

Année 2013

Thèse n° 2097

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Ecole doctorale : Science de la vie et de la Santé

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Interface Chimie-Biologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 10 décembre 2013

Par **Giovanni TONELLI**

Né(e) le 6 juillet 1983 à Giulianova (Italie)

SYSTÈMES ORGANISÉS À BASE DE MOLÉCULES HYBRIDES LIPIDE-NUCLÉOTIDES POUR LA DÉLIVRANCE DES ACIDES NUCLÉIQUES

Membres du Jury

Mr. le Professeur Daniel SCHERMANExamineur
Mme le Docteur Claudie BOURGAUX.....Rapporteur
Mr. le Professeur Ange POLIDORI.....Rapporteur
Mme le Docteur Laurence NAVAILLESExamineur
Mr. le Professeur Philippe BARTHELEMY.....Directeur de Thèse

Résumé

La thérapie génique est une forme de médecine moléculaire qui a des potentialités majeures dans le traitement d'un grand nombre de maladies héréditaires ou de cancers. Les acides nucléiques doivent pénétrer à l'intérieur des cellules et interagir avec la machinerie génétique présente. Une des plus grandes limitations dans l'application de ce type de traitement est le développement d'un vecteur sûr et efficace pour transporter ces molécules dans les cellules. Les vecteurs sont classifiés traditionnellement en deux grandes catégories : viral et non-viral. Les vecteurs de type viral sont les plus efficaces et utilisés dans la majorité des tests cliniques, cependant ils peuvent provoquer une forte réponse immunitaire et ils ont des coûts importants de production. Les vecteurs de type non viral peuvent être fabriqués facilement en grande quantité, ne sont pas immunogéniques et possèdent l'avantage de pouvoir être modulés en fonction des applications. Les lipides et les polymères cationiques sont les plus étudiés à cause de leurs propriétés de complexation avec les acides nucléiques. Cependant ces complexes chargés positivement peuvent être toxiques à cause de leur interaction non spécifique avec les membranes cellulaires, ce qui limite leur utilisation *in vivo*. Cela a conduit à la recherche de nouveaux vecteurs, neutres ou anioniques, pour diminuer les problèmes de cytotoxicité.

Les nucléolipides (NL) sont des molécules hybrides bioinspirées amphiphiles formées d'une partie hydrophile nucléotidique et d'une partie hydrophobe lipidique. Ces molécules sont donc capables de s'autoassembler et de former des structures supramoléculaires avec des propriétés physico-chimiques principalement liées à la nature chimique de la tête polaire nucléotidique. L'interaction avec des acides nucléiques est alors possible grâce à des interactions de type Watson-Crick, cependant elles ne sont pas suffisamment élevées pour former un complexe stable pour être utilisées dans les conditions biologiques. La synthèse d'une nouvelle famille de molécules hybrides de type amino-nucléo-lipides (ANL) a été développée dans l'objectif d'améliorer les interactions et donc la complexation grâce à la présence d'un acide aminé sur la partie polaire de l'amphiphile. La synthèse chimique des ANLs avec différents acides aminés (glycine, phénylalanine) en position 5' du sucre et différents lipides (dimiristoyl, dioleoyl) estérifié au phosphate présent en position 3' a été réalisée.

Les études physico-chimiques réalisées par diffusion dynamique de la lumière (DLS), cryo-microscopie électronique (cryo-TEM) et diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) ont permis d'étudier la morphologie et l'organisation structurale des objets supramoléculaires formés par ces molécules. Ces études ont en particulier permis de mettre en évidence la relation entre la structure chimique et les propriétés physico-chimiques. Les NLs forment des vésicules unilamellaires et les ANLs, grâce à la présence de l'acide aminé sur la tête polaire, forment des vésicules de type multilamellaire.

L'étude des interactions, réalisée par calorimétrie à titration isotherme (ITC), entre les vésicules et un acide nucléique modèle (poly A) montre qu'il existe une interaction entre les deux partenaires, mais que cette interaction n'est pas suffisamment forte pour envisager des applications biologiques. La stratégie d'utiliser un cation divalent, comme le calcium, pour ponter les charges négatives des nucléolipides et les charges négatives des acides nucléiques a été envisagé et les complexes ont été étudiés par SAXS. Enfin, des transitions de morphologies observées en fonction de la concentration ont été étudiées par DLS et cryo-TEM. Ces transitions de morphologies ont pu être corrélées à des effets de force ionique sur les propriétés de la tête polaire.

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Je remercie le Professeur Daniel Scherman qui m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Je remercie également le Docteur Claudie Bourgaux et le Professeur Ange Polidori pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit.

Je tiens à remercier le Docteur Jean-Louis Mergny, directeur de l'unité Inserm U869, pour m'avoir accueilli et permis de réaliser ce travail au sein de son unité. Je remercie également le Docteur Philippe Richetti, directeur du Centre de Recherche Paul Pascal, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je remercie le Professeur Philippe Barthélémy, mon directeur de thèse, pour m'avoir confié ce projet de recherche, pour son enthousiasme et pour son soutien au cours de ces trois années.

Je voudrais remercier profondément le Docteur Laurence Navailles, pour la collaboration et le soutien à ce travail tout au long de ces trois années, pour sa disponibilité et pour toutes les discussions enrichissantes que nous avons eu.

Je tiens particulièrement à remercier les personnes qui ont participé à ma formation scientifique et qui ont donc contribué directement et précieusement à l'accomplissement de ce travail. Le Professeur Frédéric Nallet pour sa disponibilité, son humilité et son aide infini sur les expériences de diffusion du rayonnement, le Docteur Khalid Oumzil pour son aide et ses conseils sur la synthèse chimique et le Professeur Gilles Sigaud pour l'analyse thermique.

Je remercie le Docteur Cédric Gaillard pour les images de microscopie électronique (cryo-TEM) et son implication dans le projet.

Je remercie les stagiaires qui ont participé « directement » à ce projet, Anaïs Raynaud, Alexandre Trichies et Mounir Benkoulouche et toutes les personnes qui ont contribué « indirectement » à ce travail, Dr. Amit Patwa, Ahmed Bentaleb, Dr. Laurent Azema, Dr. Arnaud Gissot, Eric Schoentgen, Frédéric Louereat, Isabelle Ly, Dr. Salim Khiati, Dr. Emerson Teixeira da Silva.

Je remercie également tous les membres, présents et passés, de l'équipe de chimie, Pr. Isabelle Bestel, Dr. Laurent Laxtague, Dr. Bernard Rayner, Dr. Eric Amigues, Brune Vialet, Nataliia Beztsinna, Thinhinane Chaou, Sybille Kennel, Aref Hassan, Gaëlle Girard, Alessio Conti, Arnaud Pol, Frédéric Vigié, Dr. Alex Pokholenko, Nathalie Pierre, Marie-José Dalila, Dr. Ahissan Aimé, pour leur critiques scientifiques constructives lors des réunions d'équipe.

Je remercie tous les membres de l'unité Inserm U869 qu'ont contribué à rendre le travail au quotidien plus agréable, surtout pendant la pause-déjeuner, Dr. Fabien Darfeuille, Dr. Cathy

Staedel, Dr. Isabelle Iost, Sandrine Chabas, Kati Ba-Pierozzi, H el ene Arnion, Andrea Sirianni, Amandine Bonnin, Jacques Puyol, Dursun Kurkut.

Je remercie tous mes amis qui m'ont soutenu dans ce projet, Donato, Raquel, Davide, Valentina, Evelia, Davide, Stefano.

Le remerciement le plus grand va   ma famille qui m'a aidé et encouragé tout au long de cette aventure. En particulier   ma femme, Silvia Mazzaferro, sans elle la réalisation de ce travail n'aurait pas été possible.

Table des matières

Résumé.....	3
Remerciements.....	5
Table des matières.....	7
Abréviations	9
1 Introduction générale.....	13
1.1 Délivrance des acides nucléiques	13
1.1.1 Introduction.....	13
1.1.2 Mécanisme d'action	13
1.1.3 Barrières biologiques (Limitations) in vivo	14
1.1.4 Stratégies pour la délivrance d'acide nucléiques in vivo	17
1.2 Interactions faibles.....	21
1.2.1 Introduction.....	21
1.2.2 Liaison covalente polaire.....	21
1.2.3 Forces de van der Waals.....	23
1.2.4 Effet hydrophobe.....	27
1.2.5 ADN structure.....	28
1.2.6 ADN et interactions	34
1.3 Nucléolipides	42
1.3.1 Introduction.....	42
1.3.2 Nucléolipides naturels	42
1.3.3 Nucléolipides synthétiques	44
1.3.4 Auto-assemblage.....	51
1.3.5 Interactions	56
1.4 Objectifs du projet	58
1.5 Rationnel dans le choix des structures chimiques à synthétiser	60
2 Synthèse des nucléolipides.....	65
2.1 Introduction.....	65
2.2 Liste des molécules synthétisées.....	65
2.3 Synthèse des nucléotides-3'-lipides (NLs)	67
2.3.1 Synthèse de diC14-dT, diC14-dA, diC8:1-dT.....	67
2.3.2 Synthèse du 1,2-dioleoyl-sn-glycérol (DOG)	69
2.4 Synthèse des amino-acide-5'-nucléotide-3'-lipides (ANLs)	71
2.4.1 Synthèse de diC14-dT-Gly, 12	74
2.4.2 Synthèse de diC14-dA-Boc-Phe, 15 et de diC14-dA-Phe	76
2.5 Partie expérimentale.....	78
2.5.1 Matériels et méthodes	78
2.5.2 Synthèse des nucléotides-3'-lipides (NLs).....	79
2.5.3 Synthèse des acide aminé-5'-nucléotides-3'-lipides (ANLs).....	90
3 Morphologie des systèmes	97
3.1 Introduction.....	97
3.2 Préparation des échantillons	97

3.3	Etude de la morphologie des objets supramoléculaires	98
3.3.1	<i>Microscopie optique à contraste de phase.....</i>	98
3.3.2	<i>Microscopie électronique</i>	99
3.3.3	<i>Diffusion dynamique de la lumière.....</i>	103
3.4	Partie expérimentale.....	118
3.4.1	<i>Microscopie à contraste de phase</i>	118
3.4.2	<i>Cryo-TEM.....</i>	118
3.4.3	<i>Diffusion dynamique de la lumière.....</i>	118
4	Structure des systèmes	119
4.1	Introduction.....	119
4.2	Fluidité membranaire.....	119
4.2.1	<i>Calorimétrie différentielle à balayage.....</i>	121
4.2.2	<i>Diffusion des rayons X aux grands angles</i>	123
4.3	Caractérisation structurale par diffusion des rayons X aux petits angles.....	126
4.4	Etude structurale par SAXS de complexes de nucléolipides avec le calcium et acides nucléiques.....	133
4.4.1	<i>Complexes binaires lipides – calcium</i>	134
4.4.2	<i>Complexes ternaires lipides – calcium – acide nucléique</i>	138
4.5	Partie expérimentale.....	141
4.5.1	<i>Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)</i>	141
4.5.2	<i>Diffusion des rayons X aux grands angles (WAXS)</i>	141
4.5.3	<i>Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).....</i>	141
4.5.4	<i>Préparation des complexes avec le calcium</i>	142
5	Etude de l'interaction	145
5.1	Introduction.....	145
5.2	Gel d'agarose	145
5.3	RiboGreen®	147
5.4	Calorimétrie à titration isotherme (ITC).....	149
5.5	Partie expérimentale.....	158
5.5.1	<i>Gel d'agarose</i>	158
5.5.2	<i>Essai du RiboGreen®.....</i>	158
5.5.3	<i>Calorimétrie à titration isotherme (ITC)</i>	158
6	Conclusions et perspectives	161
	Bibliographie	163
	Liste de publications et communications	172

Abréviations

AAV : adeno-associated virus
ACN : acétonitrile
ADN : acide désoxyribonucléique
AGO2 : protéine argonaute2
AMP : adénine monophosphate
ANL : amino acide-5'-nucléotide-3'-lipide
Ara-C : cytosine arabinoside ou cytarabine
ARN : acide ribonucléique
BET : bromure d'éthidium
BOC : tert-butyl carbamate
C16-AMP : deoxyadenine 3'-palmitoylphosphate
C16-EP : ethanol-palmitoylphosphate
C16-TMP : deoxythymidine 3'-palmitoylphosphate
C20-AMP : deoxytadenine 3'-arachidoylphosphate
C20-EP : ethanol-arachidoylphosphate
C20-TMP : deoxythymidine 3'-arachidoylphosphate
CALNN : pentapeptide, Cys-Ala-Leu-Asn-Asn
CCM : chromatographie sur couche mince
CDP : cytidine diphosphate
Cryo-TEM : microscopie électronique en transmission cryogénique
DAUPC : 1,2-Diarachidoyluridinophosphocholine
DCC : N,N'-dicyclohexylcarbodiimide
DCM : dichlorométhane
DCU : dicyclohexyl-urée
diC12-dT : 1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphate-deoxythymidine
diC14-dA : 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphate-deoxyadénine
diC14-dT : 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphate-deoxythymidine
diC14-dT-Gly : 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphate-deoxythymidine-5'-L-glycine
diC14-dT-Phe : 1,2-miristoyl-*sn*-glycero-3-phosphate-deoxythymidine-5'-L-phenylalanine
diC16-dT : 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphate-deoxythymidine
diC18:1-dT : 1,2-dioléoyl-*sn*-glycero-3-phosphate-deoxythymidine
diC18:1-dT-Phe : 1,2-oléoyl-*sn*-glycero-3-phosphate-deoxythymidine-5'-L-phenylalanine
diF17UPC : 2',3'-O-di-2H,2H,3H,3H-perfluoro-undecanoyl-uridine-5'-phosphocholine
DLPU : 1,2-dilauroyl-5'-phosphatidyl-uridine
DLS : diffusion dynamique de la lumière
DMAP : 4-diméthylaminopyridine
DMSO : diméthylsulfoxyde
DMT : diméthoxytrityle
DMUPC : 1,2-Dimyristoyluridinophosphocholine
DOG : 1,2-dioléoyl-*sn*-glycérol
DOP-adénosine : 1,2-dioléoyl-5'-phosphatidyl-adénosine
DOPE : 1,2-dioléyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyléthanolamine
DOP-uridine : 1,2-dioléoyl-5'-phosphatidyl-uridine

DOTAP : N-[1-(2,3-dioleoyloxy)-propyl]-N',N',N'-triméthylammonium chloride
 DOTAU : N-[5'-(2',3'-dioleoyl)uridine]-N',N',N'-triméthylammonium tosylate
 DOUGluc : 1-(2',3'-dioleoylcarbamoyluridine-5')-β-d-glucoopyranoside
 DOUPC : 1,2-Dioléoyluridinophosphocholine
 DPPC : 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine
 DPPG : 1,2-dipalmitoyl-phosphatidyladenosine
 DPUPC : 1,2-Dipalmitoyluridinophosphocholine
 DSC : calorimétrie différentielle à balayage
 DSUPC : 1,2-Distéaryluridinophosphocholine
 EPR : enhanced permeability and retention
 ESI MS : spectrométrie de masse par ionisation
 FQGII : pentapeptide, Phe-Gln-Gly-Ile-Ile
 GNF : glycosil-nucléosides-fluorolipides
 GNL : glycosil-nucléosides-lipides
 HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
 Hp : 3-hydroxypyrrole
 HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance
 Im : imidazole
 ITC : calorimétrie de titration isotherme
 LDL : lipoprotéines de basse densité
 LNA : locked nucleic acid
 L α : phase fluide
 L β : phase gel
 miRNA : micro-ARN
 mRNA : ARN messenger
 MVLBG2 : N-1-2-[[[(1S)-1,4-Di[(1S)-1,4-di[(1S)-1,4-di[(3-aminopropyl)amino]butylcarboxamido]butyl]carboxamidobutyl]carboxamido]ethyl-3,4-di[(Z)-9-octadecenyloxy]benzamide
 NAAC : N4-alkyl-araC
 NL : nucléotide-3'-lipide
 NLS : séquence de localisation nucléaire
 NOAC : N4-octadécyl-araC
 PAMAM : polyamidoamine
 PAPC : 2',3'-O-16-hentriacontanyliden-adenine-5'-phosphocholine
 PDI : index de polydispersité
 PEG : polyéthylène glycol
 PEI : polyéthylènimine
 polyA : acide polyadéninilique
 polyU : acide polyuridinilique
 POPA : 1-palmytoil-2-oléoyl-phosphatidyl-adénine
 POP-Ade : 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine
 POPC : 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine
 POPG : 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylglycérol
 POPU : 1-palmytoil-2-oléoyl-phosphatidyl-uridine
 PUPC : 2',3'-O-16-hentriacontanyliden-uridine-5'-phosphocholine
 Py : pyrrole

Pyr : pyridine
QELS : diffusion quasi-élastique de la lumière
RES : système réticulo-endothélial
RISC : RNA induced silencing complex
RMN : résonance magnétique nucléaire
RNase H : ribonucléase H
SAXS : diffusion des rayons X aux petits angles
siRNA : petits ARN interférents
SQdFdC : N4-trisnorsqualenogemcitabine
TBAF : fluorure de tétra-n-butylammonium
TBDPS-Cl : tert-butyl-diphenyl-silyl chlorure
TCA : acide trichloroacétique
TEA : triéthylamine
TEM : microscopie électronique en transmission
TFA : acide trifluoroacétique
THF : tétrahydrofurane
Tm : température de transition de phase gel → fluide
WAXS : diffusion des rayons X aux grands angles

1 Introduction générale

1.1 Délivrance des acides nucléiques

1.1.1 Introduction

L'agence européenne des médicaments (EMA) définit un médicament de thérapie génique comme un produit thérapeutique biologique avec les deux caractéristiques suivantes :

- a. Il contient un principe actif qui contient ou consiste en un acide nucléique recombinant utilisé ou administré dans les êtres humains avec l'objectif de réguler, réparer, remplacer, ajouter ou supprimer une séquence génétique.
- b. Son effet thérapeutique, prophylactique ou diagnostique concerne directement la séquence de l'acide nucléique recombinant ou le produit de l'expression génétique de cette séquence (Wirth et al., 2013).

Les acides nucléiques qui peuvent être utilisés comme moyen thérapeutique appartiennent à différentes classes : plasmides, oligonucléotides, petits ARN interférent (siRNA), anti-micro-ARN, aptamères, ribozymes.

L'avantage principal de l'utilisation de ce type de produits thérapeutiques, par rapport à la thérapie conventionnelle basée sur l'utilisation de petites molécules, est la reconnaissance sélective de cibles et voies moléculaires qui lui confère une formidable spécificité d'action. D'autre part leur spécificité pourrait diminuer fortement les effets secondaires négatifs comparés aux principes actifs conventionnels. De plus ces médicaments pourraient intervenir dans les premières étapes du développement de la maladie en limitant sa progression et ses complications (Patil et al., 2005a). Malgré ces caractéristiques favorables, il y a très peu d'exemples de ce type de médicaments sur le marché (Wirth et al., 2013). Les causes peuvent être attribuées à la pharmacocinétique de ces molécules : mauvaise pénétration intracellulaire *in vivo*, faible stabilité dans les milieux biologiques et courte demi-vie (Patil et al., 2005a).

1.1.2 Mécanisme d'action

La connaissance des mécanismes d'action des acides nucléiques qui peuvent être utilisés en thérapie est un prérequis important pour la conception de systèmes de délivrance efficaces. Les plasmides sont des molécules d'ADN double brin généralement circulaires de masse moléculaire très élevée (3 millions pour un plasmide de 5kb) contenant des transgènes qui codent pour des protéines spécifiques. L'introduction de ces molécules dans les cellules donne la capacité à la cellule de synthétiser la protéine qui est programmée dans le plasmide de façon à rétablir une protéine absente ou défectueuse. Le mécanisme d'action implique que le plasmide pénètre dans le noyau cellulaire après être entré dans le cytoplasme, pour pouvoir utiliser les mécanismes de transcription et de traduction de la cellule (Patil et al., 2005a). Les oligonucléotides sont des courtes séquences de 13-25 bases d'ADN simple brin qui sont capables d'inhiber l'expression d'une protéine spécifique. Les oligonucléotides antisenses sont complémentaires des molécules spécifiques d'ARN messager (mRNA) à travers des

interactions de type Watson-Crick de façon à bloquer la traduction correcte de l'mRNA. Un second mécanisme proposé est le clivage de l'mRNA grâce à l'action d'une enzyme, la ribonucléase H (RNase H). Cet enzyme est capable de cliver le filament d'ARN dans des duplexes ADN-ARN, de façon à libérer le filament d'oligonucléotide antisense qui peut ainsi se lier à une autre molécule mRNA. Les oligonucléotides antisense n'ont pas besoin d'entrer dans le noyau cellulaire vu que leurs cibles (mRNA) se trouvent dans le cytoplasme. Les oligonucléotides antigènes sont capables de former une triple hélice avec l'ADN génomique et d'inhiber ainsi le processus de translation et de transcription des protéines. Cependant ils doivent pénétrer dans le noyau cellulaire pour pouvoir interagir avec l'ADN génomique (Bennett and Swayze, 2010; Fattal and Barratt, 2009). Les siRNA sont des courts segments d'ARN double brin de 21-23 nucléotides capables d'inhiber l'expression et de cliver le mRNA cible. Ils forment un complexe multi-enzymatique intracellulaire avec le RISC (RNA-induced silencing complex) et la protéine Argonaute 2 (AGO2). Ce complexe élimine un des deux brins (passager) du duplex de siRNA, le brin restant (guide ou antisense) guide le complexe vers son mRNA cible en bloquant la translation. Si la complémentarité est parfaite le complexe clive mRNA, dans ce cas l'inhibition de l'expression génique est très efficace parce que ce complexe est capable de détruire un autre mRNA de façon catalytique (de Fougerolles et al., 2007). La remarquable capacité d'interférence en vers les ARN, la meilleure stabilité *in vivo* grâce aux doubles brins et le site d'action cytoplasmique font que les siRNA sont assez puissants en comparaison avec des oligonucléotides antisenses. Les micro-ARN (miRNA) sont des molécules endogènes d'ARN non codant de 19-24 nucléotides capables de réguler négativement le mRNA cible. Le mécanisme d'action est similaire aux siRNA avec lesquels ils partagent la capacité de former un complexe avec la protéine AGO2. Cependant vu la partielle complémentarité avec le mRNA cible, le clivage est difficile comme dans le cas du siRNA. Les miRNA jouent un rôle important dans différentes maladies dont le cancer. L'utilisation d'anti-miRNA (antagomiR) est une stratégie thérapeutique pour contrôler leur surexpression (Fattal and Barratt, 2009).

1.1.3 Barrières biologiques (Limitations) *in vivo*

Avant d'explorer les stratégies utilisées pour la délivrance des acides nucléiques, il est important d'analyser quels sont les principaux obstacles biologiques qui peuvent limiter leur efficacité thérapeutique (figure 1.1).

La première barrière biologique est l'activité des nucléases dans le plasma et les tissus. En particulier la 3'-exonucléase hydrolyse le squelette phosphodiester à partir des extrémités (Fattal and Barratt, 2009; Juliano et al., 2009). Des études pharmacocinétiques ont montré que la demi-vie d'un oligonucléotide antisense chez le singe était de 5 minutes (Agrawal et al., 1995) et la partie non dégradée dans le plasma est distribuée dans les tissus périphériques, en particulier dans le foie.

Les modifications chimiques sur les acides nucléiques ont réussi à surmonter le problème de la stabilité versus les nucléases, néanmoins il reste des problèmes liés à la pharmacocinétique et à la biodistribution. Différentes études montrent que la demi-vie plasmique est de l'ordre de quelques minutes pour la phase de distribution et plusieurs heures pour la phase d'élimination.

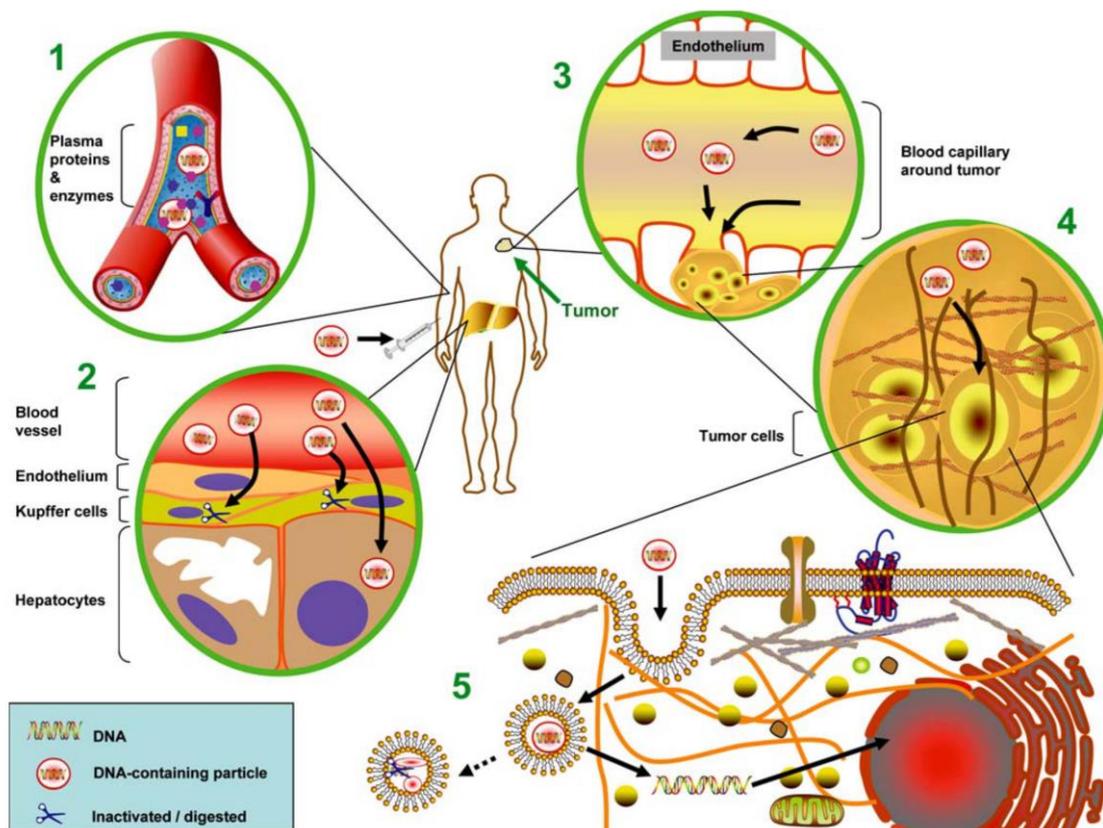


Figure 1.1. Principales barrières biologiques pour la délivrance des acides nucléiques par voie intraveineuse. Adaptée depuis (Li and Szoka, 2007).

Les acides nucléiques sont accumulés dans les tissus périphériques en particulier dans le foie et dans les reins, mais ils ne passent pas la barrière hémato-encéphalique et ils sont éliminés principalement par voie rénale bien que liés aux protéines. Cette description reste assez générale et ne prend pas en compte les différents types de structure moléculaire. A titre d'exemple, la conjugaison de siRNA avec différents lipides (Wolfrum et al., 2007) améliore la liaison avec les lipoprotéines plasmiques et/ou l'albumine, donc le temps de circulation dans le sang et l'internalisation dans le foie via le récepteur pour les lipoprotéines de basse densité (LDL).

Une barrière principale pour l'utilisation des acides nucléiques *in vivo* est la clairance de la part du système réticulo-endothélial (RES). Le RES fait partie du système immunitaire et il est en particulier responsable de l'activité phagocytaire en charge d'éliminer les bactéries et les virus, d'enlever les cellules endommagées ou mortes et de retirer les débris cellulaires (Underhill and Ozinsky, 2002). Il est composé principalement de monocytes circulant et de macrophages tissu spécifiques. Les pathogènes ou les particules en circulation sont liés aux opsonines (anticorps ou facteurs du complément) et sont ainsi reconnus par les récepteurs de surface des macrophages. En fonction des différents récepteurs liés il se produit l'activation de plusieurs voies de signalisation inflammatoires et phagocytose de l'objet opsonisé. Après l'internalisation, le phagosome fusionne avec les lysosomes et il y a donc dégradation du contenu de la vésicule (Dobrovolskaia and McNeil, 2007). Pour ces raisons on trouve des concentrations élevées d'acide nucléiques dans le foie et dans la rate vu le nombre de macrophages présents à cause de l'activité de purification de ces organes. De plus la

phagocytose de la part du RES a un impact important sur la toxicité de ces systèmes avec des effets secondaires graves au niveau hépatique, rénal et splénique (Juliano et al., 2009).

Pour pouvoir arriver aux cellules cibles, dans la plupart des cas, les acides nucléiques doivent sortir des vaisseaux sanguins et donc traverser la barrière endothéliale. Cela est particulièrement vrai dans le cas d'acides nucléiques qui font partie de complexes nanoparticulaires, mais il peut s'appliquer aussi pour les acides nucléiques libres. Les cellules qui forment le tissu endothélial adhèrent très fermement les unes avec les autres à travers différents types de jonctions intercellulaires (Komarova and Malik, 2010). Le passage de molécules à travers l'endothélium est possible grâce à la présence de voies paracellulaires formées par des petites imperfections dans les jonctions entre les cellules endothéliales. La taille des pores est comprise entre 4 nm et 20 nm (Firth, 2002). Normalement, vu leur tailles, les acides nucléiques devraient traverser facilement la barrière endothéliale, cependant il ne faut pas oublier que ces molécules sont des polyélectrolytes qui présentent un rayon hydrodynamique important comparé à des molécules non chargées de masse moléculaire similaire. Une autre voie de passage de la barrière endothéliale est l'utilisation de la voie transcellulaire. La transcytose est le passage de matériel contenu dans des vésicules à travers une cellule, ce passage demande de l'énergie pour assurer le mouvement des vésicules. Ces vésicules sont formées à partir de fossettes membranaires, dénommées cavéoles, de 70 nm de diamètre, présentes sur la face luminale de l'endothélium (Komarova and Malik, 2010). Il existe plusieurs conditions qui peuvent conditionner la perméabilité de l'endothélium. Pendant le processus inflammatoire, de nombreux médiateurs sont libérés pour augmenter le transport de macromolécules à travers l'endothélium. Il existe aussi des tissus spécialisés, comme le foie et la rate, qui doivent purifier des grosses quantités de sang. Pour ce faire, ils possèdent des fenestrations spéciales de 100-200 nm de diamètre entre les cellules endothéliales (Juliano et al., 2009). Dans le cas de tumeurs, la rapide croissance des cellules cancéreuses ne permet pas une organisation correcte des vaisseaux sanguins. Ils présentent alors des discontinuités et des ouvertures de l'ordre de 100-700 nm. De plus il y a un mauvais drainage lymphatique et la libération de médiateurs pro-inflammatoires. L'ensemble de ces facteurs constituent ce qu'on appelle l'effet « EPR » (enhanced permeability and retention) qui permet l'accumulation de macromolécules et nanoobjets dans les tumeurs (Maeda et al., 2000).

Une fois que les acides nucléiques ou leurs complexes sont arrivés à leur cible thérapeutique ils doivent être internalisés dans les cellules et selon leur mécanisme d'action, ils devront arriver dans le cytoplasme ou entrer dans le noyau cellulaire. A cause de leur taille et de leur charge, pour les acides nucléiques, le mécanisme le plus favorable pour entrer dans la cellule est l'endocytose. Il existe différents types d'endocytose : endocytose à clathrine, endocytose à cavéoles, endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline, phagocytose, macropinocytose. Le type de mécanisme utilisé pour l'internalisation dépend surtout du type de cellule cible vu que dans la plupart des cas pendant l'endocytose il y a la participation d'un récepteur de surface (Khalil et al., 2006). Cependant il faut noter que souvent il se produit l'utilisation simultanée de plusieurs voies d'internalisation. La contribution des différentes voies dépend aussi du type de vecteur utilisé. Les vésicules d'endocytose fusionnent d'abord avec des endosomes précoces (pH 6), ensuite avec des endosomes tardifs (pH 5.5) et finalement avec des lysosomes (pH 4.5). Le piégeage dans les endosomes est une barrière majeure pour la transfection des cellules (Juliano et al., 2009). Il existe différentes stratégies

d'échappement qui dépend du type de vecteur utilisé. Dans le cas de polymères cationiques on utilise l'effet « éponge à protons » : la présence des amines secondaires et tertiaires avec un pouvoir tampon élevé favorise l'accumulation de protons dans l'endosome et de leurs contre ions associés. Cela a pour conséquence l'augmentation de la pression osmotique et donc la lyse de l'endosome (Morille et al., 2008). Dans le cas des lipides cationiques on utilise leur interaction avec les phospholipides chargés négativement présents dans la face cytoplasmique des membranes endosomiales, cet interaction est à l'origine du mécanisme appelé flip-flop ou il y a décomplexation des acides nucléiques, échange avec les lipides anioniques et relargage dans le cytoplasme. De plus il est possible d'utiliser des lipides appelés « helper » comme la DOPE qui vont fusionner avec la membrane et la déstabiliser vu leur tendance à former des phases hexagonales inverses (Li and Szoka, 2007). Après être sorti des endosomes, les acides nucléiques, selon leur mécanisme d'action, doivent pénétrer le noyau, cela signifie passer la membrane nucléaire. Cette membrane possède des pores de quelques nm, mais dans le cas de macromolécules l'internalisation se fait grâce à des transporteurs de membrane qui reconnaissent une séquence peptidique particulière appelée « séquence de localisation nucléaire » (NLS). Le mécanisme probable d'internalisation nucléaire est le transfert dans le noyau pendant la mitose (Morille et al., 2008).

1.1.4 Stratégies pour la délivrance d'acide nucléiques *in vivo*

Cette section n'est pas une revue systématique sur les méthodes de délivrance des acides nucléiques. L'idée est de donner un aperçu des problématiques liées à la vectorisation et quelques généralités sur les stratégies de délivrance. Je voudrais aussi souligner que malgré les nombreux travaux de recherche et les presque 1800 études cliniques qui sont en cours il n'y a que quelques médicaments sur le marché à base d'acides nucléiques. Il existe différentes stratégies qui peuvent être utilisées pour améliorer l'efficacité thérapeutique des acides nucléiques. Différentes modifications chimiques ont été proposées pour augmenter la stabilité des acides nucléiques dans le plasma et améliorer l'interaction avec leurs cibles ainsi que la sélectivité (figure 1.2).

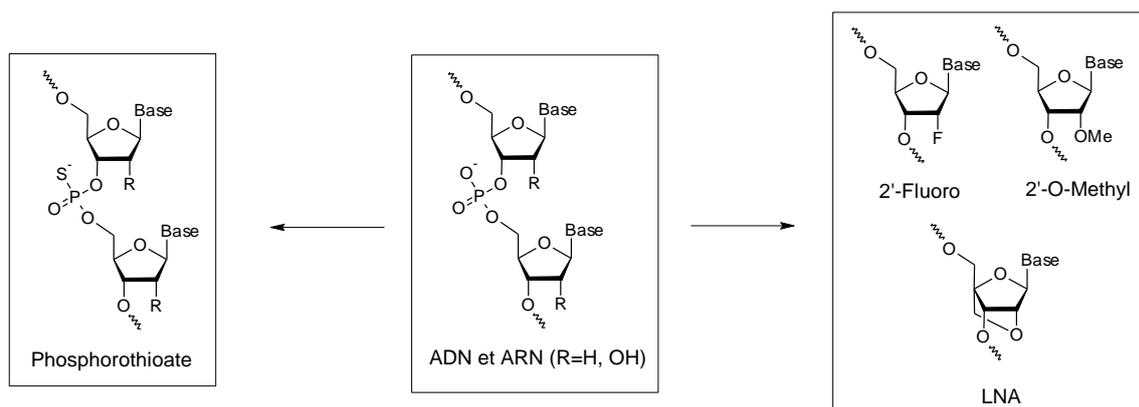


Figure 1.2. Schéma représentant les principales modifications chimiques pour augmenter la stabilité des acides nucléiques en conditions physiologiques.

Le phosphorothioate est une des premières modifications effectuées sur le squelette phosphodiester et reste la modification la plus utilisée (Bennett and Swayze, 2010; De Rosa et al., 2010). Elle présente l'avantage d'améliorer la stabilité, de favoriser le clivage de l'ARN

cible (RNAase H) et d'augmenter l'interaction avec les protéines plasmiques donc une diminution de l'élimination rénale. Les modifications sur la position 2' du sucre grâce à la proximité avec le 3'-phosphate dans l'acide nucléique augmentent la résistance aux nucléases. L'inconvénient est que ces modifications diminuent ou inhibent l'activité de clivage de la RNAase H du filament d'ARN opposé à la modification. Une des solutions au problème est de construire l'acide nucléique de façon à avoir la partie centrale avec une séquence naturelle de nucléotides et les extrémités avec de brèves séquences de résidus 2' modifiés. La partie centrale sera responsable de l'interaction avec l'ARN cible et de l'activité de clivage de l'RNAase H alors que les parties latérales seront responsables de la résistance aux nucléases. La modification 2'-fluoro est la plus efficace dans l'amélioration de l'affinité pour l'ARN cible entre les modifications 2'. Cependant les modifications 2'-alkyl sont plus efficaces dans l'augmentation de la résistance aux nucléases. La modification du sucre avec un système bicyclique formé d'un pont méthylène entre le carbone 4' et l'hydroxyle 2' (LNA : locked nucleic acid) améliore de façon dramatique les propriétés d'interactions entre l'acide nucléique et la cible en gardant la résistance aux nucléases (Campbell and Wengel, 2011). Il est plus difficile d'effectuer des modifications sur des siRNA, parce qu'elles peuvent modifier leur capacité d'interaction avec les protéines cellulaires nécessaires au mécanisme d'action de ces molécules.

Bien que les modifications chimiques aient permis des améliorations importantes pour l'utilisation des acides nucléiques, ces molécules ont besoin de systèmes de délivrance pour être efficacement utilisées en thérapie (Fattal and Barratt, 2009). Les méthodes de délivrance sont généralement classées dans trois catégories : techniques mécaniques et électriques, vecteur viraux et vecteur synthétiques non-viraux. L'idée est de donner un aperçu des différentes stratégies utilisées en soulignant les avantages et les désavantages de chaque technique.

L'injection directe dans le noyau d'un acide nucléique (microinjection) est la technique conceptuellement la plus simple. Cette méthode est très efficace mais elle est laborieuse et compliquée pour une utilisation *in vivo*. La biolistique est une technique qui consiste à propulser le gène d'intérêt dans les cellules à l'aide d'un canon à ADN (gene gun). L'ADN est adsorbé sur la surface de microparticules d'or ou de tungstène qui sont projetées à grande vitesse sur les cellules afin de traverser leurs membranes ou parois (dans le cas de cellules végétales). Cette méthode est très efficace *in vitro* sur des cultures cellulaires mais d'utilisation limitée *in vivo* vu la nécessité d'avoir un contact direct avec les cellules cible (Luo and Saltzman, 2000). L'électroporation consiste à utiliser des impulsions électriques pour perméabiliser la membrane cellulaire de façon transitoire et permettre ainsi l'internalisation de macromolécules. Elle est une des méthodes les plus efficaces dans le transfert d'acides nucléiques, elle a été testée avec succès en essai clinique au niveau de la peau, des muscles et de la cornée. Ses limitations correspondent à une certaine mortalité cellulaire et à son utilisation locale (Escoffre et al., 2009). Les virus génétiquement modifiés représentent les systèmes de transfert d'acides nucléiques les plus étudiés dans les essais cliniques (Ginn et al., 2013) (figure 1.3). La capacité des virus de transférer du matériel génétique dans les cellules n'est pas surprenante considéré l'évolution pendant des millions d'années du mécanisme d'internalisation de leur propre génome dans les cellules cibles pendant le cycle de répllication virale. De façon schématique une particule virale est un objet de taille nanométrique composé d'un acide nucléique et de quelques protéines qui la protègent

de la dégradation extracellulaire et favorisent son internalisation dans les cellules cibles. Un vecteur viral exploite donc les propriétés biologiques des virus en remplaçant le génome viral par l'acide nucléique d'intérêt thérapeutique.

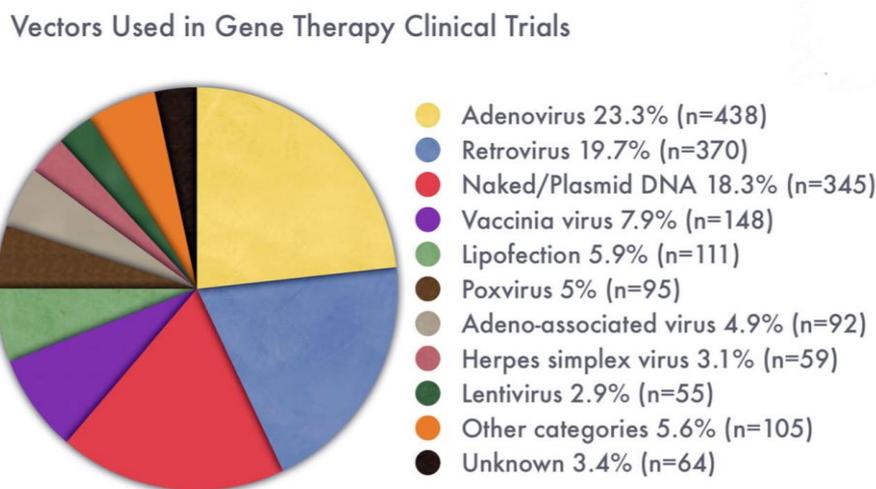


Figure 1.3. Vecteurs utilisés pour la thérapie génique dans les essais cliniques.
Adaptée depuis (Ginn et al., 2013).

