⁺ et permet l'obtention de la maghémite (γ -Fe₂O₃) en milieu acide (**Figure 2.1 B**). Cette réaction se traduit par un changement de couleur du précipité de noir en rouille. Pour cette étape la réaction d'oxydoréduction est la suivante :



Les nanoparticules obtenues ont ensuite été soumises à un protocole de lavage (eau/acétone/éther) et ont été redispersées dans l'eau distillée à pH acide formant une solution colloïdale stabilisée par répulsions électrostatiques (**Figure 2.1 C**).

Les nanoparticules de maghémite ainsi obtenues sont polydisperses. Afin de réduire cette polydispersité, un tri en taille a été réalisé selon un protocole de précipitation sélective induite par l'augmentation de la force ionique.^{154,156,157} Les nanoparticules de plus grande taille,

Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation des liposomes fusogènes magnétiques

moins stables du fait de leur moindre surface spécifique et de leur énergie interfaciale plus faible, flocculent préférentiellement. Ces particules flocculées ont été séparées du surnageant par séparation magnétique, et après lavage, redispersées dans de l'eau distillée. Le cycle de précipitation/lavage/redispersion a été répété plusieurs fois sur les fractions surnageantes et précipitées, permettant l'obtention de plusieurs populations de nanoparticules différenciées selon leur taille.

Afin d'assurer une bonne stabilité colloïdale des nanoparticules de maghémite à pH 7, celles-ci ont été fonctionnalisées par des molécules de citrate (**Figure 2.1 D**). Le citrate se complexe à la surface des nanoparticules via ses groupes carboxylates et apporte une charge négative permettant de stabiliser les NPM par répulsions électrostatiques.¹⁵⁸

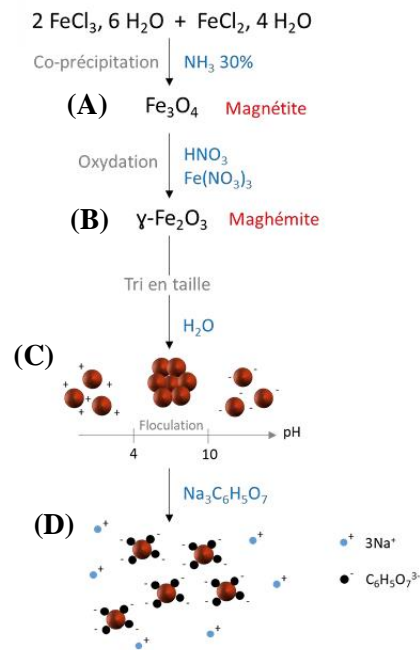


Figure 2.1 : Schéma de la synthèse des nanoparticules de maghémite, suivi d'un tri en taille et de la citration des nanoparticules pour les stabiliser à pH 7.¹³⁵

Le diamètre hydrodynamique des nanoparticules magnétiques (NPM) a été mesuré par diffusion dynamique de la lumière. Un seul pic net centré à 24 nm avec un indice de polydispersité (PDI) de 0,1 est obtenu (**Figure 2.2 A**), ce qui est tout à fait standard pour ces NPM obtenues par coprécipitation et citratées. L'absence de pics secondaires indique qu'il n'y a pas ou peu d'agrégats. Le potentiel zêta des NPM mesuré à pH 7, avec une conductivité de 12 mS/cm, donne un pic net et unique, avec une distribution très étroite, centré à -37 mV ($n =$

3) (*Figure 2.2 B*), indiquant une très bonne stabilité colloïdale à pH neutre grâce aux répulsions électrostatiques induites par les citrates.¹⁵⁸

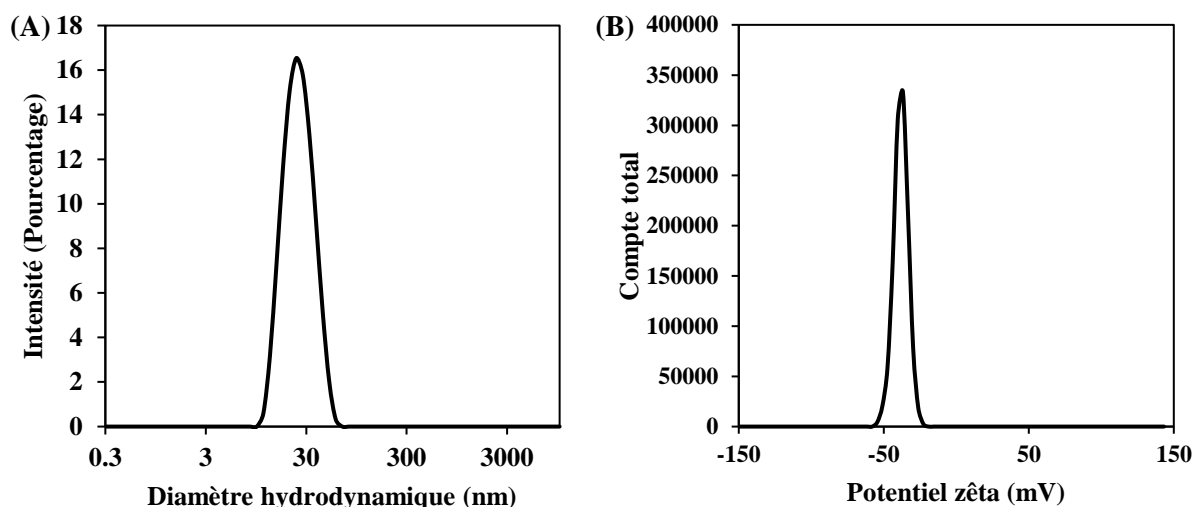


Figure 2.2 : (A) Diamètre hydrodynamique et (B) potentiel zêta des NPM citratés synthétisées par co-précipitation.

Les observations effectuées par microscopie électronique à transmission (TEM) révèlent des nanoparticules de maghémite globalement sphériques (« rock-like ») (*Figure 2.3 A*) avec une taille moyenne de 10 nm (*Figure 2.3 B*).

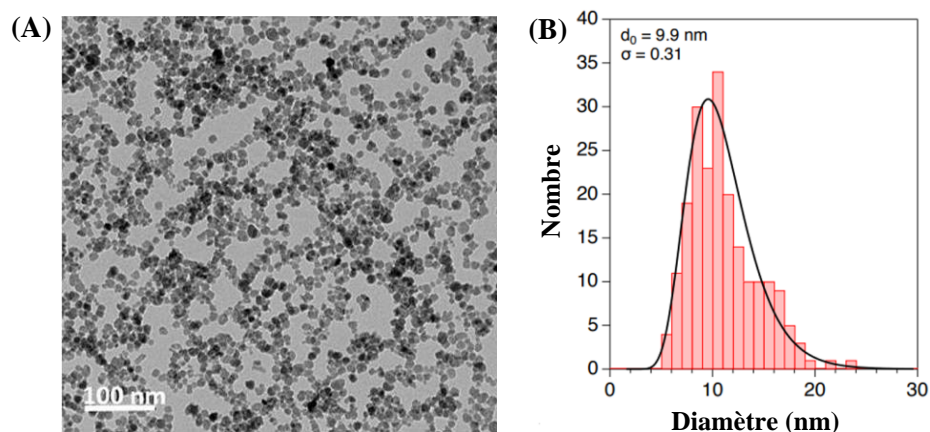


Figure 2.3 : (A) Cliché de microscopie électronique et (B) distribution en taille des NPM citratées.

Après dégradation en milieu acide, la concentration en fer du ferrofluide citraté, déterminée par spectroscopie d'absorption atomique, est de $[Fe] = 1,55$ M. Les mesures d'aimantation, effectuées à l'aide d'un magnétomètre SQUID, ont permis d'obtenir la courbe d'aimantation (*Figure 2.4 A*) et les courbes FC et ZFC (*Figure 2.4 B*) du ferrofluide citraté.

La courbe d'aimantation est en forme de sigmoïde très symétrique, sans boucle d'hystérésis, ce qui est typique d'un comportement superparamagnétique (**Figure 2.4 A**). L'aimantation à saturation obtenue est d'environ 80 emu/g, ce qui est très proche de la valeur théorique de la maghémite pure (74–80 emu/g)¹⁵⁹, et donc démontre une excellente qualité cristalline. Sur la courbe ZFC (**Figure 2.4 B**), un maximum est atteint à environ 130 K, ce qui correspond à la température de blocage (T_B) des nanoparticules. Au-delà de cette T_B , les NPM sont superparamagnétiques, et l'aimantation diminue avec la température. Pour la courbe FC, lors du refroidissement sous champ magnétique, les moments magnétiques s'alignent progressivement et deviennent bloqués à basse température ; ensuite, lors du réchauffement, l'aimantation reste élevée et quasi constante (courbe plate) jusqu'à ce que l'agitation thermique suffise à désaligner les moments au-delà de la température de blocage. Pour des nanoparticules de maghémite citratées d'environ 10 nm dispersées dans l'eau, la température de blocage varie de 150 à 250 K.¹⁵⁸

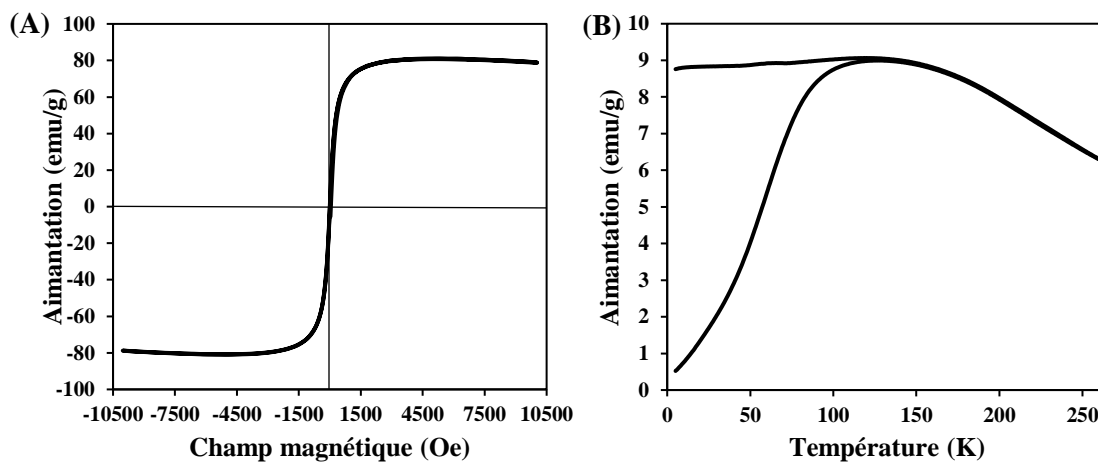


Figure 2.4 : Courbes (A) d'aimantation et (B) ZFC/FC du ferrofluide citraté

2. Mise au point de la synthèse des MFL par REV

a. Choix de la formulation

Notre choix s'est tourné vers la composition lipidique DOTAP/DOPE (1/1) très utilisée dans la littérature pour ces propriétés fusogéniques comme décrit dans le chapitre 1, auquel viennent s'ajouter un lipide pégylé qui va permettre de stabiliser à la fois l'émulsion et les liposomes ; et un lipide fluorescent permettant de suivre la fusion. Ces derniers étant ajoutés pour un équivalent de 0,1, ce qui correspond à des pourcentages molaires de l'ordre de 4-5 %.^{105,160–162} Le TopFluor PE a été choisi car il possède un système conjugué semblable à celui du β -BODIPY C12-HPC, considéré comme étant l'un des fluorophores les plus fusogènes dans

l'article de Csiszar et *al.*¹⁶⁰, mais le TopFluor PE a l'avantage d'être moins coûteux. Les formules des différents lipides sont rappelées dans le *Tableau 2.1*.

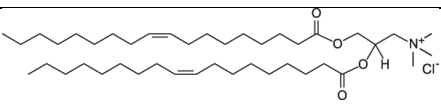
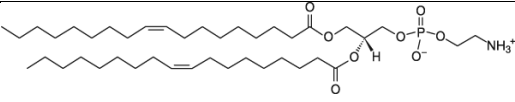
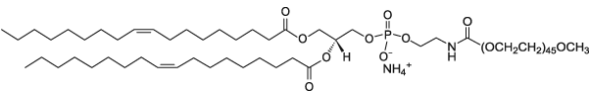
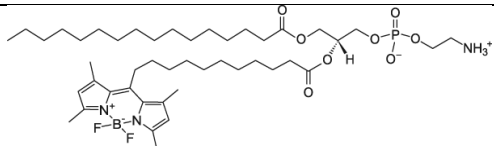
Lipides	Nom complet	Structure
DOTAP	1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (chloride salt)	
DOPE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	
PEG (2000) PE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt)	
TopFluor PE	1-palmitoyl-2-(dipyrrrometheneboron difluoride)undecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	

Tableau 2.1 : Phospholipides synthétiques constituant les MFL : cationique (DOTAP), zwitterionique (DOPE), pégylé (PEG PE), fluorescent (Topfluor PE).

Dans un premier temps, les MFL ont été préparés dans l'eau ultrapure, afin d'étudier leur fusion d'un point de vue électrostatique avec un système modèle (chapitre 3), ce qui permet de ne pas écranter les charges, comme cela peut l'être dans un tampon. Néanmoins, pour l'étude des liposomes fusogènes avec les cellules, il a été nécessaire de préparer les MFL dans un tampon, afin de pouvoir travailler à pH physiologique.

b. Optimisation de la REV

Lors du stage de Master 2 de Namita John, l'influence de la concentration en fer sur la formation des liposomes magnétiques avait été explorée, dans le but de limiter les interactions électrostatiques entre les nanoparticules magnétiques chargées négativement et le lipide cationique DOTAP. Pour cela, la concentration en fer avait été drastiquement réduite, d'un facteur proche de 1000, par rapport à la synthèse classique des liposomes ultramagnétiques. Dans ces conditions, avec une concentration en fer fixée à 2,4 mM et une concentration totale en lipides de 2,6 mM, la synthèse par la méthode d'évaporation en phase inverse (REV) avait permis l'obtention de liposomes magnétiques, mais il était nécessaire d'améliorer le rendement et la reproductibilité de cette synthèse.

Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation des liposomes fusogènes magnétiques

Dans le cadre de ce travail, plusieurs paramètres de synthèse ont été étudiés dans une démarche d'optimisation. L'attention a d'abord été portée sur les étapes clés du protocole REV, notamment la formation de l'émulsion primaire eau-dans-huile, générée par agitation par ultrasons (**Figure 2.5 étapes B-C**), ainsi que la phase d'évaporation du solvant organique sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif (**Figure 2.5 étapes C-D**). Ces étapes sont critiques car elles conditionnent la qualité de l'émulsion intermédiaire et influencent directement l'organisation des lipides. L'étape d'évaporation est également déterminante dans la formation des liposomes car elle affecte non seulement la stabilité des lipides, potentiellement thermosensibles, mais aussi l'efficacité d'encapsulation des nanoparticules dans la bicouche lipidique. La méthodologie utilisée pour déterminer l'influence de ces différents paramètres a été de mesurer systématiquement en fin de synthèse le diamètre hydrodynamique afin de confirmer la présence de liposomes d'environ 300 nm, le potentiel zêta pour s'assurer de la conservation de la charge positive des liposomes et l'observation en MET permettait d'estimer le nombre de liposomes magnétiques sur la grille.

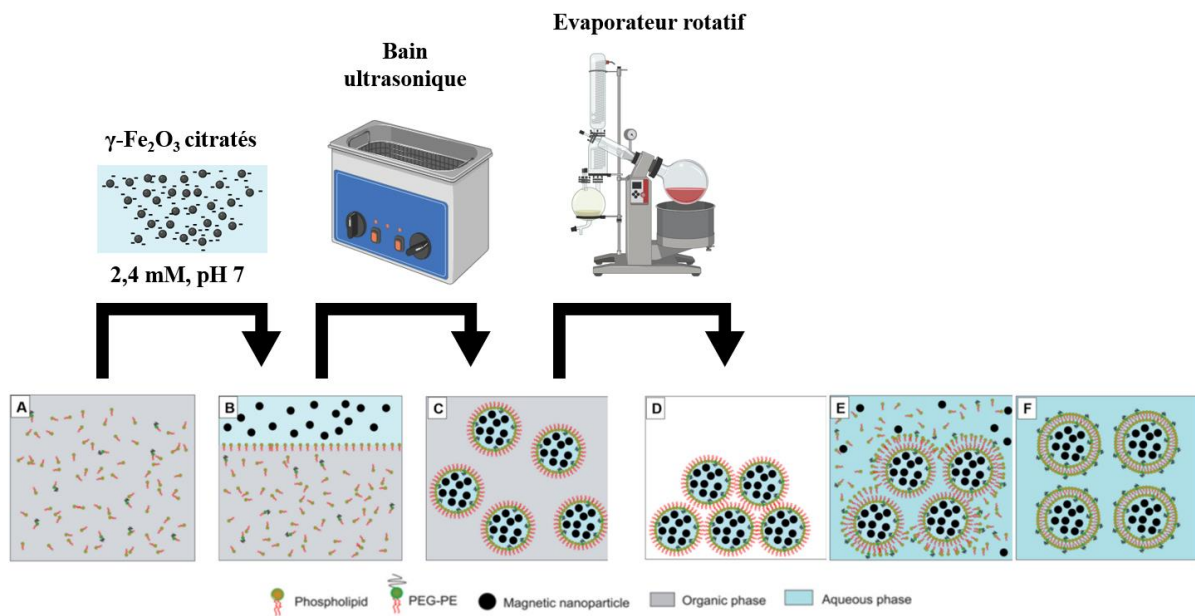


Figure 2.5 : Schéma de la synthèse des MFL.

i. Influence de la température du bain à ultrasons lors de la formation de l'émulsion

L'influence de la température du bain à ultrasons a été étudiée en raison de son rôle critique dans la formation de l'émulsion eau-dans-huile (W/O), étape essentielle à la synthèse des liposomes magnétiques par la méthode REV. Le bain utilisé n'étant pas thermostaté, sa température augmente progressivement au cours du temps, typiquement de 10 – 20 °C en 20

minutes d'utilisation continue. Afin d'évaluer l'impact de la température, différentes plages de température ont été testées : 20 – 30 °C, 25 – 35 °C, 30 – 40 °C, 35 – 45 °C et 40 – 50 °C.

Les résultats expérimentaux indiquent que la synthèse des liposomes magnétiques fonctionne lorsque la température du bain reste comprise entre 20 et 40 °C. En revanche, au-delà de 40 °C, la synthèse échoue systématiquement. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cet échec : (i) à des températures avoisinant 50 °C, les solvants organiques utilisés (chloroforme et éther diéthylique) deviennent plus volatils, ce qui peut entraîner leur évaporation prématurée durant l'agitation ultrasonique, compromettant ainsi la formation stable de l'émulsion W/O ; (ii) l'augmentation de la fluidité des chaînes lipidiques à haute température accroît la perméabilité membranaire, favorisant la fuite des nanoparticules hydrophiles encapsulées (NPM)^{75,163} ; (iii) l'élévation de la pression de vapeur de l'eau réduit l'intensité des phénomènes de cavitation (micro-effondrements), ce qui diminue l'efficacité du cisaillement induit par les ultrasons et, par conséquent, compromet l'émulsification¹⁶⁴ ; (iv) enfin, la stabilité chimique des lipides peut être altérée par la chaleur et les ultrasons, favorisant leur dégradation.¹⁶⁵ Sur le plan moléculaire, bien que le DOTAP et le PEG-PE présentent une bonne stabilité thermique jusqu'à environ 60–70 °C à pH neutre, en raison notamment de l'absence de doubles liaisons particulièrement sensibles à l'oxydation, des conditions ultrasoniques à température élevée ($T > 50$ °C) peuvent néanmoins accélérer significativement l'hydrolyse des liaisons ester (DOTAP, PEG-PE) ou amide (PEG-PE), favorisant ainsi leur dégradation.¹⁶⁵ En revanche, les lipides insaturés tels que le DOPE, le DOTAP et le TopFluorPE présentent une vulnérabilité accrue à l'oxydation radicalaire : leurs doubles liaisons peuvent réagir rapidement avec les radicaux libres générés par la cavitation ultrasonique, notamment en présence d'oxygène dissous et à des températures modérées (40–45 °C).^{165–167}

Ainsi, la température du bain à ultrasons constitue un paramètre critique pour la réussite de la synthèse de liposomes fusogènes magnétiques. Une température comprise entre 25 °C et 40 °C apparaît optimale, car elle permet une cavitation efficace tout en limitant l'évaporation des solvants et la dégradation thermique ou oxydative des lipides. En pratique, cependant, l'absence de thermostat complique le contrôle précis de la température, la température est donc mesurée au début et à la fin de l'émulsion. Expérimentalement, la solution est donc introduite dans le bain à ultrasons à température ambiante (18–20 °C) et, au cours des 20 à 40 minutes d'US, la température monte progressivement jusqu'à 30–38 °C. Dans ces conditions, la synthèse des MFL permet d'obtenir, en moyenne, 3 à 5 liposomes magnétiques par carreau de grille en MET.

ii. Influence de la température du bain marie lors de l'évaporation des solvants

L'impact des conditions expérimentales (temps et température) lors de l'évaporation sous vide a été évalué. Cette phase (**Figure 2.5 C-D-E**) est cruciale dans le protocole de synthèse REV, puisqu'elle permet l'élimination des solvants organiques, ici le chloroforme ($T_{eb} = 61\text{ °C}$) et l'éther diéthylique ($T_{eb} = 35\text{ °C}$), tous deux très volatils, et déclenche un phénomène physique fondamental dans la formation des liposomes : le collapse des gouttelettes de l'émulsion primaire (*passage de l'étape D à l'étape E*).

Ce collapse qui correspond à la rupture partielle de certaines gouttelettes permet la libération de lipides (**Figure 2.5 E**) qui se réorganisent alors autour d'autres gouttelettes intactes, formant ainsi une bicouche lipidique (**Figure 2.5 F**). Ce processus s'observe expérimentalement via la transition de phase gel à liquide du film lipidique. Une fois cette transition terminée, la phase devient fluide et prend une teinte orangée caractéristique, résultant du mélange des lipides (jaune/vert) avec la dispersion de NPM (marron cuivré). Il faut noter que ce collapse induit également le relargage de nanoparticules magnétiques dans le milieu (**Figure 2.5 E**).

Comme pour l'étape aux bains US, la température d'évaporation constitue un facteur critique. Des températures trop élevées ($> 40\text{--}50\text{ °C}$) peuvent induire une dégradation thermique des lipides, en particulier ceux contenant des insaturations (oxydation), tout en accélérant l'évaporation des solvants de manière incontrôlée. Ceci peut entraîner la formation de structures lipidiques hétérogènes ou de liposomes de taille non maîtrisée. À l'inverse, des températures trop basses ralentissent significativement l'évaporation, ce qui peut inhiber la transition gel/liquide et nuire à la formation efficace des liposomes. Ainsi, une plage de température modérée, située entre 30 °C et 40 °C , a été identifiée comme optimale pour concilier efficacité d'évaporation, transition gel/liquide contrôlée et préservation de l'intégrité structurale des lipides.

Deux conditions expérimentales ont été comparées : 28 °C pendant 90 minutes et 40 °C pendant 20 minutes (pression d'évaporation constante). Bien que ces deux conditions conduisent à une quantité de MFL observés en TEM relativement équivalente (5 à 8 MFL par carreau), la seconde a été retenue pour sa rapidité, la température de 40 °C permettant une évaporation complète en seulement 20 minutes sans compromettre la qualité des liposomes formés.

iii. Influence du ratio fer/lipides

La concentration en fer ayant déjà été fortement réduite par rapport à celle utilisée pour les liposomes ultramagnétiques, c'est l'impact de la concentration totale en lipides qui a été exploré. Celle-ci a été ajustée entre 2 mM et 5 mM, afin d'identifier un ratio fer/lipides optimal pour la formation des MFL. Chaque préparation, après séparation magnétique, a été analysée par DLS (diamètre hydrodynamique et potentiel zêta) et examinée en TEM. Les mesures DLS montrent que le diamètre et le potentiel zêta restent globalement stables quelle que soit la concentration lipidique. En revanche, les observations en TEM révèlent qu'à faible concentration en lipides (2 mM), peu de MFL se forment (**Figure 2.6 A**), probablement en raison d'un manque de lipides pour envelopper les nanoparticules dans une bicouche complète ; et à forte concentration lipidique (5 mM), un excès de liposomes vides est observé, souvent agrégés avec des nanoparticules (**Figure 2.6 B**), ce qui compromet la formation de structures bien définies.

Ces comportements s'expliquent par la nécessité, dans la méthode REV, d'un excès contrôlé de lipides pour permettre le passage de la monocouche à la bicouche lors du collapse, condition essentielle à la formation de liposomes. Si la concentration en lipides est trop faible, les bicouches lipidiques ne peuvent pas se former correctement autour des NPM, limitant l'encapsulation. À l'inverse, un excès de lipides favorise la formation de liposomes vides non chargés en NPM, qui, en raison de leur charge positive, interagissent avec les NPM libres et forment des agrégats, au détriment de la formation de MFL. Néanmoins, un ratio fer/lipides de 0,8 (soit $[\text{Fe}] = 2,4 \text{ mM}$ et $[\text{lipides}] = 3 \text{ mM}$) semble représenter un compromis optimal, permettant d'obtenir un nombre suffisant de liposomes magnétiques tout en limitant la formation de liposomes vides. Cette condition favorise ainsi une encapsulation efficace des nanoparticules tout en réduisant les phénomènes d'agrégation observés à plus forte concentration lipidique (**Figure 2.6 C**).

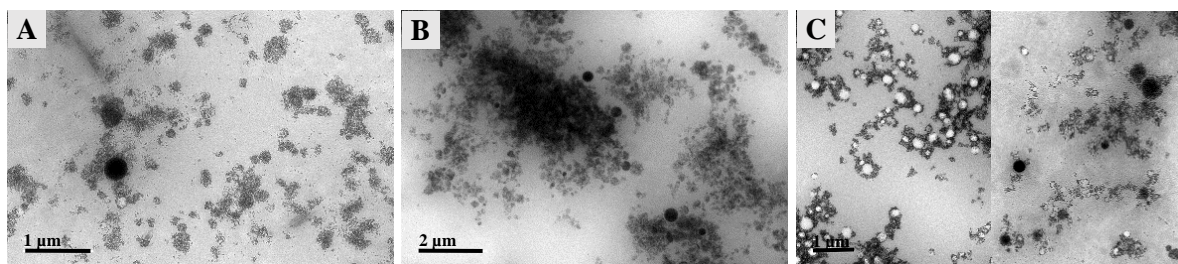


Figure 2.6 : Clichés de MET des MFL préparés par REV avec une concentration en fer constante (2,4 mM) et des concentrations en lipides totales de (A) 2 mM, (B) 3 mM, (C) 5 mM. Les observations ont été faites après séparation magnétique mais sans filtration.

c. Mise au point de la purification des MFL

À l'issue de la synthèse, la solution obtenue contient un mélange hétérogène composé de MFL, de liposomes vides, de nanoparticules magnétiques non encapsulées, ainsi que d'agrégats, parfois visibles à l'œil nu. Si la présence de liposomes vides et de NPM libres est attendue en raison de la méthode d'encapsulation utilisée, celle des agrégats est davantage liée à l'utilisation du lipide cationique, qui favorise les interactions électrostatiques non spécifiques. Afin de récupérer un maximum de liposomes magnétiques tout en conservant leur charge positive, plusieurs méthodes de purification post-synthèse ont été testées : la séparation magnétique, la centrifugation et la filtration sur seringue.

i. Séparation magnétique classique

La séparation magnétique repose sur l'attraction des objets magnétiques dans un gradient de champ magnétique. Plus ces objets sont magnétiques, plus la séparation va être rapide et efficace. En effet, en fin de synthèse, la solution récupérée contient des MFL, des nanoparticules magnétiques stables en solution et des agrégats magnétiques. La séparation magnétique va en théorie permettre de séparer les plus gros objets magnétiques, liposomes et agrégats, des liposomes vides et des nanoparticules non encapsulées.

Pour cela, la dispersion est placée pendant 2 heures au contact d'un aimant puissant en Nd-Fe-B (Calamit, 15 cm × 8 cm × 2 cm). Le culot formé est ensuite récupéré et analysé. Une analyse par diffusion dynamique de la lumière (DLS), réalisée avant et après séparation (**Figure 2.7A**), met en évidence trois populations de taille distincte dans les deux échantillons : un premier pic autour de 200 nm, correspondant vraisemblablement aux MFL, et un second, plus large, centré vers 1500 nm, attribué à des agrégats. Un troisième pic, autour de 50 nm, n'est présent que dans la dispersion initiale et disparaît après séparation. Il est donc probable qu'il corresponde aux nanoparticules libres non encapsulées, éliminées lors du processus. Les observations en microscopie électronique (MET) du culot confirment la présence de MFL et d'agrégats de tailles diverses (200 à 5000 nm, **Figure 2.7 C**). Par ailleurs, la mesure du potentiel zêta montre que les structures collectées restent chargées positivement (**Figure 2.7 B**), ce qui confirme leur nature cationique.

La séparation magnétique apparaît donc comme une méthode efficace pour concentrer les MFL tout en éliminant une grande partie des nanoparticules libres, des lipides isolés et des liposomes vides. Toutefois, la présence résiduelle d'agrégats montre que cette technique ne

permet pas une purification complète. Elle reste cependant simple, rapide à mettre en œuvre, et suffisamment sélective pour des applications nécessitant une préconcentration fiable des MFL.

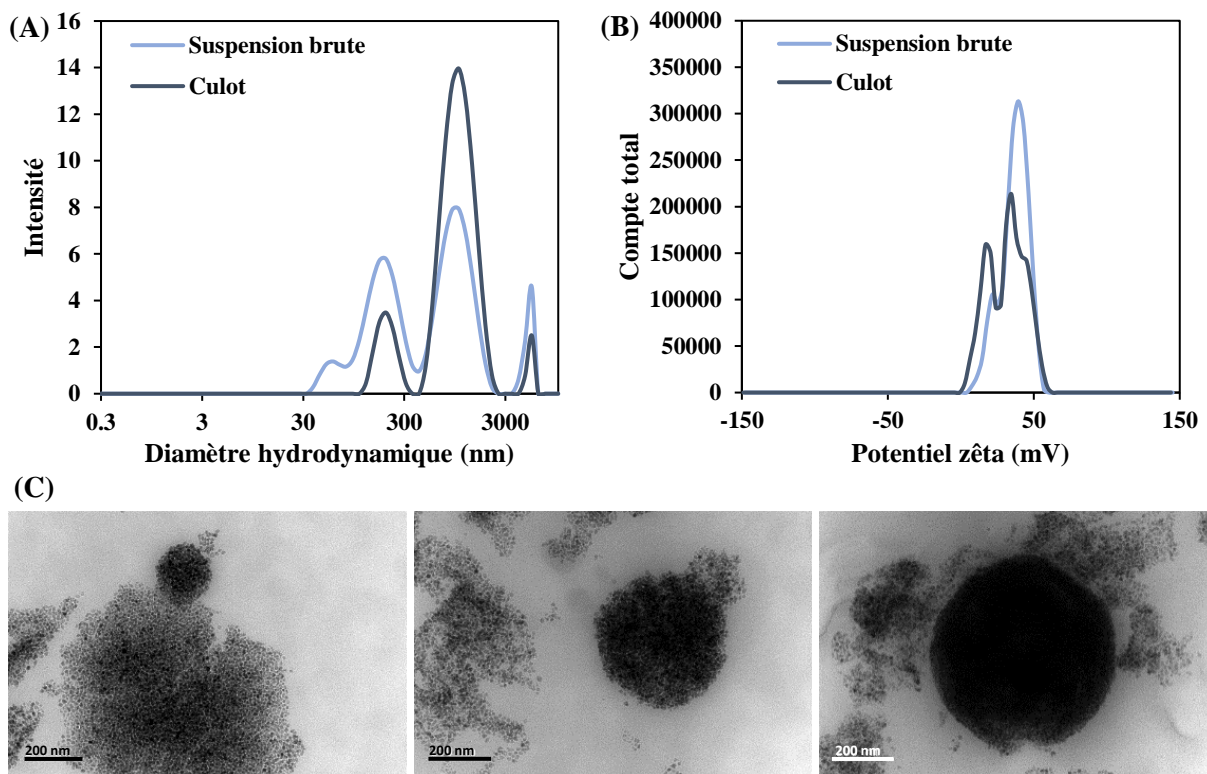


Figure 2.7 : (A) Diamètre hydrodynamique, (B) potentiel zêta de la solution obtenue en fin de synthèse avant et après séparation magnétique (culot). (C) Clichés de microscopie électronique du culot.

ii. Séparations magnétiques fractionnées

L'un des principaux obstacles rencontrés lors de la synthèse des MFL est la formation concomitante d'agrégats de nanoparticules, qui sont co-récupérés avec les MFL après une séparation magnétique de 2 heures. Afin de tenter de dissocier les MFL des agrégats, un fractionnement temporel du culot magnétique a été réalisé : une première fraction (f1) a été prélevée après 15 minutes sur aimant, la seconde (f2) après 1 h 45, aucun culot n'étant observable entre ces deux temps.

Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation des liposomes fusogènes magnétiques

Les culots redispersés ont été analysés par DLS (taille et mesure du potentiel zêta) et MET. Le diagramme de distribution des tailles en intensité du culot f1 présente deux pics, un à 170 nm (taille typique des MFL) et un second, très intense, à 1200 nm, attribué à des agrégats de NPM (*Figure 2.8 A, bleu clair*). Le culot f2 révèle un premier pic à 125 nm, et un second plus large vers 660 nm, correspondant respectivement à de petits liposomes et des agrégats (*Figure 2.8 A, bleu foncé*). En distribution en nombre, la taille dominante pour f2 est de 80 nm, suggérant la présence de petits MFL ou petits agrégats (*Figure 2.8 B, bleu foncé*). En revanche, f1 est dominé par des objets à 170 nm, mais avec un pic secondaire à 1000 nm (*Figure 2.8 B, bleu clair*), confirmant la coexistence de MFL et de gros agrégats. Les observations en MET confirment ces données puisque la fraction f1 contient la majorité des MFL avec une taille d'environ 200 nm (*Figure 2.8 C*), mais aussi des agrégats de grande taille. Alors que dans la fraction f2, les MFL sont moins nombreux, plus petits (*Figure 2.8 D*) et accompagnés d'agrégats de taille intermédiaire (~400–600 nm).

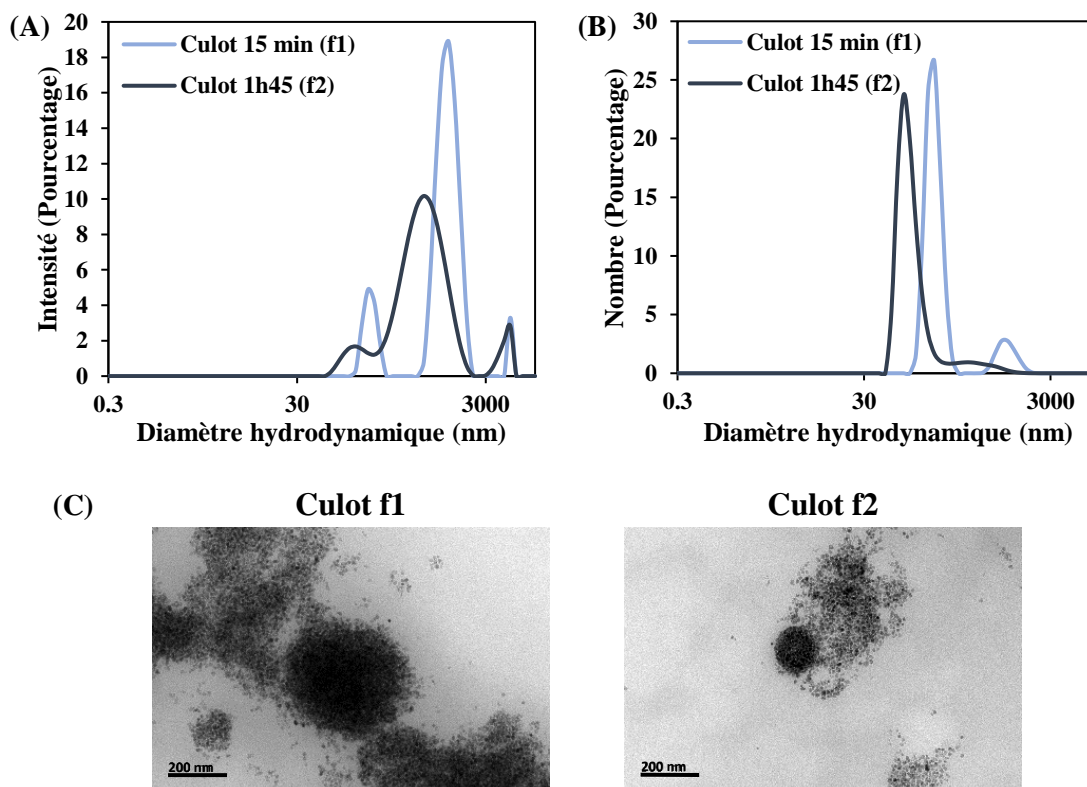


Figure 2.8 : (A) Diamètre hydrodynamique, (B) potentiel zêta, et (C) clichés de microscopie électronique des culots f1 et f2.

Ce fractionnement a permis de démontrer que la séparation magnétique des MFL est rapide et efficace, avec conservation de la charge positive. Cependant, elle ne permet pas d'exclure complètement les agrégats, particulièrement les plus gros, qui sont capturés dès les premières minutes.

À la suite du premier fractionnement, un second protocole a été mis en place dans le but d'améliorer la séparation des MFL. Ce fractionnement visait à mieux contrôler la séparation en utilisant des aimants de taille différente, tout en réduisant les temps d'exposition à moins de 15 minutes pour isoler efficacement les gros agrégats.

La solution est déposée sur un petit aimant cylindrique (0,5 cm de diamètre et 1 cm de longueur) pendant 1 minute, permettant la récupération des agrégats de NPM dans la fraction f1. Le surnageant a ensuite été récupéré et soumis à nouveau au même aimant pour 4 minutes (fraction f2), puis une troisième fois pendant 2 minutes (fraction f3). Les fractions suivantes ont été exposées à un gros aimant rectangulaire (aimant Nd-Fe-B, 15 cm × 8 cm × 2 cm) avec des durées d'exposition respectives de 6 minutes (f4), 12 minutes (f5), 24 minutes (f6) et 48 minutes (f7).

Les analyses par diffusion dynamique de la lumière (DLS) ont montré, pour les fractions f1 à f4, la présence de deux populations distinctes : un premier pic correspondant aux MFL et agrégats de NPM de taille similaire, avec un diamètre hydrodynamique entre 160 et 260 nm, et un second pic correspondant à des agrégats plus volumineux, allant de 500 à 1400 nm (*Figure 2.9 A*). Pour les fractions f5 et f6, le second pic se déplace vers des tailles plus petites, proches de 300 nm (*Figure 2.9 B*), suggérant la décantation des plus gros agrégats.

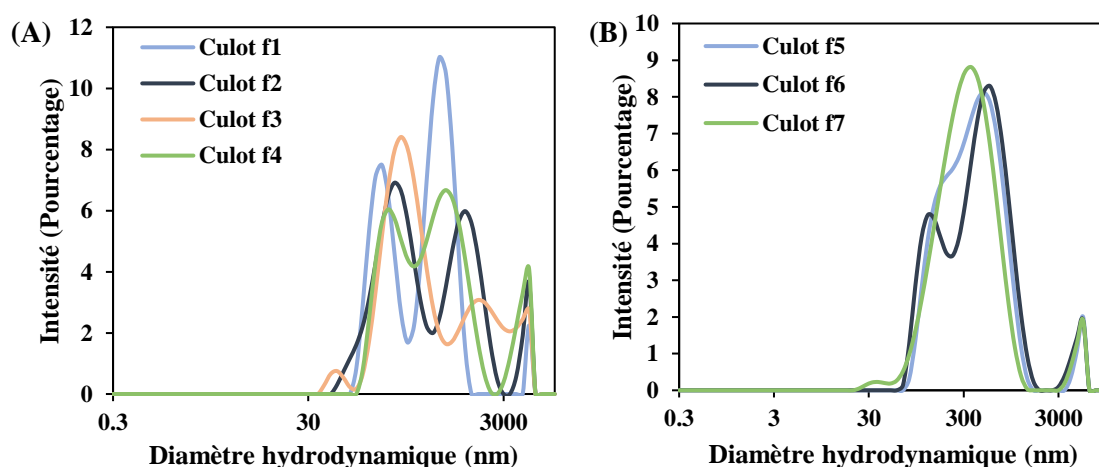


Figure 2.9 : Diamètre hydrodynamique des fractions (A) f1 à f4 et (B) f5 à f7,

Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation des liposomes fusogènes magnétiques

La MET a confirmé ces observations puisque les fractions f1 et f2 contiennent majoritairement des agrégats de NPM avec seulement 1 à 2 MFL par carreau (*Figure 2.10 A*), tandis que les fractions f3 et f4 présentent environ une dizaine de MFL par carreau (*Figure 2.10 B*), toujours accompagnés de gros agrégats (*Figure 2.10 A et B*). Les fractions f5 et f6 montrent un enrichissement significatif en MFL (environ vingt par carreau), associés à des agrégats de petite à moyenne taille (*Figure 2.10 C*), alors que la fraction f7 est principalement constituée d'agrégats intermédiaires avec une quasi-absence de MFL (*Figure 2.10 D*).

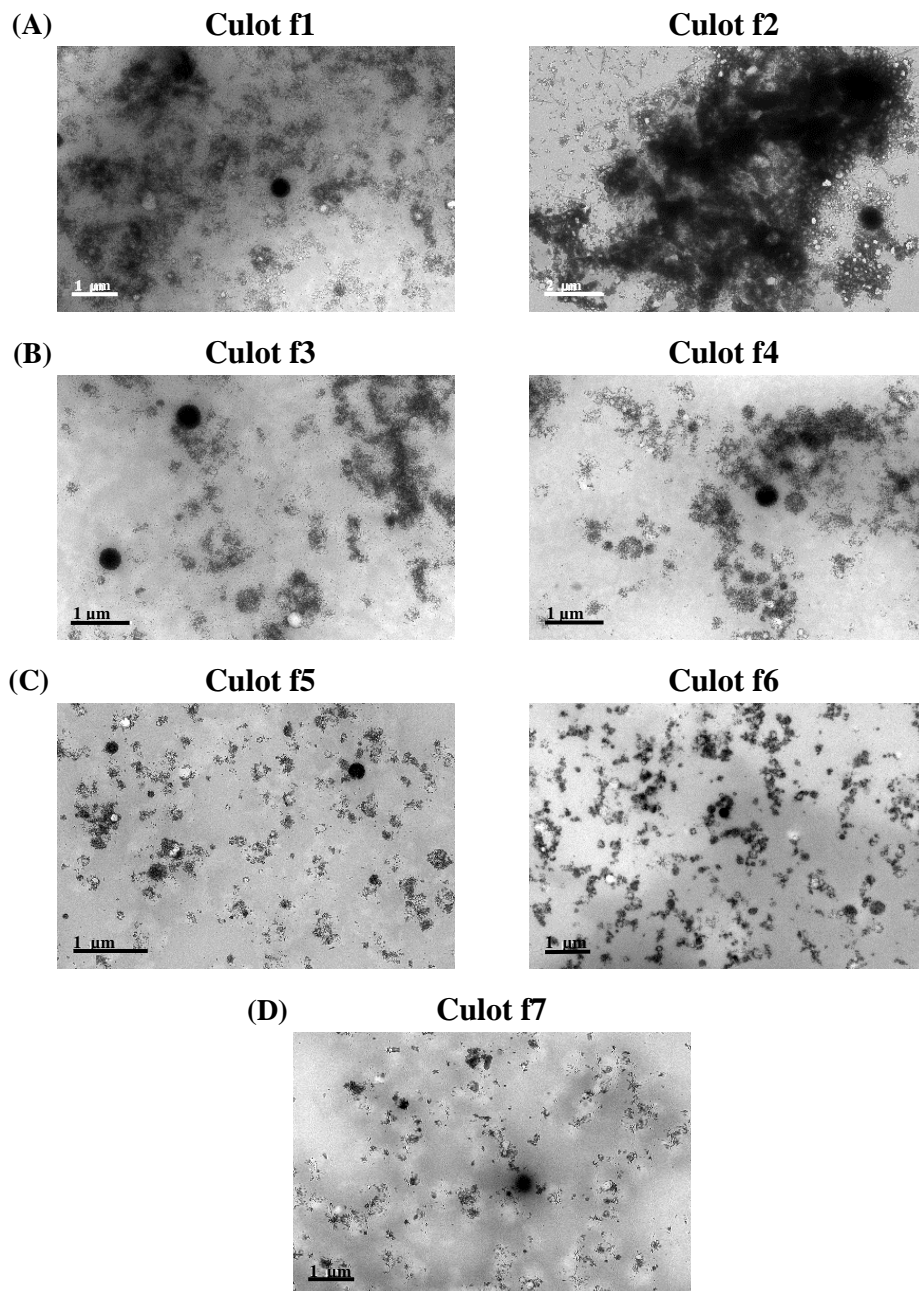


Figure 2.10 : Clichés de microscopie électronique des culots (A) f1 et f2, (B) f3 et f4, (C) f5 et f6, et (D) f7.

En résumé, ce fractionnement magnétique séquentiel met en évidence une séparation progressive : les gros agrégats de NPM sont attirés en premier (f1, f2), suivis d'une augmentation du nombre de MFL dans les fractions intermédiaires (f3, f4). Les fractions f5 et f6 correspondent au pic de récupération des MFL, avec une réduction des gros agrégats qui ont décanté, tandis que la fraction f7 regroupe principalement les agrégats de taille intermédiaire, quasiment dépourvus de MFL. Cette méthode permet donc une séparation partielle des MFL par rapport aux gros agrégats de NPM en exploitant les différences de taille et de propriétés magnétiques.

Toutefois, elle ne permet pas une purification complète, en raison de la persistance d'agrégats de NPM de taille similaire aux MFL. Par ailleurs, la mise en œuvre plus contraignante de cette méthode de séparation magnétique fractionnée en limite l'applicabilité pratique, ce qui conduit à privilégier la séparation magnétique classique pour les futures synthèses.

iii. Fractionnement de la centrifugation

Toujours dans le but d'éliminer les gros agrégats et de purifier la dispersion de liposomes magnétiques fusogènes, des centrifugations successives ont été réalisées. Ce procédé permettrait de séparer les MFL des agrégats en fonction de leur densité, les particules les plus lourdes sédimentant sous l'effet de la force centrifuge pour former un culot, alors que les particules plus légères restent en dispersion dans le surnageant.

Après une séparation magnétique classique effectuée (aimant Nd-Fe-B rectangulaire 15×8×2 cm pendant 2 heures), le culot de MFL récupéré a été redispersé dans de l'eau puis soumis à plusieurs cycles de centrifugation successifs. À chaque étape, les culots et surnageants ont été collectés et analysés par diffusion dynamique de la lumière (DLS) et microscopie électronique en transmission. Les différentes fractions obtenues sont notées f1 et f2 (1 min à 1000 RPM), f3 et f4 (2 min à 1000 RPM), f5 (6 min à 1000 RPM) et f6 (4 min à 2000 RPM).

Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation des liposomes fusogènes magnétiques

Les analyses DLS montrent systématiquement la présence de trois pics distincts dans toutes les fractions. Le pic principal, le plus intense, est localisé autour de 1000 nm dans les culots (*Figure 2.11 A*) et à environ 800 nm dans les surnageants (*Figure 2.11 B*). Deux autres pics, moins intenses, apparaissent autour de 250 nm pour les culots (*Figure 2.11 A*) et 170 nm pour les surnageants (*Figure 2.11 B*), ainsi qu'un troisième pic plus large dépassant 3 μm dans les deux cas (*Figure 2.11 A et B*). Cette répartition en taille suggère que les culots contiennent des MFL (250 nm) et agrégats de nanoparticules magnétiques plus volumineux (1000 nm) que ceux présents dans les surnageants (170 nm pour MFL et 800 nm pour agrégats).

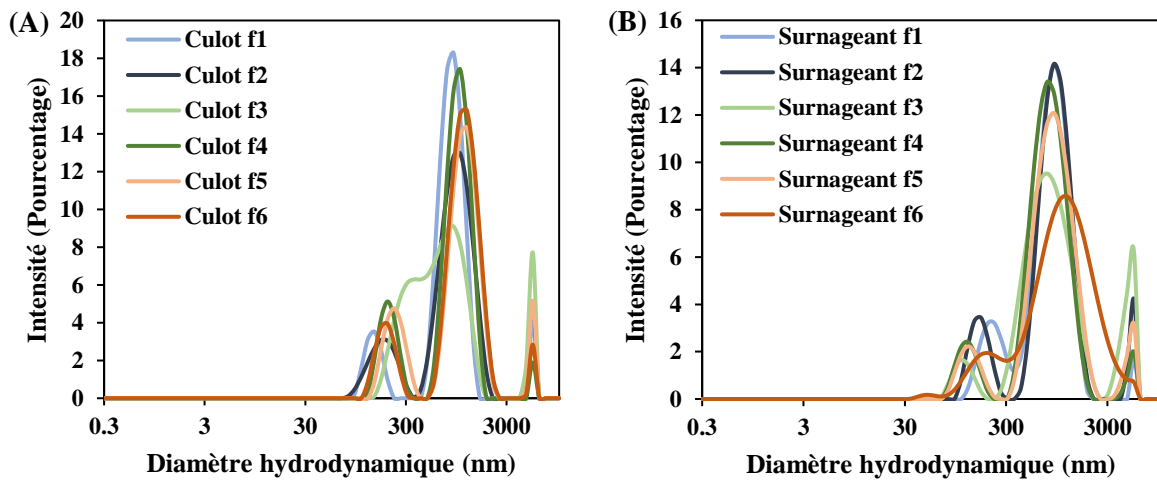


Figure 2.11 : Diamètre hydrodynamique (A) de chaque culot redispersé dans l'eau et (B) de chaque surnageant.

Les observations en MET corroborent ces résultats, révélant que les culots sont principalement composés d'agrégats de NPM et de liposomes vides, avec une faible présence de MFL (*Figure 2.12 A*). En revanche, les surnageants contiennent majoritairement des MFL ainsi que des agrégats de NPM de taille inférieure (*Figure 2.12 B*). L'analyse qualitative en MET des surnageants a permis d'identifier que les fractions f2 et f3 contiennent la plus forte concentration de MFL, avec environ une trentaine de MFL par carreau ($n=3$), contre seulement 3 à 4 MFL par carreau pour f1 et f7, 15 pour f4, et 6 à 8 pour f5 et f6. Le potentiel zêta mesuré pour chaque fraction est homogène et centré autour de +50 mV, indiquant que la charge positive caractéristique des MFL est préservée tout au long du processus.

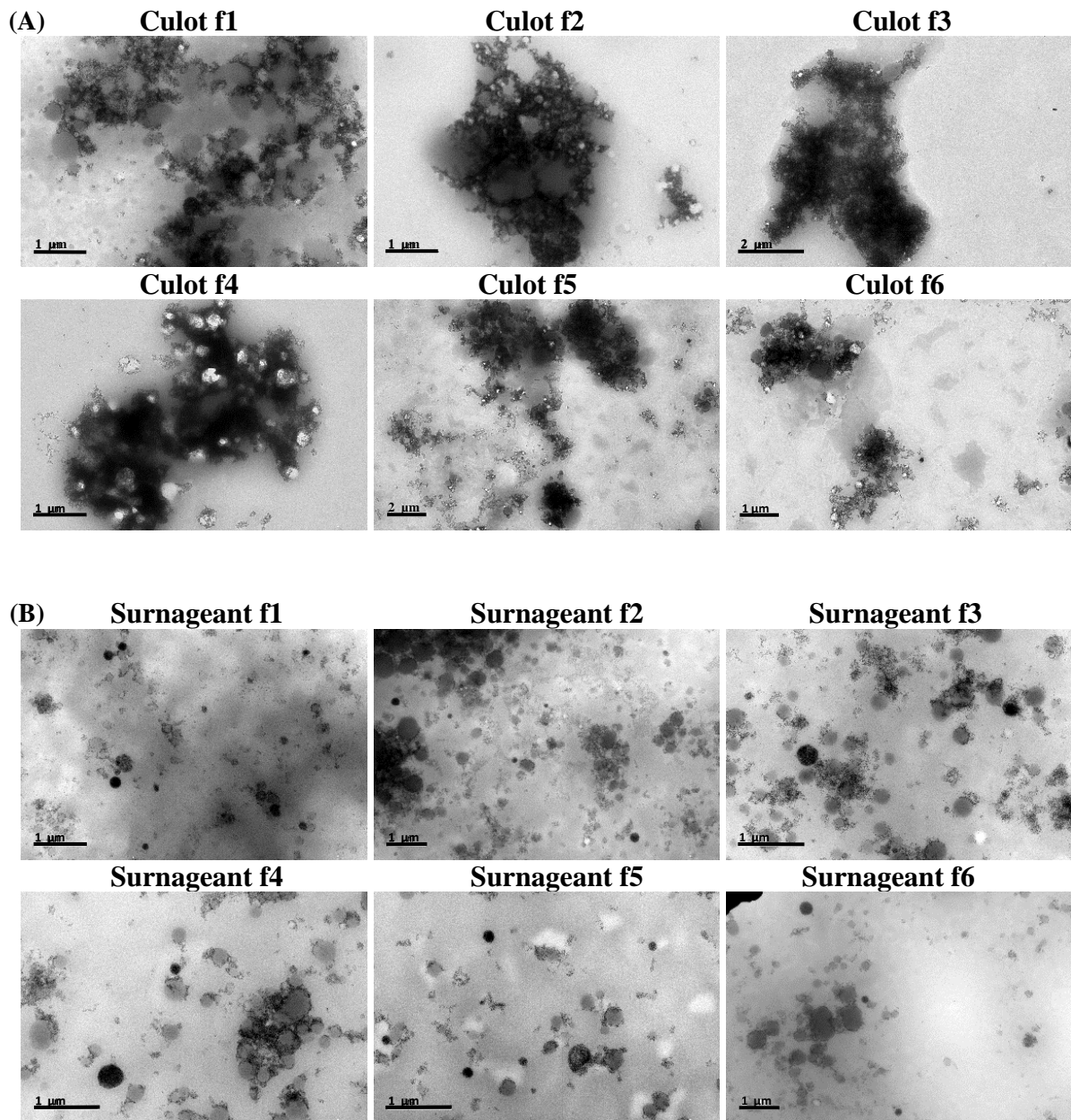


Figure 2.12 : Clichés de MET de chaque (A) culot redispersé dans l'eau et (B) surnageant.