Tous les vecteurs viraux ont les caractéristiques suivantes : la suppression des gènes codant pour des protéines virales surtout celles qui sont pathogéniques, la conservation des séquences de génome viral et l'expression des protéines nécessaires à la réplication virale (Giacca and Zacchigna, 2012). Les classes principales de virus utilisés sont les rétrovirus, les lentivirus, les adénovirus, les virus adéno-associés (adeno-associated virus, AAV) et les herpèsvirus. L'avantage principal de l'utilisation des vecteurs viraux est lié à l'augmentation de l'efficacité de transfection dans plusieurs types de tissus. Cependant il a été mis en évidence des difficultés par rapport à l'utilisation en thérapie de ces systèmes surtout liés à leur toxicité, en particulier à la forte réponse immunitaire déclenchée par la capsid protéique virale. De plus l'intégration du gène thérapeutique dans le génome de la cellule hôte peut être à l'origine de mutagénèses insertionnelles. Enfin il existe des problèmes liés à la production industrielle à grande échelle et à la stabilité de ces formulations (Patil et al., 2005a). En juillet 2012, l'agence européenne du médicament a donné, pour la première fois en Occident, son accord à la commercialisation d'une thérapie génique. Ce traitement, le Glybera™, est un virus adéno-associé capable d'induire l'expression de la lipoprotéine lipase pour le traitement du déficit en lipoprotéine lipase (Ylä-Herttuala, 2012).

Les systèmes de délivrance de type non-viraux sont principalement constitués de molécules cationiques capables d'interagir avec les acides nucléiques chargés négativement à travers des interactions électrostatiques. Les complexes formés sont appelés lipoplexes ou polyplexes en fonction de la nature chimique du vecteur (lipide ou polymère). Ils présentent les avantages d'être formulés aisément à grande échelle, une faible immunogénéité, ils peuvent être facilement modifiés et peuvent complexer des acides nucléiques de masse moléculaire élevée. Cependant ces systèmes sont peu efficaces dans la transfection des cellules en comparaison des systèmes viraux et ils présentent une toxicité lorsqu'ils sont utilisés par voie systémique, surtout liée à l'interaction avec les protéines plasmiques (Morille et al., 2008).

La polyéthylèneimine (PEI) est un polymère chargé positivement disponible en différents poids moléculaires sous forme linéaire ou ramifiée. Les complexes formés avec les acides nucléiques ont une charge nette positive et ils sont donc capables d'interagir avec les membranes cellulaires chargées négativement afin d'être internalisés par endocytose et de s'échapper des endosomes grâce à l'effet « éponge à protons » (Boussif et al., 1995). Toutefois ces systèmes présentent des problèmes liés à leur toxicité et à leur biodistribution *in vivo* à cause de leur capture par le RES et leur liaison aux protéines plasmiques chargées négativement. La toxicité peut être réduite en utilisant des PEI de faibles poids moléculaire ou en modifiant la surface des complexes avec des PEG (Fattal and Barratt, 2009). Les dendrimères de polyamidoamine (PAMAM) représentent une deuxième classe de polymères synthétiques polycationiques qui peuvent être utilisés pour la transfection (Haensler and Szoka, 1993; Kukowska-Latallo et al., 1996). La structure sphérique tridimensionnelle offre un contrôle en termes de degré et de génération des branches et donc des particules avec une faible polydispersité comparée à d'autres polymères. Ces propriétés confèrent une certaine reproductibilité dans la délivrance des acides nucléiques et dans la formulation. Le chitosan est un polysaccharide biodégradable naturel chargé positivement qui possède une faible toxicité et immunogénicité (MacLaughlin et al., 1998). Pour former le complexe, l'acide nucléique est ajouté sous agitation à une solution acide de chitosan de faible masse moléculaire. Cependant son efficacité est basse comparée à d'autres systèmes. De plus, différentes étapes d'optimisation dans la préparation de ce type de nanoparticules sont nécessaires (masse moléculaire, degré de déacétylation, ratio N/P, méthode de préparation) (Liu et al., 2007).

Les liposomes sont des vésicules constituées d'un compartiment aqueux à l'intérieur d'une bicouche phospholipidique. Ils peuvent être utilisés comme systèmes de délivrance d'acides nucléiques soit en les piégeant dans le compartiment aqueux soit grâce à des interactions avec la bicouche lipidique. Ces systèmes ne sont pas immunogéniques généralement et leur composition peut être facilement variée de façon à contrôler certaines caractéristiques comme la taille, la charge de surface et la morphologie, mais aussi leur donner des fonctionnalités spécifiques comme le ciblage ou le relargage contrôlé (Patil et al., 2005a). Normalement les liposomes sont constitués d'une combinaison de différents composés : lipides, lipides pégylés, lipide-polymères, ligands de ciblage. Les lipides cationiques ont été un des systèmes les plus efficaces *in vitro* depuis leur première publication (Felgner et al., 1987). Après avoir été mélangés avec des acides nucléiques ils peuvent se complexer et former des particules cationiques. Ces complexes (lipoplexes) protègent l'acide nucléique de la dégradation et favorisent sa délivrance dans les cellules après interaction avec les membranes cellulaires chargées négativement. Cependant ces systèmes sont peu efficaces *in vivo* vu leur capacité de transfection et une certaine toxicité associée à une réponse inflammatoire et activation du complément. De plus ils présentent des problèmes de pharmacocinétique, ils s'accumulent dans les poumons et dans le foie ou ils sont principalement dégradés, ils interagissent rapidement avec les protéines plasmiques chargées négativement (Li and Szoka, 2007). Les lipides neutres (ou helper lipids) sont utilisés pour leur propriété à former des structures intermédiaires de fusion avec les membranes. Un exemple est le 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphaethanolamine (DOPE). Il est aussi possible d'utiliser des lipides anioniques. Ces lipides sont similaires aux lipides biologiques et ils ont une faible toxicité. Cependant ces systèmes ont une application limitée vu la difficulté de former des complexes à cause de

répulsions électrostatiques entre les lipides anioniques et les acides nucléiques chargés négativement. Une solution possible est d'utiliser un agent complexant l'acide nucléique de type cationique (PEI, protamine, Ca^{++}) et de décorer ainsi le complexe avec les lipides anioniques (Patil et al., 2005b). L'utilisation de lipides pégylés dans la composition des liposomes pourrait prévenir la reconnaissance de la part du RES en augmentant la furtivité des objets, le temps de circulation et en diminuant leur toxicité (Patil et al., 2005a).

1.2 Interactions faibles

1.2.1 Introduction

L'idée principale de ce sous chapitre est d'examiner les forces intermoléculaires qui permettent aux différentes molécules d'interagir entre elles, avec une attention particulière sur les interactions faibles concernant les acides nucléiques.

La liaison chimique est le phénomène physique qui lie deux ou plusieurs atomes entre eux en réorganisant leurs électrons de valence de façon qu'une force d'attraction nette se produise entre eux. Il y a deux types principaux de liaisons : ionique et covalente. Une liaison ionique se forme quand un ou plusieurs électrons de valence sont transférés d'un atome à l'autre, avec la formation d'ions positifs et négatifs, la liaison consiste dans la force électrostatique attractive entre les deux ions de charge opposée. Une liaison covalente, d'autre part, implique le partage des électrons de valence entre les atomes.

1.2.2 Liaison covalente polaire

Les modèles qui représentent la liaison covalente et ionique sont des situations limites. En réalité, la liaison covalente pure, dans laquelle les atomes partagent équitablement la paire d'électrons, se produit seulement entre atomes identiques. Quand deux atomes différents forment une liaison covalente, la paire d'électrons ne sera pas répartie de façon symétrique, on parle alors de liaison covalente polaire, dans laquelle les deux atomes possèdent des charges partielles (figure 1.4).

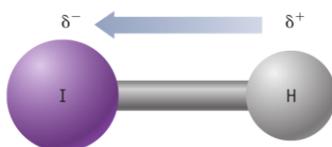


Figure 1.4. Une liaison covalente polaire.
Adaptée depuis (Kotz et al., 2012).

La liaison est polaire parce que les atomes ne sont pas capables d'attirer les électrons avec la même force et la distribution des électrons sera asymétrique. L'atome dans lequel la répartition des électrons sera plus importante aura une charge négative partielle. Une liaison polaire possède donc un pôle négatif et un pôle positif. Dans les ions, le déplacement des électrons est complet et on peut attribuer une charge nette positive et une charge nette

négative à chaque atome. Vu les différents types d'atomes ce n'est pas surprenant que les liaisons peuvent se situer dans un continuum entre covalente pure et ionique pure.

Dans les années 1930, L. Pauling a proposé (Pauling, 1932) un paramètre appelé « électronégativité atomique » (χ) qui nous permet de dire si une liaison est polaire, quel atome de liaison possède la charge partielle négative et si une liaison est plus polaire qu'une autre. L'électronégativité est définie comme la mesure de la capacité d'un atome à attirer les électrons de liaison vers soi-même. L'électronégativité augmente généralement quand on se déplace vers la droite (dans la même période) et vers le haut (dans le même groupe) dans le tableau périodique (figure 1.5).

1A	2A											3A	4A	5A	6A	7A
Li 1.0	Be 1.6											B 2.0	C 2.5	N 3.0	O 3.5	F 4.0
Na 0.9	Mg 1.3	3B	4B	5B	6B	7B	8B			1B	2B	Al 1.6	Si 1.9	P 2.2	S 2.6	Cl 3.2
K 0.8	Ca 1.0	Sc 1.4	Ti 1.5	V 1.6	Cr 1.7	Mn 1.5	Fe 1.8	Co 1.9	Ni 1.9	Cu 1.9	Zn 1.6	Ga 1.8	Ge 2.0	As 2.2	Se 2.6	Br 3.0
Rb 0.8	Sr 1.0	Y 1.2	Zr 1.3	Nb 1.6	Mo 2.2	Tc 1.9	Ru 2.2	Rh 2.3	Pd 2.2	Ag 1.9	Cd 1.7	In 1.8	Sn 2.0	Sb 1.9	Te 2.1	I 2.7
Cs 0.8	Ba 0.9	La 1.1	Hf 1.3	Ta 1.5	W 2.4	Re 1.9	Os 2.2	Ir 2.2	Pt 2.3	Au 2.5	Hg 2.0	Tl 1.6	Pb 2.3	Bi 2.0	Po 2.0	At 2.2

Figure 1.5. Valeurs d'électronégativité de Pauling pour les éléments du tableau périodique.

Adaptée depuis (Kotz et al., 2012).

En fonction de la différence d'électronégativité entre les atomes, la liaison interatomique varie entre deux extrêmes : différence d'électronégativité très faible (< 0.5), liaison apolaire donc liaison covalente et différence d'électronégativité très grande (> 1.7), liaison fortement polarisée donc liaison ionique. Entre ces deux extrêmes ($0.5 < \Delta\chi < 1.7$) la liaison est qualifiée de liaison covalente polaire.

La polarité de liaison se reflète aussi sur la polarité globale des molécules, vu que beaucoup de molécules ont des liaisons polaires. Les molécules diatomiques avec les deux atomes d'électronégativité différente sont toujours polaires. Cependant dans le cas de molécules avec deux ou plusieurs liaisons polaires il faut regarder la répartition des charges dans l'espace et évaluer si le barycentre des charges positives coïncide avec celui des charges négatives (figure 1.6).

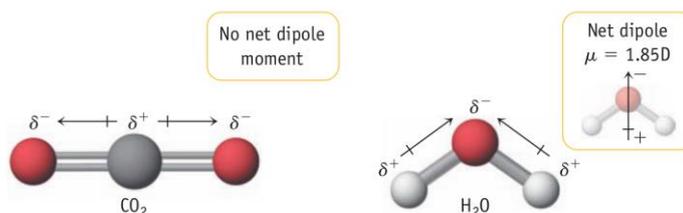


Figure 1.6. Polarité des molécules triatomiques. Adaptée depuis (Kotz et al., 2012).

En tout cas plus la valeur du moment dipolaire est grande, plus la molécule est polaire. En fonction du nombre de paires d'électrons partagés entre les atomes on parle de liaison simple, double et triple. Dans le cas de molécules avec différentes structures de résonance, les liaisons ne sont pas provoquées par un nombre pair d'électrons, il est alors possible d'avoir des liaisons fractionnaires. La longueur de liaison est la distance entre les noyaux de deux atomes liés, cette distance est clairement liée à la taille des deux atomes. Que se passe-t-il quand on veut rapprocher deux atomes d'hydrogène qui se trouvent au départ à une distance infinie ? Initialement, les atomes sont assez éloignés et ils n'interagissent pas entre eux, au fur et à mesure que les atomes se rapprochent le noyau de l'un des atomes commence à interagir avec l'électron de l'autre atome et vice-versa. A cause de ces forces attractives le nuage électronique se modifie et l'énergie potentielle diminue. Les calculs, validés par des mesures expérimentales, montrent que quand la distance entre les atomes est de 74 pm l'énergie potentielle est au minimum et la molécule de H₂ est très stable. Si la distance est inférieure à 74 pm l'énergie potentielle augmente rapidement à cause des interactions répulsives entre les noyaux des deux atomes (figure 1.7) (McMurry and Fay, 2012).

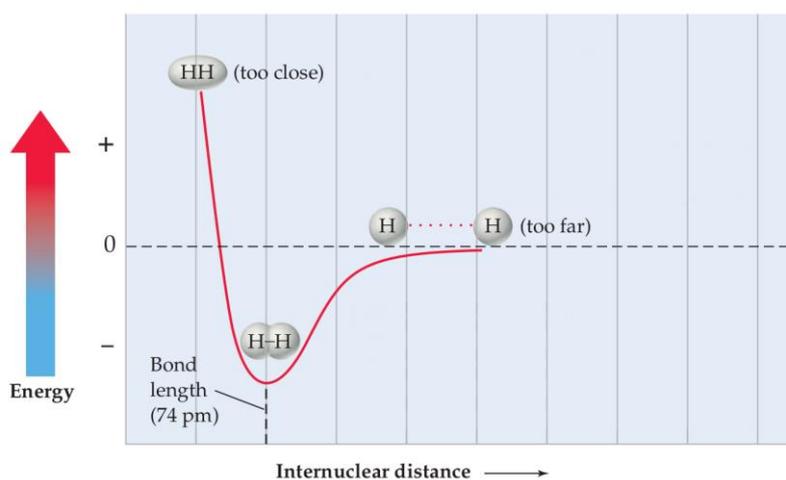


Figure 1.7. Energie potentielle en fonction de la distance internucléaire pour la molécule de H₂. Adaptée depuis (McMurry and Fay, 2012).

L'enthalpie de dissociation d'une liaison est le changement d'enthalpie nécessaire pour briser une molécule dans les différents atomes en phase gazeuse. Ce processus est toujours endothermique, ΔH est positive, donc on doit fournir de l'énergie. L'énergie nécessaire pour briser une liaison est la même que celle qui est libérée quand la liaison est formée. Un exemple d'enthalpie de dissociation pour une liaison C—H est 413 kJ/mol (98.7 kcal/mol) (Kotz et al., 2012).

1.2.3 Forces de van der Waals

Les forces intermoléculaires sont appelées de façon générale forces de van der Waals et elles comprennent toutes les forces attractives et répulsives entre molécules avec un dipôle permanent, entre molécules polaires et molécules non-polaires et entre molécules non-polaires. Dans le cadre d'une interaction entre une molécule polaire qui possède un moment dipolaire, μ_1 , et un ion qui possède une charge, Q_2 , il y a des forces d'attraction qui sont parmi

les plus grandes entre les forces d'interaction intermoléculaires (figure 1.8a).

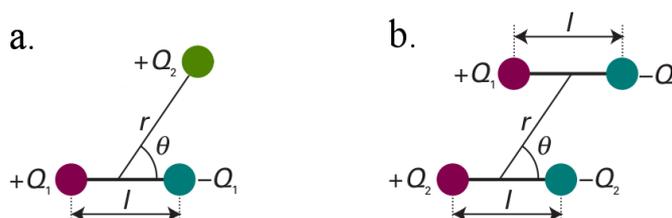


Figure 1.8. Interaction entre un dipôle et charge (a) et entre un dipôle et un dipôle (b).
Adaptée depuis (Atkins and De Paula, 2010).

Les attractions ion-dipôle peuvent être évaluées en utilisant une équation corrélée à la loi de Coulomb : $V = \mu_1 Q_2 \cos\theta / 4\pi\epsilon r^2$ et elles dépendent de différents facteurs : la distance entre ion et dipôle, r , la charge de l'ion, Q_2 , l'amplitude du dipôle, μ_1 , l'orientation du dipôle par rapport à la charge, θ . Si Q_2 est positive, l'énergie sera plus faible lorsque $\theta = 0$ et donc la charge partielle du dipôle se trouve plus près de la charge positive de l'ion. Cette énergie d'interaction décroît plus vite avec la distance que celle entre deux charges ponctuelles ($1/r^2$ plutôt que $1/r$) car, pour la charge isolée, les deux charges partielles du dipôle semblent fusionner et s'annulent quand la distance r augmente. Un exemple est l'hydratation d'ions dans les solutions aqueuses, le changement d'enthalpie associé à ce processus est appelé enthalpie de solvation ou d'hydratation qui correspond aux variations d'enthalpie qui se produisent lorsque des cations et des anions très éloignés les uns des autres dans un gaz forment une solution très diluée. Ces valeurs ne peuvent être mesurés mais une estimation dans le cadre d'hydratation des ions sodium donne une valeur de -405 kJ/mol (-96.7 kcal/mol).

Quand il y a une interaction entre deux molécules polaires (figure 1.8b) il y a attraction entre l'extrémité négative de l'une et l'extrémité positive de l'autre molécule. Cette attraction est appelée interaction dipôle-dipôle. Dans le cas de deux dipôles stationnaires, on peut calculer de façon similaire au cas précédent l'énergie d'interaction entre deux dipôles μ_1 et μ_2 : $V = \mu_1 \mu_2 (1 - 3\cos\theta) / 4\pi\epsilon r^3$. Cette énergie potentielle décroît encore plus vite que dans le cas précédent ($1/r^3$) car les charges des deux dipôles semblent fusionner et s'annuler quand les dipôles s'éloignent. Le facteur angulaire prend en compte les deux orientations possibles des dipôles. Dans les cas où les deux molécules polaires sont libres de rotation (dans un gaz ou un liquide), le calcul de l'énergie moyenne d'interaction donne comme résultat : $V = 2\mu_1^2 \mu_2^2 / 3(4\pi\epsilon)^2 kT r^6$. On peut noter la dépendance de l'énergie à l'inverse de la distance à la puissance six et à l'inverse de la température. Plus grandes sont les forces d'attraction entre les molécules, plus grande sera l'énergie à fournir pour séparer les molécules (Atkins and De Paula, 2010).

La liaison hydrogène est un cas particulier d'interaction dipôle-dipôle dans lequel sont impliquées des molécules qui possèdent des liaisons N—H, O—H, F—H. Normalement les points d'ébullition des composés corrélés augmentent avec la masse moléculaire, par exemple pour les produits contenant de l'hydrogène avec les éléments du groupe 4A : $\text{CH}_4 < \text{SiH}_4 < \text{GeH}_4 < \text{SnH}_4$. Une tendance similaire devrait se retrouver pour les composés contenant de

l'hydrogène avec les éléments du groupe 5A, 6A, 7A. Cependant, les points d'ébullition de NH_3 , H_2O et HF dévient de façon significative par rapport à l'extrapolation des valeurs basés sur la masse moléculaire. Par exemple, pour l'eau la valeur expérimentale est 200°C plus élevée par rapport à la valeur extrapolée. Vu que le point d'ébullition est corrélé avec les interactions intermoléculaires, cela indique que pour les produits NH_3 , H_2O et HF il y a des fortes forces d'attraction intermoléculaires. L'explication est à rechercher dans l'électronégativité de N (3.0), O (3.5) et F (4.0), qui sont parmi les éléments ayant les valeurs d'électronégativité les plus élevées. Les liaisons N—H, O—H, F—H sont donc fortement polarisées, l'hydrogène apporte une charge positive significative et N, O, F apportent une charge négative significative. La liaison hydrogène est une forme extrême d'interaction dipôle-dipôle dans laquelle un atome est toujours l'hydrogène et l'autre atome est un élément fortement électro-négatif, souvent O, N, F (figure 1.9).

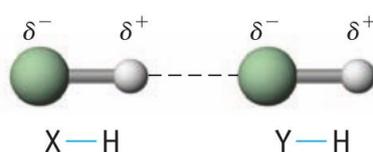


Figure 1.9. Représentation schématique d'une liaison hydrogène. Adaptée depuis (Kotz et al., 2012).

L'atome d'hydrogène forme un pont entre les deux atomes électro-négatifs. Les énergies associées avec les liaisons hydrogènes sont de l'ordre de 5-30 kJ/mol (1.2-7.2 kcal/mol).

Les molécules polaires comme l'eau peuvent induire un dipôle dans des molécules qui n'ont pas de dipôle permanent. Par exemple, le nuage électronique dans une molécule isolée d'oxygène (O_2) est distribué de façon symétrique entre les deux atomes, si on approche une molécule polaire (eau), ce nuage est déformé par l'une des deux extrémités partiellement chargées de la molécule d'eau. La molécule d' O_2 devient alors polaire, on parle alors de dipôle induit et elle peut interagir, faiblement, avec la molécule d'eau. Ces interactions sont du type dipôle induit et elle peut interagir, faiblement, avec la molécule d'eau. Ces interactions sont du type dipôle-dipôle induit. La propriété de formation d'un dipôle induit, μ^* , est appelé polarisation et dépend de la polarisabilité, α , de l'atome ou de la molécule. Plus le nuage électronique est grand, plus la molécule sera facilement polarisée. La formule de l'énergie d'interaction dipôle induit – dipôle est : $V = 2\mu_1^2\alpha_2 / \pi\epsilon r^6$. La solubilité de certain gaz dans l'eau est un effet des interactions dipôle-dipôle induit.

L'iode, I_2 , n'est pas un gaz à température ambiante, cela montre que des molécules apolaires doivent pouvoir interagir entre elles. Si l'on compare l'enthalpie d'évaporation de quelques molécules apolaires on peut déduire que dans certains cas ces interactions doivent être importantes. Il faut considérer que les molécules et les atomes sont dans un état de mouvement constant, quand deux atomes ou molécules apolaires se rapprochent, il y a attraction et répulsion entre leurs électrons et leurs noyaux qui peuvent conduire à des déformations de leurs nuages électroniques. Ces dipôles induits de façon temporaire peuvent interagir, ce type d'interaction est appelée dipôle induit – dipôle induit ou forces de dispersion de London. Ce type de force d'interactions est présent entre toutes les molécules, polaires ou apolaires, mais sont les seules forces présentes entre les molécules apolaires. Deux facteurs

important peuvent jouer sur l'amplitude de ces forces : la polarisabilité et la surface relative des molécules participant à l'interaction.

Le benzène, modèle de système riche en électrons π , n'a pas de moment dipolaire permanent, vu la faible polarité des liaisons C—H et à cause de la symétrie de la molécule. Cependant le système d'électrons π , en dessus et en dessous de l'anneau de benzène, possède une charge négative partielle et pour contrebalancer possède également une charge positive partielle dans le plan de la molécule (figure 1.10).

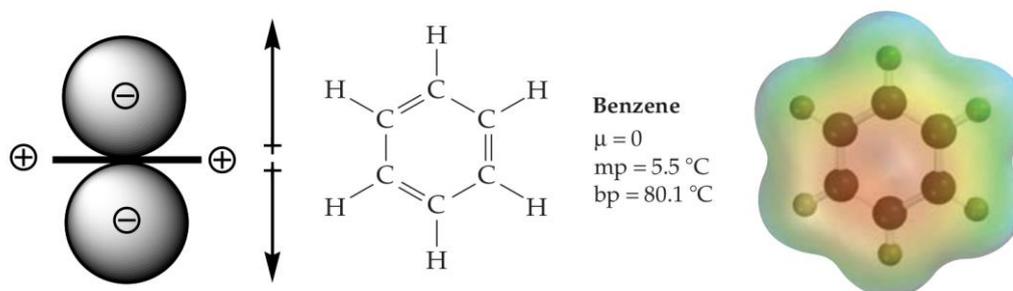


Figure 1.10. Structure du benzène. Adaptée depuis (McMurray and Fay, 2012).

Ce système est un quadrupôle électrique (deux dipôles, alignés en parallélogrammes sans moment dipolaire net). La région négative du quadrupôle peut interagir avec des composés chargés positivement, avec des composés polaires et aussi avec un autre quadrupôle. Dans le cas d'interactions avec des cations, la nature du cation influencera la force de l'interaction, le maximum de l'interaction en phase gazeuse est avec le Li^+ et il diminue avec l'augmentation de la taille du cation. De plus il y a un effet de solvation, le maximum de l'interaction se retrouve en phase gazeuse et il diminue avec l'augmentation de la polarité du solvant. Analysant le moment quadrupolaire de différents dérivés du benzène on peut prévoir la tendance des interactions. Les substituants qui augmentent la densité de charge négative dans le cycle aromatique augmentent la force d'interaction, ainsi pour les systèmes hétéroaromatiques si la paire d'électrons fait partie du système aromatique.

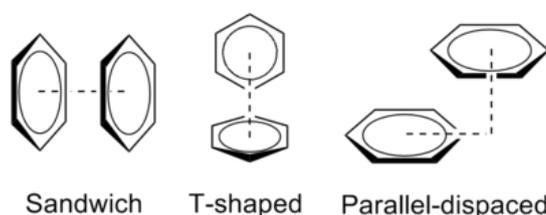


Figure 1.11. Structures possibles pour les dimers de benzène.
Adapté depuis (Anslyn and Dougherty, 2004).

On parle de « π -stacking » pour les interactions entre deux quadrupôles, cependant le terme n'est pas correct, parce qu'on ne peut pas parler d'une superposition parfaite ou on aurait une répulsion entre les deux systèmes π négatives. Dans le cas de géométries simples comme le

benzène la conformation la plus stable est appelée « géométrie en forme de T » dans laquelle les deux anneaux sont positionnés de façon perpendiculaire l'un par rapport à l'autre. Pour des structures aromatiques plus compliquées la structure la plus favorable est souvent une « superposition décalée », de façon à aligner les zones chargées négativement du centre avec les zones chargées positivement des bords (figure 1.11) (Anslyn and Dougherty, 2004).

1.2.4 Effet hydrophobe

Si on mélange l'eau avec un solvant apolaire comme le benzène ou l'hexane, on a la formation de deux phases : les deux liquides ne sont pas miscibles. Le benzène ou l'hexane sont hydrophobes donc ne sont pas capables d'interagir de façon favorable avec l'eau, de plus ils interfèrent avec les liaisons hydrogène présentes entre les molécules d'eau. Toutes les molécules ou ions en solution aqueuse interfèrent avec les liaisons hydrogènes des molécules d'eau, mais les solutés polaire (NaCl) sont capables de compenser la perte des liaisons hydrogène entre molécules d'eau avec des nouvelles interactions entre le soluté et l'eau et le changement d'enthalpie associé est généralement faible. Cependant, dans le cas de solutés hydrophobes, il n'y a pas de compensation et leur addition à l'eau provoque une petite augmentation de l'enthalpie. En outre, la dissolution de molécules hydrophobe dans l'eau conduit à une diminution de l'entropie, les molécules d'eau à proximité des solutés hydrophobes sont contraintes au niveau de leurs orientations et forment des structures assez organisées autour de chaque molécule hydrophobe. La diminution d'entropie est proportionnelle à la surface du soluté hydrophobe, le changement d'énergie libre (ΔG) associé à la dissolution d'un composé hydrophobe dans l'eau est défavorable : $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, avec ΔH (enthalpie) positif, ΔS (entropie) négatif et ΔG positif. Les composés amphiphiles sont formés d'une partie polaire et une partie apolaire. Si on mélange ce produit avec l'eau, la

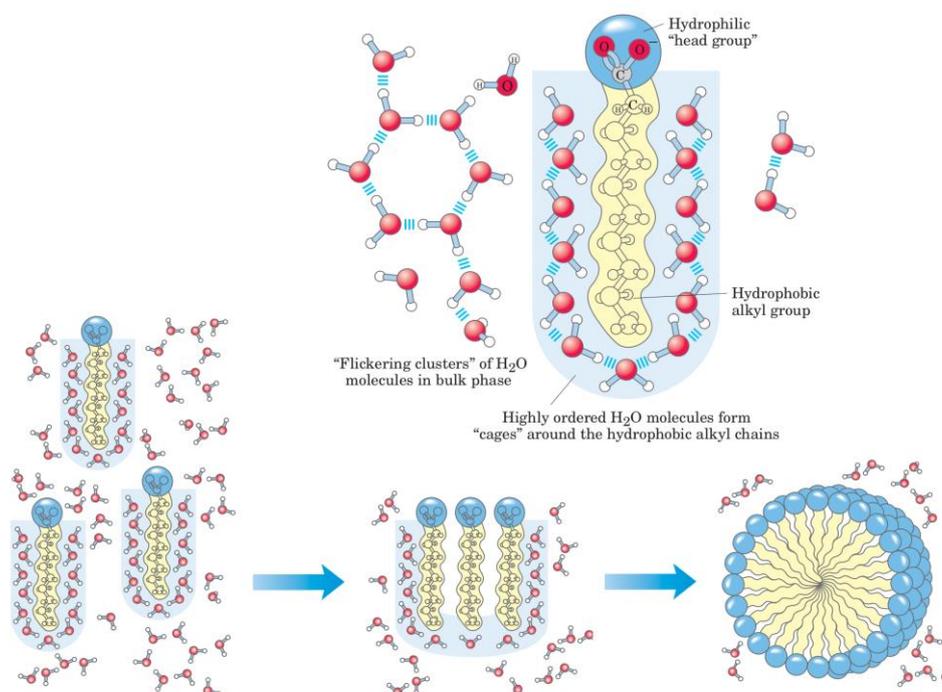


Figure 1.12. Comportement des molécules amphiphiles dans l'eau. Adaptée depuis (Nelson et al., 2008).

partie polaire ou hydrophile interagit favorablement avec le solvant et tendra à se dissoudre, mais la partie apolaire ou hydrophobe tendra à éviter le contact avec l'eau (figure 1.12). Les parties hydrophobes tendront à s'associer pour minimiser leur surface de contact avec l'eau et les parties hydrophiles seront disposées de façon à maximiser les interactions avec le solvant. Ce type de structure est appelé micelle et peut être formée de centaines de molécules. Les forces qui tiennent les parties hydrophobes ensemble sont souvent appelées interactions hydrophobes, cependant il n'y a aucun type d'attraction essentielle entre les parties apolaires, il est simplement le résultat de l'équilibre thermodynamique que cherche à minimiser le nombre de molécules ordonnées d'eau présentes à la surface des parties hydrophobes. Plusieurs biomolécules sont amphiphiles, comme les protéines, certaines vitamines, les stérols, les phospholipides des membranes. La structure tertiaire de ces molécules et leur interaction avec d'autres biomolécules dépendent fortement des interactions hydrophobes qui sont capables de se mettre en place. Par exemple, la structure des membranes biologiques est déterminée par les interactions hydrophobes entre les lipides et les protéines membranaires (Nelson et al., 2008).

Le tableau 1.1 récapitule les principaux types d'interactions et les énergies mise en jeu.

Type d'interaction	Energie typique (kJ/mol)	Dépendance à la distance de l'énergie potentielle	Commentaire
Liason covalente	400		Dans les solides ioniques
Ion-ion	250	$1/r$	Dans les solutions aqueuses
Ion-dipôle	20	$1/r$	
Dipôle-dipôle	15	$1/r^2$	
	2	$1/r^3$	Entre des molécules polaires stationnaires
	0.3	$1/r^6$	Entre des molécules polaires en rotation
Dispersion de London	2	$1/r^6$	Entre tous les types de molécules et d'ions
π - π stacking	2		
Liason hydrogène	20		X—H...Y quand X et Y = N, O ou F

Tableau 1.1. Principaux type d'interaction et énergies mise en jeu. Adapté depuis (Atkins and De Paula, 2010).

1.2.5 ADN structure

Les acides nucléiques sont les molécules centrales dans la transmission, l'expression et la conservation de l'information génétique. L'ADN est un exemple classique de corrélation entre la fonction biologique et la structure biomoléculaire dont l'assemblage est dépendant des nombreuses interactions intermoléculaires. L'ADN est, dans sa structure primaire, un polymère linéaire composé de monomères, appelés nucléotides.

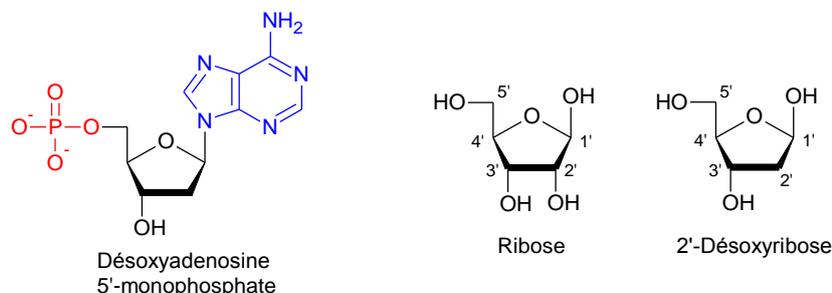


Figure 1.13. Structure d'un nucléotide.

Un nucléotide est formé de trois parties : un groupe phosphate, un sucre pentose (cinq carbones) et une base azotée. Dans l'ADN, le sucre est toujours le désoxyribose, dans l'ARN, le sucre est toujours le ribose (figure 1.13).

Les bases azotées sont l'adénine, la guanine, la cytosine et la thymine, dans l'ADN ou l'uracile, dans l'ARN. Les bases sont classifiées en purines et pyrimidines (figure 1.14).

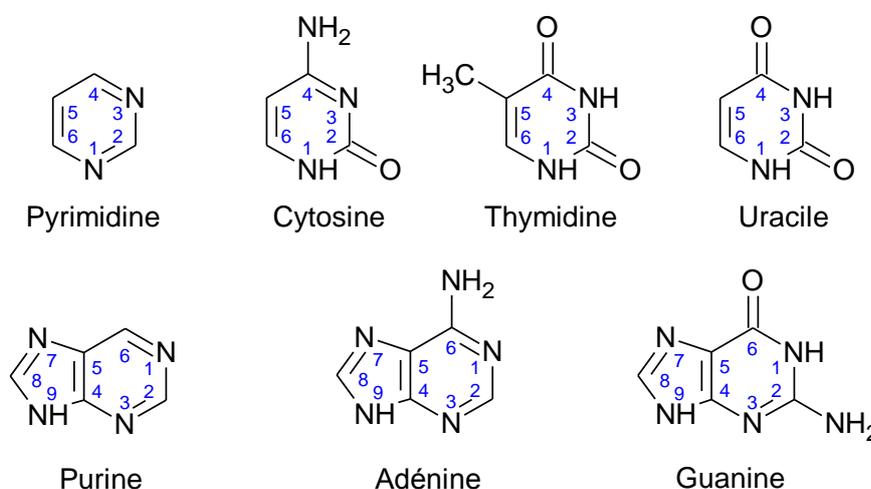


Figure 1.14. Structure des principales bases azotées.

Une purine comprend deux cycles condensés, une pyrimidine, un seul cycle. Purines et pyrimidines sont des molécules hétérocycliques qui présentent plusieurs atomes d'azote dans leur cycle. La présence d'azote confère un caractère basique à ces molécules, mais aucune n'est protonée à pH neutre. Le caractère acide des acides nucléiques est dû à la présence du phosphate qui se dissocie et libère un proton à pH physiologique. Les bases sont liées à la position 1' du sucre à travers l'azote 9 des purines ou l'azote 1 des pyrimidines.

Le phosphate est estérifié en position 5' ou 3' du sucre. Un brin d'acide nucléique est donc un polymère de phosphoryle-pentose dont les groupes latéraux sont des bases puriques et pyrimidiques (figure 1.15).

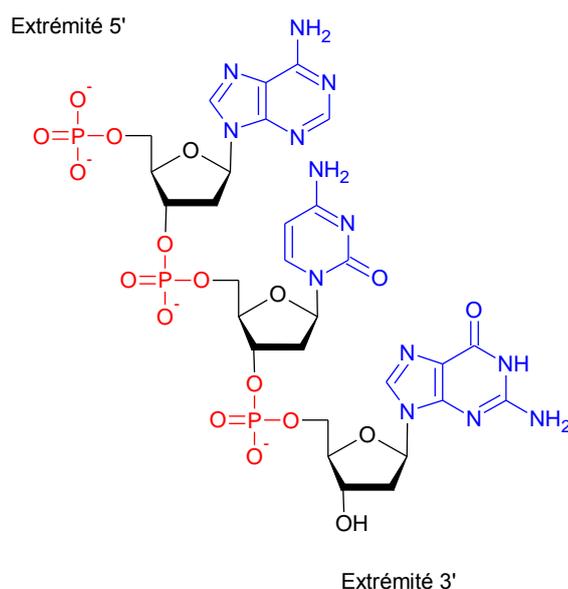


Figure 1.15. Structure de un polynucléotide.

Les nucléotides sont unis par des liaisons appelées phosphodiester. Un brin d'acide nucléique a une orientation chimique : l'extrémité 3' porte un groupe hydroxyle libre sur le carbone 3' du sucre ; l'extrémité 5' porte un groupe hydroxyle libre ou un groupe ester phosphate sur le carbone 5' du sucre. Cette polarité est à la base de la convention selon laquelle les polynucléotides sont tracés et lus dans le sens 5' → 3' (Bloomfield et al., 2000).

Les atomes d'azote et d'oxygène de chaque base se comportent comme des accepteurs ou donneurs de liaisons hydrogène. Chaque base possède des sites accepteur ou donneur, ainsi s'il n'y a pas de contrainte sur la géométrie de l'interaction chaque base peut s'apparier avec elle-même ou avec une autre base à travers des liaisons hydrogène (figure 1.16).

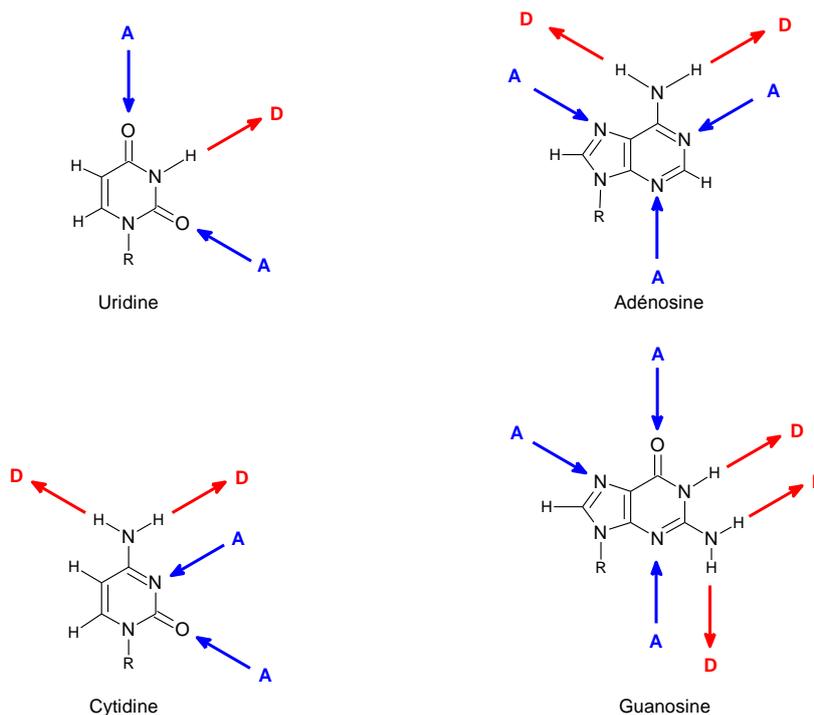


Figure 1.16. Principales groupes accepteurs et donneurs de liaisons hydrogène dans les bases azotées.

Il est aussi possible de former des liaisons hydrogène avec des acides aminés polaires dans le cadre d'interactions entre les acides nucléiques et les protéines. De plus, pour les nucléosides des liaisons hydrogène sont possibles entre le nucléotide à travers le 2'-OH et le groupe phosphate. Dans les solutions aqueuses, tous les sites accepteurs et donneurs forment des liaisons hydrogène avec l'eau, donc à chaque fois qu'il y a un appariement entre deux bases ou entre une base et un acide aminé il se produit un échange entre les liaisons hydrogène présentes entre la base et l'eau pour avoir des nouvelles liaisons hydrogène entre les deux bases ou entre la base et l'acide aminé. La présence de liaisons hydrogène entre les bases en solution peut être étudiée par RMN en analysant les déplacements et les temps d'échange des protons imine et amine ou par spectroscopie infrarouge en étudiant les fréquences du carbonyle. A travers des études de cristallographie aux rayons X, on peut déduire la distance de la liaison hydrogène entre les atomes accepteur et donneur (N – N, O – O, N – O). S'il y a formation de liaison hydrogène la distance sera 2.8-3 Å, sinon la distance sera au moins de 3.4 Å (Bloomfield et al., 2000). La forme la plus commune d'appariement entre les bases,

qu'on peut trouver dans l'ADN ou l'ARN double filament, est celle définie par Watson et Crick en 1953 (WATSON and CRICK, 1953), où l'adénine se lie avec la thymine ou l'uracile et la guanine se lie avec la cytosine. Chaque base établit des liaisons hydrogène avec la base du filament opposé en formant une paire de bases planaires. Ces interactions entre les bases de type liaison hydrogène sont à l'origine de la complémentarité des paires de bases et donc de l'association spécifique entre deux filaments de la double hélice. L'hélice de l'ADN-B « canonique » a 10 paires de base par tour (chaque sucre tourne de 36°) et, vu que les bases aromatiques sont empilées les unes sur les autres avec une épaisseur de van der Waals de 3.4\AA , l'hélice fait un tour complet chaque 34\AA . Chaque adénine doit s'apparier avec une thymine et chaque guanine doit s'apparier avec une cytosine. Leur géométrie est telle que toutes les paires de bases sont interchangeables et peuvent se remplacer dans l'hélice double sans provoquer des distorsions et ainsi modifier la position des atomes C-1' du squelette de sucre-phosphate. L'ADN-B, le plus répandu, a deux profonds sillons hélicoïdaux de largeur différente. Le petit sillon expose le côté de la paire de base où est présent le squelette de sucre-phosphate, tandis que le grand sillon expose le côté opposé.

Dickerson et Drew, en 1979, ont déterminé la structure cristalline aux rayons x d'un dodécaèdre de nucléotides auto-complémentaires, $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$. Cette étude a une importance historique parce qu'elle confirme l'exactitude du modèle de Watson et Crick. Les valeurs moyennes trouvées étaient très proches des valeurs indiquées pour l'ADN-B « canonique » (10.1 paires de bases par tour, rotation de 35.5° entre chaque sucre, distance entre chaque paire de bases de 3.4\AA), par contre les valeurs individuelles pour chaque résidu peuvent être assez différentes. Par exemple, la rotation de chaque paire de bases peut varier entre 26° et 43° . Cela signifie qu'il peut exister des distorsions localisées qui provoquent des rotations et des inclinaisons des paires de bases. Les études menées par rayons-X et RMN ont démontré que la conformation de l'ADN est irrégulière d'une façon dépendante de la séquence, bien qu'on n'ait pas encore trouvé de règles qu'attribuent à une séquence spécifique une conformation spécifique. Cependant la séquence établit la déformabilité de l'hélice double, due à la superposition des anneaux aromatiques de la paire de bases adjacentes. Par exemple, un segment formé par une série de purines sera très rigide à cause de la superposition majoritaire entre les noyaux aromatiques. Ce phénomène est très important parce qu'il permet à une séquence particulière de faire une interaction spécifique avec des protéines qui régulent l'information génétique. Quand l'humidité relative est diminuée à 75% l'ADN-B subit un changement réversible de conformation vers la forme A de l'ADN. L'ADN-A est une hélice double tournant vers la droite de diamètre plus large (diamètre 26\AA) et plus courte par rapport à l'ADN-B, avec 11 paires de bases par tour complet de 28\AA .

La conformation d'une unité de nucléotide est définie par six angles de torsion du squelette sucre-phosphate et par l'angle de torsion de la base par rapport au sucre. En considérant ces sept degrés de liberté par nucléotide on s'attend à ce que les polynucléotides soient assez flexibles. Cependant il existe une série de contraintes qui diminuent leur liberté de conformation. La rotation de la base autour de la liaison avec le sucre est fortement gênée. Les purines ont deux orientations possibles : syn et anti, pour les pyrimidines seulement la conformation anti est possible à cause du carbonyle en C2 qu'interfère avec le sucre. Dans les hélices doubles, normalement, toutes les bases sont en conformation anti. Le ribose a un certain degré de flexibilité qu'on retrouve sur la conformation du squelette de sucre-phosphate. L'anneau de ribose n'est pas planaire mais légèrement plié à cause des répulsions

stériques, il adopte une conformation dite « demi chaise » avec 4 atomes sur le même plan et un atome hors du plan. Si l'atome hors du plan est du même côté que le C5' la conformation est appelée endo, si il est de l'autre côté alors il est appelée exo. Dans la majorité des cas les atomes hors du plan sont le C2'-endo, le C3'-endo ou le C3'-exo. La conformation du sucre gouverne les orientations relatives des substituents phosphate de chaque résidu de ribose. Les angles de torsion de la chaîne de sucre-phosphate ne sont pas complètement libres de tourner à cause de la conformation du ribose et de la présence d'interactions non covalentes des groupes phosphate. Ces restrictions de conformation confèrent une certaine rigidité au squelette de sucre-phosphate (Voet and Voet, 2011).

L'appariement des bases est la force qui lie deux filaments d'acides nucléiques. On a vu que la forme la plus commune d'appariement est celle définie par Watson et Crick et aussi que les bases présentent différents sites qui peuvent être à l'origine de liaisons hydrogène. Il est important de comprendre pourquoi les liaisons hydrogène formées dans la paire Watson-Crick sont favorisées par rapport à d'autres géométries. Si on essaye de co-cristalliser l'adénine et la thymine, la paire de base formée à l'N7 (géométrie Hoogsteen) de l'adénine comme accepteur de liaison hydrogène à la place du N1 (géométrie Watson-Crick) (figure 1.17).

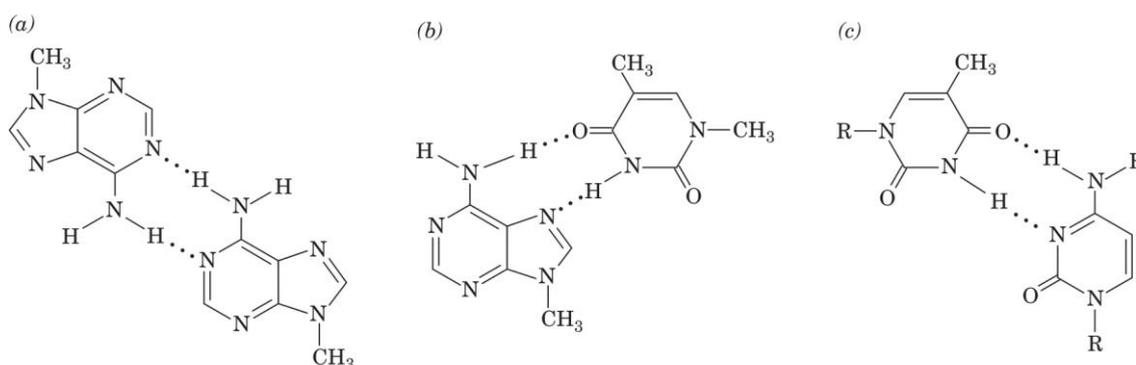


Figure 1.17. Appariement de bases de type non Watson-Crick entre deux résidus de 9-méthyladénine (a), de type Hoogsteen entre la 9-méthyladénine et la 1-méthylthymine (b) et de façon hypothétique entre la cytosine et la thymine. Adaptée depuis (Voet and Voet, 2011).

Cela suggère que l'appariement de type Hoogsteen est plus stable par rapport à la paire Watson-Crick, cependant on ne le retrouve jamais dans les hélices doubles en conditions physiologiques. La guanine et la cytosine co-cristallisent toujours avec la géométrie Watson-Crick grâce à la présence de trois liaisons hydrogène dans la structure. Les paires de bases trouvées dans l'ADN, A•T, T•A, C•G, G•C, sont interchangeables sans modifier la structure du squelette de sucre-phosphate. On pourrait imaginer des contraintes de type géométrique qui favorisent l'appariement entre ce type de base dans l'hélice double. Lord et Rich (Kyogoku et al., 1969) à travers des études spectroscopiques dans l'infrarouge ont calculé les constantes d'association de différents types de paires de bases et ont montré que pour les paires de base de type Watson-Crick les constantes d'association, dans le chloroforme, sont beaucoup plus élevées par rapport à des paires de base non classiques (tableau 1.2).

Cela indique que la complémentarité électronique entre les paires de bases Watson-Crick est à l'origine de leur présence exclusive dans l'ADN. Les liaisons hydrogène sont fondamentales pour la spécificité de l'appariement de l'ADN et pour la fidélité de sa réplication, cependant ils contribuent faiblement à la stabilité de la double hélice.

Paire de bases	K (M ⁻¹)
Auto-association	
A • A	3.1
U • U	6.1
C • C	28
G • G	10 ³ -10 ⁴
Watson-Crick	
A • U	100
G • C	10 ⁴ -10 ⁵

Tableau 1.2. Constante d'association pour la formation de paires de bases.
Adaptée depuis (Kyogoku et al., 1969).

Par exemple, si l'on ajoute de l'éthanol à une solution aqueuse d'ADN, avec le but de consolider les liaisons hydrogène, on provoque la déstabilisation de l'hélice double (T_m plus basse). L'éthanol, moins polaire, détruit les interactions hydrophobes qui sont responsables de la stabilité de la structure de l'ADN, de plus les liaisons hydrogène entre les bases sont remplacées par des liaisons hydrogène entre les bases et l'eau, qui sont quasi équivalentes énergétiquement. La contribution des liaisons hydrogène est de 2-8 kJ/mol. Les purines et les pyrimidines tendent à former des empilements de molécules planaires parallèles. Il a été montré, à travers des études de pression osmotique, que des bases d'acides nucléiques sont capable de s'agréger dans les solutions aqueuses, de plus l'origine de cette association ne peut pas être la formation de liaisons hydrogène parce qu'on la retrouve aussi pour des dérivés substitués qui ne peuvent pas faire de liaisons hydrogène (N⁶, N⁶ – dimethyladenosine). Cela montre que l'origine de l'association est l'empilement des bases. On retrouve le même type d'interaction pour les polynucléotides. Par exemple, le polyA montre une augmentation de l'absorbance UV avec la température. Cet effet hyperchromique est indépendant de la concentration, donc ne peut pas être dû à la rupture d'interactions intermoléculaire. De plus, il n'est pas dû à la rupture de liaisons hydrogène parce qu'on le retrouve aussi pour la poly(N⁶, N⁶ – dimethyladenosine). Cela doit dépendre des interactions d'empilement entre les bases qui sont détruites avec l'augmentation de la température. Ce n'est pas encore clair la nature des forces hydrophobes qui stabilisent l'ADN. Il y a un effet hydrophobe, comme pour les protéines, où le moteur de l'interaction est l'entropie et il y a des interactions de type π -stacking entre les bases, de plus la présence d'hétéroatomes dans les bases confère une certaine polarité qui peut être à l'origine des forces d'interactions. Pour la stabilité de la double hélice il faut aussi prendre en compte les interactions électrostatiques entre les groupes phosphate. Si on augmente la concentration en cation Na⁺, on observe une augmentation de la T_m , on augmente donc la stabilité de la double hélice grâce à des interactions plus fortes avec l'ADN double filament qui possède une densité majoritaire de charges négatives. La même chose est vraie pour d'autres cations monovalents comme le Li⁺ ou le K⁺. Par contre si on ajoute un cation divalent comme le Mg⁺⁺ ou le Mn⁺⁺ l'interaction devient beaucoup plus spécifique, c'est pour cette raison que différentes enzymes qui interagissent avec l'ADN ont besoin de Mg⁺⁺ pour leur activité (Voet and Voet, 2011).

1.2.6 ADN et interactions

Les acides nucléiques pour assurer leurs fonctions doivent interagir avec d'autres molécules. Les interactions plus basiques existent avec l'eau et les ions, ces interactions sont responsables de la structure des acides nucléiques, de plus elles peuvent influencer la façon d'interagir avec d'autres molécules. A un autre niveau les interactions avec des petites molécules ou des protéines sont responsables de l'activité de régulation et structurale des acides nucléiques.

L'eau est le composant majeur du solvant des acides nucléiques en conditions biologiques. Des études ont montré que la quantité d'eau, ou humidité relative, influence la structure de l'hélice de l'ADN. Quand l'humidité relative est assez élevée (>85%) on a la forme B, si l'humidité relative est comprise entre 75% et 85% on a la forme A et à valeurs d'humidité relative inférieures à 75% on a des structures désordonnées (forme Z). De plus la composition des bases (C/G versus A/T) et des sels peut modifier ces valeurs. La capacité de former des liaisons hydrogène conduit à des interactions entre l'eau et des acides nucléiques à travers des groupes, comme O et N, qui sont des accepteurs de liaison hydrogène ou des protons qui sont donneurs de liaisons hydrogène. La formation ou la rupture du réseau de liaisons hydrogène dans l'eau est directement corrélée à la diminution ou à l'augmentation de l'entropie. L'augmentation du moment dipolaire rend l'eau un bon solvant pour les ions, de plus l'augmentation de la constante diélectrique influence la force des interactions électrostatiques en les rendant plus faibles (Bloomfield et al., 2000). L'eau forme une première couche d'hydratation sur la surface de l'ADN, ces molécules sont moins mobiles que l'eau en solution. Les molécules d'eau sont localisées en majorité près des atomes de O et N, et du groupe phosphate. Le nombre de molécules d'eau associées à la forme B de l'ADN est de 18-30 molécules par nucléotide. Dans le cas de la forme A, ce nombre diminue à 10-15 molécules par nucléotide à cause de l'hélice plus compacte et à une plus grande exposition des cycles des sucres (Makarov et al., 2002).

Les acides nucléiques sont des polyélectrolytes anioniques avec une charge négative par phosphate. Pour cette raison, ils peuvent interagir fortement avec les cations dans l'environnement cellulaire. La concentration d'ions dans les cellules peut varier en fonction du type de cellule, et cette variabilité peut jouer un rôle fondamental sur la régulation des processus biologiques. La compréhension du comportement des acides nucléiques comme polyélectrolytes est importante si on veut connaître l'effet des interactions avec des ligands chargés, comme des protéines et des petites molécules et sur la condensation de l'ADN. De plus ils peuvent y avoir des effets indirects des ions sur l'eau et donc sur la structure et l'hydratation. Il y a trois types d'interactions principales entre ions et acides nucléiques en solution : deux sont assez classiques, la liaison ionique spécifique et l'atmosphère ionique de type Debye-Huckel, la troisième est spécifique des polyélectrolytes, elle est appelée condensation des contre-ions ou condensation de Manning. Si le paramètre de densité de charge est plus grand que 1, les contre-ions condensent sur le polyélectrolyte, ces contre-ions sont donc contraints de rester proches de la surface de l'ADN mais ils peuvent bouger le long de l'hélice. Les interactions qu'impliquent un changement net du nombre des ions liés sont souvent guidées par le changement d'entropie puis par la libération des ions condensés (Bloomfield et al., 2000). L'interaction entre une molécule d'ADN et une autre molécule peut

être non spécifique, donc indépendante de la séquence ou extrêmement spécifique, donc capable de reconnaître une séquence particulière dans un gène ou un génome. Ce type de reconnaissance spécifique peut être accompli très efficacement par l'ADN lui-même, en particulier grâce à la formation de liaisons hydrogène de type Watson-Crick entre les bases. Des interactions singulières peuvent dépendre aussi des différences structurales qui affectent l'hélice double, comme par exemple la distance entre les groupes phosphate qui peut conditionner les interactions électrostatiques avec les protéines. Les différences électroniques entre la paire de bases adénine/thymine et guanine/cytosine font que cette dernière est plus riche en électrons et donc les interactions de type π -stacking sont favorisés, par exemple avec des molécules intercalantes ou des résidus hydrophobes (phénylalanine ou tryptophane). En outre le groupe méthyl de la thymine peut être impliqué dans le grand sillon avec des interactions de type van der Waals avec des groupes hydrophobe (Neidle, 2008).

Il existe beaucoup de médicaments qui exercent leur activité à travers des interactions de type non covalente avec l'ADN, par exemple dans le cadre de nombreux anti-cancéreux et antibiotiques. L'interaction implique le blocage de la transcription et la réplication de l'ADN et, dans certains cas, l'interférence avec l'activité des complexes ADN-enzymes, donc l'activation de mécanismes de mort cellulaire. Ces mécanismes ne sont pas spécifiques et donc l'action toxique est exprimée aussi vers les cellules saines, cependant dans le cadre d'interaction avec les complexes protéine-ADN, l'action pourrait être plus spécifique suite à la surexpression de ces protéines en conditions pathologiques. Les interactions non covalentes entre l'ADN et des molécules peuvent être classifiés en différentes catégories : interactions de type électrostatiques avec le squelette de sucre-phosphate (anionique), interactions de type liaisons hydrogène dans le grand sillon ou petit sillon et interaction de type intercalant dans le grand sillon ou petit sillon (Strekowski and Wilson, 2007). Dans la majorité de ce type d'interactions les molécules possèdent une charge positive, ainsi la contribution des interactions électrostatiques est toujours significative. Plusieurs antibiotiques, antibactériens et anti-tumoraux possèdent un système aromatique planaire (chromophore), normalement constitué de 3 anneaux fusionnés ensemble qui ont la taille typique d'une paire de bases. L'hypothèse de l'intercalation a été proposée par Leonard Lerman (LERMAN, 1961), il propose que le groupement chromophore planaire de la molécule vienne s'insérer entre deux paires de bases adjacentes (figure 1.18). L'intercalation est stabilisée par des forces de polarisation et par des interactions de type van der Waals.

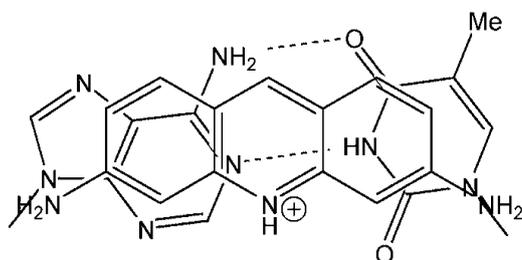


Figure 1.18. Molécule de proflavine superposée à une paire de bases, montrant leur taille similaire. Adapté depuis (Neidle, 2008).

Le caractère polaire est augmenté par la présence d'hétéroatomes dans le chromophore. Chaque molécule liée provoque le déroulement et l'extension de l'hélice double de 3.4Å. Le nombre maximum de molécules qui peut être lié à l'ADN double brin est d'une molécule chaque trois paires de bases. Par principe d'exclusion une paire de base ne peut avoir qu'une molécule de chaque côté, à cause des contraintes structurales.

Un exemple de ce type de médicament est la doxorubicine qui appartient à la famille des anthracyclines, Ils forment des complexes ternaires avec l'ADN et la topoisomérase, un enzyme surexprimé dans certaines tumeurs. Dans le cadre des intercalants simples (figure 1.19),

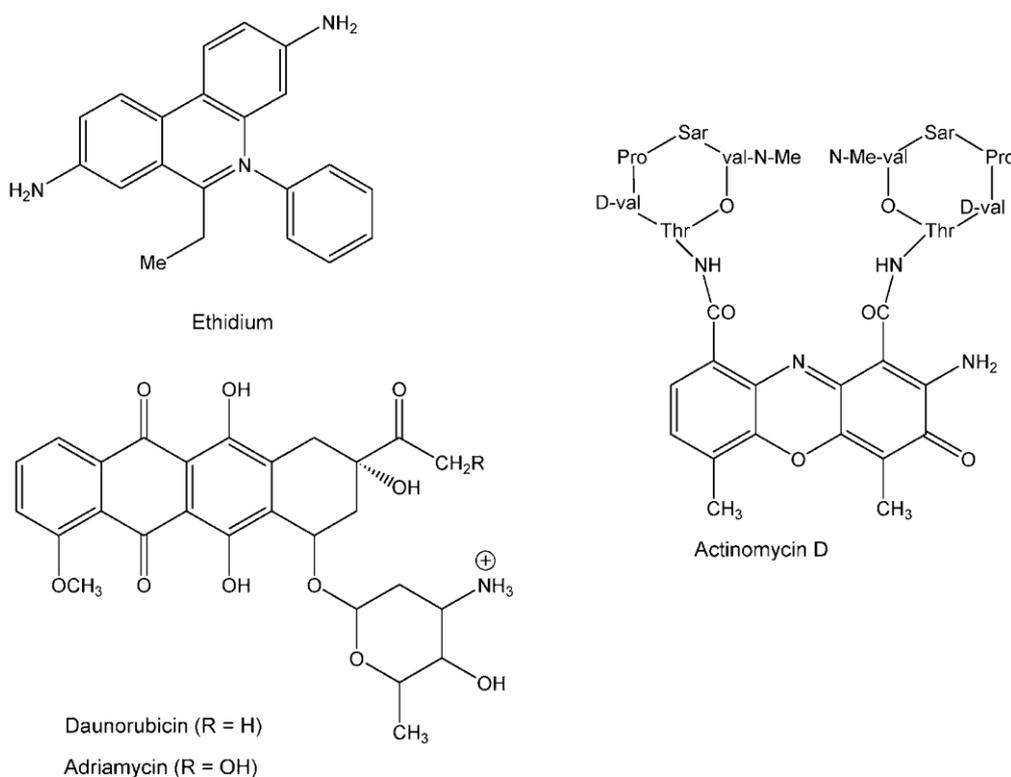


Figure 1.19. Structure de quelques intercalants simples. Adapté depuis (Neidle, 2008).

leur structure consiste en un chromophore avec souvent une charge positive, ces molécules ne sont pas capables de reconnaître des séquences spécifiques. Les intercalants complexes possèdent des groupements comme des chaînes latérales, des sucres ou des peptides, qui sont responsables d'interactions de type hydrogène ou hydrophobe dans le petit sillon de l'ADN. Grâce à ces interactions spécifiques ils sont capables de reconnaître des séquences particulières. Il existe une troisième catégorie d'agents intercalants appelés bis-intercalant, où deux chromophores sont liés ensemble, séparés par une distance de 10.2Å, de façon à s'insérer à la distance de deux paires de bases. Le linker entre les deux chromophores peut être responsable de liaisons hydrogène dans le petit sillon. Une série de ces molécules a été développée avec l'objectif d'améliorer l'interaction et ainsi l'activité biologique. Les résultats ont montré que l'affinité pour l'ADN était comparable à celle des protéines régulatrices

biologiques (10^{11} mol^{-1}), par contre l'activité n'était pas améliorée par rapport à des molécules intercalantes simples.

Une autre grande famille de molécules qui interagit avec l'ADN peut être classifiée comme ligands des sillons (groove-binders), à travers des interactions de type liaison hydrogène. On trouve dans cette famille des antiparasitaires ou des antiviraux. Par rapport aux intercalants, ils ne modifient pas la structure de l'ADN et ils sont séquence spécifiques, avec une préférence pour les régions riches en adénine/thymine dans l'hélice double de l'ADN (Dervan, 1986). Un exemple de ces types de molécule est le colorant pour l'ADN, Hoechst 33258 et DAPI, ou les médicaments, berenil et pentamidine (figure 1.20).

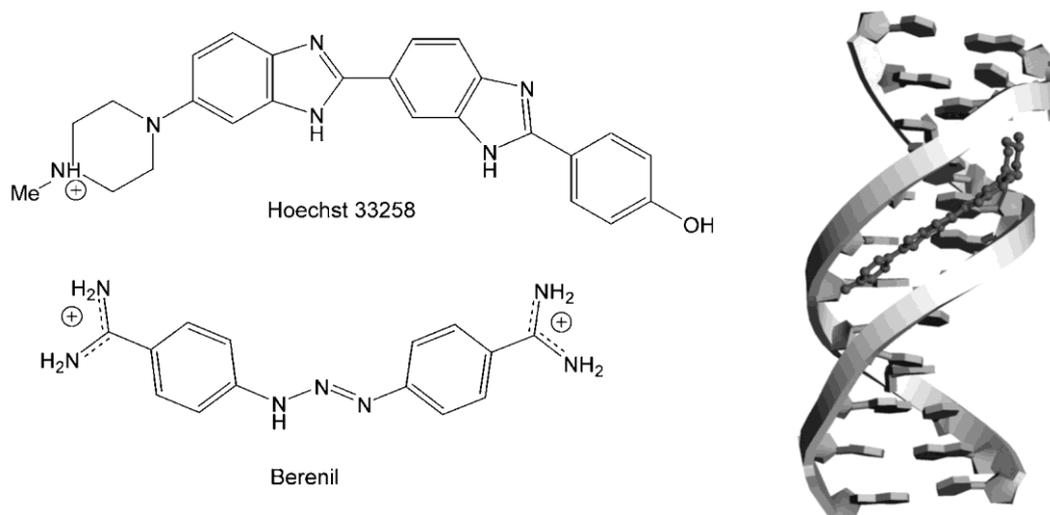


Figure 1.20. Quelques structures de ligands des sillons (groove-binders) et la structure cristalline d'un complexe entre Hoechst 33258 et un duplex formé de d(CGCAAATTTGcG). Adaptée depuis (Neidle, 2008).

L'affinité de ces molécules pour l'ADN est comparable à celle des intercalants (10^6 mol^{-1}), mais ils ne perturbent pas sa structure. Leurs caractéristiques principales sont la présence d'une charge positive, des noyaux aromatiques connectés entre eux plutôt que fusionnés et une structure tridimensionnelle en forme de croissant. La majorité de ces molécules se lie dans le petit sillon présent dans la forme B de l'ADN, en particulier avec les régions riches en adénine/thymine avec leurs groupes aromatiques parallèles aux deux squelettes de sucre-phosphate (Spink et al., 1994). Le petit sillon tend à être assez étroit, en favorisant des interactions de type van der Waals entre le ligand et les groupements qui forment les parois du sillon (CH 1', CH 4', CH₂ 5' du sucre). La présence de liaisons hydrogène entre le ligand et les groupes donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène présentes dans les paires de bases peut être à l'origine de l'affinité pour certaines séquences. Il y a aussi d'autres facteurs qui peuvent influencer l'affinité pour les régions riches en adénine/thymine, comme le fait que le petit sillon dans ces régions est plus étroit et la présence d'un potentiel électrostatique négatif est complémentaire avec les charges positives présentes dans ces molécules. Il peut y avoir aussi de l'encombrement stérique causé par le groupe NH₂ de la guanine qui pourrait gêner le positionnement de la molécule dans le petit sillon. La nécessité que la molécule suive parfaitement la courbure du petit sillon a été appelée « isohélicité » (Goodsell and Dickerson,

1986). Cela semble contredire le fait que la spécificité de ce type de molécules est due à la formation de liaisons hydrogène. La molécule Hoechst 33258 est un bis-benzimidazole utilisé comme colorant pour l'ADN ou les chromosomes. Des études ont montré que la molécule est capable d'interagir avec 4-5 paires de bases dont la majorité sont des couples adénine/thymine avec au moins une paire guanine/cytosine à une extrémité. Les deux groupes benzimidazole forment une série de liaisons hydrogène multiple avec trois couples adénine/thymine, par contre l'anneau de la pipéridine n'est pas planaire et trop encombré pour pouvoir s'insérer dans le petit sillon, donc il force la molécule à se mettre dans un endroit avec un sillon plus large comme celui formé par la guanine/cytosine.

Deux autres molécules assez étudiées et caractérisées sont la netropsine et la distamycine. Leur structure consiste dans des unités de N-méthyl-pyrrole et d'amide connecté avec une ou deux charges positives. Toutes ces molécules ont une affinité pour les régions riches en adénine/thymine pour les raisons qu'on a examinées (figure 1.21a).

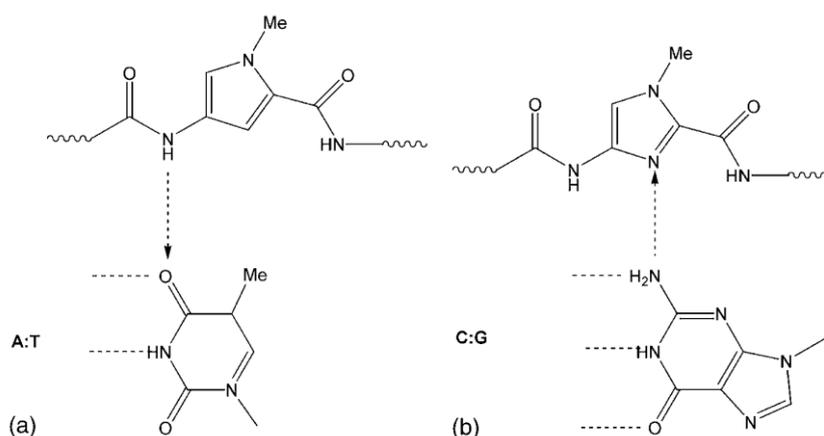


Figure 1.21. Le principe de la reconnaissance amide-base entre la distamycine et une paire de base A-T (a).

Le même concept est montré pour la reconnaissance de la netropsine avec la paire de base C-G.

Adaptée depuis (Neidle, 2008).

Sur la base de ces concepts, le groupe de Lown (Lown, 1994) a proposé une nouvelle classe de molécules, appelées « lexitropsines » ayant la capacité de former une liaison hydrogène avec le NH_2 de la guanine présente dans le petit sillon et de conférer une spécificité majeure dans l'interaction (figure 1.21b). L'idée est d'utiliser un imidazole pour changer la polarité de la liaison hydrogène dans le petit sillon. Les résultats montrent que ces molécules ne sont pas plus spécifiques, de plus l'affinité pour les deux types de paires de bases est réduite. Les causes de l'échec sont à chercher dans les dimensions et la flexibilité du sillon formé par le couple guanine/cytosine qui ne garantit pas un nombre adéquat d'interaction de type van der Waals avec ces molécules, qui sont assez petites et plates (Neidle, 2001). Il a été observé qu'à des rapports élevés entre molécule/ADN, la distamycine peut former des complexes 2 : 1. Les deux molécules interagissent avec l'hélice double sous forme de dimère antiparallèle. Ces observations ont été à la base de nombreuses études qui ont conduit à la conception d'une nouvelle classe de molécules capables de reconnaître des séquences spécifiques (Dervan, 2001). La possibilité d'avoir deux molécules dans le complexe implique que les deux bases présentes dans la paire de base soient liées par liaisons hydrogène, cela conduit à une

meilleure discrimination entre le base et donc une meilleure spécificité par rapport aux complexes 1 : 1.

La stratégie pour pouvoir passer de la reconnaissance de la paire adénine/thymine à la paire guanine/cytosine est d'adopter le même changement utilisé dans le cas des lexitropsines, remplacer l'N-méthyl pyrrole (Py) par un imidazole (Im). Les molécules obtenues sont appelées « polyamides » et sont capables de cibler, sous forme de dimère, une large gamme de séquence d'ADN avec une bonne sélectivité (figure 1.22).

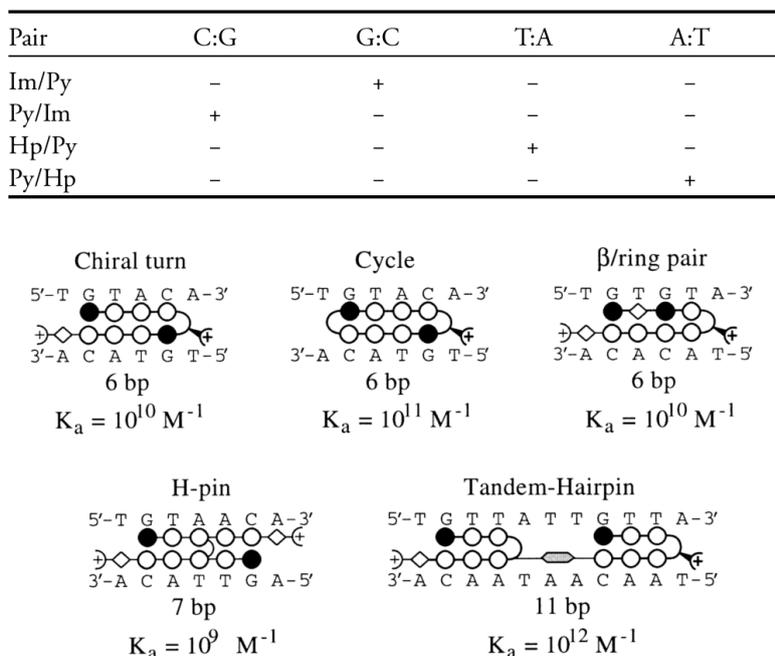


Figure 1.22. Code d'appariement pour la reconnaissance du petit sillon et quelques exemples de molécules liantes avec leurs constantes d'association.

Adaptée depuis (Dervan, 2001).

D'autre type d'hétérocycles ont été utilisé pour augmenter les probabilités de faire des liaisons hydrogènes avec des bases particulières, comme le 3-hydroxypyrrole (Hp) ou le benzimidazole. Une stratégie pour augmenter la reconnaissance a été de lier de façon covalente deux molécules de polyamides, qui n'ont pas nécessairement la même séquence, cela évite que les deux molécules du dimère puissent glisser et donc avoir des problèmes de lecture de la séquence. Ces molécules en forme d'épingle à cheveux ont une sélectivité élevée et une affinité avec des constantes d'association de l'ordre de quelque nM. Ces systèmes présentent des limitations liées à la taille de la séquence capable d'être reconnue, 7-9 paires de bases versus les 16-18 paires de base idéales, de plus il y a des séquences qui semblent marcher moins bien par rapport à d'autres (Neidle, 2008).

Les processus qui contrôlent la condensation de l'ADN dans les cellules, qui régulent l'expression de chaque gène, et donc la lecture correcte et la transcription de séquences de bases, nécessitent l'interaction d'un grand nombre de protéines spécifiques et non spécifiques. De façon similaire, plusieurs protéines sont nécessaires pour reconnaître l'ADN endommagé

et procéder ainsi à sa réparation. Ce n'est pas surprenant que beaucoup des travaux sont faits pour étudier les interactions entre l'ADN et les protéines.

Les protéines liant l'ADN sont classifiées dans un certain nombre de familles. Les groupes principaux sont : protéines régulatrices, qui contrôlent la transcription, nucléases qui clivent l'ADN de façon relativement spécifique, protéines réparatrices capables de reconnaître des lésions à l'ADN, protéines qui contrôlent la topologie de l'ADN, comme les topoisomères, protéines structurales responsables de la condensation de l'ADN, comme les histones et protéines de traitement comme les polymérase qui ne sont pas séquence spécifique mais doivent être capables de reconnaître les différents types de duplex d'ADN. Cette diversité de fonctions ne se reflète pas directement dans la façon d'interagir de ces protéines avec l'ADN mais plutôt dans la structure des protéines elles-mêmes. La lecture directe d'une séquence particulière d'ADN se produit à travers des liaisons hydrogène avec les bords de la paire de bases (Seeman et al., 1976). Cette interaction peut provenir du côté du grand sillon ou il y a plus de groupes donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène et donc la discrimination entre différentes séquence d'ADN sera facilitée. Dans le cas de protéines qui sont capables de déformer la structure de l'ADN l'interaction pourra venir aussi dans le petit sillon à cause de la déformation.

Une lecture indirecte des séquences peut se produire à travers le squelette de sucre-phosphate, les charges négatives présentes peuvent être facilement la cible des groupements latéraux des acides aminés chargés positivement, et produire ainsi des interactions de type électrostatiques, très importantes pour la liaison entre l'ADN et la protéine. Il existe un nombre limité de motifs utilisés par les protéines pour reconnaître l'ADN. Les principaux motifs sont : α -hélice-tour- α -hélice (HTH motif), « doigts de zinc », domaines leucine zipper, feuillet- β , épingle à cheveux (Luscombe et al., 2000). Les interactions directes impliquent l'O6 et/ou l'N7 de la guanine pour former des liaisons hydrogène avec les extrémités chargées positivement des longues chaînes latérales de l'arginine ou de la lysine, les amides de la glutamine et asparagine ou le groupe hydroxyle de la serine (figure 1.23).

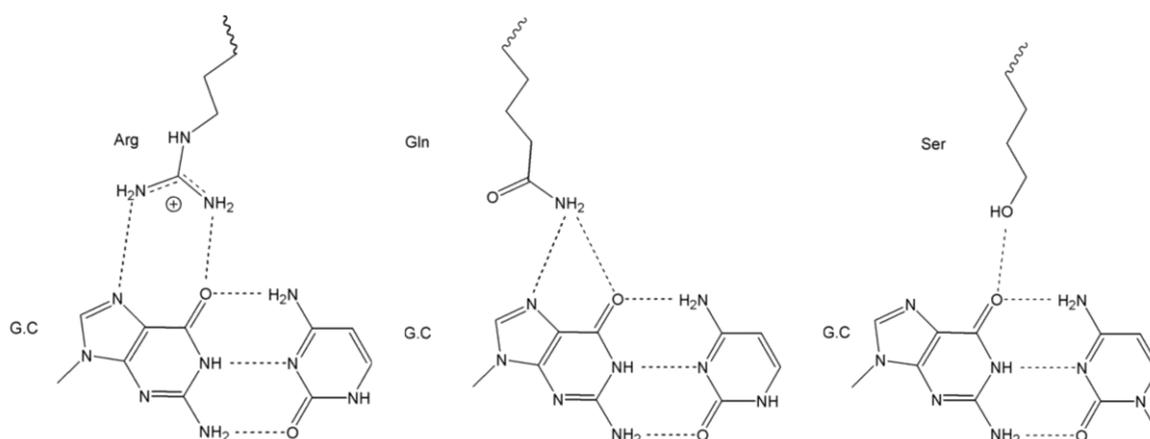


Figure 1.23. Possibles modes d'interaction et de reconnaissance entre la paire de bases G-C et l'arginine, la glutamine ou la serine. Adaptée depuis (Neidle, 2008).

La reconnaissance d'un site particulier capable de former des liaisons hydrogène dans une base par rapport à des sites proches se fait grâce à des petits changements de position des

chaines latérales des acides aminés, qui font qu'ils se positionnent dans la conformation plus stable énergétiquement.

L'adénine interagit avec l'N6 et/ou l'N7, mais ce type de reconnaissance est moins fréquent, aussi pour les bases pyrimidiques moins fréquentes que la guanine. Il n'existe pas de correspondance 1 : 1 entre un acide aminé et l'ADN, la reconnaissance peut provenir d'une grande variété de façons.

La possibilité de former des liaisons hydrogène avec les bases quand ils forment la paire de base Watson-Crick est peu commun, normalement l'interaction avec une seule base est suffisante pour la discrimination. Il est possible aussi de former des liaisons hydrogène avec deux bases consécutives dans le même filament, donc il est possible d'obtenir une certaine sélectivité pour des dinucléotides. La séquence thymine-guanine est reconnue par la lysine à travers les deux carbonyles de la thymine et de la guanine (figure 1.24).

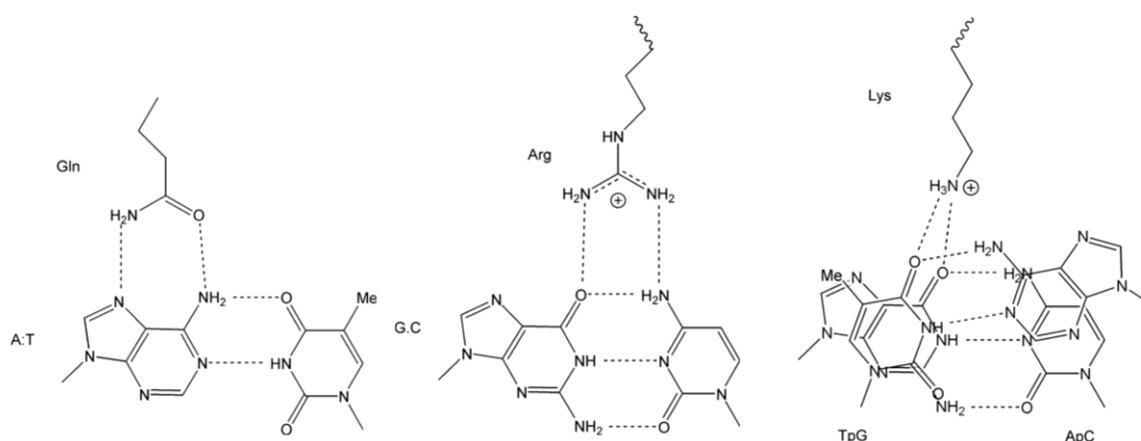


Figure 1.24. Possibles modes d'interaction et de reconnaissance entre la paire de bases A-T et la glutamine, interaction de l'arginine avec les deux bases de la paire G-C et interaction de la lysine avec le dinucléotide TpG. Adaptée depuis (Neidle, 2008).

Si on remplace une des deux bases, la lecture ne peut pas se faire de la même façon. La même chose peut se produire pour un autre type de dinucléotides avec d'autres acides aminés. L'analyse de la distribution des interactions entre les acides aminés et les bases dans une base de donnée de 129 structures ADN-protéines (tableau 1.3) (Luscombe et al., 2001) montre qu'il n'est pas possible d'établir un système de préférence d'un acide aminé pour une base. Cela dépend de plusieurs facteurs : les différences dans la structure de l'ADN dans différents complexes, les différents motifs des protéines impliqués dans la reconnaissance de l'ADN, autres facteurs de reconnaissance comme le méthyle de la thymine impliqué dans des interactions de type van der Waals avec les chaînes latérales hydrophobes des acides aminés et le fait général qu'une base peut être reconnue par plusieurs acides aminés. Un rôle très important dans la reconnaissance est attribué à des interactions moins spécifiques (en termes de liaison hydrogène) entre les protéines et le squelette de sucre-phosphate, mais aussi à des interactions hydrophobes. La flexibilité des chaînes latérales des acides aminés fait que les interactions vont se faire avec tous les éléments de la structure de l'ADN. La somme des interactions électrostatiques et hydrophobes joue un rôle, à travers des interactions directes et indirectes, pour la reconnaissance d'une structure particulière de l'ADN et donc les domaines

clé de la protéine interagissent avec les domaines clé de l'ADN pour pouvoir être fonctionnels (Neidle, 2008).

	Guanine	Cytosine	Adenine	Thymine
Arginine	98	8	19	24
Lysine	30	6	4	9
Serine	12	2	1	3
Asparagine	7	10	18	7
Glutamine	6	2	16	2
Glutamate	1	10	1	0

Tableau 1.3. Distribution des acides aminés dans les interactions avec les bases dans les structures de protéines-ADN. Adaptée depuis (Luscombe et al., 2001).