Ainsi, bien que la centrifugation permette d'éliminer une partie des gros agrégats de NPM, elle ne conduit pas à une purification complète, laissant subsister des agrégats de taille intermédiaire au sein de la dispersion, situation comparable à celle observée avec le fractionnement de la séparation magnétique. Si l'objectif principal est d'éliminer les gros agrégats de manière simple et rapide, la centrifugation apparaît plus avantageuse en termes de facilité opérationnelle et de rapidité, comparée à la séparation magnétique fractionnée. La séparation magnétique fractionnée, bien que plus spécifique dans son principe, présente une complexité technique plus élevée et un protocole plus long, limitant son usage pour une purification rapide.

iv. Filtration sur filtre seringue

Toujours dans le but d'améliorer la séparation des gros agrégats des liposomes magnétiques fusogènes, la filtration à l'aide de filtres à seringue a été testée en complément de la séparation magnétique. Pour les liposomes ultramagnétiques, une filtration après l'étape d'évaporation à l'évaporateur rotatif, utilisant une membrane en polyéthylène (PE) avec des pores de 450 nm, permet d'éliminer efficacement les plus gros agrégats. Cependant, pour les MFL, les premiers essais avec ce type de filtre n'ont pas été concluants pour deux raisons. La première étant que le volume mort du filtre était trop important par rapport au volume de la solution récupérée en fin de synthèse, ce qui entraînait une rétention quasi totale de l'échantillon dans le corps du filtre. La deuxième était qu'après filtration, les MFL perdaient leur charge positive.

Une alternative a donc été testée avec des membranes en acétate de cellulose, reconnues pour leur faible adsorption et couramment utilisées pour des biomolécules sensibles telles que protéines, ADN, et lipides. Ces filtres hydrophiles sont globalement neutres, sans charge nette ni groupes anioniques susceptibles d'interagir électrostatiquement avec les têtes cationiques des lipides, ce qui minimise la fixation et la perte de charge. Pour valider cette approche, la dispersion de MFL obtenue après synthèse a été divisée en deux : une moitié a été filtrée (fraction f2), tandis que l'autre est restée non filtrée (fraction f1). Les deux fractions ont ensuite été soumises à une séparation magnétique classique. Les culots récupérés ont été redispersés et analysés par diffusion dynamique de la lumière et microscopie électronique à transmission.

Les résultats DLS montrent que la dispersion non filtrée (f1) présente deux populations distinctes : un pic majeur autour de 570 nm, attribuable aux agrégats ou liposomes de grande taille, et un pic mineur à 170 nm correspondant probablement aux MFL (**Figure 2.13 A, bleu clair**). Après filtration (f2), la distribution devient plus homogène, avec un unique pic centré à environ 310 nm (**Figure 2.13 A, bleu foncé**), indiquant une meilleure uniformité de taille. Par ailleurs, le potentiel zêta reste stable et positif (+44 mV), démontrant que la charge superficielle des liposomes est conservée après filtration (**Figure 2.13 B**).

L'observation par MET corrobore ces résultats, puisque la quantité de MFL reste comparable pour les deux fractions (≈ 10 MFL/carreau, $n=5$), tandis que la taille des agrégats de NPM est visiblement réduite, laissant majoritairement des nanoparticules isolées ou faiblement agrégées de taille proche de celle des liposomes (*Figure 2.13 C*).

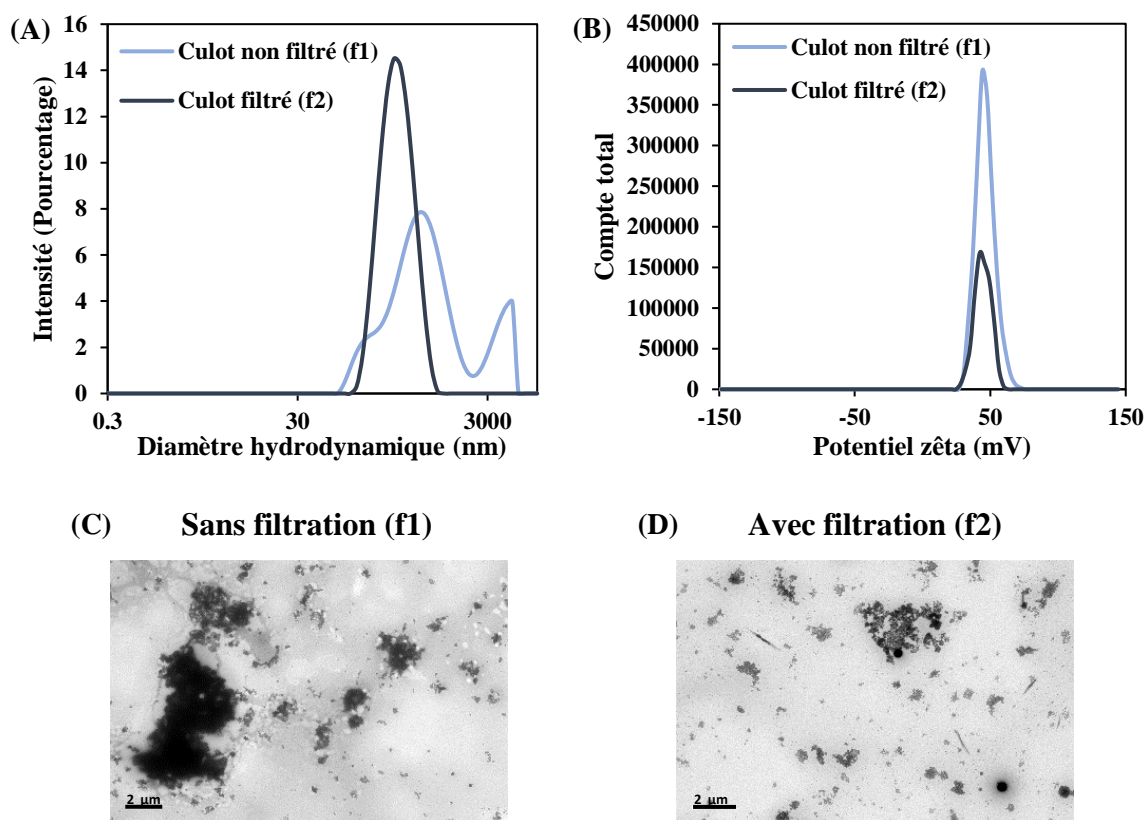


Figure 2.13 : (A) Diamètre hydrodynamique, (B) potentiel zêta et (C) cliché de MET des fractions sans et (D) avec filtration à travers une membrane d'acétate de cellulose.

Ainsi, la filtration sur membrane d'acétate de cellulose améliore significativement l'homogénéité de la dispersion, sans altérer la charge ni réduire la concentration en MFL. Cette méthode se distingue des autres techniques de purification en permettant une élimination effective des agrégats de taille supérieure aux MFL. Toutefois, elle ne supprime pas complètement les agrégats dont la taille est proche de celle des liposomes, ce qui explique la présence d'un seul pic en DLS mais d'agrégats observés en MET. Il est aussi possible que certains agrégats visibles en MET se soient formés lors du séchage de la grille, puisqu'ils n'apparaissent pas en DLS. En conclusion, la purification à l'aide de filtres en acétate de cellulose constitue la seule méthode testée permettant une élimination réelle et efficace des gros agrégats tout en préservant les propriétés physico-chimiques essentielles des MFL.

d. Synthèse optimisée des liposomes fusogènes magnétiques

À l'issue des différentes étapes d'optimisation, des liposomes fusogènes magnétiques ont été préparés par la méthode d'évaporation en phase inverse, schématisée **Figure 2.6**. L'émulsion eau dans l'huile est formée par dispersion d'une solution de nanoparticules magnétiques citratées ($Fe = 2,4 \text{ mM}$, 1 mL) dans une phase organique éther/chloroforme ($3/1 \text{ v/v}$) dans laquelle les lipides DOTAP, DOPE, PEGPE et TopfluorPE ont été, au préalable, mélangés dans les proportions DOTAP/DOPE/PEGPE/TopFluorPE $45,5/45,5/4,5/4,5 \%$ mol. Après 25 minutes aux ultrasons, l'émulsion est transférée très rapidement à l'évaporateur rotatif. L'observation de la transition gel-liquide se produit au bout d'une vingtaine de minutes, la solution contenant les MFL est alors récupérée et filtrée sur membrane d'acétate de cellulose (450 nm) puis placée sur l'arête d'un aimant rectangulaire ($Nd-Fe-B$, $15 \text{ cm} \times 8 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$). Le culot contenant les MFL est alors redispersé dans l'eau ($100 \mu\text{L}$) (**Figure 2.14**).

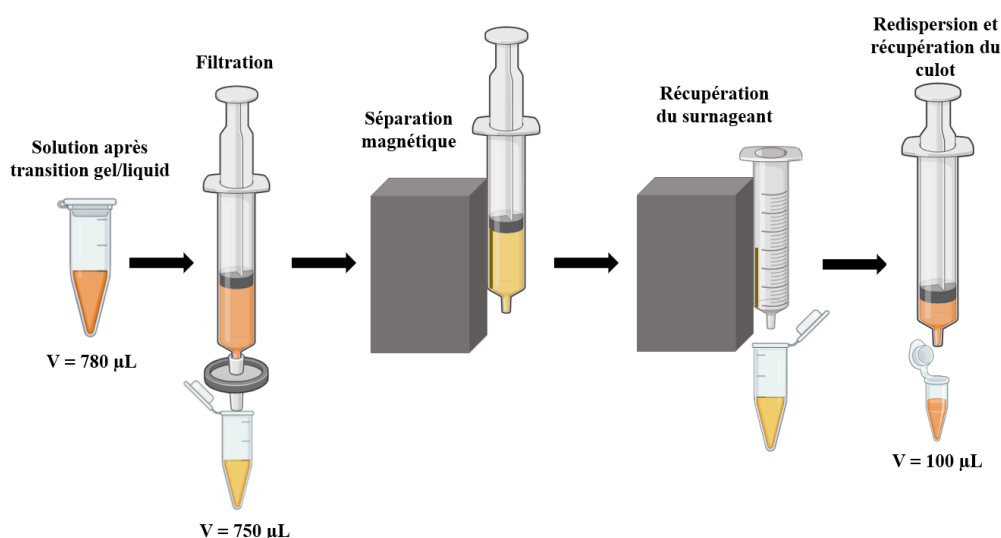


Figure 2.14 : Schéma des étapes de purification des MFL.

Les MFL dans l'HEPES ont été préparés selon le même protocole en utilisant des NPM dispersées dans l'HEPES. Les MFL ainsi obtenus ont été utilisés pour des études de fusion avec des vésicules extracellulaires dans le cadre du stage de Master 2 de Sofia Liz Basteiro, en collaboration avec Claire Wilhelm (laboratoire Physique et Cancer, Institut Curie).

3. Caractérisation des liposomes fusogènes magnétiques

a. Taille, charge et stabilité des MFL par des méthodes de diffusion de la lumière

Les diamètres hydrodynamiques des MFL dans l'eau ultrapure (conductivité de 40 $\mu\text{S}/\text{cm}$) et dans le tampon HEPES (pH = 7) ont été mesurés par diffusion dynamique de la lumière. Un pic intense centré autour de 310 nm dans l'eau (*Figure 2.15, bleu clair*) et 360 nm dans l'HEPES (*Figure 2.15, bleu foncé*) est observé, avec respectivement un indice de polydispersité (PDI) de 0,25 et 0,27. Un pic secondaire à plus de 3 μm correspondant à des agrégats ou poussière est observable malgré les étapes de purification (*Figure 2.15*). Le diamètre hydrodynamique est légèrement plus élevé dans HEPES que dans l'eau, mais cette taille correspond aux tailles obtenues classiquement en REV, sachant que cette méthode, contrairement à l'hydratation d'un film lipidique, ne comporte pas d'étape d'extrusion qui permettrait d'homogénéiser les tailles.

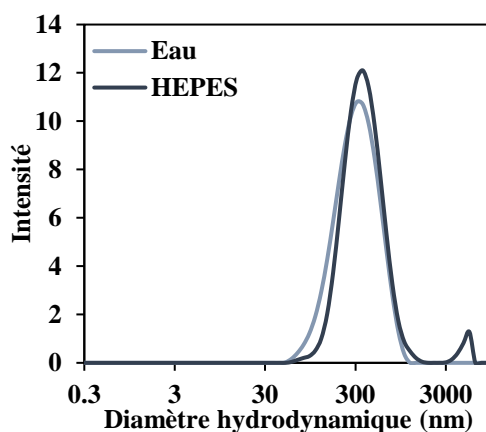


Figure 2.15 : Diamètre hydrodynamique des MFL, mesuré sur trois mesures consécutives par diffusion dynamique de la lumière à 25 °C.

Les MFL dans l'eau ont également été caractérisés par NTA (Nanoparticle Tracking Analysis). Ces analyses ont été réalisées par Sofia Liz Basteiro à l'institut Pierre Gilles de Gennes. Cette technique permet d'obtenir une distribution de tailles en suivant le mouvement brownien de chaque nanoparticule à l'aide d'un microscope à lumière laser, couplé à une caméra. En analysant les trajectoires des particules, la taille est déterminée grâce à la relation de Stokes-Einstein. Cette technique permet également de déterminer un nombre d'objets en solution et la taille de ces objets.

Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation des liposomes fusogènes magnétiques

L'analyse par NTA indique que le nombre de MFL en solution est d'environ 4.10^{10} MFL/mL, avec un diamètre moyen de 177 nm. On remarque cependant la présence de plusieurs petits pics entre 20 et 100 nm (*Figure 2.16*), suggérant une certaine hétérogénéité dans la population. On remarque également une diminution nette du nombre de particules au-delà de 300 nm (*Figure 2.16*), ce qui reflète une distribution majoritairement bien contrôlée et une faible proportion de gros agrégats (supérieurs à 300 nm).

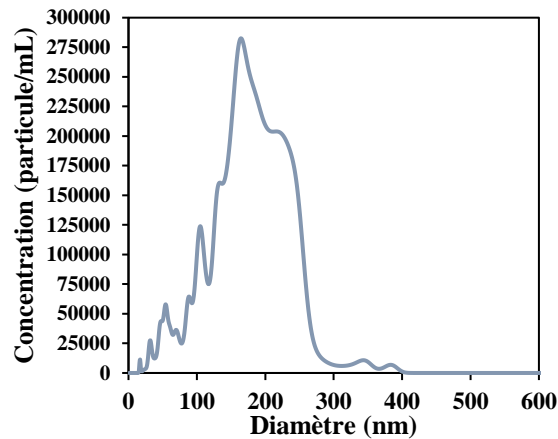


Figure 2.16 : Distribution en taille des particules, mesurée par NTA.

Le potentiel zêta des échantillons dans l'eau et dans l'HEPES a également été mesuré par électrophorèse laser Doppler. La conductivité de la solution de MFL dans l'eau à pH 7 est de $40 \mu\text{S}/\text{cm}$ et la mesure du potentiel zêta donne un pic net et unique centré autour de $+50 \text{ mV}$ avec une distribution étroite (*Figure 2.17, bleu clair*), ce qui implique que la population est électriquement homogène et fortement chargée positivement. Dans l'HEPES, ce pic est à $+20 \text{ mV}$, mais la distribution est plus large (*Figure 2.17, bleu foncé*). Ce résultat est attendu car dans le tampon HEPES il existe un effet d'écrantage des charges par les ions du tampon qui explique cette diminution.

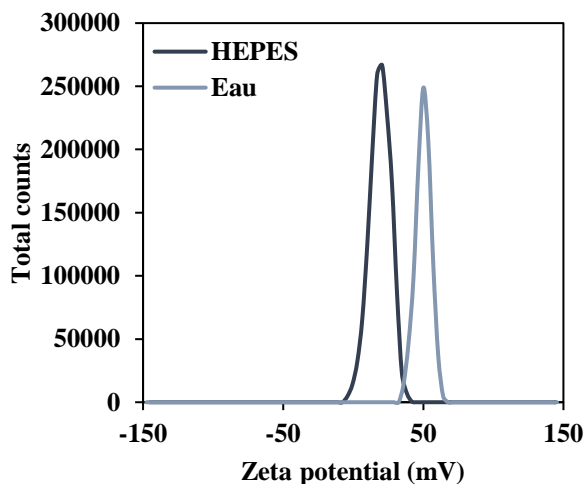


Figure 2.17 : Potentiels zêta des MFL dans l'eau ultrapure (conductivité de 40 $\mu\text{S}/\text{cm}$, pH 7) et dans l'HEPES (pH 7) mesurés à 25 °C.

La stabilité des liposomes fusogènes magnétiques a été évaluée dans l'eau ultrapure, pendant trois semaines en suivant l'évolution de leur taille et de leur charge. La mesure du diamètre hydrodynamique dans l'eau montre que la taille reste relativement constante, signe d'une bonne stabilité colloïdale sur 3 semaines. Il n'y a pas de phénomène majeur d'agglomération ou de précipitation visible jusqu'à 21 jours (**Figure 2.18 A**). En revanche, on observe un très net déclin de la charge après 7 jours (**Figure 2.18 B**) sûrement dû à l'hydrolyse du DOTAP. L'augmentation du potentiel zêta après 14 jours reste inexpliquée.

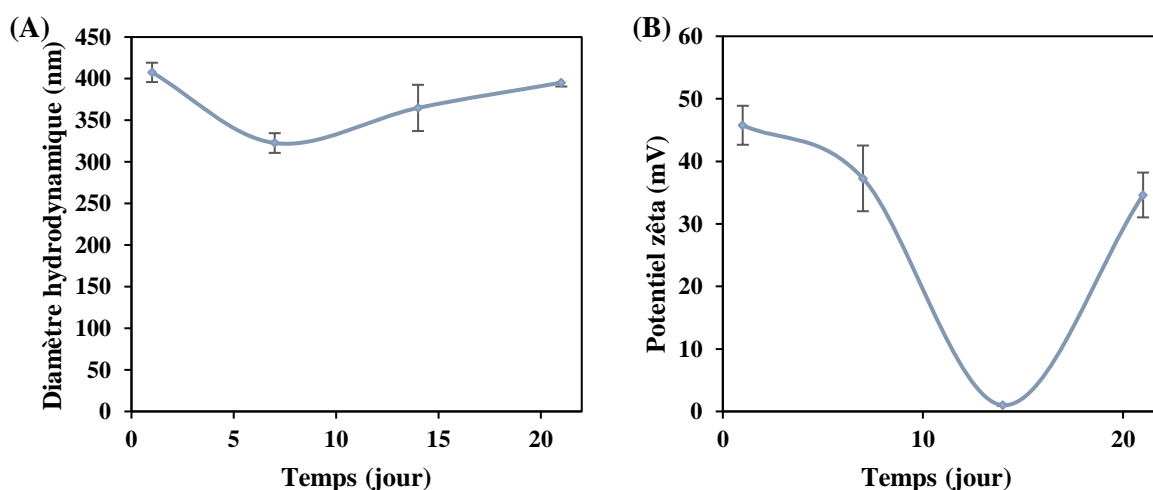


Figure 2.18 : (A) Diamètre hydrodynamique et (B) potentiel zêta des MFL dans l'eau (conductivité = 40 $\mu\text{S}/\text{cm}$) au cours du temps.

b. Taille, morphologie et structure des MFL par microscopies

Les MFL ont été analysés par microscopie électronique à transmission après séchage sur la grille, une technique permettant de caractériser leur taille, leur morphologie et de confirmer l'encapsulation des nanoparticules magnétiques au sein des liposomes. Les images révèlent des structures sphériques denses aux électrons, de tailles comprises entre 80 et 400 nm, mesurées statistiquement sur un échantillon de 200 MFL (*Figure 2.19 A*). Dans le cas des liposomes les moins denses, il est possible de distinguer les NPM avec un diamètre d'une dizaine de nanomètres (*Figure 2.19 A*). À plus faible grossissement, les MFL sphériques et très denses aux électrons se distinguent facilement des agrégats de particules (*Figure 2.19 B*) qui peuvent correspondre aux plus gros objets observés en DLS mais qui peuvent aussi résulter du séchage lors de la préparation des grilles MET.

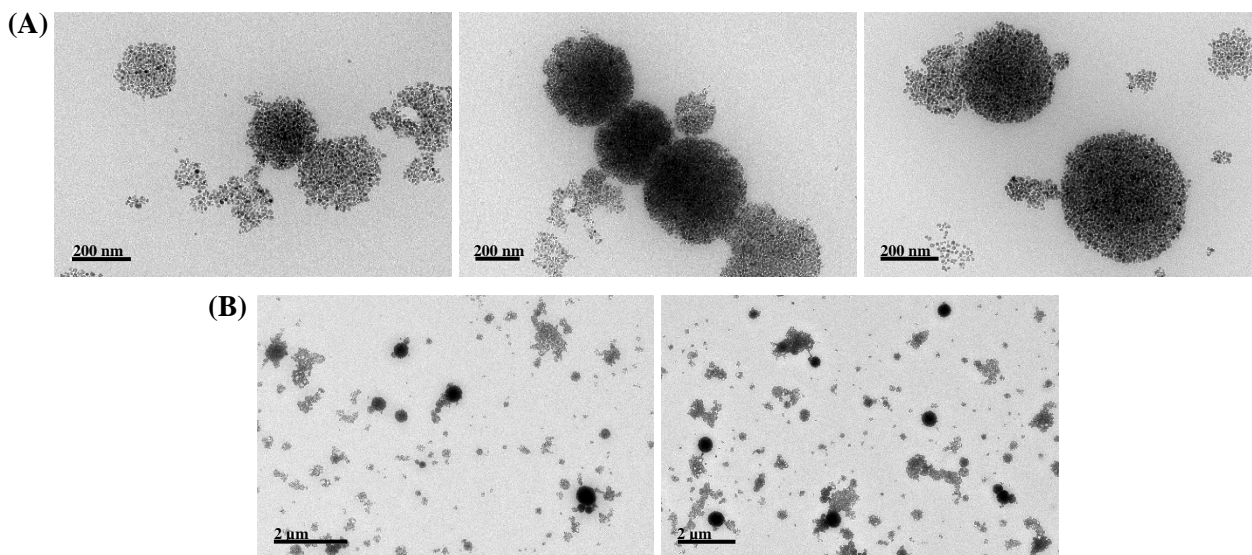


Figure 2.19 : Clichés des MFL en microscopie électronique à transmission (A) à fort et (B) faible grossissement.

Afin d'obtenir une représentation plus fidèle de la solution de MFL et de visualiser la bicouche lipidique, les échantillons ont été analysés en cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-MET). Cette technique a permis d'observer des structures sphériques encapsulant les NPM, correspondant aux MFL, avec un diamètre moyen d'environ 180-200 nm, ainsi que des structures plus petites (*Figure 2.20*). Comparée à la MET classique, la cryo-MET révèle des solutions de MFL plus propres, avec moins d'agrégats. Toutefois, de façon surprenante, la bicouche lipidique reste difficilement observable, malgré les conditions optimisées de vitrification.

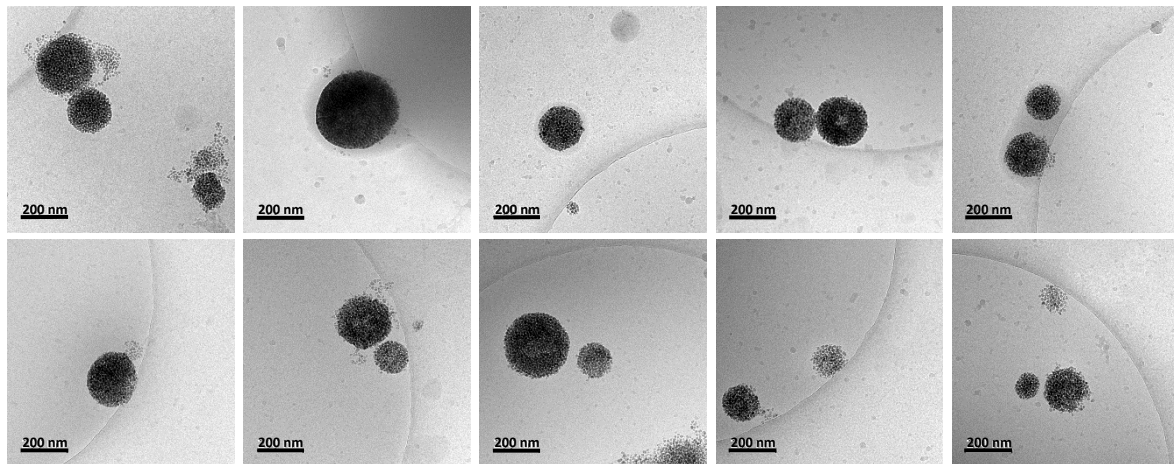


Figure 2.20 : Clichés de cryo-TEM des MFL.

Une coloration négative à l'acétate d'uranyle a donc été réalisée avant observation en MET. L'acétate d'uranyle est un agent de contraste électron-dense en raison de l'uranium qu'il contient, il n'interagit pas directement avec les structures internes, mais s'accumule autour d'elles, créant un contraste inverse : les objets apparaissent clairs sur un fond sombre.⁴³ Sur les clichés obtenus, un halo noir entoure les structures sphériques contenant les NPM (**Figure 2.21 A**), un fin liseré blanc est observable à plus fort grossissement (**Figure 2.21 B**), correspondant vraisemblablement à la bicouche lipidique. Il est toutefois remarquable que cette bicouche, habituellement bien visible en cryo-TEM ou en coloration négative, soit ici difficilement discernable. Cela pourrait s'expliquer par la forte interaction électrostatique entre les lipides cationiques de la membrane et les charges négatives des NPM.

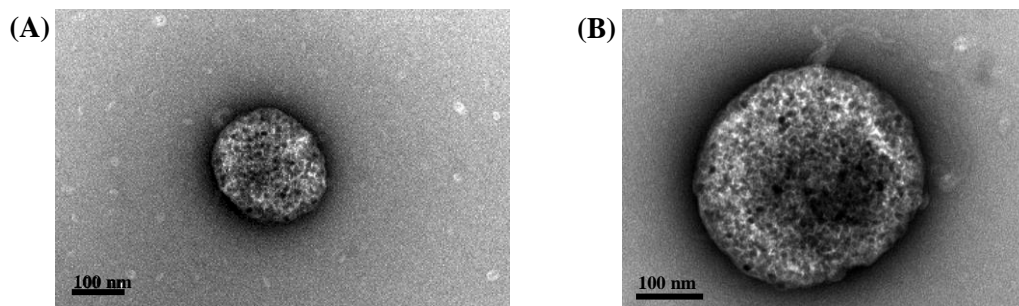


Figure 2.21 : Images des MFL en microscopie électronique à transmission après coloration négative à l'acétate d'uranyle à (A) faible et (B) fort grossissements.

Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation des liposomes fusogènes magnétiques

Les MFL, fluorescents grâce à l'incorporation de Topfluor PE ($\lambda_{\text{exp}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 503 \text{ nm}$) dans la composition lipidique, ont été observés en microscopie confocale. Leur mouvement brownien est nettement perceptible lors de l'observation en direct et sur les captures d'image des spots fluorescents verts bien distincts sont visibles (**Figure 2.22 A**). Ces signaux restent stables dans le temps, traduisant une bonne photostabilité du fluorophore, ce qui est favorable pour de futures expériences de fusion membranaire ou de colocalisation. Un diagramme de distribution en taille a été obtenu à l'aide d'un programme corrélant l'intensité lumineuse des spots à leur diamètre (**Figure 2.22 B**). Le diamètre moyen mesuré est d'environ 174 nm, ce qui est cohérent avec les observations en MET. Il convient toutefois de rappeler que la limite de résolution latérale en microscopie confocale est d'environ 200-250 nm (objectif NA = 1,4). Ainsi, les objets de taille inférieure ne peuvent pas être distingués individuellement, ils apparaissent souvent élargis, flous, ou fusionnés s'ils sont trop proches spatialement. Il sera toutefois intéressant de comparer cette distribution en taille avec celle obtenue après fusion avec des systèmes modèles (Chapitre 3).



Figure 2.22 : (A) Image de microscopie confocale des MFL marqués au TopFluorPE et (B) distribution en taille.

c. Caractérisations magnétiques des liposomes fusogènes magnétiques

i. Spectroscopie d'absorption atomique

La spectroscopie d'absorption atomique (AAS) est une méthode analytique largement utilisée pour quantifier la concentration d'éléments métalliques, tels que le fer, dans divers types d'échantillons. Dans le cas des MFL, les nanoparticules magnétiques sont d'abord dissoutes par traitement à l'acide chlorhydrique concentré, permettant la solubilisation complète du fer. La concentration en fer mesurée par AAS varie selon les lots de MFL, généralement entre 0,5 et 2 mM. Pour rappel, le nombre d'objets mesuré en NTA est de $4 \cdot 10^{10}$ MFL/mL.

En prenant en considération une concentration moyenne en fer de 1 mM et des nanoparticules de 10 nm de diamètre, on peut estimer le nombre de NPM à environ 3.10^{13} NPM/mL. Cela conduit à une estimation du nombre de NPM par MFL de l'ordre de 750 NPM/MFL. Cet ordre de grandeur, de l'ordre de 1000 NPM par MFL, semble cohérent avec les observations issues des clichés de microscopie électronique à transmission.

ii. SQUID : courbes d'aimantation et ZFC/FC

La courbe d'aimantation des MFL mesurée à 300 K présente une forme sigmoïdale caractéristique d'un comportement superparamagnétique, sans hystérésis, l'aimantation rémanente est nulle et le champ coercitif également (**Figure 2.23 A**). L'aimantation à saturation (M_s) atteint environ 80 emu/g sous un champ de ± 8000 Oe, une valeur proche de celle obtenue pour les NPM libres (75 emu/g, **Figure 2.4 A**), ce qui indique que l'encapsulation dans les liposomes n'altère pas leurs propriétés magnétiques.

Les courbes ZFC et FC révèlent une température de blocage autour de 107 K pour les MFL (**Figure 2.23 B**), contre 127 K pour les NPM libres (**Figure 2.4 B**). De manière surprenante, la température de blocage des nanoparticules magnétiques diminue après leur encapsulation dans les liposomes fusogènes, or les interactions entre NPM sont généralement responsables d'une augmentation de la température de blocage.¹⁵⁰ Cette observation est surprenante mais peut s'expliquer par le mode de préparation des MFL qui induit un tri des MNP. En effet, lors des étapes successives, il est fort possible que les grosses particules aient été plus facilement précipitées que les petites. La température de blocage étant très influencée par la taille de NPM, ce tri involontaire peut expliquer cette diminution de la température de blocage.

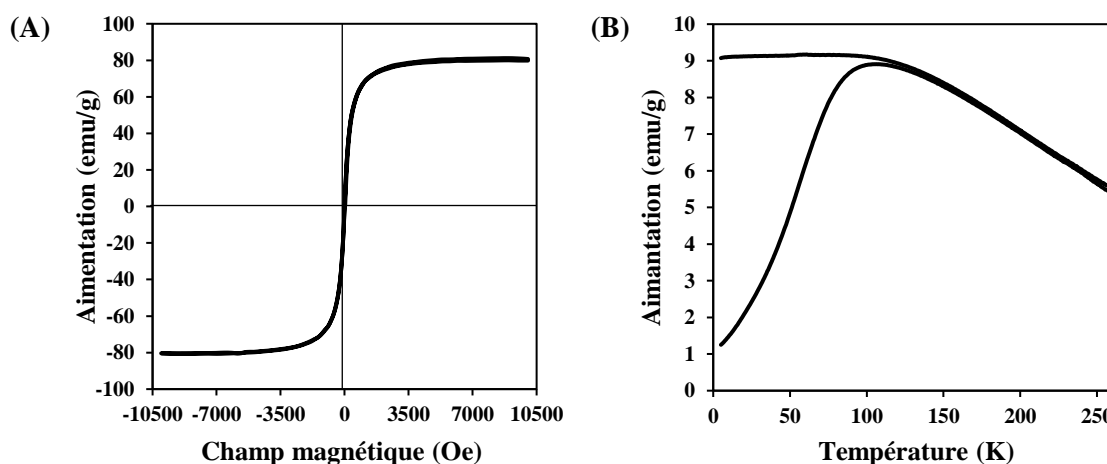


Figure 2.23 : (A) Courbes d'aimantation et (B) courbes ZFC/FC des MFL.

4. Conclusion sur la structure et les propriétés des MFL

La synthèse par REV optimisée a permis de répondre au cahier des charges qui était d'encapsuler des nanoparticules magnétiques dans des liposomes DOTAP/DOPE tout en conservant une forte charge positive. Ces MFL, avec un diamètre hydrodynamique moyen de 300 nm, sont stables sous champ magnétique. Ils sont stables dans l'eau et dans un tampon pendant une semaine permettant d'envisager leur utilisation pour des expériences de fusion avec des systèmes modèles (chapitre 3) et avec des cellules (chapitre 4). La microscopie électronique confirme l'encapsulation des NPM dans des structures lipidiques.

Le fait d'avoir des difficultés à observer la membrane de ces MFL vient probablement de la forte interaction entre les NPM et la bicouche, toutes deux de charge opposée (*Figure 2.24 A*). Il est aussi possible d'envisager que les NPM aient été enrobées avec une bicouche avant d'être encapsulées dans un liposome. (*Figure 2.24 B*) ou que cette interaction ait favorisé l'enrobage des NPM avec une monocouche de lipides avant d'être encapsulées dans une goutte lipidique (*Figure 2.24 C*).

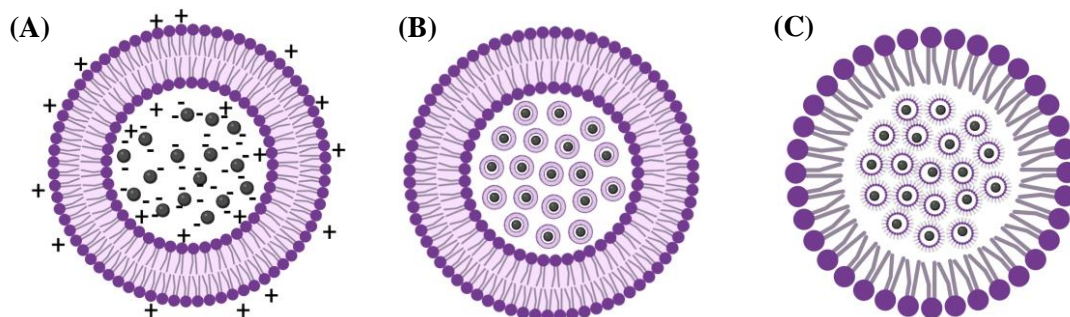


Figure 2.24 : Schémas des structures possibles des liposomes encapsulant les NPM.

Cependant, l'option A reste la plus probable car l'hypothèse B est trop gourmande en lipides et la C est très défavorable du point de vue géométrique. En effet, les deux lipides ne vont pas former spontanément une monocouche.

5. Matériel

Les réactifs $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, l'acide chlorhydrique fumant (HCl 37 %), l'acide nitrique (HNO_3 52,5 %) et l'acétone ont été achetés chez VWR (France). Les solutions lipidiques de 1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium-propane (chlorure) (DOTAP), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoéthanolamine (DOPE), 1-palmitoyl-2-(dipyrométhénobore difluorure)undécanoyl-sn-glycero-3-phosphoéthanolamine (TopFluor PE), 1,2-dioleoyl-sn-

glycero-3-phosphoéthanolamine-N-[méthoxy(polyéthylène glycol)-2000] (ammonium) (PEG PE), tous en solution dans le chloroforme, ont été acquis via Avanti Polar Lipids, Inc. Le chloroforme, l'ammoniaque concentrée (NH_3 22,5 %) et l'éther diéthylique proviennent de MERCK. L'eau utilisée est de qualité Milli-Q, obtenue grâce au système de purification Direct-Q® 5 UV, présentant une résistivité de 0,06 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

6. Méthodes

a. Synthèse des nanoparticules magnétiques citratées

i. Synthèse des nanoparticules de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

Les nanoparticules de maghémite ont été obtenues par co-précipitation alcaline.¹⁵⁴ (**Figure 2.1**) La première étape correspond à la coprécipitation des sels de fer, en préparant une solution acide contenant les ions Fe^{2+} et Fe^{3+} . Pour cela, 180 g de FeCl_2 ont été dissous dans un mélange de 100 mL d' HCl à 37 % et 500 mL d'eau déionisée (DI). Puis, cette solution a été versée dans un bécher de 5 L contenant 715 mL de FeCl_3 (27 %). De l'eau DI a été ajoutée pour avoir un volume de 3 L. Ensuite sous agitation magnétique, 1 L de NH_3 concentré (22,5 %) a été ajouté rapidement et le mélange a été laissé sous agitation à température ambiante pendant 30 minutes. Une décantation magnétique a ensuite été effectuée en plaçant la solution sur une plaque magnétique pendant au moins 10 min. Le surnageant a été aspiré et 1 L d'eau DI ajouté au précipité. La solution est agitée pendant 10 min et à nouveau décantée magnétiquement pendant 10 min afin de récupérer le précipité lavé. Le précipité de nanoparticules de magnétite a été redispersé dans 360 mL d'acide nitrique à 52 % et dans de l'eau DI pour avoir une solution finale à 2 L. La solution a été agitée pendant 30 minutes, rendant le milieu fortement acide et stabilisant les nanoparticules.

La seconde étape a consisté à oxyder la magnétite en maghémite. Tout d'abord, par décantation magnétique, les nanoparticules ont été séparées de la solution. Le surnageant a été aspiré et le culot de nanoparticules récupéré a été redispersé dans 800 mL d'eau DI contenant 323 g de nitrate de fer (III) préalablement porté à ébullition. Ce mélange a été chauffé à 30 °C et agité pendant 30 minutes, ce qui entraîne l'oxydation des ions Fe^{2+} en Fe^{3+} et permet l'obtention de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghémite). Cette réaction se traduit par un changement de couleur de la solution de noir à rouille. A nouveau les nanoparticules, préalablement décantée magnétiquement pendant 10 min, ont été passées en milieu acide pour les stabiliser, en redispersant les NPM dans 360 mL d'acide nitrique à 52 % et en complétant le mélange avec de l'eau DI pour avoir une solution finale de 2 L. La solution a été agitée pendant 10 minutes,

puis à nouveau une étape de décantation sur plaque magnétique a permis de récupérer le précipité afin de le soumettre à un protocole de lavage en plusieurs étapes. Trois lavages consécutifs à l'acétone (3 fois avec 1 L) ont été effectués pour retirer les excès d'eau et autres solvants hydrosolubles, suivis de deux lavages à l'éther diéthylique (2 fois avec 0,5 L) pour déshydrater et nettoyer la surface des particules. Entre chaque lavage la solution a été agitée pendant 10 min et une étape de décantation magnétique a été réalisée. Les nanoparticules ont ensuite été redispersées dans 1 L d'eau distillée, formant ainsi une dispersion colloïdale.

ii. Trie en taille

Afin de réduire la polydispersité des nanoparticules de maghémite obtenues, un fractionnement par taille a été réalisé selon un protocole de précipitation sélective induite par l'augmentation de la force ionique.^{154,157} L'ajout d'acide nitrique concentré (52,5 %, 30 mL) à la dispersion colloïdale induit une augmentation de la force ionique du milieu. Ces particules floculées sont séparées du surnageant par séparation magnétique, puis lavées successivement avec 0,5 L d'acétone et 0,3 L d'éther diéthylique, et enfin redispersées dans de l'eau distillée. Le cycle de précipitation/lavage/redispersion a été répété plusieurs fois sur les fractions surnageantes et précipitées, permettant l'obtention de plusieurs populations de nanoparticules différenciées selon leur taille. Dans le cadre de cette étude, nous avons conservé la fraction de culot contenant des NPM d'environ 10 nm, obtenue après deux précipitations.

iii. Citration

Afin d'assurer une bonne stabilité colloïdale des nanoparticules de maghémite à pH 7, celles-ci ont été fonctionnalisées par citration. Pour cela, la dispersion aqueuse a été chauffée à 100 °C pendant 30 minutes en présence de citrate de sodium (4,5 g, soit 0,125 M). Le rapport molaire citrate/fer a été ajusté à 0,13 en se basant sur la quantité totale de fer introduite dans la synthèse. Les nanoparticules citratées ont ensuite été lavées par décantation magnétique, successivement avec 0,5 L d'acétone, puis avec 0,3 L d'éther diéthylique, avant d'être redispersées dans de l'eau distillée (DI). À ce stade, elles forment une dispersion stable de nanoparticules chargées négativement.

b. Préparation des MFL par REV

Le mélange lipidique DOTAP/DOPE/PEGPE/TopfluorPE (45,5/45,5/4,5/4,5 % molaire) dans le chloroforme a été préparé dans un vial préalablement dégazé à l'azote, par ajouts successifs de 38.1 μL de DOTAP (25 mg/ml), 40.6 μL de DOPE (25 mg/ml), 15.1 μl of PEG 2000 PE (25 mg/ml), 117.2 μl de Topfluor PE (1 mg/ml), 1 ml de chloroforme, 3 mL d'éther diéthylique et 1 mL de la solution colloïdale de NPM citratés dans l'eau ($[\text{Fe}] = 2,4 \text{ mM}$). L'émulsion eau/huile est formée après 25 min d'agitation dans un bain à ultrasons à une température initiale de 22 °C. La température du bain est de 33 °C à l'issue des 25 min d'ultrasons. L'émulsion est ensuite transférée très rapidement dans un ballon puis placée à l'évaporateur rotatif (BÜCHI R-210) dont la température du bain-marie est de 40 °C, la pression est réglée en fonction de la nature du solvant et dure environ 3 min à 335 mbar (CHCl_3) puis 12 min à 119 mbar (éther). La fin de l'évaporation est marquée par le passage de la phase gel à la phase liquide jusqu'à l'obtention d'une solution orange / marron ($v = 700 \mu\text{L}$) avec quelques agrégats qui peuvent être visibles en surface.

Afin d'éliminer les gros agrégats, la dispersion est filtrée à l'aide d'un filtre sur seringue (ThermoFisher) constitué d'une membrane d'acétate de cellulose avec des pores de 450 nm. Le filtre est préalablement rincé avec 10 mL d'eau désionisée. Après un passage sur le filtre, la solution orange (environ 700 μL) est placée dans une seringue de 1 mL sur l'arête d'un aimant Nd-Fe-B rectangulaire (Calamit, 15 cm de longueur, 8 cm de largeur, et 2 cm d'épaisseur). Après 2 h sur l'aimant, le piston est retiré afin de récupérer le surnageant dans un Eppendorf placé en dessous de la seringue puis la seringue est détachée de l'aimant et le culot contenant les MFL est redispersé dans 100 μL d'eau ultrapure et récupéré à l'aide d'une pipette.

La synthèse des MFL a également été réalisée dans l'HEPES, en dispersant les NPM dans ce même tampon afin d'éviter les chocs osmotiques. Ainsi, 152 μL de la solution de NPM citratée ($[\text{Fe}] = 15,5 \text{ mM}$) ont été ultrafiltrés dans un tube d'ultrafiltration (Vivaspin 2, 10000 MWCO, $V = 2 \text{ mL}$) pendant 20 min à une vitesse de 8000 RPM. Puis le culot, correspondant aux NPM dans le compartiment supérieur, a été redispersé dans 1 mL de la solution d'HEPES à 25 mM ($\text{pH} = 7.07$). La suite de la synthèse des MFL se déroule de la même manière que dans l'eau sauf que le culot récupéré après la séparation magnétique est redispersé dans 100 μL de tampon HEPES.

c. Caractérisation des NPM et des MFL

i. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Le diamètre hydrodynamique des NPM et des MFL a été mesuré par diffusion dynamique de la lumière à l'aide d'un instrument Malvern Zetasizer ULTRA. Les mesures ont été faites en triplicata à 25 °C dans une cellule DTS1070, à un angle de réfraction de 173°, avec des indices de réfraction de 1,45 pour la dispersion liposomale et de 3,13 pour la dispersion de nanoparticules magnétiques. Chaque dispersion de nanoparticules ou de liposomes a été préalablement diluée cent fois dans de l'eau ultrapure afin d'obtenir une dispersion de 1 mL à un pH compris entre 6,5 et 7,5.

À partir de ces mêmes dispersions, le potentiel zêta des NPM et MFL a également été mesuré à l'aide d'un appareil Malvern Zetasizer Ultra. Les mesures de potentiel zêta, basées sur la mobilité électrophorétique, ont été réalisées en triplicata à 25 °C, dans une cuve DTS1070 à un taux de comptage inférieur à 100 kcps, avec une conductivité de 40 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour les MFL et de 12 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour les NPM. Le potentiel zêta a été déterminé à partir de la vitesse électrophorétique des particules, et converti via l'équation de Smoluchowski.

En mesurant le diamètre hydrodynamique et le potentiel zêta par DLS, la stabilité des liposomes fusogènes magnétiques a été testée dans l'eau ultrapure. À cet effet, 10 μL de MFL ont été dilués dans 990 μL d'eau ultrapure, puis les mesures de diffusion dynamique de la lumière (DLS) ont été effectuées pour suivre l'évolution du diamètre hydrodynamique et du potentiel zêta pendant 20 jours.

ii. Analyse de suivi de nanoparticules (NTA)

Afin d'optimiser les conditions de mesure, plusieurs dilutions de la solution de MFL dans de l'eau Milli-Q ont été réalisées. Chaque dilution a été introduite individuellement dans l'appareil Nanosight NS300 (Malvern Panalytical) à l'aide d'une seringue (600 μL). Le but était de déterminer la concentration idéale d'objets par mL, en ajustant le volume de solvant jusqu'à atteindre une concentration proche de 10^8 particules/mL, seuil optimal pour une détection fiable et une bonne résolution des particules par l'analyseur.

iii. Microscopie électronique à transmission (MET)

Pour observer en TEM la dispersion de NPM ou de MFL ([lipides] = 3 mM et [NPM] = 2,4 mM) préalablement filtrée et séparée magnétiquement, une goutte de la dispersion, diluée deux fois par de l'eau ultrapure, a été déposée sur une grille carbone-cuivre de TEM. Puis la grille a été séchée toute la nuit. Finalement, les liposomes fusogènes ont été observés au microscope électronique à transmission JEOL 1011 avec une caméra digitale MegaView III.

iv. Microscopie électronique cryo (cryo-MET)

Pour les observations en cryo-TEM, un aliquot de 4 μ L du culot de MFL a été déposé sur une grille carbone-cuivre et laissé sécher pendant 30 secondes, puis absorbé manuellement avec du papier filtre Whatman pendant 2 secondes avant d'être vitrifié dans de l'éthane liquide à l'aide d'un système de vitrification (LEICA EM CPC). Les grilles ont été stockées dans de l'azote liquide. L'imagerie a été réalisée avec une caméra Gatan® US 1000 (2k x 2k) de type U, sensible à une tension d'accélération de 200 kV, en utilisant un microscope JEOL 2100 équipé d'un filament LaB6.

v. Microscopie électronique à transmission en coloration négative

La MET en coloration négative a été réalisée, avec de l'acétate d'uranyle à 1,5 %, afin de mettre en évidence la bicouche lipidique des liposomes. Pour cela une goutte de la dispersion de MFL, diluée 2 fois, a été déposée sur la grille pendant 2 min, puis la goutte est absorbée avec un papier humidifié jusqu'à l'obtention d'un film mince, puis 1 goutte d'acétate d'uranyle a été déposée sur la grille pendant 2 min, et la goutte a, à nouveau, été réabsorbée avec un papier humidifié en laissant un film très fin. La grille a séché toute la nuit et le lendemain elle a été observée au microscope électronique à transmission JEOL 1011 avec une caméra digitale MegaView III.

vi. Microscopie confocale

La fluorescence des MFL a été observée avec un microscope confocal (Zeiss LSM 980) en configuration verticale, équipé d'un objectif à immersion dans l'huile 63x, avec une ouverture numérique (NA) de 1,4 et d'un détecteur GaAsp à 32 canaux. Une goutte de la préparation de MFL (TopFluor PE, λ d'excitation 495 nm, λ d'émission 503 nm) a été déposée entre une lame et une lamelle, puis les images ont été acquises, par France Lam et Chloé Chaumeton, avec une excitation laser à 488 nm. Le traitement des images a été réalisé à l'aide

Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation des liposomes fusogènes magnétiques

du logiciel ImageJ. La détection et la mesure des liposomes ont été réalisées à l'aide d'un script personnalisé développé par Jean-François Giles (Institut de Biologie Paris-Seine, IBPS). Ce script applique une soustraction de fond (rolling = 100), un filtrage médian (rayon = 1), un seuillage automatique selon la méthode de Li, puis une segmentation via la fonction "Find Maxima", combinée à une transformation de Voronoï pour individualiser les agrégats. Les objets détectés ont été filtrés selon des critères morphologiques stricts : circularité $\geq 0,75$, aire comprise entre 0,00 et 10 μm^2 , et diamètre de Ferret maximal $\leq 10 \mu\text{m}$. Les mesures ont été extraites via le ROI Manager. Les données quantitatives de taille ainsi obtenues ont ensuite été exportées vers le logiciel Igor Pro (Wavemetrics) pour l'élaboration d'un histogramme de distribution des MFL.

vii. Spectroscopie d'absorption atomique (AAS)

La spectroscopie d'absorption atomique (AAS) des NMP et des MFL a été faite à l'aide d'un spectromètre d'absorption atomique (AAS) à flamme PerkinElmer PinAAcle 500, à une longueur d'onde de 248 nm. Avant les mesures d'AAS, les NPM et les MFL ont été dégradés par de l'acide chlorhydrique 37 % (300 μL) et dilués par de l'acide nitrique 2 % (3 mL).

viii. SQUID

Les mesures d'aimantation ont été effectuées à l'aide d'un magnétomètre SQUID MPMS de Quantum Design Ltd. Les échantillons ont été préparés de la manière suivante : 100 μL de la dispersion de MFL ont été introduits dans un tube Eppendorf. L'air a été retiré du tube, puis remplacé par de l'hélium. La cellule contenant l'échantillon a été positionnée à l'intérieur d'une paille en plastique, à une hauteur de 66 mm par rapport au bas de la paille, afin que l'échantillon soit à la bonne hauteur lors des mesures magnétiques une fois dans l'instrument. Les courbes d'aimantation des NPM et des MFL ont été mesurées à 300 K, sous un champ magnétique variant de -10 000 Oe à 10 000 Oe. À la suite de cela, la température a été fixée à 5 K et le champ magnétique a été réduit à une valeur proche de zéro par des oscillations, ce qui signifie qu'aucun champ magnétique résiduel n'est maintenu. Les aimantations en mode Zero Field Cooled (ZFC) et Field Cooled (FC) ont été enregistrées dans la plage de température allant de 5 K à 260 K, à une vitesse de 2 K/min, sous un champ magnétique de 20 Oe. Ensuite, la forme des courbes d'aimantation a été corrigée pour soustraire les contributions diamagnétiques du solvant et du tube Eppendorf, à l'aide d'un blanc (Eppendorf + eau).

Chapitre 3 : Étude de la fusion des liposomes magnétiques fusogènes sur système modèle

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser à l'interaction entre les liposomes fusogènes magnétiques, décrits au chapitre 2, et des systèmes modèles de membranes cellulaires. Ces systèmes modèles sont constitués de vésicules unilamellaires de grande taille (Large Unilamellar Vesicles, LUV), dont la taille, la charge de surface et la composition lipidique peuvent être rigoureusement contrôlées, tant du point de vue chimique que physicochimique. L'hypothèse de départ de cette étude repose sur l'idée qu'une interaction électrostatique entre les deux systèmes favorise le processus de fusion membranaire. Cette hypothèse est soutenue par une étude approfondie publiée en 2022 par Cavalcanti et al.¹⁶², dans laquelle les auteurs explorent l'impact de la composition lipidique, de la charge et de la fluidité membranaire sur la fusion de LUV. Leur conclusion principale est que la fusion est principalement médiée par les interactions électrostatiques.