1.3 Nucléolipides

1.3.1 Introduction

Les molécules hybrides formées de deux ou plus sous unités chimiques différentes sont ubiquitaires soit en nature soit dans la chimie de synthèse. Par exemple, comme nous avons vu dans la section précédente, les acides nucléiques sont composés d'une base azotée (purine ou pyrimidine), d'un sucre (ribose ou désoxyribose) et d'un phosphate. Une famille intéressante de molécules hybrides est celle des nucléolipides (Hynie and Smrt, 1978) ou il y a la liaison covalente de deux structures importantes de biomolécules : une partie lipidique (chaîne alkylée, cholestérol, etc.) et l'autre partie est dérivée d'un nucléotide ou nucléoside ou nucléobase ou oligonucléotide (figure 1.25).

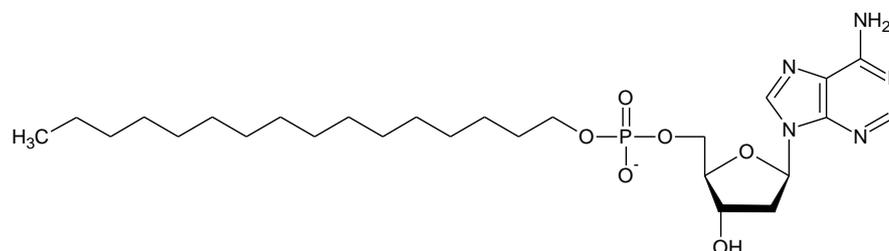


Figure 1.25. Un exemple typique de nucléolipide (C₁₆-AMP). Adaptée depuis (Hynie and Smrt, 1978).

La présence simultanée d'une composante hydrophobe et d'une composante polaire peut conférer à ces molécules des propriétés particulières d'auto-assemblage dans l'eau avec la possibilité d'obtenir des nouveaux systèmes supramoléculaires avec des propriétés physico-chimiques originales. Ces systèmes pourraient donc être utilisés pour de nombreuses applications comme la conception de nouveaux biomatériaux jusqu'à l'utilisation comme systèmes de délivrance de médicaments.

1.3.2 Nucléolipides naturels

Un exemple classique de nucléolipide naturel est la cytidine diphosphodiacylglycerol (CDP-diacylglycerol) (figure 1.26).

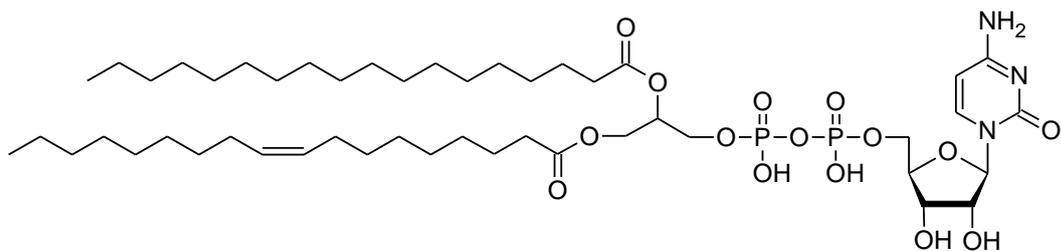


Figure 1.26. Cytidine diphosphodiacylglycerol (CDP-diacylglycerol).

Cette molécule est un intermédiaire réactif avec la capacité de transférer des groupes d'acide phosphatidique vers les groupes OH présents dans les carbohydrates ou les protéines pour former des glycolipides ou des lipoprotéines. De plus il est un intermédiaire important dans la synthèse des phospholipides membranaires, à travers le transfert vers l'OH du phosphatidylglycerol ou de l'inositol pour la synthèse de la cardiolipine et du phosphatidylinositol (Nelson et al., 2008).

D'autres types de nucléolipides naturels ont été isolés dans certaines bactéries, comme les tunicamycines, dans *Streptomyces lysosuperficus* (Takatsuki et al., 1971) ou les liposidomycines, dans *Streptomyces griseosporus* (Isono et al., 1985) (figure 1.27).

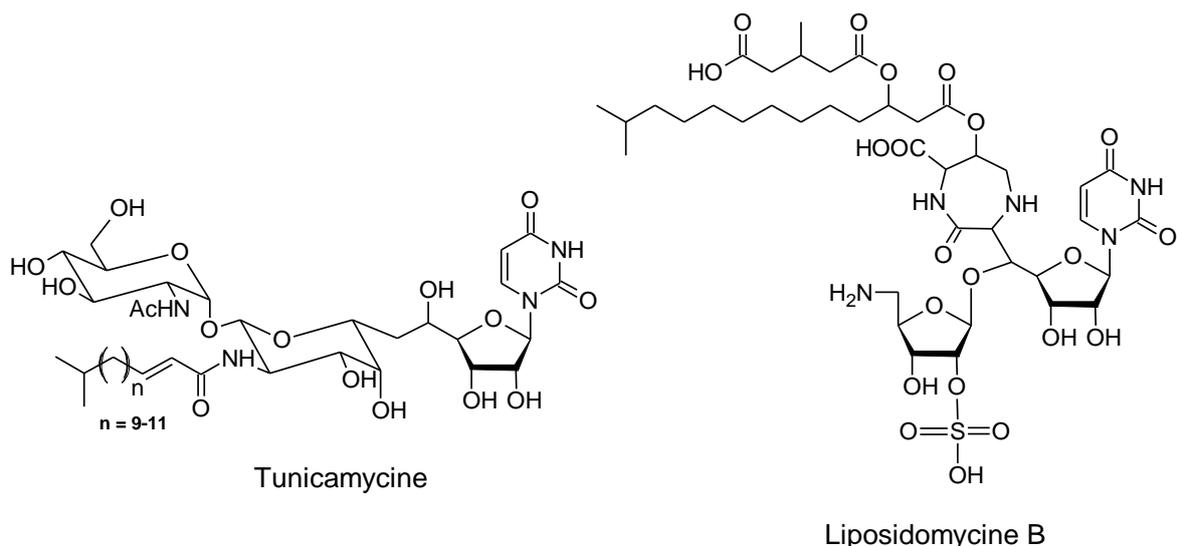


Figure 1.27. Quelques exemples de nucléolipides naturels.

Ces molécules sont capables de provoquer une série de réponses biologiques : antibiotique, antiviral, antifongique, antitumoral. Leur activité antibiotique consiste à inhiber la synthèse des peptidoglycanes, nécessaires à la formation de la paroi bactérienne, en bloquant la réaction de la translocase.

D'autres exemples sont la septacidine qui a une activité antifongique ou des études ont montré l'importance d'avoir une longueur de chaîne particulière pour pouvoir avoir un effet biologique (Acton et al., 1977) ou les agelasines qui ont été isolées dans des éponges marines du genre *Agelas*. Les molécules de cette famille de nucléolipides sont les seules à avoir la chaîne lipidique liée sur la base azotée (Rosemeyer, 2005).

1.3.3 Nucléolipides synthétiques

Les analogues des nucléotides et des bases azotées sont des composés cytotoxiques, utilisés comme agent antiviraux, molécules immunosuppressives ou anticancéreux. Ce sont des antimétabolites qui interfèrent avec la synthèse des acides nucléiques après avoir été incorporés dans les molécules d'ADN ou ARN. Grâce à des modifications dans la structure chimique par rapport aux nucléotides et bases azotées de purines et pyrimidines physiologiques, ils bloquent l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse des acides nucléiques où ils modifient le métabolisme cellulaire des nucléosides. Ces molécules sont généralement hydrophiles et nécessitent des transporteurs de membranes pour pouvoir être internalisés dans les cellules (Galmarini et al., 2002). Différentes prodrogues ont été synthétisées (figure 1.28),

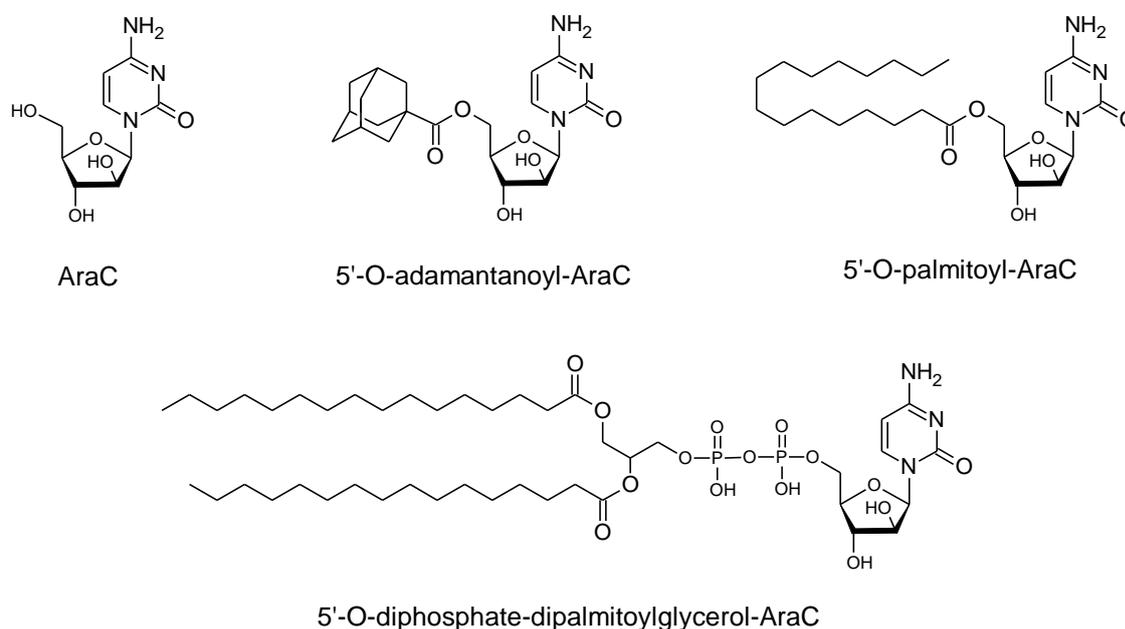
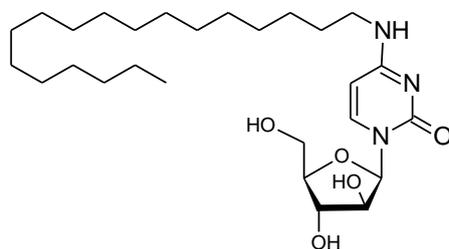


Figure 1.28. Quelques exemples de structure de prodrogues à base de nucléolipides synthétiques.

dont l'objectif est d'améliorer les propriétés biologiques, En couplant un groupement hydrophobe à ce type de molécules, on obtient des composés amphiphiles qui peuvent avoir une biodisponibilité orale augmentée grâce à une meilleure absorption et/ou un métabolisme diminué. De plus, on s'attend à ce que ces molécules amphiphiles traversent plus facilement la membrane cellulaire, sans l'aide de transporteurs de membrane (Allain et al., 2012). La cytarabine ou cytosine arabinoside (ara-C) est un agent thérapeutique utilisé pour le traitement de la leucémie. Son action est due à l'inhibition de l'ADN polymérase et à son incorporation dans l'ADN, qui conduit à la synthèse incomplète de fragments d'ADN. Pour améliorer sa biodisponibilité orale, différentes prodrogues ont été synthétisés. Gray et al. (Gray et al., 1972) ont proposé la conjugaison avec un résidu hydrophobe d'adamantane. Ce nucléolipide est beaucoup plus efficace que le nucléoside de départ, cela n'est pas dû à une augmentation de son activité intrinsèque mais à une action prolongée du conjugué. MacCoss et al. (MacCoss et al., 1978) ont étudié la 1,2-dipalmitoyl-5'-diphosphate-cytarabine. Ce composé, sous forme de sel de disodium, n'est pas soluble dans l'eau, mais après sonication, il a été

observé la formation de micelles qui sont capables d'inhiber la croissance de cellules léucémiques (L1210). Si on compare l'activité cytotoxique de ce produit avec le dérivé correspondant monocaténaire ou le dérivé avec l'adamantine, on remarquera une activité cytotoxique mineure, probablement due à un mécanisme d'internalisation différent et à l'hydrolyse de la prodrogue.

Toutes ces prodrogues lipophiles sont très peu solubles dans l'eau, donc elles devraient être encapsulées dans des vecteurs pour améliorer leur administration. L'incorporation dans des liposomes peut aussi constituer une forme de relargage contrôlé de la prodrogue puis du principe actif. Cela à plusieurs avantages comme une encapsulation majeure du médicament dans les liposomes vu son caractère lipophile, une diminution des fuites dans les environnements aqueux, une protection de la dégradation métabolique et effet réservoir, donc la possibilité d'avoir un système à libération prolongé (Rosemeyer, 2005). Rubas et al. (Rubas et al., 1986) ont synthétisé une série de dérivés de l'araC avec des chaînes oleoyl et palmitoyl sur la position N4 de la cytosine et 5' de l'arabinose. Ces molécules ont été mélangées avec des lipides amphiphiles naturels (phosphatidylcholine d'œuf et cholestérol) pour former des liposomes d'une centaine de nm. Ces formulations ont été testées in vivo contre la leucémie lymphoïde L1210 et se sont révélées entre 2 et 4 fois d'efficacité supérieure par rapport à l'araC. Dans le même groupe, d'autres études ont permis la synthèse d'une nouvelle classe de dérivés N4-alkyl-araC (NAAC) et la mise en évidence d'une corrélation structure-activité entre la longueur de la chaîne alkyle et l'activité antitumorale. Le dérivé octadécylé (NOAC, C18) (figure 1.29) possède une lipophilicité élevée et une bonne résistance aux désaminases (Schwendener and Schott, 2005).



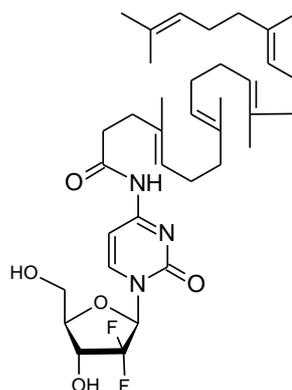
NOAC

Figure 1.29. Dérivé octadécylé de la N4-alkyl-araC (NAAC). Adaptée depuis (Schwendener and Schott, 2005).

Une autre catégorie de prodrogues est représentée par les prodrogues amphiphiles capables de s'auto-assembler de façon à former un nanovecteur. Ces systèmes présentent des avantages par rapport aux préparations à base de liposomes comme la facilité de formulation, l'absence d'excipients et un taux élevé d'encapsulation. L'organisation supramoléculaire de ces systèmes joue un rôle primordial dans leur efficacité thérapeutique, parce qu'elle contrôle plusieurs propriétés comme la stabilité dans les milieux physiologiques, la taille et la structure qui sont corrélées à la capacité de diffuser dans les membranes et donc à être internalisés dans les cellules. Jin et collaborateurs (Jin et al., 2008) ont synthétisé plusieurs dérivés d'antiviraux analogues des nucléosides, acyclovir, didanosine, zidovudine, ayant comme partie lipophile le cholestérol et comme linker des groupements succinyl, adipoyl ou phosphoryl acyl. Ils ont

montré que ces molécules sont capables de s'auto-assembler et de former dans l'eau des vésicules de taille nanométrique.

Le groupe de recherche de P. Couvreur a mis en évidence que la conjugaison avec le squalène, un triterpène isoprénoïde naturel précurseur de la synthèse des stérols, avec des analogues des nucléosides conduit à la formation de molécules amphiphiles qui s'auto-organisent comme nano-assemblages de 100-300 nm (Couvreur et al., 2006). La N-4-trisnorsqualenoylgemcitabine (figure 1.30) forme des nano-objets de 120-140 nm constitués de phases hexagonales inverses dans l'eau.

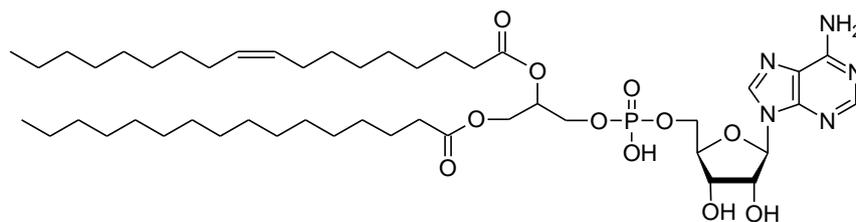


N-4-trisnorsqualenoylgemcitabine
(SQdFdC)

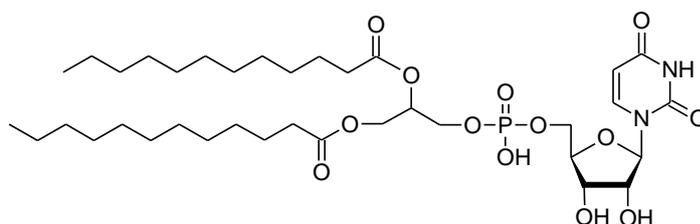
Figure 1.30. Dérivé squalenoyl de la gemcitabine.
Adaptée depuis (Couvreur et al., 2006).

Il a été montré que la SQdFdC est plus cytotoxique que la gemcitabine dans différentes lignées cellulaires de cancer, par exemple elle est beaucoup plus active vers les cellules de leucémie résistantes à la gemcitabine (L1210 10K) (Reddy et al., 2007). Une dernière famille de ces molécules est représentée par des nucléolipides qui ne sont pas des prodrugs mais qui présentent dans la tête polaire des nucléosides ou des bases azotées naturels. Ces molécules possèdent des propriétés d'auto-assemblage intéressantes liées à la reconnaissance moléculaire entre les bases et donc à la capacité de formation de liaison hydrogène et π -stacking. Ces propriétés peuvent être utilisées pour la fabrication de nouveaux matériaux à visée pharmaceutique en utilisant les propriétés d'interactions particulières des têtes polaires. De plus ces molécules étant bio-inspirées, elles devraient être biodégradables et moins toxiques. Différents types de nucléolipides ont été synthétisés jusqu'à présent. Les différents chercheurs ont fait varier la base, le sucre, la chaîne lipidique, le nombre de chaînes, la position des chaînes, la charge (anionique, cationique, neutre, zwitterionique), les groupes linker, la présence de sucre ou d'acides aminés. Le groupe de Baglioni a synthétisé et étudié des nucléolipides échangeant la tête polaire des phosphatidylcholines avec l'adénosine ou l'uridine (Berti et al., 1997). La partie lipidique était conjuguée en position 5' du sucre. Les molécules sont chargées négativement à cause du groupement phosphate de la tête nucléotidique (figure 1.31). Différentes structures ont été observées en fonction de la longueur des chaînes lipidiques, en accord avec les variations du paramètre de packing. L'1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidyl-uridine (POPU) et l'1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidyl-adenosine

(POPA) forment des phases lamellaires (Milani et al., 2006), l'1,2-dilauroyl-phosphatidyluridine (DLPU)



1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidyladenosine (POPA)

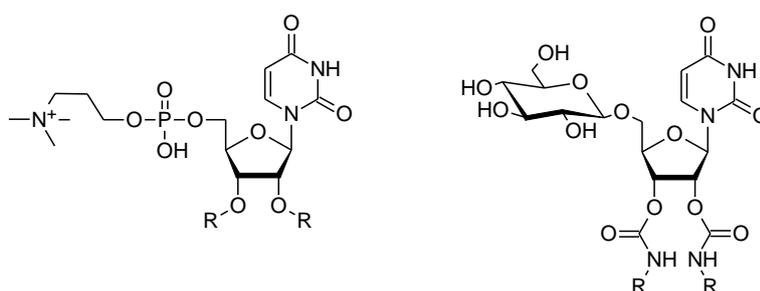


1,2-dilauroyl-phosphatidyluridine (DLPU)

Figure 1.31. Quelques exemples de nucléolipides anioniques. Adaptés depuis (Baldelli Bombelli et al., 2002).

forme des agrégats cylindriques qui peuvent subir des changements de structure en fonction de la concentration ou de la force ionique (Baldelli Bombelli et al., 2002).

Le groupe de recherche de Philippe Barthélémy a développé une longue série de dérivés amphiphiles des nucléosides (Moreau et al., 2004). Ils ont étudié comment le changement de structure chimique se reflète sur les propriétés d'auto-assemblage. Les chaînes lipidiques sont estérifiées en position 2' et 3' du sucre pour les systèmes bicaténaires. La phosphocholine est en position 5' du sucre (figure 1.32).



DMUPC, R = myristoyl, C14

DOUGluc, R = oleoyl, C18:1

DPUPC, R = palmitoyl, C16

DSUPC, R = stearyl, C18

DAUPC, R = arachidoyl, C20

DOUPC, R = oleoyl, C18:1

Figure 1.32. Quelques exemples de nucléolipides zwitterioniques ou neutres.

Ces molécules zwitterioniques ont la caractéristique de former des phases lamellaires au-dessus de la T_m (température de transition gel-sol, $L\beta \rightarrow L\alpha$), pour des températures inférieures à la T_m ces systèmes s'organisent en forme de fibres qui peuvent former des hydrogels ou organogels. La conjugaison en position 5' du sucre avec une molécule de glucose, avec les chaînes oleoyl liées avec un carbamate en position 2' et 3' du sucre conduit à la formation d'une molécule amphiphile neutre (DOUGluc) capable d'interagir avec les groupes phosphate d'un filament double brin de polyA-polyU (Arigon et al., 2005).

Pour améliorer l'interaction avec l'ADN de ces systèmes, il a été proposé d'ajouter une charge positive dans la tête polaires de ces nucléolipides, la DOTAU possède deux chaînes oleoyls estérifiées en position 2' et 3' du sucre, et un groupement triméthylammonium en position 5' (figure 1.33) (Chabaud et al., 2006).

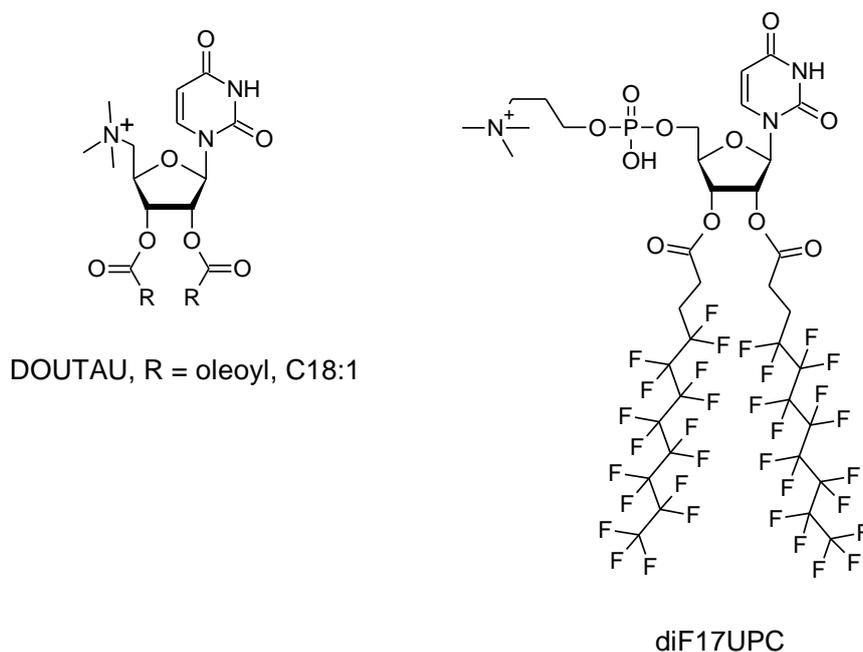


Figure 1.33. Structure de un nucléolipides cationique, la DOTAU et d'un nucléolipides possédant des chaînes fluorocarbonées.

La molécule est capable de former des lipoplexes avec l'ADN, qui va se positionner entre les bicouches. La molécule est moins toxique que la Lipofectamine® dans des tests de prolifération cellulaire et aussi plus efficace pour des concentrations élevées de lipide. Cela est probablement dû à un rapport favorable entre toxicité et efficacité de transfection. Il a été exploré la possibilité d'utiliser des chaînes fluorocarbonée (Moreau et al., 2006), celles-ci présentent des différences structurales qui peuvent se refléter sur la structure des objets formés. Elles sont plus hydrophobes et lipophobes, de plus, le volume occupé par les chaînes est plus grand et cela pourrait amener une certaine rigidité à la bicouche. Le choix d'utiliser des chaînes d'undecanoyl avec seulement les 8 derniers atomes de carbone fluorés, pour un total de 17 atomes de fluor par chaîne, est fait pour avoir la même hydrophobicité des chaînes palmitoyl/sterayl pour pouvoir comparer les deux systèmes. Le diF17UPC forme des phases lamellaires par rapport à ses analogues DSUPC et DPUPC que forment des fibres. Des nucléolipides anioniques monocaténaires (figure 1.34) (Campins et al., 2007) ont également été étudiés. Ils présentent une chaîne alkyle phosphorylé en position 3' du sucre de longueur

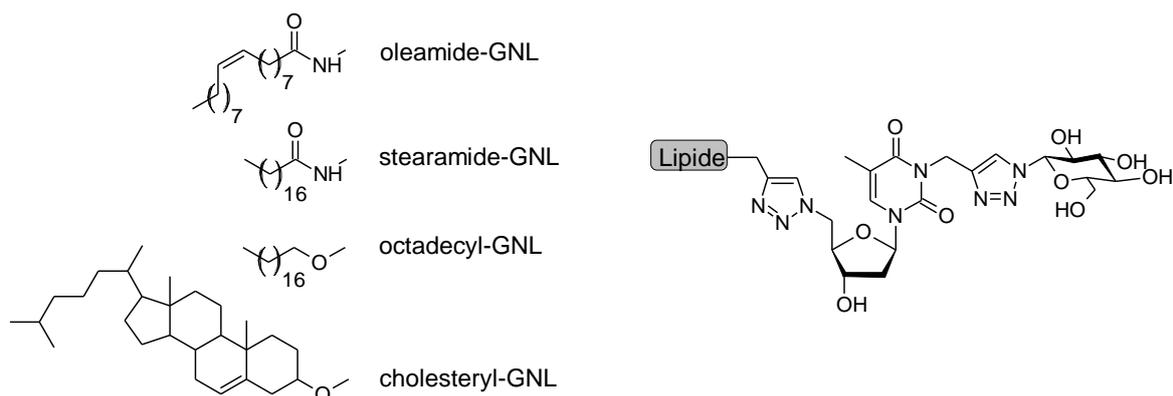


Figure 1.35. Exemples de dérivés glycosylés de nucléolipides (GNLs).

Ces molécules sont formées d'une chaîne lipidique, d'un nucléoside et d'un monosaccharide liés de façon covalente à travers des ponts 1,2,3-triazole. En particulier, les molécules constituées de thymine, de glucose et de différentes chaînes lipidiques, sont synthétisés facilement en trois étapes avec des réactions de « chimie click ». Ces molécules sont capables de s'auto-assembler pour former des fibres qui sont à l'origine d'hydrogels et organogels. La formation de gels est obtenue à faibles concentrations, 0.1% pour le dérivé stearamide, et elle est fortement dépendante du type de lipide, du linker et de la présence des trois blocs (sucre, nucléoside, lipide). Le travail a conduit aussi à la synthèse du même produit avec une chaîne fluorée (C₁₀F₁₇H₄) (Godeau et al., 2010). Cette molécule est capable de former un gel mais la concentration nécessaire est plus élevée (2.5%). En revanche les GNF sont capables de stabiliser le gel en présence de milieu de culture DMEM, ce qui permet d'envisager des applications pour la culture cellulaire.

Dans l'objectif d'explorer une autre famille de nucléolipides pour la délivrance d'acides nucléiques, des dérivés anioniques bicaténaires ont été synthétisés (Khiati et al., 2009). Ces molécules sont formées d'un nucléotide (thymidine) avec le phosphate en position 3' du sucre et des chaînes lipidiques (C₁₂, C₁₄, C₁₆) constituées par des 1,2-diacylglycerols estérifiés avec le phosphate (figure 1.36).

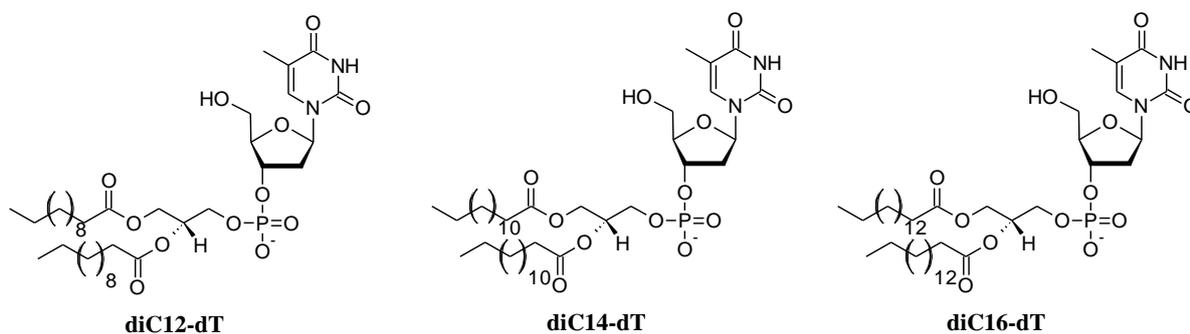


Figure 1.36. Nucléolipides bicaténaires anioniques.

La co-formulation de ces molécules avec du DOPE (dioleoylphosphatidylethanolamine) et du Ca⁺⁺ conduit à la formation de complexes avec l'ADN capables de transférer des cellules

HEK 293. Les avantages de ces systèmes sont leur faible cytotoxicité et l'utilisation de Ca^{++} à des concentrations plus élevées que la concentration physiologique, cela pourrait conduire à un meilleur relargage de l'ADN au niveau intracellulaire. Si on compare plusieurs longueurs de chaînes, les dérivés avec des chaînes palmitoyl sont légèrement plus efficaces. La présence de DOPE pourrait contribuer à une meilleure fusion avec les membranes cellulaires et donc à une meilleure internalisation.

1.3.4 Auto-assemblage

Il est intéressant d'explorer plus en détail les propriétés d'auto-assemblage des nucléolipides, en particulier si les propriétés biophysiques des lipides et les propriétés de reconnaissance moléculaire des bases azotées sont démontrées dans les molécules hybrides des nucléolipides et s'il est possible de mettre en évidence de nouvelles propriétés. Une des premières techniques utilisées pour étudier la propriété d'auto-assemblage a été la mesure d'isothermes de compression pression de surface – aire moléculaire (π -A) (figure 1.37).

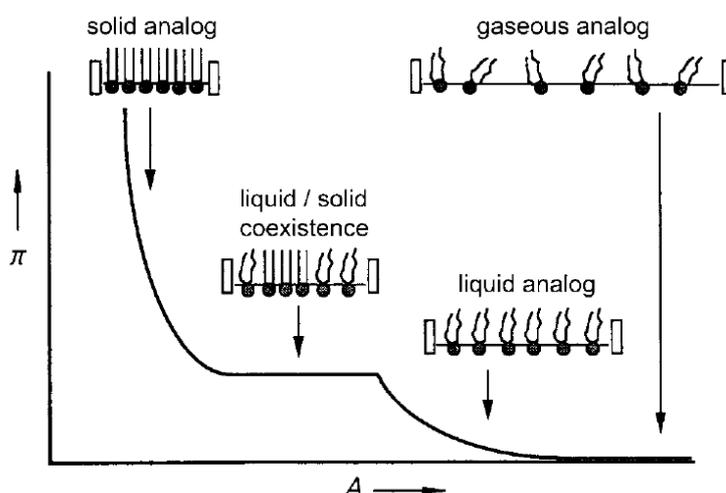


Figure 1.37. Principe des mesures isothermes de compression, pression de surface – aire moléculaire (π -A). Adapté depuis (Rosemeyer, 2005).

Cette technique permet d'étudier des monocouches auto-assemblées à l'interface air-eau, en obtenant des informations sur l'auto-assemblage bidimensionnel. Ahlers et collaborateurs (Ahlers et al., 1990) ont étudié de façon systématique plusieurs nucléolipides en faisant varier le nombre de chaînes lipidiques, le type de base azotée et la nature de la tête polaire (figure 1.38).

Tous les nucléolipides étudiés étaient capables de former des monocouches à l'interface air-eau. Dans le cas des dérivés bicaténaires des bases azotées, il y a une différence significative à 40°C entre l'adénine et la thymine. Pour l'adénine la pression de collapse est de l'ordre de 60 mN/m, tandis que pour la thymine cette valeur est autour de 45 mN/m.

Cette différence est expliquée par une meilleure superposition des bases et donc un meilleur π -stacking des purines par rapport aux pyrimidines.

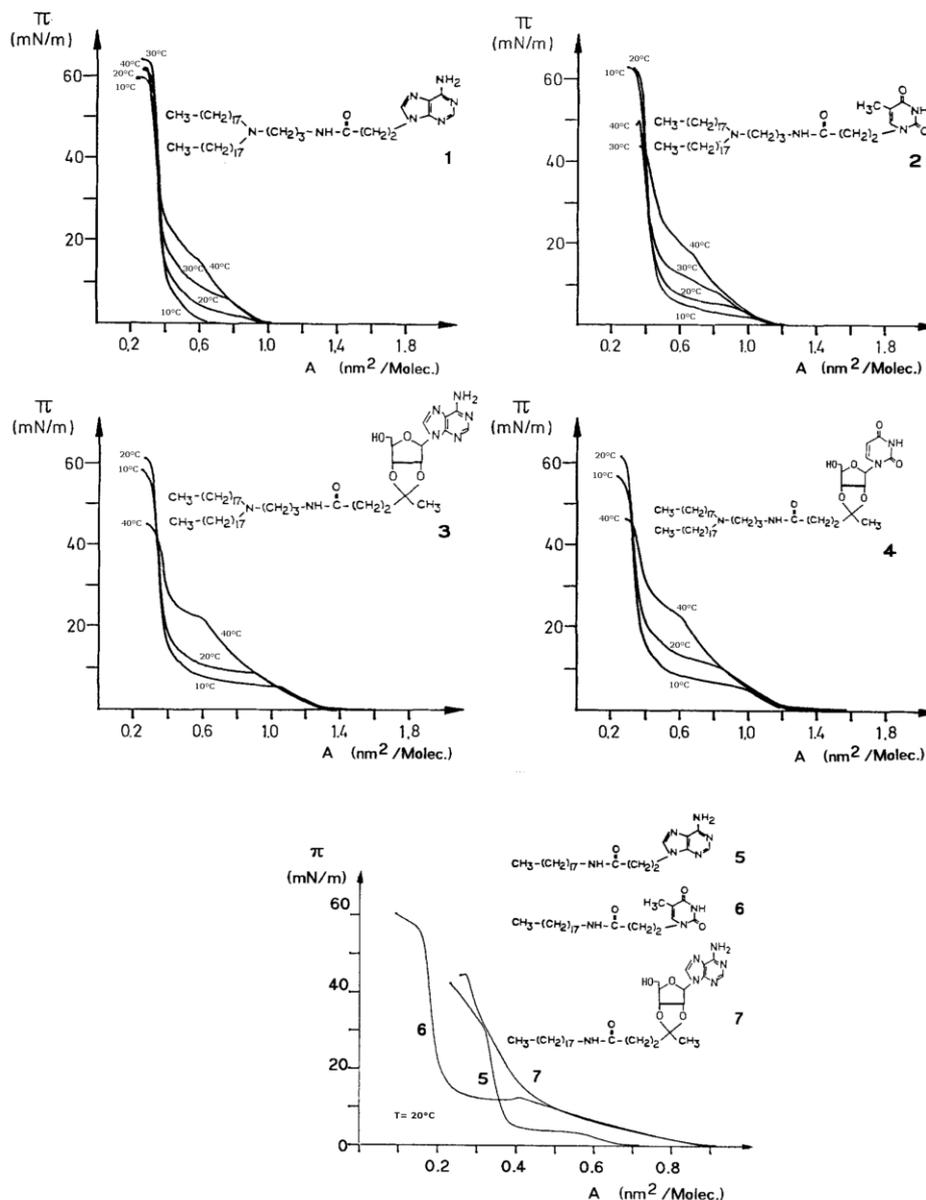


Figure 1.38. Digrammes pression de surface – area ($\pi - A$), pour l'adénine lipide (1), la thymine lipide (2), adénosine lipide (3), l'uridine lipide (4), à différentes températures et pour une série de amphiphiles monocaténaires (5,6,7) à 20 °C. Adapté depuis (Ahlers et al.,1990).

Pour les systèmes avec une tête polaire nucléosidique il n'y a pas une grosse différence entre les deux bases. Les différences plus importantes existent pour les systèmes monocaténaires. Dans le cas de l'adénosine-lipide il n'y a pas de plateau correspondant à la formation d'une phase condensée. Pour les autres, deux systèmes de base azotée-lipide, une tête polaire plus petite permet la formation d'une phase condensée qui est plus dense pour le dérivé de la thymine.

Baglioni et collaborateurs ont étudié le comportement à l'interface air-eau de monocouches de dérivés 5'-dioleoylphosphatidyl de l'adénosine, de l'uridine et de la cytidine (Berti et al., 1997). Les isothermes π -A montrent des variations dépendant de la base azotée et du pH de la sous phase, cela suggère que les équilibres de protonation-deprotonation des bases et des

groupes phosphates sont les facteurs principaux qui contrôlent les paramètres bidimensionnels.

De plus, il y a une interaction particulière en fonction de la nature du cation monovalent présent dans la sous phase, par exemple le dérivé uridinylé a une aire limite par molécules qui augmente avec la taille du cation ($\text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+$), en revanche le dérivé adénylé montre un comportement différent avec les cations Na^+ et K^+ où les forces d'attraction coulombienne favorisent une compression de la monocouche et le Li^+ favorise une expansion de la monocouche avec une augmentation de la pression de collapse. Ces résultats indiquent une forte interaction spécifique entre ce cation et la partie nucléosidique de la molécule. Les mêmes auteurs ont également étudié la structure tridimensionnelle d'une dispersion des mêmes molécules, après qu'ils aient été extrudés plusieurs fois sur des membranes de polycarbonate avec des pores de 200, 100, 50 nm (Berti et al., 1998, 2000). Les résultats montrent l'obtention de vésicules unilamellaires de taille environ de 30 nm qui sont assez stables dans le temps. Les vésicules constituées de dérivés adénylés montrent après des analyses UV un effet hypochromique, cela indique que l'adénine présente dans les têtes polaires forme des empilements de type π -stacking. En revanche on n'observe pas la même chose pour les dérivés uridinylés. Ils ont joué aussi sur la variation de la longueur des chaînes lipidiques, en observant des structures particulières (Baldelli Bombelli et al., 2002). Par exemple, l'1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (C12) forme des micelles filaires géantes en présence d'une force ionique relativement élevée (0.1 mM tampon phosphate). En augmentant la concentration en nucléolipides, ces micelles augmentent leur taille jusqu'à montrer un comportement similaire aux polymères où on observe un enchevêtrement des chaînes (figure 1.39).

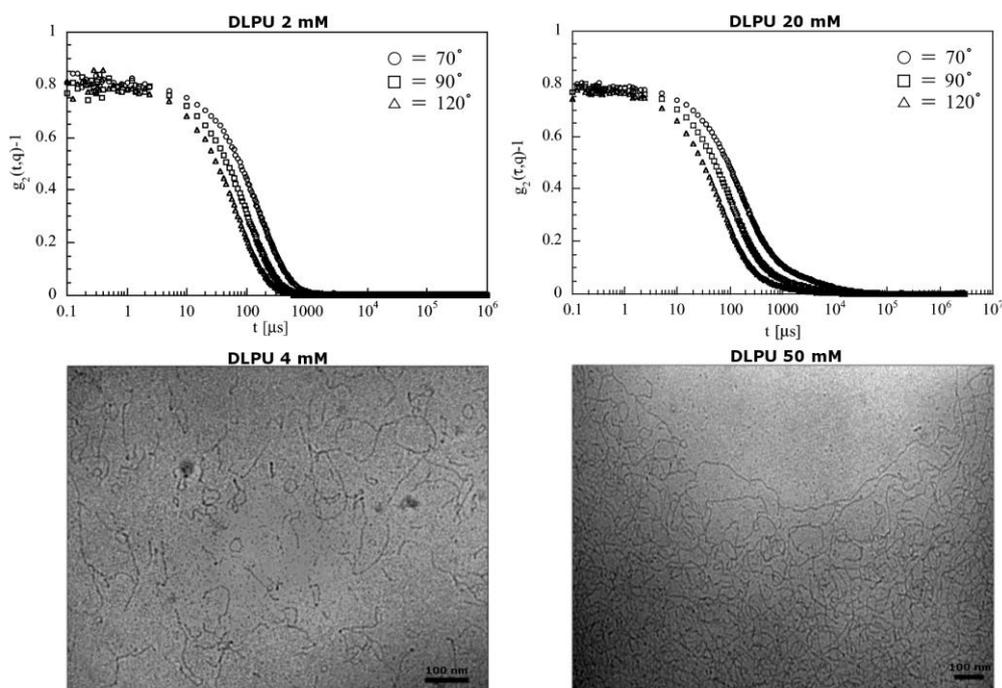


Figure 1.39. Profils DLS et images cryo-TEM pour le DLPU à différentes concentrations. Adaptée depuis (Baldelli Bombelli et al., 2002).

Cela a été étudié avec différentes techniques, en particulier avec la diffusion dynamique de la lumière (DLS), où on observe la présence d'un seul temps de relaxation pour les systèmes plus dilués montrant donc un comportement diffusif, en revanche pour les échantillons plus concentrés on observe deux temps de relaxation. Le temps rapide est corrélé à un comportement diffusif, le temps long est corrélé à un comportement de type réseau de chaînes polymériques. Les mêmes résultats ont été montrés par cryo-TEM où on peut avoir une observation « directe » de l'échantillon avec des basses probabilités d'artefacts liés à sa préparation.