L'objectif de notre étude est d'évaluer l'efficacité de la fusion entre deux populations de LUV. D'une part, des LUV cationiques, avec ou sans nanoparticules magnétiques, constitués d'un mélange DOTAP/DOPE décrit dans la littérature pour ses propriétés fusogènes, d'autre part, des LUV accepteurs zwitterioniques ou anioniques. L'évolution du diamètre hydrodynamique et du potentiel zêta sera suivie par diffusion dynamique de la lumière, le titrage calorimétrique isotherme permettra quant à lui d'extraire les paramètres thermodynamiques associés à la réaction. Enfin, les expériences menées en microscopie confocale, notamment la colocalisation et le transfert de fluorescence (FRET), apporteront des informations complémentaires sur le mélange lipidique et le transfert des nanoparticules magnétiques.

1. Synthèse des LUV anioniques et cationiques

a. Synthèse des LUV par extrusion

Les différentes formulations de LUV ont été préparées par extrusion, une méthode largement décrite dans la littérature pour sa capacité à générer des vésicules de taille contrôlée et de composition homogène.¹⁶⁸ Les mélanges lipidiques, initialement solubilisés dans du chloroforme, ont été évaporés sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif jusqu'à obtention d'un film lipidique homogène déposé sur les parois du ballon. Ce film sec a ensuite été hydraté avec de l'eau ultrapure (Milli-Q) ajustée à un pH compris entre 6,5 et 7,5, conduisant à la formation spontanée de liposomes multilamellaires (MLV) par gonflement du film lipidique. Les MLV obtenus ont ensuite été extrudés de manière séquentielle à travers des membranes de polycarbonate (400 nm puis 200 nm) permettant d'obtenir des vésicules unilamellaires de

grande taille (LUV). Cette synthèse permet un excellent contrôle de la taille finale des liposomes tout en préservant l'intégrité chimique des composants lipidiques.

La formulation des liposomes cationiques complète correspond à celle des liposomes magnétiques fusogènes présentée au chapitre 2, à savoir un mélange de DOTAP/DOPE/TopFluorPE/PEGPE. Afin d'évaluer l'impact du PEG et du lipide fluorescent sur les propriétés de fusion, une série de formulations a été établie, allant de la composition minimale (DOTAP/DOPE) jusqu'à la formulation complète des MFL incluant le fluorophore (TopFluorPE) et le lipide pégylé (PEG-PE).

Les liposomes accepteurs ont été conçus pour présenter une charge de surface contrôlée. Deux types ont été préparés : des LUV anioniques, obtenus par l'ajout de POPC/POPG (50/50 % mol) et des LUV zwitterioniques, composés exclusivement de POPC (100 % mol). Pour les observations en microscopie confocale, un lipide fluorescent (EggLissRhodPE) compatible avec le FRET a été incorporé à la membrane des LUV accepteurs. Les différentes compositions utilisées pour les formulations de LUV sont récapitulées dans le *Tableau 3.1*.

LUV	Composition lipidique	% molaire
Cationiques	DOTAP/DOPE	50/50
Cationiques fluorescents	DOTAP/DOPE/TopFluor	46,6/47,6/4,8
Cationiques pégylés	DOTAP/DOPE/PEGPE	47.6/47.6/4.8
Cationiques pégylés et fluorescents	DOTAP/DOPE/TopFluor/PEG-PE	45,5/45,5/4,5/4,5
Accepteurs zwitterioniques	POPC	100
Accepteurs zwitterioniques fluorescents	POPC	100
Accepteurs anioniques	POPC/POPG	50/50
Accepteurs anioniques fluorescents	POPC/POPG/EggLissRhodPE	49.5/49.5/1

Tableau 3.1 : Récapitulatif des compositions des liposomes unilamellaires (LUV).

b. Caractérisations des différentes formulations de LUV

i. Mesure des diamètres hydrodynamiques et des potentiels zêta

Après dilution, les liposomes cationiques, zwitterioniques et anioniques ont été caractérisés par diffusion dynamique de la lumière afin de déterminer leur taille hydrodynamique moyenne (**Figure 3.1**) ainsi que leur potentiel zêta (**Figure 3.2**).

Comme attendu pour cette méthode de préparation, les diamètres hydrodynamiques mesurés correspondent étroitement à ceux des pores des membranes utilisées lors de l'extrusion, soit environ 200 nm. De légères variations de taille sont toutefois observées en fonction de la composition lipidique. En particulier, la formulation complète (DOTAP/DOPE/TopFluorPE/PEGPE) présente un diamètre légèrement supérieur, atteignant 225 nm (**Figure 3.1**). Cette augmentation peut être attribuée à la présence du PEGPE. En effet, le polyéthylène glycol (PEG), polymère hydrophile greffé sur la tête polaire des phospholipides, induit une stabilisation stérique des liposomes en solution et contribue à une augmentation apparente de leur diamètre hydrodynamique. L'analyse des indices de polydispersité (PDI), montre que toutes les formulations présentent des valeurs inférieures à 0,35, ce qui indique une distribution de taille relativement homogène, compatible avec des suspensions colloïdales bien définies.

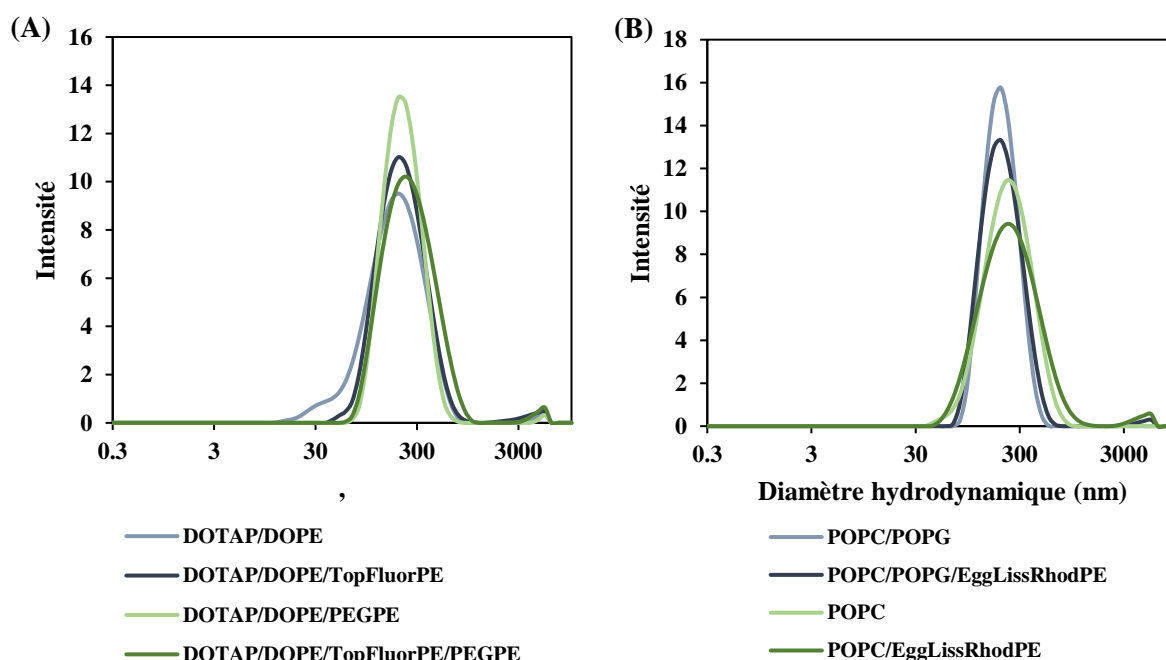


Figure 3.1 : Diamètres hydrodynamiques (A) des LUV cationiques et (B) des LUV anioniques, et zwitterioniques.

Les potentiels zêta mesurés pour les formulations contenant des lipides cationiques (DOTAP) sont très élevés, comme illustré en *Figure 3.2*. La formulation DOTAP/DOPE (50 % mol de DOTAP) présente un potentiel zêta de +61 mV, tandis que la formulation complète (DOTAP/DOPE/TopFluorPE/PEGPE) affiche une valeur réduite à +45 mV (*Figure 3.2 A*). Cette diminution s'explique principalement par la réduction de la proportion de DOTAP dans la formulation totale, mais aussi potentiellement par l'effet masquant du PEG en surface, qui peut partiellement neutraliser la charge effective.

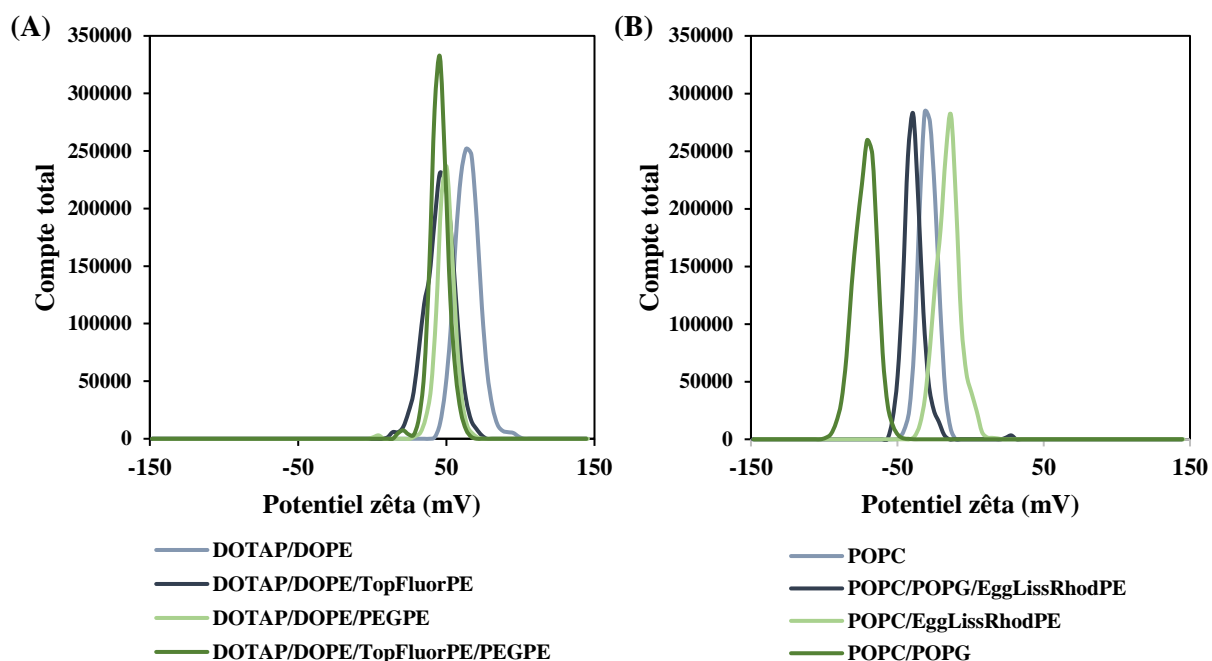


Figure 3.2 : Potentiel zêta (A) des LUV cationiques et (B) des LUV anioniques, et zwitterioniques.

Les liposomes anioniques, formulés avec du POPG, présentent logiquement des potentiels zêta négatifs. La formulation POPC/POPG (50/50 mol %) atteint -71 mV, tandis que l'ajout du lipide fluorescent EggLissRhodPE conduit à une valeur de -39 mV (*Figure 3.2 B*). Une explication serait que l'ajout d'Egg Liss Rhod PE à la formulation POPC/POPG (qui contient 50 % de POPG, un lipide fortement anionique), induit le remplacement d'une fraction de lipides très négatifs (POPG) par un lipide neutre ou très faiblement chargé. Cela diminue mécaniquement la densité de charges négatives à la surface, le potentiel zêta devient moins négatif.

Fait intéressant, même les formulations contenant uniquement des lipides zwitterioniques (100 % POPC) présentent des potentiels zêta nettement négatifs. Ce phénomène, observé en conditions de faible force ionique (eau ultrapure à pH 7, conductivité de $40 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), s'explique par l'orientation des têtes polaires des phospholipides. Les groupements choline (chargés positivement) ont tendance à s'orienter vers l'extérieur de la membrane, plus éloignés de la surface immédiate, alors que les groupements phosphate (chargés négativement) se situent plus près de la surface. Cette répartition asymétrique crée un champ électrique local qui se traduit par un potentiel zêta négatif, bien que les lipides soient globalement neutres.^{169,170}

ii. Analyse des tailles et concentration par NTA

L'analyse quantitative par NTA permet de déterminer le nombre de particules par classe de taille. Ainsi, pour les liposomes cationiques de formulation complète (DOTAP/DOPE/TopFluorPE/PEGPE), on obtient une concentration totale de $2,1 \times 10^{12}$ LUV/mL, avec deux sous-populations dominantes autour de 190 nm et 150 nm (*Figure 3.3*). Quelques agrégats plus gros sont également observés vers 380 nm, en accord avec les données DLS.

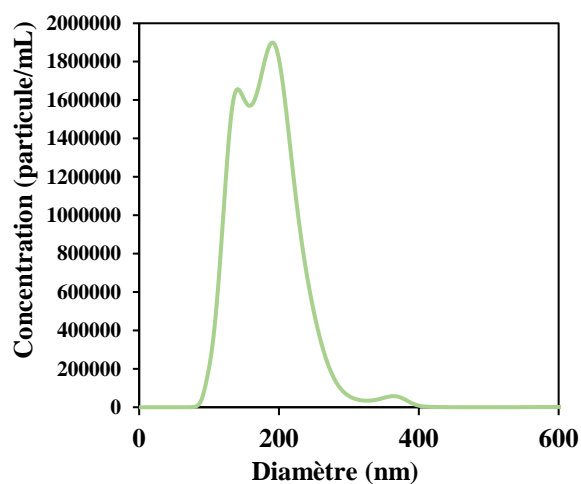


Figure 3.3 : Concentration en particules (particule/mL) en fonction du diamètre des objets analysés par NTA, des LUV DOTAP/DOPE/TopFluorPE/PEGPE.

Concernant les liposomes à base de POPC, ils présentent des tailles moyennes d'environ 123 nm pour la formulation anionique POPC/POPG/EggLissRhodPE (**Figure 3.4 A**), et de 154 nm pour la formulation neutre POPC/EggLissRhodPE (**Figure 3.4 B**). On observe ici une divergence entre les mesures obtenues par DLS et celles issues de l'analyse par NTA. Toutefois, les mesures en NTA n'ayant été réalisées qu'une seule fois, il serait nécessaire de les reproduire afin de confirmer ces résultats. Malgré cela, les concentrations mesurées restent du même ordre de grandeur, avoisinant 10^{12} LUV/mL pour les deux formulations à base de POPC.

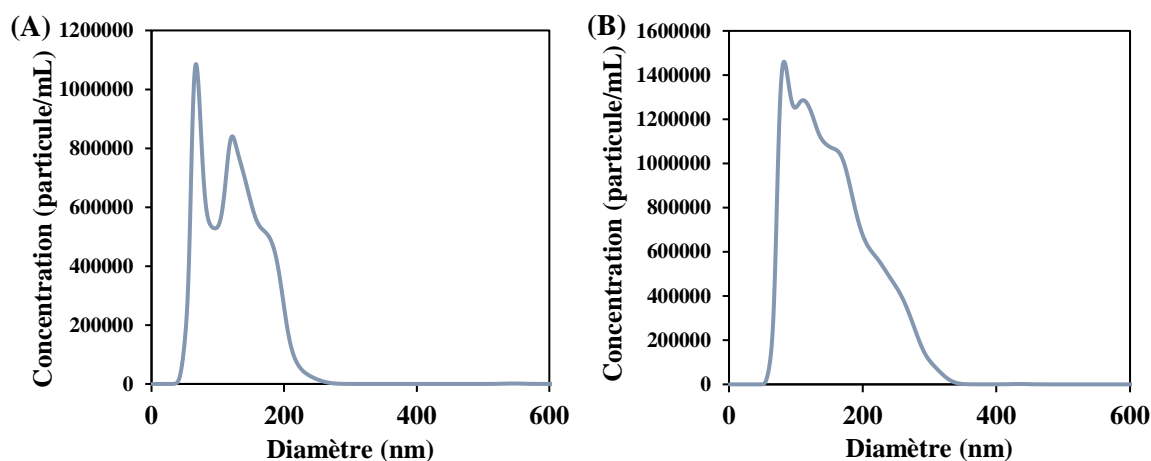


Figure 3.4 : Concentration en particules (particule/mL) en fonction du diamètre des objets analysés par NTA, des LUV (A) POPC/POPG/EggLissRhodPE, (B) POPC/EggLiss RhodPE.

iii. Observation en microscopie confocale

La finalité de cette étude étant d'évaluer la fusion entre liposomes magnétiques cationiques et liposomes accepteurs par transfert de fluorescence en microscopie confocale, il était essentiel de pouvoir visualiser ces deux populations de manière distincte et individuelle. Les liposomes cationiques sont marqués avec du TopFluor PE, dont les propriétés spectrales sont les suivantes : excitation à 495 nm et émission à 503 nm, générant un signal fluorescent dans le vert. Les liposomes accepteurs, de nature anionique ou zwitterionique, sont quant à eux marqués avec de l'Egg Liss Rhod PE, présentant une excitation à 560 nm et une émission à 590 nm, ce qui correspond à un signal dans le rouge.

Après dépôt de quelques gouttes de chaque dispersion entre lame et lamelle, les images confocales obtenues pour chaque formulation sont présentées en **Figure 3.5**. Globalement, tous les liposomes montrent une agitation brownienne importante et apparaissent sous forme de spots bien individualisés et sphériques à l'échelle de la microscopie optique. Les liposomes cationiques sont visualisés par des spots verts (**Figure 3.5 A**), tandis que les liposomes accepteurs apparaissent sous forme de spots rouges (**Figures 3.5 B et 3.5 C**). Ces signaux fluorescents se révèlent stables dans le temps, un critère essentiel garantissant la fiabilité des futures expériences de colocalisation et du suivi dynamique de la fusion membranaire, où la constance du signal est indispensable à une interprétation quantitative rigoureuse.

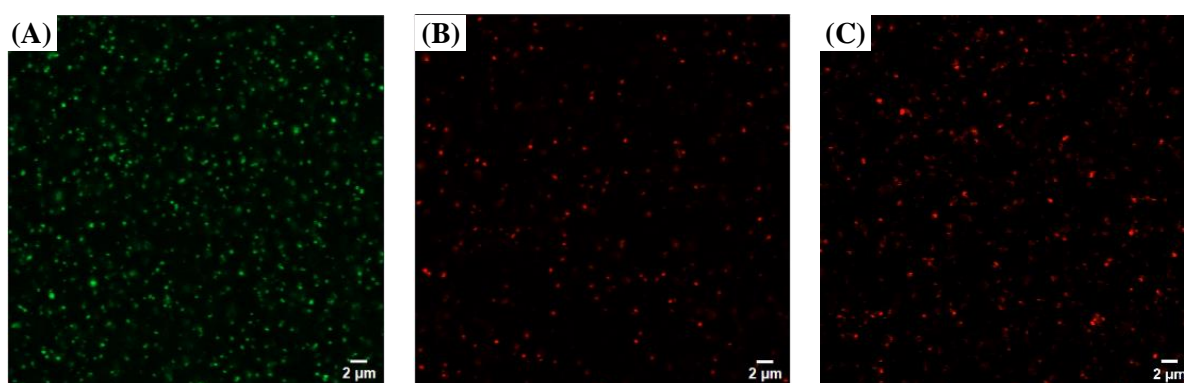


Figure 3.5 : Clichés de microscopie confocale des liposomes (A) cationiques (DOTAP/DOPE/TopfluorPE/PEGPE) (B) anioniques (POPC/POPG/EggLissRhodPE) et (C) zwitterioniques (POPC/ EggLissRhodPE).

Un programme d'analyse d'images a été utilisé pour estimer la taille des spots observés en microscopie confocale. Les paramètres principaux pris en compte incluent la circularité des objets, l'intensité du signal fluorescent, ainsi que la conversion entre le nombre de pixels détectés par objet, la taille d'un pixel (définie par le facteur d'échelle de l'image) et les dimensions physiques de l'objet. Cela permet d'exprimer les tailles mesurées en nanomètres.

Le diamètre moyen mesuré pour les liposomes cationiques est de 185 nm ($n = 4539$ objets) (**Figure 3.6 A**), en bon accord avec les tailles obtenues précédemment pour les MFL (~180 nm) ayant la même composition lipidique. Les liposomes anioniques présentent un diamètre moyen de 210 nm ($n = 1870$ objets) (**Figure 3.6 B**), les liposomes zwitterioniques affichent quant à eux une taille moyenne apparente plus faible, de 162 nm ($n = 3973$ objets) (**Figure 3.6 C**). Cependant, il convient de rappeler que la résolution latérale de la microscopie confocale est limitée par la diffraction optique. Avec un objectif à ouverture numérique (NA) de 1,4, la limite de résolution est d'environ 200-250 nm, ce qui signifie que les objets de taille

inférieure ou proche de cette valeur peuvent ne pas être correctement distingués, conduisant à une sous-estimation ou à un regroupement visuel des petits objets.

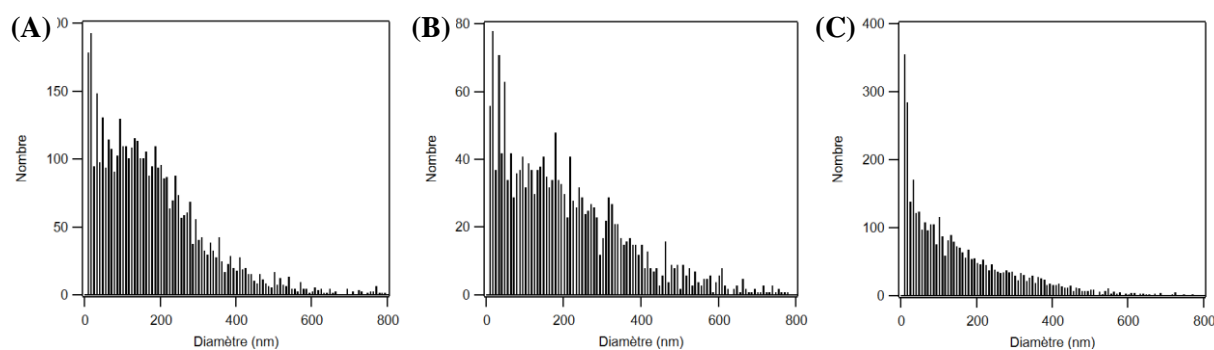


Figure 3.6 : Histogrammes des distributions en tailles **(A)** des LUV cationiques (DOTAP/DOPE/Topfluor/PEGPE), **(B)** des LUV anioniques (POPC/POPG/EggLissRhodPE) et **(C)** des LUV zwitterioniques (POPC/EggLissRhodPE).

2. Impact de la composition lipidique sur les propriétés fusogéniques des LUV

Dans un premier temps, la fusion entre les liposomes cationiques (formulés sans nanoparticules magnétiques) et les liposomes accepteurs a été étudiée afin d'évaluer l'impact de la composition lipidique sur l'efficacité du processus de fusion. L'interaction entre ces deux populations de LUV a été caractérisée par DLS pour suivre l'évolution de la taille et de la charge des liposomes, par ITC pour obtenir les paramètres thermodynamiques associés à l'interaction et par microscopie confocale (colocalisation et FRET) afin d'évaluer s'il y a fusion membranaire.

a. Evolution de la taille et de la charge suivie par titrage en DLS

Dans l'étude de Cavalcanti et *al.*¹⁶², la fusion entre des LUV cationiques (DOTAP/DOPE) et des LUV accepteurs, soit anioniques (POPC/POPG), soit zwitterioniques (POPC), a été analysée par titrage en DLS et en ITC. Les auteurs ont montré qu'une fusion effective a lieu lorsque les LUV anioniques sont mélangés aux LUV cationiques, notamment au point de neutralisation des charges. En revanche, aucune fusion n'a été observée avec des liposomes zwitterioniques à base de POPC.

Ces résultats ont constitué le point de départ de notre propre étude. Nous avons tout d'abord cherché à valider la pertinence du titrage en DLS comme méthode de suivi de la fusion, puis à explorer l'influence de la présence de PEG et de lipides fluorescents dans la composition

des membranes lipidiques. Par analogie avec les expériences menées sur les liposomes magnétiques, et pour des raisons pratiques liées à la quantité de matériel, ce sont les LUV accepteurs préparés par extrusion ([lipides] = 7 mM) qui ont été ajoutés dans la dispersion de liposomes cationiques ([lipides] = 0,5 mM). Après chaque ajout de liposomes accepteurs à la dispersion initiale de liposomes cationiques, la taille hydrodynamique et le potentiel zêta du mélange ont été mesurés par DLS.

Les résultats du titrage sont présentés en fonction du rapport molaire entre LUV accepteurs et liposomes fusogènes qui sera noté par la suite *Ratio molaire accepteurs/fuso* (**Figure 3.7**). Dans le cas des LUV accepteurs anioniques POPC/POPG, leur ajout progressif entraîne systématiquement une inversion du potentiel zêta (**Figure 3.7 A**) ainsi qu'une augmentation transitoire du diamètre hydrodynamique (**Figure 3.7 C**). L'ampleur de cette augmentation dépend de la composition lipidique des liposomes cationiques. Elle est très marquée pour les formulations DOTAP/DOPE (**courbe noire**) et DOTAP/DOPE/TopFluorPE (**courbe bleue**), plus modérée pour DOTAP/DOPE/PEGPE (**courbe violette**), et absente pour la formulation complète DOTAP/DOPE/TopFluorPE/PEGPE (**courbe grise**).

Lorsqu'elle est observée, l'augmentation transitoire du diamètre hydrodynamique est corrélée à la neutralisation du potentiel zêta. Les rapports molaire accepteurs/fuso correspondant aux points de neutralisation sont respectivement de 0,32 (DOTAP/DOPE), 0,25 (DOTAP/DOPE/TopFluorPE), 0,20 (DOTAP/DOPE/PEG-PE) et 0,12 (formulation complète) (**Figure 3.7 A et C**). La composition lipidique des liposomes cationiques influence donc significativement leur interaction avec les liposomes anioniques. Cette évolution est logique compte tenu du fait que l'incorporation de PEGPE et/ou de TopFluorPE réduit le potentiel zêta initial (de +62 mV à +45–50 mV) donc une plus faible quantité de liposomes accepteurs est nécessaire pour atteindre l'inversion de charge.

À l'inverse, le titrage avec des liposomes zwitterioniques (POPC) ne conduit à aucune variation notable du potentiel zêta (**Figure 3.7 B**) ni du diamètre hydrodynamique (**Figure 3.7 D**), quelle que soit la composition des liposomes cationiques. Cela confirme l'absence d'interaction électrostatique forte avec les membranes neutres, cette observation est cohérente avec les résultats rapportés par Cavalcanti *et al.*¹⁶²

Ces résultats suggèrent une interaction entre les LUV cationiques et anioniques, médiée par des forces électrostatiques, qui induit une augmentation transitoire du diamètre

hydrodynamique. Cette augmentation pourrait résulter soit d'un réarrangement lipidique entre les bicouches, soit d'un phénomène d'agrégation temporaire des liposomes. À ce stade, les données issues de la DLS ne permettent pas de trancher entre ces deux hypothèses, car dans les deux cas, une augmentation concomitante de la taille moyenne et de la polydispersité est attendue.

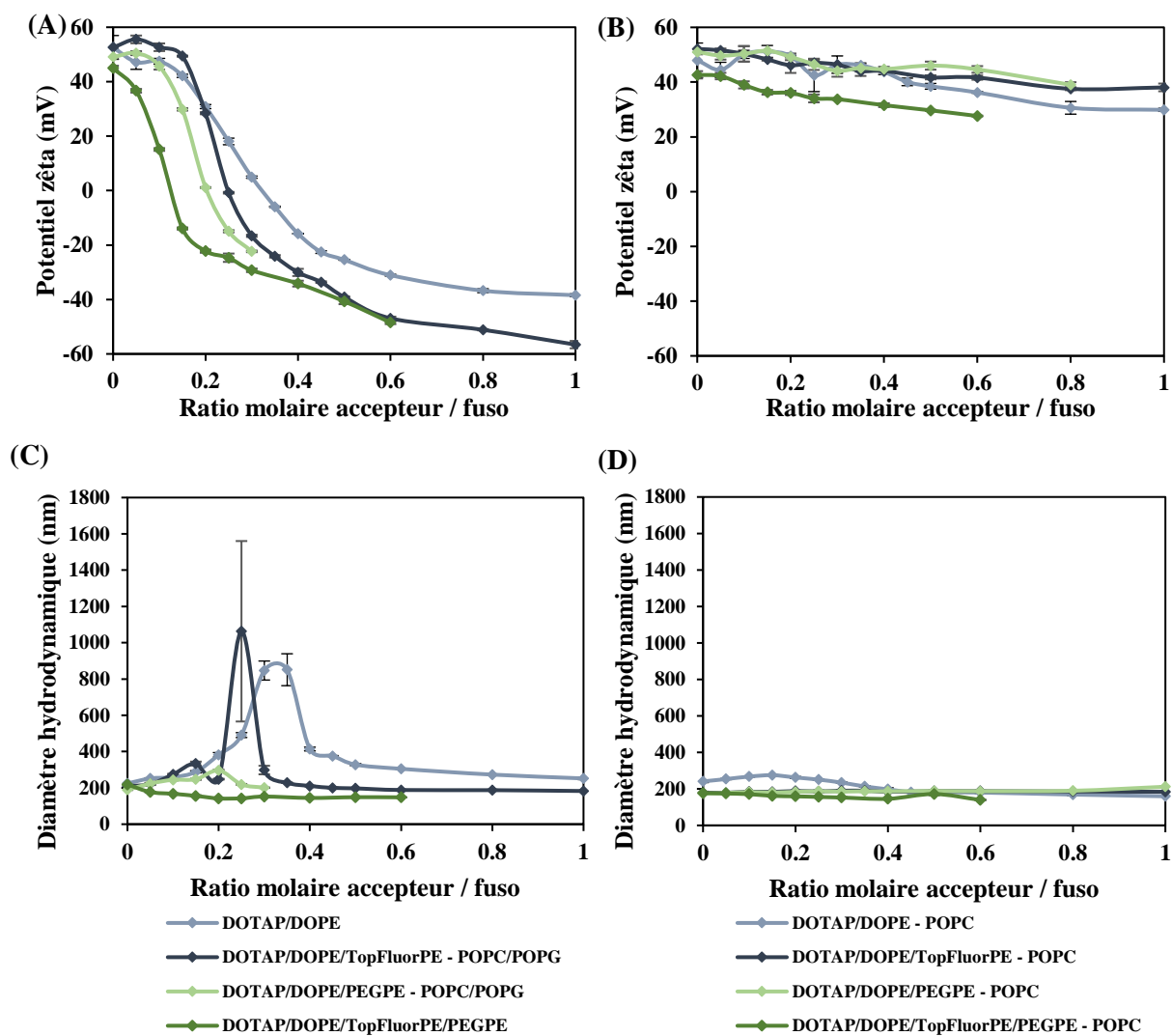


Figure 3.7 : (A) Potentiel zêta et (C) diamètre hydrodynamique mesurés après titrage des LUV cationiques par des LUV anioniques POPC/POPG. (B) Potentiel zêta et (D) diamètre hydrodynamique lors du titrage par des LUV zwitterioniques POPC. Les LUV cationiques ont pour compositions : DOTAP/DOPE (50/50 mol %, bleu clair), DOTAP/DOPE/TopFluorPE (47.6/47.6/4.8 mol %, bleu foncé), DOTAP/DOPE/PEGPE (47.6/47.6/4.8 mol %, vert clair), et DOTAP/DOPE/TopFluorPE/PEG-PE (45.5/45.5/4.5/4.5 mol %, vert foncé). La concentration lipidique des LUV cationiques est de 0,5 mM, celle des LUV accepteurs de 7 mM. Les barres d'erreur représentent l'écart type calculée à partir de trois mesures consécutives.

b. Données thermodynamiques de l'interaction entre LUV fusogènes et LUV accepteurs

Parallèlement aux titrages en DLS, l'interaction entre ces deux familles de liposomes a été suivie en ITC. À notre connaissance, l'ITC dans le cadre de l'étude de la fusion de systèmes lipidiques n'a été utilisé que dans très peu d'études dont celle de Cavalcanti et al.¹⁶². Dans cet article, l'ITC permet de déterminer si la réaction entre deux populations de LUV est endothermique ou exothermique et comment cette enthalpie est liée à la composition des membranes lipidiques. En revanche, aucune interprétation de la réaction en elle-même n'est faite.

L'ITC est une méthode performante pour étudier les propriétés thermodynamiques des réactions physico-chimiques en solution. En mesurant la chaleur échangée (absorbée ou dégagée) lors de l'interaction entre les composants, on obtient un thermogramme, qui représente la puissance différentielle fournie par le calorimètre pour maintenir une température constante entre la cellule et la référence (*Figure 3.8, noir*), ainsi qu'une isotherme de réaction (*Figure 3.8, bleu*).

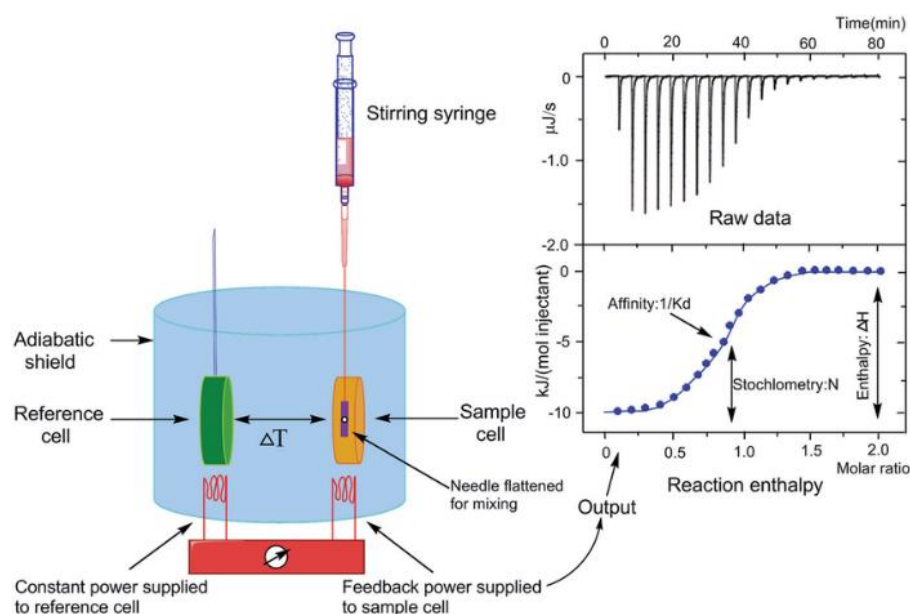


Figure 3.8 : Montage utilisé pour le suivi par ITC du titrage des LUV cationiques (cellule échantillon) par les LUV accepteurs (seringue).

L'isotherme de réaction, issue du thermogramme, permet ensuite d'obtenir des paramètres thermodynamiques clés, tels que la constante de liaison K_b , l'enthalpie de liaison ΔH_b et la stœchiométrie n . À partir de ces données, il est possible de calculer les variations d'énergie libre ΔG et d'entropie ΔS de la réaction.

$$\Delta G = -RT \ln K_b$$
$$\Delta S = (\Delta H_b - \Delta G)/T$$

Ces données thermodynamiques sont fondamentales pour comprendre le type d'interactions moléculaires entre les composants.

Dans notre étude, les liposomes fusogènes cationiques sont placés dans la cellule calorimétrique à une concentration lipidique fixée de 0,5 mM, les LUV accepteurs sont introduits par injections successives à l'aide d'une seringue d'injection dans la cellule calorimétrique, maintenue à 25 °C. Les concentrations lipidiques des LUV accepteurs ont dû être ajustées afin d'avoir un rapport accepteur/fuso permettant d'atteindre la saturation. Les concentrations utilisées sont respectivement de 4 mM pour les formulations DOTAP/DOPE et DOTAP/DOPE/TopFluorPE, et de 1 mM pour les formulations DOTAP/DOPE/PEGPE et DOTAP/DOPE/TopFluorPE/ PEGPE.

Les thermogrammes enregistrés lors du titrage des LUV cationiques par des LUV anioniques présentent tous des pics de dégagement de chaleur attestant que quelle que soit la formulation des liposomes cationiques, la réaction est exothermique (**Figure 3.9 A**). L'interaction entre les LUV anioniques, contenant du POPG, et les liposomes cationiques se révèle donc être un processus fortement exothermique, en revanche aucune variation calorimétrique significative n'est détectée lors des titrages avec des LUV zwitterioniques composés uniquement de POPC.

Les injections successives de LUV POPC/POPG génèrent des pics de chaleur dont l'amplitude varie en fonction de la composition lipidique des LUV cationiques : environ 1 $\mu\text{cal/s}$ pour DOTAP/DOPE (*Figure 3.9 A, noir*), 1,5 $\mu\text{cal/s}$ pour DOTAP/DOPE/TopFluorPE (*Figure 3.9 A, bleu*), 0,7 $\mu\text{cal/s}$ pour DOTAP/DOPE/PEG-PE (*Figure 3.9 A, violet*), et 0,6 $\mu\text{cal/s}$ pour la formulation complète DOTAP/DOPE/TopFluorPE/PEG-PE (*Figure 3.9 A, gris*). La variation d'intensité des dégagements de chaleur entre ces thermogrammes (*Figure 3.9 A*) peut s'expliquer en partie par la différence de concentration lipidique des liposomes accepteurs injectés : 4 mM pour DOTAP/DOPE et DOTAP/DOPE/TopFluorPE, contre 1 mM pour les formulations contenant du PEGPE. Les faibles amplitudes de signal calorimétrique observées pour ces dernières (0,7 et 0,6 $\mu\text{cal/s}$) ne traduisent donc pas nécessairement une affinité réduite, mais peuvent être attribuées à une concentration lipidique plus faible, et donc à un nombre d'événements (interaction ou fusion) plus faible.

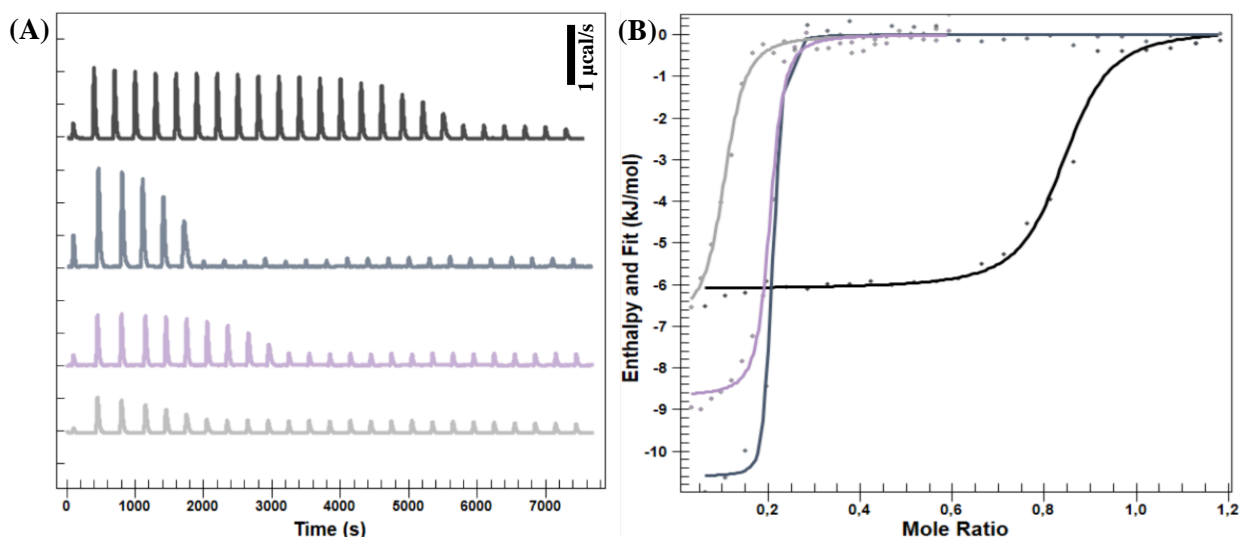


Figure 3.9 : (A) Thermogrammes bruts issus des titrations ITC de liposomes cationiques DOTAP/DOPE (noir), DOTAP/DOPE/TopFluorPE (bleu), DOTAP/DOPE/PEGPE (violet) et DOTAP/DOPE/TopFluorPE/PEGPE (gris) par des injections successives de liposomes anioniques POPC/POPG. (B) Isothermes de liaison correspondants, représentant l'enthalpie différentielle en fonction du ratio molaire accepteurs/fuso (=Mole ratio).

Les faibles signaux résiduels autour de 0,14 $\mu\text{cal/s}$ observés en fin de titrage correspondent à l'effet de dilution des liposomes anioniques dans la cellule de mesure, comme illustré sur le thermogramme de contrôle (*Figure 3.10*). Ainsi, après soustraction de cette valeur, on trouve que 67% de l'énergie thermique mesurée par ITC provient de l'interaction

entre vésicules de charges opposées, ce qui traduit une certaine affinité entre les liposomes, compatible avec un mécanisme dominé par des interactions électrostatiques.

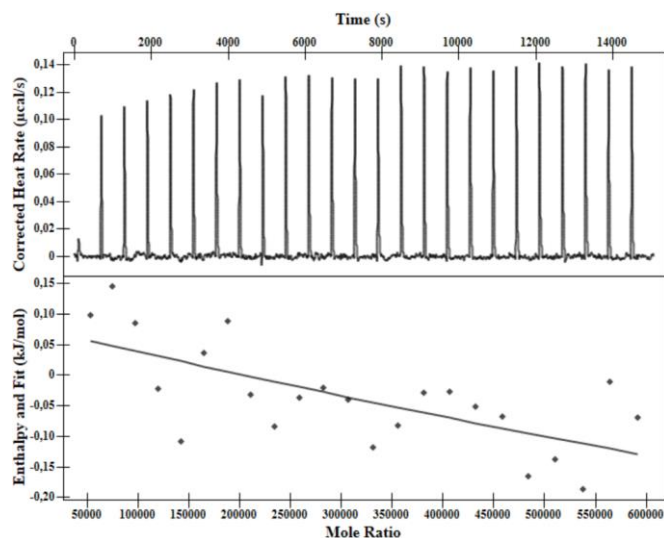


Figure 3.10 : Thermogrammes bruts et isothermes de réaction correspondants au contrôle de dilution des liposomes POPC/POPG dans l'eau ultrapure.

L'intégration des pics calorimétriques du thermogramme permet d'obtenir des isothermes représentant l'enthalpie (ΔH) en fonction du rapport molaire accepteur/fuso (**Figure 3.9 B, points**). La forme sigmoïde des courbes suggère un modèle d'interaction indépendant, sans comportement coopératif marqué (**Figure 3.9 B, courbe**). Ce modèle, fréquemment appliqué aux interactions bimoléculaires simples, permet d'extraire des paramètres thermodynamiques caractéristiques tels que la stœchiométrie apparente (n), l'enthalpie standard de liaison (ΔH , en kJ/mol), et l'enthalpie libre (ΔG , en kJ/mol).¹⁷⁰ Ces données sont regroupées dans le **Tableau 3.2**.

Titration avec LUV anioniques	DLS	ITC		
	n	n	ΔH (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)
DOTAP/DOPE	0,35	1,644 \pm 0,027	-3,112 \pm 0,083	-35,9
DOTAP/DOPE/TopFluor	0,25	0,378 \pm 0,015	- 5,304 \pm 0,150	-37,57
DOTAP/DOPE/PEGPE	0,2	0,194 \pm 0,004	-6,818 \pm 0,455	-35,82
DOTAP/DOPE/PEGPE/TopFluor	0,15	0,101 \pm 0,004	-8,680 \pm 0,288	-31,53

Tableau 3.2 : Valeurs thermodynamiques (n : stœchiométrie de la réaction, ΔH : enthalpie de réaction, ΔG : enthalpie libre) issues du fit des isothermes obtenues en ITC pour le titrage de différentes formulations de LUV cationiques avec les LUV anioniques. Les valeurs de n obtenues en DLS sont rappelées.

Les paramètres thermodynamiques extraits des titrages calorimétriques isothermes révèlent une évolution significative de la stœchiométrie de la réaction et de l'enthalpie en fonction de la composition lipidique (**Tableau 3.2**). La stœchiométrie apparente de liaison (n) diminue significativement à mesure que la formulation des liposomes cationiques se complexifie, passant de $1,64 \pm 0,03$ pour les liposomes DOTAP/DOPE à $0,101 \pm 0,004$ pour la formulation complète DOTAP/DOPE/PEGPE/TopFluorPE. Cette tendance est en bon accord avec les résultats de DLS, qui montrent qu'une plus faible quantité de LUV anioniques est nécessaire pour atteindre le point d'équivalence dans les formulations contenant du PEG et le TopFluor. De la même manière que pour les mesures de DLS, cette diminution de la stœchiométrie peut s'expliquer par une réduction de la densité de charges positives à la surface des liposomes, due à l'incorporation de lipides zwitterioniques ou neutres (PEGPE, TopFluorPE). En effet, le potentiel zêta passe de +70 mV pour DOTAP/DOPE à +45 mV pour la formulation DOTAP/DOPE/PEGPE/TopFluorPE, traduisant une baisse de la contribution électrostatique, et donc une diminution du nombre de sites accessibles pour la fusion.

De manière très intéressante, l'enthalpie libre (ΔH) devient de plus en plus négative lorsque la formulation se complexifie, passant de $-3,1$ kJ/mol pour la formulation de base à $-8,7$ kJ/mol pour la formulation complète. Cette évolution traduit une augmentation du caractère exothermique de l'interaction, ce qui est contre-intuitif. En effet, si on résonne uniquement sur l'interaction électrostatique, il serait logique que le titrage avec les LUV ayant le potentiel zêta le plus élevé (DOTAP/DOPE) conduise à une interaction plus forte et donc un caractère exothermique plus marqué que la formulation complète avec du PEG et du TopFluor. De plus, l'ajout individuel de PEG ou de TopFluor conduit également à une augmentation de l'enthalpie (plus négative), suggérant l'implication d'interactions additionnelles, au-delà des simples forces électrostatiques. En effet, les lipides fluorescents tels que le TopFluor PE, qui contiennent des systèmes π -conjugués, sont bien connus pour perturber la structure de la bicouche lipidique et favoriser des événements de fusion membranaire, ce qui peut contribuer à un dégagement de chaleur supplémentaire.^{160,172} Quant au PEG, il est classiquement décrit comme inhibiteur de fusion lorsqu'il est inséré dans la membrane (en raison d'effets de stabilisation stérique), mais peut également se comporter comme un agent fusogène lorsqu'il est libre en solution, comme le rapportent plusieurs études.¹⁷³ Dans notre cas, la formulation complète incluant du PEG conduit à une réaction plus fortement exothermique.

L'interprétation des valeurs d'enthalpie mesurées par ITC doit toutefois être abordée avec prudence. En effet, dans notre cas, la chaleur dégagée est probablement la somme de plusieurs contributions : interactions électrostatiques, désolvatation, réorganisations membranaires, voire fusion des liposomes. Contrairement à certaines études ITC mettant en évidence des événements successifs identifiables par des épaulements distincts dans les thermogrammes, aucune déviation significative n'est observée ici dans la déconvolution des courbes, rendant difficile la discrimination des mécanismes sous-jacents. Dans ce contexte, nous avons choisi de ne pas interpréter quantitativement les valeurs de constante d'affinité (K_d) issues du modèle de liaison utilisé, puisqu'il est impossible d'associer ce K_d à une réaction unique et bien définie.

Il reste néanmoins intéressant de commenter les valeurs d'énergie libre de Gibbs (ΔG), toutes négatives, indiquant que l'interaction est spontanée et thermodynamiquement favorable dans tous les cas. Les valeurs obtenues pour les formulations DOTAP/DOPE ($-35,9$ kJ/mol) et DOTAP/DOPE/PEGPE ($-35,82$ kJ/mol) sont très proches, suggérant que l'incorporation du PEGPE dans la bicouche n'altère pas significativement le caractère favorable de la fusion. L'ajout du TopFluor PE entraîne une diminution supplémentaire de ΔG ($-37,57$ kJ/mol), ce qui confirme son rôle favorable dans le processus. En revanche, la formulation complète (DOTAP/DOPE/PEGPE/TopFluorPE) présente une valeur de ΔG légèrement moins négative ($-31,5$ kJ/mol). Cette différence pourrait cependant résulter d'un artefact d'ajustement, dans la mesure où l'isotherme de ce titrage ne présente pas de plateau bien défini en début de courbe, ce qui peut altérer la robustesse du fit.

Il est également intéressant de noter que la valeur de ΔG obtenue est de l'ordre de 13 kT, ce qui fournit un point de comparaison pertinent avec la littérature. En effet, bien que rares soient les études expérimentales permettant d'évaluer directement l'énergie libre d'une réaction de fusion membranaire, l'ITC pourrait constituer un outil intéressant pour approcher cette grandeur. À titre de comparaison, plusieurs modèles théoriques ont estimé l'énergie d'activation globale de la fusion lipidique dans une plage très large, allant de 20 à 150 kT selon les hypothèses retenues. La première mesure expérimentale de cette énergie d'activation a été proposée par Pincet et *al.*¹⁰, qui ont obtenu une valeur de 30 kT à partir de mesures de fluorescence réalisées à différentes températures.

c. Étude de l'interaction entre LUV cationiques et accepteurs en microscopie confocale

Les analyses réalisées par DLS et ITC ont permis de démontrer l'existence d'interactions fortes entre les LUV cationiques et les LUV anioniques, interactions renforcées par l'incorporation de TopFluor PE dans les formulations cationiques. Toutefois, ces techniques ne permettent pas de distinguer clairement si ces interactions aboutissent à un phénomène de fusion membranaire ou simplement à une agrégation entre vésicules de charges opposées. Afin de lever cette ambiguïté, des expériences de colocalisation et de transfert de fluorescence ont été conduites par microscopie confocale.

Celles-ci ont été réalisées sur la plateforme d'imagerie de l'Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS, Sorbonne Université). Seule la formulation complète DOTAP/DOPE/TopFluorPE/PEGPE a été utilisée pour ces essais, la présence du fluorophore (TopFluor PE) étant indispensable pour le suivi en imagerie.

i. Colocalisation des LUV cationiques et accepteurs en microscopie confocale

La colocalisation des liposomes a été évaluée par microscopie confocale à fluorescence en mélangeant des liposomes cationiques marqués au TopFluor PE (émission verte) avec des liposomes accepteurs soit anioniques, soit zwitterioniques, marqués à l'Egg Liss Rhod PE (émission rouge).

L'observation de ces mélanges entre lame et lamelle a révélé, dans le cas des liposomes anioniques, la formation d'objets sphériques de grande taille, émettant un signal orange résultant du chevauchement des canaux verts et rouges, indiquant une colocalisation des deux types de vésicules (**Figure 3.11**). Le coefficient de corrélation de Pearson (PCC), calculé à partir de sept images représentatives, s'élève à $0,84 \pm 0,03$, témoignant d'une forte corrélation spatiale entre les deux fluorophores. La visualisation de liposomes plus gros ($> 1 \mu\text{m}$) dont les contours membranaires sont bien identifiables suggère une fusion plutôt qu'une simple agrégation, phénomène cohérent et déjà décrit dans la littérature.¹⁶² Par ailleurs, la présence de structures tubulaires évoque un remodelage membranaire induit par un excès localisé de lipides.

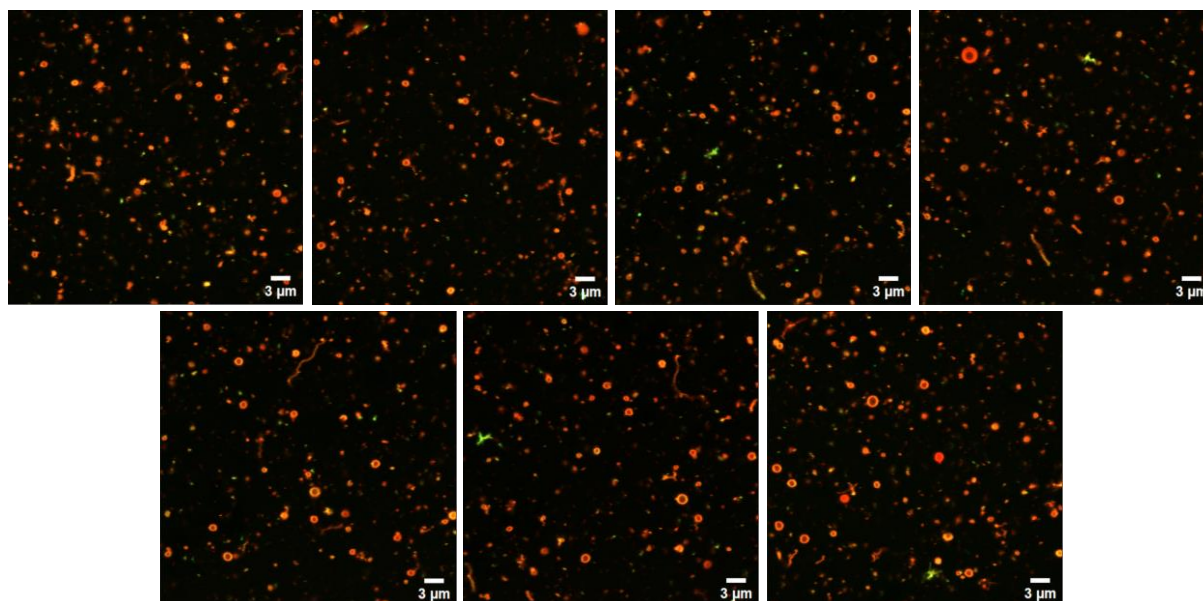


Figure 3.11 : Images de microscopie confocale à fluorescence de LUV cationiques DOTAP/DOPE/TopFluorPE/PEGPE (émission verte) après mélange équimolaire avec des LUV anioniques POPC/POPG/EggLissRhodPE (émission rouge, 49,5/49,5/1 mol%).