Le groupe de Barthélémy a synthétisé un grand nombre de nucléolipides, dont il a été possible d'étudier plusieurs types d'auto-assemblage différents. Les dérivés phosphocholine de l'uridine avec plusieurs types de chaînes sont capables de former des vésicules, des fibres, des gels en fonction de la température et de la concentration (figure 1.40) (Moreau et al., 2004).

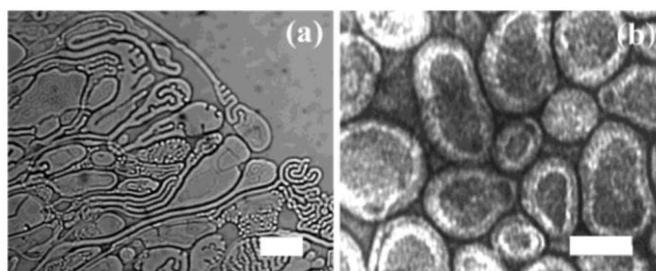


Figure 1.40. Image de microscopie optique des organizations supramoléculaires après hydratation de la DOUPC, barre = 30 μ m (a) ; image de TEM de SUV obtenues après extrusion de la DOUPC, barre = 50 nm (b). Adaptée depuis (Moreau et al., 2004).

Au-dessus de la T_m toutes les molécules forment des vésicules, par exemple la DOUPC forme des vésicules de 40 nm après hydratation des lipides et après extrusion sur une membrane de polycarbonate de 50 nm.

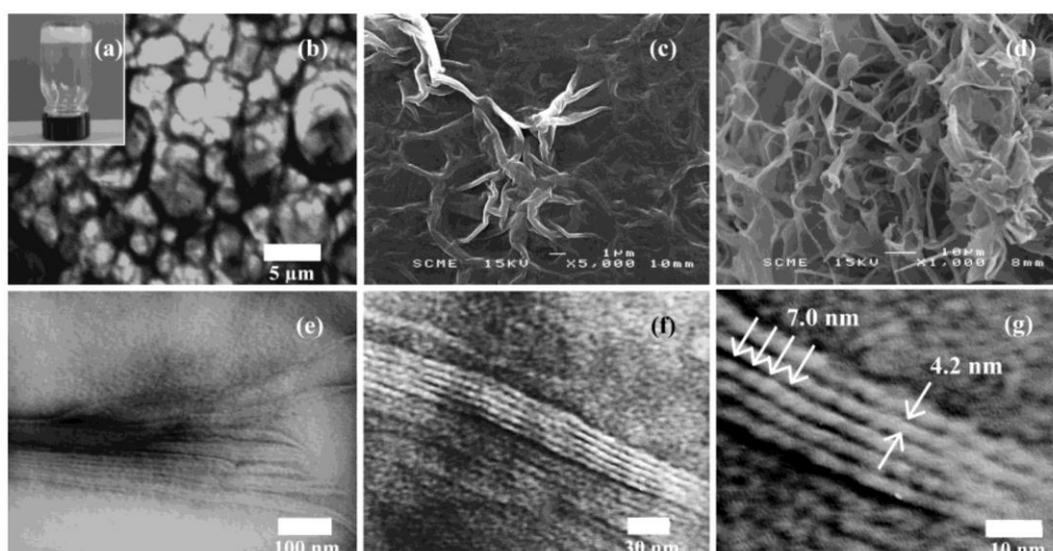


Figure 1.41. Hydrogel de DPUPC (6% w/w) (a), image TEM de l'hydrogel (b), images SEM de l'hydrogel (c) et après lyophilisation (d). Images TEM à haute résolution de nanofibres de DPUPC qui constituent l'hydrogel (e-g). Adapté depuis (Moreau et al., 2004).

La DPUPC au-dessous de la T_m et avec une concentration de 6% forme des hydrogels (figure 1.41).

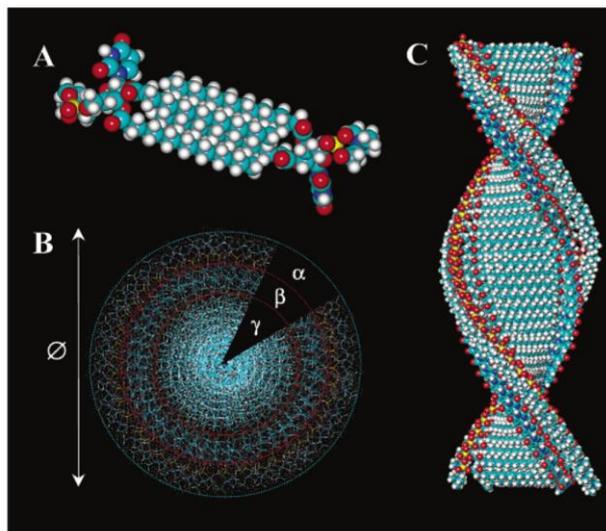


Figure 1.42. Modèle proposé pour la formation de nanofibres hélicoïdales simili-DNA. Deux molécules de DPUPC forment l'unité répétitive de base de la structure hélicoïdale (A). Différentes vue de la structure hélicoïdale (B-C).

Adaptée depuis (Moreau et al., 2004).

Les images de TEM et SEM montrent la présence d'un réseau de fibres enchevêtrées, les images à haute résolution montre la présence de fibres hélicoïdales alignées de diamètre d'environ 4 nm et avec un pas d'hélice d'environ 7 nm. La formation d'hydrogel n'a jamais été montrée pour la DPPC, cela indique que la présence de la base azotée joue un rôle primordial dans la structure de l'auto-assemblage. Le modèle proposé considère des interactions hydrophobes et π -stacking à l'origine de la stabilisation de l'hélice (figure 1.42). En particulier la partie hydrophile (phosphocholine) est orientée vers l'extérieur, les uridines empilées (π -stacking) et les chaînes lipidiques tournées à l'intérieur de l'hélice.

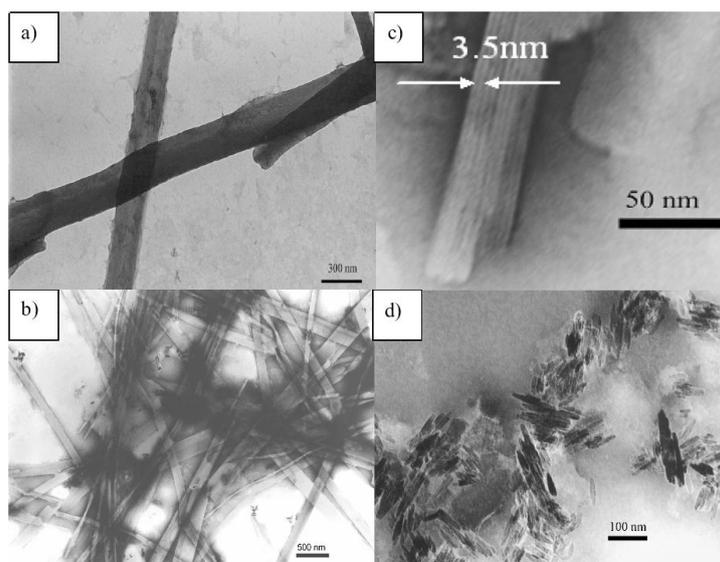


Figure 1.43. Images TEM de C16-3'-TMP (a), C20-3'-TMP (b,c) et C16-3'-AMP. Adapté depuis (Campins et al., 2007).

Au-dessus de la T_m , les nucléosides phosphocholine amphiphiles forment des structures de type bicouches qui s'organisent pour former des vésicules.

Les nucléolipides anioniques monocaténaire (Campins et al., 2007), C16-TMP et C20-TMP forment des structures qui ressemblent à des fibres qui sont plus petites pour les systèmes C16-AMP et C20-AMP et qui ressemblent plus à des petits cristaux (figure 1.43).

Des images à haute résolution de l'échantillon C20-TMP montrent des structures répétitives bien organisées au niveau nanométrique. La distance moyenne est estimée à 3.5 nm. Les analyses aux rayons X montrent que dans le cas du C20-TMP le système adopte une structure cristalline monoclinique de type orthorhombique, tandis que les petits cristaux observés dans le cas du C20-AMP sont dus à un arrangement triclinique des molécules.

1.3.5 Interactions

Les nucléolipides qui ont les propriétés de reconnaissance des bases azotées complémentaires des acides nucléiques et d'auto-assemblage des lipides sont les candidats moléculaires idéals pour le transport d'oligonucléotides, d'ADN et siRNA. Il faut souligner l'importance d'introduire différentes caractéristiques moléculaires et structurales dans l'objectif d'améliorer l'efficacité de transfection et de minimiser la cytotoxicité. L'objectif principal sera donc de se concentrer sur des interactions de type liaisons hydrogène et de π -stacking entre les nucléolipides et les acides nucléiques (LaManna et al., 2012). Pour pouvoir évaluer l'interaction et donc la capacité du vecteur à complexer l'acide nucléique, plusieurs études de reconnaissance moléculaire ont été effectuées. Ahlers et collaborateurs (Ahlers et al., 1990) ont étudié à travers la mesure d'isothermes de compression pression de surface – aire moléculaire (π -A) les propriétés d'interactions entre des nucléolipides neutres organisés en monocouche à l'interface aire-eau et des bases azotées soit sous forme de monomère soit sous forme de polymère (figure 1.44).

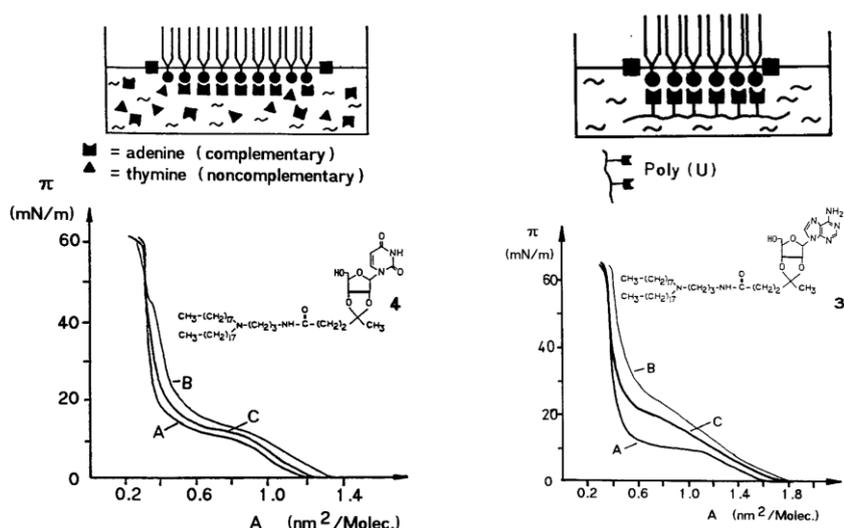


Figure 1.44. Diagrammes schématiques de l'interaction entre les nucléolipides en monocouches et les nucléobases monomériques ou polymériques. Diagrammes de pression de surface – area (π – A), pour l'uridine lipide (4) versus no base (A), adénine (B), thymine (C) et pour l'adénosine lipide (3) versus no base (A), polyU (B), polyA (C). Adaptée depuis (Ahlers et al., 1990).

Les bases azotées monomériques montrent clairement leur influence sur le comportement de surface du nucléolipide causant une expansion de la monocouche. Si on compare les isothermes on observe une différence entre le type de base ajoutée dans la sous phase, adénine (complémentaire) ou thymine (non complémentaire). L'isotherme avec la base complémentaire (adénine) est déplacée vers des plus grandes aires moléculaires, cela indique une diminution de la densité de packing causée par l'interaction entre la base azotée et la monocouche. Cette augmentation d'aire moléculaire est plus importante (presque 2 fois) dans les cas de l'adénine par rapport à la thymine. Dans la phase condensée l'influence de la thymine cesse vers 40 mN/m, en revanche l'adénine influence l'arrangement de la monocouche condensée jusqu'à 50 mN/m. Pour les bases azotées polymériques (polyA ou polyU), on observe que les deux sous phases causent une expansion de la monocouche, dans ce cas constituée d'un nucléolipide dérivé de l'adénine. L'effet des molécules présentes dans la sous phase est assez important, dans le cas du polyA (non complémentaire) on observe une diminution de l'aire moléculaire jusqu'à 35 mN/m ou l'isotherme ressemble fortement à la courbe obtenue pour le produit pur. Cela indique que le polyA est éliminé de la partie polaire de la monocouche et donc il n'influence plus l'arrangement de la monocouche. En revanche le polyU (complémentaire) montre une interaction jusqu'à des pressions de surface assez élevées. Même à la pression de rupture, l'aire moléculaire reste plus élevée. Cela indique une plus forte interaction entre le nucléolipide et le polyU.

Baglioni et collaborateurs a étudié en détail les propriétés de reconnaissance moléculaire des nucléolipides anioniques dans les liposomes, micelles, vésicules et monocouches (Baglioni and Berti, 2003). Les études de miscibilité entre DOP-adénosine et DOP-uridine ont montré un comportement non-idéal à pH physiologique (Berti et al., 1997). La stabilisation des monocouches formées d'un mélange des deux nucléolipides a été attribuée à des interactions de type liaison hydrogène et π -stacking entre les têtes polaires. De plus le minimum d'énergie libre a été observé pour un rapport DOP-adénine/DOP-uridine de 0.2-0.3 fraction molaire. Cela indique la formation d'un trimère $U_2 \cdot A$ dans lequel l'adénosine présente les liaisons hydrogène en même temps de type Watson-Crick et de type Hoogsten. Ils ont étudié aussi l'interaction entre des vésicules préparées à partir des nucléolipides DOP-adénine et DOP-uridine (Berti et al., 2000). La stabilité des vésicules a été étudiée dans le temps avec des mesures de diffusion quasi-élastiques de la lumière (QELS) et les propriétés de reconnaissance moléculaire ont été étudiées à travers des mesure de spectroscopie UV et dichroïsme circulaire (CD) en fonction du temps. Après mélange des deux types de vésicules, formées de nucléolipides complémentaires, ils n'ont pas observé de changements structuraux. En revanche, ils ont observé un effet hypochromique et une augmentation de l'ellipticité, après 15-20 jours. Les nucléolipides que ne sont pas complémentaires n'ont pas montré ce comportement. Cela indique une reconnaissance de type base-base dans l'eau.

Barthélémy et collaborateurs ont synthétisé un nucléolipide cationique avec l'objectif de complexer les charges négatives présentes sur les acides nucléiques pour former un vecteur pour la délivrance d'acides nucléiques à visée thérapeutique (Chabaud et al., 2006). La DOTAU a montré son efficacité dans la transfection de cellules de type MCF-7 par rapport à son analogue abasique, DOTAP et à la Lipofectamine®, de plus cette molécule est moins toxique. Une caractérisation des complexes, par SAXS, a montré la formation de structure de type phase lamellaire. Les phases lamellaires, dans les cas des complexes DOTAU/polyA, ont

des valeurs de périodicité lamellaire plus petites par rapport aux complexes DOTAP/polyA. Cela indique que la présence de la base, thymine complémentaire avec l'adénine, conduit à la formation de complexes plus compacts (5 nm par rapport à 5.6 nm). Une autre stratégie pour la vectorisation d'acides nucléiques pourrait être l'utilisation de nucléolipides anioniques ou neutres et l'utilisation d'un cation bivalent, comme le calcium. Khiati et al. (Khiati et al., 2009) ont synthétisé et évalué l'activité de nucléotides dérivés des 1,2-diacylglycerol et de calcium. Les études physicochimiques ont montré la formation de complexes stables entre les nucléolipides et l'ADN avec des concentrations en Ca^{++} supérieures à 1mM. Cette concentration est supérieure à la concentration intracellulaire (1 μM), cela rend possible un mécanisme de relargage intracellulaire de l'acide nucléique. Des expériences de transfection cellulaire sur des cellules de type HEK 293 ont montré que la présence de la partie nucléotidique (diC16dT) augmente l'efficacité de transfection d'un facteur 1.6 par rapport au control abasique (DPPG). Très récemment Montis et collaborateurs (Montis et al., 2012) ont étudié l'interaction entre des nucléolipides anioniques et des acides nucléiques mono filament ou double filament en utilisant du calcium comme pont entre les charges négatives. En particulier, ils ont étudié des mélanges 1:4 de 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidyladenosine (POP-Ade) et 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC) et leur interaction avec des acides nucléiques mono filament (polyU) ou double filament (ADN). Les résultats ont montré que les liposomes constitués de POP-Ade : POPC étaient capables de complexer le polyU à partir de 13 mM de calcium, en revanche les liposomes contrôle abasique formés de POPG : POPC n'étaient pas capables, même à des concentrations élevées de calcium de complexer le polyU. Cela peut être justifié par la présence d'interactions spécifiques de type liaison hydrogène et/ou π -stacking entre les bases complémentaires. Dans le cas de la complexation avec l'ADN (double filament), les deux systèmes étaient capables de former un complexe, avec des petites différences structurales, comme la concentration minimale de calcium nécessaire pour la formation du complexe. Cela semble indiquer une affinité majeure des nucléolipides pour les acides nucléiques. La différence entre acides nucléiques mono ou double filament pourrait être attribuée à la différente distribution des charges négatives, entre 4 et 7 Å pour le polyU et environ 1.7 Å pour l'ADN. Dans ce dernier cas, cette petite distance favorise les interactions électrostatiques. En revanche, dans le cas du polyU la densité de charges négative n'est pas suffisante et il est donc nécessaire de faire intervenir d'autres types d'interaction, comme dans le cas des paires de base adénine-uracile.

1.4 Objectifs du projet

La thérapie génique est une forme de médecine moléculaire qui a des potentialités pour traiter un grand nombre de maladies héréditaires ou acquises. Les concepts de base de la thérapie génique ont été discutés dans la section 1.1. Pour résumer, la thérapie génique est basée sur l'introduction dans les cellules cibles d'une partie de matériel génétique pour guérir la maladie ou ralentir sa progression. Pour atteindre cet objectif, la thérapie génique a besoin de technologies capables de transférer un gène dans une grande variété de cellules, tissus et organes. Une des plus grandes limitations dans l'application à grande échelle de ce type de traitement est le développement d'un vecteur sûr et efficace pour transporter le matériel génétique à l'intérieur des cellules (Verma and Weitzman, 2005). Les propriétés idéales que devraient avoir un vecteur sont une efficacité de transfection élevée avec un bon niveau de

spécificité et de ciblage, une faible toxicité et immunogénicité, biodégradabilité et une forte stabilité des formulations pharmaceutiques (Patil et al., 2005a). La délivrance d'acides nucléiques est classifiée traditionnellement en deux grandes catégories basées sur le type de vecteur utilisé : viral et non-viral. Les vecteurs de type viraux sont le moyen le plus efficace pour la délivrance d'acides nucléiques, à cause des composants spécialisés et hautement évolués des virus. Actuellement, ces vecteurs sont les plus répandus dans les tests cliniques. Cependant, ils présentent de nombreux problèmes : déclenchement d'une forte réponse immunogénique, capacité d'encapsulation limitée, problèmes liés à l'insertion du gène et donc probabilité de mutations et un coût élevé de production. Les systèmes de transfection de type non-viral sont préférés par rapport aux virus parce qu'ils ne sont pas immunogéniques, ils sont faciles à produire en grande quantité et ils ne sont pas limités en taille d'acide nucléique à complexer (Morille et al., 2008). Parmi les systèmes de délivrance de type non-viral on peut reconnaître deux grandes familles en fonction de la nature de l'agent complexant : polymère et lipides. Dans ce travail de thèse on va se concentrer sur la famille des lipides. Un des avantages de ce type de systèmes de délivrance est qu'il possède une structure chimique bien définie, qui peut être bien caractérisée et facilement synthétisée à grande échelle. Ces molécules, généralement amphiphiles, possèdent des propriétés d'auto-assemblage intéressantes, qui peuvent être facilement contrôlées pour obtenir des vecteurs avec une grande variabilité de taille et de morphologie. De plus grâce à des petites modifications chimiques il peut être possible de changer et de moduler ces propriétés. Les lipides cationiques, depuis leur apparition en 1987 (Felgner et al., 1987) ont été les plus étudiés grâce à leurs propriétés de complexation avec plusieurs acides nucléiques. Ils restent les plus utilisés grâce à leur efficacité de transfection sur un grand nombre de cellules et sont les plus répandus dans les tests cliniques. La composante cationique de ces molécules, complexe et compacte les charges négatives des acides nucléiques, grâce à la contribution entropique garantie par le relargage des contre-ions, et conduit à l'interaction avec les membranes cellulaires chargées négativement. La présence de lipides zwitterioniques pourrait augmenter l'efficacité de transfection, soit en diminuant la toxicité associée aux lipides cationiques soit en améliorant la fusion avec la membrane plasmique (Montis et al., 2012). La limitation majeure pour l'utilisation de ces systèmes *in vivo* est leur cytotoxicité. Cela a stimulé l'utilisation de lipides zwitterionique ou anioniques (Patil et al., 2004) comme alternative pour les lipides cationiques afin d'éviter ainsi les problèmes liés à la cytotoxicité. Dans ce cas, la présence de cations multivalents, comme le Ca^{++} , est nécessaire pour ponter les charges négatives des phosphates présents dans les têtes polaires des nucléolipides et les charges négatives des phosphates présentes dans le squelette des acides nucléiques. De plus la présence de Ca^{++} à des concentrations beaucoup plus élevées que les concentrations intracellulaires pourrait constituer un système à relargage contrôlé. Khiati S. (Khiati et al., 2009), dans un travail précédent a commencé à étudier une famille de nucléolipides anioniques dérivés des nucléotides conjugués à des 1,2-diacylglycerol. Il a montré leur efficacité de transfection sur certains types de lignées cellulaires (MCF-7), de plus il a montré leur efficacité de transfection majeure par rapport à des phospholipides anioniques contrôlés qui ne possédaient pas de base azotée. Sur la base de ces résultats encourageants on a proposé de développer et d'étudier une nouvelle famille de nucléolipides anioniques dérivés des 1,2-diacylglycerols, avec la partie lipidique phosphorylé en position 3' du sucre et un acide aminé ou un peptide en position 5' du sucre. Cela devrait conduire à la synthèse d'une molécule

« multifonctionnelle », grâce à la présence de deux parties chimiques différentes, une partie nucléotidique et une partie peptidique. L'objectif principal reste une amélioration des capacités de complexation de ces systèmes avec les acides nucléiques, grâce à la possibilité de formation d'interactions faibles spécifiques. De plus la fonctionnalisation de ces molécules avec l'acide aminé ou le peptide pourrait améliorer la complexation. Une fois maîtrisé la synthèse chimique et la compréhension des propriétés d'auto-assemblage de ces molécules, on pourrait envisager l'utilisation de peptides qui possèdent des séquences spécifiques de ciblage et donc qui sont susceptibles d'améliorer l'efficacité de transfection grâce au ciblage. De plus la présence dans les molécules de sous unités bio-inspirées devrait conduire à des molécules facilement biodégradables et faiblement toxiques.

Le travail sera donc articulé en différentes parties : synthèse chimique des molécules, préparation et caractérisation physico-chimique des auto-assemblages supramoléculaires, étude de l'interaction et de la complexation avec des acides nucléiques.

1.5 Rationnel dans le choix des structures chimiques à synthétiser

L'idée principale de ce sous-chapitre est d'expliquer brièvement les critères et les motivations dans le choix des différentes sous-unités qui constituent les dérivés peptidiques des nucléolipides. La structure générale de cette nouvelle classe de nucléolipides est représentée dans la figure 1.45.

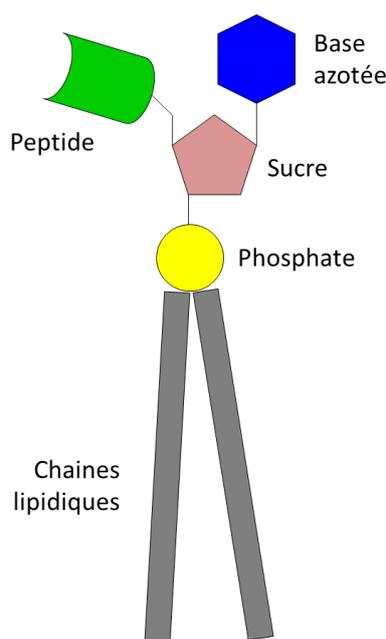


Figure 1.45. Structure générale d'un peptido-nucléo-lipide.

On distingue cinq sous-unités principales : la base azotée, le sucre, le phosphate, les chaînes lipidiques et la partie peptidique. On peut facilement comprendre que le nombre de structure qu'on peut obtenir est très grand et cela pourrait poser des problèmes au niveau de la synthèse et surtout au niveau des études physico-chimiques et biologiques. On a donc fixé des critères de sélection qui constituent le rationnel dans le choix des structures à synthétiser. Ces critères sont :

- Facilité et faisabilité de la synthèse
- Originalité de la structure chimique
- Fluidité des chaînes à température ambiante
- Peptide fonctionnel
- Pas d'interactions électrostatiques avec l'acide nucléique à complexer

Pour la partie nucléotidique on a utilisé la thymine comme base azotée qui ne nécessite pas la présence de groupes protecteurs pour la synthèse, de plus la présence du méthyle pourrait être intéressante pour d'éventuelles interactions hydrophobes ; le sucre utilisé a été le désoxyribose, ici aussi l'absence d'un hydroxyle facilite la synthèse, enfin le groupe phosphate a été positionné en position 3' du sucre, cela laisse disponible un alcool primaire en position 5' qui peut être intéressant au niveau de la synthèse pour favoriser une grande réactivité et une meilleure disponibilité des produits de départ. Au niveau des interactions, il serait susceptible de favoriser la formation de liaisons hydrogène.

Pour la partie lipidique, le critère était d'avoir des bicouches fluides à température ambiante pour faciliter les étapes de formulation. Après un examen des températures de transition de phase (T_m) gel \rightarrow fluide ($L\beta \rightarrow L\alpha$) sur une série de phospholipides commerciaux (Tableau 1.4) (Caffrey, 1993), les choix intéressants étaient les chaînes de longueur inférieure à 14 atomes de carbone ou les chaînes présentant des doubles liaisons.

Températures de transition de phase des phospholipides dans l'eau		
Phospholipides		T_m (°C)
Dilauroyl phosphatidylcholine	12:0 DLPC	-2
Dimiristoyl phosphatidylcholine	14:0 DMPC	24
Dipalmitoyl phosphatidylcholine	16:0 DPPC	41
Distearoyl phosphatidylcholine	18:0 DSPC	55
Dioleoyl phosphatidylcholine	18:1 DOPC	-17
Dilauroyl phosphatidylethanolamine	12:0 DLPE	29
Dimiristoy phosphatidylethanolamine	14:0 DMPE	50
Dipalmitoyl phosphatidylethanolamine	16:0 DPPE	63
Distearoyl phosphatidylethanolamine	18:0 DSPE	74
Dioleoyl phosphatidylethanolamine	18:1 DOPE	-16
Dilauroyl phosphatidylglycerol	12:0 DLPG	-3
Dimiristoy phosphatidylglycerol	14:0 DMPG	23
Dipalmitoyl phosphatidylglycerol	16:0 DPPG	41
Distearoyl phosphatidylglycerol	18:0 DSPG	55
Dioleoyl phosphatidylglycerol	18:1 DOPG	-18

Tableau 1.4. Température de transition des phospholipides dans l'eau. Adaptée depuis (Caffrey, 1993).

De plus la taille de la chaîne peut avoir une influence sur l'efficacité de transfection et sur la cytotoxicité (Koynova and Tenchov, 2009). Finalement les options pour le type de chaîne choisies sont les chaînes miristoyl (14:0) et oleoyl (18:1).

Pour la partie peptidique, on a souhaité favoriser un peptide fonctionnel, qui soit capable d'interagir avec un acide nucléique et/ou capable d'un certain niveau de ciblage. De plus, on ne voulait pas utiliser un peptide chargé positivement, pour favoriser des interactions plus faibles, de type spécifique (liaison hydrogène) et aussi pour éviter tous les problèmes liés à l'utilisation de lipides cationiques pour la transfection (toxicité et interaction avec le sérum). Après un examen de la littérature, on a trouvé un article du groupe de recherche de E. Stulz (Coomber et al., 2010) où les auteurs montrent que des nanoparticules d'or, qui possèdent sur leur surface un peptide, peuvent être connectées via des acides nucléiques à double filament. En particulier, les nanoparticules d'or sont recouvertes d'un mélange de deux peptides : CALNN et CALNN-linker-FQGII. Le peptide CALNN possède à son extrémité une cystéine avec la fonction de liant avec la surface des nanoparticules et avec l'autre extrémité le résidu acide donc chargé négativement (Lévy et al., 2004). La fonction de ce peptide est de stabiliser la suspension de nanoparticules d'or. Le peptide FQGII est lié au peptide CALNN à travers un linker (acide 6-aminohexanoïque). Les auteurs ont fait varier le pourcentage de peptide FQGII présent sur la surface et aussi le type d'acides nucléiques double filament. Dans un cas (Template 2) ils sont auto-complémentaires dans l'autre cas (Template 1) la complémentarité est décalé de façon à former des longues doubles hélices d'acides nucléiques (figure 1.46).

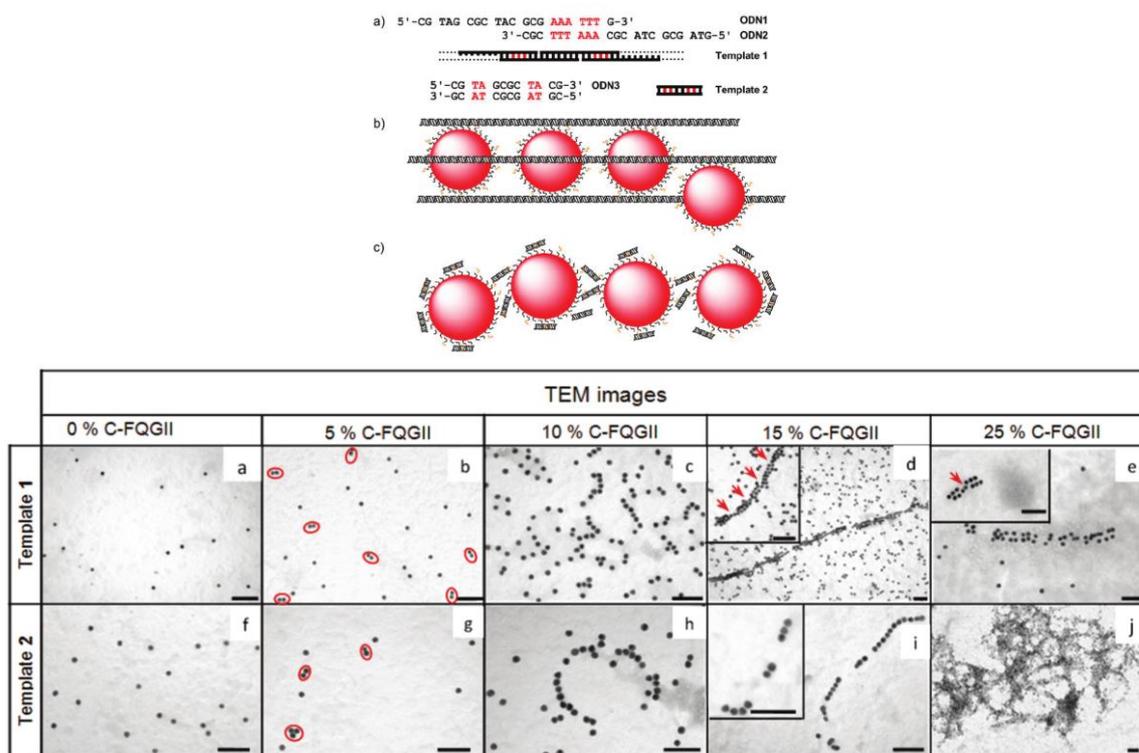


Figure 1.46. Deux différents types d'acide nucléique à double filament (template 1 ou template 2) sont à l'origine de différentes structures qui deviennent plus complexes avec l'augmentation de la pourcentage de peptide à la surface des nanoparticules d'or. Adaptée depuis (Coomber et al., 2010).

Dans les images de microscopie électronique on voit bien les nanoparticules d'or qui sont de plus en plus connectées en fonction de la concentration de peptide et qui forment des structures différentes en fonction du type d'acide nucléique utilisé. Le peptide FQGII est donc capable d'interagir avec des doubles filaments d'ADN. De plus si on regarde la composition d'acides aminés présents Phénylalanine (F), Glutamine (Q), Glycine (G), Isoleucine (I), on remarquera que il n'y a pas d'acides aminés chargés positivement, ce peptide interagit donc majoritairement grâce à des interactions de type hydrophobe et cela est en accord avec les critères qu'on avait fixé au départ.

Le peptide n'est pas d'origine naturelle, mais il a été découvert par le groupe de Sasaki (Alam et al., 2000) après un dépistage d'une librairie combinatoire en phase solide. Les auteurs ont synthétisé une librairie de pentapeptides en phase solide sur des résines en utilisant comme linker deux unités d'acide 6-aminohexanoïque, de façon à avoir une séquence par bille. Sur des billes magnétiques ils sont couplés à une séquence d'oligonucléotide présentant deux séquences complémentaires espacées par une boucle non-nucléotidique formée par six unités de PEG (figure 1.47).

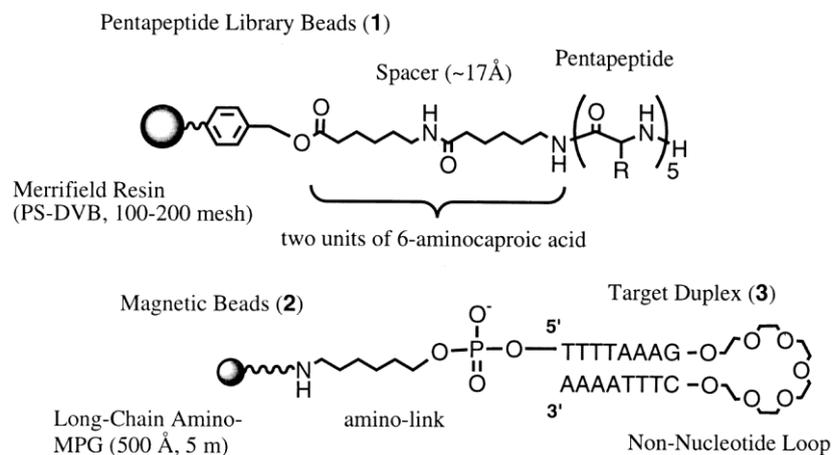


Figure 1.47. Structure de la librairie et des billes magnétiques.
Adaptée depuis (Alam et al., 2000).

Un mélange des deux types de billes dans un tube a été effectué pendant 3h, puis un aimant a été placé à l'extérieur de la paroi du tube.

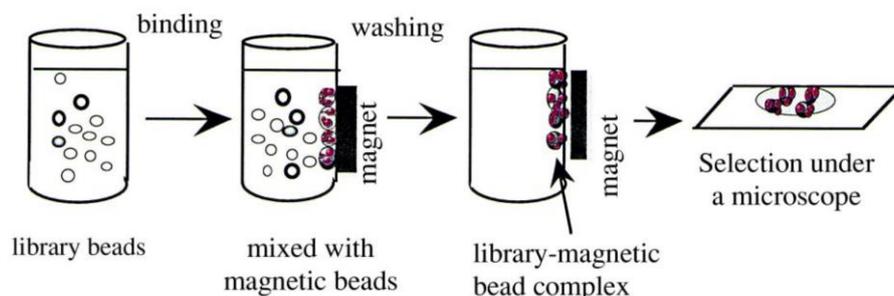


Figure 1.48. Schéma de la procédure de dépistage et sélection des billes magnétiques.
Adaptée depuis (Alam et al., 2000).

Les complexes bille-bille ont donc été séparés après observation au microscope et les peptides ont été envoyés au séquençage pour déterminer la séquence (figure 1.48).

Une analyse statistique de chaque position du pentapeptide a permis la conception d'une série de pentapeptides qui se sont révélés assez efficaces dans l'interaction avec des duplex d'acides nucléiques et dont le peptide FQGII a été identifié comme le plus efficace de toute la série. L'étude de l'interaction a été effectuée à travers des tests de déplacement du bromure d'ethidium (figure 1.49).

Entry	Peptides	Target duplex (3) $K_{ETBr} = 3.9 \times 10^6$	A3T3 $K_{ETBr} = 2.5 \times 10^6$	CA12 $K_{ETBr} = 7.6 \times 10^6$	CT12 $K_{ETBr} = 2.4 \times 10^6$
1	FQGII	7.2	4.2	7.8	2.8
2	FQWII	24.5	34	11	10
3	FQFII	22	15.6	25	12.5
4	FQYII	35	17.5	45	17
5	WATTT	19	22	19	12
6	NQGIL	36	33	17.8	11.8
7	ILPEI	9.3	7.2	11.6	4.9
8	AHNLA	8	9	14.5	6
9	KTIKA	24	9	24.5	7.5
10	EPFSF	14.5	10.5	23	10
11	FTGVM	27	15.7	34.3	12.2
12	TEHQL ^b	14.3	17.2	20	8
13	KGFTD	37	37.5	24	10
14 ^c	FQWII	1.4×10^6	0.2×10^6	1.0×10^6	1.9×10^6
15	Distamycin	—	—	No inhibition	19

^aDNA as duplex = ethidium bromide = 1.0 μ M, 10.0 mM SHE buffer, pH 5.0, Ex = 546 nm, Em = 595 nm.

^bNo caproic acid unit connected to C-terminal.

^cBinding constants (K_s , M^{-1}) were determined directly by titration experiments under the same condition.

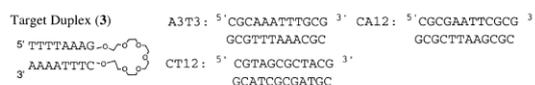


Figure 1.49. Tableau récapitulatif des différentes pentapeptides sélectionnés avec les constantes d'association pour différentes séquence d'oligonucléotides. Les valeurs expriment la concentration de peptide (μ m) nécessaire pour déplacer de 50% le bromure d'ethidium lié. Adaptée depuis (Alam et al., 2000).

Cela a été le choix rationnel qui nous a motivé au départ de ce travail pour la synthèse de cette nouvelle famille de nucléolipides. En réalité le nombre de structures qui ont été synthétisées et qui seront développées dans le chapitre suivant est plus limité. Il ne nous a pas été possible de synthétiser les dérivés peptido-nucléolipides par faute de temps et nous nous sommes concentrés sur la synthèse des dérivés acide-aminé-nucléolipides et sur l'étude complexe de leurs intéressantes propriétés physico-chimiques.

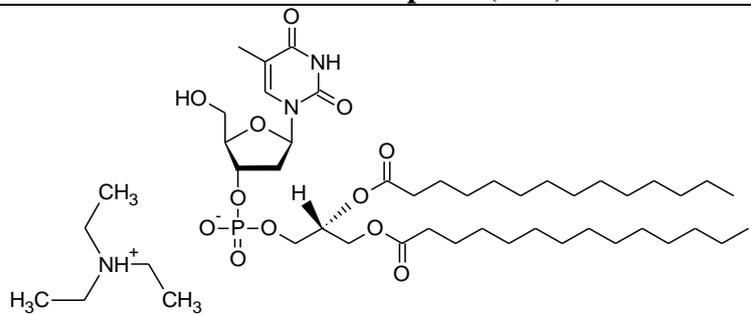
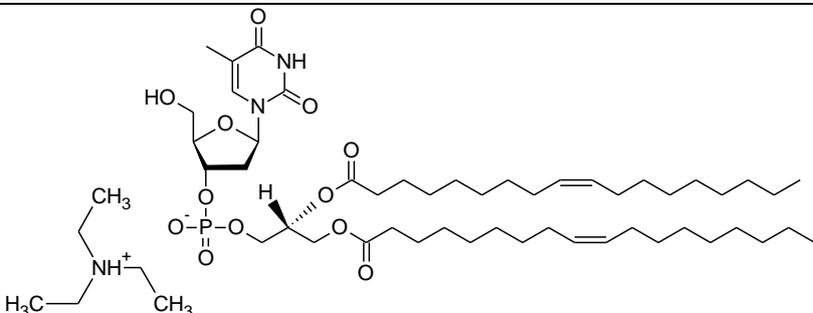
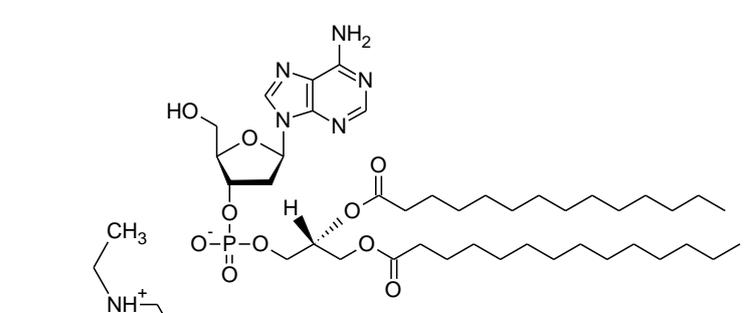
2 Synthèse des nucléolipides

2.1 Introduction

Ce chapitre décrit les différentes stratégies de synthèse utilisées pour la préparation des dérivés lipidiques des nucléotides. La première partie de ce chapitre présente la synthèse des nucléolipides constitués d'un nucléotide, avec le phosphate en position 3' du déoxyribose et des chaînes lipidiques. Cette famille de composés correspond aux nucléotide-3'-lipides (NLs). Dans une deuxième partie la synthèse des dérivés peptidiques des NLs est décrite. Ces amphiphiles, appelés amino acide-5'-nucléotide-3'-lipides (ANLs), portent un acide aminé estérifié en position 5' du déoxyribose.

2.2 Liste des molécules synthétisées

Le tableau 2.1 ci-dessous résume les différentes structures moléculaires synthétisées.

Nucléotide-3'-lipides (NLs)	
	diC14-dT, 1
	diC18:-dT, 2
	diC14-dA, 4

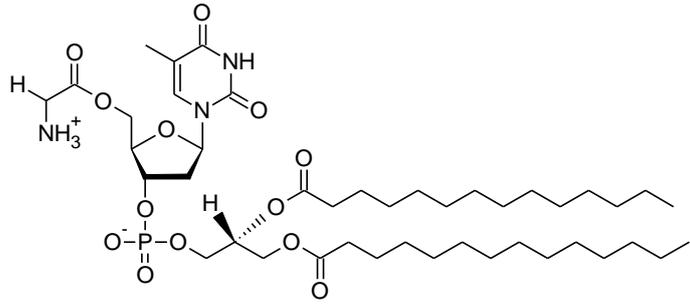
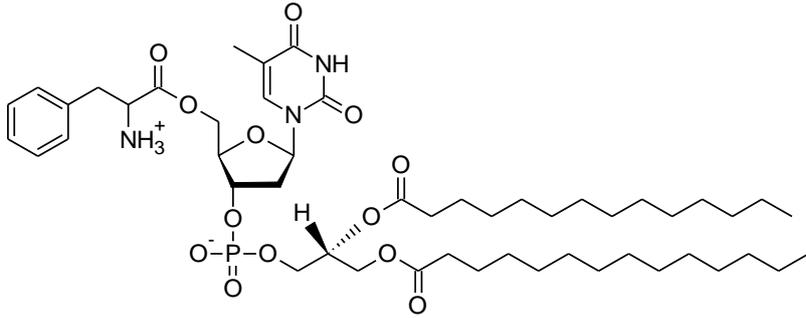
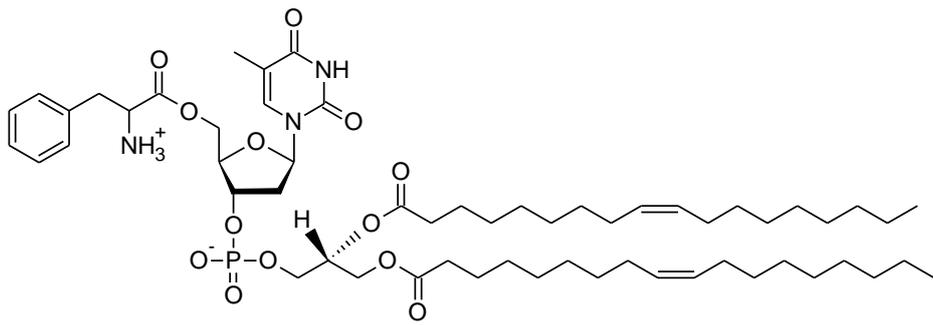
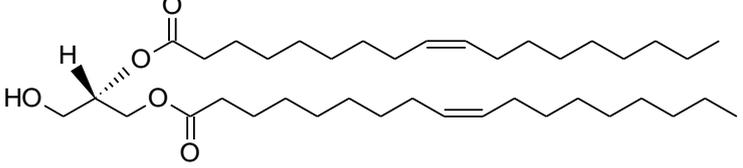
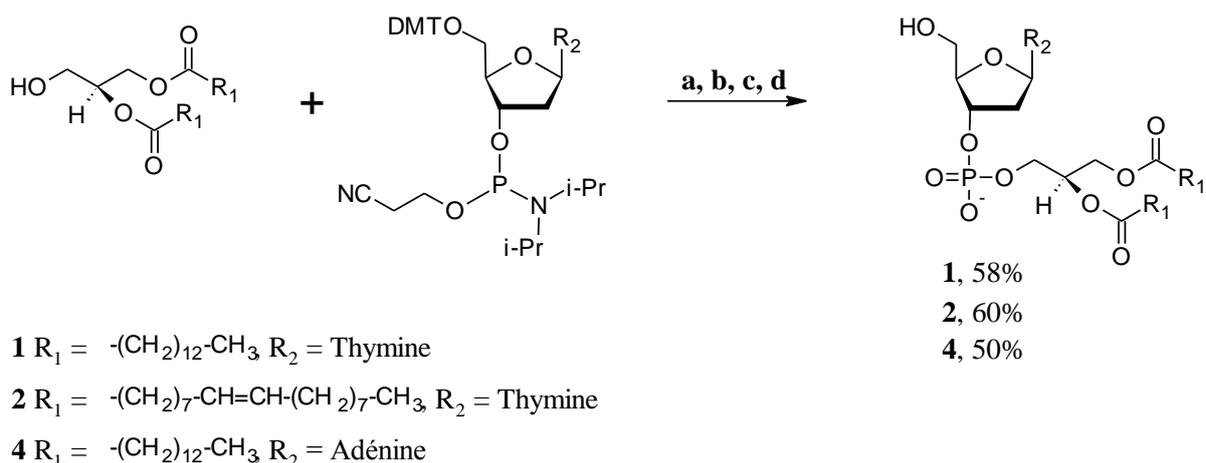
Amino acid-5'-nucléotide-3'-lipides (ANLs)
 <p>The structure shows a deoxythymine (dT) base attached to a deoxyribose sugar at the 5' position. The sugar is linked via a phosphate group to a glycerol backbone. The glycerol backbone is esterified with two long-chain fatty acids (C14) at the 1 and 3 positions. The amino acid group is glycine, shown as a zwitterion with a protonated amine group (NH₃⁺).</p> <p style="text-align: center;">diC14-dT-Gly, 10</p>
 <p>The structure is similar to diC14-dT-Gly, but the amino acid group is phenylalanine (Phe), shown as a zwitterion with a protonated amine group (NH₃⁺) and a benzyl side chain.</p> <p style="text-align: center;">diC14-dT-Phe, 12</p>
 <p>The structure is similar to diC14-dT-Phe, but the fatty acid chains are long-chain monounsaturated (C18:1) instead of saturated (C14).</p> <p style="text-align: center;">diC18:1-dT-Phe, 14</p>
Diacylglycerol
 <p>The structure shows a glycerol backbone esterified with two long-chain monounsaturated fatty acids (C18:1) at the 1 and 3 positions. The 2' position of the glycerol backbone has a free hydroxyl group (HO).</p> <p style="text-align: center;">DOG, 8</p>

Tableau 2.1. Liste de principales structures moléculaires synthétisées.

2.3 Synthèse des nucléotides-3'-lipides (NLs)

Afin d'évaluer les propriétés physico-chimiques et biologiques des dérivés peptidiques des nucléolipides, une stratégie de synthèse basée sur l'utilisation de phosphoramidites et de diacylglycérol a été mise en place. Cette synthèse permet d'obtenir les NLs dont la partie lipidique est positionnée en 3' du déoxyribose. Les dérivés de la thymine et l'adénine ont été préparés selon une procédure en quatre étapes utilisée précédemment au laboratoire (Desbat et al., 2012; Khiati et al., 2009) et représentée dans la figure 2.1.



(a) Tetrazole 0.45 M dans CH_3CN , 16h, TA ; (b) I_2 0.02 M dans $\text{THF}/\text{Pyr}/\text{H}_2\text{O}$, 6h, TA ; (c) TCA 3% dans DCM , 4h, TA ; (d) TEA, DCM , 16h, TA.

Figure 2.1. Schéma générale de synthèse des nucléotides-3'-lipides.

Les produits (NLs, 1, 2 et 4) ont été préparés sans isoler les composés intermédiaires avec des rendements compris entre 50 et 60%. La procédure mise en œuvre est adaptée de la synthèse chimique en phase solide usuellement employé pour la préparation des oligonucléotides (McBride and Caruthers, 1983; Wei, 2013).

2.3.1 Synthèse de *diC14-dT*, *diC14-dA*, *diC8:1-dT*

Les NLs ont été synthétisés selon le protocole adapté de la synthèse en phase solide des oligonucléotides (figure 2.1). La première étape de couplage entre le nucléotide phosphoramidite et le 1,2-diacylglycérol correspondant est effectuée dans l'acétonitrile. Le phosphoramidite activé par le triazole va réagir avec l'alcool primaire du 1,2-diacylglycérol. Cette étape est réalisée en conditions anhydres, pour éviter la dégradation du phosphoramidite. Cette première étape peut être suivie par RMN du ^{31}P en observant le déplacement du déplacement chimique (δ) du pic du phosphore de 150 ppm vers 140 ppm. La présence éventuelle d'un pic vers 10 ppm, indique la résonance du phosphore sous forme de phosphonate. Ce pic est alors indicatif de la dégradation du phosphoramidite. A l'étape suivante, dans le même milieu réactionnel est ajoutée une solution d'iode dans un mélange eau/pyridine pour oxyder le phosphite en phosphate. Une coloration jaune peut être observée

lorsqu'un excès d'iode est ajouté, indiquant une oxydation totale de la molécule. Cette réaction peut également être suivie par RMN du ^{31}P , on observe alors un déplacement chimique du phosphore de 140 ppm vers 0.5 ppm. Après évaporation des solvants, on procède à une étape de lavage de la phase organique avec une solution saturée en thiosulfate de sodium (Na_2SO_3). Cette solution est utilisée pour neutraliser l'iode en excès. La solution de TCA dans le DCM est ensuite ajoutée pour déprotéger le groupement DMT. Une coloration orange intense de la solution correspondant à la libération du carbocation $[\text{DMT}]^+$ est observée. Du méthanol (MeOH) est ajouté pour piéger le $[\text{DMT}]^+$ et du bicarbonate de sodium (NaHCO_3) pour neutraliser le milieu acide. Après une étape d'extraction, sans purification, l'étape finale de déprotection du groupe 2'-cyanoéthyle en milieu basique est réalisée. La base utilisée est la triéthylamine (TEA) qui est une base moins nucléophile de l'ammoniaque. L'utilisation de cette base est compatible avec les liaisons esters, présentent sur la molécule. Le produit est purifié par chromatographie sur silice et par exclusion de taille sur une colonne Sephadex LH20. Le rendement final est compris entre 50 et 60%. Les produits finaux ont été bien caractérisés par RMN du ^1H , ^{13}C , ^{31}P et par spectroscopie de masse (sauf le composé 4). Après analyse des spectres RMN on remarque la présence de pics caractéristiques de la TEA, en rapport 1 :1 avec le produit, cela indique la TEA comme contre ion du phosphate.

Pour la synthèse du produit diC14-dA (4), le phosphoramidite commercial possède une protection benzoyle sur l'amine de l'adénine. Il est alors nécessaire d'introduire dans le schéma synthétique une étape supplémentaire de déprotection avant de faire le couplage avec le 1,2-diacylglycérol, comme montré dans la figure 2.2.

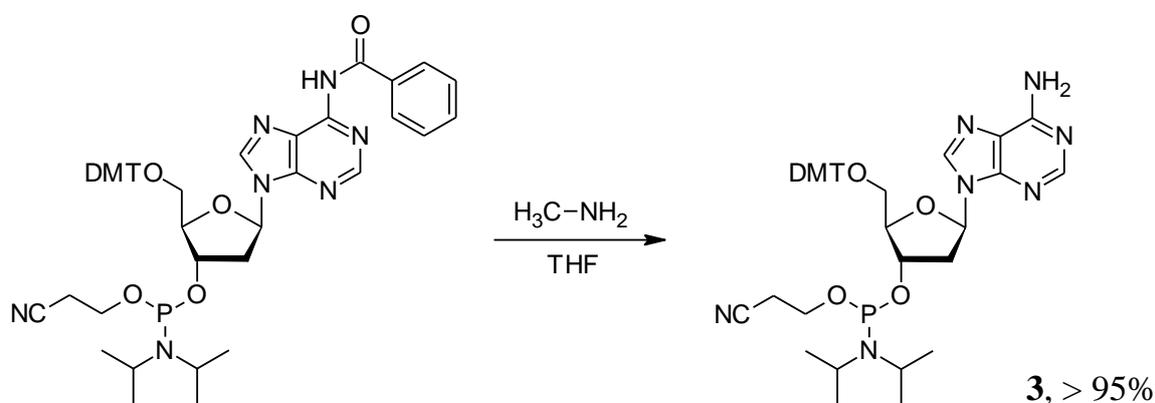


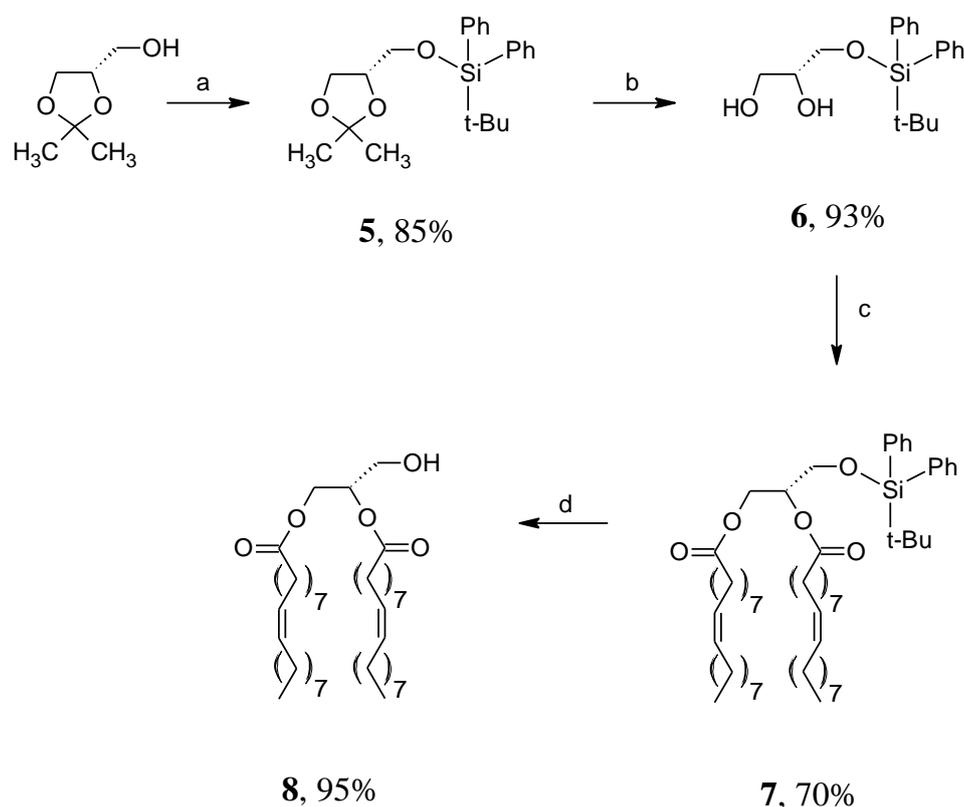
Figure 2.2. Déprotection de la N6-benzoyl-adénosine phosphoramidite.

La déprotection est effectuée par transamidification avec la méthylamine comme décrit dans la littérature (Desbat et al., 2012). La réaction est quantitative, cependant il est nécessaire de maintenir le milieu basique afin d'éviter d'activer le phosphoramidite. Le groupe amino libre de l'adénine n'est pas assez nucléophile pour intervenir dans la réaction de couplage suivante car le doublet d'électrons non liant de l'azote est conjugué dans le noyau purine.

2.3.2 Synthèse du 1,2-dioleoyl-*sn*-glycérol (DOG)

Les 1,2-diacyl-*sn*-glycérols à chaînes saturées sont des molécules commerciales qui peuvent être facilement achetées pour la synthèse des NLs. En revanche, compte tenu des quantités nécessaires pour la caractérisation physicochimique du dérivé nucléotidique du 1,2-dioleoyl-*sn*-glycérol, il est nécessaire de le synthétiser.

La synthèse, reportée dans la figure 2.3, a été adaptée à partir de la méthode utilisée par Nyilas (Nyilas, 1997).



(a) TBDPS-Cl, Imidazole, THF, 16h, TA ; (b) AcOH 90% dans H₂O, 10 min, 115°C; (c) Acide oléique, DCC, DMAP, DCM, 2h, TA ; (d) TBAF 1M dans THF, AcOH, 15 min, 0°C plus 16h, TA.

Figure 2.3. Synthèse du 1,2-dioleoyl-*sn*-glycérol.

L'hydroxyle en position 3 de l'1,2-isopropylidene-*sn*-glycérol est protégé avec un groupement *ter*-butyl-diphényl-silyl-éther (TBDPS). Le choix de ce groupement protecteur a été fait par rapport à la maîtrise de ce genre de protection normalement utilisée pour la protection des hydroxyles des nucléosides.

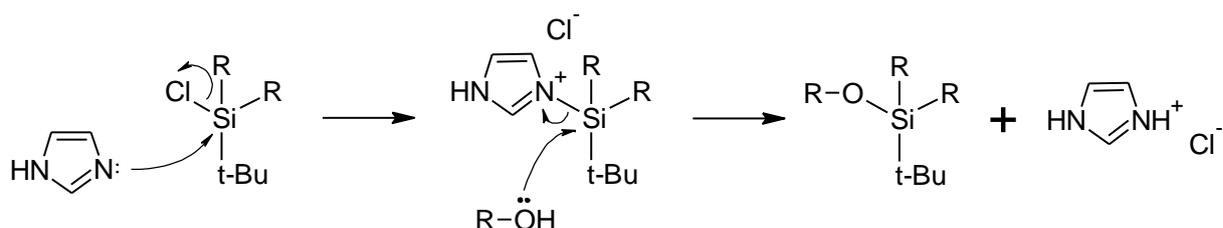


Figure 2.4. Mécanisme de protection d'un alcool avec un groupement silylé.

Le TBDPS a été sélectionné comme groupement protecteur, par rapport au plus communément utilisé *ter*-butyl-diméthyl-silyl-éther (TBDMS), parce que ce dernier est plus sensible aux conditions acides nécessaires pour déprotégera l'acétonide dans l'étape suivante. Le mécanisme est montré sur la figure 2.4.

Le clivage de l'acétonide, qui est une réaction quantitative, est effectué dans des conditions acides par une solution aqueuse d'acide acétique à 90% à 115°C pendant 10 min. Le mécanisme est présenté sur la figure 2.5.

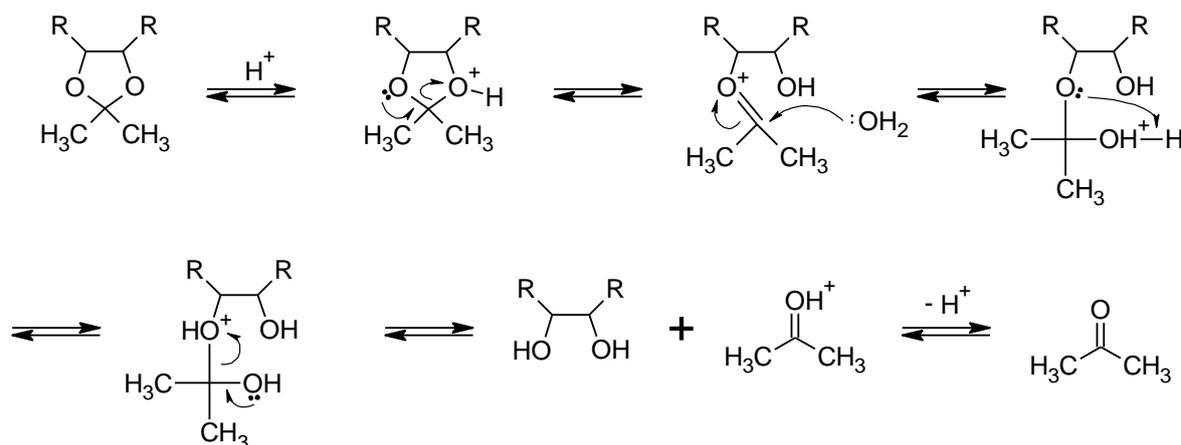


Figure 2.5. Mécanisme de déprotection de l'acétonide.

L'étape suivante correspond au couplage avec les chaînes d'acides gras grâce à la formation des esters entre l'acide oléique et les hydroxyles du produit **6**. La méthode utilisée est l'estérification de Steglich (Höfle et al., 1978) et consiste dans l'utilisation de la N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) comme réactif de couplage en présence de 4'-N,N-diméthylaminopyridine (DMAP) comme catalyseur. Le mécanisme est montré dans la figure 2.6.

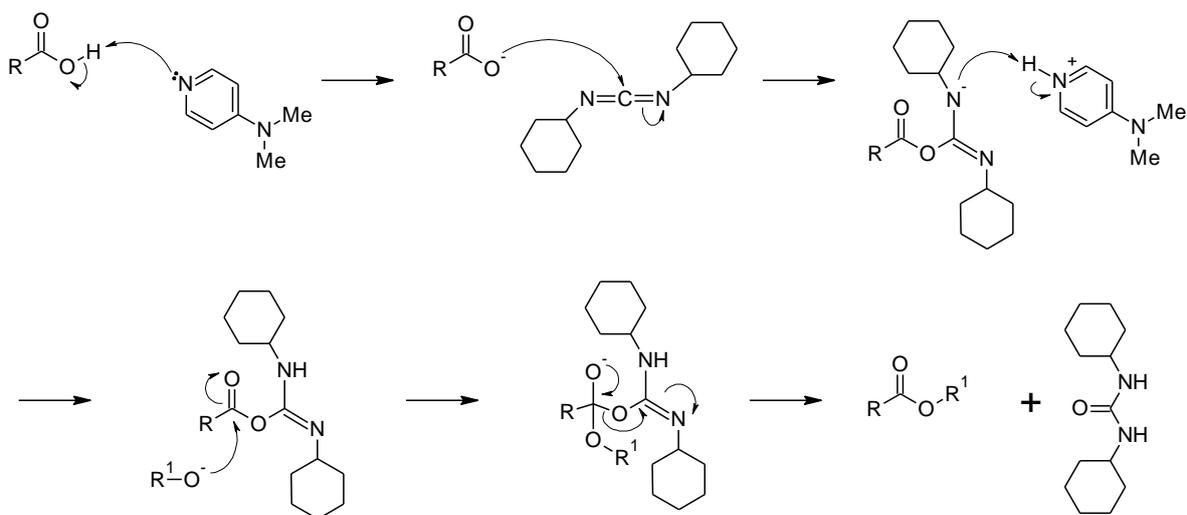


Figure 2.6. Mécanisme de l'estérification de Steglich.

L'acide carboxylique réagit avec la DCC pour former une O-acyl-urée, qui est plus réactive que l'acide libre. L'alcool attaque alors cet intermédiaire pour former l'ester attendu et la dicyclohexylurée (DCU). La DCU n'est pas soluble dans le DCM et peut facilement être filtrée à la fin de la réaction. Le DMAP est une base qui sert à éviter le 1,3-rearrangement de l'intermédiaire O-acyl-urée vers la N-acyl-urée. La DMAP réagit rapidement avec l'O-acyl-urée pour former un réactif capable de transférer les groupes acyles vers l'alcool.

L'étape finale consiste à déprotéger l'hydroxyle en position 3 du glycérol. Le clivage des éthers de silyle peut être aisément effectué à l'aide d'ions fluorure (F^-). Une source d'ions F^- soluble dans les solutions organiques très utilisée est le fluorure de tétra-n-butylammonium (TBAF) en solution dans le THF. Le mécanisme de la déprotection est présenté sur la figure 2.7.

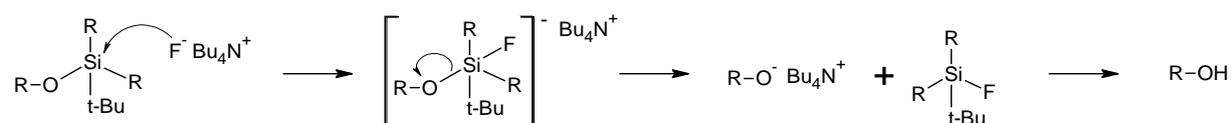


Figure 2.7. Mécanisme de déprotection des éthers de silyle par TBAF.

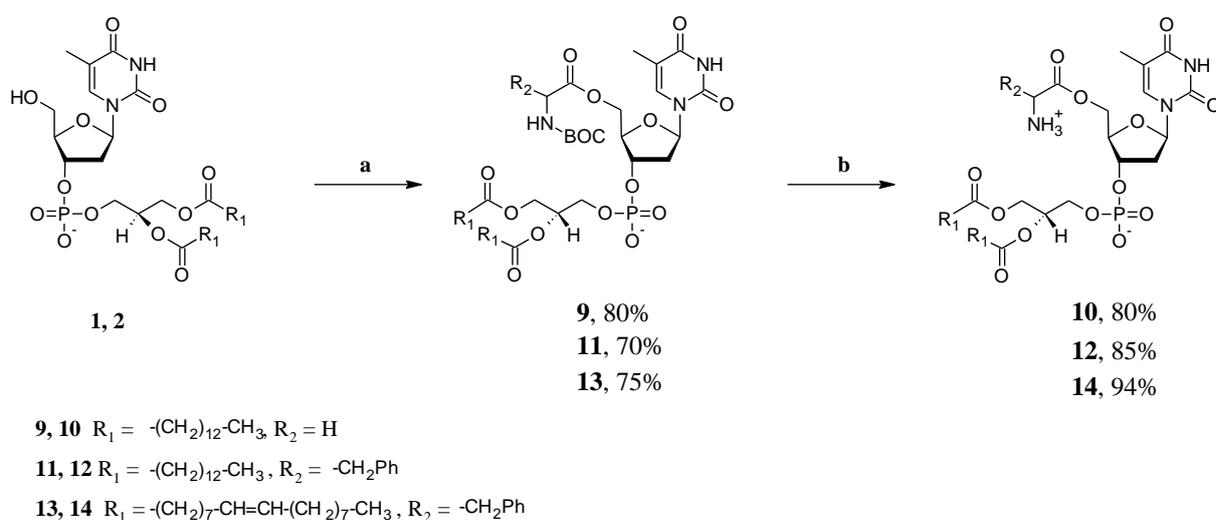
Le F^- a une grande affinité pour le silicium, la liaison Si-F est beaucoup plus forte que la liaison Si-O (Si-F 142 kcal/mol ; Si-O 112 kcal/mol). Cela explique l'efficacité de cette réaction. L'attaque nucléophile de F^- sur le silicium conduit à la formation d'intermédiaire pentavalent grâce à l'hybridation des orbitales d du fluor. Le rôle de l'acide acétique est de reprotonation de l'alcoolate pour éviter l'hydrolyse des esters. La déprotection est efficace, cependant cette étape reste assez délicate. Il a été reporté dans la littérature (Kodali et al., 1990) la possibilité de la migration de l'acyle de sn-1,2-diacylglycérols vers les 1,3-diacylglycérols, cela probablement dû à la réactivité de l'alcool primaire par rapport à l'alcool secondaire. Cette migration peut être facilitée en présence de solvants polaires ou en présence de silice. Pour cette raison, après purification par chromatographie par exclusion de taille sur colonne LH20, il est nécessaire d'utiliser le produit assez rapidement pour le couplage avec le nucléoside phosphoramidite. Dans le cas de la présence des deux isomères, la réactivité des deux groupes hydroxyles n'est pas la même. L'isomère sn-1,2 possède un alcool primaire, par contre l'isomère sn-1,3 possède un alcool secondaire. Si on n'utilise pas un gros excès d'alcool pour la réaction de couplage, il est possible d'obtenir le seul produit demandé.

2.4 Synthèse des amino-acide-5'-nucléotide-3'-lipides (ANLs)

Le couplage avec un peptide des NLs n'est pas une opération facile à cause de la complexité structurale de ces molécules. La présence de différentes sous unités, en particulier la liaison ester entre les chaînes lipidiques et le glycérol. Pour ces raisons avant de tenter de coupler directement le peptide avec le NL, une première série de couplages a été réalisée avec une sous unité de type acide aminé. Ce type de couplage conduit à des dérivés ANLs originaux. Cette approche préliminaire qui correspond à une étape de validation de la méthode de synthèse, permet également d'évaluer l'impact de la présence d'un aminoacide sur les propriétés d'auto assemblages. Le choix de l'acide aminé à coupler en premier a été fait par

rapport aux acides aminés présents dans le peptide FQGII décrit dans le chapitre 1.5. Parmi ces acides aminés (Phe, Gln, Gly, Ile) nous avons sélectionné d'abord la glycine, parce que cet acide aminé est le plus simple.

Pour lier l'acide aminé avec l'alcool en position 5' du sucre des NLs, il était possible d'utiliser soit la partie carboxylique et former ainsi un ester soit utiliser la partie amine pour former un amide. Nous avons gardé la même idée que dans le cas du peptide qui est couplé par l'extrémité C-terminale avec l'extrémité N-terminale libre. L'idée alors était de former un ester en utilisant des acides aminés protégés sur l'amine par un carbamate tert-butoxycarbonyle (BOC) et donc avec le groupe carboxyle disponible pour l'estérification. De plus cela pourrait conduire à la formation d'un produit zwitterionique au lieu d'un produit anionique, qui pourrait présenter des intéressantes propriétés d'auto-assemblage. La synthèse est représentée dans la figure 2.8.



(a) Boc-Gly-OH ou Boc-Phe-OH, DCC, DMAP, DCM, 16h, TA ; (b) TFA 50% dans DCM, 4h, TA.

Figure 2.8. Synthèse des ANLs.

Le choix d'utiliser un groupement protecteur BOC a été fait car sa déprotection est réalisée en conditions acides. Des conditions proches à la déprotection du groupe DMT, comment vu précédemment (sous-chapitre 2.2.2). Avec cette stratégie les esters entre les chaînes lipidiques et le glycérol ne sont pas clivés dans ces conditions.

La synthèse est réalisée en deux étapes : a) couplage avec l'acide aminé protégé par le BOC sur l'amine pour former les produits intermédiaires (**9, 11, 13**) puis b) déprotection du BOC pour l'obtention des produits finaux (**10, 12, 14**). La méthode d'estérification utilisée est la méthode écrite dans le sous-chapitre précédent (2.3.3) en utilisant le couple DCC / DMAP. Le produit intermédiaire peut être isolé et purifié. Cet intermédiaire est caractérisé par spectroscopie RMN et de masse. La purification est réalisée par chromatographie sur gel de silice et exclusion de taille. La présence du groupement BOC sur l'amine augmente la lipophilie du composé ce qui se traduit par une plus grande facilité de manipulation par rapport au produit final déprotégé.

La déprotection du carbamate BOC se fait en conditions acides par une solution d'acide trifluoracétique (TFA, 50%) dans le DCM.

La réaction est quantitative et rapide. Le mécanisme est présenté sur la figure 2.9.

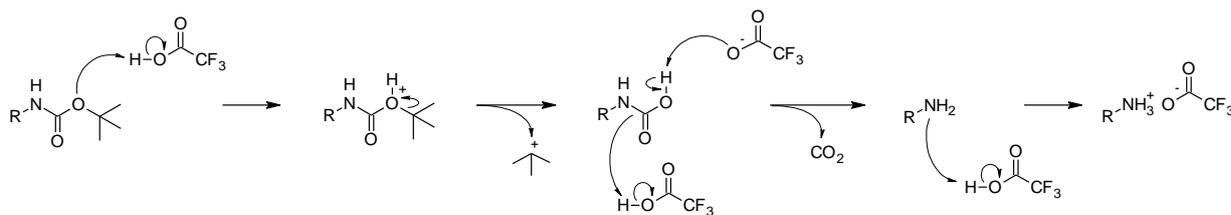


Figure 2.9. Mécanisme de la déprotection du BOC.

Après protonation du carbamate, il y a élimination du cation tert-butyle qui peut être piégé ou, après déprotonation former l'isobutyle. L'acide carbamique formé se décarboxyle et conduit à la formation de l'amine libre. En condition acide l'amine se protone et forme un sel avec le TFA. Après évaporation des solvants pour éliminer l'excès de TFA, la purification se fait sur colonne d'exclusion de taille. A cause de la présence de l'amine libre et du groupe phosphate, le produit est fortement retenu et migre difficilement sur plaques CCM. Il est nécessaire d'utiliser de la TEA pour neutraliser la silice et diminuer sa polarité. Pour la caractérisation du produit final, les spectres RMN, ont été enregistrés à 50°C dans des solvants polaires comme le DMSO-d6 ou la pyridine-d5. L'analyse des spectres RMN nous montre l'absence de TFA dans les produits finaux et la présence de TEA. La formation d'un zwitterion entre l'amine de l'acide aminé et le phosphate n'est pas réalisée.

La figure 2.10 montre le spectre RMN ¹H du diC14-dT-Phe, l'analyse des pics et l'acquisition de spectres complémentaires de RMN bidimensionnelle ¹H de type COSY (non présenté) ont permis d'identifier les pics de la phénylalanine et montrer la formation du produit final.

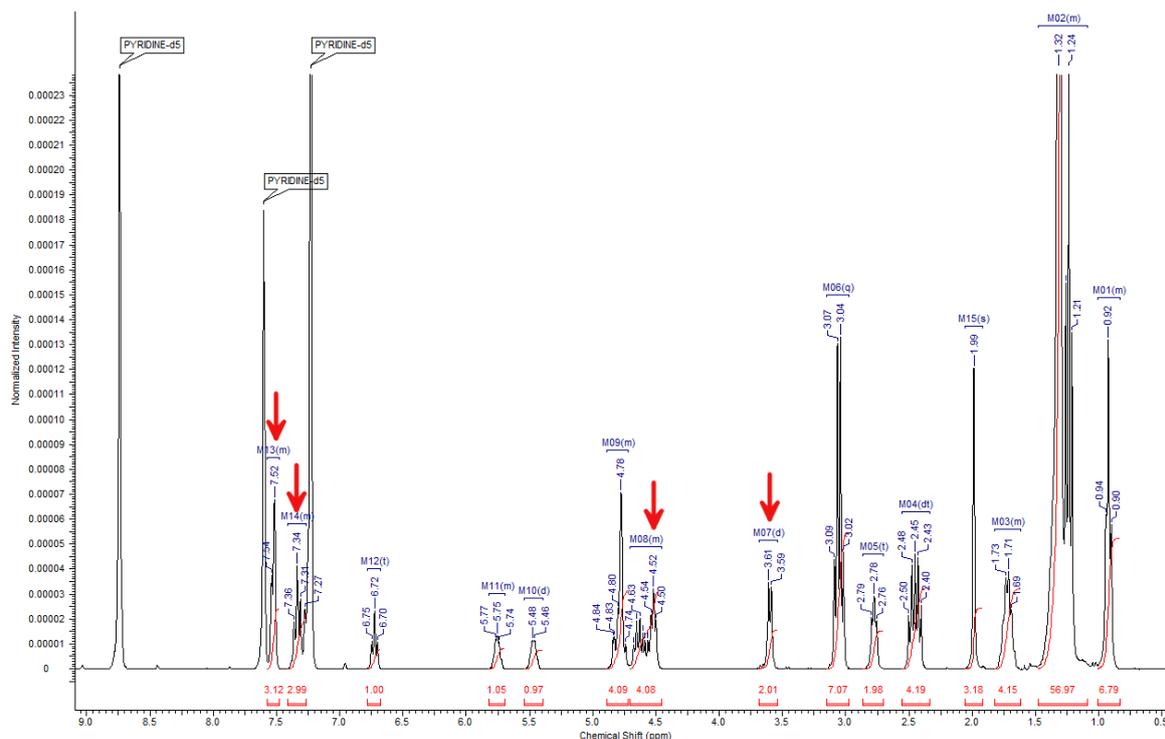


Figure 2.10. Spectre RMN ¹H pour le diC14-dT-Phe dans la pyridine-d5.

L'analyse détaillée du spectre est reportée dans la partie expérimentale. Le signal à 3.60 ppm se présente sous forme de doublet ($J=6.6$ Hz) et correspond à la résonance des protons du CH_2 α , le massif observé entre 4.50 et 4.70 ppm contient le CH et les signaux entre 7.30 et 7.55 ppm correspondent au phényle.

La figure 2.11 montre le spectre RMN ^{13}C pour le diC14-dT-Phe, l'analyse des pics et l'acquisition de spectres complémentaires de ^{13}C DEPT ont permis d'identifier les pic correspondent à la formation de l'ester entre le groupe carboxylique de la phénylalanine, 171.51 ppm et les pics correspondent au CH_2 , 39.19 ppm et au CH, 56.91 ppm. Les pic correspondent au phényle sont également identifiés, 128.82 ppm (p), 130.25 ppm (o), 131.33 ppm (m) et 137.39 ppm (quaternaire).

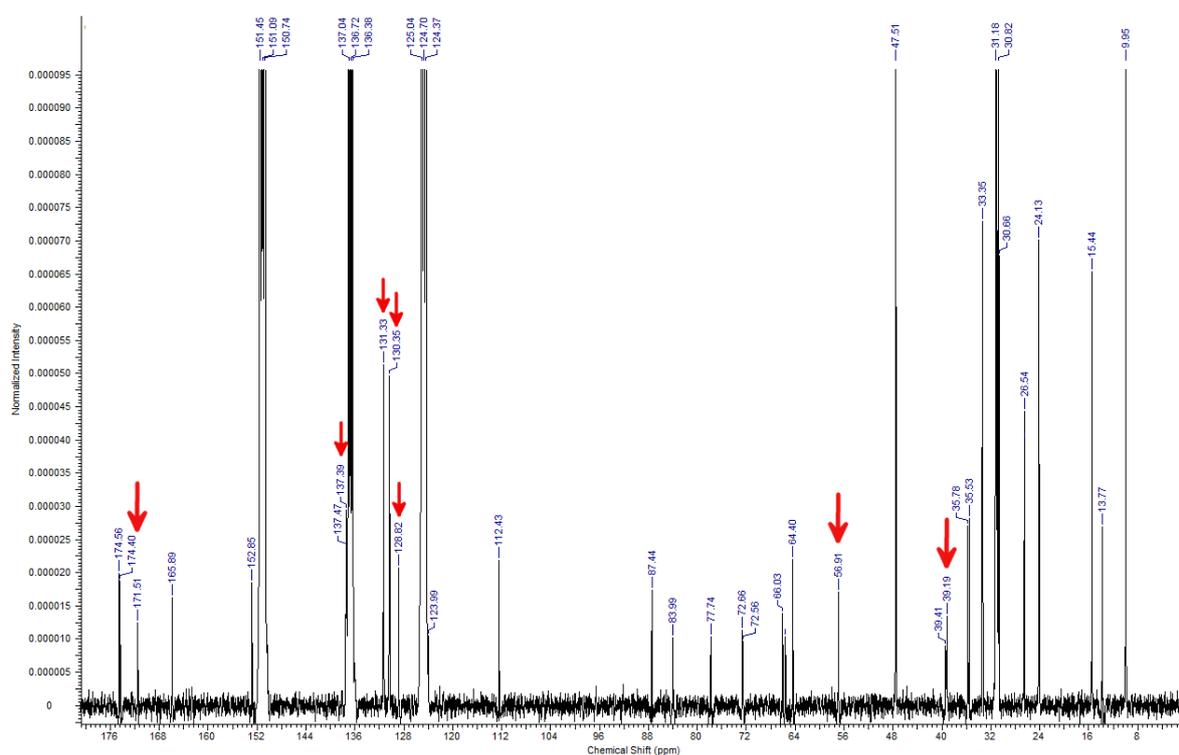


Figure 2.11. Spectre RMN ^{13}C pour le diC14-dT-Phe dans la pyridine-d5.

2.4.1 Synthèse de diC14-dT-Gly, 12

Le diC14-dT-Gly a été le premier ANL synthétisé. L'étape la plus délicate a été sa purification. Plusieurs problèmes liés au choix des éluants et du type de colonne ont été rencontrés. Des premières expériences nous ont permis de conclure que la liaison ester entre la glycine et le diC14-dT était fragile.

La rupture de la liaison ester dans les conditions de purification peut être expliquée par une réaction de transesterification dû à la présence de MeOH et de silice. Cette rupture a été expliquée suite aux expériences HPLC. La figure 2.12 montre les profils HPLC obtenus pour

le diC14-dT dans le MeOH et pour deux solutions diC14-dT-Gly dans deux solvants différents (Eau et MeOH).

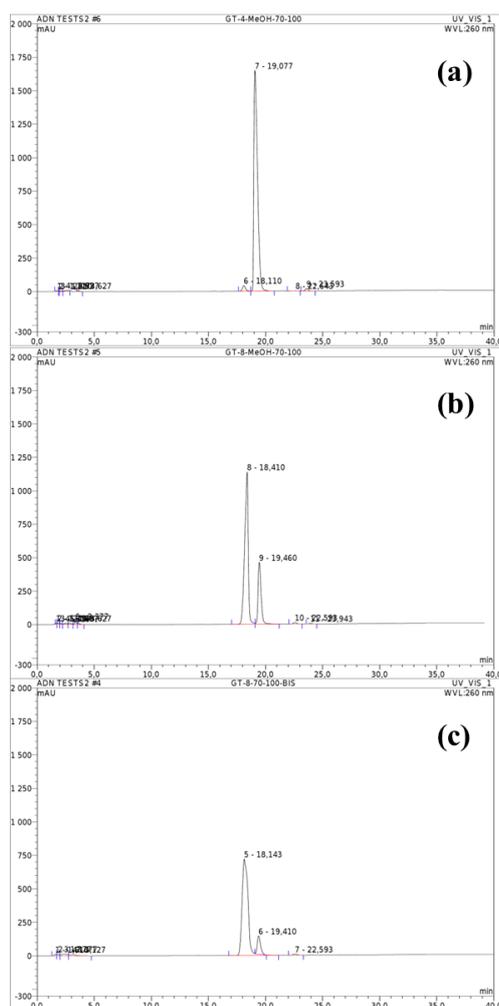


Figure 2.12. Profils HPLC pour diC14-dT dans le MeOH (a) et diC14-dT-Gly dans le MeOH (b) et dans l'eau (c).