À l'inverse, en présence de liposomes zwitterioniques (POPC/EggLissRhodPE), les images (**Figure 3.12**) révèlent uniquement des signaux fluorescents distincts, émis soit dans le rouge, soit dans le vert, avec un diamètre moyen de 200 nm, caractéristiques des LUV individuels. Le PCC moyen de $0,15 \pm 0,07$ reflète une absence de colocalisation significative, suggérant que les deux populations de liposomes restent séparées, en l'absence d'interactions électrostatiques.

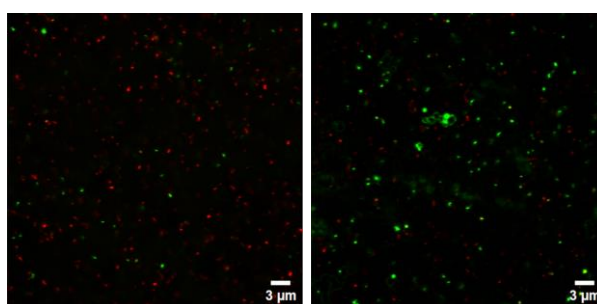


Figure 3.12 : Images de microscopie confocale à fluorescence de LUV cationiques DOTAP/DOPE/TopFluorPE/PEGPE (émission verte) après mélange équimolaire avec des LUV zwitterioniques POPC/EggLissRhodPE (99/1 mol%).

Des analyses de distribution de taille ont été réalisées à partir de deux images par condition. Pour le mélange avec les liposomes anioniques, la distribution est étendue, atteignant 2500 nm, avec une moyenne de 303 nm, révélant une population hétérogène enrichie en gros liposomes (**Figure 3.13 A**). En revanche, avec les liposomes zwitterioniques, la distribution est plus étroite, centrée sous 500 nm, et la taille moyenne est de 189 nm, ce qui est compatible avec la population initiale de LUV (**Figure 3.13 B**). Cette valeur est en effet cohérente avec les tailles mesurées séparément pour les liposomes cationiques (185 nm) et les liposomes zwitterioniques (162 nm) suggérant l'absence d'interactions significatives entre les deux populations (**Figure 3.6**). Ces résultats confirment l'augmentation de la taille des liposomes après mélange des deux populations de LUV anioniques et cationiques, ce qui est compatible avec des phénomènes de fusion. En présence des LUV zwitterioniques, aucune augmentation de taille n'est observée.

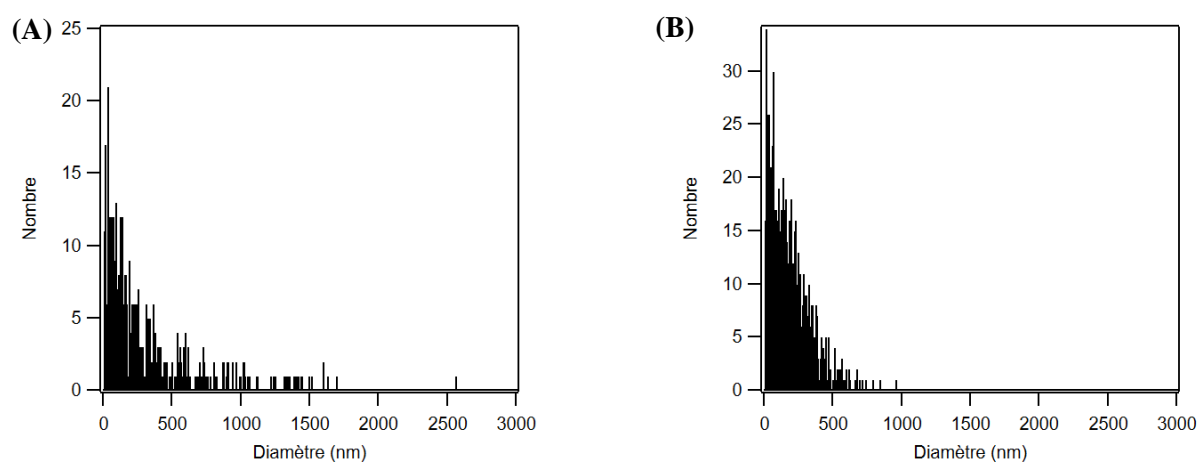


Figure 3.13 : Les histogrammes de distribution de taille correspondants ont été établis à partir de deux images pour chaque condition : **(A)** pour le mélange avec les LUV anioniques et **(B)** pour celui avec les LUV zwitterioniques.

ii. Expériences de transfert de fluorescence

Les résultats de colocalisation ont confirmé que les liposomes cationiques et anioniques sont spatialement localisés au même endroit, condition indispensable à la mise en œuvre d'une expérience de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Cette technique permet de différencier une fusion d'une simple agrégation entre liposomes, en évaluant la proximité moléculaire entre deux fluorophores : le TopFluorPE (émission verte, $\lambda_{ex} = 495$ nm, $\lambda_{em} = 503$ nm) incorporé aux liposomes cationiques, et l'Egg Liss Rhod PE (émission rouge, $\lambda_{ex} = 560$ nm, $\lambda_{em} = 583$ nm) présent dans les liposomes accepteurs. La terminologie classique "donneur/accepteur" pour désigner respectivement le fluorophore vert et rouge est

volontairement évitée ici, afin d'éviter toute confusion avec le rôle des liposomes "accepteurs" dans l'expérience de fusion. Les termes « donneur » (TopFluor) et « fluorophore rouge » (Egg Liss Rhod PE) seront donc employés.

Pour que le phénomène de FRET se produise, le couple de fluorophores est généralement sélectionné en respectant trois critères fondamentaux : (i) le spectre d'émission du donneur doit recouvrir partiellement le spectre d'absorption du fluorophore rouge (**Figure 3.14 A**), (ii) les deux fluorophores doivent être situés à une distance inférieure à 10 nm (**Figure 3.14 B**), et (iii) leurs dipôles doivent être orientés dans la même direction (**Figure 3.14 C**). Lorsque ces conditions sont réunies, un transfert d'énergie non-radiatif peut se produire du donneur vers le fluorophore rouge, suite à l'excitation du donneur à sa longueur d'onde d'excitation.

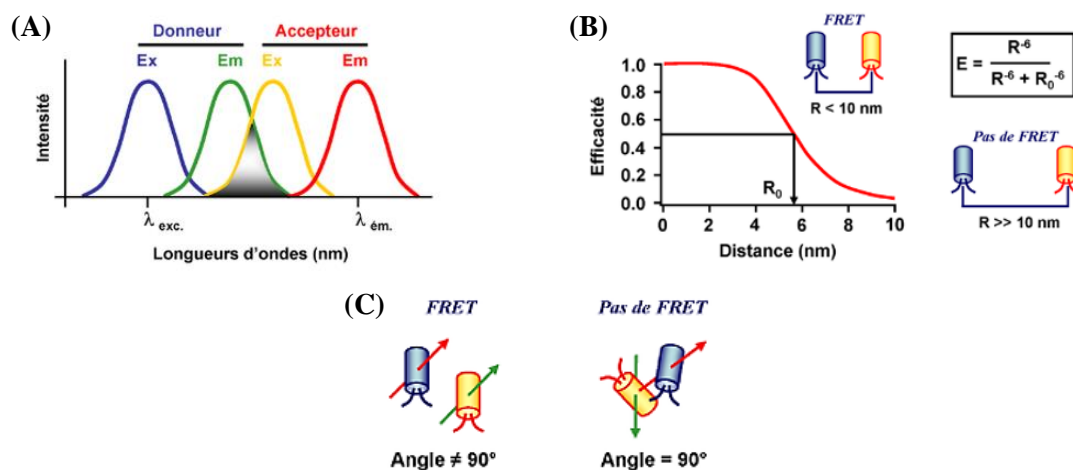


Figure 3.14 : Conditions pour que le phénomène de FRET se produise : (A) Superposition des bandes d'émission et d'excitation du fluorophore donneur et accepteur respectivement, (B) distance entre les fluorophores inférieure à 10 nm, (C) alignement des dipôles de la paire de fluorophores.

Afin d'interpréter correctement les résultats des expériences de FRET, plusieurs contrôles préalables sont indispensables. Il convient notamment de vérifier que le fluorophore rouge (EggLissRhodPE) n'est pas excité de manière significative à la longueur d'onde utilisée pour exciter le TopFluorPE (488 nm), et de caractériser précisément le spectre d'émission du TopFluorPE. À cette fin, des images ont été acquises pour chaque type de liposome individuellement : DOTAP/DOPE/TopFluorPE/PEGPE, POPC/POPG/EggLissRhodPE et POPC/EggLissRhodPE (**Figure 3.15**). Pour chacun, le profil d'intensité moyen de 150 spots a été établi. Les liposomes cationiques marqués au TopFluorPE présentent un pic d'émission principal à 510 nm, environ sept fois plus intense qu'un second pic à 575 nm (**Figure 3.15 A et B, courbes vertes**). Ce second pic, nettement moins marqué, ne correspond pas à l'émission typique de l'EggLissRhodPE, dont le maximum est centré à 590 nm (**Figure 3.15 A et B, courbes rouges**). Par ailleurs, les liposomes marqués uniquement avec EggLissRhodPE, qu'ils soient anioniques ou zwitterioniques, montrent une fluorescence résiduelle faible lorsqu'ils sont excités à 488 nm. En effet, leur intensité est environ cinq fois inférieure (**Figure 3.15 A et B, courbes rouges**) à celle des liposomes TopFluorPE (**Figure 3.15 A et B, courbes vertes**) enregistrée dans les mêmes conditions expérimentales. Ces résultats confirment que l'émission de l'EggLissRhodPE à 488 nm peut être considérée comme négligeable, validant ainsi l'utilisation du couple TopFluorPE-EggLissRhodPE pour des expériences de FRET fiables.

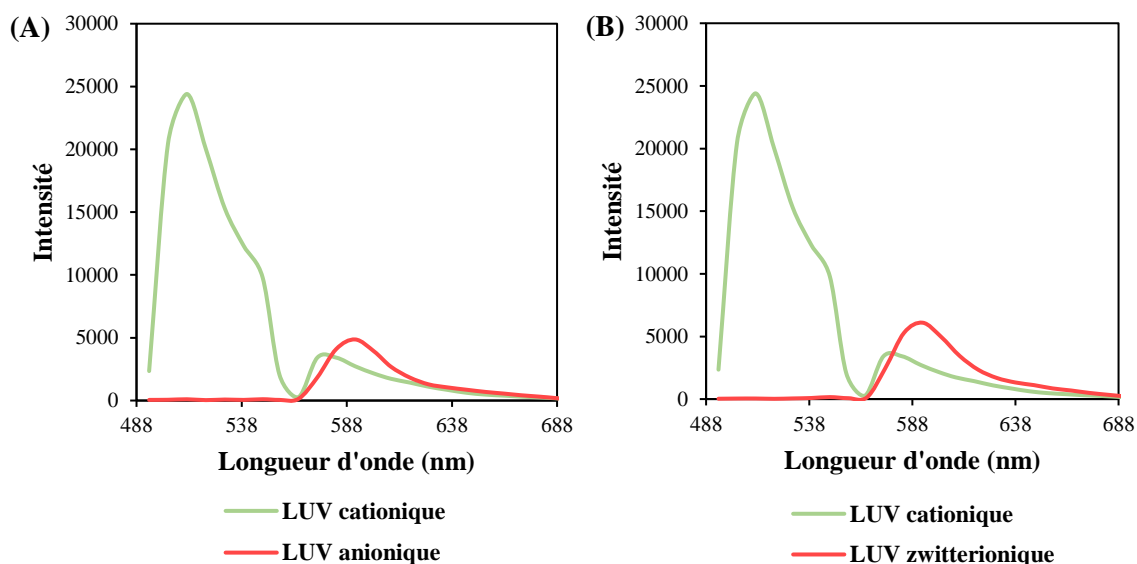


Figure 3.15 : (A) Profils d'intensité des LUV cationiques DOTAP/DOPE/TopFluorPE/PEGPE (vert), et des LUV anioniques POPC/POPG/EggLissRhodPE (rouge). (B) Profils d'intensité des LUV cationiques DOTAP/DOPE/TopFluorPE/PEGPE (vert) et des LUV zwitterioniques POPC/EggLissRhodPE (rouge).

L'expérience de FRET a été réalisée en incubant pendant 1 heure les LUV cationiques (DOTAP/DOPE/TopFluorPE/PEGPE) avec les LUV accepteurs à des concentrations équimolaires, comme dans les expériences de colocalisation. Ce rapport équimolaire permet d'envisager que chaque LUV cationique ait potentiellement un partenaire accepteur. L'observation a été effectuée en microscopie confocale à une longueur d'onde d'excitation de 488 nm. Les profils d'intensité moyenne, calculés à partir de 150 vésicules par condition, ont été comparés aux contrôles.

Dans le mélange avec les LUV anioniques (*Figure 3.16 A, courbe orange*), l'intensité du pic d'émission du TopFluorPE à 510 nm diminue d'un facteur 1,5 par rapport au contrôle (*Figure 3.16 A, courbe verte*), alors que l'intensité du pic de l'EggLissRhodPE à 590 nm augmente d'un facteur 6 par rapport au contrôle (*Figure 3.16 A, courbe rouge*). Ce double effet, baisse du signal du donneur et hausse du signal du fluorophore rouge, indique un transfert d'énergie, caractéristique d'un phénomène de FRET. Ce phénomène de FRET prouve qu'il y a bien fusion membranaire entre les deux types de liposomes. En revanche, dans le cas du mélange avec les liposomes zwitterioniques (*Figure 3.16 B, courbe orange*), l'intensité du signal du TopFluorPE reste inchangée (*Figure 3.16 B, orange, 1^{er} pic*), mais le signal du fluorophore rouge augmente tout de même d'un facteur 2,7 (*Figure 3.16 B, orange, 2^{ème} pic*). Ce transfert partiel pourrait être attribué à une faible interaction non spécifique ou à un artefact de proximité locale, sans qu'une véritable fusion ne soit démontrée.

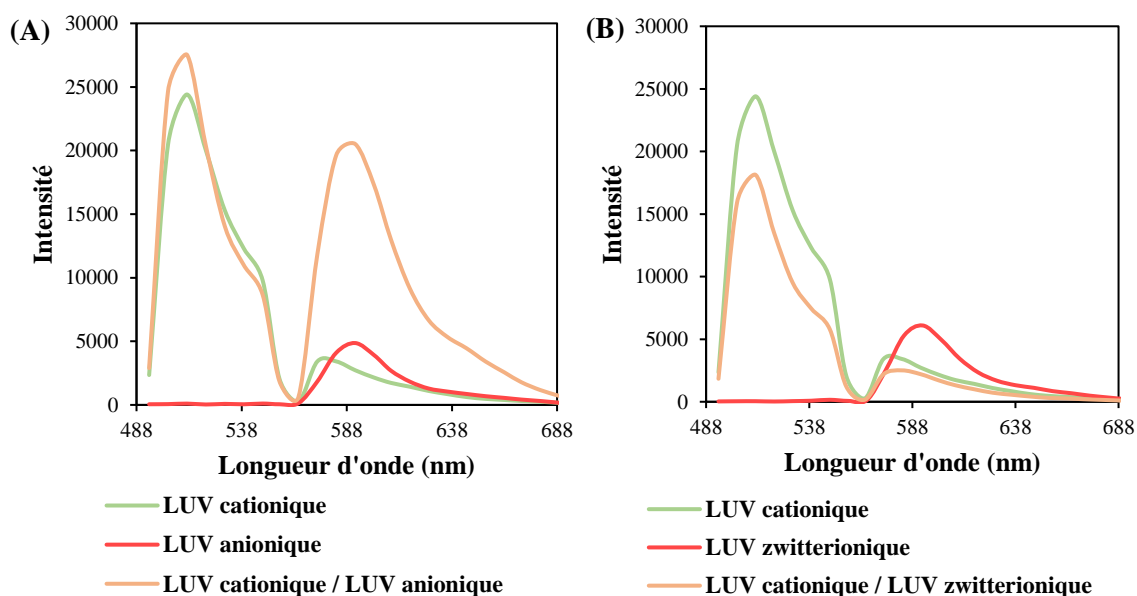


Figure 3.16 : (A) Profils d'intensité des LUV cationiques DOTAP/DOPE/TopFluorPE/ PEGPE (vert), des LUV anioniques POPC/POPG/EggLissRhodPE (rouge) et du mélange LUV

cationiques / LUV anioniques (orange). **(B)** Profils d'intensité des LUV cationiques DOTAP/DOPE/TopFluorPE/PEGPE (vert), des LUV zwitterioniques POPC/EggLissRhodPE (rouge) et du mélange LUV cationiques / LUV zwitterioniques (orange).

L'efficacité du FRET a été déterminée en calculant le rapport entre l'aire du pic du fluorophore rouge et la somme des aires des pics des fluorophores donneur et rouge, sur la base de 150 profils d'intensité individuelle. Ce ratio constitue un indicateur quantitatif du transfert d'énergie entre fluorophores. Une efficacité de FRET de 0,46 a été mesurée lors de l'incubation des liposomes cationiques avec des liposomes anioniques (*Figure 3.17, bleu*), contre une valeur de 0,15 en présence de liposomes zwitterioniques (*Figure 3.17, vert*). Plus ce ratio tend vers 1, plus le transfert d'énergie est important, traduisant une efficacité de FRET élevée. Ces résultats suggèrent un transfert d'énergie significatif entre le TopFluorPE, incorporé dans les LUV cationiques donneurs, et l'EggLissRhodPE, présent dans les LUV anioniques. Cette observation implique un rapprochement spatial suffisant entre les fluorophores ainsi qu'un alignement adéquat de leurs dipôles, deux conditions qui ne peuvent être réunies que si les lipides issus des deux populations de liposomes coexistent au sein d'une même bicouche lipidique. Une telle configuration est caractéristique d'un processus de fusion ou d'hémifusion membranaire, au cours duquel les bicouches lipidiques s'unissent partiellement ou totalement.

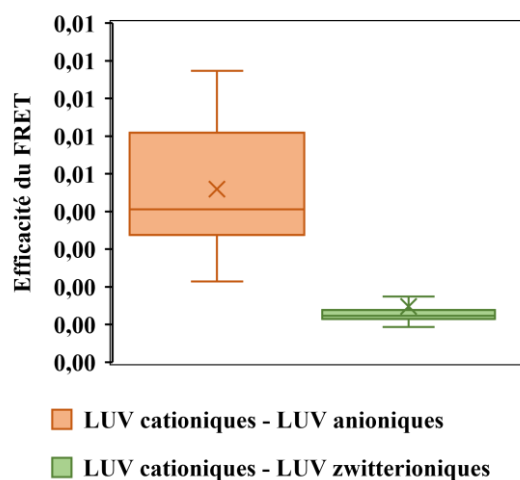


Figure 3.17 : Efficacité du FRET des mélanges de LUV cationiques avec des LUV anioniques (orange) ou LUV zwitterioniques (vert).

3. Interaction des MFL avec les LUV accepteurs

a. Titrage des MFL par les liposomes accepteurs en DLS

Les liposomes cationiques composés de DOTAP/DOPE/TopFluorPE/PEGPE présentent une forte propension à fusionner avec des LUV anioniques ; cette fusion est principalement médiée par des interactions électrostatiques. Dans la continuité de ces observations, l'objectif de cette partie de l'étude a été d'évaluer si la présence de nanoparticules magnétiques dans le cœur aqueux de ces liposomes fusogènes, tels que décrits au chapitre 2, altère ou non leur capacité de fusion.

Pour répondre à cette question, la même stratégie expérimentale que celle appliquée dans le cas des LUV sans NPM a été rigoureusement suivie. Les MFL ont été titrés soit avec des liposomes anioniques POPC/POPG (*Figure 3.18 A*), soit avec des liposomes zwitterioniques POPC (*Figure 3.18 B*), servant respectivement de liposomes modèles accepteurs favorables ou non favorables à la fusion. À chaque étape du titrage, le diamètre hydrodynamique et le potentiel zêta ont été mesurés. Les mesures ont été réalisées avec une concentration lipidique fixée à 9,5 μM pour les MFL et à 1,2 mM pour les LUV accepteurs.

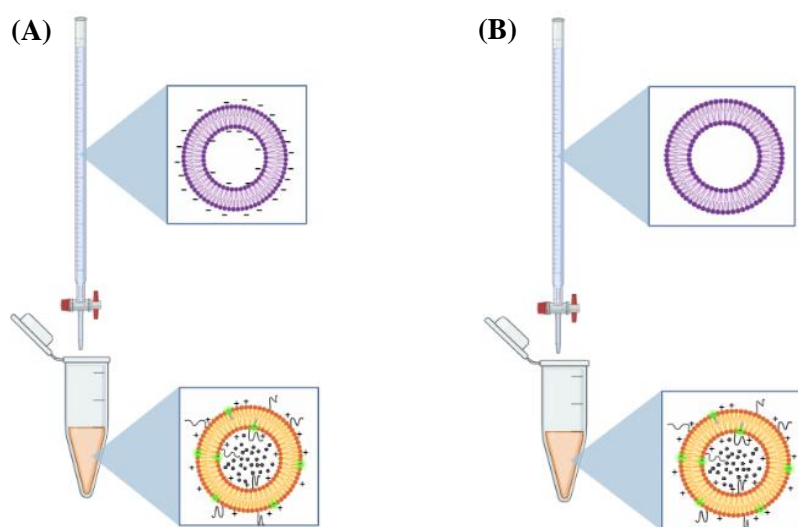


Figure 3.18 : Titrage des MFL par les LUV (A) anioniques, ou (B) zwitterioniques.

Les résultats obtenus mettent en évidence une inversion marquée du potentiel zêta, indiquant une neutralisation progressive des charges de surface des MFL lors du titrage par les liposomes anioniques. L'inversion de charge se produit pour un ratio molaire accepteur/MFL de 0,4 (*Figure 3.19 A, bleu*) qui coïncide avec une augmentation transitoire du diamètre hydrodynamique mesuré par DLS (*Figure 3.19 B, bleu*), confirmant les observations faites sur les LUV vides. En revanche, aucune variation significative ni du potentiel zêta (*Figure 3.19 A, vert*), ni du diamètre hydrodynamique (*Figure 3.19 B, vert*) n'est observée avec les LUV zwitterioniques. Ces observations confirment que les phénomènes observés dans le système MFL/(LUV anioniques) sont induits par des interactions électrostatiques entre entités de charge opposées, condition préalable à la formation d'assemblages mixtes lipidiques. Ces réarrangements peuvent refléter soit une agrégation contrôlée, soit une fusion ou une hémifusion membranaire, comme cela a été observé précédemment avec les liposomes cationiques sans nanoparticules.

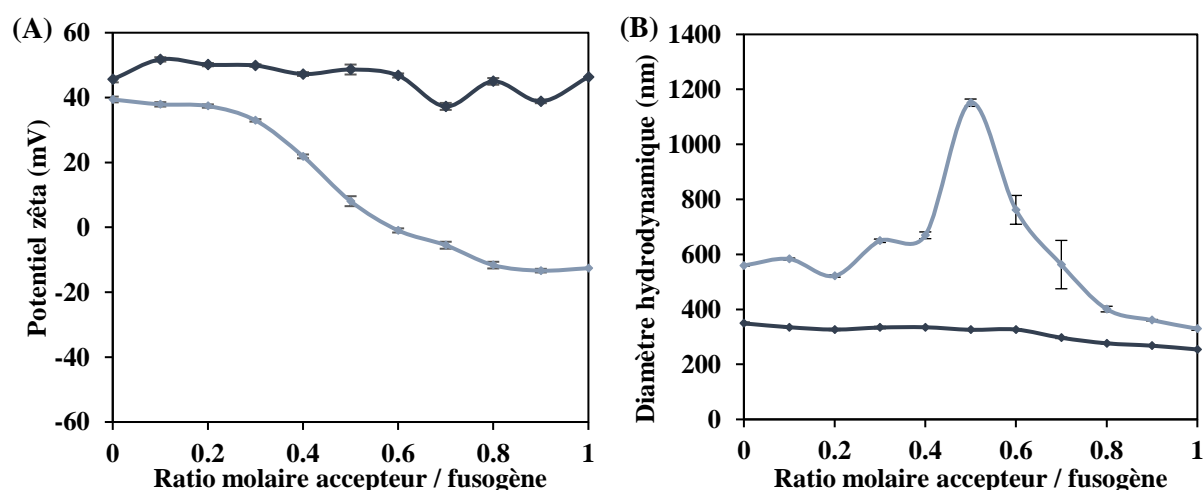


Figure 3.19 : Mesures (A) du potentiel zêta et (B) du diamètre hydrodynamique au cours du titrage des MFL par les LUV anioniques POPC/POPG (50:50 % mol, bleu clair) ou zwitterioniques POPC (bleu foncé). Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé à partir de trois mesures consécutives.

b. Titrage des MFL par les liposomes accepteurs en ITC

L'échange de chaleur engendré par le mélange des MFL avec des LUV accepteurs a été mesuré en ITC. Les MFL sont introduits dans la cellule de mesure à une concentration lipidique de 0,12 mM, les LUV anioniques sont injectés avec la seringue à 1,2 mM. Toutes les mesures ont été réalisées à 25 °C. Le profil thermique obtenu révèle une série de pics exothermiques

initiaux d'environ $0,8 \mu\text{cal/s}$, décroissant progressivement au fil des injections jusqu'à atteindre une valeur basale de $0,17 \mu\text{cal/s}$ (*Figure 3.20 A, bleu clair*), correspondant à la chaleur de dilution des LUV dans l'eau ultrapure (*Figure 3.10*). Ces données indiquent que près de 79 % de la chaleur dégagée est spécifiquement liée aux interactions entre MFL et LUV anioniques. Dans le cas du titrage des MFL par des LUV zwitterioniques, la puissance thermique enregistrée reste constante autour de $0,16 \mu\text{cal/s}$ (*Figure 3.20 A, bleu foncé*), correspondant exclusivement à la dilution des liposomes POPC dans la cellule (*Figure 3.10*), ce qui indique qu'il n'y a aucune interaction entre ces deux populations de LUV.

Les données expérimentales, issues de l'intégration des pics du thermogramme, ont été modélisées à l'aide d'un modèle indépendant pour le titrage avec les liposomes anioniques (*Figure 3.20 B, bleu clair*), et avec un modèle linéaire pour le titrage avec les liposomes zwitterioniques (*Figure 3.20 B, bleu foncé*). Ces isothermes confirment ainsi une interaction thermodynamiquement significative entre les MFL et les LUV anioniques, contrastant avec l'absence d'interaction détectée avec les LUV zwitterioniques.

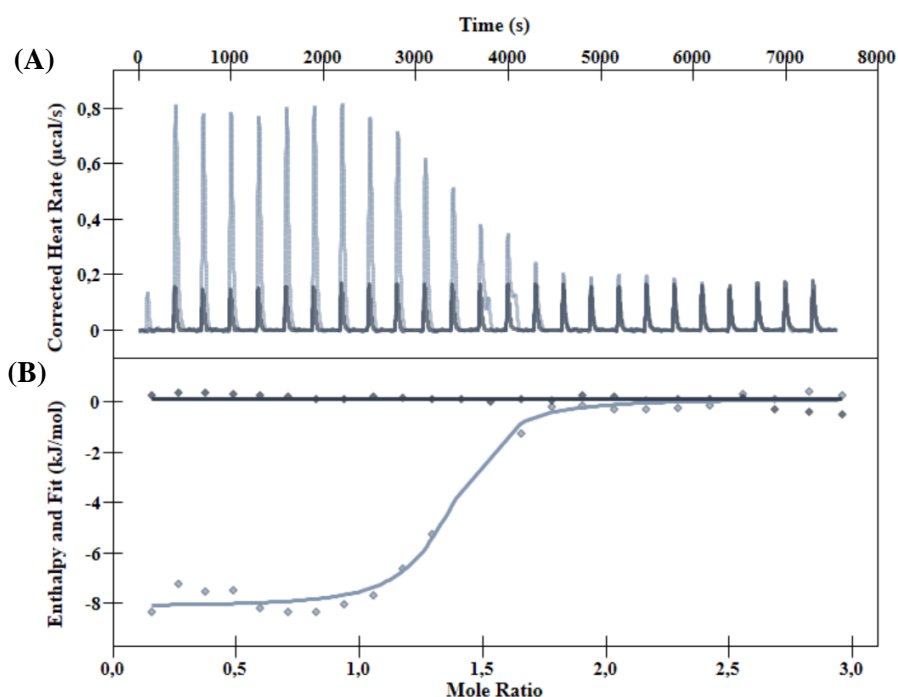


Figure 3.20 : (A) Thermogrammes bruts issus du titrage ITC des MFL par des injections successives de LUV anioniques POPC/POPG (bleu clair) ou de LUV zwitterioniques POPC (bleu foncé) ; (B) Isothermes représentant l'enthalpie différentielle en fonction du ratio molaire accepteurs/fuso (=Mole ratio).

L'analyse calorimétrique par ITC du titrage des MFL par les liposomes anioniques POPC/POPG, dont les résultats sont résumés dans le **Tableau 3.3**, met en évidence une interaction exothermique marquée, caractérisée par une enthalpie de liaison $\Delta H = -8,272 \pm 0,518$ kJ/mol. De manière remarquable, on retrouve les mêmes ordres de grandeur que l'enthalpie mesurée avec des liposomes ayant la même composition lipidique sans nanoparticules ($-8,680 \pm 0,288$ kJ/mol). Le modèle permet également d'estimer une stœchiométrie apparente de 1,33, indiquant qu'en moyenne, un liposome accepteur interagit avec plus d'un MFL. Cette évolution de la stœchiométrie entre les liposomes cationiques contenant des NPM et ceux qui en sont dépourvus est en accord avec les données de DLS, qui révèlent une saturation des charges à un ratio molaire de 0,4 pour les MFL, contre 0,15 pour les liposomes vides. Cette différence peut s'expliquer par le potentiel zêta plus élevé des MFL (+62 mV) comparé à celui des liposomes vides (+45 mV), ce qui implique qu'une plus grande quantité de liposomes anioniques est nécessaire pour neutraliser les charges de surface et initier les réarrangements membranaires. L'enthalpie libre (ΔH) calculée pour le titrage des MFL avec les LUV anioniques (-34,4 kJ/mol) est également cohérente avec la valeur trouvée dans le cas des LUV cationiques sans NPM (-31,53 kJ/mol). Ainsi, bien que les MFL présentent une charge de surface plus élevée et donc une stœchiométrie plus importante, ils conservent un comportement thermodynamique similaire aux LUV cationiques vides en termes d'interaction avec les membranes anioniques, ce qui suggère que la présence des nanoparticules magnétiques n'entrave pas le processus d'interaction lipidique à l'échelle moléculaire.

Titration avec LUV anioniques	DLS	ITC		
	n	n	ΔH (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)
MFL	0,4	$1,334 \pm 0,064$	$-8,272 \pm 0,518$	-34,14
LUV cationiques	0,15	$0,101 \pm 0,004$	$-8,680 \pm 0,288$	-31,53

Tableau 3.3: Valeurs thermodynamiques (n : stœchiométrie de la réaction, ΔH : enthalpie de réaction, ΔS : entropie) issues du fit des isothermes obtenues en ITC pour le titrage des MFL et des LUV cationiques sans nanoparticules magnétiques avec la même formulation. Les valeurs de n obtenues en DLS sont rappelées.

c. Suivi de la fusion des MFL avec des LUV accepteurs par microscopie confocale

i. Colocalisation des MFL avec les LUV accepteurs

L'analyse par microscopie confocale de fluorescence du mélange entre les MFL (marqués en vert) et les LUV accepteurs anioniques (marqués en rouge) révèle, comme observé

précédemment avec les LUV cationiques vides, la formation d'objets sphériques de grande taille, émettant une fluorescence orange indicative de la superposition des deux signaux (*Figure 3.21 A*). On observe également des objets plus petits (environ 200 nm) émettant uniquement en vert ou en rouge, correspondant à des liposomes non engagés dans l'interaction (*Figure 3.21 A*). Le coefficient de corrélation de Pearson (PCC), calculé à partir de deux images représentatives, est de $0,89 \pm 0,01$, confirmant une forte colocalisation entre les MFL et les LUV anioniques. Ce niveau de corrélation est même légèrement supérieur à celui mesuré pour les LUV vides (PCC = 0,84), ce qui indique que la présence de nanoparticules magnétiques n'entrave pas l'interaction entre liposomes de charges opposées.

En revanche, dans le cas du mélange entre MFL et LUV zwitterioniques POPC/EggLissRhodPE (99/1 % mol), les images révèlent principalement des objets de petite taille (~100-500 nm) (*Figure 3.22 B*), émettant séparément en vert ou en rouge, sans chevauchement des signaux (*Figure 3.21 B*). Le coefficient de Pearson est alors de $0,24 \pm 0,05$, proche de zéro, ce qui témoigne d'une distribution spatiale indépendante des deux populations lipidiques, et donc d'une absence d'interaction spécifique.

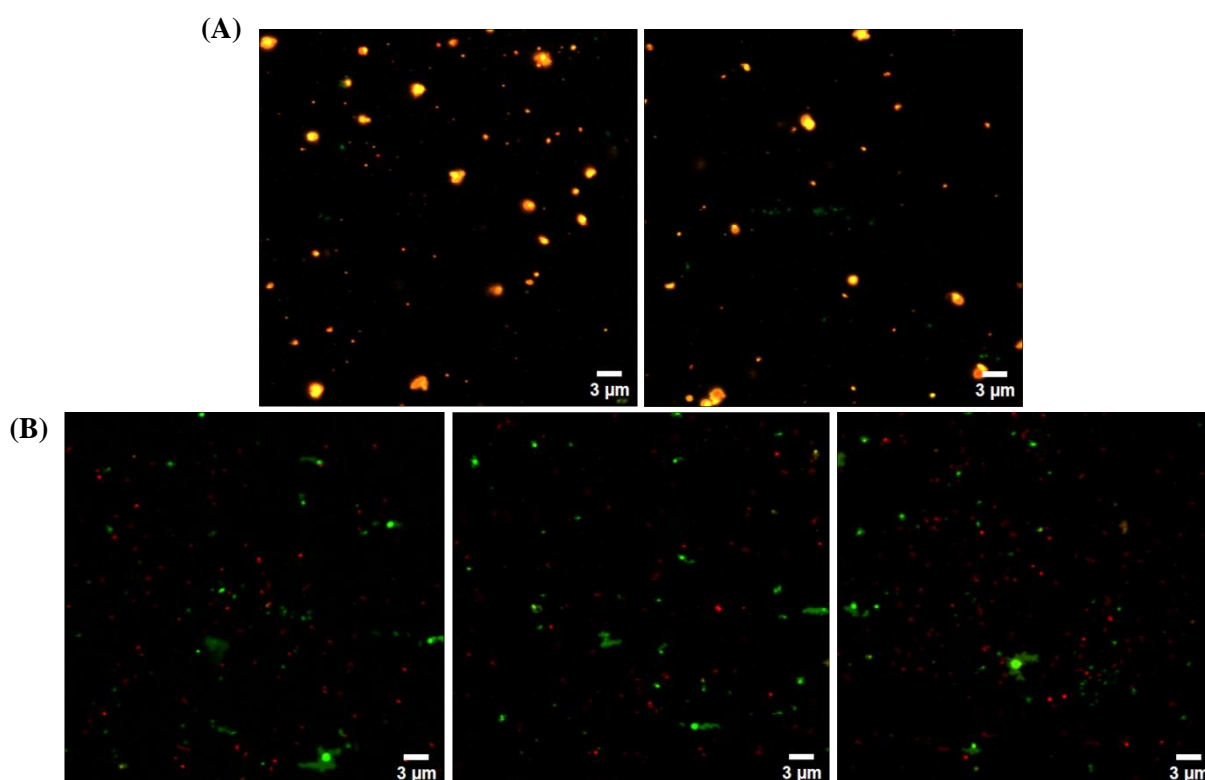


Figure 3.21 : Images de microscopie confocale de LUV cationiques DOTAP/DOPE/TopFluorPE/PEGPE (émission verte) après mélange équimolaire avec (A) des LUV anioniques POPC/POPG/EggLissRhodPE ou (B) des LUV zwitterioniques POPC/EggLissRhodPE.

L'analyse de la distribution des tailles (effectuée à partir de deux images par condition) montre, pour le mélange MFL/LUV anioniques, une population hétérogène avec une moyenne à 436 nm et une distribution étendue jusqu'à 3000 nm (**Figure 3.22 A**). Cette large répartition est cohérente avec la formation d'assemblages lipidiques de type agrégats ou structures fusionnées. À l'inverse, la distribution de taille pour le mélange MFL/LUV zwitterioniques est beaucoup plus étroite, centrée autour de 225 nm (**Figure 3.22 B**). Cette valeur moyenne de 225 nm reste légèrement supérieure à celle mesurée indépendamment pour les MFL seuls (180 nm), ce qui pourrait s'expliquer par des variations liées au lot de MFL utilisé dans cette expérience. Toutefois, une légère interaction non spécifique entre les MFL et les liposomes zwitterioniques ne peut être totalement exclue.

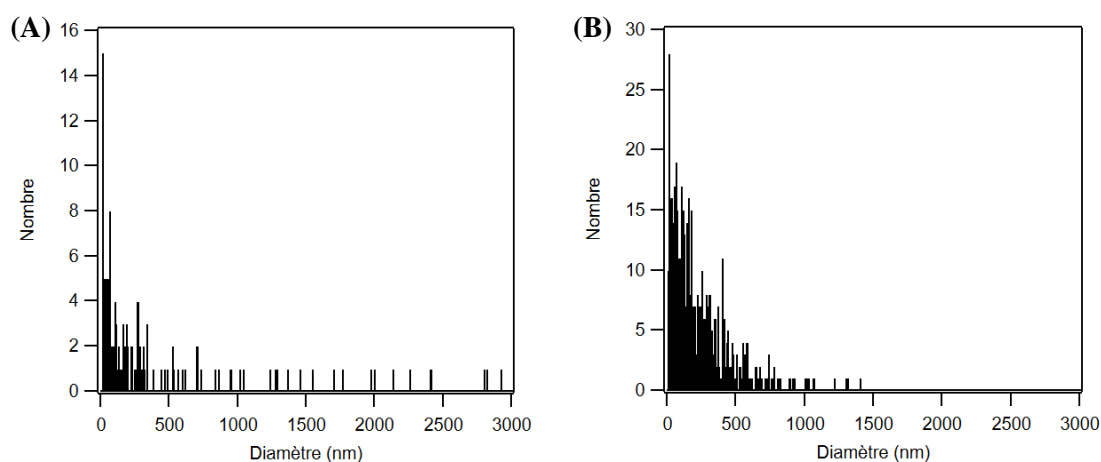


Figure 3.22 : Les histogrammes de distribution de taille correspondants ont été établis à partir de deux images pour chaque condition : (A) pour le mélange avec les LUV anioniques et (B) pour celui avec les LUV zwitterioniques.

En conclusion, ces observations par colocalisation confirment que les MFL conservent leur capacité à interagir efficacement avec des membranes anioniques, et que l'incorporation de nanoparticules magnétiques n'affecte pas l'interaction observée. Elles permettent également d'exclure toute interaction significative avec des membranes de nature zwitterionique, ce qui renforce la spécificité électrostatique du processus.

ii. Transfert de fluorescence des MFL avec les LUV accepteurs

L'expérience de FRET illustrée **Figure 3.23** repose sur le même principe que celle mise en œuvre avec les LUV cationiques sans NPM, mais cette fois appliquée aux MFL. En cas de fusion entre les MFL et les LUV accepteurs, les membranes contenant le fluorophore donneur TopFluorPE ($\lambda_{\text{ex}}= 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}= 503 \text{ nm}$) entrent en contact étroit avec celles des LUV accepteurs marqués avec le fluorophore rouge Egg Liss Rhod PE ($\lambda_{\text{ex}}= 560 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}= 583 \text{ nm}$). L'excitation du système à 488 nm, proche du maximum d'absorption du donneur, permet alors un transfert d'énergie de type FRET et la détection d'une émission à 590 nm.

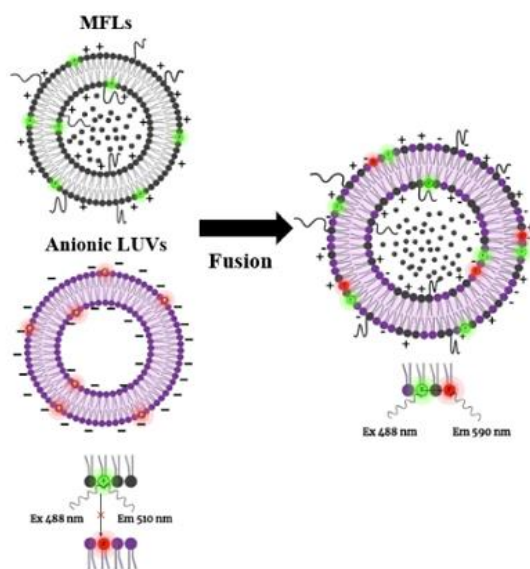


Figure 3.23 : Schéma de principe du FRET entre les MFL et les liposomes anioniques.

Les MFL ont d'abord été analysés seuls afin d'établir un profil d'intensité spectrale moyen ($n = 150$ vésicules), servant de référence pour les expériences de FRET. Les profils des LUV accepteurs, marqués avec l'Egg Liss Rhod PE et déjà caractérisés, ont été récupérés. Le spectre moyen des MFL présente un pic d'émission principal centré à 510 nm, correspondant au fluorophore donneur TopFluor PE, dont l'intensité est environ neuf fois supérieure à celle du second pic observé à 575 nm (*Figure 3.24 A et B, courbes vertes*). Ce second pic, bien que détectable, ne coïncide pas avec le maximum d'émission attendu du fluorophore rouge Egg Liss Rhod PE, situé à 590 nm. Par ailleurs, l'excitation à 488 nm induit une émission très faible de l'Egg Liss Rhod PE (*Figure 3.24 A et B, courbes rouges*), environ cinq fois plus faible que celle du TopFluor PE, ce qui confirme que le signal rouge observé dans les conditions témoins est négligeable.

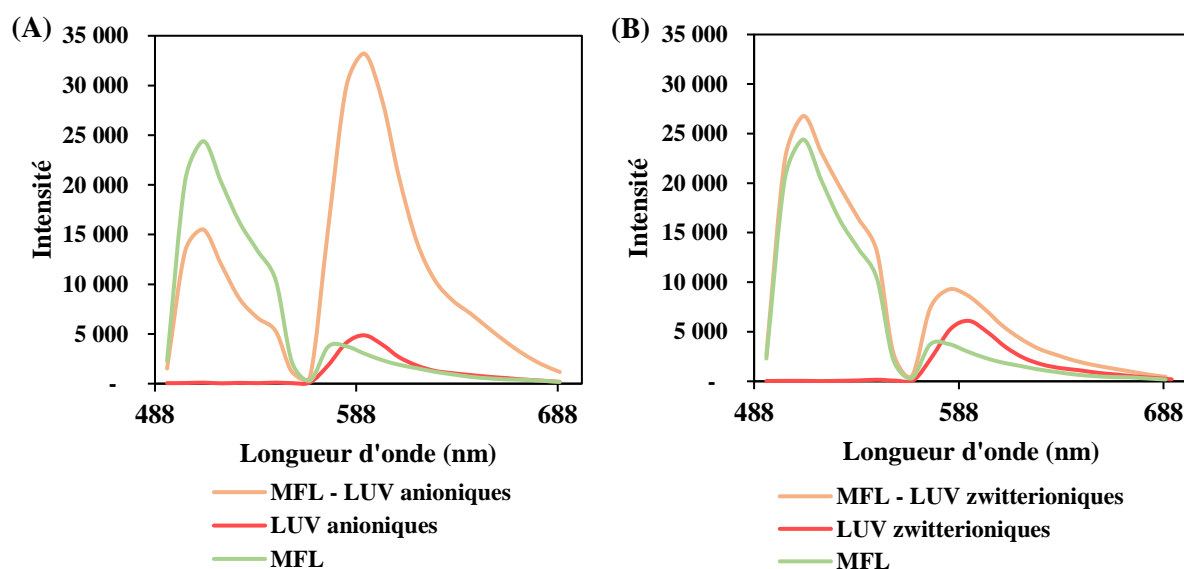


Figure 3.24 : (A) Profils d'intensité des MFL (vert), des LUV anioniques POPC/POPG/EggLissRhodPE (rouge) et du mélange MFL / LUV anioniques (orange). (B) Profils d'intensité des MFL (vert), des LUV zwitterioniques POPC/EggLissRhodPE (rouge) et du mélange MFL / LUV zwitterioniques (orange).

Les MFL ont ensuite été incubés avec les LUV accepteurs pendant 1 heure en proportion équimolaire. Les profils d'intensité spectrale moyenne ($n = 150$ vésicules) obtenus pour les mélanges MFL/LUV anioniques et MFL/LUV zwitterioniques ont été comparés à ceux des contrôles. Dans le cas des LUV anioniques, un transfert d'énergie de type FRET est clairement mis en évidence, puisque l'intensité du pic d'émission du TopFluor PE à 510 nm diminue d'un facteur 1,5 (*Figure 3.24 A, courbe orange*) par rapport aux MFL seuls (*Figure 3.24 A, courbe verte*), alors que le pic d'émission à 590 nm du Egg Liss Rhod PE augmente d'un facteur 6

(*Figure 3.24 A, courbe orange*) par rapport au contrôle LUV seuls (*Figure 3.24 A, courbe rouge*). Ces variations sont compatibles avec un rapprochement nanométrique des deux fluorophores, induit par un processus de fusion. Un phénomène similaire, bien que plus modéré, est observé dans le cas des LUV zwitterioniques. En effet, si l'intensité du pic du donneur à 510 nm reste inchangée (*Figure 3.24 B, courbe orange*), le signal de l'Egg Liss Rhod PE à 590 nm augmente tout de même d'un facteur 2,7 (*Figure 3.24 B, courbe orange*) par rapport au témoin POPC seul (*Figure 3.24 B, courbe rouge*). Cette augmentation pourrait refléter un faible transfert d'énergie non spécifique ou une proximité transitoire entre les membranes, sans fusion effective, en accord avec les faibles coefficients de colocalisation observés par imagerie.

L'efficacité du transfert d'énergie par FRET a été quantifiée et atteint une valeur de 0,76 lorsque les MFL sont incubés avec les LUV anioniques (*Figure 3.25, orange*). Ce résultat contraste nettement avec une efficacité plus faible, de 0,46, observée lors de l'incubation des LUV cationiques sans nanoparticules magnétiques, réalisée selon la même méthodologie. Fait intéressant, une efficacité de 0,35 est également mesurée lors de l'incubation des MFL avec les LUV zwitterioniques (*Figure 3.25, vert*), supérieure à celle observée avec les LUV cationiques sans NPM (0,15). Ces différences suggèrent que la présence des nanoparticules magnétiques dans les MFL favorise un rapprochement plus étroit et/ou plus fréquent des membranes lipidiques, même avec des LUV zwitterioniques, comme le montrent les travaux de Lira et *al.*¹⁷⁴ ou François-Martin et *al.*¹⁷⁵, bien que l'interaction soit plus marquée avec les LUV anioniques.

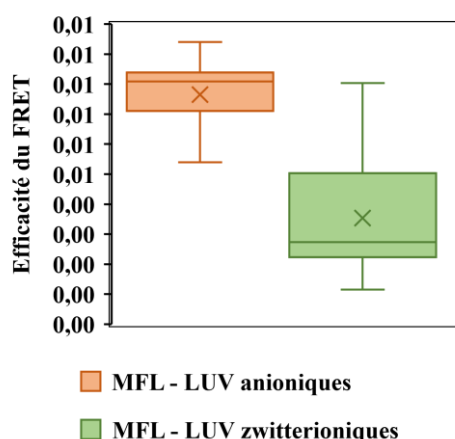


Figure 3.25 : Efficacité du FRET mesurée sur des mélanges de MFL avec des LUV anioniques (bleu) ou des LUV zwitterioniques (vert).

iii. Optimisation de la fusion entre MFL et LUV accepteurs

Afin d'identifier les paramètres influençant la fusion entre les MFL et les LUV accepteurs anioniques, l'effet du temps d'incubation et du ratio molaire a été évalué. Dans un premier temps, les MFL ont été incubés avec les LUV anioniques à concentration équimolaire, pendant 1 heure ou 17 heures.

Les profils d'intensité moyenne ($n = 150$ vésicules) révèlent un transfert de fluorescence significatif entre les deux populations, aussi bien après 1 heure (*Figure 3.26 A, bleu*) qu'après 17 heures d'incubation (*Figure 3.26 A, vert*). Les valeurs d'efficacité FRET correspondantes (*Figure 3.26 B*) sont par ailleurs similaires, indiquant que la fusion atteint un plateau dès la première heure. Ces résultats suggèrent que la fusion membranaire entre MFL et LUV anioniques est un phénomène rapide, en accord avec les observations rapportées dans la littérature^{172,176}, et qu'un temps d'incubation d'une heure est amplement suffisant pour obtenir une fusion optimale.

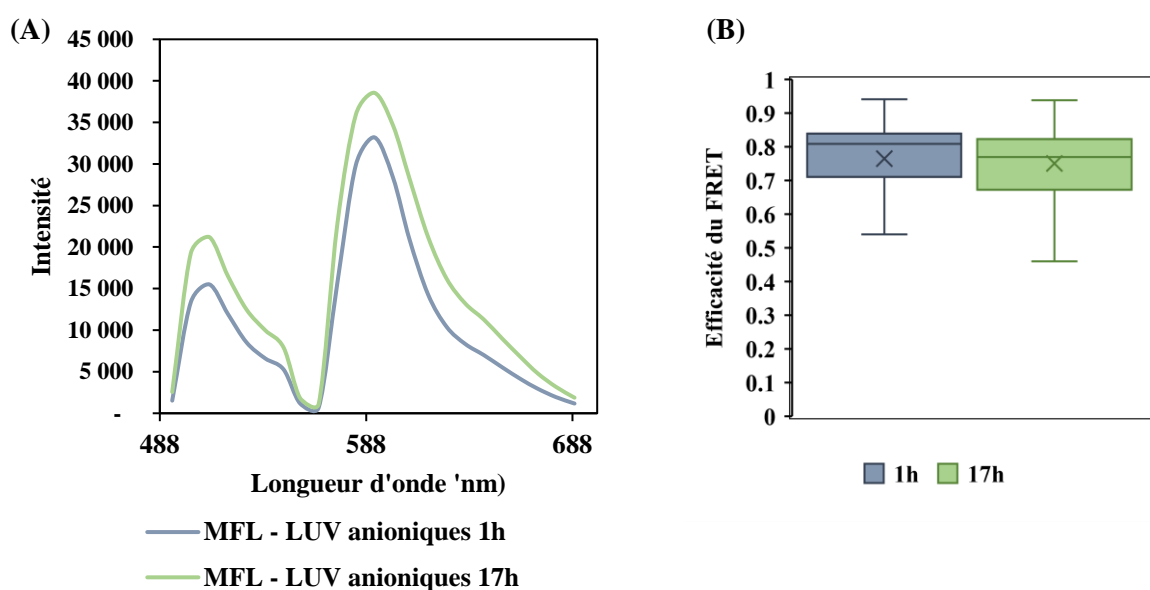


Figure 3.26 : (A) Profils d'intensité moyenne, et (B) efficacité du FRET du mélange MFL / (LUV anioniques) avec un temps d'incubation de 1 h (bleu) ou 17 h (vert).

L'effet de la variation du ratio MFL/LUV anioniques sur le phénomène de fusion a également été évalué en se basant sur le nombre de liposomes mesuré en NTA. Trois proportions de MFL/(LUV anioniques) ont été testées : 25/75, 50/50 et 75/25. L'analyse des profils d'intensité de fluorescence ($n = 150$ vésicules) montre que les conditions 50/50 et 75/25 présentent des signatures spectrales similaires (*Figure 3.27 A, vert et orange*), avec des

efficacités de transfert d'énergie quasi équivalentes, respectivement de 0,25 et 0,23 (**Figure 3.27 B, vert et orange**). En revanche, lorsque les LUV anioniques sont en excès (condition 25/75), un transfert d'énergie beaucoup plus important est observé, comme en témoignent la forte diminution du signal du donneur (TopFluorPE) et l'augmentation marquée de l'émission du fluorophore rouge (EggLissRhodPE), conduisant à une efficacité de FRET élevée de 0,70 (**Figure 3.27 A et B, bleu**). Ces résultats suggèrent que l'efficacité de fusion est fortement influencée par la proportion relative de chaque population, avec une fusion optimale lorsque les liposomes accepteurs sont en excès par rapport aux MFL. Cela indique qu'un excès de LUV anioniques est nécessaire pour saturer efficacement les sites de contact électrostatiques des MFL, très chargés positivement, et favoriser ainsi une interaction intermembranaire complète.

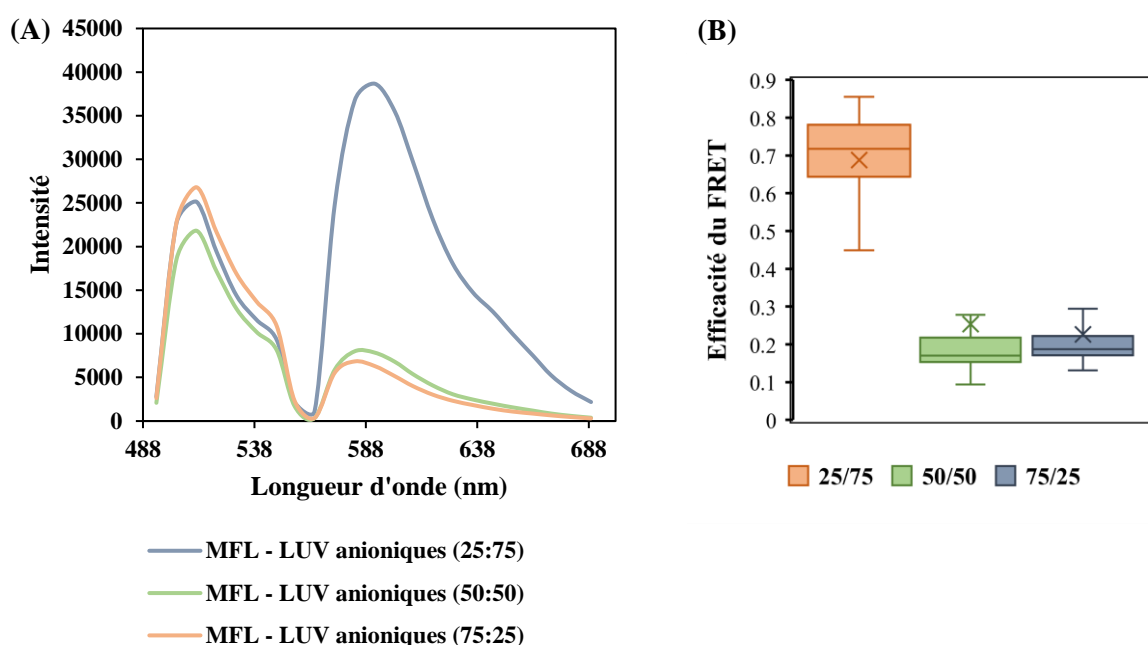


Figure 3.27 : (A) Profils d'intensité de fluorescence moyenne et (B) Efficacité du FRET du mélange MFL / UV anioniques avec un rapport de 25:75 (orange), 50:50 (vert) et 75:25 (bleu).

iv. Magnétophorèse

L'expérience de FRET a permis de démontrer la fusion lipidique entre les deux populations de liposomes : les MFL et les LUV anioniques. Conformément à la définition rigoureuse présentée au chapitre 1, le terme *fusion* ne sera utilisé que pour désigner une interaction entraînant le mélange du contenu des vésicules, ce qui n'a pas été démontré ici. Toutefois, la preuve d'un mélange des bicouches lipidiques implique une étape de fusion partielle, justifiant d'examiner le devenir des nanoparticules magnétiques initialement

Chapitre 3 : Étude de la fusion des liposomes fusogènes magnétiques sur système modèle

encapsulées dans les MFL. Afin d'évaluer si les liposomes résultant de cette interaction possèdent des propriétés magnétiques, une expérience de magnétophorèse a été réalisée. Un mélange équimolaire de MFL et de LUV anioniques a été déposé entre lame et lamelle, en présence d'un fil de nickel aimanté à l'aide d'un aimant permanent cylindrique (1 cm de longueur et 0,5 cm de diamètre). Ce dispositif permet de générer un gradient de champ magnétique dirigé vers l'extrémité du fil.

Un contrôle préalable a été effectué pour s'assurer de l'absence d'auto-fluorescence du fil de nickel, garantissant que tout signal observé provient exclusivement des liposomes. Après introduction du mélange de liposomes, une migration rapide des vésicules vers la pointe du fil aimanté a été observée : en moins de 60 secondes, une accumulation locale de liposomes est visible sous forme d'un halo fluorescent autour de la pointe du fil aimanté (**Figure 3.28**). En effet, l'analyse des signaux montre un halo vert (**Figure 3.28 A**), correspondant au fluorophore TopFluorPE initialement présent dans les MFL, et un halo rouge (**Figure 3.28 B**), lié à la présence d'EggLissRhodPE, marqueur des LUV anioniques. La superposition des deux signaux dans la région d'accumulation (**Figure 3.28 C**) indique une colocalisation significative des deux types de lipides. Après 5 minutes, l'intégralité du fil de nickel est recouverte d'une fluorescence orange homogène, résultant de la superposition des signaux verts et rouges.

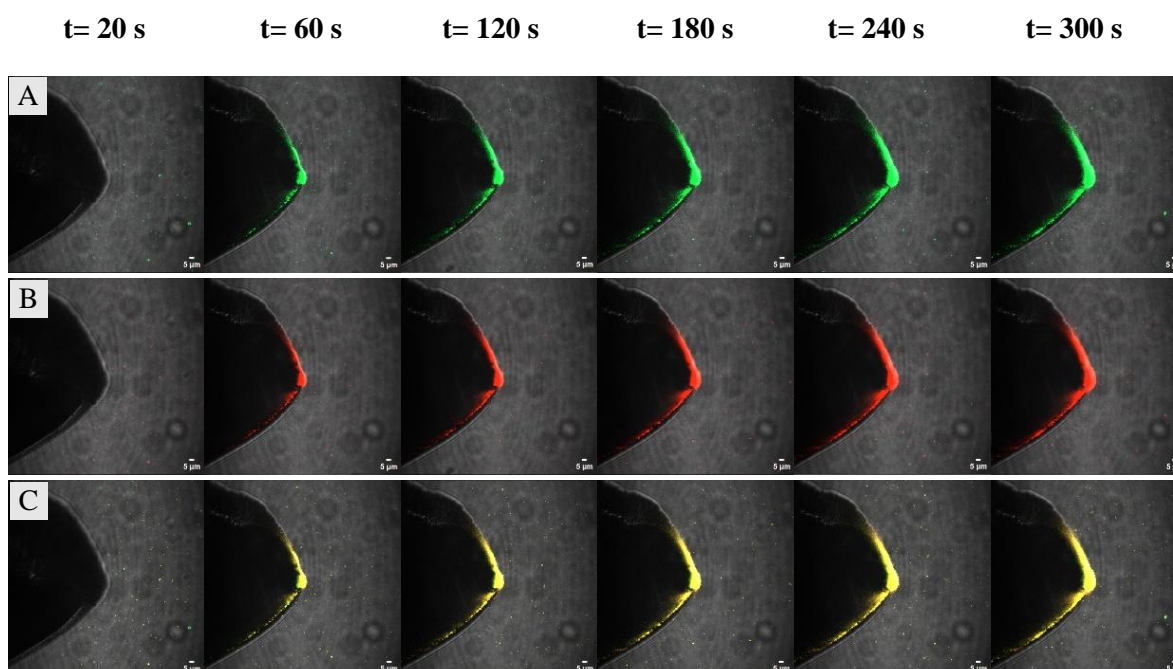


Figure 3.28 : Images de microscopie confocale capturées à différents temps illustrant l'attraction magnétique des liposomes issus de la fusion des MFL avec les LUV anioniques.

Ces résultats démontrent clairement que les liposomes anioniques, initialement dépourvus de propriétés magnétiques, acquièrent un caractère magnétique suite à leur interaction avec les MFL. L'expérience de magnétophorèse constitue ainsi une preuve du transfert des nanoparticules magnétiques via un mécanisme de fusion lipidique entre MFL et LUV anioniques.

4. Conclusion de l'étude de la fusion des MFL sur système modèle

L'ensemble des résultats obtenus démontre que la formulation lipidique choisie est particulièrement adaptée pour induire la fusion membranaire. Comme attendu, la présence de fluorophores facilite ce processus, conformément à la littérature, où leur rôle dans la déstabilisation de la membrane est établi.¹⁶⁰ En revanche, l'incorporation de lipides pégylés (PEG-PE), souvent décrits comme inhibiteurs de la fusion en raison de leur effet stérique¹⁷⁷⁻¹⁷⁹, ne présente ici aucun effet inhibiteur. Ce constat, encore peu documenté dans la littérature, qui s'intéresse principalement au PEG libre en solution^{180,181}, constitue un apport original de notre étude.

Par ailleurs, les résultats mettent en évidence le rôle clé de la composition lipidique dans le contrôle de la fusion membranaire. Cette étude valide à la fois la pertinence de la formulation développée et la robustesse des outils analytiques utilisés (DLS, ITC, microscopie confocale, FRET), qui constituent une plateforme fiable et complémentaire pour évaluer la survenue d'un processus de fusion.

Dans ce contexte, les différentes approches mises en œuvre ont permis de démontrer que les liposomes magnétiques fusogènes (MFL) fusionnent efficacement avec des LUV accepteurs, en particulier de nature anionique. Cette fusion conduit au transfert des propriétés magnétiques, confirmé par magnétophorèse. L'ensemble des données expérimentales souligne le rôle central des interactions électrostatiques dans l'initiation et la stabilisation de la fusion lipidique. Enfin, la présence des nanoparticules magnétiques n'entrave pas le processus de fusion, ce qui permet d'envisager l'utilisation des MFL comme outil pour délivrer des NPM à des cellules.

5. Matériel et méthodes

a. Matériel

Tous les phospholipides dissous dans le chloroforme ont été achetés auprès de Avanti Polar Lipids, Inc., incluant le 1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium-propane (chloride salt) (DOTAP), le 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), le 1-palmitoyl-2-(dipyrrométhène boron difluoride) undécanoyle – sn – glycéro – 3 - phosphoéthanolamine (TopFluorPE), le 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[méthoxy(polyéthylène glycol)-2000] (ammonium salt) (PEG(2000)-PE), 1-palmitoyl-2-oléoyl-glycero-3-phosphocholine (POPC), 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycérol) (sodium salt) (POPG), ainsi que le L- α -Phosphatidylethanolamine-N-(lissaminérodamine B sulfonyle) (ammonium salt) (Egg Liss Rhod PE). L'eau utilisée pour toutes les étapes de préparation était de qualité Milli-Q, produite à l'aide d'un système de purification Direct-Q® 5 UV, avec une résistivité de 18,2 M Ω ·cm à 25 °C, correspondant à une conductivité de 0,06 μ S/cm.

b. Préparation des LUV cationiques, anioniques et zwitterioniques

Les liposomes cationiques DOTAP/DOPE (50/50 mol%), DOTAP/DOPE/TopFluorPE (47,6/47,6/4,8 mol%), DOTAP/DOPE/PEGPE (47,6/47,6/4,8 mol%) et DOTAP/DOPE/TopFluorPE/PEGPE (45,5/45,5/4,5/4,5 mol%) ainsi que les liposomes anioniques POPC/POPG (50/50 mol%) et POPC/POPG/EggLissRhodPE (49,5/49,5/1 mol%) et les liposomes zwitterioniques POPC (100 mol%) et POPC/EggLissRhodPE (99/1 mol%) ont été préparés par la méthode classique d'hydratation en couche mince suivie d'une extrusion séquentielle.^{43,168} Les lipides, préalablement dissous dans du chloroforme, ont été utilisés à des concentrations de 25 mg/mL pour le DOTAP et le PEG PE, de 10 mg/mL pour le DOPE, le POPC et le POPG, et de 1 mg/mL pour le TopFluorPE et l'EggLissRhodPE. Les volumes correspondants à chaque composition lipidique ont été ajoutés dans un ballon à fond rond de 50 mL afin d'atteindre une quantité totale de 0,01 mmol de lipides, à l'exception des formulations POPC/POPG/EggLissRhodPE et POPC/EggLissRhodPE pour lesquelles cette quantité a été fixée à 0,001 mmol. Le solvant organique a été entièrement évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif BÜCHI R-210 sous une pression de 119 mbar à 30 °C pendant 30 minutes, jusqu'à obtention d'un film lipidique homogène. Celui-ci a été ensuite hydraté avec 1 mL d'eau Milli-Q sous agitation vigoureuse au vortex pendant 1 minute, produisant une suspension de vésicules multilamellaires (MLV) qui a ensuite été soumise à une extrusion mécanique à l'aide d'une mini-extrudeuse (Avanti Polar Lipids, Inc.) successivement à travers des filtres de

polycarbonate Whatman® Nuclepore™ Track-Etched de 0,4 μm et 0,2 μm , chaque étape étant répétée 11 fois pour garantir une distribution homogène de taille.

c. Caractérisation des LUV cationiques, anioniques, zwitterioniques

i. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Le diamètre hydrodynamique des LUV a été déterminé par diffusion dynamique de la lumière (DLS) à l'aide d'un instrument Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical) opérant à 25 °C. Les mesures ont été réalisées en triplicat dans une cellule capillaire DTS1070, à un angle de détection de 173° et avec un indice de réfraction fixé à 1,45 pour les dispersions lipidiques. Avant chaque mesure, les échantillons ont été dilués cent fois dans de l'eau ultrapure de type Milli-Q, afin d'obtenir un volume de 1 mL de dispersion, avec un pH maintenu entre 6,5 et 7,5. En parallèle, le potentiel zêta de ces dispersions a été évalué selon la même procédure expérimentale, toujours à l'aide du Zetasizer Ultra, en exploitant la technique de mesure de la mobilité électrophorétique des particules. Les analyses ont été conduites en triplicata à 25 °C dans une cellule DTS1070, avec un taux de comptage inférieur à 100 kcps et une conductivité de l'ordre de 40 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Le potentiel zêta a ensuite été calculé à partir de la vitesse de migration électrophorétique des liposomes, par application du modèle de Smoluchowski.

ii. Analyse de suivi de nanoparticules (NTA)

Les échantillons de liposomes ont été dilués dans de l'eau ultrapure jusqu'à atteindre une concentration approximative de 10^8 particules par millilitre puis introduits à l'aide d'une seringue de 600 μL dans un instrument Nanosight NS300 (Malvern Panalytical) équipé d'un système de suivi individuel des particules en mouvement brownien. Le comptage a permis de déterminer le nombre de particules par millilitre pour chaque dispersion analysée

iii. Microscopie confocale

Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal Zeiss LSM 980, en configuration verticale, équipé d'un objectif à immersion dans l'huile 63 \times (NA = 1,4) et d'un détecteur GaAsP multicanal (32 canaux). Une goutte de chaque préparation de LUV considérée a été déposée entre lame et lamelle. Les images ont été acquises avec une excitation laser à 488 nm pour les liposomes marqués au TopFluorPE et à 561 nm pour ceux contenant de l'Egg Liss Rhod PE. Le traitement des images a été réalisé à l'aide du logiciel ImageJ (version 1.53c, NIH). La détection et la mesure des liposomes ont été réalisées à l'aide d'un script personnalisé développé par Jean-François Giles (Institut de Biologie Paris-Seine, IBPS). Ce script applique

une soustraction de fond (rolling = 100), un filtrage médian (rayon = 1), un seuillage automatique selon la méthode de Li, puis une segmentation via la fonction “Find Maxima”, combinée à une transformation de Voronoï pour individualiser les agrégats. Les objets détectés ont été filtrés selon des critères morphologiques stricts : circularité $\geq 0,75$, aire comprise entre 0,00 et 10 μm^2 , et diamètre de Ferret maximal $\leq 10 \mu\text{m}$. Les mesures ont été extraites via le ROI Manager. Les données quantitatives de taille ainsi obtenues ont ensuite été exportées vers le logiciel Igor Pro (Wavemetrics) pour l’élaboration des histogrammes de distribution, permettant de comparer les différentes conditions expérimentales de manière statistiquement robuste.

d. Titrage des liposomes cationiques suivie par diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Le diamètre hydrodynamique et le potentiel zêta ont été mesurés en triplicat à 25 °C à l’aide d’un Zetasizer ULTRA (Malvern Panalytical) équipé d’une cellule DTS1070. Les mesures ont été réalisées pour chaque condition après chaque ajout de titrant dans la solution titrée. Pour les expériences de titrage, des injections successives de liposomes accepteurs (LUVs anioniques ou zwitterioniques) ont été effectuées toutes les 10 minutes dans une suspension de LUVs cationiques ou de MFL. Les liposomes accepteurs étaient soit des LUVs POPC/POPG (50 :50 mol %, anioniques), soit des LUVs POPC (100 mol %, zwitterioniques). Étant donné que la concentration lipidique des MFL (9,5 μM) était significativement plus faible que celle des LUVs cationiques (0,5 mM), les concentrations des suspensions de LUVs accepteurs ont été ajustées en conséquence. Pour les MFL, les LUVs accepteurs ont été préparés à une concentration lipidique finale de 1,2 mM. Pour les LUVs cationiques, la concentration lipidique des LUVs accepteurs a été portée à 7 mM. Des injections successives de 8,6 μL de LUVs accepteurs ont été réalisées au début et à la fin de chaque titrage, correspondant à un rapport molaire accepteur/fuso de 0,1. Toutefois, en cas d’inversion du potentiel zêta (changement de signe de la charge superficielle), le volume d’injection a pu être réduit à 4,3 μL , afin d’atteindre un rapport accepteur/fuso de 0,05, permettant une analyse plus fine des effets électrostatiques à seuil critique.

e. Titrage des liposomes cationiques suivie par calorimétrie

Les expériences de calorimétrie de titration isotherme ont été réalisées à l'aide d'un calorimètre NanoITC (TA Instruments) thermostaté à 25 °C. La cellule de référence était remplie avec 1 mL d'eau Milli-Q, tandis que la cellule d'échantillon contenait 950 μL de LUV cationiques ou de MFL. Les liposomes accepteurs, soit des LUVs POPC (100 mol %), soit des LUV POPC/POPG (50:50 mol %), ont été injectés à l'aide d'une seringue de 250 μL . La concentration lipidique a été ajustée en fonction du système étudié. Pour le titrage des LUVs cationiques vides (DOTAP/DOPE, DOTAP/DOPE/TopFluorPE), la concentration dans la cellule était de 0,5 mM, et celle des LUVs accepteurs de 4 mM. Pour les formulations plus complexes (DOTAP/DOPE/PEGPE et DOTAP/DOPE/TopFluorPE/PEGPE), la concentration lipidique des LUVs accepteurs a été réduite à 1 mM. Les MFL ont été titrés à des concentrations plus faibles : 0,12 mM pour les titrages avec POPC/POPG (1,2 mM), et 0,105 mM pour les titrages avec POPC (1,05 mM). Chaque titration comprenait 25 injections de 10 μL , espacées de 5 minutes, avec une agitation constante de 300 tr/min. Une première injection de 5 μL a systématiquement été réalisée pour compenser les imprécisions liées au jeu mécanique du piston ; les données de cette première injection ont été exclues de l'analyse. L'analyse des données thermodynamiques a été réalisée à l'aide du logiciel NanoAnalysis (TA Instruments), avec ajustement du fond et intégration des pics de chaleur pour l'obtention des paramètres de liaison (ΔH , ΔS , n).

f. Microscopie confocale des MFL avec les LUV accepteurs

i. Colocalisation

Les expériences de colocalisation ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal Zeiss LSM 980 monté en configuration verticale, équipé d'un objectif à immersion dans l'huile 63x (NA 1,4) et d'un détecteur GaAsp à 32 canaux. Les MFL marqués avec TopFluor PE ($\lambda_{\text{Ex}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 503 \text{ nm}$) ont été incubés avec les LUV accepteurs contenant Egg Liss Rhod PE ($\lambda_{\text{Ex}} = 560 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 583 \text{ nm}$) à des concentrations lipidiques équimolaires pendant 2 heures à température ambiante. Une goutte de la suspension a été déposée entre une lame et une lamelle. L'imagerie a été réalisée en mode acquisition séquentielle avec des excitations laser à 488 nm (TopFluor) et 561 nm (Rhodamine). L'analyse des images a été effectuée avec le logiciel ImageJ (version 1.53c, NIH). Le coefficient de colocalisation de Pearson (PCC) a été calculé à l'aide du plugin JaCoP (Just Another Colocalization Plugin). Les distributions de taille ont été obtenues à partir des images confocales analysées via un script personnalisé développé

par Jean-François Giles (IBPS), intégré dans ImageJ. Ce script permet une détection automatique des objets via : une soustraction du fond (rolling = 100), un filtrage médian (rayon = 1), un seuillage selon la méthode de Li et une segmentation par “Find Maxima” combinée à une partition de Voronoï. Les objets ont ensuite été filtrés selon des critères morphologiques (circularité $\geq 0,75$, aire $\leq 10 \mu\text{m}^2$, Ferret maximal $\leq 10 \mu\text{m}$). Les mesures ont été extraites via le ROI Manager. Les données de taille ainsi obtenues ont été exportées et traitées dans le logiciel Igor Pro pour générer les histogrammes de distribution de taille.

ii. *Transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET)*

Les expériences de FRET ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal Zeiss LSM 980 monté en configuration verticale, équipé d'un objectif 63x à immersion dans l'huile (NA 1,4) et d'un détecteur GaAsp à 32 canaux. Les images ont été acquises en mode détection spectrale sur une fenêtre de 490 à 700 nm, après excitation laser à 488 nm (excitation du donneur). Deux types de spectres ont été enregistrés comme références : l'émission du donneur seul correspondant aux MFL contenant TopFluor PE, excité à 488 nm, et l'émission du fluorophore rouge (Egg Liss Rhod PE), excité à 488 nm, afin de visualiser le signal de fond du fluorophore rouge. Ensuite, l'évolution conjointe des intensités d'émission du donneur et du fluorophore rouge après mélange des liposomes (excitation à 488 nm) a été suivie pour évaluer l'activation du FRET. Les MFL (ou les LUV cationiques vides DOTAP/DOPE/TopFluorPE/PEGPE) ont été incubés 1 heure à concentration équimolaire avec deux types de LUV accepteurs : zwitterioniques POPC/EggLissRhodPE (99/1 mol%), ou anioniques POPC/POPG/EggLissRhodPE (49,5/49,5/1 mol%). Les images ont été traitées avec le logiciel ImageJ pour extraire les profils de fluorescence d'intensité moyenne sur $N = 150$ vésicules par condition. L'efficacité du FRET a été calculée selon la formule suivante :

$$\text{Efficacité} = (\text{Aire du pic fluorophore rouge}) / (\text{Aire pic donneur} + \text{Aire pic fluorophore rouge})$$

Pour explorer l'effet du temps d'incubation, des mesures ont également été effectuées après 1 h ou 17 h d'incubation à concentration équimolaire. L'effet du rapport en nombre d'objet MFL : LUV accepteur a été évalué à l'aide de trois mélanges préparés selon les proportions 25:75, 50:50 et 75:25. Le traitement des images a été le même pour chaque paramètre testé.

iii. Magnétophorèse

Une cellule d'observation a été fabriquée en intercalant deux couches de parafilm entre une lame et une lamelle, formant ainsi une chambre. Un fil en métal de nickel a été inséré dans la cellule pour permettre l'application d'un champ magnétique localisé. Un aimant cylindrique (NdFeB, diamètre : 0,5 cm ; longueur : 1 cm) a été fixé à l'extrémité du fil, générant un gradient de champ magnétique au niveau de la zone d'observation. Un mélange à concentration équimolaire de liposomes fusogènes magnétiques et de LUV anioniques POPC/POPG (50/50 mol%) a été préparé une heure avant l'observation afin d'assurer une interaction stable entre les deux populations. La réponse magnétique du mélange a été suivie en temps réel à l'aide d'un système de vidéo-microscopie couplé à un microscope confocal vertical Zeiss LSM 980, équipé d'un objectif 63x à immersion dans l'huile (NA 1,4) et d'un détecteur GaAsp à 32 canaux. Les déplacements des liposomes sous l'effet du champ magnétique ont été enregistrés et analysés pour évaluer leur comportement sous gradient.

Chapitre 4 : Étude de la fusion des liposomes magnétiques fusogènes avec des cellules

Chapitre 4 : Étude de la fusion des liposomes magnétiques fusogènes avec des cellules

Dans le chapitre 3, nous avons démontré que les liposomes magnétiques cationiques fusionnent avec les liposomes anioniques, un système modèle simplifié de la cellule. À l'issue de la fusion, ces objets deviennent magnétiques. Cependant, nous n'avons aucune information concernant la localisation des NPM dans les liposomes après fusion. Ainsi, dans ce chapitre, l'objectif premier consistera à étudier la fusion des MFL avec des cellules et ensuite à essayer d'apporter une réponse à la question de la localisation des NPM après fusion.

Les cellules qui ont été utilisées au cours de cette étude sont des cellules ovariennes de hamster (CHO-K1) et des cellules humaines cancéreuses de neuroblastome (SH-SY5Y). Les CHO-K1 sont des cellules qui ont été très utilisées au laboratoire PHENIX dans le contexte de l'étude de l'échappement endosomal des NPM^{17,135}, ce qui en fait un point de comparaison intéressant. Les SH-SY5Y sont, quant à elles, des cellules tumorales, ce qui permettrait de comparer l'effet de la génération de chaleur induite par les NPM lors des expériences d'hyperthermie magnétique.

Cette étude se faisant en milieu cellulaire, les LUV cationiques sans NPM et les MFL, ont été préparés dans un tampon HEPES (Acide 4-(2-hydroxyéthyl) pipérazine-1-éthanesulfonique) dilué à 25 mM. Les MFL, obtenus dans l'HEPES, présentent une taille similaire à ceux préparés dans l'eau, mais leur potentiel zêta est inférieur (+20 mV). Les liposomes étant particulièrement sensibles aux variations de pH et d'osmolarité, l'utilisation d'un tampon physiologique (pH ~7,2–7,4) permet de maintenir un environnement stable, évitant ainsi les chocs osmotiques susceptibles d'altérer leur intégrité en milieu de culture cellulaire¹⁸³

L'interaction des MFL avec les cellules sera suivie par microscopie confocale, pour différentes concentrations lipidiques. Des tests de viabilité cellulaire permettront de déterminer si ces concentrations sont toxiques pour les cellules, étant donné que les lipides cationiques sont réputés pour être des lipides toxiques.¹⁸⁴ La microscopie électronique sur les cellules apportera des renseignements sur le devenir des NPM après fusion lipidique et les expériences d'hyperthermie magnétique renseigneront sur leur capacité à tuer les cellules grâce à un échauffement local médié par les NPM libérées dans le cytosol.

La question s'est posée de savoir s'il était préférable d'utiliser la concentration lipidique ou la concentration en fer des MFL pour interpréter les résultats obtenus par les différentes techniques d'analyse. C'est finalement la concentration lipidique et non la concentration en fer qui a été choisie car d'une part, ce sont les lipides qui fusionnent avec la cellule et d'autre part, car ce sont aussi eux qui peuvent être responsables de la toxicité, notamment les lipides cationiques.¹⁸⁴ Par ailleurs, d'autres liposomes ont été utilisés à titre de comparaison : des LUV cationiques ayant la même formulation lipidique que les MFL mais sans NPM et des liposomes magnétiques non fusogènes (LUM). Les trois systèmes ont été comparés sur la base de leurs concentrations lipidiques.

Les concentrations lipidiques ont été mesurées par la méthode Rouser, la valeur moyenne mesurée sur 14 lots de MFL est de $0,70 \pm 0,16$ mM. Toutefois, cette méthode ne peut être utilisée pour chaque lot, car elle nécessite une quantité importante de MFL, au point de consommer presque intégralement l'échantillon, ce qui est incompatible avec les besoins des expériences cellulaires. Par conséquent, les concentrations lipidiques en MFL utilisées pour les expériences cellulaires ont été estimées à partir du volume de culot obtenu après la séparation magnétique. En supposant que ce culot conserve la concentration lipidique initiale, fixée à 3 mM, on peut alors estimer la concentration finale après dilution dans le tampon HEPES. Par exemple, si l'on récupère un culot de 50 μ L à 3 mM et qu'on le dilue dans 250 μ L de tampon, la concentration lipidique estimée est alors de 0,6 mM. Les valeurs des concentrations lipidiques estimées sont en bon accord avec les valeurs mesurées par le dosage Rouser.

1. Stabilité des MFL dans le milieu de culture DMEM/F12

Les cellules CHO-K1 et SH-SY5Y sont cultivées dans un milieu de culture DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium with F12 nutriments) supplémenté avec 10 % de HI FBS (Heat-Inactivated Fetal Bovine Serum) et 1% de Pen/Strep (Pénicilline/Streptomycine). La stabilité des MFL dans ce milieu supplémenté et non supplémenté a donc été déterminée. Pour ce faire, l'évolution du diamètre hydrodynamique des MFL dans le milieu non-supplémenté ou supplémenté a été mesurée toutes les 30 min par DLS sur une durée de 16 h.

Les diamètres hydrodynamiques des MFL, dans le milieu non supplémenté, montrent qu'un unique pic est obtenu pour chaque mesure et que ces pics sont globalement centrés sur 350 nm (*Figure 4.1 A*). En revanche, les profils d'intensité des diamètres hydrodynamiques des MFL dans le milieu supplémenté montrent trois pics globalement constants au cours du temps avec le premier pic vers 8 nm, le second pic vers 40 nm et le dernier pic vers 370 nm (*Figure 4.1 B*). La présence de trois pics étant probablement induite par l'ajout des molécules HI FBS et Pénicilline/Streptomycine dans le milieu de culture DMEM/F12, avec pour le troisième pic vers 350-370 nm, une superposition de la taille des MFL et de certaines molécules présentes dans le milieu supplémenté, ce qui expliquerait l'élargissement du pic.

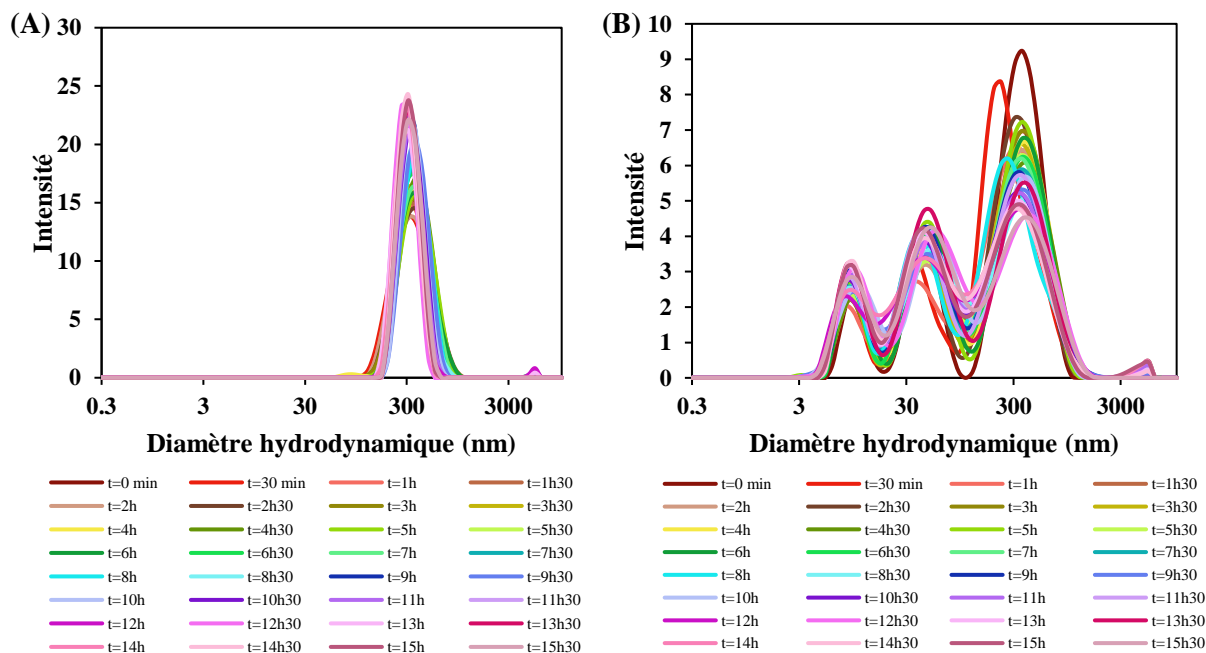


Figure 4.1 : Diamètres hydrodynamiques des MFL mesurés toutes les 30 min pendant 15h30, soit (A) dans le milieu DMEM/F12 non supplémenté, soit (B) dans le milieu DMEM/F12 supplémenté.

Dans le cadre du suivi de la stabilité colloïdale des MFL, la *Figure 4.2* présente l'évolution du diamètre hydrodynamique associé au pic situé entre 350 et 370 nm, mesuré dans deux milieux de culture (supplémenté ou non) au cours du temps. Les graphiques correspondant aux MFL dans le milieu non supplémenté (*Figure 4.2A*) et supplémenté (*Figure 4.2B*) montrent une évolution globalement constante du diamètre hydrodynamique. Toutefois, dans le milieu non supplémenté, ce diamètre oscille légèrement entre 300 et 400 nm, tandis que dans le milieu supplémenté, les oscillations sont plus marquées et irrégulières, s'étendant de 310 à 470 nm. Malgré cela, les barres d'incertitude, représentant l'écart-type sur trois mesures, indiquent que les variations ne sont pas statistiquement significatives, suggérant que les MFL restent globalement stables dans les deux milieux. Les fluctuations plus prononcées observées dans le milieu supplémenté peuvent s'expliquer par la présence de trois pics distincts dans la distribution de tailles. Seul le pic centré autour de 300 nm, correspondant aux MFL, a été pris en compte pour l'analyse. Toutefois, la présence simultanée d'autres populations dans le milieu oblige le logiciel à effectuer une décomposition complexe des signaux, ce qui peut réduire la précision des diamètres hydrodynamiques attribués aux MFL. Ainsi, les variations observées pourraient refléter les limites de l'analyse logicielle.

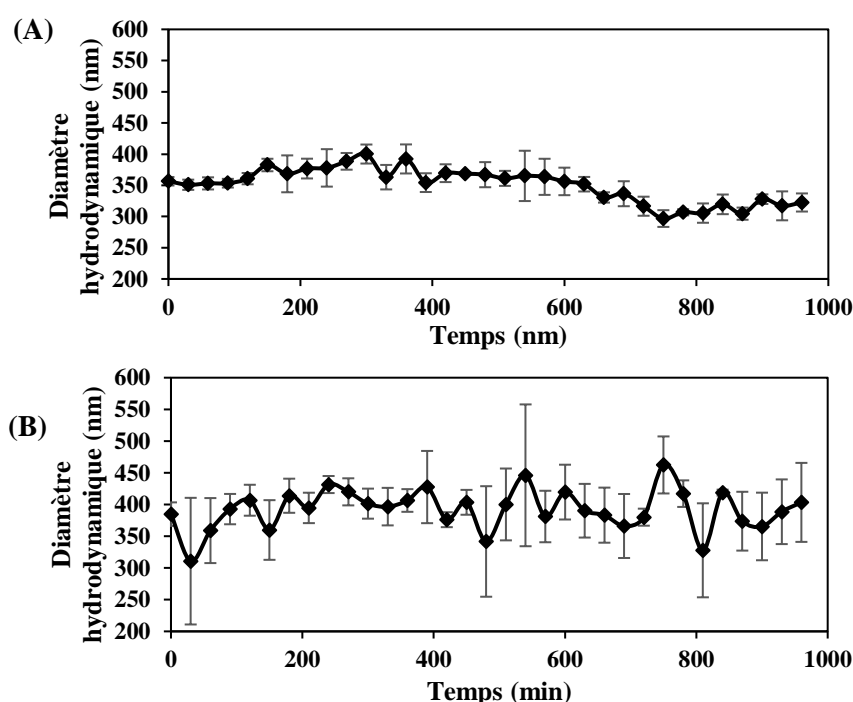


Figure 4.2 : Évolution du diamètre hydrodynamique des MFL centré sur le pic vers 350-370 nm, au cours du temps (16 h) (A) dans le milieu DMEM/F12 non supplémenté et (B) dans le milieu DMEM/F12 supplémenté.

2. Étude de la fusion entre les MFL et les cellules par microscopie confocale

La microscopie confocale à fluorescence a été utilisée pour évaluer la fusion membranaire entre les liposomes fusogènes magnétiques et les cellules. Cette approche repose sur l'utilisation de lipides fluorescents (TopFluor PE), initialement intégrés à la bicouche lipidique des MFL. En l'absence de fluorescence native dans la membrane plasmique cellulaire, la détection d'un signal fluorescent au niveau de cette membrane peut apporter la preuve d'une fusion entre les MFL et les cellules. Plusieurs paramètres expérimentaux ont été testés afin d'identifier les conditions optimales de fusion : le délai avant observation, l'état cellulaire (cellules vivantes vs fixées), la durée d'incubation, la concentration lipidique des MFL, la température d'incubation, la nature des liposomes (MFL, liposomes fusogènes non magnétiques, LUM) ainsi que le type cellulaire utilisé.

a. Mise au point des conditions d'observation des cellules

i. Choix du délai avant observation

L'objectif de cette expérience est de déterminer le moment optimal pour l'observation des cellules après leur incubation avec les MFL. En effet, il était envisagé qu'un délai de 24 heures de repos post-incubation puisse favoriser la récupération cellulaire, notamment en raison du stress potentiel induit par les étapes de lavage. Cette période de repos permettrait aux cellules de restaurer leur intégrité avant l'analyse, une pratique couramment adoptée au laboratoire dans le cadre des observations en microscopie. Ainsi, les cellules CHO-K1 vivantes ont été incubées avec les MFL à une concentration lipidique estimée à 0,25 mM pendant 30 min. À la fin de l'incubation, les cellules ont été rincées. Puis, les noyaux ont été préalablement marqués en bleu à l'aide du Hoechst, et les cellules ont été observées soit une heure, soit 24 heures après le traitement.

Les résultats montrent que les cellules non traitées, observées soit une heure, soit 24 heures après incubation, présentent uniquement un marquage nucléaire bleu, confirmant l'absence de fluorescence au niveau de la membrane plasmique (*Figure 4.3 A et B, CHO-K1*). En revanche, chez les cellules traitées avec les MFL, l'observation réalisée une heure après l'incubation révèle une fluorescence verte localisée sous forme de spots périnucléaires, ainsi qu'un marquage net de la membrane plasmique (*Figure 4.3 A, CHO-K1 MFL*). Après 24 heures, ce marquage membranaire disparaît, au profit d'une fluorescence intracellulaire plus diffuse, accompagnée de spots verts à fluorescence intense (*Figure 4.3 B, CHO-K1 MFL*). Les spots correspondent probablement aux MFL piégés dans les endosomes, ce qui expliquerait leur

signal fluorescent très intense et focalisé. La fluorescence observée au niveau de la membrane plasmique résulte soit d'une adsorption des MFL à la surface cellulaire, soit d'une fusion partielle avec la membrane.

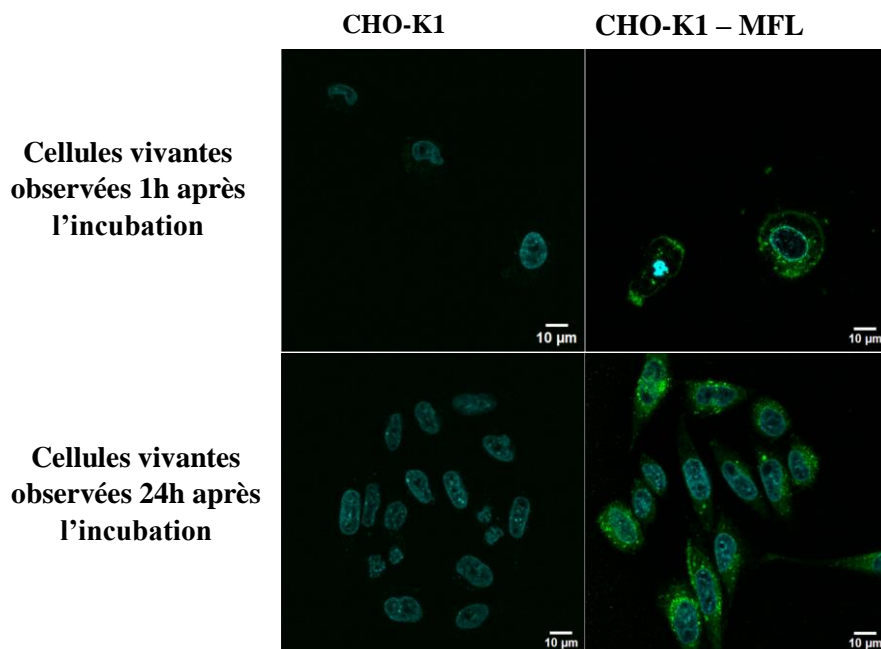


Figure 4.3 : Images de microscopie confocale à fluorescence des cellules CHO-K1 non traitées (CHO-K1) ou traitées avec les MFL (0,25 mM) pendant 30 min à 37 °C (CHO-K1/MFL). Les cellules ont été observées 1 h ou 24 h après l'incubation. Noyaux des cellules en bleu (Hoechst dye 33342).

Ces observations suggèrent que la fluorescence membranaire est transitoire. À plus long terme, sa disparition pourrait être due à un processus d'endocytose des MFL ou à un renouvellement de la membrane plasmique. Il n'est toutefois pas possible de distinguer ces deux mécanismes sur la seule base des observations réalisées, car chacun peut conduire à une intensification du signal fluorescent endosomal, soit par accumulation des objets fluorescents dans les endosomes, soit par marquage des membranes endosomales. Par ailleurs, la fluorescence verte diffuse observée dans le cytoplasme après 24 heures suggère une possible libération intracellulaire des fluorophores, ou des lipides associés, à la suite de la dégradation des MFL dans les lysosomes. Ainsi, l'ensemble des résultats indique que le délai d'observation post-incubation joue un rôle déterminant dans la localisation du marquage fluorescent. Donc pour préserver la fluorescence membranaire, il serait intéressant de figer l'état cellulaire à un moment donné, la fixation immédiate des cellules après incubation apparaît comme la stratégie la plus appropriée.

ii. Observations sur cellules fixées

D'après les résultats précédents, la solution envisageable serait de fixer les cellules. Cependant, afin de vérifier si la fixation cellulaire influence l'observation de la fluorescence de la membrane plasmique, les cellules CHO-K1 ont été incubées avec des MFL à une concentration lipidique estimée à 0,25 mM pendant 30 minutes à 37 °C. À l'issue de cette incubation, les noyaux ont été colorés au Hoechst, puis les cellules ont été immédiatement fixées avant d'être observées en microscopie confocale. Cette condition correspond approximativement à une observation effectuée une heure après l'incubation comme c'était le cas pour les cellules vivantes, à la différence près que la fixation permet d'immobiliser l'état de fluorescence au moment de l'observation.

Chez les cellules non traitées, seuls les noyaux apparaissent en bleu, sans signal fluorescent détecté ni au niveau de la membrane plasmique ni dans les compartiments intracellulaires (**Figure 4.4, CHO-K1**). En revanche, dans les cellules fixées ayant été incubées avec les MFL, un marquage fluorescent au niveau de la membrane plasmique est observé, pouvant résulter soit d'une fusion partielle des bicouches lipidiques des MFL avec la membrane cellulaire, soit d'une simple adsorption des MFL à la surface de la cellule (**Figure 4.4, CHO-K1-MFL**). On observe aussi des signaux verts sous forme de spots intracellulaires, correspondant vraisemblablement à des MFL localisés dans les endosomes, ainsi que des agrégats verts sur la surface de culture, en dehors des cellules.

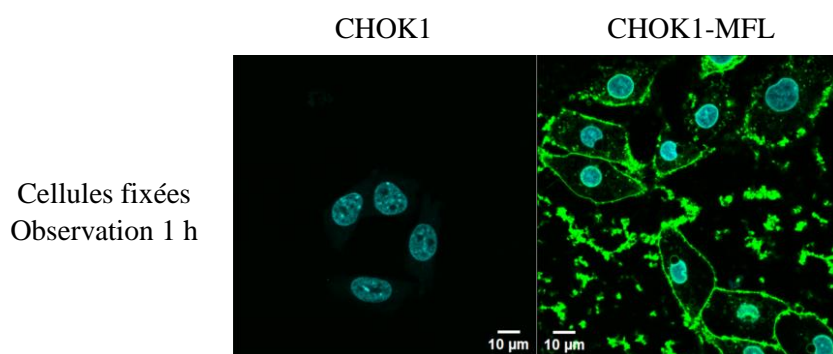


Figure 4.4 : Images de microscopie confocale de cellules non traitées (CHO-K1) ou traitées avec des MFL (CHO-K1-MFL) à une concentration lipidique estimée de 0,25 mM pendant 30 min à 37 °C. Les cellules ont été fixées après incubation. Noyaux des cellules en bleu (Hoechst dye 33342).

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus sur cellules vivantes observées une heure après incubation, ce qui suggère que la fixation cellulaire n'altère pas l'observation de la fluorescence. Elle permet au contraire de figer l'état de marquage au moment de l'analyse, offrant ainsi une image stable et représentative du phénomène étudié. Par conséquent, toutes les expériences présentées dans la suite de ce travail seront réalisées sur des cellules fixées.

De plus, la fixation des cellules sera bénéfique car une série d'expériences à venir prévoit de bloquer les processus d'endocytose, qui sont fortement dépendants de la température, en réalisant les incubations à 4 °C. Cependant, comme les observations avec le microscope utilisé ne peuvent être effectuées qu'à température ambiante, une possible réactivation des mécanismes d'endocytose compromettant l'interprétation des résultats pourrait être dommageable. Ainsi, compte tenu de ces contraintes et des résultats précédemment obtenus, le choix de fixer les cellules au paraformaldéhyde (PFA) avant l'observation est le plus adéquat. Cette fixation permet de préserver l'état des cellules tel qu'il était à la fin de l'incubation à 4 °C, tout en évitant une reprise de l'activité cellulaire susceptible de modifier la distribution des MFL.

iii. Choix du temps d'incubation des MFL avec les cellules CHO-K1

Dans l'expérience précédente, des cellules CHO-K1 ont été incubées à 37 °C avec des MFL à une concentration lipidique estimée à 0,25 mM pendant 30 minutes. Cette condition a permis d'observer un marquage net des membranes cellulaires, visible par une fluorescence verte délimitant clairement les contours des cellules (**Figure 4.4, CHO-K1-MFL**). Ces résultats suggèrent qu'un temps d'incubation de 30 minutes est suffisant pour permettre une interaction efficace des MFL avec la membrane plasmique des cellules CHO-K1. Ce constat fait écho aux résultats de FRET présentés au chapitre 3, qui ont montré que la fusion entre les MFL et des liposomes anioniques est un processus rapide, d'une durée inférieure à une heure. Sur cette base, cette durée d'incubation a été retenue pour l'ensemble des expériences présentées par la suite.

b. Fusion des cellules CHO-K1 avec les MFL

i. Influence de la température et de la concentration lipidique

Les expériences précédentes ont permis de déterminer les paramètres expérimentaux à utiliser pour observer les cellules au microscope, c'est-à-dire d'incuber les cellules pendant 30 minutes et de fixer les cellules directement après l'incubation afin de figer la fluorescence. Ces conditions adoptées, les cellules ont été incubées avec les MFL en faisant varier la concentration lipidique en MFL (0,01 à 0,25 mM) et la température d'incubation (37 °C ou 4 °C). La variation des concentrations lipidiques a pour objectif de déterminer la condition optimale pour un transfert lipidique efficace entre les MFL et la membrane cellulaire. L'objectif d'abaisser la température d'incubation à 4 °C est de bloquer le processus d'endocytose.

Par conséquent, les cellules ont été incubées avec les MFL pendant 30 min, à 37 °C et à 4 °C, avec les concentrations lipidiques estimées suivantes : 0,01 ; 0,03 ; 0,05 ; 0,07 ; 0,1 ; 0,15 et 0,25 mM. À la fin de l'incubation, les cellules ont été lavées, puis les noyaux ont été colorés avec du Hoechst et les cellules ont été fixées avant d'être observées au microscope confocal. Les contrôles négatifs réalisés sur les cellules CHO-K1 incubées à 37 °C et à 4 °C, en l'absence de MFL, montrent uniquement le marquage nucléaire en bleu, sans aucun signal fluorescent au niveau de la membrane plasmique, confirmant l'absence de fluorescence de fond.

Concernant la variation de la température d'incubation, les résultats (*Figure 4.5, 37 °C*) montrent à 37 °C une fluorescence verte au niveau de la membrane plasmique correspondant aux MFL adsorbés ou fusionnés par la membrane plasmique. De nombreux spots verts intracellulaires sont également observés, correspondant vraisemblablement aux MFL internalisés et localisés dans des compartiments intracellulaires tels que les endosomes ou les lysosomes. En revanche, ces spots intracellulaires disparaissent totalement à 4 °C (*Figure 4.5, 4 °C*), ce qui confirme qu'ils sont issus de l'endocytose et que ce processus est bloqué à basse température. La fluorescence au niveau de la membrane plasmique est, quant à elle, toujours visible à 4 °C, indiquant que l'interaction lipidique entre les MFL et la membrane cellulaire reste possible à cette température.

Concernant la variation de la concentration lipidique en MFL, les résultats montrent une fluorescence verte de plus en plus marquée au niveau de la membrane plasmique (à 37 °C et 4 °C), ainsi qu'au niveau des compartiments intracellulaires (à 37 °C uniquement). À 4 °C, où seule la fluorescence membranaire est observée, on note une évolution progressive de l'intensité

Chapitre 4 : Étude de la fusion des liposomes magnétiques fusogènes avec des cellules

et de la définition du marquage en fonction de la concentration en MFL. À 0,01 mM, la fluorescence est détectée de manière diffuse au niveau de la membrane cellulaire, suggérant un début d'interaction (*Figure 4.5, CHO-K1-MFL 0,01 mM*) ; à 0,03 mM, le contour de la membrane commence à se dessiner, bien que de façon encore granuleuse (*Figure 4.6, CHO-K1-MFL 0,03 mM*) ; à 0,05 mM, une délimitation plus nette apparaît, bien qu'elle conserve encore un aspect granuleux (*Figure 4.5, CHO-K1-MFL 0,05 mM*) ; à 0,07 mM, la membrane est visualisée sous forme d'un contour fluorescent continu (*Figure 4.5, CHO-K1-MFL 0,07 mM*) ; et à 0,1 mM et 0,25 mM (*Figure 4.5, CHO-K1-MFL 0,1 mM et 0,25 mM*), le profil est similaire à celui obtenu à 0,07 mM, mais avec une intensité de fluorescence plus élevée. Cette tendance est également observée à 37 °C, à laquelle s'ajoute une intensification des signaux intracellulaires (spots), traduisant probablement une internalisation plus importante des MFL. Globalement, plus la concentration lipidique des MFL est élevée, plus l'intensité de la fluorescence augmente, à la fois au niveau de la membrane plasmique et des compartiments intracellulaires.

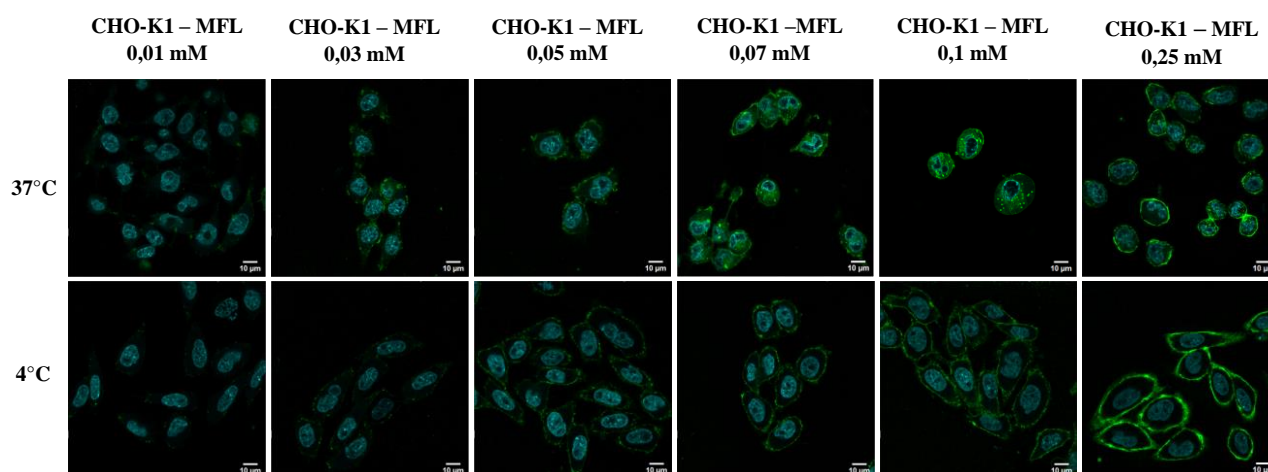


Figure 4.5 : Images de microscopie confocale à fluorescence des cellules CHO-K1 ou des cellules CHO-K1 incubées à 37 °C (1^{ère} ligne) ou à 4 °C (2^{ème} ligne) avec les MFL aux concentrations lipidiques estimées suivantes : 0,01 mM, 0,03 mM, 0,05 mM, 0,07 mM, 0,1 mM, et 0,25 mM. Noyaux des cellules en bleu (Hoechst dye 33342).