Les profils HPLC ont été obtenus en utilisant une colonne en phase inverse de type C4 avec un gradient de deux éluants (A : 95% tampon TEA/AcOH pH 7, 5% acétonitrile ; B : 20% tampon TEA/AcOH pH 7, 80% acétonitrile) entre 70% B → 100% B. L'analyse des profils HPLC révèle la présence de deux pics, qui correspondent aux produit ANL et son analogue clivé. Le poids relatif des deux pics peut changer en fonction des solubilités différentes dans les deux solvants. Après incubation du produit pendant 5 jours une nouvelle analyse HPLC a été réalisée. Les résultats obtenus sont montrés sur la figure 2.13.

On observe sur le profil du diC14-dT-Gly en solution dans le MeOH (figure 2.13b) la présence d'un seul pic qui correspond au produit clivé (diC14-dT). Cela a été confirmé par co-injection des deux solutions (diC14-dT + diC14-dT-Gly). Par contre on notera que le diC14-dT-Gly en solution dans l'eau a très peu évolué (figure 2.13c).

Pour essayer d'évaluer si ce problème de stabilité était lié à la présence d'un acide aminé ou à la nature de son résidu, un dérivé de la phénylalanine a été synthétisé.

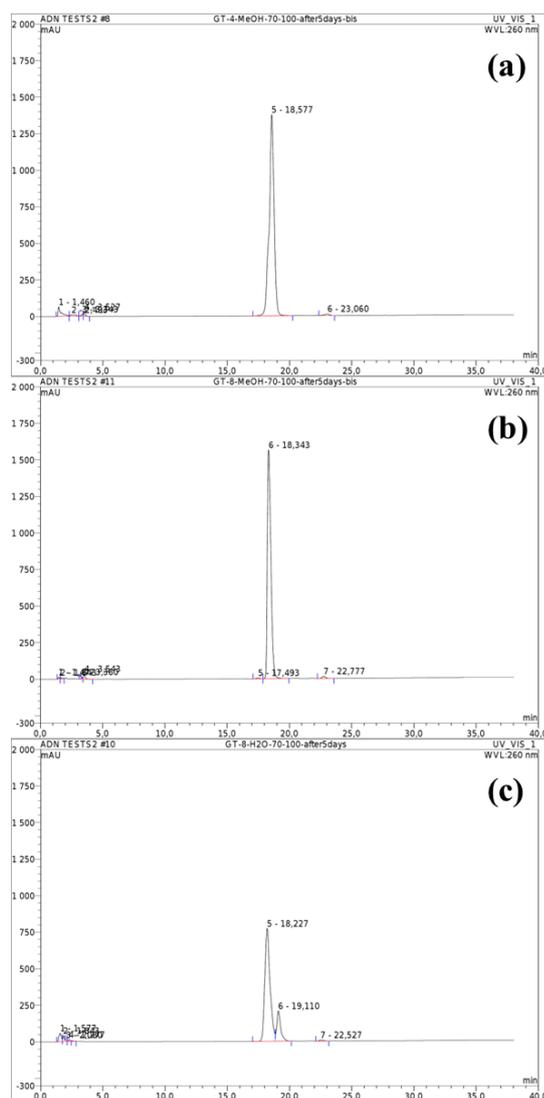


Figure 2.13. Profils HPLC pour les solutions après 5 jours d’incubation du diC14-dT dans le MeOH (a) et diC14-dT-Gly dans le MeOH (b) et dans l’eau (c).

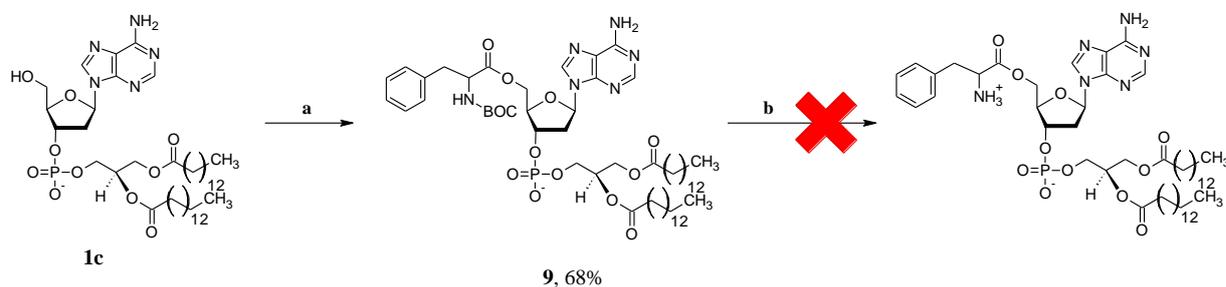
Cela nous a conduit à la synthèse des dérivés phénylalanine des NLs. Ces dérivés se sont révélés plus stables et donc plus faciles à purifier. L’hypothèse qui peut être formulée correspond à la présence d’un encombrement stérique provenant du cycle aromatique de la phénylalanine, qui rendrait moins accessible l’ester. Le choix de la phénylalanine a été fait car c’est le premier acide aminé dans la séquence du peptide FQGII.

En outre la présence d’un noyau aromatique pourrait jouer un rôle dans les interactions hydrophobes et de type π -stacking avec les acides nucléiques.

2.4.2 Synthèse de diC14-dA-Boc-Phe, 15 et de diC14-dA-Phe

Les ANLs synthétisés possèdent tous la thymine comme base azotée. Il nous a paru intéressant de préparer des dérivés de l’adénine. La présence de l’adénine au niveau de la tête polaire pourrait conduire à des interactions plus fortes avec les acides nucléiques, comme montré sur d’autres nucléolipides étudiés au laboratoire (Patwa et al., 2013).

La possibilité de disposer des deux dérivés avec les bases azotées complémentaires (thymine et adénine) pourrait être utilisée pour préparer des mélanges et donc fournir des informations supplémentaires sur les propriétés d'auto-assemblage et d'interaction de ces molécules. La synthèse est représentée sur la figure 2.14.



(a) Boc-Phe-OH, DCC, DMAP, DCM, 16h, TA ; (b) TFA 50% dans DCM, 4h, TA.

Figure 2.14. Synthèse des dérivés adénine des NL et ANLs.

La première étape qui conduit à la formation du produit diC14-dA-Boc-Phe (**15**) utilise la même stratégie de synthèse utilisée et discuté pour les autre ANLs. La présence du groupe amino de l'adénine pouvait gêner la réaction et conduire à la formation de produit d'addition en présence de DCC et DMAP. Cela ne s'est pas vérifié et la purification a été effectuée par chromatographie sur colonne de silice et d'exclusion de taille sur colonne LH20. Les purifications sont toujours des étapes importantes pour ce type de produit qui sont amphiphiles et qui migrent difficilement sur gel de silice.

Il a été impossible d'obtenir le produit final attendu à cause d'une dégradation dans les conditions de déprotection du BOC déjà utilisées pour obtenir les autres ANLs. La formation d'un milieu réactionnel coloré en brun foncé a été observé. Cette coloration pourrait être expliquée par des réactions de dépurination de l'adénine dans des conditions acides par le TFA (50% dans DCM).

2.5 Partie expérimentale

2.5.1 Matériels et méthodes

Tous les matériaux de départ et les solvants sont des produits commerciaux et ils ont été utilisés sans purification supplémentaire.

Les réactions ont été suivies per chromatographie sur couche mince (CCM) avec un gel de silice Merck 60 F₂₅₄ déposé sur plaque d'aluminium de 0.25 mm d'épaisseur. Les composés sont visualisés par irradiation UV à la longue d'onde de 254 nm. Le révélateur utilisé était une solution éthanolique d'acide sulfurique (5 ml EtOH et 5 ml acide sulfurique) suivi d'un chauffage à 150°C.

Les composés ont été purifiés par chromatographie séparative en utilisant deux types de méthodes :

- Chromatographie liquide de type « flash » (Biotage) sur colonne de gel de silice Merck 60 (taille des particules : 45 µm) ;
- Chromatographie liquide à exclusion de taille sur colonne Sephadex LH-20 en utilisant comme éluant un mélange de dichlorométhane (DCM) : méthanol (MeOH), 50 : 50.

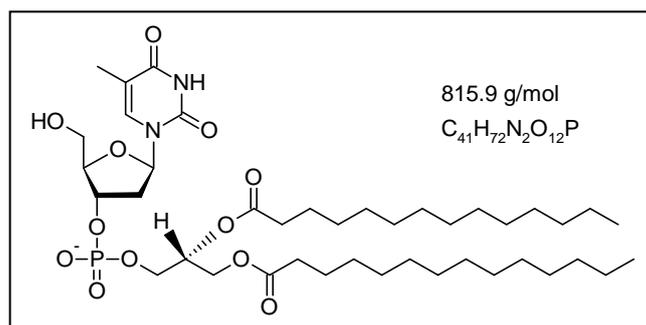
Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton (¹H), du carbone (¹³C) et du phosphore (³¹P) de tous les composés ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance DPX-300 MHz. Les déplacements chimiques sont donnés en parties par million (ppm) par rapport au tétraméthylsilane, pris en référence. Les constantes de couplage, J, sont exprimées en Hz. Les solvants deutérés utilisés sont le CDCl₃, le DMSO-d₆ et la pyridine-d₅.

Les spectres de masse à haute résolution ont été enregistrés, pour tous les produits finaux, sur un appareil Qstar Elite (Applied Biosystems) près le Centre d'Etude Structurale et d'Analyse des Molécules Organiques (CESAMO) de l'université de Bordeaux 1. Les échantillons ont été introduits par électrospray (ESI) en polarité négative (-) ou positive (+) et analysés par un analyseur hybride Q-TOF (quadripôle/temps de vol).

L'analyse par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) a été conduite sur un appareil VWR Hitachi avec comme détecteur une photodiode L-2455. La détection est faite par mesure d'absorbance à 260 nm. La phase mobile est un gradient entre deux éluants A (tampon AcOH/TEA pH 7 95%, ACN 5%) et B (tampon AcOH/TEA pH 7 20%, ACN 80%). Le gradient utilisé était 70% B → 100% B dans 30 minutes.

2.5.2 Synthèse des nucléotides-3'-lipides (NLs)

Thymidine 3'-(1,2-Dimiristoyl-sn-glycero-3-phosphate), diC14-dT, 1



Le 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-deoxythymidine-3'-O-[O-(2-cyanoéthyle)-N,N-diisopropyl-phosphoramidite] (2 g, 1 équiv, 2.69 mmol) et le 1,2-dimiristoyl-sn-glycérol (1.8 g, 1.3 équiv, 3.5 mmol) sont solubilisés dans 10 ml de THF anhydre sous argon. La solution de tétrazole dans l'acétonitrile (0.45M, 8 ml, 1.3 équiv, 3.5 mmol) est alors ajoutée, la formation d'un précipité est observée, et le mélange réactionnel est agité pendant 16 h à température ambiante. L'étape d'oxydation est réalisée après ajout d'une solution d'iode (I_2 0.02 M dans THF/Pyr/ H_2O , 140 ml, 1.1 équiv) jusqu'à ce que la coloration jaune persiste. Après 6 h à température ambiante, le solvant est évaporé sous pression réduite, les produits intermédiaires sont alors solubilisés dans 50 ml d'acétate d'éthyle (AcOEt) et lavés avec 2 fois 25 ml d'une solution saturée de $Na_2S_2O_3$, la phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et évaporée. Les produits récupérés sont solubilisés dans 20 ml de DCM anhydre et 1 ml de TCA est ajouté sous argon, on observe une coloration orange foncé. Après 4 h à température ambiante, on ajoute 10 ml de MeOH, on observe un changement de coloration orange foncé vers orange clair, 25 ml de solution saturée de $NaHCO_3$, on observe un virage de coloration orange clair vers jaune, 30 ml de DCM et on procède à l'extraction de la phase aqueuse avec 2 fois 25 ml de DCM. Les phases organiques sont alors réunies, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et le solvant est évaporé. Les produits sont solubilisés dans 6 ml de DCM anhydre et 6 ml de TEA et agités pendant 16 h à température ambiante. Le solvant alors est évaporé et le produit est purifié par chromatographie liquide sur colonne de gel de silice (éluant : DCM/MeOH/TEA, gradient 96/2/2 vers 88/10/2) pour obtenir une poudre légèrement jaunâtre (1.27 g ; Rendement : 58%).

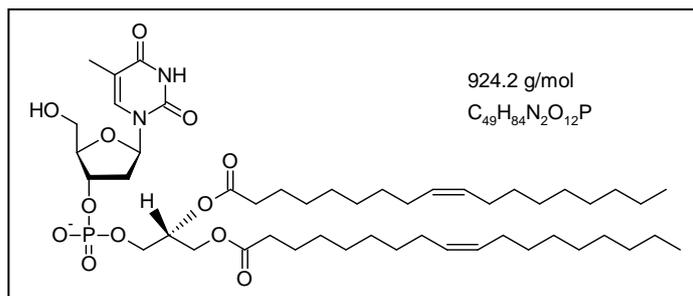
1H NMR (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0.89 (t, $J=6.5$ Hz 6H CH_3 chaines) 1.23-1.38 (m, 40H $2CH_2$ chaines + 9H $3CH_3$ TEA) 1.53-1.64 (m, 4H $2CH_2$ chaines) 1.93 (s, 3H, CH_3 base) 2.04-2.39 (m, 5H $2CH_2$ chaines + H 2' sucre) 2.45-2.57 (m, 1H 2' sucre) 3.09 (q, $J=7.2$ 6H $3CH_2$ TEA) 3.77-4.42 (m, 7H $2CH_2$ glycérol + 1H 4' 2H 5' sucre) 4.85-4.97 (m, 1H 3' sucre) 5.22-5.29 (m, 1H glycérol) 6.2(t, $J=6.2$ 1H 1' sucre) 7.55 (s, 1H base)

^{13}C NMR (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm 8.59 (3C $3CH_3$ TEA) 12.58 (1C CH_3 base) 14.12 (2C CH_3 chaines) 22.70 (2C CH_2 chaines) 24.91 (2C CH_2 chaines) 29.13-29.80 (14C CH_2 chaines) 31.93 (4C CH_2 chaines) 34.22-34.30 (2C CH_2 chaines) 39.08 (1C CH_2 2' sucre) 45.74 (3C $3CH_2$ TEA) 61.93 (1C CH_2 glycérol) 62.62 (1C CH_2 glycérol) 63.56 (1C CH_2 5'sucre) 70.26 (1C CH glycérol) 74.07 (1C CH 4' sucre) 84.60 (1C CH 3' sucre) 85.64 (1C CH 1' sucre)

110.8 (1C base) 136.08 (1C base) 150.21 (1C C=O base) 163.58 (1C C=O base) 173.09 (1C ester chaines) 173.52 (1C ester chaines)
³¹P NMR (121MHz, CDCl₃) δ ppm 2.84

ESI MS [M – H]⁻ : théorique = 815.482, observé= 815.481

Thymidine 3'-(1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphate), diC18:1-dT, 2



Le 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-deoxythymidine-3'-O-[O-(2-cyanoéthyle)-N,N-diisopropyl-phosphoramidite] (2 g, 1 équiv, 2.69 mmol) et le 1,2-oleoyl-sn-glycérol (2.5 g, 1.5 équiv, 4.0 mmol) sont solubilisés dans 10 ml de THF anhydre sous argon. La solution de tétrazole dans l'acétonitrile (0.45M, 8 ml, 1.3 équiv, 3.5 mmol) est alors ajoutée, on observe la formation d'un précipité, et le mélange réactionnel est agité pendant 16 h à température ambiante. On procède alors à l'étape d'oxydation et la solution d'iode (I_2 0.02 M dans THF/Pyr/ H_2O , 140 ml, 1.1 équiv) est ajoutée jusqu'à coloration jaune persistante. Après 6 h à température ambiante, le solvant est évaporé sous pression réduite, les produits intermédiaires sont alors solubilisés dans 50 ml d'acétate d'éthyle (AcOEt) et lavés 2 fois 25 ml avec une solution saturée de $Na_2S_2O_3$, la phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et évaporée. Les produits récupérés sont solubilisés dans 20 ml de DCM anhydre et 0.5 ml de TCA est ajouté sous argon, on observe une coloration orange foncé. Après 4 h à température ambiante, on ajoute 10 ml de MeOH, on observe un virage de coloration orange foncé vers orange claire, 25 ml de solution saturée de $NaHCO_3$, on observe un virage de coloration orange claire vers jaune, 30 ml de DCM et on procède à l'extraction de la phase aqueuse avec 2 fois 25 ml de DCM. Les phases organiques sont alors réunies, séchée sur Na_2SO_4 , filtrées et le solvant est évaporé. Les produits sont solubilisés dans 3 ml de DCM anhydre et 7 ml de TEA et agités pendant 16 h à température ambiante. Le solvant alors est évaporé et le produit est purifié par chromatographie liquide sur colonne de gel de silice (éluant : DCM/MeOH/TEA, gradient 96/2/2 vers 88/10/2) pour obtenir une poudre légèrement jaunâtre (1.45 g ; Rendement : 60%).

1H NMR (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0.87 (t, $J=6.5$ Hz 6H CH_3 chaines) 1.23-1.38 (m, 40H $2CH_2$ chaines + 9H $3CH_3$ TEA) 1.53-1.64 (m, 4H $2CH_2$ chaines) 1.93 (s, 3H, CH_3 base) 1.96-2.04 (m 8H CH_2 chaines) 2.24-2.39 (m, 5H $2CH_2$ chaines + H 2' sucre) 2.45-2.57 (m, 1H 2' sucre) 3.02-3.14 (m, 6H $3CH_2$ TEA) 3.77-4.42 (m, 7H $2CH_2$ glycérol + 1H 4' 2H 5' sucre) 4.85-4.97 (m, 1H 3' sucre) 5.22-5.29 (m, 1H glycérol) 5.31-5.37 (4H $CH=CH$ chaines) 6.2(t, $J=6.2$ 1H 1' sucre) 7.59 (s, 1H base)

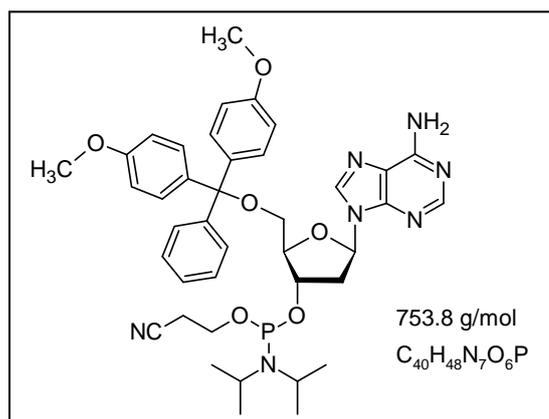
^{13}C NMR (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm 8.61 (3C $3CH_3$ TEA) 12.62 (1C CH_3 base) 14.15 (2C CH_3 chaines) 22.70 (2C CH_2 chaines) 24.86 (2C CH_2 chaines) 27.20-27.23 (4C CH_2 chaines) 29.13-29.80 (14C CH_2 chaines) 31.93 (4C CH_2 chaines) 34.06-34.24 (2C CH_2 chaines) 38.98 (1C CH_2 2' sucre) 45.74 (3C $3CH_2$ TEA) 61.93 (1C CH_2 glycérol) 62.59 (1C CH_2 glycérol) 63.56 (1C CH_2 5'sucre) 70.22 (1C CH glycérol) 74.31 (1C CH 4' sucre) 84.71 (1C CH 3' sucre) 85.70 (1C CH 1' sucre) 110.8 (1C base) 129.70 (4C $CH=CH$ chaines) 136.16 (1C base)

150.29 (1C C=O base) 163.70 (1C C=O base) 173.09 (1C ester chaines) 173.52 (1C ester chaines)

^{31}P NMR (121MHz, CDCl_3) δ ppm 2.64

ESI MS $[\text{M} - \text{H} + 2\text{Na}]^+$: théorique = 969.8, observé= 969.5

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-deoxyadenosine-3'-O-[O-(2-cyanoéthyle)-N,N-diisopropylphosphoramidite], 3



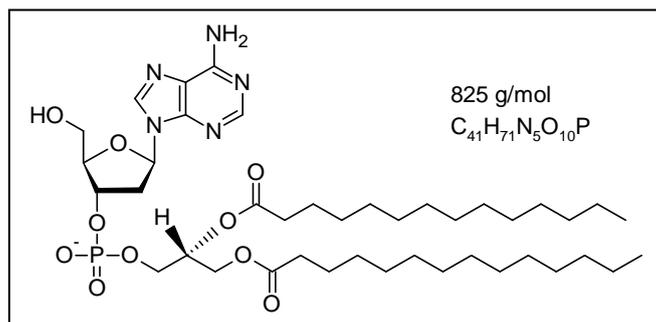
Le N₆-benzoyl-5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-deoxyadenosine-3'-O-[O-(2-cyanoéthyle)-N,N-diisopropyl-phosphoramidite] (1 g, 1 équivalent, 1.17 mmol) a été additionné à une solution de méthylamine (CH₃NH₂, 2M dans THF, 10 ml) sous argon. Après 2 h à température ambiante, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu a été purifié par chromatographie liquide sur colonne de gel de silice (éluant : DCM/MeOH/TEA, gradient 98/0/2 vers 88/10/2) pour obtenir les fractions contenant le produit (1.27 g ; Rendement : >95%).

¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ ppm

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ ppm

³¹P NMR (121MHz, CDCl₃) δ ppm 151.4

Adénine 3'-(1,2-Dimiristoyl-sn-glycero-3-phosphate), diC14-dA, 4



Le produit **3** (1 g, 1 équiv, 1.32 mmol) et le 1,2-dimiristoyl-sn-glycérol (0.88 g, 1.3 équiv, 1.72 mmol) sont solubilisé dans 10 ml de THF anhydre sous argon. La solution de tetrazole dans l'acétonitrile (0.45M, 4 ml, 1.3 équiv, 1.72 mmol) est alors ajoutée, on observe la formation d'un précipité, et le mélange réactionnel est agité pendant 16 h à température ambiante. On procède alors à l'étape d'oxydation et la solution d'iode (I_2 0.02 M dans THF/Pyr/ H_2O , 50 ml, 1.1 équiv) est ajoutée jusqu'à coloration jaune persistante. Après 6 h à température ambiante, le solvant est évaporé sous pression réduite, les produits intermédiaires sont alors solubilisés dans 50 ml de acétate d'éthyle (AcOEt) et lavés 2 fois 25 ml avec une solution saturée de $Na_2S_2O_3$, la phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et évaporée. Les produits récupérés sont solubilisés dans 10 ml de DCM anhydre et 0.5 ml de TCA est ajouté sous argon, on observe une coloration orange foncé. Après 4 h à température ambiante, on ajoute 3 ml de MeOH, on observe un virage de coloration orange foncé vers orange clair, 20 ml de solution saturée $NaHCO_3$, on observe un virage de coloration orange clair vers jaune, 20 ml de DCM et on procède à l'extraction de la phase aqueuse avec 2 fois 25 ml de DCM. Les phases organiques sont alors réunies, séchée sur Na_2SO_4 , filtrées et le solvant est évaporé. Les produits sont solubilisés dans 3 ml de DCM anhydre et 7 ml de TEA et agités pendant 16 h à température ambiante. Le solvant alors est évaporé et le produit est purifié par chromatographie liquide sur colonne de gel de silice (éluant : DCM/MeOH/TEA, gradient 95/3/2 vers 88/10/2) pour obtenir une poudre légèrement jaunâtre (0.547 g ; Rendement : 50%).

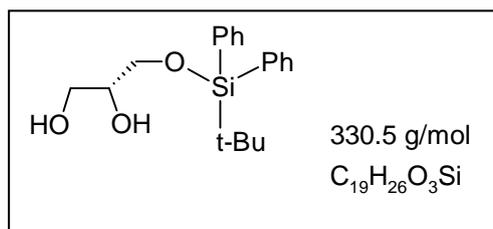
1H NMR (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0.88 (t, $J=6.5$ Hz 6H CH_3 chaines) 1.16-1.42 (m, 40H $2CH_2$ chaines + 9H $3CH_3$ TEA) 1.51-1.70 (m, 4H $2CH_2$ chaines) 2.22-2.38 (m, 4H $2CH_2$ chaines) 2.54-2.68 (m, H 2' sucre) (m,) 3.01-3.18 (m, 7H $3CH_2$ TEA + 1H 2' sucre) 3.78-4.52 (m, 7H $2CH_2$ glycérol + 1H 4' 2H 5' sucre) 5.04-5.16 (m, 1H 3' sucre) 5.20-5.29 (m, 1H glycérol) 6.00(br. s NH_2 base) 6.36 (dd, $J=9.04$, 5.4 1H 1' sucre) 7.95 (s, 1H H2 base) 8.30 (s, 1H H8 base)

^{13}C NMR (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm 8.59 (3C $3CH_3$ TEA) 14.11 (2C CH_3 chaines) 22.67 (2C CH_2 chaines) 24.91 (2C CH_2 chaines) 29.13-29.80 (14C CH_2 chaines) 31.91 (4C CH_2 chaines) 34.09-34.30 (2C CH_2 chaines) 39.43 (1C CH_2 2' sucre) 45.68 (3C $3CH_2$ TEA) 62.67 (1C CH_2 glycérol) 63.41 (1C CH_2 glycérol) 63.54 (1C CH_2 5'sucre) 70.36 (1C CH glycérol) 70.48 (1C CH 4' sucre) 87.41 (1C CH 3' sucre) 88.25 (1C CH 1' sucre) 121.11 (1C base) 140.47 (1C

H8 base) 148.69 (1C base) 152.12 (1C H2 base) 155.73 (1C base) 173.12 (1C ester chaines)
173.47 (1C ester chaines)

^{31}P NMR (121MHz, CDCl_3) δ ppm 2.21

1,2-Isopropylidene-3-O-(tert-butyldiphenylsilyl)-sn-glycérol, **5**



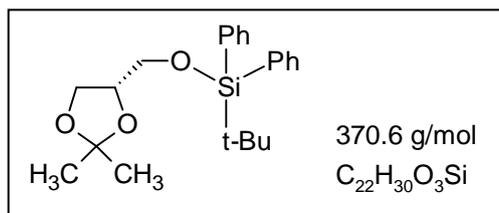
L'imidazole (6.17 g, 2.4 équiv, 90.79 mmol) a été solubilisé dans 15 ml de DMF sous argon, le chlorure de tert-butyldiphénylsilyle (TBDPS-Cl, 12.48 g, 1.2 équiv. 45.4 mmol) et le 1,2-isopropylidene-sn-glycérol (5 g, 1 équiv, 37.83 mmol) ont été ajoutés au milieu réactionnaire. Après 16 h à température ambiante, le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le résidu a été purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : hexane/EtOAc 98/2). On récupère le produit **5** sous forme de un huile (11.5 g ; Rendement : 85%).

¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ ppm 1.09 (s, 9H tert-butyle) 1.38 (s, 3H CH₃ acétonide) 1.42 (s, 3H CH₃ acétonide) 3.61-3.84 (m, 2H CH₂ glycérol) 3.88-4.16 (m, 2H CH₂ glycerol) 4.18-4.34 (m, 1H CH glycérol) 7.34-7.52 (m, 6H phényle) 7.66-7.73 (d, 4H phényle)

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ ppm 19.27 (1C, tert-butyle) 25.51 (1C acétonide) 26.74 (1C acétonide) 26.83 (3C, tert-butyle) 64.60 (1C CH₂ glycérol) 66.86 (1C CH₂ glycérol) 76.11 (1C CH glycérol) 109.2 (1C acétonide) 127.71 (4C phényle, m) 129.73 (2C phényle, p) 133.37 (2C phényle) 135.6 (4C phényle, o)

ESI MS [M + Na⁺]⁺ : théorique =393.5, observé= 393.2

3-O-(tert-butyldiphenylsilyl)-sn-glycérol, 6



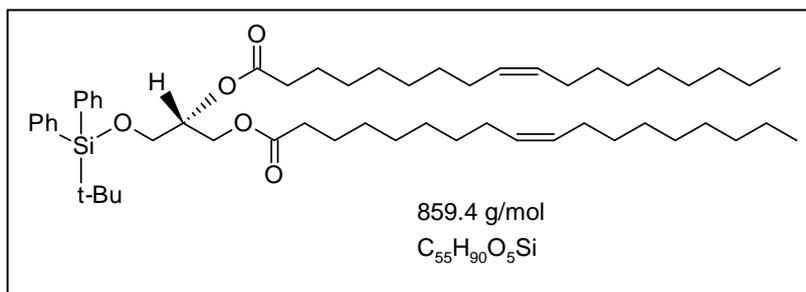
Le composé 5 (11.5 g, 1 équiv, 31.04 mmol) et 100 ml de une solution d'acide acétique (90%) ont été agités dans les conditions de reflux (115°C) pendant 5 minutes. Après la solution a été refroidie à température ambiante et le solvant évaporé sous pression réduite. Le résidu huileux a été utilisé sans purification supplémentaire. (9.5 g ; Rendement : 93%).

1H NMR (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm 1.09 (s, 9H tert-butyle) 3.57-3.89 (m, 5H glycérol) 7.36-7.50 (m, 6H phényle) 7.65-7.72 (d, 4H phényle)

^{13}C NMR (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm 19.26 (1C, tert-butyle) 26.88 (3C, tert-butyle) 63.87 (1C CH_2 glycérol) 65.21 (1C CH_2 glycérol) 71.99 (1C CH glycérol) 127.90 (4C phényle, m) 129.98 (2C phényle, p) 132.89 (2C phényle) 135.57 (4C phényle, o)

ESI MS $[M + Na^+]^+$: théorique = 353.5, observé = 353.2

3-O-(tert-butylidiphenylsilyl)-1,2-dioleoyl-sn-glycérol, 7



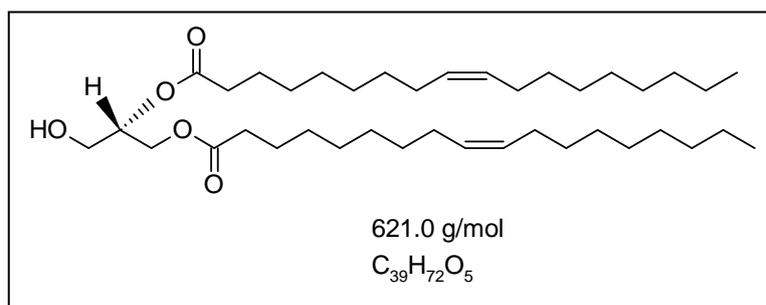
Le composé **6** (9.5 g, 1 équiv, 28 mmol) et l'acide oléique (17.86 g, 2.2 équiv, 63.23 mmol) ont été solubilisés dans 170 ml de DCM anhydre sous argon. La N-N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 17.79 g, 3 équiv, 86.22 mmol) et la 4'-diméthylaminopyridine (DMAP, 3.5 g, 1 équiv, 28.74 mmol) sont additionnées et le milieu réactionnaire est agité pendant 2 h à température ambiante. La dicyclohexylurée (DCU) a été alors filtrée et le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le produit **7** a été obtenu après purification par chromatographie sur gel de silice (éluant : hexane/EtOAc, gradient 100/0 vers 97/3) sous forme de un huile (17.1 g ; Rendement : 70%).

1H NMR (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0.86-0.93 (m, 6H CH_3 chaines) 1.09 (s, 9H tert-butyle) 1.26-1.34 (m, 40H $2CH_2$ chaines) 1.51-1.68 (m, 4H chaines) 1.99-2.06 (m, 8H chaines) 2.22-2.36 (m, 4H chaines) 3.77-3.84 (m, 2H CH_2 glycérol) 4.19-4.46 (m, 2H CH_2 glycérol) 5.15-5.23 (m, 1H CH glycérol) 5.30-5.42 (m, 4H $CH=CH$ chaines) 7.36-7.48 (m, 6H phényle) 7.63-7.71 (d, 4H phényle)

^{13}C NMR (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm 14.16 (2C CH_3 chaines) 19.24 (1C, tert-butyle) 22.72 (2C chaines) 24.89 (2C chaines) 26.72 (3C, tert-butyle) 27.16-27.29 (4C chaines) 29.07-29.84 (m, 18C chaines) 31.94 (4C chaines) 34.14 (1C chaines) 34.33 (1C chaines) 62.30 (1C glycérol) 62.41 (1C glycérol) 71.49 (1C glycérol) 127.78 (4C phényle, m) 129.73 (2C $CH=CH$ chaines) 129.83 (2C phényle, p) 130.02 (2C $CH=CH$ chaines) 133.05 (2C phényle) 135.57 (4C phényle, o) 173.04 (1C ester) 173.44 (1C ester)

ESI MS $[M + Na]^+$: théorique =888.2, observé= 881.6

1,2-dioleoyl-sn-glycérol, DOG, 8



La solution de fluorure de tetra-butyl-N-ammonium dans le THF (1M, 20.46 ml, 4.4 équiv, 20.46 mmol) et l'acide acétique (2.34 ml, 8.8 équiv, 40.92 mmol) sont mélangés dans un bécher avant d'être additionné au composé **7** sous argon à 0°C. Après 15 minutes d'agitation, le bain de glace a été retiré et le milieu réactionnaire a été laissé revenir à la température ambiante et agité pendant 16h. Le contenu du ballon a été alors filtré sur une colonne de silice, en utilisant le THF comme éluant et le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le produit sous forme d'une huile a été rapidement purifié par chromatographie d'exclusion de taille sur colonne LH20 (éluant DCM/MeOH 50/50). (2.9 g ; Rendement : 95%).

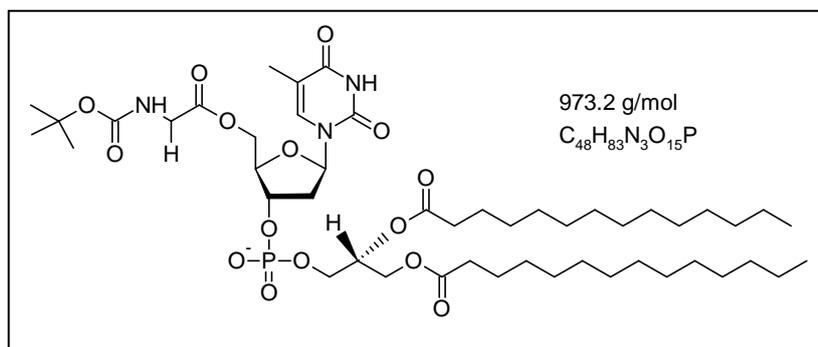
^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ ppm 0.86-0.94 (m, 6H CH_3 chaînes) 1.19-1.39 (m, 40H 2CH_2 chaînes) 1.58-1.69 (m, 4H chaînes) 1.97-2.09 (m, 8H chaînes) 2.29-2.40 (m, 4H chaînes) 3.71-3.784 (m, 2H CH_2 glycérol) 4.21-4.40 (m, 2H CH_2 glycérol) 5.06-5.12 (m, 1H CH glycérol) 5.28-5.45 (m, 4H $\text{CH}=\text{CH}$ chaînes)

^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ ppm 14.11 (2C CH_3 chaînes) 22.69 (2C chaînes) 24.89 (2C chaînes) 27.17 (4C chaînes) 28.78-29.85 (m, 18C chaînes) 31.91 (4C chaînes) 34.09 (1C chaînes) 34.28 (1C chaînes) 61.57 (1C glycérol) 62.01 (1C glycérol) 72.13 (1C glycérol) 129.70 (2C $\text{CH}=\text{CH}$ chaînes) 130.04 (2C $\text{CH}=\text{CH}$ chaînes) 173.40 (1C ester) 173.75 (1C ester)

ESI MS $[\text{M} + \text{Na}^+]^+$: théorique =644, observé= 643.5

2.5.3 Synthèse des acide aminé-5'-nucléotides-3'-lipides (ANLs)

Thymidine 3'-(1,2-Dimiristoyl-sn-glycero-3-phosphate)-5'-(N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-glycine), diC14-dT-Boc-Gly, **9**



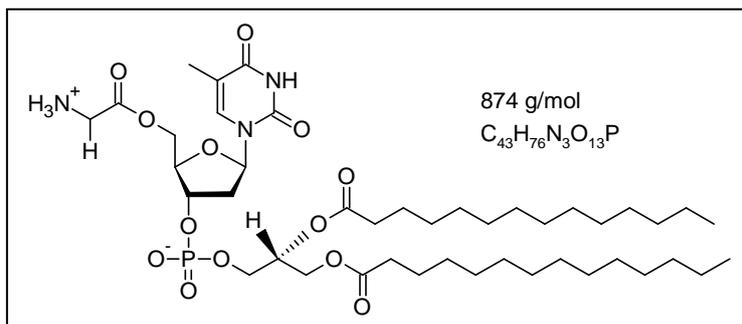
Le composé **1** (0.3 g, 1 équivalent, 0.37 mmol) et la N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-glycine (0.13 g, 2 équivalent, 0.74 mmol) ont été solubilisés dans 10 ml de DCM anhydre sous argon. La N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 0.152 g, 2 équivalent, 0.74 mmol) et la 4'-diméthylaminopyridine (DMAP, 0.025 g, 0.5 équivalent, 0.2 mmol) sont additionnées et le milieu réactionnaire est agité pendant 4 h à température ambiante. La dicyclohexylurée (DCU) a été alors filtrée et le solvant a été évaporé sous pression réduite. Après purification par chromatographie sur gel de silice (éluant : DCM/MeOH/TEA, gradient 98/1/1 vers 89/10/1). Le produit **9** a été obtenu (0.3 g ; Rendement : 80%).

1H NMR (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0.85-0.91 (m, 6H CH_3 chaînes) 1.23-1.48 (m, 40H $2CH_2$ chaînes + 9H $3CH_3$ TEA + 9H $3CH_3$ Boc) 1.53-1.64 (m, 4H $2CH_2$ chaînes) 1.96 (s, 3H, CH_3 base) 2.08-2.39 (m, 5H $2CH_2$ chaînes + H 2' sucre) 2.47-2.64 (m, 1H 2' sucre) 3.03-3.16 (m, 6H $3CH_2$ TEA) 3.92-4.85 (m, 9H $2CH_2$ glycérol + 1H 3' 1H 4' 2H 5' sucre) 4.85-4.97 (m, 1H CH_2 acide aminé) 5.24-5.32 (m, 1H glycérol) 6.3(t, J=6.4 1H 1' sucre) 7.24 (s, 1H base)

^{13}C NMR (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm 8.88 (3C $3CH_3$ TEA) 12.95 (1C CH_3 base) 14.42 (2C CH_3 chaînes) 22.98 (2C CH_2 chaînes) 25.14 (2C CH_2 chaînes) 28.58 (3C CH_3 Boc) 29.23-29.95 (14C CH_2 chaînes) 32.20 (4C CH_2 chaînes) 34.22-34.30 (2C CH_2 chaînes) 38.1 (1C CH_2 2' sucre) 42.74 (1C CH_2 acide aminé) 45.96 (3C $3CH_2$ TEA) 62.96 (1C CH_2 glycérol) 63.5 (1C CH_2 glycérol) 64.81 (1C CH_2 5' sucre) 70.54 (1C CH glycérol) 74.60 (1C CH 4' sucre) 80.21 (1C CH 3' sucre) 84.91 (1C CH 1' sucre) 111.65 (1C base) 135.42 (1C base) 150.72 (1C C=O base) 156.07 (1C C=O Boc) 164.19 (1C C=O base) 170.5 (1C ester acide aminé) 173.09 (1C ester chaînes) 173.52 (1C ester chaînes)

^{31}P NMR (121MHz, $CDCl_3$) δ ppm 2.15

Thymidine 3'-(1,2-Dimiristoyl-sn-glycero-3-phosphate)-5'-L-glycine), diC14-dT-Gly, 10



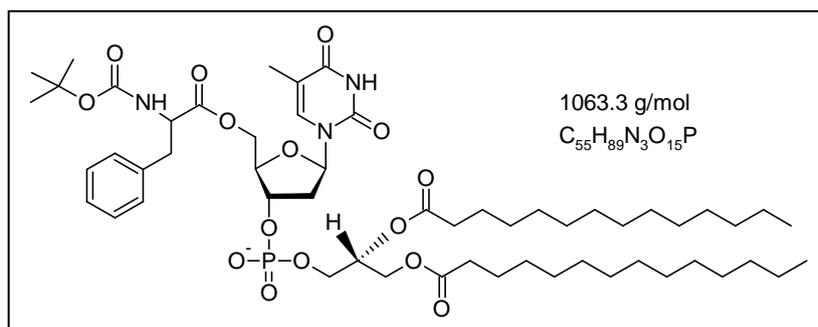
Le composé **9** (0.3 g, 1 équiv, 0.3 mmol) a été solubilisé dans 6ml d'une mélange de TFA/DCM 50/50. Après 4h à température ambiante le solvant a été évaporé sous pression réduite et le produit a été purifié par chromatographie à exclusion de taille sur Sephadex LH20. (0.22 g ; Rendement : 70%).