Le marquage fluorescent des membranes plasmiques à 37 °C devient clairement visible à partir de 0,03 mM. À 0,01 mM, bien qu'une fluorescence soit perceptible à l'oculaire du microscope, la sensibilité de la caméra ne permet pas de la visualiser sur les images enregistrées. Par ailleurs, à cette faible concentration (0,01 mM), les cellules conservent une morphologie allongée comparable à celle des cellules non traitées. En revanche, dès 0,03 mM, les cellules

apparaissent plus arrondies, ce qui pourrait refléter un début de toxicité des MFL. Ces observations devront toutefois être confirmées par des tests de viabilité cellulaire pour valider l'hypothèse d'un effet toxique lié à une concentration lipidique trop élevée. Le fin liseré fluorescent, bien défini, qui entoure les cellules suggère fortement une incorporation des lipides des MFL au sein de la membrane plasmique, plutôt qu'une simple adsorption en surface. Ce mode de distribution est cohérent avec de nombreuses études ayant démontré un transfert lipidique par fusion membranaire.^{105,160,161,172} Toutefois, la présence ponctuelle de zones de fluorescence plus intense à la périphérie cellulaire pourrait refléter des MFL résiduels, non fusionnés, encore en interaction transitoire avec la membrane.

Par ailleurs, en comparant les morphologies cellulaires à 37 °C et à 4 °C, on observe que les cellules maintenues à 4 °C présentent une forme plus étalée et régulière, proche de leur aspect natif. À l'inverse, à 37 °C, les cellules semblent davantage rétractées et arrondies, suggérant un stress cellulaire ou une perturbation de l'organisation membranaire induite par l'interaction avec les MFL. Ces observations suggèrent que les cellules tolèrent mieux les MFL à 4 °C, malgré l'inhibition des processus biologiques actifs à cette température. Une explication possible vient du fait qu'en l'absence d'endocytose, les lipides cationiques cytotoxiques contenus dans les MFL ne pénètrent pas dans la cellule, ce qui limite leur impact nocif.

ii. Comparaison avec d'autres formulations liposomales

Dans cette expérience, l'objectif était de comparer l'interaction des cellules CHO-K1 avec des MFL, à celle observée avec deux types de liposomes : des LUV cationiques fusogènes non magnétiques (DOTAP/DOPE/TopFluorPE/PEGPE), marqués par un fluorophore vert inséré dans leur bicouche lipidique, et des liposomes ultramagnétiques non fusogènes (LUM), marqués par un fluorophore rouge. Les cellules CHO-K1 ont été incubées à 37 °C pendant 30 minutes avec les MFL, ou l'un ou l'autre de ces liposomes à une concentration lipidique de 0,25 mM, déterminée par la méthode Rouser de dosage des lipides. À l'issue de l'incubation, les noyaux ont été colorés au Hoechst, puis les cellules ont été fixées et observées en microscopie confocale.

L'image des cellules non traitées (**Figure 4.6, CHO-K1**), utilisée comme contrôle négatif, montre uniquement le signal bleu des noyaux. Aucune fluorescence membranaire n'est détectée, confirmant l'absence de marquage de fond. En revanche, les cellules incubées avec les liposomes cationiques fusogènes présentent une forte fluorescence verte localisée au niveau de la membrane plasmique (**Figure 4.6, CHO-K1 – LUV**). Ce marquage suggère une interaction

avec la membrane, similaire à celle observée précédemment avec les MFL (*Figure 4.6, CHO-K1 – MFL*). Cependant, bien que la concentration lipidique et les conditions d'incubation soient identiques, les cellules semblent davantage impactées par les MFL : elles présentent une morphologie plus rétractée et arrondie (*Figure 4.5, CHO-K1 – MFL 0,25 mM, 37 °C*), comparées aux cellules traitées avec les liposomes cationiques sans nanoparticules magnétiques (*Figure 4.6, CHO-K1 – LUV*). Cette différence de morphologie pourrait traduire une toxicité accrue des MFL par rapport aux liposomes cationiques classiques.

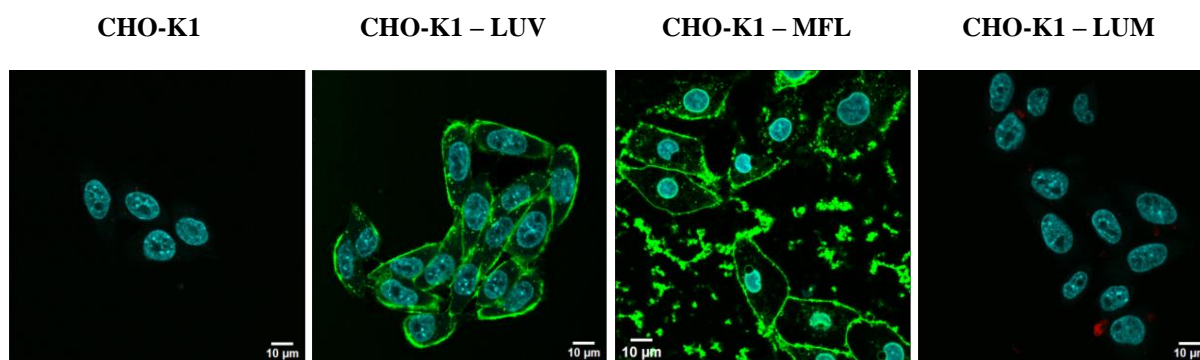


Figure 4.6 : Images de microscopie confocale des cellules CHO-K1 non traitées (CHO-K1) ou traitées à 37 °C avec des LUV cationiques (CHO-K1 – LUV) ou des liposomes ultramagnétiques non fusogènes (LUM) (CHO-K1 – LUM) à une concentration lipidique de 0,25 mM pendant 30 min. Noyaux des cellules en bleu (Hoechst dye 33342).

À l'inverse, les cellules incubées avec les LUM (*Figure 4.7, CHO-K1 – LUM*) ne présentent quasiment aucun signal fluorescent, à l'exception de quelques rares spots rouges ponctuels, qui correspondent probablement à leur localisation dans des compartiments intracellulaires, tels que des endosomes. Ces résultats sont cohérents puisque ces liposomes, non fusogènes, ne sont pas censés s'intégrer à la membrane plasmique et sont normalement internalisés par endocytose.¹⁸⁵ Leur comportement en fait un bon contrôle négatif pour évaluer la capacité de fusion membranaire. En effet, dans le cas d'une composition lipidique « classique » (DPPC/DSPC/DSPE-PEG/Rho) aucun transfert de fluorescence à la membrane plasmique n'est observé. Néanmoins, on aurait pu s'attendre à observer un plus grand nombre de LUM endocytés, puisque dans les travaux de Béalle et *al.*¹⁸⁵, le nombre de spots rouges correspondant aux LUM internalisés dans les endosomes est plus conséquent, or ce sont les mêmes synthèses. La seule différence est que dans cet article, les observations sont effectuées 1 heure après incubation, il est donc plus facile de localiser les LUM dans les lysosomes qui sont plus gros.

c. Fusion des cellules SH-SY5Y avec les MFL

Un autre type cellulaire, les cellules SH-SY5Y (lignée de neuroblastome humain), a été étudié afin de comparer leur interaction avec les MFL, sur la base des résultats obtenus avec les cellules CHO-K1. Les cellules SH-SY5Y ont été incubées à 37 °C pendant 30 minutes avec des MFL à des concentrations lipidiques de 0,05, 0,15 et 0,25 mM. Ces valeurs ont été choisies en fonction des résultats obtenus avec les CHO-K1, en sélectionnant les concentrations à partir desquelles une fluorescence membranaire nette avait été observée. À l'issue de l'incubation, les cellules ont été lavées, les noyaux marqués au Hoechst, puis les cellules ont été fixées et observées en microscopie confocale.

Comme attendu, l'image des cellules non traitées (*Figure 4.7, SH-SY5Y*) révèle uniquement le signal nucléaire bleu du Hoechst, sans fluorescence au niveau de la membrane plasmique, confirmant l'absence de signal de fond. À 0,05 mM (*Figure 4.7, SH-SY5Y – MFL 0,05 mM*), quelques spots verts sont visibles dans le cytoplasme, accompagnés d'un marquage partiel de la membrane plasmique, indiquant un début d'interaction entre les MFL et les cellules SH-SY5Y. Lorsque la concentration en MFL est augmentée à 0,15 mM (*Figure 4.7, SH-SY5Y – MFL 0,15 mM*) puis à 0,25 mM (*Figure 4.7, SH-SY5Y – MFL 0,25 mM*), la fluorescence membranaire devient plus intense et homogène, suggérant une intégration lipidique plus marquée.

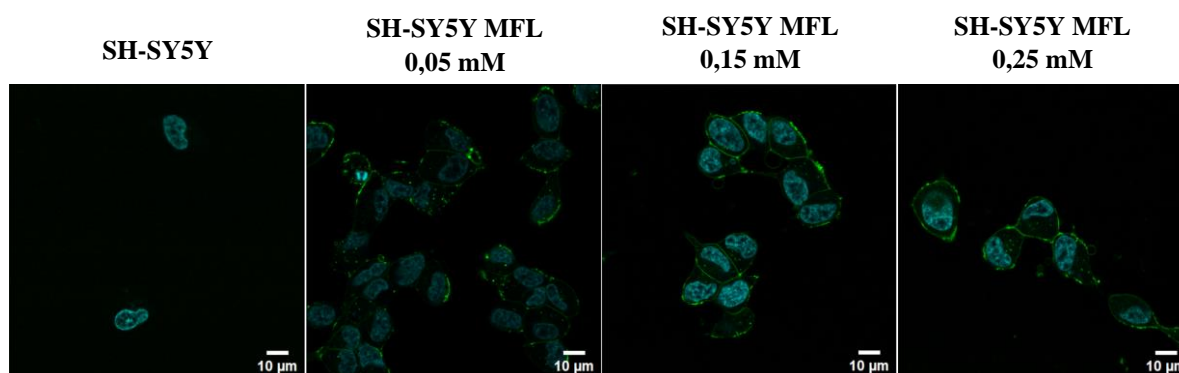


Figure 4.7 : Images de microscopie à fluorescence des cellules SH-SY5Y non traitées (SH-SY5Y) ou traitées à 37 °C avec les MFL aux concentrations lipidiques estimées suivantes 0,05 mM (SH-SY5Y MFL 0,05 mM), 0,15 mM (SH-SY5Y MFL 0,15 mM), 0,25 mM (SH-SY5Y MFL 0,25 mM). Noyaux des cellules en bleu (Hoechst dye 33342).

Ces observations, comparables à celles effectuées avec les cellules CHO-K1, confirment la capacité des MFL à fusionner efficacement avec la membrane plasmique de cellules d'origine différente. Bien que seules deux lignées cellulaires aient été testées, ces résultats suggèrent que le potentiel de fusion membranaire des MFL ne serait pas strictement spécifique à un type cellulaire particulier.

d. Conclusion sur les études de fusion par microscopie confocale

L'ensemble des observations réalisées en microscopie confocale à fluorescence a permis de démontrer que les MFL fusionnent avec les membranes plasmiques des cellules CHO-K1 et SH-SY5Y. Les résultats montrent qu'une augmentation de la concentration lipidique des MFL entraîne une intensification du signal fluorescent au niveau de la membrane plasmique, ainsi que l'apparition de spots intracellulaires compatibles avec une internalisation par endocytose (probablement dans des compartiments de type endosomes ou lysosomes). L'incubation à 4 °C, qui inhibe le processus d'endocytose, a permis de confirmer que l'interaction des MFL avec la membrane plasmique reste possible même à basse température. Par ailleurs, cela confirme également qu'une partie des MFL est internalisée par endocytose lorsque ce processus n'est pas bloqué.

Malgré ces observations prometteuses, certaines limites doivent être soulignées. Un effet cytotoxique a été observé ; les cellules incubées à 37 °C présentent rapidement des altérations morphologiques (forme arrondie, rétractée) pouvant refléter une toxicité liée aux MFL ou un stress membranaire induit par leur interaction. Enfin, si le marquage fluorescent fin et net observé au niveau de la membrane suggère un phénomène de fusion lipidique, d'autres mécanismes tels que l'adsorption ou l'agrégation des MFL à la surface cellulaire ne peuvent être totalement exclus. Des approches complémentaires, telles que des expériences de FRET ou des analyses de colocalisation membranaire, seraient nécessaires pour confirmer la nature exacte de ces interactions.

3. Mesure de la toxicité des MFL

Les observations en microscopie confocale ont montré que les cellules CHO-K1 incubées à 37 °C avec les MFL présentent rapidement des altérations morphologiques, telles qu'un aspect arrondi et rétracté. Afin d'évaluer l'impact de ces interactions sur la viabilité cellulaire, un test Alamar Blue a été réalisé à différentes concentrations lipidiques et pour plusieurs temps d'incubation. Le test Alamar Blue repose sur la réduction d'un colorant, la resurine, composé bleu et non fluorescent, en résorufine, de couleur rose et fluorescente, par les enzymes des cellules vivantes et métaboliquement actives. Ainsi, seules les cellules viables sont capables de convertir la résazurine, générant un signal fluorescent mesurable. À l'inverse, les cellules mortes ou inactives ne réduisent pas le colorant, ce qui se traduit par un signal faible ou inexistant.¹⁸⁶

Les cellules CHO-K1 ont été incubées avec des concentrations de MFL comprises entre 0,01 mM et 0,1 mM, pendant 30 minutes, 1 heure, 6 heures et 24 heures. Pour chaque condition, un contrôle positif (cellules CHO-K1 non traitées, considérées comme saines) et un contrôle négatif (cellules CHO-K1 lysées, considérées comme mortes) ont été réalisés en triplicat. Les résultats résumés dans le *Tableau 4.1* montrent que, pour chaque temps d'incubation, les valeurs de fluorescence des cellules non traitées sont comparables entre elles, de même que celles des cellules lysées. Par ailleurs, la fluorescence mesurée pour les cellules mortes est équivalente à celle du milieu de culture sans cellules, confirmant qu'il s'agit de l'intensité basale non induite par les cellules. Ces observations valident la fiabilité du test Alamar Blue pour détecter une perte complète d'activité métabolique et confirment l'intégrité des cellules non traitées ainsi que la mort effective des cellules lysées utilisées comme contrôle négatif.

Temps d'incubation	30 min	1 h	6 h	24 h
Fluorescence des cellules saines	$3,4 \times 10^{+7} \pm 1,3 \times 10^{+6}$	$3,4 \times 10^{+7} \pm 3,3 \times 10^{+6}$	$3,6 \times 10^{+7} \pm 2,9 \times 10^{+6}$	$4,1 \times 10^{+7} \pm 4,8 \times 10^{+6}$
Fluorescence des cellules mortes	$5,4 \times 10^{+6} \pm 5,6 \times 10^{+4}$	$5,2 \times 10^{+6} \pm 1,2 \times 10^{+5}$	$5,2 \times 10^{+6} \pm 3,7 \times 10^{+4}$	$5,0 \times 10^{+6} \pm 1,1 \times 10^{+5}$
Fluorescence du milieu de culture	$5,35 \times 10^{+6} \pm 2,4 \times 10^{+5}$			

Tableau 4.1 : Intensités de fluorescence des cellules saines et mortes pour les temps d'incubation de 30 min, 1 h, 6 h et 24 h après ajout d'Alamar Blue, ainsi que du milieu de culture.

Les résultats du test de viabilité cellulaire montrent que, pour une concentration lipidique en MFL de 0,01 mM, la viabilité des cellules CHO-K1 reste élevée, indiquant une absence de cytotoxicité significative : 82 % à 30 minutes, 93 % à 1 heure, 92 % à 6 heures et 81 % à 24 heures (**Figure 4.8, CHO-K1 MFL 0,01 mM**). Ces valeurs, proches de celles du contrôle sain, suggèrent que cette concentration est bien tolérée, même après une exposition prolongée. En revanche, à partir de 0,03 mM, une diminution progressive de la viabilité est observée : 60 % à 30 minutes, 77 % à 1 heure, 57 % à 6 heures, puis une chute importante à 25 % à 24 heures (**Figure 4.8, CHO-K1 MFL 0,03 mM**). Cette évolution traduit une cytotoxicité modérée à marquée, dépendante du temps d'exposition. L'effet toxique devient particulièrement prononcé à partir de 0,05 mM, avec des taux de viabilité réduits à 45 % à 30 minutes, 63 % à 1 heure, 34 % à 6 heures, et seulement 6 % à 24 heures (**Figure 4.8, CHO-K1 MFL 0,05 mM**). À 0,07 mM et 0,1 mM, la cytotoxicité est comparable à celle observée à 0,05 mM : 59 %, 57 %, 41 % et 10 % pour 0,07 mM ; et 46 %, 47 %, 33 % et 4 % pour 0,1 mM, respectivement à 30 min, 1 h, 6 h et 24 h (**Figure 4.8, CHO-K1 MFL 0,07 mM et 0,1 mM**).

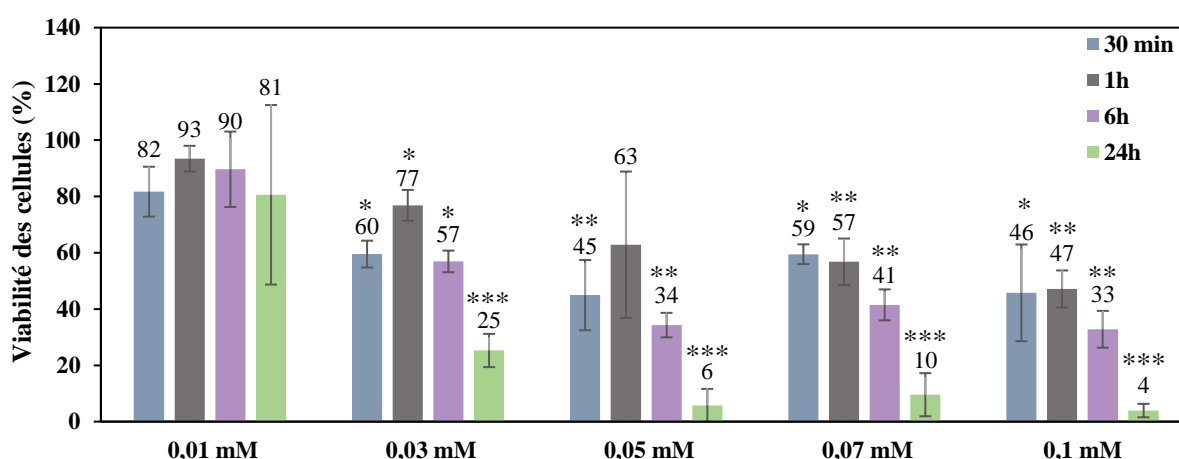


Figure 4.8 : Test de viabilité par la méthode Alamar Blue des cellules CHO-K1 incubées avec les MFL à différentes concentrations lipidiques estimées (0,01 mM, 0,03 mM, 0,05 mM, 0,07 mM, 0,1 mM) et à des temps d'incubation différents (30 min, 1 h, 6 h, 24 h). Analyse statistique réalisée à l'aide du test de Student (* : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$).

Il est important de souligner que les lots de MFL utilisés pour les tests à 0,05 mM, 0,07 mM et 0,1 mM ne provenaient pas d'un même lot de synthèse. Les concentrations lipidiques ayant été estimées indépendamment pour chaque lot, de légères erreurs de quantification peuvent expliquer la similarité des effets cytotoxiques observés entre ces concentrations, alors qu'une toxicité croissante aurait été attendue.

Chapitre 4 : Étude de la fusion des liposomes magnétiques fusogènes avec des cellules

Globalement, ces résultats mettent en évidence une toxicité des MFL dépendante à la fois de la dose et du temps d'exposition. La concentration de 0,01 mM ne présente aucun effet délétère, même après 24 heures. À partir de 0,03 mM, une mortalité cellulaire notable est observée, en particulier au-delà de 6 heures. Pour des concentrations $\geq 0,05$ mM, une mortalité cellulaire importante est induite, y compris pour les plus courts temps d'incubation. Ces données corroborent les observations obtenues par microscopie confocale, qui montraient dès 0,03 mM un changement morphologique des cellules, traduisant un stress ou un effet cytotoxique précoce.

4. Etude de la fusion des MFL avec des cellules par microscopie électronique à transmission

À la suite des observations en microscopie confocale ayant mis en évidence la fusion des MFL avec les membranes cellulaires, une question essentielle reste en suspens : que deviennent les nanoparticules magnétiques ? Demeurent-elles à la surface cellulaire, sont-elles insérées dans la membrane plasmique ou bien internalisées dans le cytosol ? Grâce à leur contraste électronique, les NPM peuvent être localisées très précisément dans la cellule par MET.

Afin de répondre à ces interrogations, une analyse structurale des cellules a été menée pour localiser les NPM après incubation. Les cellules ont été fixées, incluses dans une résine puis découpées en sections ultrafines et déposées ensuite sur des grilles en cuivre. Les coupes ont été contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb avant l'observation au microscope électronique à transmission. La préparation des coupes cellulaires et les observations ont été réalisées par Mickael Trichet sur la plateforme de microscopie électronique de l'Institut de Biologie Paris Seine (IBPS) de Sorbonne Université.

Plusieurs conditions expérimentales ont été réalisées dans l'idée de comparer des liposomes fusogènes magnétiques avec des liposomes non fusogènes magnétiques et avec des nanoparticules magnétiques. Compte tenu des résultats de microscopie confocale montrant, à 4 °C, un marquage fluorescent vert localisé à la membrane plasmique, les incubations cellulaires ont été réalisées à cette température. Le but étant de bloquer les mécanismes d'endocytose, afin de limiter au maximum l'accès au cytosol des nanoparticules magnétiques. Cette condition expérimentale permet ainsi de privilégier l'observation d'éventuels événements de fusion directe entre la membrane des liposomes et celle des cellules, tout en réduisant les artefacts liés à l'endocytose.

a. Observation des cellules incubées avec des MFL, des LUM et des NPM

Les cellules CHO-K1 ont été incubées à 4 °C pendant 30 minutes avec trois formulations distinctes : des liposomes fusogènes magnétiques (MFL), des liposomes ultramagnétiques non fusogènes (LUM), ou des nanoparticules de maghémite citratée (NPM). Les MFL et LUM ont été utilisés à une concentration lipidique de 0,15 mM, correspondant respectivement à des concentrations en fer de 0,4 mM pour les MFL et 48,6 mM pour les LUM. Les NPM ont été ajoutées à une concentration en fer équivalente à celle des MFL, soit 0,4 mM. Bien que cette

concentration lipidique de 0,15 mM ait montré une certaine cytotoxicité à 37 °C dans les tests de viabilité, elle a été choisie ici en raison du signal fluorescent intense observé en microscopie confocale, suggérant un nombre élevé d'événements d'interaction et potentiellement une internalisation accrue des nanoparticules dans le cytosol. Par ailleurs, d'après les résultats de microscopie confocale à 4 °C, les MFL ne semblent pas induire les mêmes effets cytotoxiques qu'à 37 °C, ce qui rend cette condition expérimentale pertinente pour évaluer spécifiquement les phénomènes d'interaction membrane-liposome sans interférence majeure liée à la viabilité cellulaire.

Les images obtenues par microscopie électronique en transmission des cellules CHO-K1 non traitées révèlent, en vue large, la présence du noyau et du cytoplasme, sans aucune trace de nanoparticules magnétiques (*Figure 4.9 A, gauche*). Un agrandissement permet d'observer les différents organites cellulaires (*Figure 4.9 A, milieu et droite*). En revanche, les images TEM des cellules incubées avec les MFL montrent, en vue large, de nombreux objets fortement contrastés localisés autour des cellules, au niveau de la membrane plasmique (*Figure 4.9 B, gauche*). À plus fort grossissement, ces structures sont identifiables comme étant des MFL ou des NPM. Des NPM sont également observées à l'intérieur du cytoplasme (*Figure 4.9 B, milieu*). Un zoom sur ces particules cytoplasmiques révèle l'absence de membrane les entourant (*Figure 4.9 B, droite*), ce qui suggère que certaines NPM ont été directement libérées dans le cytosol suite à une fusion des MFL avec la membrane plasmique. Cette observation contraste nettement avec les cellules non traitées, qui ne présentent aucune NPM, et met en évidence la capacité des MFL à s'associer à la membrane plasmique et à transférer en partie de leur contenu directement dans le cytoplasme.

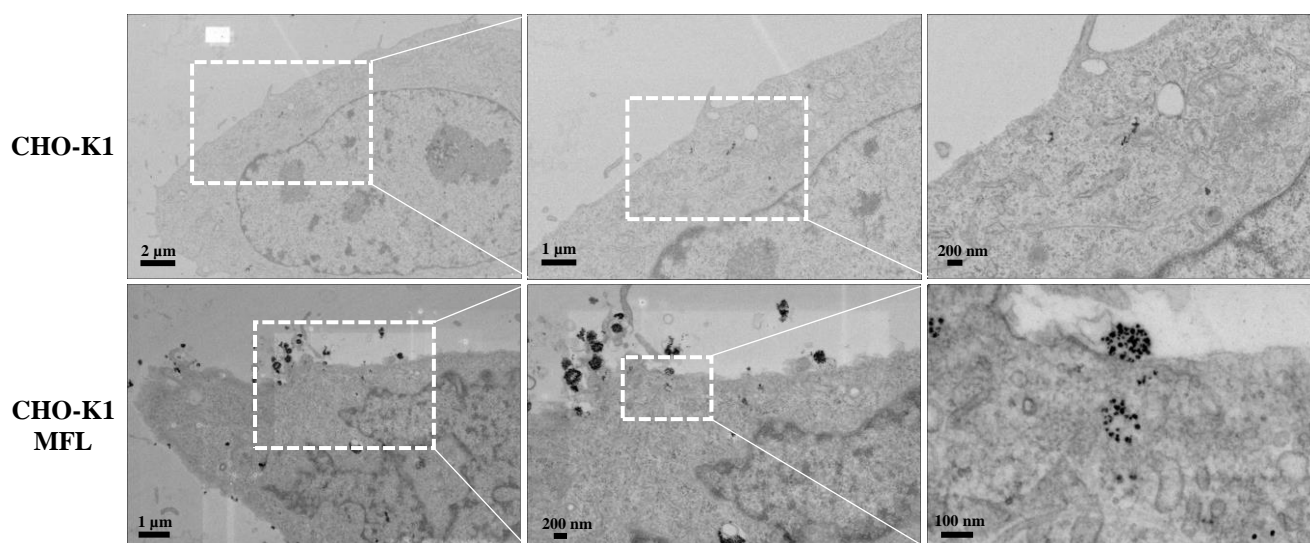


Figure 4.9 : Images TEM (A) de cellules CHO-K1 non traitées, ou incubées avec (B) des MFL.

Concernant les cellules incubées avec les LUM ou avec les NPM libres, les vues larges ne montrent pas de présence notable de NPM à proximité ou à la surface des cellules (*Figure 4.10 A et B, gauche*). Les zooms intermédiaires ne révèlent pas non plus de NPM associées à la membrane plasmique (*Figure 4.10 A et B, milieu*), ce qui contraste clairement avec la condition MFL (*Figure 4.9 B, milieu*). Toutefois, des NPM sont observées dans le cytoplasme, mais à la différence de la condition MFL, elles sont toutes localisées à l'intérieur d'endosomes (*Figure 4.10 A et B, droite*), indiquant une entrée par endocytose. Le nombre d'endosomes contenant des NPM reste néanmoins faible, ce qui est cohérent avec les conditions expérimentales à 4 °C, température à laquelle l'endocytose est largement inhibée. L'observation des quelques endosomes peut s'expliquer par les limitations pratiques à maintenir rigoureusement la température à 4 °C tout au long de la manipulation des cellules (incubation, lavages, etc.), ce qui peut laisser place à une endocytose résiduelle. Fait intéressant, toutes les NPM observées dans les cellules après incubation avec les LUM sont dans des endosomes (*Figure 4.10 A, droite*). Ces résultats confirment que ni les LUM, incapables de fusionner directement avec la membrane plasmique, ni les NPM libres, incapables de traverser la membrane plasmique par simple diffusion, ne permettent une libération directe des NPM dans le cytosol.

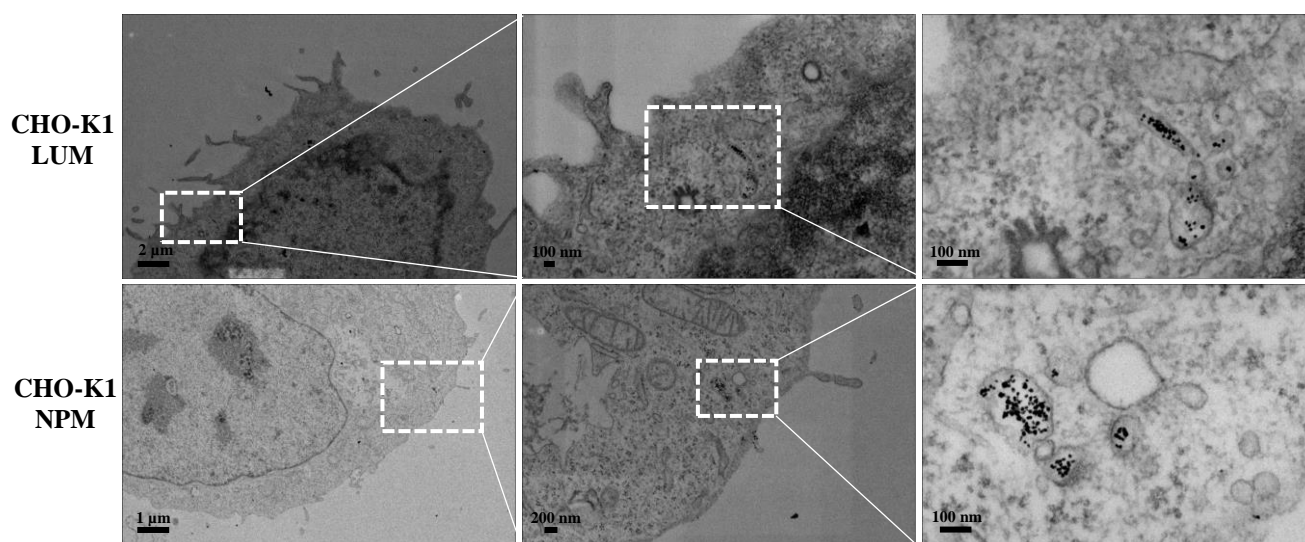


Figure 4.10 : Images TEM des cellules CHO-K1 incubées avec (A) des LUM ou (B) des NPM.

b. Evènements observés dans les cellules incubées avec les MFL

Lorsque les cellules sont incubées avec les MFL, plusieurs types d'évènements sont observés à la surface et à l'intérieur des cellules, illustrant la complexité des interactions entre les MFL et la membrane plasmique. Ces observations permettent de distinguer différentes

situations : (i) Des nanoparticules sphériques fortement contrastées localisées au niveau de la membrane plasmique, suggérant une simple adsorption des MFL à la surface cellulaire (**Figure 4.11 A**) ; (ii) Des liposomes dont la membrane paraît altérée ou partiellement continue avec celle de la cellule, ce qui pourrait suggérer un processus de fusion lipidique, bien que cela ne soit pas clairement identifiable sur l'image (**Figure 4.11 B**) ; (iii) Des NPM clairement localisées dans des endosomes, traduisant une internalisation résiduelle par endocytose, bien que cette voie soit en principe inhibée à 4 °C (**Figure 4.11 C**) ; (iv) Des NPM libres dans le cytoplasme, non entourées de membrane, ce qui soutient l'hypothèse d'un relargage direct après fusion des MFL avec la membrane plasmique (**Figure 4.11 D**) ; (v) Des NPM entourées d'une structure membranaire peu définie, rendant difficile la distinction entre une localisation dans un endosome ou une présence libre dans le cytoplasme. Il pourrait s'agir d'une membrane endosomale partiellement dégradée ou d'un artefact de coupe (**Figure 4.11 E**). L'ensemble de ces observations confirme que les MFL peuvent non seulement interagir étroitement avec la membrane plasmique, mais également permettre le transfert de leur contenu vers le cytosol via des mécanismes de fusion directe.

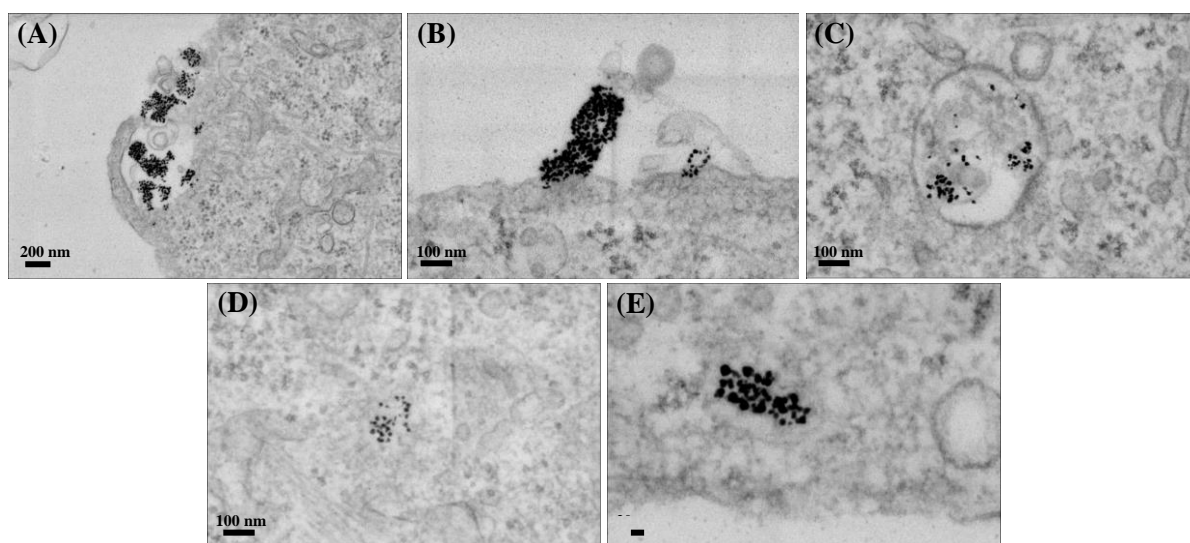


Figure 4.11 : Images de TEM des événements se produisant lorsque que les cellules sont incubées avec les MFL à 4°C pendant 30 min : (A) des nanoparticules et MFL adsorbés ; (B) des liposomes dont la membrane paraît altérée ou partiellement continue avec celle de la cellule, ce qui pourrait suggérer un processus de fusion lipidique ; (C) des NPM localisées dans des endosomes ; (D) des NPM libres dans le cytoplasme, non entourées de membrane ; (E) Des NPM entourées d'une structure membranaire peu définie.

Afin de mieux évaluer si les nanoparticules de maghémite observées dans le cytosol sont libres ou confinées dans des structures membranaires, les images D et E de la **Figure 4.11**, issues de la MET, ont été analysées à l'aide du logiciel ImageJ. Ce logiciel permet non seulement de renforcer les contrastes, mais aussi d'appliquer des LUT (Look-Up Tables), un outil en imagerie qui permet de représenter l'intensité des pixels à l'aide d'échelles de couleurs artificielles, telles que l'inversion des contrastes ou l'application de la palette FIRE (Fluorescence Intensity Rendering Enhancement). Dans notre cas, la palette FIRE transforme les niveaux de gris en un dégradé de couleurs, ce qui améliore la visualisation des variations d'intensité. L'utilisation de ces transformations, accentuation/inversion du contraste, ou palette FIRE, facilite la détection de structures bien définies et peut aider à identifier d'éventuelles délimitations membranaires autour des nanoparticules. L'analyse des images D et E de la **Figure 4.11**, qui correspondent respectivement à des NPM supposées libres dans le cytosol et à des NPM potentiellement entourées par une membrane (compartiments d'endocytose), a été affinée en utilisant cette palette. Les images transformées (**Figure 4.12**) confirment les hypothèses formulées : sur les images du haut, les NPM apparaissent comme des amas diffus sans délimitation claire, suggérant leur présence libre dans le cytosol à la suite de la fusion des MFL. En revanche, les images du bas mettent en évidence une structure périphérique plus marquée autour des NPM, compatible avec une enveloppe membranaire, probablement de type endosomal.

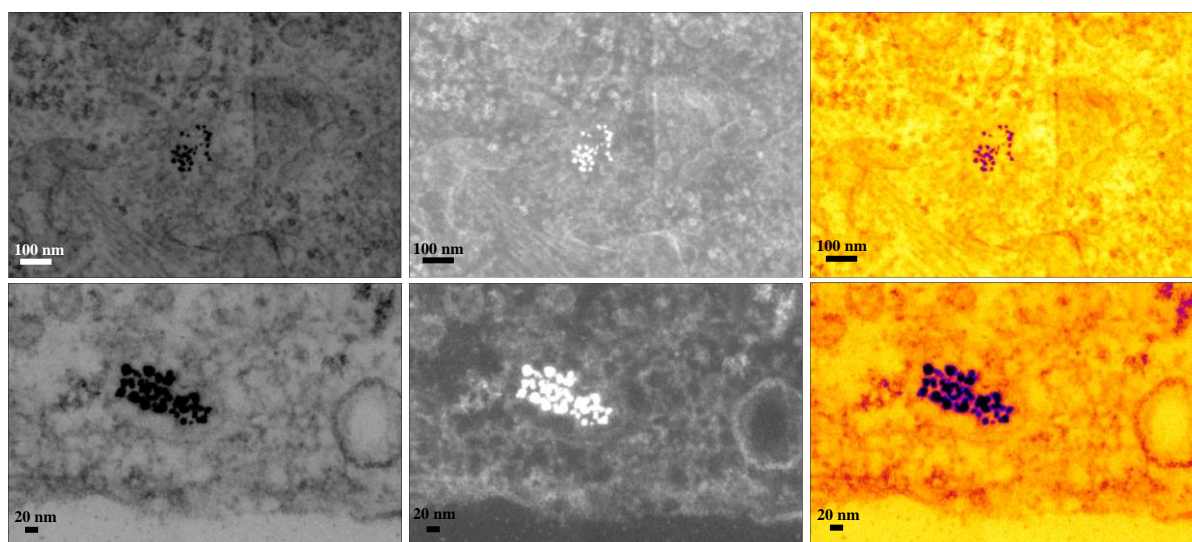


Figure 4.12 : Clichés de MET des cellules incubées avec les MFL (0,15 mM, 30 min, 4 °C), dont le contraste a été renforcé (gauche), inversé (milieu) ou modifié par l'application de la palette FIRE (droite).

c. Conclusion de l'étude menée en microscopie électronique à transmission

L'analyse par microscopie électronique en transmission des cellules incubées avec les MFL met en évidence une diversité d'événements traduisant des interactions complexes entre les liposomes et la membrane plasmique. Contrairement aux conditions contrôles (cellules non traitées, LUM, ou NPM libres), les cellules exposées aux MFL présentent non seulement une accumulation marquée de particules à la surface cellulaire, mais également des signes de fusion potentielle et de libération intracellulaire de NPM. La présence de NPM libres dans le cytosol, non entourées de membrane, constitue un indice solide en faveur d'un mécanisme de fusion directe entre les liposomes et la membrane plasmique, permettant le relargage de leur contenu dans le cytosol.

Ainsi, ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle les MFL sont capables d'interagir directement avec la membrane plasmique des cellules et de délivrer leur contenu via un mécanisme de fusion lipidique, même dans des conditions où l'endocytose est inhibée. Ce phénomène semble spécifique aux MFL ; les autres conditions ne montrent que très peu d'internalisation, essentiellement confinée dans des endosomes. Cependant, une limite importante de cette analyse réside dans l'interprétation des images TEM, qui dépendent fortement de la coupe effectuée. Certaines observations ambiguës (ex. : particules à la frontière cellulaire ou faiblement délimitées) peuvent être biaisées par des artefacts liés à la préparation des échantillons.

De plus, il existe une autre limite importante, c'est que toutes les observations ont été réalisées à 4 °C, température choisie volontairement afin de bloquer l'endocytose et d'isoler les phénomènes de fusion lipidique. Cette décision ayant été motivée dans l'idée de minimiser les processus d'internalisation active et par un manque de temps pour mener l'expérience en parallèle à 37 °C, présente néanmoins une contrepartie car l'abaissement de la température a probablement un impact sur la dynamique membranaire globale, ce qui peut ralentir la survenue de fusions lipidiques.

Ainsi, bien que des résultats positifs aient été obtenus en microscopie confocale à 4 °C (suggérant un marquage membranaire), la capacité des MFL à induire une fusion dans des conditions physiologiques reste à confirmer. Dans le cadre d'expériences futures, cette étude sera répétée à 37 °C, condition physiologique où les mécanismes de fusion sont plus actifs, mais où l'endocytose est également présente.

5. Hyperthermie magnétique sur cellules après fusion avec les MFL

Les expériences de microscopie électronique à transmission (MET) ayant mis en évidence la présence de nanoparticules magnétiques libres dans le cytosol à la suite de l'interaction entre les MFL et les cellules, il apparaît pertinent d'évaluer l'effet d'un traitement par hyperthermie magnétique sur ces cellules. Pour rappel, le confinement subcellulaire des NPM limite leur capacité de chauffage, en raison de l'augmentation des interactions dipolaires magnétiques entre particules, liées à leur proximité, ce qui perturbe la relaxation de Néel.^{138,141} Leur libération dans le cytoplasme pourrait ainsi permettre de préserver leurs propriétés magnétiques. Les tests d'hyperthermie magnétique permettraient alors d'évaluer leur efficacité en tant qu'outils thérapeutiques à visée intracellulaire.

Cette approche repose sur l'application d'un champ magnétique alternatif (CMA), induisant un échauffement localisé des NPM au sein des cellules, susceptible de générer un stress cellulaire détectable, voire d'induire la mort cellulaire.

a. Mise au point de l'expérience d'hyperthermie magnétique

i. Contexte de l'expérience

Comme le souligne clairement Vilas et *al.*¹⁸⁷ dans leur revue, les protocoles classiques d'hyperthermie magnétique consistent en une exposition continue des cellules à un champ magnétique alternatif pendant 30 minutes à une heure, entraînant un échauffement global des nanoparticules magnétiques. Cette élévation thermique peut provoquer des dommages structuraux importants au sein des cellules, menant majoritairement à une mort cellulaire par nécrose.

Dans notre approche, un protocole original a été mis en place afin d'induire une hyperthermie modérée, localisée et contrôlée. Les cellules ont été maintenues à une température constante de 37 °C à l'aide d'un système de régulation thermique par bain-marie, associé à une sonde de température garantissant un suivi précis des conditions macroscopiques. Contrairement aux expositions continues décrites dans la littérature, un mode fractionné a été adopté, reposant sur des cycles successifs (10, 20 ou 40) d'exposition au CMA. Chaque cycle, d'une durée de 15 minutes, est suivi d'une pause de 5 minutes.

Chapitre 4 : Étude de la fusion des liposomes magnétiques fusogènes avec des cellules

Ce protocole permet de maintenir une température globale stable, tout en favorisant des élévations thermiques localisées au niveau intracellulaire. Ces micro-élévations, bien que non détectables par la sonde thermique, peuvent suffire à induire un stress cellulaire localisé, susceptible d'activer des mécanismes de mort cellulaire tels que l'apoptose ou la nécrose. L'un des principaux avantages de cette approche réside dans la spatialisation de l'effet : si une mort cellulaire est induite, elle demeure circonscrite aux zones ciblées.

Pour évaluer l'impact de l'exposition au CMA sur la viabilité cellulaire, un test post-traitement à l'Alamar Blue a été réalisé. Ce test permet de mesurer l'activité métabolique résiduelle des cellules, offrant ainsi une estimation indirecte du taux de mortalité induite par l'hyperthermie.

ii. Choix de la fréquence et de l'intensité du champ magnétique

La fréquence et l'intensité du champ magnétique alternatif sont des paramètres clés dans les protocoles d'hyperthermie magnétique. Au laboratoire, des essais sont actuellement menés sur des cellules exposées à des nanoparticules magnétiques fonctionnalisées avec des peptides éponges à protons, permettant l'échappement endosomal des nanoparticules après internalisation, et ces tests utilisent une fréquence fixée à 488 kHz. Il est toutefois essentiel de limiter tout échauffement non spécifique du milieu environnant, c'est-à-dire non lié à l'action des NPM. À cet effet, un seuil de sécurité, connu sous le nom de critère de Brezovich, est souvent pris en compte : il stipule que le produit de l'intensité du champ magnétique (H) par sa fréquence (f) doit rester inférieur à $4,85 \times 10^8 \text{ A} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.^{17,187,188} Dans notre étude, l'objectif est de sélectionner une intensité de champ à 488 kHz suffisamment élevée pour être efficace, mais qui ne provoque pas de hausse de température du milieu de culture supérieure à 1 °C, que ce seuil de sécurité soit strictement respecté ou non.

À cette fin, le milieu de culture DMEM/F12 supplémenté, utilisé pour la culture des cellules CHO-K1 et SH-SY5Y, a été thermostaté à 37 °C dans une enceinte connectée à un bain-marie, puis placé au centre de la bobine électromagnétique. Quatre cycles de 15 minutes de champ magnétique alternatif, entrecoupés de 5 minutes de pause, ont été appliqués à une fréquence fixe de 488 kHz, avec des intensités successives de 200, 150, 100 et 50 Gauss.

Les résultats présentés en *Figure 4.13* montrent une élévation de température dépendante de l'intensité du champ : 1,3 °C à 200 G, 0,3 °C à 150 G, 0,2 °C à 100 G, et aucune élévation à 50 G. Sur cette base, l'intensité de 150 G a été retenue comme condition optimale, car elle représente la valeur la plus élevée du champ n'induisant qu'une élévation thermique minimale. Cependant, le calcul du critère de Brezovich avec cette intensité donne : $H \times f = 11\,936,6 \text{ A}\cdot\text{m}^{-1} \times 488\,400 \text{ Hz} = 5,83 \times 10^9 \text{ A}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, ce qui dépasse largement le seuil de sécurité classiquement établi à $4,85 \times 10^8 \text{ A}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Néanmoins, aucun échauffement significatif du milieu n'ayant été observé expérimentalement, cette intensité est jugée acceptable pour les conditions de test retenues. De plus, des études récentes proposent de réévaluer les limites de sécurité du critère de Brezovich, en montrant que des valeurs plus élevées de $H \times f$ peuvent être tolérées in vivo sans effets indésirables significatifs, à condition d'un contrôle thermique strict.¹⁸⁹

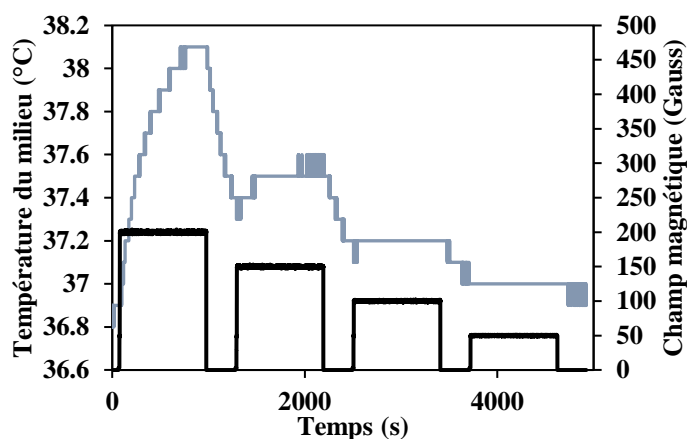


Figure 4.13 : Suivi de l'évolution de la température (bleu) du milieu de culture thermostaté à 37 °C, durant 4 cycles de CMA d'une durée de 15 min consécutifs avec 5 min de pause entre chaque cycle avec une fréquence de 488 kHz et des intensités respectives de 200 G, 150 G, 100 G et 50 G (noir).

iii. Pourvoir chauffant des NPM dans les conditions expérimentales

Avant de débiter les tests d'hyperthermie sur des cellules, nous avons vérifié la capacité des nanoparticules magnétiques utilisées pour la synthèse des MFL à générer une élévation de température significative dans nos conditions expérimentales (488 kHz, 150 G). Pour cela, une dispersion de NPM dans le milieu de culture DMEM/F12 supplémenté, à une concentration en fer de 150 mM, a été soumise à un champ magnétique alternatif selon le protocole zigzag proposé initialement par Ruta et *al.*¹⁹⁰.

Le protocole zigzag est une méthode expérimentale développée pour améliorer la précision et la reproductibilité des mesures de SLP (Specific Loss Power) de nanoparticules magnétiques.¹⁹⁰ Ce protocole consiste à enchaîner plusieurs cycles successifs de chauffage et de refroidissement d'une suspension de nanoparticules soumise à un champ magnétique alternatif. Concrètement, la température de l'échantillon est augmentée de manière contrôlée jusqu'à environ +3 °C au-dessus de la température initiale, puis on laisse le système redescendre naturellement d'environ -2 °C par rapport à la température maximale atteinte. Ce cycle de montée et de descente est répété généralement dix fois, ce qui donne une courbe de température en dents de scie, d'où le nom de « zigzag » (**Figure 4.14**).

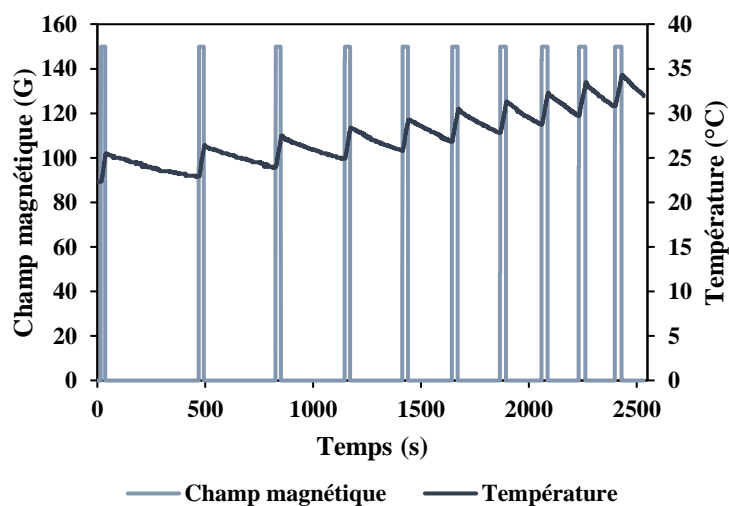


Figure 4.14 : Protocole zigzag appliqué au NPM de maghémite citraté.

Les données ont été analysées à l'aide du modèle Box-Lucas (BL), permettant de prendre en compte les pertes thermiques, inévitables du fait de l'absence de calorifugeage de la bobine utilisée. En appliquant ce modèle sur chaque montée en température des cycles du protocole zigzag (*Figure 4.14*), il est possible d'extraire la vitesse initiale de chauffe pour chaque cycle. Cette dérivée permet ensuite de calculer une valeur de SLP (Specific Loss Power) individuelle pour chaque montée, selon la formule standard prenant en compte la capacité calorifique et la masse de fer. En répétant ce processus sur l'ensemble des cycles, on obtient une série de valeurs de SLP que l'on peut tracer en fonction du numéro de cycle. Ce graphique (*Figure 4.15*), montre que les valeurs de SLP restent globalement stables, oscillant entre environ 32 et 45 W/g, ce qui signifie que le système reste thermiquement stable et que les nanoparticules conservent leur efficacité de dissipation thermique au fil des cycles. À partir de ces dix expériences, la moyenne des valeurs de SLP a été calculée à $36,5 \pm 4,6$ W/g, ce qui reflète une puissance de dissipation thermique constante des nanoparticules dans les conditions expérimentales définies et est en accord avec les valeurs de la littérature.¹⁹¹

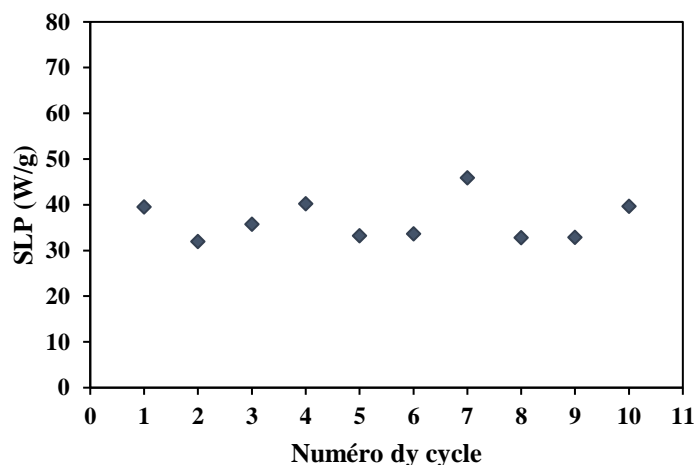


Figure 4.15 : Valeurs des SLP avec la méthode BL sur la courbe complète.

Avec 10 cycles, on obtient 10 valeurs de SLP, l'intérêt majeur de ce protocole réside donc dans la possibilité d'obtenir plusieurs mesures dans des conditions strictement identiques, ce qui permet de calculer rapidement une moyenne et une incertitude sur le SLP, tout en limitant les erreurs liées aux instruments de mesure ou aux variations environnementales. De plus, les faibles variations de température imposées par le protocole (+3 °C en chauffage et -2 °C en refroidissement) respectent les recommandations récentes de la littérature, notamment celles de Wells et al.¹⁹², car elles permettent d'éviter les surchauffes tout en assurant une meilleure stabilité thermique et une sécurité expérimentale accrue.

b. Hyperthermie magnétique sur les cellules CHO-K1

i. CHO-K1 incubées avec des MFL, des LUM et des LUV cationiques

Les conditions de l'expérience étant déterminées et la possibilité de chauffage des NPM étant confirmée, les tests d'hyperthermie ont pu commencer. Les cellules CHO-K1 ont été incubées pendant 30 minutes à 37 °C avec des MFL, des LUV cationiques fusogènes ou des LUM, à une concentration lipidique de 0,25 mM. Cette concentration a été choisie pour les premières expériences car elle correspondait à celle utilisée en microscopie confocale où la fluorescence était la plus intense. Par ailleurs, les tests de viabilité n'avaient pas encore été réalisés au moment de ces expériences. Deux boîtes de Pétri comportant chacune quatre puits ont été ensemencées avec les cellules. Les puits 1 de chaque boîte ont servi de contrôle avec les CHO-K1 non traités, les puits 2 contiennent les CHO-K1 avec des MFL, les puits 3 les CHO-K1 avec des LUV cationiques sans NPM et les puits 4 les CHO-K1 avec des LUM. L'une des boîtes a été placée dans l'incubateur à 37 °C en condition de 5 % de CO₂ et l'autre boîte dans une enceinte thermostatée à 37 °C, intégrée dans une bobine d'induction électromagnétique. Un champ magnétique alternatif a été appliqué à la boîte dans l'enceinte, de manière fractionnée, selon une séquence de 20 cycles ON/OFF : chaque cycle comprenait 15 minutes d'activation du champ (ON, à 488 kHz et 150 Gauss), suivies de 5 minutes de repos sans champ (OFF). La température du milieu cellulaire a été surveillée en continu à l'aide d'une sonde thermique insérée dans le puits 2.

Le profil du CMA (courbe bleue) ainsi que l'évolution de la température mesurée dans le milieu de culture (courbe noire) sont illustrés sur la **Figure 4.16**. Lors de chaque activation du CMA, une élévation thermique de l'ordre de 0,5 °C est observée, suivie d'un refroidissement d'environ 0,4-0,5 °C durant les phases OFF. La température globale du milieu passe ainsi progressivement de ~36,5 °C à environ 37,2 °C au terme des 20 cycles. Cette élévation thermique est attribuée à l'accumulation de chaleur générée par les courants de Foucault (eddy currents) dans le milieu salin de culture, bien que la température globale reste contrôlée grâce au système thermostaté.¹⁹³

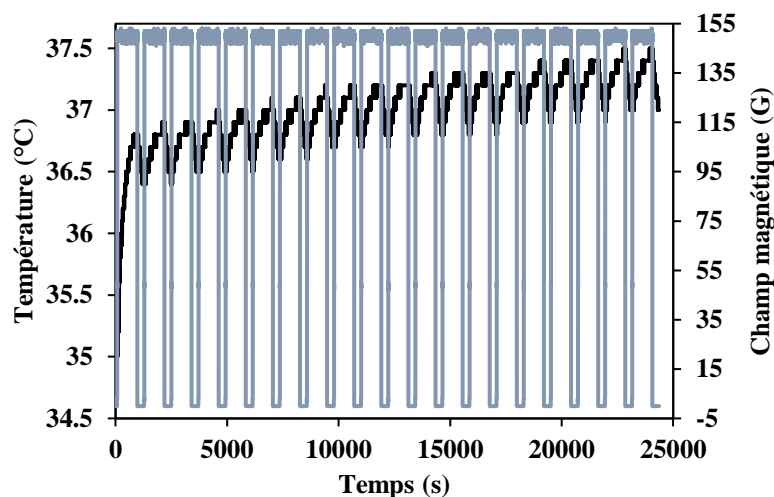


Figure 4.16 : Température (noir) du milieu de culture des cellules incubées avec les MFL au cours des 20 cycles de champ magnétique alternatif (bleu).

À l'issue des 20 cycles d'exposition au champ magnétique alternatif, la viabilité cellulaire a été évaluée pour chacune des conditions expérimentales, comme présenté en **Figure 4.17**. Toutefois, une limitation majeure du protocole réside toujours dans le fait qu'un seul puits a été utilisé par condition, ce qui empêche toute estimation de l'incertitude expérimentale et ne permet pas la réalisation d'analyses statistiques robustes. Ce choix est en partie imposé par les dimensions de la bobine électromagnétique, paramètre sur lequel une cellule a été conçue pour accueillir uniquement des boîtes de Pétri d'un diamètre de 35 mm, limitant ainsi l'expérimentation à des boîtes compartimentées avec un maximum de quatre conditions. Afin d'augmenter la fiabilité des mesures, la fluorescence du test Alamar Blue a toutefois été mesurée en triplicat pour chaque puits.

La condition témoin, constituée de cellules non traitées et non exposées au CMA, a été utilisée comme référence (100 % de viabilité). Fait notable, les cellules non traitées mais soumises au CMA présentent une viabilité significativement augmentée, atteignant 128 %, ce qui suggère un effet potentiellement stimulant du CMA sur la prolifération cellulaire. Dans une seconde condition, les cellules ont été incubées avec des MFL. Dans ce cas, la viabilité cellulaire chute fortement à 51 % en l'absence de CMA et à 52 % en sa présence, indiquant une cytotoxicité intrinsèque marquée des MFL. Ce résultat est cohérent avec les tests de cytotoxicité précédemment réalisés, où la toxicité est probablement liée à leur nature cationique.¹⁸⁴ L'application du champ magnétique n'aggrave pas cette toxicité, ce qui suggère que l'effet délétère est principalement attribuable aux liposomes eux-mêmes. Une troisième condition expérimentale a évalué l'impact des LUV cationiques, la viabilité cellulaire s'établit à 71 %

Chapitre 4 : Étude de la fusion des liposomes magnétiques fusogènes avec des cellules

sans CMA et à 79 % avec CMA, confirmant la toxicité partielle de ces liposomes cationiques, et l'absence d'effet nocif supplémentaire induit par le CMA. Enfin, les cellules incubées avec les LUM présentent une viabilité élevée : 92 % sans CMA et 89 % avec CMA. Ces résultats suggèrent que ni les LUM ni l'exposition au champ magnétique n'induisent de cytotoxicité significative, ce qui en fait un contrôle négatif pertinent pour l'évaluation des effets membranaires et de l'hyperthermie magnétique.

Dans l'ensemble, ces données montrent que dans les conditions expérimentales appliquées (37 °C, 20 cycles ON/OFF, 488 kHz, 150 G), le CMA seul ne génère pas une hyperthermie suffisante pour affecter la viabilité cellulaire. L'effet cytotoxique observé est principalement attribué à la présence de lipides cationiques entrant dans la formulation des LUV et des MFL.

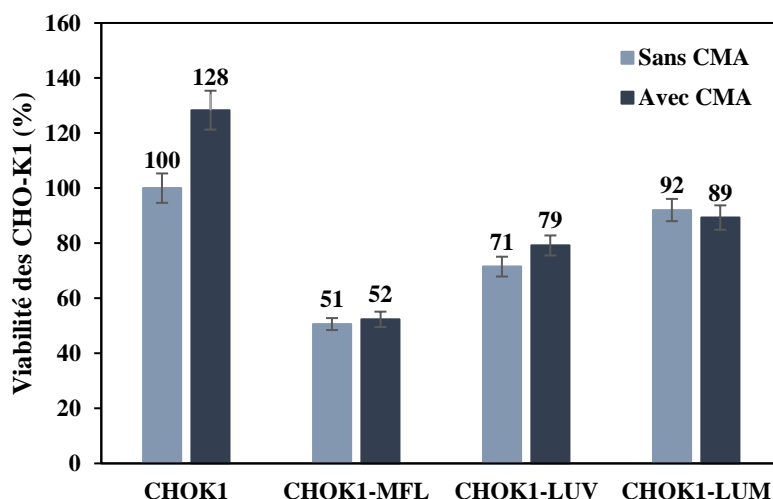


Figure 4.17 : Viabilité des cellules non traitées ou traitées avec des MFL, des LUV cationiques ou des LUM, sans ou avec application d'un champ magnétique alternatif.

ii. CHO-K1 incubées avec les MFL à différentes concentrations lipidiques et en augmentant le nombre de cycles de CMA

Dans le cadre d'études menées au laboratoire sur l'échappement endosomal à l'aide de peptides éponges à protons, des expériences d'hyperthermie magnétique ont été réalisées. Dans ces travaux, le nombre de cycles d'exposition au champ magnétique alternatif a été modulé (10, 15, 20 et 40 cycles), et il a été observé que la mortalité cellulaire augmentait avec le nombre de cycles, atteignant un plateau à 40 cycles. Dans la continuité de ces études, il nous a donc semblé pertinent d'explorer plus en profondeur l'effet cumulatif de l'exposition au CMA, cette fois dans le contexte d'une incubation des cellules CHO-K1 avec des MFL.

Dans cette optique, le protocole a été ajusté afin de doubler le nombre de cycles d'activation, passant de 20 à 40. En effet, les expériences précédentes menées avec 20 cycles de CMA n'ont montré aucune mortalité cellulaire significative attribuable à l'hyperthermie magnétique. Par ailleurs, pour cette nouvelle expérience, les cellules ont été incubées avec des MFL à différentes concentrations lipidiques. Des concentrations plus faibles que celles utilisées précédemment ont été testées, dans le but de réduire la toxicité directe, tout en conservant une quantité suffisante de MFL. L'hypothèse sous-jacente est qu'une concentration lipidique élevée augmente la probabilité d'un nombre important de NPM présentes dans le cytosol des cellules.

Ainsi, au cours de cette expérience, les cellules CHO-K1 ont été incubées pendant 30 minutes à 37 °C avec des MFL à des concentrations lipidiques estimées à 0,05 mM, 0,15 mM et 0,25 mM. Pour chaque condition, deux boîtes de Pétri compartimentées (4 compartiments chacune) ont été préparées en parallèle : l'une a été placée dans un incubateur standard (37 °C, 5 % de CO₂), servant de contrôle, tandis que l'autre a été placée dans une cellule thermostatée intégrée à une bobine électromagnétique. L'exposition des cellules au CMA s'est déroulée sur deux jours consécutifs, à raison de 20 cycles par jour. Chaque cycle comportant 15 minutes d'exposition au champ magnétique (phase ON), suivies de 5 minutes de repos (phase OFF). Les paramètres du champ appliqué sont les suivants : fréquence de 488 kHz et intensité de 150 G. La température a été surveillée en continu à l'aide d'une sonde insérée dans le puits contenant les cellules et les MFL. Les mesures ont confirmé une régulation thermique efficace, avec une température maintenue à 37 °C ± 1 °C pendant toute la durée de l'expérimentation. De légères élévations (~0,5 °C) ont été observées pendant les phases ON, mais elles étaient compensées par des baisses équivalentes durant les phases OFF. La température maximale enregistrée n'a jamais excédé 37,4 °C.

La viabilité cellulaire a été évaluée à l'issue des 40 cycles à l'aide du test Alamar Blue. Il convient toutefois de noter que, comme précédemment, ces mesures ont été réalisées sur un seul puits par condition. Par conséquent, les valeurs obtenues doivent être interprétées avec prudence, car l'absence de répliquas augmente le risque d'erreur expérimentale et limite la robustesse statistique des conclusions.

Chapitre 4 : Étude de la fusion des liposomes magnétiques fusogènes avec des cellules

Les résultats, présentés en **Figure 4.18**, montrent une diminution progressive de la viabilité cellulaire avec l'augmentation de la concentration lipidique et ce indépendamment de l'exposition au CMA. Chez les cellules non traitées par les MFL, une légère cytotoxicité liée au CMA a été observée : la viabilité passe ainsi de 100 % (sans CMA) à 82 % (avec CMA). Ce résultat suggère que l'exposition à un grand nombre de cycles pourrait induire un effet délétère, potentiellement en lien avec un stress mécanique ou des perturbations électromagnétiques mineures. Chez les cellules incubées avec 0,05 mM de MFL, la viabilité diminue de 77 % (sans CMA) à 54 % (avec CMA). Cette diminution importante, bien que survenant en l'absence d'élévation thermique globale, pourrait être attribuée à un effet direct du champ magnétique, comme celui observé dans les cellules non traitées. La différence de mortalité induite par le CMA entre ces deux conditions (18 % pour les cellules sans MFL, contre 26 % pour celles avec 0,05 mM de MFL), bien que modeste et peut être due à une variabilité expérimentale, mais pourrait également refléter un début de mortalité par hyperthermie magnétique localisée. À des concentrations lipidiques plus élevées (0,15 mM et 0,25 mM), la viabilité cellulaire chute de manière drastique. À 0,15 mM, la viabilité passe à 44 % sans CMA et 46 % avec CMA ; et à 0,25 mM, elle atteint 8 % sans CMA et 9 % avec CMA. Ces résultats indiquent qu'à ces niveaux de concentration, la toxicité intrinsèque des MFL est suffisante pour induire une mort cellulaire massive, masquant ainsi tout effet additionnel potentiel du CMA.

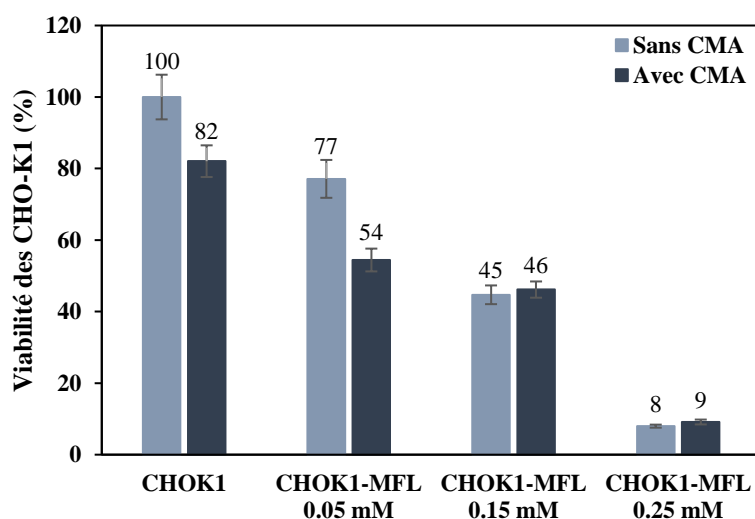


Figure 4.18 : Viabilité des cellules non traitées ou traitées avec des MFL de différentes concentrations (0,05 mM, 0,15 mM et 0,25 mM), sans ou avec application d'un champ magnétique alternatif.

Ces observations montrent que l'augmentation du nombre de cycles de CMA a bien un impact sur la viabilité cellulaire, mais que cet effet ne semble pas spécifiquement lié à un mécanisme d'hyperthermie magnétique. En effet, la cytotoxicité observée, que les cellules soient ou non exposées au champ magnétique, semble être principalement induite par les MFL eux-mêmes. À noter que les valeurs de viabilité obtenues dans cette série d'expériences sont légèrement supérieures à celles observées lors de précédents tests de toxicité effectués après 30 minutes d'incubation (par exemple, une viabilité de 45 % à 0,05 mM). Cette différence pourrait s'expliquer par des variations entre les lots, de MFL ou de cellules, utilisés, ou encore par une surestimation de la concentration lipidique réelle des MFL.

Enfin, l'absence d'effet additif du CMA à forte concentration pourrait refléter une saturation du mécanisme toxique, au-delà duquel l'exposition magnétique ne peut plus aggraver l'effet cytotoxique déjà maximal induit par les MFL. Il convient toutefois de souligner que ces tests nécessiteraient d'être reproduits afin de confirmer les tendances observées. Malheureusement, le manque de temps n'a pas permis la réalisation de répétitions expérimentales, ce qui constitue une limite importante de cette étude.

c. Hyperthermie sur les cellules SH-SY5Y

L'application d'un champ magnétique alternatif dans le but d'induire une hyperthermie magnétique a également été testée sur les cellules tumorales SH-SY5Y. Contrairement aux cellules CHO-K1 utilisées lors des expériences précédentes, qui sont des cellules saines, les cellules SH-SY5Y sont issues d'une lignée cancéreuse neuroblastique humaine. Cette différence physiologique pourrait influencer leur sensibilité à l'hyperthermie. Sur la base de cette hypothèse, il a donc semblé pertinent de tester les propriétés d'hyperthermie magnétique des MFL sur les cellules SH-SY5Y.

Le protocole expérimental appliqué aux cellules SH-SY5Y est resté quasiment identique à celui utilisé pour les cellules CHO-K1, à deux exceptions près. La première concerne les concentrations lipidiques des MFL utilisées pour l'incubation des cellules : 0,03 mM, 0,05 mM et 0,07 mM. Ces concentrations ont été choisies en se basant sur les résultats obtenus lors des expériences de microscopie confocale obtenues avec les SH-SY5Y, où, pour rappel, une fluorescence membranaire est observable à partir de 0,05 mM. La seconde différence majeure du protocole concerne la mise en place de triplicats pour chaque condition expérimentale. En tout, six boîtes de Pétri ont été utilisées, réparties en deux groupes : trois boîtes non exposées

Chapitre 4 : Étude de la fusion des liposomes magnétiques fusogènes avec des cellules

au CMA, servant de contrôle, et trois boîtes soumises à l'exposition magnétique. Chaque boîte était compartimentée en quatre puits : le puits 1 contenait des cellules non traitées, tandis que les puits 2, 3 et 4 accueilleraient respectivement des cellules incubées avec des MFL à 0,03 mM, 0,05 mM et 0,07 mM. L'exposition au CMA a été réalisée sur deux jours consécutifs, à raison de 20 cycles par jour, soit un total de 40 cycles. Chaque cycle comportait 15 minutes d'exposition à un champ magnétique alternatif (fréquence : 488 kHz ; intensité : 150 G), suivies de 5 minutes de repos. Les trois boîtes soumises au CMA ont été empilées les unes sur les autres dans la cellule thermostatée intégrée à la bobine électromagnétique. La température a été contrôlée en continu, maintenue autour de 37 °C, avec des élévations modérées (~0,5 °C) durant les phases ON et des baisses équivalentes (~0,4 °C) pendant les phases OFF.

L'analyse de la viabilité cellulaire (*Figure 4.19*) révèle que les cellules SH-SY5Y non traitées conservent une viabilité de 100 % en l'absence de CMA, et même légèrement supérieure (108 %) après exposition au champ magnétique. Concernant les cellules incubées avec les MFL, les résultats indiquent une viabilité avec des valeurs significativement identiques, puisque pour une concentration de 0,03 mM, la viabilité est de 91 % (sans CMA) et 100 % (avec CMA) ; pour 0,05 mM, elle est de 84 % et 91 % ; et pour 0,07 mM, de 95 % et 98 %. Ces résultats montrent qu'aucun effet cytotoxique significatif n'est induit, que ce soit par les MFL seuls ou par leur combinaison avec une exposition au champ magnétique alternatif. Par conséquent, aucun effet d'hyperthermie magnétique susceptible d'altérer la viabilité de ces cellules cancéreuses n'a été mis en évidence dans ces conditions.

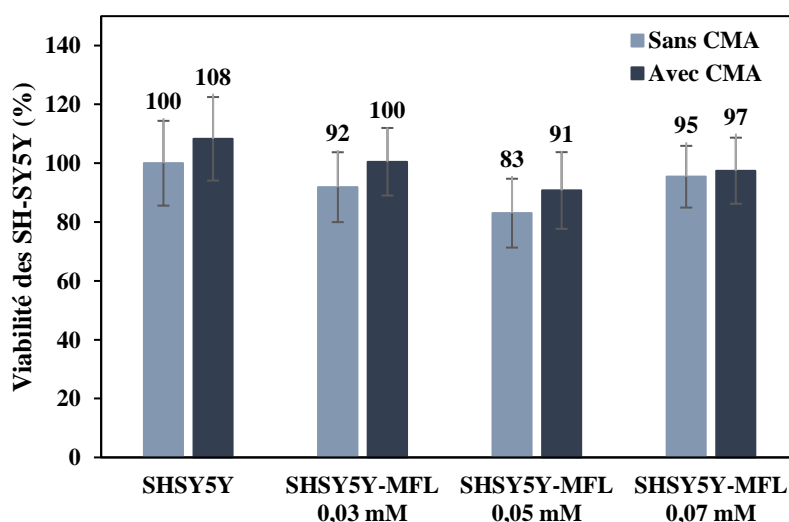


Figure 4.19 : Viabilité des cellules SH-SY5Y non traitées ou traitées avec des MFL de différentes concentrations (0,05 mM, 0,15 mM et 0,25 mM), sans ou avec application d'un champ magnétique alternatif.

d. Conclusion et perspectives des résultats d'hyperthermie magnétique

Les expériences menées sur les cellules CHO-K1 (non tumorales) et SH-SY5Y (tumorales) ont permis d'initier l'étude de l'efficacité des liposomes magnétiques fusogènes dans l'induction d'une hyperthermie locale sous l'effet d'un champ magnétique alternatif. Le protocole adopté, basé sur des cycles fractionnés d'exposition (15 minutes de phase ON suivies de 5 minutes de phase OFF), avait pour objectif de provoquer un échauffement local induit par les nanoparticules magnétiques, conduisant à une mort cellulaire ciblée. Les résultats obtenus indiquent qu'aucune cytotoxicité significative n'a été observée dans la majorité des conditions testées, que ce soit en fonction du nombre de cycles (20 ou 40) ou de la concentration lipidique des MFL. Une exception possible est observée pour les cellules CHO-K1 exposées à 40 cycles, où une tendance à la diminution de la viabilité cellulaire pourrait suggérer un début d'effet hyperthermique. En revanche, cette tendance n'est pas retrouvée pour les cellules SH-SY5Y ni avec l'augmentation de la concentration lipidique. Ces données suggèrent que l'effet hyperthermique attendu n'a pas été globalement atteint dans les conditions expérimentales mises en œuvre. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette absence d'effet : une concentration trop faible de NPM dans les cellules, une production de chaleur insuffisante, ou encore une dissipation thermique trop localisée pour entraîner un effet létal mesurable à l'échelle cellulaire.

Cependant, ces travaux sur l'hyperthermie magnétique locale sont encore à un stade exploratoire, et plusieurs pistes d'optimisation méritent d'être approfondies. Tout d'abord, l'incertitude persistante sur la concentration lipidique réelle des MFL constitue une limitation importante à l'interprétation des seuils d'efficacité et de toxicité. Par ailleurs, les premières expériences menées sur les cellules CHO-K1 présentaient une faiblesse statistique, puisque les conditions n'étaient testées que sur un seul puits, empêchant toute analyse statistique robuste. Ce point a été corrigé lors des expériences sur cellules SH-SY5Y, pour lesquelles chaque condition a été réalisée en triplicat. Il conviendrait de systématiser cette approche afin d'améliorer la fiabilité et la reproductibilité des données. En complément, l'influence de la fréquence et de l'intensité du champ magnétique appliqué pourrait être explorée de manière plus approfondie. Ajuster ces paramètres permettrait potentiellement d'optimiser l'effet thermique généré par les NPM.

Chapitre 4 : Étude de la fusion des liposomes magnétiques fusogènes avec des cellules

Enfin, l'approche actuelle de détection de l'hyperthermie magnétique repose exclusivement sur un test de viabilité (Alamar Blue) réalisé à l'issue de l'exposition au CMA. Utiliser d'autres techniques de détection comme le test d'exclusion au bleu Trypan, qui est l'un des tests les plus fréquemment utilisés pour évaluer la viabilité cellulaire dans les études d'hyperthermie magnétique *in vitro*¹⁸⁷, pourrait être une alternative complémentaire. Ce test d'exclusion au bleu Trypan repose sur la capacité des cellules viables à exclure le colorant, grâce à l'intégrité de leur membrane cellulaire.¹⁹⁴ Les cellules colorées par le bleu Trypan présentent alors une membrane endommagée, ce qui est considéré comme une cytotoxicité irréversible.

Parallèlement à l'évaluation de la viabilité cellulaire, il serait pertinent de mesurer localement les variations de température afin de déterminer si les nanoparticules magnétiques génèrent effectivement une dissipation thermique localisée. Pour cela, le recours à des nanothermomètres fluorescents représenterait une approche prometteuse. Ces sondes permettent en effet de mesurer en temps réel, à l'échelle subcellulaire, les micro-élévations de température induites par l'application d'un champ magnétique alternatif.¹⁹⁵

En complément des mesures thermiques, des analyses cytologiques et moléculaires peuvent être mises en œuvre afin d'évaluer l'activation de voies cellulaires de réponse au stress, y compris en l'absence de cytotoxicité immédiate observable. L'apoptose, par exemple, est fréquemment détectée à l'aide d'un marquage à l'Annexin V/propidium iodide, couplé à la cytométrie en flux ou à la microscopie, permettant d'identifier les cellules en phase précoce ou tardive d'apoptose.^{196,197} Le stress oxydatif, souvent induit par des élévations thermiques localisées ou une exposition prolongée à un champ magnétique alternatif, peut être quantifié par la sonde fluorescente DCFH-DA, qui permet de mesurer la production intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).¹⁹⁸ Enfin, l'autophagie est généralement suivie par la détection des protéines LC3-II et p62, marqueurs clés évalués en Western blot ou en immunofluorescence, afin de distinguer la formation d'autophagosomes et le bon déroulement du flux autophagique.¹⁹⁹ L'intégration de ces approches permettrait d'avoir une compréhension plus fine des mécanismes cellulaires de stress ou de survie activés, indépendamment de toute perte immédiate de viabilité.

6. Matériel et Méthodes

a. Matériel

Les réactifs chimiques et biologiques ont été obtenus auprès des fournisseurs suivants : tampon d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine-éthanesulfonique (HEPES), sérum bovin fœtal (FBS), colorant Hoechst 33342, , glutaraldéhyde, résine Epon et acide chlorhydrique 37% : Merck. Le milieu Eagle de Dulbecco modifié/mélange nutritif F-12 (DMEM/F12), le sérum de veau fœtal inactivé à la chaleur (HI-FBS), et la trypsine/acide éthylènediaminetétraacétique (Trypsin/EDTA) (0,25 %/0,02 %) ont été achetés chez PAN-Biotech (Allemagne). La pénicilline/streptomycine (pen/strep) a été obtenue chez Dutscher (France). Le marqueur de noyaux sur cellules vivantes Nucblue™(Hoechst 33342), le réactif de viabilité cellulaire Alamar Blue et le kit de test de cytotoxicité à la lactate déshydrogénase (LDH) CyQUANT ont été achetés chez Thermo Fisher Scientific (USA).

b. Stabilité des MFL dans le milieu de culture DMEM/F12

Deux dispersions de MFL ont été préparées sous hotte à flux laminaire (PSM) en prélevant 10 µl de MFL (lot 199), puis en les diluant respectivement dans 990 µl de DMEM/F12 supplémenté ou non supplémenté. Chaque dispersion a ensuite été transférée dans une cellule DTS1070 (Malvern). Le diamètre hydrodynamique a été mesuré à l'aide d'un Malvern Zetasizer ULTRA, selon un programme défini sur le logiciel Zetasizer. Des mesures en triplicat ont été effectuées toutes les 30 minutes pendant une durée totale de 15 h 30, à 25 °C, avec un angle de détection de 173°. L'indice de réfraction utilisé pour la phase liposomale était de 1,45.

c. Culture cellulaire

Les cellules d'ovaires de hamster chinois, de type sauvage (CHO-K1), ainsi que les cellules du neuroblastome humain (SH-SY5Y) ont été cultivées dans du milieu de culture DMEM/F12 (50:50) supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal inactivé à la chaleur (HI-FBS) et 1 % d'un mélange de pénicilline (100 000 IU/L) et streptomycine (100 000 IU/L). Les cellules ont été incubées dans une atmosphère humide à 37 °C avec un taux de CO₂ de 5 %.

d. Microscopie confocale à fluorescence

Les cellules CHO-K1 ou SH-SY5Y ont étéensemencées dans des plaques Ibidi de 8 puits (10 000 cellules/puits dans 200 μ L). Les cellules ont été incubées dans du milieu de culture (DMEM-F12) contenant 10 % HI-FBS et 1% d'un mélange pénicilline/streptomycine à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO₂ pendant 24 heures avant que le milieu ne soit éliminé, et remplacé par un nouveau milieu non supplémenté (sans HI FBS et Pen/Strep) contenant les liposomes spécifiques (MFL, liposomes cationiques DOTAP/DOPE/TopFluorPE/ PEGPE, LUM). Les cellules ont été incubées pendant 30 min pour chaque condition présentée. À la fin de l'incubation les cellules ont été lavées 2 fois avec du milieu de culture (200 μ L) et 3 fois avec du PBS (200 μ L). Les noyaux des cellules ont été colorés avec du Hoechst 33342 (dilué dans du PBS) pendant 15 minutes, avant d'être lavés une dernière fois avec du PBS. Puis les cellules ont été fixées dans 450 μ L de paraformaldéhyde à 4 % dans du PBS pendant 15 minutes, avant d'être lavées 3 fois avec 500 μ L de PBS. Finalement, 200 μ L de PBS ont été ajoutés pour l'observation. Les cellules ont été imagées sur un microscope confocal inversé Zeiss LSM710 (Carl Zeiss, Allemagne), avec un objectif Plan-Apochromat 63x/1.4 DIC M27 à immersion en huile. L'ensemble des acquisitions a été réalisé sur la plateforme de microscopie de l'Institut de biologie Paris Seine (IBPS), à température ambiante, avec des paramètres d'acquisition similaires pour une expérience donnée, mais qui peuvent différer d'une expérience à l'autre. Finalement, les images ont été générées en utilisant FIJI ImageJ.

e. Test de viabilité des cellules CHO-K1 traitées

Les cellules CHO-K1 ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits à fond plat, à raison de 15 000 cellules par puits, dans 200 μ L de milieu DMEM-F12 complété avec 10 % de sérum inactivé HI-FBS et 1 % de pénicilline/streptomycine. Les plaques ont été incubées pendant 24 heures à 37 °C dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂. La plaque a été divisée en quatre selon le temps d'incubation (30 minutes, 1 heure, 6 heures et 24 heures) des MFL avec les cellules CHO-K1. Par conséquent, l'incubation de la plaque a été effectuée sur deux jours : les puits correspondant à la condition 24 heures ont été traités dès le premier jour, tandis que les conditions 30 min, 1 h et 6 h ont été lancées le lendemain. Pour chaque condition, le milieu de culture a été retiré avant d'ajouter un nouveau milieu sans sérum, contenant les MFL à différentes concentrations lipidiques estimées : 0,01 mM, 0,03 mM, 0,05 mM, 0,07 mM et 0,1 mM. Pour les puits incubés pendant 24 h, 100 μ L de DMEM-F12 supplémenté ont été ajoutés après 6 heures d'incubation afin de prolonger la culture dans des conditions plus

favorables. Afin de maintenir des conditions de volume homogènes entre tous les puits, 100 µL de milieu supplémenté ont également été ajoutés aux autres puits (30 min, 1 h, 6 h), bien que cela n'ait pas été strictement nécessaire. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triplicat. À la fin du temps d'incubation assigné, le milieu des puits concernés a été aspiré, et chaque puits a été rincé deux fois avec 200 µL de milieu de culture, puis trois fois avec 200 µL de PBS. Ensuite, 200 µL de milieu complet ont été ajoutés, et les cellules ont été replacées en incubation pendant 24 heures à 37 °C et à 5 % de CO₂. À l'issue de cette période, le milieu a été retiré, puis 100 µL d'une solution d'Alamar Blue diluée à 10 % dans du milieu supplémenté ont été ajoutés à chaque puits. Trois puits supplémentaires, sans cellules, ont reçu la même solution afin d'établir un contrôle de la fluorescence basale du milieu. L'Alamar Blue a été incubé pendant 4 heures au contact des cellules avant lecture de la fluorescence à 560/590 nm à l'aide du lecteur de plaques SpectraMax i3x (Molecular Devices). Le contrôle positif correspond aux cellules non traitées, dont l'activité métabolique intacte conduit à une réduction maximale de l'Alamar Blue. Le contrôle négatif a été obtenu en incubant des cellules non traitées avec 20 µL de Triton X-100 à 10 % pendant 30 minutes avant l'ajout d'Alamar Blue, induisant une activité métabolique minimale. Le pourcentage de viabilité a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ viabilité} = \frac{\text{Fluorescence de l'échantillon}}{\text{Fluorescence des cellules non traitées}} * 100$$

L'analyse statistique des résultats de viabilité cellulaire a été réalisée à l'aide du test de Student, en comparaison au contrôle correspondant aux cellules CHO-K1 non traitées (* : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0.001$).

f. Microscopie électronique à transmission des CHO-K1 incubées avec les MFL

Les cellules CHO-K1 ont étéensemencées dans 4 plaques ibidi de 8 puits (10 000 cellules/puits dans 200 µL). Les cellules ont été incubées à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO₂ pendant 24 heures, ensuite le milieu a été retiré, et du milieu non supplémenté a été ajouté. Les cellules ont été placées à température ambiante pendant 10 min, puis à 4 °C pendant 10 min. Le milieu a été aspiré à nouveau et les cellules ont été incubées avec des MFL ([lipides] = 0,15 mM, [fer] = 0,4 mM), des LUM ([lipides] = 0,15 mM, [fer] = 48,6 mM) ou des NPM ([fer] = 0,4 mM) dilués dans du milieu de culture DMEM/F12 non supplémenté. Les cellules ont été incubées pendant 30 min à 4 °C, puis lavées 2 fois avec du milieu de culture (200 µL)

Chapitre 4 : Étude de la fusion des liposomes magnétiques fusogènes avec des cellules

et 3 fois avec du PBS (200 μ L) à 4 °C. Chaque condition, en plus des cellules non traitées (contrôle), a été effectuée en quadruple. Les cellules ont été fixées avec du glutaraldéhyde (2 %) dans du tampon cacodylate (0,1 M, pH 7,4) à température ambiante pendant 1 h 30. Les cellules fixées ont été lavées 5 fois avec du tampon cacodylate (0,1 M, pH 7,4). Les échantillons ont ensuite été postfixés avec 1 % de tétroxyde d'osmium contenant 1,5 % de cyanoferrate de potassium pendant 1 heure à température ambiante, puis progressivement déshydratés dans de l'éthanol (de 50 % à 100 %) et inclus dans la résine époxy Agar 100. Des coupes minces (80 nm) ont été collectées sur des grilles de cuivre de 200 mesh, et contre-colorées avec du citrate de plomb avant observation avec un microscope électronique à transmission JEM-2100 fonctionnant à 80 kV avec un filament LaB6 (plateforme de microscopie électronique de l'Institut de Biologie Paris-Seine, Sorbonne Université). Les images ont été enregistrées avec une caméra CCD Veleta 2k x 2k, montée sur le côté, pilotée par le logiciel iTEM (Olympus). La préparation des échantillons, l'ultramicrotomie et les observations en TEM ont été réalisées par Michaël Trichet sur la plateforme de microscopie électronique de l'Institut de Biologie Paris-Seine (Sorbonne Université).

g. Test d'hyperthermie magnétique

i. Choix de l'intensité

Sous hotte à flux laminaire (PSM), 400 μ L de milieu DMEM/F12 supplémenté ont été ajoutés dans une boîte de Pétri. Celle-ci a ensuite été placée dans une enceinte thermostatée à 39 °C à l'aide d'un bain-marie. L'enceinte a ensuite été insérée au centre d'une bobine électromagnétique S56-1422 afin d'y appliquer un champ magnétique alternatif sur la boîte de Pétri. La température a été mesurée en continu tout au long de l'expérience à l'aide d'une sonde placée directement dans la solution. La température initiale mesurée était de 36,8 °C. Le champ magnétique a été appliqué au milieu de culture selon le programme suivant :

Etape	Contrôle	Fréquence (kHz)	Intensité (Gauss)	Condition de fin	Temps(s)
1	Aucun			Temps	60
2	Champ : mode 3	488	200	Température au-dessus de 40 °C	900
3	Aucun			Temps	300
4	Aucun			Température en-dessous de 37.5	600
5	Champ : mode 3	488	150	Température au-dessus de 40 °C	900
6	Aucun			Temps	300
7	Aucun			Température en-dessous de 37.5	600
8	Champ : mode 3	488	100	Température au-dessus de 40 °C	900
9	Aucun			Temps	300
10	Aucun			Température en-dessous de 37.5	600
11	Champ : mode 3	488	50	Température au-dessus de 40 °C	900
12	Aucun			Temps	300

Tableau 4.2 : Programme de CMA appliqué pour mesurer la température du milieu de culture.

ii. SLP des NPM

Dans une boîte de Pétri, 500 μ L d'une dispersion de NP de maghémite citratée diluée dans du milieu de culture DMEM/F12 supplémenté à une concentration de 150 mM ont été ajoutés. Celle-ci a ensuite été placée dans une enceinte non thermostatée, elle-même insérée au centre d'une bobine électromagnétique S56-1422 afin d'appliquer un champ magnétique alternatif sur la boîte de Pétri. La température a été mesurée en continu tout au long de l'expérience à l'aide d'une sonde placée directement dans la solution. La température initiale mesurée était de 22,7 °C. Le champ magnétique a été appliqué à la dispersion de NPM selon le programme suivant, dont les étapes 2 et 3 ont été reproduits 10 fois :

Etape	Contrôle	Fréquence (kHz)	Intensité (Gauss)	Condition de fin	Temps(s)
1	Aucun			Temps	60
2	Champ : mode 3	488	150	Température augmente de 3°C	900
3	Aucun			Température diminue de 2°C	900

Tableau 4.3 : Programme zigzag appliqué pour la mesure de la SLP des NPM.

iii. Test d'hyperthermie magnétique sur cellules CHO-K1 et SH-SY5Y

Des boîtes de Pétri compartimentées en 4 puits (2 avec les CHO-K1 et 6 avec les SH-SY5Y), préalablement traitées au collagène, ont étéensemencées avec 50 000 cellules/puits dans 500 μ L. Les cellules ont été incubées à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO₂ pendant 24 heures avant que le milieu ne soit retiré, et remplacé par un nouveau milieu non supplémenté (sans HI FBS et pen/strep) contenant des MFL à différentes concentrations lipidiques (0,05 mM ; 0,15 mM ; 0,25 mM), des liposomes cationiques DOTAP/DOPE/TopFluorPE/ PEGPE ([lipides] = 0,25 mM), ou des LUM ([lipides] = 0,25 mM). Les cellules ont été incubées pendant 30 min, puis lavées 3 fois avec du milieu de culture (200 μ L) et 3 fois avec du PBS (200 μ L), puis 300 μ L de milieu de culture supplémenté ont été ajoutés. Chaque condition, en plus des cellules non traitées (contrôle), a été effectuée une seule fois dans le cas des cellules CHO-K1 et en triplicat dans le cas des SH-SY5Y. Sur les deux boîtes (6 pour les SH-SY5Y) préparées dans le cas des CHO-K1, une boîte de Pétri (3 pour SH-SY5Y) a été mise à l'incubateur et l'autre dans une enceinte thermostatée par un bain-marie à 38 °C (CHO-K1) et 39 °C (SH-SY5Y). Cette enceinte a été conçue spécialement pour contenir les boîtes de Pétri et être placée dans la bobine S56-1422.

Chapitre 4 : Étude de la fusion des liposomes magnétiques fusogènes avec des cellules

Le programme suivant a été effectué, avec les étapes 2 et 3 qui ont été reproduites 20 ou 40 fois :

Etape	contrôle	Fréquence (kHz)	Intensité (Gauss)	Condition de fin	Temps (s)
1	Aucun			Temps	60
2	Champ: mode 3	488	150	Au dessus de 40 °C	900
3	Aucun			Temps	300

À la fin des cycles, la boîte de Pétri a été mise à l'incubateur pendant 24 h (37 °C, 5 % de CO₂) avant que le milieu ne soit retiré à nouveau, et qu'une solution d'Alamar Blue diluée à 10% avec du milieu de culture supplémenté ne soit ajoutée. L'Alamar Blue a été au contact des cellules pendant 4 h puis la fluorescence du milieu a été lue à 560/590 nm avec un lecteur de plaques SpectraMax i3x commercialisé par Molecular Devices.

Conclusion et perspectives

Ce travail de thèse a porté sur le développement de liposomes magnétiques fusogènes permettant de délivrer des nanoparticules magnétiques dans le cytosol des cellules. L'objectif était d'utiliser la fusion membranaire comme moyen de contournement de l'endocytose. En effet, les NPM sont généralement endocytées, ce qui a pour conséquence une chute drastique de leur propriété d'échauffement en hyperthermie magnétique, ainsi que la perte des possibilités de ciblage intracellulaire ou de recrutement de protéines.

Au cours de ce travail de thèse, des liposomes cationiques de type DOTAP/DOPE, bien décrits dans la littérature pour leurs propriétés fusogènes, encapsulant des nanoparticules magnétiques citratées, ont été synthétisés. Ces liposomes sont pégylés, ce qui leur assure une bonne stabilité dans l'eau et dans un tampon HEPES, et sont fluorescents, ce qui permet leur suivi en microscopie confocale. De plus, les MFL conservent les propriétés superparamagnétiques des NPM encapsulées.

La fusion des MFL a d'abord été étudiée sur des systèmes modèles constitués de liposomes unilamellaires de grande taille (LUV), dont la taille et la charge étaient rigoureusement contrôlées. L'analyse de l'évolution du diamètre hydrodynamique, du potentiel zêta et de l'enthalpie de réaction au cours du titrage des MFL par des LUV anioniques ou zwitterioniques a permis de confirmer l'hypothèse initiale selon laquelle la fusion entre les MFL et ces systèmes modèles est médiée par des interactions électrostatiques. La preuve de la fusion lipidique à proprement parler a été apportée par les expériences de transfert de fluorescence (FRET) réalisées en microscopie confocale. Par ailleurs, la variation de la composition lipidique des LUV cationiques a révélé que ni les nanoparticules magnétiques ni le PEG n'affectent significativement la réaction de fusion, tandis que l'incorporation de TopFluorPE la favorise. Toutefois, le devenir des nanoparticules magnétiques après fusion reste à éclaircir même si nous avons la preuve, grâce aux expériences de magnétophorèse, qu'il y a bien un transfert de la charge magnétique aux liposomes fusionnés.

La fusion des MFL a ensuite été étudiée *in vitro* sur deux lignées cellulaires à l'aide de différentes approches complémentaires. Dans un premier temps, des observations en microscopie confocale ont permis de confirmer le transfert de fluorescence des MFL vers la membrane cellulaire. Ce transfert n'a été observé qu'avec des liposomes fusogènes, par comparaison avec des liposomes non fusogènes. Ensuite, les observations réalisées en microscopie à 4 °C, afin de bloquer l'endocytose, ont révélé la présence de nanoparticules libres dans le cytosol et la présence de clusters de NPM à la surface des cellules, attestant d'une forte

Conclusion générale

interaction électrostatique. Enfin, l'impact de l'hyperthermie magnétique sur la viabilité cellulaire a été évalué. Aucune mortalité cellulaire induite par ce traitement n'a toutefois été détectée après incubation avec les MFL. Parallèlement, des tests de viabilité ont confirmé une toxicité du DOTAP dépendante de la dose.

La fusion des MFL avec des vésicules extracellulaires (EV) a également été étudiée dans le cadre du stage de Master 2 de Sofia Liz Basteiro, que j'ai co-encadré. D'un point de vue technologique, ces MFL présentent un intérêt certain pour la préparation d'objets hybrides. Les vésicules extracellulaires sont de petites vésicules sphériques (20 à 400 nm de diamètre) d'origine lipidique et de nature anionique, libérées par la plupart des cellules eucaryotes via le bourgeonnement de la membrane plasmique. Elles sont capables de transporter diverses biomolécules, telles que des protéines, des lipides ou encore des acides nucléiques (**Figure 1A**). L'objectif de ce travail était d'explorer le potentiel synergique de la fusion entre EV et MFL comme stratégie d'ingénierie des vésicules extracellulaires. Cette approche visait à combiner les propriétés biologiques natives des EV avec les fonctionnalités des nanoparticules magnétiques (NPM), qui représentent des outils efficaces pour la séparation et la concentration des EV. Un suivi rigoureux des deux populations (EV et MFL), à l'aide de différentes techniques de mesure de taille, a permis de mettre en évidence l'apparition d'une nouvelle population correspondant aux objets hybrides. De plus, des événements de transfert des NPM vers les EV ont pu être observés en cryoTEM (**Figure 1B**).

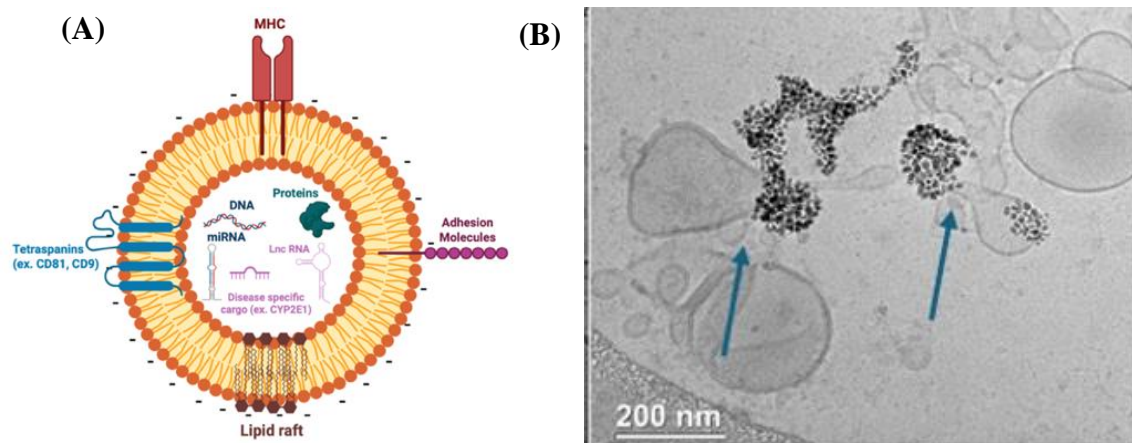


Figure 1 : (A) Schéma d'une vésicule extracellulaire, (B) image de CryoTEM de vésicules extracellulaires après fusion avec des MFL.

Nous avons ainsi réussi à concevoir des liposomes magnétiques qui fusionnent avec des membranes modèles, des vésicules extracellulaires et des cellules. Toutefois, plusieurs axes d'optimisation restent à explorer, notamment pour améliorer le suivi des nanoparticules magnétiques et obtenir une réponse plus marquée en hyperthermie magnétique.

Sur le premier point, des travaux sont en cours dans le cadre du stage de Master 2 de Carlos Pizarro Plaza, visant à adapter la méthode de synthèse d'évaporation en phase inverse (REV) à l'encapsulation de nanoparticules à la fois magnétiques et fluorescentes. Deux types de nanoparticules sont actuellement testés : des structures cœur-coquille ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$), contenant un fluorophore encapsulé dans la couche de silice, et des nanoparticules de magnétite fonctionnalisées en surface par un ligand dopaminique fluorescent. Ces deux systèmes présentent des tailles et des charges de surface différentes, rendant leur encapsulation dans les liposomes particulièrement délicate et nécessitant une optimisation fine des conditions de formulation.

Concernant l'hyperthermie magnétique, plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'absence de mortalité cellulaire observée dans nos conditions expérimentales. D'une part, une concentration insuffisante de nanoparticules dans le cytosol pourrait ne pas permettre un échauffement intracellulaire suffisant. Dans ce cas, une réévaluation de la formulation des MFL peut être nécessaire en modifiant la nature des NPM encapsulées et en optant pour des nanoparticules ayant une efficacité en hyperthermie supérieure comme des nanofleurs, ou des nanoparticules plus grosses et plus monodisperses. D'autre part, le protocole d'hyperthermie utilisé, bien qu'il garantisse un contrôle rigoureux des paramètres expérimentaux et limite les biais d'échauffement du milieu extracellulaire, pourrait être optimisé davantage. En particulier, il serait pertinent d'explorer l'influence du champ et de la fréquence sur les performances d'hyperthermie en cellules. Les méthodes d'analyse post-traitement pourraient également être approfondies, en incluant des tests complémentaires d'évaluation de la viabilité ou de l'activité métabolique.

Une autre piste d'amélioration concerne la formulation des MFL, en particulier la possibilité de substituer le DOTAP, dont la toxicité est bien documentée, par des lipides ionisables. Ces derniers présentent un comportement pH-dépendant : ils sont cationiques en milieu acide, mais deviennent neutres ou zwitterioniques à pH physiologique. Cette propriété peut être exploitée pour favoriser la fusion avec les membranes endosomales et permettre une libération cytosolique efficace des NPM. En effet, après internalisation par endocytose,

Conclusion générale

l'acidification progressive de l'endosome induit un changement de charge des lipides, favorisant leur fusion avec la membrane endosomale et la libération du contenu dans le cytosol. Ce mécanisme présente également l'avantage de limiter la toxicité souvent associée aux lipides cationiques permanents. Par ailleurs, l'utilisation de lipides ionisables permettrait de limiter les interactions indésirables entre les NPM et les lipides lors de la formulation, ce qui pourrait faciliter l'encapsulation de concentrations plus élevées de NPM dans les liposomes.

Enfin, bien que les NPM aient été principalement utilisées ici pour leur potentiel en hyperthermie magnétique, le système de liposomes fusogènes développé pourrait être extrapolé à d'autres types de nanoparticules fonctionnalisées, par exemple pour le ciblage intracellulaire spécifique, la libération contrôlée de médicaments ou le suivi de biomolécules. Cette approche ouvre ainsi la voie à des applications thérapeutiques et diagnostiques plus larges dans le domaine de la nanomédecine.

Bibliographie

- (1) Cooper, G. M. *La cellule: Une approche moléculaire*; De Boeck Supérieur, 1999.
- (2) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed.; Garland Science, 2002.
- (3) Pollard, T. D.; Earnshaw, W. C.; Lippincott-Schwartz, J.; Johnson, G. *Cell Biology - Edition 4*, Elsevier.; 2023.
- (4) Lodish, H.; Berk, A.; Kaiser, C. A.; Amon, A.; Ploegh, H.; Bretscher, A.; Krieger, M.; Martin, K. C. *Molecular Cell Biology*; Macmillan Learning, 2016.
- (5) Mitchell, P. Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation. 1966. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, 1807 (12), 1507–1538. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.09.018>.
- (6) Rothman, J. E. Mechanisms of Intracellular Protein Transport. *Nature* **1994**, 372 (6501), 55–63. <https://doi.org/10.1038/372055a0>.
- (7) Farquhar, M. G.; Palade, G. E. The Golgi Apparatus (Complex)-(1954-1981)-from Artifact to Center Stage. *J. Cell Biol.* **1981**, 91 (3 Pt 2), 77s–103s. <https://doi.org/10.1083/jcb.91.3.77s>.
- (8) De Duve, C. The Lysosome Concept. In *Ciba Foundation Symposium - Anterior Pituitary Secretion (Book I of Colloquia on Endocrinology)*; John Wiley & Sons, Ltd, 1963; pp 1–35. <https://doi.org/10.1002/9780470715314.ch1>.
- (9) Lazarow, P. B.; Fujiki, Y. Biogenesis of Peroxisomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1985**, 1, 489–530. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.01.110185.002421>.
- (10) François-Martin, C. Mesure expérimentale de l'énergie d'activation de la fusion de membranes lipidiques, Ecole normale supérieure, Paris, France, 2016.
- (11) Carmen Martínez, M.; Kunzelmann, C.; Freyssinet, J.-M. Plasma membrane remodelling and cell stimulation. *médecine/sciences* **2004**, 20 (2), 189–195. <https://doi.org/10.1051/medsci/2004202189>.
- (12) Singer, S. J.; Nicolson, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes: Cell Membranes Are Viewed as Two-Dimensional Solutions of Oriented Globular Proteins and Lipids. *Science* **1972**, 175 (4023), 720–731. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>.
- (13) Mouritsen, O. G.; Bagatolli, L. A. Lipid Domains in Model Membranes: A Brief Historical Perspective. *Essays Biochem.* **2015**, 57, 1–19. <https://doi.org/10.1042/bse0570001>.
- (14) Sezgin, E.; Levental, I.; Mayor, S.; Eggeling, C. The Mystery of Membrane Organization: Composition, Regulation and Roles of Lipid Rafts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, 18 (6), 361–374. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16>.
- (15) Eibl, H. Phospholipids as Functional Constituents of Biomembranes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, 23 (4), 257–271. <https://doi.org/10.1002/anie.198402573>.
- (16) Dowhan, W. MOLECULAR BASIS FOR MEMBRANE PHOSPHOLIPID DIVERSITY: Why Are There So Many Lipids? *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, 66, 199–232. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.199>.
- (17) Le Jeune, M. Fonctionnalisation de nanoparticules magnétiques par des peptides cationiques: vers un accès au cytosol, Sorbonne-université, Paris, France, 2022.
- (18) Zachowski, A. Phospholipids in Animal Eukaryotic Membranes: Transverse Asymmetry and Movement. *Biochem. J.* **1993**, 294 (1), 1–14. <https://doi.org/10.1042/bj2940001>.

- (19) Yeagle, P. L. Cholesterol and the Cell Membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 822 (3–4), 267–287. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(85\)90011-5](https://doi.org/10.1016/0304-4157(85)90011-5).
- (20) Van Meer, G.; Voelker, D. R.; Feigenson, G. W. Membrane Lipids: Where They Are and How They Behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, 9 (2), 112–124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>.
- (21) Chernomordik, L. V.; Kozlov, M. M. Mechanics of Membrane Fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, 15 (7), 675–683. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1455>.
- (22) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. Membrane Proteins. In *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*; Garland Science, 2002.
- (23) Varki, A. Biological Roles of Glycans. *Glycobiology* **2017**, 27 (1), 3–49. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww086>.
- (24) Luo, M. Influenza Virus Entry. In *Viral Molecular Machines*; Rossmann, M. G., Rao, V. B., Eds.; Springer US: Boston, MA, 2012; pp 201–221. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9_9.
- (25) Li, X.; Li, Z.-H.; Wang, Y.-X.; Liu, T.-H. A Comprehensive Review of Human Trophoblast Fusion Models: Recent Developments and Challenges. *Cell Death Discov.* **2023**, 9 (1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01670-0>.
- (26) Gerbaud, P.; Pidoux, G. An Overview of Molecular Events Occurring in Human Trophoblast Fusion. *Placenta* **2015**, 36 (1), 35–42.
- (27) Favier, S. Rôle de la protéine ovocytaire JUNO dans le mécanisme de blocage à la polyspermie chez les mammifères. phdthesis, Sorbonne Université, Paris, France, 2020. <https://theses.hal.science/tel-03482588> (accessed 2025-02-14).
- (28) Norman, C. A.; Krishnakumar, S. S.; Timofeeva, Y.; Volynski, K. E. The Release of Inhibition Model Reproduces Kinetics and Plasticity of Neurotransmitter Release in Central Synapses. *Commun. Biol.* **2023**, 6 (1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05445-2>.
- (29) Stein, K. K.; Primakoff, P.; Myles, D. Sperm-Egg Fusion: Events at the Plasma Membrane. *J. Cell Sci.* **2004**, 117 (26), 6269–6274. <https://doi.org/10.1242/jcs.01598>.
- (30) Joardar, A.; Pattnaik, G. P.; Chakraborty, H. Mechanism of Membrane Fusion: Interplay of Lipid and Peptide. *J. Membr. Biol.* **2022**, 255 (2), 211–224. <https://doi.org/10.1007/s00232-022-00233-1>.
- (31) Poojari, C. S.; Scherer, K. C.; Hub, J. S. Free Energies of Membrane Stalk Formation from a Lipidomics Perspective. *Nat. Commun.* **2021**, 12 (1), 6594. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26924-2>.
- (32) Leikin, S. L.; Kozlov, M. M.; Chernomordik, L. V.; Markin, V. S.; Chizmadzhev, Y. A. Membrane Fusion: Overcoming of the Hydration Barrier and Local Restructuring. *J. Theor. Biol.* **1987**, 129 (4), 411–425. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(87\)80021-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(87)80021-8).
- (33) Akimov, S. A.; Molotkovsky, R. J.; Kuzmin, P. I.; Galimzyanov, T. R.; Batishchev, O. V. Continuum Models of Membrane Fusion: Evolution of the Theory. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21 (11), 3875. <https://doi.org/10.3390/ijms21113875>.
- (34) Bayburt, T. H.; Grinkova, Y. V.; Sligar, S. G. Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins. *Nano Lett.* **2002**, 2 (8), 853–856. <https://doi.org/10.1021/nl025623k>.

- (35) Knecht, V.; Marrink, S.-J. Molecular Dynamics Simulations of Lipid Vesicle Fusion in Atomic Detail. *Biophys. J.* **2007**, *92* (12), 4254–4261. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.103572>.
- (36) Kozlovsky, Y.; Chernomordik, L. V.; Kozlov, M. M. Lipid Intermediates in Membrane Fusion: Formation, Structure, and Decay of Hemifusion Diaphragm. *Biophys. J.* **2002**, *83* (5), 2634–2651. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75274-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75274-0).
- (37) Katsov, K.; Müller, M.; Schick, M. Field Theoretic Study of Bilayer Membrane Fusion. I. Hemifusion Mechanism. *Biophys. J.* **2004**, *87* (5), 3277–3290. <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.038943>.
- (38) Marrink, S. J.; Mark, A. E. The Mechanism of Vesicle Fusion as Revealed by Molecular Dynamics Simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (37), 11144–11145. <https://doi.org/10.1021/ja036138+>.
- (39) Kamp, F.; Exner, N.; Lutz, A. K.; Wender, N.; Hegermann, J.; Brunner, B.; Nuscher, B.; Bartels, T.; Giese, A.; Beyer, K.; Eimer, S.; Winklhofer, K. F.; Haass, C. Inhibition of Mitochondrial Fusion by α -Synuclein Is Rescued by PINK1, Parkin and DJ-1. *EMBO J.* **2010**, *29* (20), 3571. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.223>.
- (40) Nikolaus, J.; Stöckl, M.; Langosch, D.; Volkmer, R.; Herrmann, A. Direct Visualization of Large and Protein-Free Hemifusion Diaphragms. *Biophys. J.* **2010**, *98* (7), 1192–1199. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.11.042>.
- (41) Hernandez, J. M.; Stein, A.; Behrmann, E.; Riedel, D.; Cypionka, A.; Farsi, Z.; Walla, P. J.; Raunser, S.; Jahn, R. Membrane Fusion Intermediates via Directional and Full Assembly of the SNARE Complex. *Science* **2012**, *336* (6088), 1581–1584. <https://doi.org/10.1126/science.1221976>.
- (42) Chernomordik, L. Non-Bilayer Lipids and Biological Fusion Intermediates. *Chem. Phys. Lipids* **1996**, *81* (2), 203–213. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(96\)02583-2](https://doi.org/10.1016/0009-3084(96)02583-2).
- (43) Bangham, A. D.; Horne, R. W. Negative Staining of Phospholipids and Their Structural Modification by Surface-Active Agents as Observed in the Electron Microscope. *J. Mol. Biol.* **1964**, *8* (5), 660–668. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(64\)80115-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(64)80115-7).
- (44) Lesoin, L. Formation de liposomes par un procédé innovant utilisant les fluides supercritiques, Université paul cézanne aix-marseille 3, Aix-Marseille, France, 2011.
- (45) Lorin, A.; Flore, C.; Thomas, A.; Brasseur, R. Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnol Agron Soc Env.* **2004**, *8* (3), 163–176.
- (46) Bozzuto, G.; and Molinari, A. Liposomes as Nanomedical Devices. *Int. J. Nanomedicine* **2015**, *10*, 975–999. <https://doi.org/10.2147/IJN.S68861>.
- (47) Lasic, D. Liposomes. *Am. Sci.* **1992**, *80* (1), 20–31.
- (48) Trucillo, P.; Campardelli, R.; Reverchon, E. Liposomes: From Bangham to Supercritical Fluids. *Processes* **2020**, *8* (9), 1022. <https://doi.org/10.3390/pr8091022>.
- (49) Drescher, S.; van Hoogevest, P. The Phospholipid Research Center: Current Research in Phospholipids and Their Use in Drug Delivery. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (12), 1235. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121235>.
- (50) Maghsoudi, S.; Hosseini, S. A.; Ravandi, S. A Review on Phospholipid and Liposome Carriers: Synthetic Methods and Their Applications in Drug Delivery. *J. Chem. Rev.* **2022**, *4* (4), 346–363. <https://doi.org/10.22034/jcr.2022.355104.1182>.

- (51) N. Israelachvili, J.; John Mitchell, D.; W. Ninham, B. Theory of Self-Assembly of Hydrocarbon Amphiphiles into Micelles and Bilayers. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2 Mol. Chem. Phys.* **1976**, *72* (0), 1525–1568. <https://doi.org/10.1039/F29767201525>.
- (52) Nagarajan, R. Molecular Packing Parameter and Surfactant Self-Assembly: The Neglected Role of the Surfactant Tail. *Langmuir* **2002**, *18* (1), 31–38. <https://doi.org/10.1021/la010831y>.
- (53) Karunakaran, B.; Gupta, R.; Patel, P.; Salave, S.; Sharma, A.; Desai, D.; Benival, D.; Kommineni, N. Emerging Trends in Lipid-Based Vaccine Delivery: A Special Focus on Developmental Strategies, Fabrication Methods, and Applications. *Vaccines* **2023**, *11* (3), 661. <https://doi.org/10.3390/vaccines11030661>.
- (54) Angelova, M. I.; Dimitrov, D. S. Liposome Electroformation. *Faraday Discuss Chem SOC* **1986**, *81*, 303–311. <https://doi.org/10.1039/DC9868100303>.
- (55) Weinberger, A.; Tsai, F.-C.; Koenderink, G. H.; Schmidt, T. F.; Itri, R.; Meier, W.; Schmatko, T.; Schröder, A.; Marques, C. Gel-Assisted Formation of Giant Unilamellar Vesicles. *Biophys. J.* **2013**, *105* (1), 154–164. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.05.024>.
- (56) Faizi, H. A.; Tsui, A.; Dimova, R.; Vlahovska, P. M. Bending Rigidity, Capacitance, and Shear Viscosity of Giant Vesicle Membranes Prepared by Spontaneous Swelling, Electroformation, Gel-Assisted, and Phase Transfer Methods: A Comparative Study. *Langmuir* **2022**, *38* (34), 10548–10557. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c01402>.
- (57) Liu, P.; Chen, G.; Zhang, J. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. *Molecules* **2022**, *27* (4), 1372. <https://doi.org/10.3390/molecules27041372>.
- (58) Taylor, K. M. G.; Morris, R. M. Thermal Analysis of Phase Transition Behaviour in Liposomes. *Thermochim. Acta* **1995**, *248*, 289–301. [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(94\)01884-J](https://doi.org/10.1016/0040-6031(94)01884-J).
- (59) Sassaroli, E.; Vykhodtseva, N. Acoustic Neuromodulation from a Basic Science Prospective. *J. Ther. Ultrasound* **2016**, *4*, 17. <https://doi.org/10.1186/s40349-016-0061-z>.
- (60) Chapman, D. Phase Transitions and Fluidity Characteristics of Lipids and Cell Membranes. *Q. Rev. Biophys.* **1975**, *8* (2), 185–235. <https://doi.org/10.1017/s0033583500001797>.
- (61) Cullis, P. R.; de Kruijff, B. Lipid Polymorphism and the Functional Roles of Lipids in Biological Membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *559* (4), 399–420. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(79\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0304-4157(79)90012-1).
- (62) Tocanne, J.-F.; Dupou-Cézanne, L.; Lopez, A. Lateral Diffusion of Lipids in Model and Natural Membranes. *Prog. Lipid Res.* **1994**, *33* (3), 203–237. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(94\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0163-7827(94)90027-2).
- (63) Contreras, F.-X.; Sánchez-Magraner, L.; Alonso, A.; Goñi, F. M. Transbilayer (*Flip-Flop*) Lipid Motion and Lipid Scrambling in Membranes. *FEBS Lett.* **2010**, *584* (9), 1779–1786. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.12.049>.
- (64) Pomorski, T.; Menon, A. K. Lipid Flippases and Their Biological Functions. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2006**, *63* (24), 2908–2921. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6167-7>.
- (65) Nelson, D. L.; Lehninger, A. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*; W. H. Freeman, 2008.
- (66) Paula, S.; Volkov, A. G.; Van Hoek, A. N.; Haines, T. H.; Deamer, D. W. Permeation of Protons, Potassium Ions, and Small Polar Molecules through Phospholipid Bilayers as a Function of Membrane Thickness. *Biophys. J.* **1996**, *70* (1), 339–348. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79575-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79575-9).

- (67) Nagle, J. F.; Tristram-Nagle, S. Structure of Lipid Bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1469* (3), 159–195. [https://doi.org/10.1016/s0304-4157\(00\)00016-2](https://doi.org/10.1016/s0304-4157(00)00016-2).
- (68) Deamer, D. W.; Bramhall, J. Permeability of Lipid Bilayers to Water and Ionic Solutes. *Chem. Phys. Lipids* **1986**, *40* (2), 167–188. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(86\)90069-1](https://doi.org/10.1016/0009-3084(86)90069-1).
- (69) Missner, A.; Pohl, P. 110 Years of the Meyer-Overton Rule: Predicting Membrane Permeability of Gases and Other Small Compounds. *Chemphyschem Eur. J. Chem. Phys. Phys. Chem.* **2009**, *10* (9–10), 1405–1414. <https://doi.org/10.1002/cphc.200900270>.
- (70) Hille, B. Ionic Channels in Excitable Membranes. Current Problems and Biophysical Approaches. *Biophys. J.* **1978**, *22* (2), 283–294. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(78\)85489-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(78)85489-7).
- (71) Walter, A.; Gutknecht, J. Permeability of Small Nonelectrolytes through Lipid Bilayer Membranes. *J. Membr. Biol.* **1986**, *90* (3), 207–217. <https://doi.org/10.1007/BF01870127>.
- (72) Lingappa, V. R.; Farey, K. *Physiological Medicine: A Clinical Approach to Basic Medical Physiology*; McGraw-Hill, 2000.
- (73) Heimburg, T. *Thermal Biophysics of Membranes*; John Wiley & Sons, 2008.
- (74) Frallicciardi, J.; Melcr, J.; Siginou, P.; Marrink, S. J.; Poolman, B. Membrane Thickness, Lipid Phase and Sterol Type Are Determining Factors in the Permeability of Membranes to Small Solutes. *Nat. Commun.* **2022**, *13* (1), 1605. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29272-x>.
- (75) Ghysels, A.; Krämer, A.; Venable, R. M.; Teague, W. E.; Lyman, E.; Gawrisch, K.; Pastor, R. W. Permeability of Membranes in the Liquid Ordered and Liquid Disordered Phases. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 5616. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13432-7>.
- (76) Zimmerberg, J.; Kozlov, M. M. How Proteins Produce Cellular Membrane Curvature. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7* (1), 9–19. <https://doi.org/10.1038/nrm1784>.
- (77) Cooke, I. R.; Deserno, M. Coupling between Lipid Shape and Membrane Curvature. *Biophys. J.* **2006**, *91* (2), 487–495. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.078683>.
- (78) Mouritsen, O. G. Lipids, Curvature, and Nano-Medicine. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2011**, *113* (10), 1174–1187. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100050>.
- (79) McMahon, H. T.; Gallop, J. L. Membrane Curvature and Mechanisms of Dynamic Cell Membrane Remodelling. *Nature* **2005**, *438* (7068), 590–596. <https://doi.org/10.1038/nature04396>.
- (80) *What is membrane curvature? - Mechanobiology Institute, National University of Singapore.* <https://www.mbi.nus.edu.sg/mbinfo/what-is-membrane-curvature/> (accessed 2025-07-03).
- (81) Olusanya, T. O. B.; Haj Ahmad, R. R.; Ibegbu, D. M.; Smith, J. R.; Elkordy, A. A. Liposomal Drug Delivery Systems and Anticancer Drugs. *Molecules* **2018**, *23* (4), 907. <https://doi.org/10.3390/molecules23040907>.
- (82) Torchilin, V. P. Recent Advances with Liposomes as Pharmaceutical Carriers. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4* (2), 145–160. <https://doi.org/10.1038/nrd1632>.
- (83) Allen, T. M.; Cullis, P. R. Liposomal Drug Delivery Systems: From Concept to Clinical Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65* (1), 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037>.
- (84) Kiessling, V.; Liang, B.; Tamm, L. K. Reconstituting SNARE-Mediated Membrane Fusion at the Single Liposome Level. *Methods Cell Biol.* **2015**, *128*, 339–363. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2015.02.005>.

- (85) Weber, T.; Zemelman, B. V.; McNew, J. A.; Westermann, B.; Gmachl, M.; Parlati, F.; Söllner, T. H.; Rothman, J. E. SNAREpins: Minimal Machinery for Membrane Fusion. *Cell* **1998**, *92* (6), 759–772. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81404-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81404-x).
- (86) Epand, R. M. Fusion Peptides and the Mechanism of Viral Fusion. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2003**, *1614* (1), 116–121. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00169-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00169-X).
- (87) Apellániz, B.; Huarte, N.; Largo, E.; Nieva, J. L. The Three Lives of Viral Fusion Peptides. *Chem. Phys. Lipids* **2014**, *181*, 40–55. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2014.03.003>.
- (88) White, J. M.; Delos, S. E.; Brecher, M.; Schornberg, K. Structures and Mechanisms of Viral Membrane Fusion Proteins: Multiple Variations on a Common Theme. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2008**, *43* (3), 189–219. <https://doi.org/10.1080/10409230802058320>.
- (89) Melikyan, G. B.; Chernomordik, L. V. Membrane Rearrangements in Fusion Mediated by Viral Proteins. *Trends Microbiol.* **1997**, *5* (9), 349–355. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(97\)01107-4](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)01107-4).
- (90) Versluis, F.; Voskuhl, J.; van Kolck, B.; Zope, H.; Bremmer, M.; Albregtse, T.; Kros, A. In Situ Modification of Plain Liposomes with Lipidated Coiled Coil Forming Peptides Induces Membrane Fusion. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (21), 8057–8062. <https://doi.org/10.1021/ja4031227>.
- (91) Yang, J.; Bahreman, A.; Daudey, G.; Bussmann, J.; Olsthoorn, R. C. L.; Kros, A. Drug Delivery via Cell Membrane Fusion Using Lipopeptide Modified Liposomes. *ACS Cent. Sci.* **2016**, *2* (9), 621–630. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.6b00172>.
- (92) Pavlov, R. V.; Akimov, S. A.; Dashinimaev, E. B.; Bashkirov, P. V. Boosting Lipofection Efficiency Through Enhanced Membrane Fusion Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25* (24), 13540. <https://doi.org/10.3390/ijms252413540>.
- (93) Lewis, R. N. A. H.; Zhang, Y.-P.; McElhaney, R. N. Calorimetric and Spectroscopic Studies of the Phase Behavior and Organization of Lipid Bilayer Model Membranes Composed of Binary Mixtures of Dimyristoylphosphatidylcholine and Dimyristoylphosphatidylglycerol. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2005**, *1668* (2), 203–214. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.12.007>.
- (94) Kozlovsky, Y.; Kozlov, M. M. Stalk Model of Membrane Fusion: Solution of Energy Crisis. *Biophys. J.* **2002**, *82* (2), 882–895. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75450-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75450-7).
- (95) Siegel, D. P. The Modified Stalk Mechanism of Lamellar/Inverted Phase Transitions and Its Implications for Membrane Fusion. *Biophys. J.* **1999**, *76* (1 Pt 1), 291–313. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77197-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77197-3).
- (96) Mouritsen, O. G.; Zuckermann, M. J. What's so Special about Cholesterol? *Lipids* **2004**, *39* (11), 1101–1113. <https://doi.org/10.1007/s11745-004-1336-x>.
- (97) Chernomordik, L. V.; Frolov, V. A.; Leikina, E.; Bronk, P.; Zimmerberg, J. The Pathway of Membrane Fusion Catalyzed by Influenza Hemagglutinin: Restriction of Lipids, Hemifusion, and Lipidic Fusion Pore Formation. *J. Cell Biol.* **1998**, *140* (6), 1369–1382. <https://doi.org/10.1083/jcb.140.6.1369>.
- (98) Markin, V. S.; Albanesi, J. P. Membrane Fusion: Stalk Model Revisited. *Biophys. J.* **2002**, *82* (2), 693–712. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75432-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75432-5).
- (99) Templeton, N. S.; Lasic, D. D.; Frederik, P. M.; Strey, H. H.; Roberts, D. D.; Pavlakis, G. N. Improved DNA: Liposome Complexes for Increased Systemic Delivery and Gene Expression. *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15* (7), 647–652. <https://doi.org/10.1038/nbt0797-647>.

- (100) Simões, S.; Filipe, A.; Faneca, H.; Mano, M.; Penacho, N.; Düzgiñes, N.; de Lima, M. P. Cationic Liposomes for Gene Delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2005**, *2* (2), 237–254. <https://doi.org/10.1517/17425247.2.2.237>.
- (101) Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M. Lipofection: A Highly Efficient, Lipid-Mediated DNA-Transfection Procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84* (21), 7413–7417. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.21.7413>.
- (102) Wasungu, L.; Hoekstra, D. Cationic Lipids, Lipoplexes and Intracellular Delivery of Genes. *J. Controlled Release* **2006**, *116* (2), 255–264. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.06.024>.
- (103) Zuhorn, I. S.; Oberle, V.; Visser, W. H.; Engberts, J. B. F. N.; Bakowsky, U.; Polushkin, E.; Hoekstra, D. Phase Behavior of Cationic Amphiphiles and Their Mixtures with Helper Lipid Influences Lipoplex Shape, DNA Translocation, and Transfection Efficiency. *Biophys. J.* **2002**, *83* (4), 2096–2108. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)73970-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)73970-2).
- (104) Koynova, R.; Tenchov, B. Cationic Lipids: Molecular Structure/ Transfection Activity Relationships and Interactions with Biomembranes. *Top. Curr. Chem.* **2010**, *296*, 51–93. https://doi.org/10.1007/128_2010_67.
- (105) Kube, S.; Hersch, N.; Naumovska, E.; Gensch, T.; Hendriks, J.; Franzen, A.; Landvogt, L.; Siebrasse, J.-P.; Kubitschek, U.; Hoffmann, B.; Merkel, R.; Csiszár, A. Fusogenic Liposomes as Nanocarriers for the Delivery of Intracellular Proteins. *Langmuir* **2017**, *33* (4), 1051–1059. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b04304>.
- (106) Zhao, C.; Wang, C.; Shan, W.; Wang, W.; Deng, H. Fusogenic Lipid Nanovesicle for Biomacromolecular Delivery. *Nano Lett.* **2024**, *24* (28), 8609–8618. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.4c01709>.
- (107) Csiszár, A.; Csiszar, A.; Pinto, J. T.; Gautam, T.; Kleusch, C.; Hoffmann, B.; Tucsek, Z.; Toth, P.; Sonntag, W. E.; Ungvari, Z. Resveratrol Encapsulated in Novel Fusogenic Liposomes Activates Nrf2 and Attenuates Oxidative Stress in Cerebromicrovascular Endothelial Cells From Aged Rats. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **2015**, *70* (3), 303–313. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu029>.
- (108) Butera, E.; Dupont, A.; Aimé, A.; Ducarre, S.; Chiechio, R. M.; Even-Hernandez, P.; Contino, A.; Maccarone, G.; Ravel, C.; Marchi, V. In Situ Labeling of the Aqueous Compartment of Extracellular Vesicles with Luminescent Gold Nanoclusters. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2024**, *16* (17), 21643–21652. <https://doi.org/10.1021/acsami.4c02445>.
- (109) Li, X.; Wei, J.; Aifantis, K. E.; Fan, Y.; Feng, Q.; Cui, F.-Z.; Watari, F. Current Investigations into Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2016**, *104* (5), 1285–1296. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35654>.
- (110) Dulińska-Litewka, J.; Łazarczyk, A.; Hałubiec, P.; Szafranski, O.; Karnas, K.; Karewicz, A. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles—Current and Prospective Medical Applications. *Materials* **2019**, *12* (4), 617. <https://doi.org/10.3390/ma12040617>.
- (111) Gossuin, Y.; Gillis, P.; Hocq, A.; Vuong, Q. L.; Roch, A. Magnetic Resonance Relaxation Properties of Superparamagnetic Particles. *WIREs Nanomedicine Nanobiotechnology* **2009**, *1* (3), 299–310. <https://doi.org/10.1002/wnan.36>.
- (112) Wu, W.; Wu, Z.; Yu, T.; Jiang, C.; Kim, W.-S. Recent Progress on Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Surface Functional Strategies and Biomedical Applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2015**, *16* (2), 023501. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/16/2/023501>.

Bibliographie

- (113) Cornell, R. M.; Schwertmann, U. *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*; John Wiley & Sons, 2003.
- (114) Morrish, A. H. *The Physical Principles of Magnetism*; R. E. Krieger Publishing Company, 1980.
- (115) Cullity, B. D.; Graham, C. D. *Introduction to Magnetic Materials*, Second edition.; IEEE Press: Piscataway, 2009. <https://doi.org/10.1002/9780470386323>.
- (116) Qiao, R.; Yang, C.; Gao, M. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles : From Preparations to in Vivo MRI Applications. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19* (35), 6274–6293. <https://doi.org/10.1039/B902394A>.
- (117) Mousli-Saada, S. E. Elaboration de nanoparticules magnétiques anisotropes et étude de leurs voies d’internalisation cellulaire. phdthesis, Sorbonne Université, 2022. <https://theses.hal.science/tel-03884548> (accessed 2023-08-31).
- (118) Dormann, J. L.; Fiorani, D.; Tronc, E. Magnetic Relaxation in Fine-Particle Systems. In *Advances in Chemical Physics*; John Wiley & Sons, Ltd, 1997; pp 283–494. <https://doi.org/10.1002/9780470141571.ch4>.
- (119) Néel, L. Théorie Du Traînage Magnétique Des Ferromagnétiques En Grains Fins Avec Application Aux Terres Cuites. *Ann. Géophysique* **1949**, *5*, 99–136. <https://hal.science/hal-03070532v1>.
- (120) Bean, C. P.; Livingston, J. D. Superparamagnetism. *J. Appl. Phys.* **1959**, *30* (4), S120–S129. <https://doi.org/10.1063/1.2185850>.
- (121) Frey, N. A.; Peng, S.; Cheng, K.; Sun, S. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Functionalization, and Applications in Bioimaging and Magnetic Energy Storage. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (9), 2532. <https://doi.org/10.1039/b815548h>.
- (122) *Surface Effects in Magnetic Nanoparticles*; Fiorani, D., Ed.; Nanostructure Science and Technology; Springer US: Boston, MA, 2005. <https://doi.org/10.1007/b136494>.
- (123) Singh, N.; Jenkins, G. J. S.; Asadi, R.; Doak, S. H. Potential Toxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPION). *Nano Rev.* **2010**, *1* (1), 5358. <https://doi.org/10.3402/nano.v1i0.5358>.
- (124) Damadian, R. Tumor Detection by Nuclear Magnetic Resonance. *Science* **1971**, *171* (3976), 1151–1153. <https://doi.org/10.1126/science.171.3976.1151>.
- (125) Lauterbur, P. C. Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance. *Nature* **1973**, *242* (5394), 190–191. <https://doi.org/10.1038/242190a0>.
- (126) Mansfield, P. Multi-Planar Image Formation Using NMR Spin Echoes. *J. Phys. C Solid State Phys.* **1977**, *10* (3), L55. <https://doi.org/10.1088/0022-3719/10/3/004>.
- (127) Thébault, C. J.; Ramniceanu, G.; Boumati, S.; Michel, A.; Seguin, J.; Larrat, B.; Mignet, N.; Ménager, C.; Doan, B.-T. Theranostic MRI Liposomes for Magnetic Targeting and Ultrasound Triggered Release of the Antivascular CA4P. *J. Controlled Release* **2020**, *322*, 137–148. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.03.003>.
- (128) Gleich, B.; Weizenecker, J. Tomographic Imaging Using the Nonlinear Response of Magnetic Particles. *Nature* **2005**, *435* (7046), 1214–1217. <https://doi.org/10.1038/nature03808>.
- (129) Mohn, F.; Scheffler, K.; Ackers, J.; Weimer, A.; Wegner, F.; Thieben, F.; Ahlborg, M.; Vogel, P.; Graeser, M.; Knopp, T. Characterization of the Clinically Approved MRI Tracer Resotran for Magnetic Particle Imaging in a Comparison Study. *Phys. Med. Biol.* **2024**, *69* (13), 135014. <https://doi.org/10.1088/1361-6560/ad5828>.

- (130) Wang, Q.; Ma, X.; Liao, H.; Liang, Z.; Li, F.; Tian, J.; Ling, D. Artificially Engineered Cubic Iron Oxide Nanoparticle as a High-Performance Magnetic Particle Imaging Tracer for Stem Cell Tracking. *ACS Nano* **2020**, *14* (2), 2053–2062. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b08660>.
- (131) NMR, F. B. B.-; EPR; Imaging. *World's first preclinical Magnetic Particle Imaging (MPI) system announced by Bruker*. News-Medical. [https://www.news-medical.net/news/20130919/Worlds-first-preclinical-Magnetic-Particle-Imaging-\(MPI\)-system-announced-by-Bruker.aspx](https://www.news-medical.net/news/20130919/Worlds-first-preclinical-Magnetic-Particle-Imaging-(MPI)-system-announced-by-Bruker.aspx) (accessed 2025-05-24).
- (132) Lübke, A. S.; Alexiou, C.; Bergemann, C. Clinical Applications of Magnetic Drug Targeting. *J. Surg. Res.* **2001**, *95* (2), 200–206. <https://doi.org/10.1006/jsre.2000.6030>.
- (133) Gilchrist, R. K.; Medal, R.; Shorey, W. D.; Hanselman, R. C.; Parrott, J. C.; Taylor, C. B. Selective Inductive Heating of Lymph Nodes. *Ann. Surg.* **1957**, *146* (4), 596–606. <https://doi.org/10.1097/00000658-195710000-00007>.
- (134) Rosensweig, R. E. Heating Magnetic Fluid with Alternating Magnetic Field. *J. Magn. Magn. Mater.* **2002**, *252*, 370–374. [https://doi.org/10.1016/S0304-8853\(02\)00706-0](https://doi.org/10.1016/S0304-8853(02)00706-0).
- (135) Perret, M. Ciblage de protéines intracellulaires par des nanoparticules magnétiques bifonctionnalisées, Sorbonne Université, Paris, France, 2025.
- (136) Jordan, A.; Wust, P.; Fählin, H.; John, W.; Hinz, A.; Felix, R. Inductive Heating of Ferrimagnetic Particles and Magnetic Fluids: Physical Evaluation of Their Potential for Hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia* **1993**, *9* (1), 51–68. <https://doi.org/10.3109/02656739309061478>.
- (137) Shliomis, M. I. Magnetic Fluids. *Sov. Phys. Uspekhi* **1974**, *17* (2), 153. <https://doi.org/10.1070/PU1974v017n02ABEH004332>.
- (138) Di Corato, R.; Espinosa, A.; Lartigue, L.; Tharaud, M.; Chat, S.; Pellegrino, T.; Ménager, C.; Gazeau, F.; Wilhelm, C. Magnetic Hyperthermia Efficiency in the Cellular Environment for Different Nanoparticle Designs. *Biomaterials* **2014**, *35* (24), 6400–6411. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.036>.
- (139) Wilhelm, C.; Gazeau, F.; Roger, J.; Pons, J. N.; Bacri, J.-C. Interaction of Anionic Superparamagnetic Nanoparticles with Cells: Kinetic Analyses of Membrane Adsorption and Subsequent Internalization. *Langmuir* **2002**, *18* (21), 8148–8155. <https://doi.org/10.1021/la0257337>.
- (140) Wilhelm, C.; Gazeau, F. Nanoparticules magnétiques au cœur des cellules : des outils pour les thérapies cellulaires. *Biol. Aujourd'hui* **2012**, *206* (4), 273–284. <https://doi.org/10.1051/jbio/2012024>.
- (141) Kolosnjaj-Tabi, J.; Javed, Y.; Lartigue, L.; Péchoux, C.; Luciani, N.; Alloyeau, D.; Gazeau, F. Cycle de vie de nanoparticules magnétiques dans l'organisme. *Biol. Aujourd'hui* **2014**, *208* (2), 177–190. <https://doi.org/10.1051/jbio/2014021>.
- (142) Laurent, S.; Mahmoudi, M. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Promises for Diagnosis and Treatment of Cancer. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.* **2011**, *2* (4), 367–390.
- (143) Rueda-Gensini, L.; Cifuentes, J.; Castellanos, M. C.; Puentes, P. R.; Serna, J. A.; Muñoz-Camargo, C.; Cruz, J. C. Tailoring Iron Oxide Nanoparticles for Efficient Cellular Internalization and Endosomal Escape. *Nanomaterials* **2020**, *10* (9), 1816. <https://doi.org/10.3390/nano10091816>.
- (144) Varkouhi, A. K.; Scholte, M.; Storm, G.; Haisma, H. J. Endosomal Escape Pathways for Delivery of Biologicals. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2011**, *151* (3), 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.11.004>.

- (145) Veiseh, O.; Gunn, J. W.; Zhang, M. Design and Fabrication of Magnetic Nanoparticles for Targeted Drug Delivery and Imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62* (3), 284–304. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.002>.
- (146) Smith, S. A.; Selby, L. I.; Johnston, A. P. R.; Such, G. K. The Endosomal Escape of Nanoparticles: Toward More Efficient Cellular Delivery. *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30* (2), 263–272. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00732>.
- (147) Vermeulen, L. M. P.; De Smedt, S. C.; Remaut, K.; Braeckmans, K. The Proton Sponge Hypothesis: Fable or Fact? *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2018**, *129*, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.05.034>.
- (148) Chen, F.; Bian, M.; Nahmou, M.; Myung, D.; L. Goldberg, J. Fusogenic Liposome-Enhanced Cytosolic Delivery of Magnetic Nanoparticles. *RSC Adv.* **2021**, *11* (57), 35796–35805. <https://doi.org/10.1039/D1RA03094A>.
- (149) Martina, M.-S.; Fortin, J.-P.; Ménager, C.; Clément, O.; Barratt, G.; Grabielle-Madelmont, C.; Gazeau, F.; Cabuil, V.; Lesieur, S. Generation of Superparamagnetic Liposomes Revealed as Highly Efficient MRI Contrast Agents for in Vivo Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (30), 10676–10685. <https://doi.org/10.1021/ja0516460>.
- (150) Béalle, G.; Di Corato, R.; Kolosnjaj-Tabi, J.; Dupuis, V.; Clément, O.; Gazeau, F.; Wilhelm, C.; Ménager, C. Ultra Magnetic Liposomes for MR Imaging, Targeting, and Hyperthermia. *Langmuir* **2012**, *28* (32), 11834–11842. <https://doi.org/10.1021/la3024716>.
- (151) Di Corato, R.; Béalle, G.; Kolosnjaj-Tabi, J.; Espinosa, A.; Clément, O.; Silva, A. K. A.; Ménager, C.; Wilhelm, C. Combining Magnetic Hyperthermia and Photodynamic Therapy for Tumor Ablation with Photoresponsive Magnetic Liposomes. *ACS Nano* **2015**, *9* (3), 2904–2916. <https://doi.org/10.1021/nn506949t>.
- (152) Fernández-Sánchez, M. E.; Barbier, S.; Whitehead, J.; Béalle, G.; Michel, A.; Latorre-Ossa, H.; Rey, C.; Fouassier, L.; Claperon, A.; Brullé, L.; Girard, E.; Servant, N.; Rio-Frio, T.; Marie, H.; Lesieur, S.; Housset, C.; Gennisson, J.-L.; Tanter, M.; Ménager, C.; Fre, S.; Robine, S.; Farge, E. Mechanical Induction of the Tumorigenic β -Catenin Pathway by Tumour Growth Pressure. *Nature* **2015**, *523* (7558), 92–95. <https://doi.org/10.1038/nature14329>.
- (153) Zhang, S.; Xu, Y.; Wang, B.; Qiao, W.; Liu, D.; Li, Z. Cationic Compounds Used in Lipoplexes and Polyplexes for Gene Delivery. *J. Controlled Release* **2004**, *100* (2), 165–180. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.08.019>.
- (154) Massart, R.; Dubois, E.; Cabuil, V.; Hasmonay, E. Preparation and Properties of Monodisperse Magnetic Fluids. *J. Magn. Magn. Mater.* **1995**, *149* (1), 1–5. [https://doi.org/10.1016/0304-8853\(95\)00316-9](https://doi.org/10.1016/0304-8853(95)00316-9).
- (155) Massart, R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Trans. Magn.* **1981**, *17* (2), 1247–1248. <https://doi.org/10.1109/TMAG.1981.1061188>.
- (156) Massart, R.; Roger, J.; Cabuil, V. New Trends in Chemistry of Magnetic Colloids: Polar and Non Polar Magnetic Fluids, Emulsions, Capsules and Vesicles. *Braz. J. Phys.* **1995**, *25* (2).
- (157) Lefebure, S.; Dubois, E.; Cabuil, V.; Neveu, S.; Massart, R. Monodisperse Magnetic Nanoparticles: Preparation and Dispersion in Water and Oils. *J. Mater. Res.* **1998**, *13* (10), 2975–2981. <https://doi.org/10.1557/JMR.1998.0407>.
- (158) de Sousa, M. E.; Fernández van Raap, M. B.; Rivas, P. C.; Mendoza Zélis, P.; Girardin, P.; Pasquevich, G. A.; Alessandrini, J. L.; Muraca, D.; Sánchez, F. H. Stability and Relaxation Mechanisms

- of Citric Acid Coated Magnetite Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117* (10), 5436–5445. <https://doi.org/10.1021/jp311556b>.
- (159) Shokrollahi, H. A Review of the Magnetic Properties, Synthesis Methods and Applications of Maghemite. *J. Magn. Magn. Mater.* **2017**, *426*, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.11.033>.
- (160) Csiszár, A.; Hersch, N.; Dieluweit, S.; Biehl, R.; Merkel, R.; Hoffmann, B. Novel Fusogenic Liposomes for Fluorescent Cell Labeling and Membrane Modification. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21* (3), 537–543. <https://doi.org/10.1021/bc900470y>.
- (161) Kolašinac, R.; Kleusch, C.; Braun, T.; Merkel, R.; Csiszár, A. Deciphering the Functional Composition of Fusogenic Liposomes. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (2), 346. <https://doi.org/10.3390/ijms19020346>.
- (162) Cavalcanti, R. R. M.; Lira, R. B.; Riske, K. A. Membrane Fusion Biophysical Analysis of Fusogenic Liposomes. *Langmuir* **2022**, *38* (34), 10430–10441. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c01169>.
- (163) Papahadjopoulos, D.; Nir, S.; Ohki, S. Permeability Properties of Phospholipid Membranes: Effect of Cholesterol and Temperature. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1972**, *266* (3), 561–583. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(72\)90354-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(72)90354-9).
- (164) Chanamai, R.; Coupland, J. N.; McClements, D. J. Effect of Temperature on the Ultrasonic Properties of Oil-in-Water Emulsions. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **1998**, *139* (2), 241–250. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(98\)00335-5](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(98)00335-5).
- (165) Simberg, D.; Weisman, S.; Talmon, Y.; Barenholz, Y. DOTAP (and Other Cationic Lipids): Chemistry, Biophysics, and Transfection. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* **2004**, *21* (4). <https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v21.i4.10>.
- (166) Ganguly, M.; Debraj, D.; Mazumder, N.; Carpenter, J.; Manickam, S.; Pandit, A. B. Impact of Ultrasonication on the Oxidative Stability of Oil-in-Water Nanoemulsions: Investigations into Kinetics and Strategies to Control Lipid Oxidation. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2024**, *63* (23), 10212–10225. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.4c00506>.
- (167) Pingret, D.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Chemat, F. Degradation during Application of Ultrasound in Food Processing: A Review. *Food Control* **2013**, *31* (2), 593–606. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.039>.
- (168) Torchilin, V.; Weissig, V. *Liposomes: A Practical Approach*; OUP Oxford, 2003.
- (169) Makino, K.; Yamada, T.; Kimura, M.; Oka, T.; Ohshima, H.; Kondo, T. Temperature- and Ionic Strength-Induced Conformational Changes in the Lipid Head Group Region of Liposomes as Suggested by Zeta Potential Data. *Biophys. Chem.* **1991**, *41* (2), 175–183. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(91\)80017-L](https://doi.org/10.1016/0301-4622(91)80017-L).
- (170) Clogston, J. D.; Patri, A. K. Zeta Potential Measurement. In *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*; McNeil, S. E., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2011; pp 63–70. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6.
- (171) Freyer, M. W.; Lewis, E. A. Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions. In *Methods in Cell Biology*; Biophysical Tools for Biologists, Volume One: In Vitro Techniques; Academic Press, 2008; Vol. 84, pp 79–113. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(07\)84004-0](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(07)84004-0).

- (172) Kolašinac, R.; Jaksch, S.; Dreissen, G.; Braeutigam, A.; Merkel, R.; Csiszár, A. Influence of Environmental Conditions on the Fusion of Cationic Liposomes with Living Mammalian Cells. *Nanomaterials* **2019**, *9* (7), 1025. <https://doi.org/10.3390/nano9071025>.
- (173) Piffoux, M.; Silva, A. K. A.; Wilhelm, C.; Gazeau, F.; Taresté, D. Modification of Extracellular Vesicles by Fusion with Liposomes for the Design of Personalized Biogenic Drug Delivery Systems. *ACS Nano* **2018**, *12* (7), 6830–6842. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b02053>.
- (174) Lira, R. B.; Robinson, T.; Dimova, R.; Riske, K. A. Highly Efficient Protein-Free Membrane Fusion: A Giant Vesicle Study. *Biophys. J.* **2019**, *116* (1), 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.11.3128>.
- (175) François-Martin, C.; Rothman, J. E.; Pincet, F. Low Energy Cost for Optimal Speed and Control of Membrane Fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114* (6), 1238–1241. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621309114>.
- (176) Noguchi, A.; Furuno, T.; Kawaura, C.; Nakanishi, M. Membrane Fusion Plays an Important Role in Gene Transfection Mediated by Cationic Liposomes. *FEBS Lett.* **1998**, *433* (1–2), 169–173. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00837-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00837-0).
- (177) Holland, J. W.; Cullis, P. R.; Madden, T. D. Poly(Ethylene Glycol)–Lipid Conjugates Promote Bilayer Formation in Mixtures of Non-Bilayer-Forming Lipids. *Biochemistry* **1996**, *35* (8), 2610–2617. <https://doi.org/10.1021/bi951999j>.
- (178) Tomatsu, I.; Marsden, H. R.; Rabe, M.; Versluis, F.; Zheng, T.; Zope, H.; Kros, A. Influence of Pegylation on Peptide-Mediated Liposome Fusion. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21* (47), 18927. <https://doi.org/10.1039/c1jm11722j>.
- (179) Holland, J. W.; Hui, C.; Cullis, P. R.; Madden, T. D. Poly(Ethylene Glycol)–Lipid Conjugates Regulate the Calcium-Induced Fusion of Liposomes Composed of Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylserine. *Biochemistry* **1996**, *35* (8), 2618–2624. <https://doi.org/10.1021/bi952000v>.
- (180) Boni, L. T.; Stewart, T. P.; Alderfer, J. L.; Hui, S. W. Lipid-Polyethylene Glycol Interactions: I. Induction of Fusion between Liposomes. *J. Membr. Biol.* **1981**, *62* (1–2), 65–70. <https://doi.org/10.1007/BF01870200>.
- (181) Lentz, B. R.; Lee, J. K. Poly(Ethylene Glycol) (PEG)-Mediated Fusion between Pure Lipid Bilayers: A Mechanism in Common with Viral Fusion and Secretory Vesicle Release? *Mol. Membr. Biol.* **1999**, *16* (4), 279–296. <https://doi.org/10.1080/096876899294508>.
- (182) D’Souza, S. M.; Brown, I. R. Constitutive Expression of Heat Shock Proteins Hsp90, Hsc70, Hsp70 and Hsp60 in Neural and Non-Neural Tissues of the Rat during Postnatal Development. *Cell Stress Chaperones* **1998**, *3* (3), 188–199. [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(1998\)003<0188:ceohsp>2.3.co;2](https://doi.org/10.1379/1466-1268(1998)003<0188:ceohsp>2.3.co;2).
- (183) de Gier, J. Osmotic Behaviour and Permeability Properties of Liposomes. *Chem. Phys. Lipids* **1993**, *64* (1), 187–196. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(93\)90065-B](https://doi.org/10.1016/0009-3084(93)90065-B).
- (184) Soenen, S. J. H.; Brisson, A. R.; De Cuyper, M. Addressing the Problem of Cationic Lipid-Mediated Toxicity: The Magnetoliposome Model. *Biomaterials* **2009**, *30* (22), 3691–3701. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.03.040>.
- (185) Béalle, G.; Di Corato, R.; Kolosnjaj-Tabi, J.; Dupuis, V.; Clément, O.; Gazeau, F.; Wilhelm, C.; Ménager, C. Ultra Magnetic Liposomes for MR Imaging, Targeting, and Hyperthermia. *Langmuir* **2012**, *28* (32), 11834–11842. <https://doi.org/10.1021/la3024716>.

- (186) O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (Resazurin) Fluorescent Dye for the Assessment of Mammalian Cell Cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267* (17), 5421–5426. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>.
- (187) Vilas-Boas, V.; Carvalho, F.; Espiña, B. Magnetic Hyperthermia for Cancer Treatment: Main Parameters Affecting the Outcome of In Vitro and In Vivo Studies. *Molecules* **2020**, *25* (12), 2874. <https://doi.org/10.3390/molecules25122874>.
- (188) Liu, X.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Zhu, W.; Li, G.; Ma, X.; Zhang, Y.; Chen, S.; Tiwari, S.; Shi, K.; Zhang, S.; Fan, H. M.; Zhao, Y. X.; Liang, X.-J. Comprehensive Understanding of Magnetic Hyperthermia for Improving Antitumor Therapeutic Efficacy. *Theranostics* **2020**, *10* (8), 3793–3815. <https://doi.org/10.7150/thno.40805>.
- (189) Herrero de la Parte, B.; Rodrigo, I.; Gutiérrez-Basoa, J.; Iturrizaga Correcher, S.; Mar Medina, C.; Echevarría-Uraga, J. J.; García, J. A.; Plazaola, F.; García-Alonso, I. Proposal of New Safety Limits for In Vivo Experiments of Magnetic Hyperthermia Antitumor Therapy. *Cancers* **2022**, *14* (13), 3084. <https://doi.org/10.3390/cancers14133084>.
- (190) Ruta, S.; Fernández-Afonso, Y.; Rannala, S. E.; Morales, M. P.; Veintemillas-Verdaguer, S.; Jones, C.; Gutiérrez, L.; Chantrell, R. W.; Serantes, D. Beyond Newton's Law of Cooling in Evaluating Magnetic Hyperthermia Performance: A Device-Independent Procedure. *Nanoscale Adv.* **2024**, *6* (16), 4207–4218. <https://doi.org/10.1039/d4na00383g>.
- (191) Lemal, P.; Balog, S.; Ackermann-Hirschi, L.; Taladriz-Blanco, P.; Hirt, A. M.; Rothen-Rutishauser, B.; Lattuada, M.; Petri-Fink, A. Simple and Fast Evaluation of Relaxation Parameters of Magnetic Nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **2020**, *499*, 166176. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2019.166176>.
- (192) Wells, J.; Ortega, D.; Steinhoff, U.; Dutz, S.; Garaio, E.; Sandre, O.; Natividad, E.; Cruz, M. M.; Brero, F.; Southern, P.; Pankhurst, Q. A.; Spassov, S.; Consortium, T. R. Challenges and Recommendations for Magnetic Hyperthermia Characterization Measurements. *Int. J. Hyperthermia* **2021**, *38* (1), 447–460. <https://doi.org/10.1080/02656736.2021.1892837>.
- (193) Kwok, M. K. Y.; Maley, C. C. J.; Dworkin, A.; Hattersley, S.; Southern, P.; Pankhurst, Q. A. Nonspecific Eddy Current Heating in Magnetic Field Hyperthermia. *Appl. Phys. Lett.* **2023**, *122* (24), 240502. <https://doi.org/10.1063/5.0153336>.
- (194) Strober, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr. Protoc. Immunol.* **2015**, *111*, A3.B.1-A3.B.3. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>.
- (195) Carrizo, C.; Agostino, G. D.; Spicer, G.; Córdoba, J. F. de; Guzmán, R. A.; Garcia-Abad, C. M.; Rivas, A.; Matesanz, R.; Oña, A.; Thompson, S. A. Towards an Innate Cell-Environment Nanothermometer. arXiv July 2, 2024. <https://doi.org/10.48550/arXiv.2407.02595>.
- (196) Martin, S. J.; Reutelingsperger, C. P.; McGahon, A. J.; Rader, J. A.; van Schie, R. C.; LaFace, D. M.; Green, D. R. Early Redistribution of Plasma Membrane Phosphatidylserine Is a General Feature of Apoptosis Regardless of the Initiating Stimulus: Inhibition by Overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* **1995**, *182* (5), 1545–1556. <https://doi.org/10.1084/jem.182.5.1545>.
- (197) Rieger, A. M.; Nelson, K. L.; Konowalchuk, J. D.; Barreda, D. R. Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay for Accurate Assessment of Cell Death. *J. Vis. Exp. JoVE* **2011**, No. 50, 2597. <https://doi.org/10.3791/2597>.
- (198) Wang, H.; Joseph, J. A. Quantifying Cellular Oxidative Stress by Dichlorofluorescein Assay Using Microplate Reader. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *27* (5–6), 612–616. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(99\)00107-0](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00107-0).

Bibliographie

(199) Mizushima, N.; Yoshimori, T.; Levine, B. Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell* **2010**, *140* (3), 313–326. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.028>.

Etude de la fusion de liposomes magnétiques avec des systèmes modèles et des cellules

Les nanoparticules magnétiques (NPM), comme de nombreuses autres nanoparticules, sont internalisées par les cellules par endocytose et se retrouvent confinées dans des vésicules intracellulaires appelées endosomes. Cependant, pour plusieurs applications biologiques, telles que l'ingénierie cellulaire ou les traitements par hyperthermie magnétique, il est nécessaire que les NPM accèdent au cytosol des cellules. Dans cette thèse, nous proposons une nouvelle stratégie reposant sur l'utilisation de liposomes fusogènes magnétiques (MFL). Les liposomes fusogènes possèdent la capacité unique de fusionner avec la membrane plasmique, permettant ainsi la libération directe de leur contenu dans le cytosol. Des NPM citratées ont été encapsulées dans le cœur aqueux de liposomes cationiques, formulés à base du mélange (DOTAP/DOPE/PEGPE/TopfluorPE), par la méthode d'évaporation en phase inverse (REV). Les MFL présentent une forte charge positive (+70 mV) essentielle pour préserver leur capacité de fusion et sont stables plusieurs jours dans l'eau et dans un tampon HEPES. La fusion des MFL a d'abord été étudiée sur des systèmes modèles constitués de liposomes ayant une taille, une charge et une composition membranaire bien définies (LUV - Large Unilamellar Vesicles). Des expériences de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET), de diffusion de la lumière et de titrage calorimétrique isotherme (ITC) ont démontré que la fusion est initiée par des interactions électrostatiques et qu'elle est fortement influencée par la composition lipidique. De plus, des expériences de magnétophorèse ont démontré que la charge magnétique était transférée aux liposomes après fusion. Nous avons également étudié la fusion des MFL avec des cellules saines (CHO-K1) et cancéreuses (SH-SY5Y). Des expériences en microscopie confocale et microscopie électronique ont confirmé la fusion des MFL avec les cellules, avec un transfert des lipides fluorescents à la membrane plasmique et l'observation des NPM libres dans le cytosol des cellules.

Study of the fusion of magnetic liposomes with model systems and cells

Magnetic nanoparticles (NPM), like many other nanoparticles, are internalised by cells through endocytosis and become confined in intracellular vesicles called endosomes. However, for several biological applications, such as cellular engineering or magnetic hyperthermia treatments, NPMs need to access the cytosol of cells. In this thesis, we propose a new strategy based on the use of magnetic fusogenic liposomes (MFLs). Fusogenic liposomes have the unique ability to fuse with the plasma membrane, allowing direct release of their contents into the cytosol. Citrated NPM were encapsulated in the aqueous core of cationic liposomes, formulated with the lipid composition (DOTAP/DOPE/PEGPE/TopfluorPE), using the reverse phase evaporation (REV) method. The MFLs have a high positive charge (+70 mV), which is essential for preserving their fusion capacity, and are stable for several days in water and HEPES buffer. MFL fusion was first studied on model systems made up of liposomes with a well-defined size, charge and membrane composition (LUV - Large Unilamellar Vesicles). Fluorescence resonance energy transfer (FRET), light scattering and isothermal calorimetry (ITC) experiments showed that fusion is initiated by electrostatic interactions and that it is strongly influenced by the lipid composition. In addition, magnetophoresis experiments demonstrated that the magnetic charge was transferred to the liposomes after fusion. We also studied the fusion of MFLs with healthy (CHO-K1) and cancer (SH-SY5Y) cells. Confocal microscopy and electron microscopy experiments confirmed the fusion of MFLs with cells, with transfer of fluorescent lipids to the plasma membrane and observation of free NPM in the cell cytosol.