1H NMR (300MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0.85-0.91 (m, 6H CH_3 chaînes) 1.23-1.36 (m, 40H $2CH_2$ chaînes) 1.53-1.64 (m, 4H $2CH_2$ chaînes) 1.88 (s, 3H, CH_3 base) 2.21-2.70 (m, 6H $2CH_2$ chaînes + 2H $2'$ sucre) 3.78-4.60 (m, 9H $2CH_2$ glycérol + 1H $3'$ 1H $4'$ 2H $5'$ sucre) 4.95-5.08 (m, 1H CH_2 acide aminé) 5.15-5.22 (m, 1H glycérol) 5.72-5.81(m, 1H $1'$ sucre) 7.10 (s, 1H base)

^{13}C NMR (75MHz, $CDCl_3$) δ ppm 11.90 (1C CH_3 base) 13.74 (2C CH_3 chaînes) 22.39 (2C CH_2 chaînes) 24.55 (2C CH_2 chaînes) 28.8-29.4 (14C CH_2 chaînes) 31.62 (4C CH_2 chaînes) 33.78-33.92 (2C CH_2 chaînes) 37.11 (1C CH_2 $2'$ sucre) 40.3 (1C CH_2 acide aminé) 62.24 (1C CH_2 glycérol) 63.53 (1C CH_2 glycérol) 63.59 (1C CH_2 $5'$ sucre) 69.86-69.97 (1C CH glycérol) 74.18-74.28 (1C CH $4'$ sucre) 81.42-81.49 (1C CH $3'$ sucre) 86.99 (1C CH $1'$ sucre) 110.87 (1C base) 137.26 (1C base) 150.41 (1C C=O base) 164.44 (1C C=O base) 166.11 (1C ester acide aminé) 173.20 (1C ester chaînes) 173.63 (1C ester chaînes)

^{31}P NMR (121MHz, $CDCl_3$) δ ppm 1.65

Thymidine 3'-(1,2-Dimiristoyl-sn-glycero-3-phosphate)-5'-(N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-phenylalanine), diC14-dT-Boc-Phe, **11**



Le composé **1** (0.4 g, 1 équiv, 0.49 mmol) et la N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-phenylalanine (0.26 g, 2 équiv, 0.98 mmol) ont été solubilisés dans 10 ml de DCM anhydre sous argon. La N-N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 0.202 g, 2 équiv, 0.98 mmol) et la 4'-diméthylaminopyridine (DMAP, 0.03 g, 0.5 équiv, 0.25 mmol) sont additionnées et le milieu réactionnaire est agité pendant 16 h à température ambiante. La dicyclohexylurée (DCU) a été alors filtrée et le solvant a été évaporé sous pression réduite. Après purification par chromatographie sur gel de silice (éluant : DCM/MeOH/TEA, gradient 97/1/2 vers 88/10/2), le produit **11** a été obtenu (0.37 g ; Rendement : 70%).

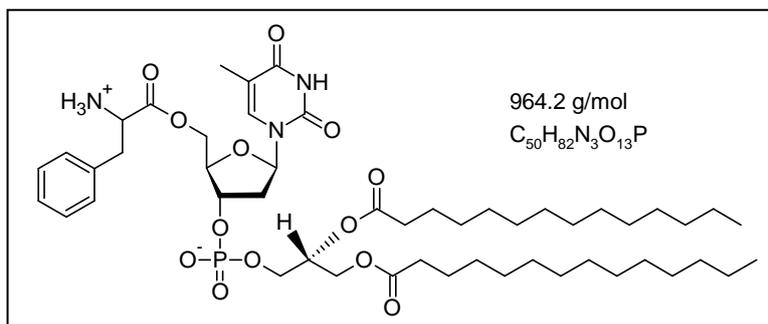
¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ ppm 0.85-0.91 (m, 6H CH₃ chaines) 1.23-1.43 (m, 40H 2CH₂ chaines + 9H 3CH₃ TEA + 9H 3CH₃ Boc) 1.55-1.64 (m, 4H 2CH₂ chaines) 1.92 (s, 3H, CH₃ base) 1.94-2.04 (m, 3H, H 2' sucre + CH₂ phénylalanine) 2.24-2.34 (m, 4H 2CH₂ chaines) 2.46-2.51 (m, 1H 2' sucre) 3.03-3.14 (m, 6H 3CH₂ TEA) 3.96-4.02 (m, CH₂ glycérol) 4.12-4.19 (m, 1H CH₂ glycérol) 4.33-4.71(m, 5H 1H CH₂ glycérol + 1H 3' 1H 4' 2H 5' sucre) 5.09-5.15 (m, 1H CH acide aminé) 5.22-5.29 (m, 1H glycérol) 6.25-6.31(m, 1H 1' sucre) 7.12-7.27 (m, 6H phénylalanine aromatique + 1H base)

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ ppm 8.61 (3C 3CH₃ TEA) 12.55 (1C CH₃ base) 14.15 (2C CH₃ chaines) 22.72 (2C CH₂ chaines) 24.88 (2C CH₂ chaines) 28.26 (3C CH₃ Boc) 29.16-29.68 (14C CH₂ chaines) 31.94 (4C CH₂ chaines) 34.09-34.30 (2C CH₂ chaines) 38.41 (1C CH₂ 2' sucre) 45.71 (3C 3CH₂ TEA) 54.77 (1C, CH₂, phénylalanine) 62.66 (1C CH₂ glycérol) 63.62 (1C CH₂ glycérol) 65.07 (1C CH₂ 5'sucre) 70.28 (1C CH glycérol) 74.98 (1C CH 4' sucre) 80.06 (1C CH 3' sucre) 84.95 (1C CH 1' sucre) 111.38 (1C base) 127.17-129.27 (5C phénylalanine aromatique) 135.16 (1C base) 135.84 (1C phénylalanine aromatique) 150.02 (1C C=O base) 154.98 (1C C=O Boc) 163.41 (1C C=O base) 171.84 (1C ester acide aminé) 173.09 (1C ester chaines) 173.5 (1C ester chaines)

³¹P NMR (121MHz, CDCl₃) δ ppm 1.97

ESI MS [M]⁻ : théorique = , observé=

**Thymidine 3'-(1,2-Dimiristoyl-sn-glycero-3-phosphate)-5'-L-phenylalanine),
diC14-dT-Phe, 12**



Le composé **11** (0.36 g, 1 équiv, 0.34 mmol) a été solubilisé dans 6ml d'une mélange de TFA/DCM 50/50. Après 4h à température ambiante le solvant a été évaporé sous pression réduite et le produit a été purifié par chromatographie d'exclusion de taille sur Sephadex LH20. (0.22 g ; Rendement : 85%).

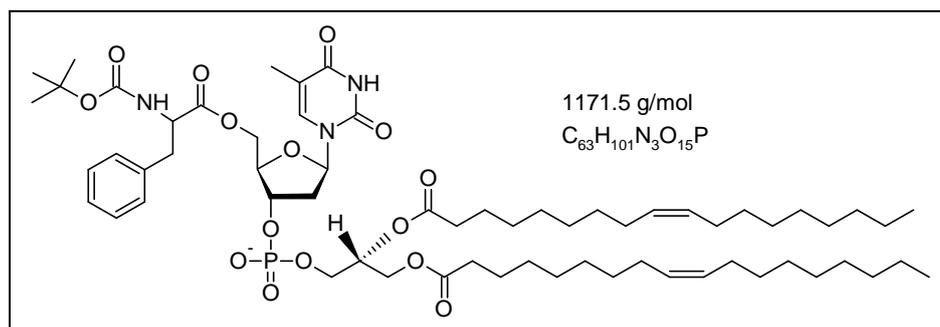
¹H NMR (300MHz, pyridine-d₅) δ ppm 0.89-0.96 (m, 6H CH₃ chaines) 1.20-1.38 (m, 40H 2CH₂ chaines) 1.66-1.77 (m, 4H 2CH₂ chaines) 1.99 (s, 3H, CH₃ base) 2.39-2.50 (m, 4H 2CH₂ chaines) 2.74-2.81 (m, 2H 2' sucre) 3.57-3.63 (m, 2H CH₂ phénylalanine) 4.48-4.85 (m, 8H 2CH₂ glycérol + 1H 4' 2H 5' sucre + 1H CH acide aminé) 5.43-5.50 (m, 1H 3' sucre) 5.72-5.79 (m, 1H glycérol) 6.68-6.76 (m, 1H 1' sucre) 7.26-7.56 (m, 5H phénylalanine aromatique + 1H base)

¹³C NMR (75MHz, pyridine-d₅) δ ppm 13.02 (1C CH₃ base) 14.69 (2C CH₃ chaines) 23.38 (2C CH₂ chaines) 25.79 (2C CH₂ chaines) 29.80-30.6 (14C CH₂ chaines) 32.6 (4C CH₂ chaines) 34.78-35.01 (2C CH₂ chaines) 38.44-38.66 (2C CH₂ 2' sucre + CH₂ phénylalanine) 56.16 (1C, CH, phénylalanine) 63.65 (1C CH₂ glycérol) 64.87 (1C CH₂ glycérol) 65.28 (1C CH₂ 5'sucre) 71.81-71.91 (1C CH glycérol) 76.99 (1C CH 4' sucre) 83.24 (1C CH 3' sucre) 86.69 (1C CH 1' sucre) 111.68 (1C base) 128.07-130.58 (5C phénylalanine aromatique) 136.63 (1C base) 136.72 (1C phénylalanine aromatique) 152.10 (1C C=O base) 165.14 (1C C=O base) 170.76 (1C ester acide aminé) 173.65 (1C ester chaines) 173.81 (1C ester chaines)

³¹P NMR (121MHz, pyridine-d₅) δ ppm 1.38

ESI MS [M + Na⁺]⁺ : théorique = 987, observé= 986.55

Thymidine 3'-(1,2-Dioléoyl-sn-glycero-3-phosphate)-5'-(N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-phenylalanine), diC18 :1-dT-Boc-Phe, **13**



Le composé **2** (0.3 g, 1 équiv, 0.325 mmol) et la N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-phenylalanine (0.172 g, 2 équiv, 0.65 mmol) ont été solubilisés dans 10 ml de DCM anhydre sous argon. La N-N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 0.134 g, 2 équiv, 0.65 mmol) et la 4'-diméthylaminopyridine (DMAP, 0.02 g, 0.5 équiv, 0.163 mmol) sont additionnées et le milieu réactionnaire est agité pendant 16 h à température ambiante. La dicyclohexylurée (DCU) a été alors filtrée et le solvant a été évaporé sous pression réduite. Après purification par chromatographie sur gel de silice (éluant : DCM/MeOH/TEA, gradient 98/1/1 vers 95/4/1), le produit **13** a été obtenu (0.27 g ; Rendement : 75%).

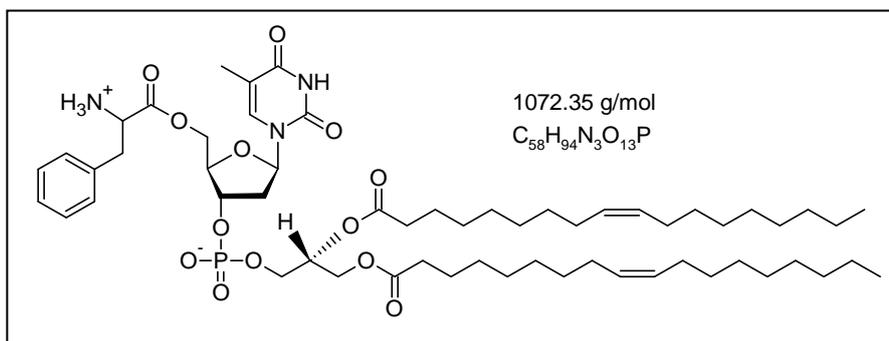
¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ ppm 0.84-0.91 (m, 6H CH₃ chaines) 1.22-1.43 (m, 40H 2CH₂ chaines + 9H 3CH₃ TEA + 9H 3CH₃ Boc) 1.53-1.64 (m, 4H 2CH₂ chaines) 1.91 (s, 3H, CH₃ base) 1.96-2.04 (m, 8H chaines) 2.24-2.34 (m, 4H 2CH₂ chaines) 2.46-2.52 (m, 1H 2' sucre) 3.03-3.13 (m, 6H 3CH₂ TEA) 3.96-4.72 (m 8H 2CH₂ glycérol + 1H 3' 1H 4' 2H 5' sucre) 5.09-5.15 (m, 1H CH₂ acide aminé) 5.21-5.30 (m, 1H glycérol) 5.30-5.39 (m, 4H CH=CH) 6.25-6.32(m, 1H 1' sucre) 7.12-7.27 (m, 5H phénylalanine aromatique + 1H base)

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ ppm 8.59 (3C 3CH₃ TEA) 12.55 (1C CH₃ base) 14.14 (2C CH₃ chaines) 22.69 (2C CH₂ chaines) 24.86 (2C CH₂ chaines) 27.23 (4C chaines) 28.26 (3C CH₃ Boc) 29.13-29.76 (14C CH₂ chaines) 31.91 (4C CH₂ chaines) 34.06-34.24 (2C CH₂ chaines) 38.4 (1C CH₂ 2' sucre) 45.7 (3C 3CH₂ TEA) 54.79 (1C, CH₂, phénylalanine) 62.66 (1C CH₂ glycérol) 63.65 (1C CH₂ glycérol) 65.0 (1C CH₂ 5'sucre) 70.28 (1C CH glycérol) 74.98 (1C CH 4' sucre) 80.03 (1C CH 3' sucre) 84.81 (1C CH 1' sucre) 111.41 (1C base) 127.16-130.01 (9C 2CH=CH chaines + 5C phénylalanine aromatique) 135.13 (1C base) 135.89 (1C phénylalanine aromatique) 150.21 (1C C=O base) 154.91 (1C C=O Boc) 163.64 (1C C=O base) 171.83 (1C ester acide aminé) 173.04 (1C ester chaines) 173.44 (1C ester chaines)

³¹P NMR (121MHz, CDCl₃) δ ppm 1.81

ESI MS [M]⁻ : théorique = , observé=

**Thymidine 3'-(1,2-Dioléoyl-sn-glycero-3-phosphate)-5'-L-phenylalanine),
diC18 :1-dT-Phe, 14**



Le composé **13** (0.288 g, 1 équiv, 0.246 mmol) a été solubilisé dans 6ml d'une mélange de TFA/DCM 50/50. Après 4h à température ambiante le solvant a été évaporé sous pression réduite et le produit a été purifié par chromatographie à exclusion de taille sur Sephadex LH20. (0.245 g ; Rendement : 94%).

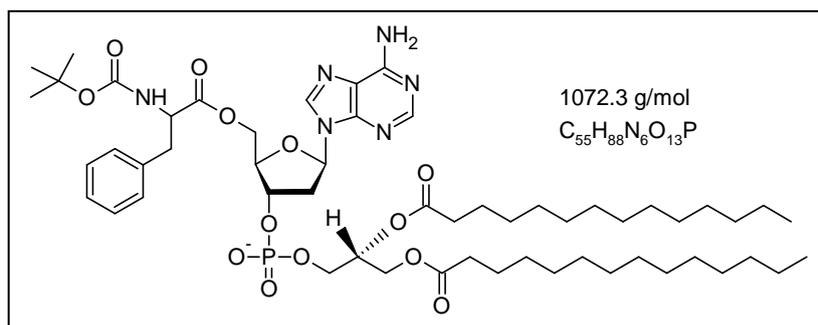
¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ ppm 0.82-0.90 (m, 6H CH₃ chaines) 1.20-1.36 (m, 40H 2CH₂ chaines) 1.46-1.57 (m, 4H 2CH₂ chaines) 1.81 (s, 3H, CH₃ base) 1.92-2.03 (m, 8H chaines) 2.19-2.42 (m, 6H 2CH₂ chaines + 2H 2' sucre) 3.83-4.39 (m, 8H 2CH₂ glycérol + 1H 4' 2H 5' sucre + 1H CH acide aminé) 4.69-4.77 (m, 1H 3' sucre) 5.06-5.16 (m, 1H glycérol) 5.27-5.38 (m, 4H CH=CH chaines) 6.09-6.17 (m, 1H 1' sucre) 7.23-7.35 (m, 5H phénylalanine aromatique) 7.46 (s, 1H base)

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ ppm 12.24 (1C CH₃ base) 14.02 (2C CH₃ chaines) 22.63 (2C CH₂ chaines) 24.84 (2C CH₂ chaines) 27.21 (4C chaines) 29.09-29.73 (14C CH₂ chaines) 31.87 (4C CH₂ chaines) 33.70 (1C CH₂ phénylalanine) 34.02-34.19 (2C CH₂ chaines) 36.3 (1C CH₂ 2' sucre) 54.50 (1C, CH, phénylalanine) 62.56 (1C CH₂ glycérol) 63.93 (1C CH₂ glycérol) 70.28 (1C CH glycérol) 79.99 (1C CH 3' sucre) 81.67 (1C CH 1' sucre) 111.19 (1C base) 127.52-130.01 (9C 2CH=CH chaines + 5C phénylalanine aromatique) 134.1 (1C base) 138.1 (1C phénylalanine aromatique) 150.29 (1C C=O base) 163.84 (1C C=O base) 167.89 (1C ester acide aminé) 173.01 (1C ester chaines) 173.31 (1C ester chaines)

³¹P NMR (121MHz, CDCl₃) δ ppm 1.38

ESI MS [M + Na⁺]⁺ : théorique = 1072.353, observé= 1072.6564

Adénine 3'-(1,2-Dimiristoyl-sn-glycero-3-phosphate)-5'-(N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-phenylalanine), diC14-dA-Boc-Phe, 15



Le composé **4** (0.2 g, 1 équiv, 0.242 mmol) et la N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-phenylalanine (0.096 g, 1.5 équiv, 0.363 mmol) ont été solubilisés dans 6 ml de DCM anhydre sous argon. La N-N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 0.075 g, 1.5 équiv, 0.363 mmol) et la 4'-diméthylaminopyridine (DMAP, 0.015 g, 0.5 équiv, 0.121 mmol) sont additionnées et le milieu réactionnaire est agité pendant 16 h à température ambiante. La dicyclohexylurée (DCU) a été alors filtrée et le solvant a été évaporé sous pression réduite. Après purification par chromatographie sur gel de silice (éluant : DCM/MeOH/TEA 95/3/2), le produit **15** a été obtenu (0.23 g ; Rendement : 68%).

¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ ppm 0.85-0.9 (m, 6H CH₃ chaines) 1.15-1.43 (m, 40H 2CH₂ chaines + 9H 3CH₃ TEA + 9H 3CH₃ Boc) 1.55-1.62 (m, 4H 2CH₂ chaines) 2.24-2.34 (m, 4H 2CH₂ chaines) 2.65-2.71 (m, 1H 2' sucre) 2.96-3.14 (m, 9H 3CH₂ TEA + H 2' sucre + CH₂ phénylalanine) 3.96-4.02 (m, CH₂ glycérol) 4.12-4.21 (m, 1H CH₂ glycérol) 4.37-4.68(m, 5H 1H CH₂ glycérol + 1H 4' 2H 5' sucre + CH acide aminé) 4.92 (m, 1H 3' sucre) 5.23-5.28 (m, 1H glycérol) 6.0 (br. s, NH₂ adénine) 6.39-6.43(m, 1H 1' sucre) 7.12-7.20 (m, 5H phénylalanine aromatique) 7.98 (s, H8 adénine) 8.3 (s, H2 adénine)

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ ppm 8.59 (3C 3CH₃ TEA) 14.16 (2C CH₃ chaines) 22.72 (2C CH₂ chaines) 24.91 (2C CH₂ chaines) 28.29 (3C CH₃ Boc) 29.26-29.73 (14C CH₂ chaines) 31.94 (4C CH₂ chaines) 34.09-34.30 (2C CH₂ chaines) 38.25 (1C CH₂ 2' sucre) 45.60 (3C 3CH₂ TEA) 54.54 (1C, CH₂, phénylalanine) 62.71 (1C CH₂ glycérol) 63.53 (1C CH₂ glycérol) 65.07 (1C CH₂ 5'sucre) 70.34-70.46 (1C CH glycérol) 75.16-75.21 (1C CH 4' sucre) 79.80 (1C CH 3' sucre) 84.90 (1C CH 1' sucre) 120.28 (1C adénine) 127.17-129.27 (5C phénylalanine aromatique) 136.02 (1C C=O Boc) 139.64 (1C phénylalanine aromatique) 149.56 (1C 8 adénine) 152. (1C 4 adénine) 155.19 (1C 2 adénine) 155.32 (1C 6 adénine) 171.73 (1C ester acide aminé) 173.12 (1C ester chaines) 173.52 (1C ester chaines)

³¹P NMR (121MHz, CDCl₃) δ ppm 2.22

ESI MS [M]⁻ : théorique = , observé=

3 Morphologie des systèmes

3.1 Introduction

Les nucléolipides possèdent des propriétés d'auto-assemblage intéressantes, comme décrit dans la partie bibliographique (chapitre 1.3). Cela est dû à leur caractère amphiphile et à la tête polaire nucléosidique, qui peuvent favoriser la formation de différents types d'organisations supramoléculaires. Ce chapitre décrit le protocole de préparation des différentes formulations de NLs et ANLs et une première étude de leurs propriétés d'auto-assemblage. En particulier, on va étudier la forme et la taille des objets formés. Ces études seront réalisées par les techniques de microscopies et de diffusion dynamique de la lumière.

3.2 Préparation des échantillons

Le protocole de préparation des échantillons a été le plus simple possible. On a pesé la poudre du produit à étudier, on l'a hydratée avec un volume de solution tampon nécessaire pour avoir la concentration demandée et on a attendu que les molécules soient bien dispersées. Pour faciliter l'étape de dispersion, après 24 h d'agitation, on a effectué des cycles de chauffage/vortex à une température maximale de 50 °C pendant 30 min (1 min chauffage/5 min vortex), pour éviter la dégradation des produits. L'utilisation de techniques complémentaires comme la microscopie ou la diffusion dynamique de la lumière nous ont permis de vérifier le niveau de dispersion des molécules.

L'utilisation d'un tampon était nécessaire pour pouvoir contrôler le pH, à cause de la présence de groupes chargés dans les molécules : le phosphate et l'amine. De plus l'éventuel intérêt thérapeutique de ces formulations et donc leur utilisation dans des milieux biologiques nécessitait de réguler le pH à 7.2 pour étudier les objets dans leurs conditions d'utilisations. Pour le choix du tampon on voulait qu'il ne soit pas toxique et qu'il n'interagisse pas avec les membranes. Nous avons regardé dans la liste des « tampons de Good », une liste de tampons spécialement étudiés pour la biologie et la biochimie (Good et al., 1966). De plus, vu la possibilité de former un zwitterion entre le groupe amino et le phosphate, on ne voulait pas un tampon à base d'ions phosphate pour éviter une compétition. Pour la même raison, on a décidé de ne pas utiliser des forces ioniques élevées, pour éviter d'avoir trop d'ions et de perturber la formation du zwitterion. Le choix c'est finalement fait sur le tampon HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) (figure 3.1) à la concentration de 50 mM, qui correspond à une force ionique de 14 mM.

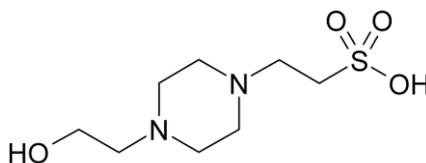


Figure 3.1. Structure moléculaire de l'HEPES.

Le choix des concentrations à étudier a été plus difficile. On avait du point de vue de la physico-chimie la nécessité d'utiliser des concentrations plus élevées (10 mM), pour avoir

assez de matière pour les analyses (rayons X, DSC, ITC) et du point de vue de la chimie et de la biologie, on avait la nécessité d'utiliser des concentrations plus faibles (1 mM) pour éviter de synthétiser des grosses quantités de produits et pour éviter un éventuel effet toxique à des concentrations plus élevées de nucléolipides. De plus il faut considérer que pour ces molécules, capables de s'organiser dans différentes structures supramoléculaires, un changement de concentration peut causer un déplacement sur le diagramme de phase et donc changer la structure de l'objet (vésicules, micelle, fibres). Il est donc essentiel de bien contrôler la concentration de chacun des échantillons et d'être vigilant sur les différents effets de dilution.

3.3 Etude de la morphologie des objets supramoléculaires

3.3.1 Microscopie optique à contraste de phase

Le microscope optique à contraste de phase, a été découvert par F. Zernike en 1934, et cela a révolutionné la recherche biomédicale, parce qu'il a donné aux chercheurs la possibilité d'observer les cellules sans avoir besoin qu'elles soient marquées ou colorées. Le principe optique utilisé consiste dans le fait qu'il y a un déplacement de phase dans le faisceau de lumière quand la lumière traverse des objets possédant différents index de réfraction. Donc la lumière qui passe à travers un échantillon sera « retardée » par rapport à la lumière qui passe à travers de l'eau. Ce retard, dû à une différence de vitesse de la lumière dans les différents matériaux, ce traduit par un déplacement de phase. Cela ne peut pas être observé par l'œil ou par le microscope optique classique. La technique du contraste de phase utilise des « astuces optiques » pour traduire ces déplacements de phase en « nuances de gris ».

Cette technique nous a permis d'observer rapidement les échantillons, sans avoir besoin de marquage ou coloration et sans avoir besoin de fixer ou sécher l'échantillon. Cette observation « directe » de l'échantillon a été effectuée après déposition d'une goutte de dispersion des objets entre lame et lamelle de verre pour observation au microscope. La limitation principale de cette technique est la résolution (environ 200 nm).

L'importance de la technique dans l'évaluation du niveau d'homogénéité de la dispersion de nucléolipides est montrée dans la figure 3.2. Les deux images de microscopie à contraste de phase sont obtenues pour l'échantillon diC18:1-dT-Phe, avant (3.2a) et après (3.2b), une série de cycles de chauffage/vortex à 50 °C pendant 30 min (1 min chauffage/5 min vortex).

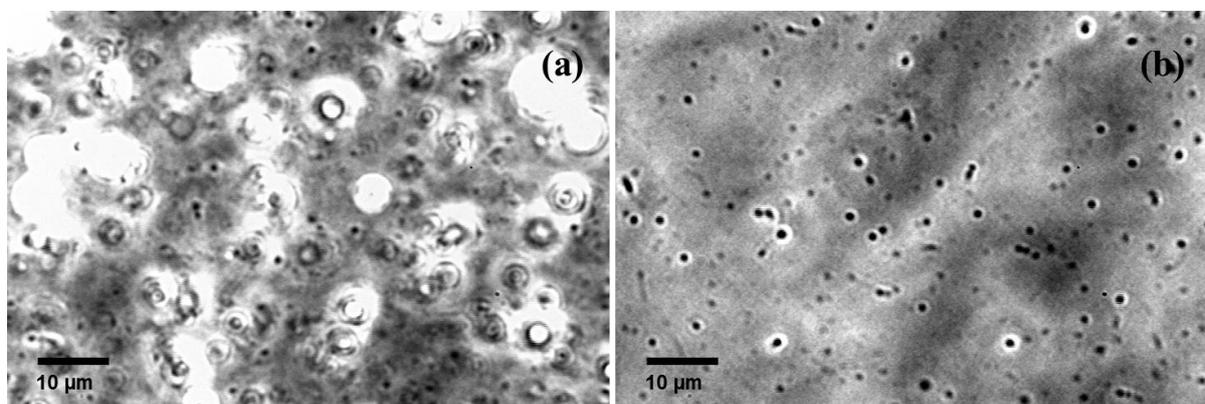


Figure 3.2. Images de microscopie à contraste de phase de une même dispersion de diC18:1-dT-Phe 5 mM dans le tampon HEPES 50 mM pH 7.2, avant (a) et après (b) le cycle de chauffage à 50 °C. 98

La dispersion après les cycles de chauffage/vortex apparaît plus homogène avec des objets de plus petite taille.

Ce type de contrôles, faits de façon systématique, nous a permis de bien définir et de mettre au point le protocole de préparation des échantillons. De plus, ces études nous ont permis de comparer différents type d'échantillons, comme présenté dans la figure 3.3 pour différentes dispersions de NLs et ANLs.

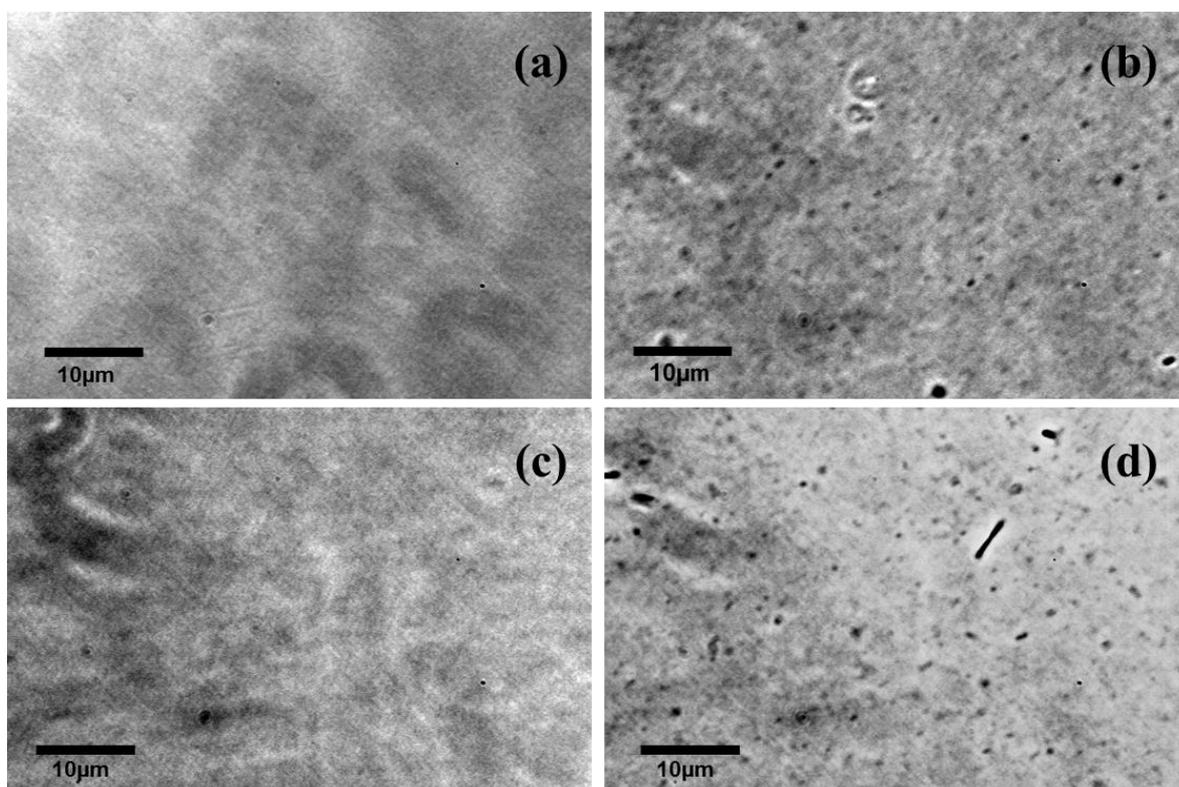


Figure 3.3. Images de microscopie à contraste de phase de diC14-dT 5 mM (a), diC14-dT-Gly 5 mM (b), diC18:1-dT 5 mM (c), diC18:1-dT-Phe 5 mM (d).

En comparant les différentes images, une première analyse nous montre une différence entre les échantillons de type NLs et ANLs. Dans le premier cas on n'observe pas d'objet (3.3a et 3.3c) dans le deuxième cas on observe plusieurs objets (3.3b et 3.3d). Le fait qu'on observe des objets nous indique que ce type de molécules est capable de s'auto-assembler, mais il ne nous donne pas d'information précise sur la forme, la taille et la structure des objets. De plus, pour les NLs, on n'observe pas d'objets, cela pourrait indiquer que les objets sont plus petits que la résolution du microscope optique (200 nm). On a donc besoin d'autres techniques complémentaires pour pouvoir étudier plus en détail les échantillons.

3.3.2 Microscopie électronique

La microscopie électronique en transmission (TEM) est une technique de microscopie où un faisceau d'électrons est transmis à travers un échantillon assez mince. Les interactions entre les électrons et l'échantillon donnent naissance à une image, dont la résolution peut atteindre quelques angströms. Cela peut être utilisé pour pouvoir visualiser et étudier des objets de

taille nanométrique et aussi pour accéder à des détails structuraux, comme par exemple les caractéristiques de la bicouche lipidique. Il est important de considérer plusieurs facteurs avant de choisir les techniques appropriées de préparation et d'observation des échantillons. Par exemple, la nature, la densité et l'épaisseur de l'échantillon peuvent influencer le comportement du faisceau d'électrons. Pour l'observation de lipides dispersés dans l'eau, il est nécessaire d'utiliser un marquage ou coloration pour visualiser correctement les objets. En particulier, on peut réaliser une coloration négative, les objets seront clairs sur un fond foncé, en utilisant des métaux lourds comme le tétraoxyde d'osmium ou l'acétate d'uranyle. Cependant, il a été montré (Bibi et al., 2011), que ces techniques de marquage et de coloration des échantillons, peuvent provoquer, dans le cas d'organisations supramoléculaires lipidiques, des changements de la structure originale de l'objet à visualiser et la formation d'artefacts. De plus, la chambre échantillon du microscope est placée sous vide, pour diminuer les interactions des électrons avec l'air, cela conduit à une déshydratation de l'échantillon et donc à des images très peu représentatives du système dispersé.

La cryo-microscopie électronique (cryo-TEM) est une adaptation de la microscopie électronique à transmission, où les étapes de coloration et de marquage de l'échantillon sont évitées. La technique utilise une étape de fixation de l'échantillon (cryo-fixation) où il y a la formation d'un film d'eau vitrifié contenant les objets à observer. Cela est possible grâce à la diminution rapide de la température de l'eau par de l'azote liquide qui empêche à l'eau de se cristalliser en glace et permet l'obtention d'un milieu solide et parfaitement transparent. Cependant l'observation de l'échantillon doit être effectuée à des températures très basses (-178 °C) pour éviter que l'eau cristallise. Cette technique permet donc la visualisation des architectures des objets, en termes de forme et de compartiment internes de façon à obtenir des informations sur leurs caractéristiques morphologiques (Gaillard and Douliez, 2012). L'image 3.4 montre les étapes de préparation d'un film mince de glace vitreuse pour l'observation en cryo-TEM.

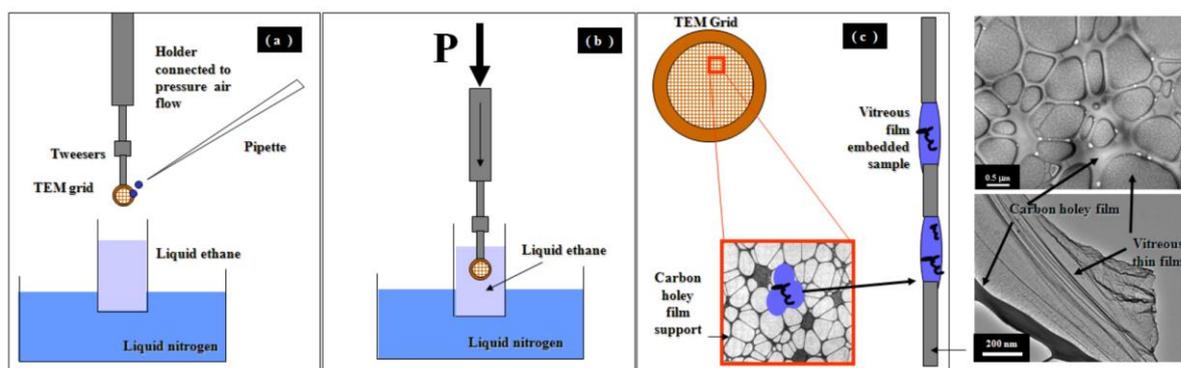


Figure 3.4. Différentes étapes de la préparation d'un film mince de glace vitreuse pour la cryo-TEM.

(a) Une microgoutte de dispersion liquide est déposée sur la grille TEM recouverte d'un film mince à trou en carbone, elle est ensuite époncée avec du papier filtre pour éliminer l'excédent de liquide. La grille est tenue en place par des pinces connectées à un système de guillotine qui permet sa projection rapide (b) dans un bain d'éthane liquide refroidi à -178 °C par de l'azote liquide. Après quelques minutes la grille est ressortie du bain et peut être observée dans le microscope ; (c) Représentation du film mince vitreux retenu entre les ouvertures du film mince à trou en carbone. Adaptée depuis (Gaillard and Douliez, 2012).

L'étude en cryo-TEM des NLs et ANLs est faite en deux parties : la première étude permet d'analyser les différentes molécules pour obtenir des informations sur le rapport structure chimique – organisation supramoléculaire et dans une deuxième étude, on fait varier les concentrations des molécules pour étudier le diagramme de phase de ces systèmes sur un domaine restreint de concentrations (1 mM \rightarrow 10 mM).

La figure 3.5 montre la morphologie des structures observées pour les dispersions de NLs (diC14-dT, diC18:1-dT) et des ANLs (diC14-dT-Phe, diC18:1-dT-Phe) préparées dans le tampon HEPES 50 mM, pH 7.2.

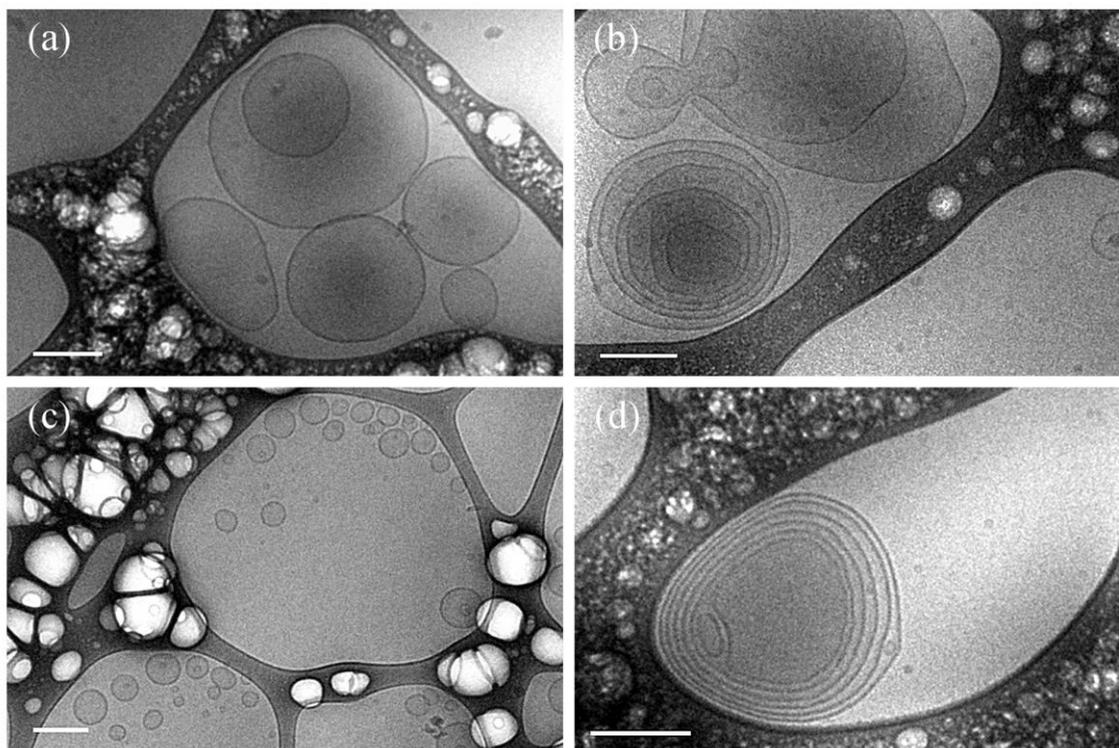


Figure 3.5. Images de cryo-TEM. (a) diC14-dT (1 mM), (b) diC14-dT-Phe (1 mM), (c) diC18:1-dT (5 mM) et (d) diC18:1-dT-Phe (1 mM) préparés dans l'HEPES 50 mM, pH 7.2. Barre d'échelle = 200 nm.

Dans le cas des NLs, on peut observer des structures vésiculaires de type unilamellaires, par contre pour les ANLs on observe des structures vésiculaires multilamellaires. Cela montre que ces molécules sont capables de s'auto-assembler à température ambiante et qu'il semble y avoir un effet de la structure chimique, lié à la présence de l'acide aminé, sur le type d'organisation supramoléculaire. De plus cet effet ne dépend pas du type de chaînes lipidiques (dimiristoyl ou dioleoyl) présentes qui sont à l'état « fluide » à température ambiante dans tous les cas. En observant plus en détail la structure des vésicules multilamellaires, on peut voir que l'empilement lamellaire est beaucoup plus régulier pour le diC18:1-dT-Phe (fig 3.5d) que pour le diC14-dT-Phe (fig. 3.5b).

De plus on peut estimer la périodicité lamellaire (épaisseur bicouche lipidique plus couche aqueuse) pour les deux systèmes. Cela a été obtenu comme une moyenne de plusieurs lectures faites dans des endroits différents comme montré dans la figure 3.6 pour le diC18:1-dT-Phe.

Les valeurs obtenus sont 30 ± 15 nm pour le diC14-dT-Phe et 17 ± 5 nm pour le diC18:1-dT-Phe.

L'estimation de l'épaisseur de la bicouche lipidique pour tous les systèmes est de 5 nm

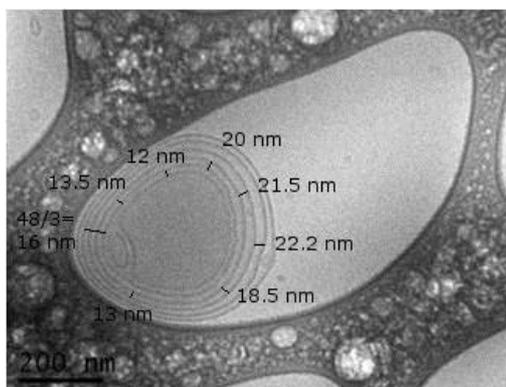


Figure 3.6. Estimations de périodicité lamellaire pour le diC18:1-dT-Phe.

La figure image 3.7 montre la morphologie des structures observées dans le cas de variations de concentrations pour le NL diC18:1-dT.

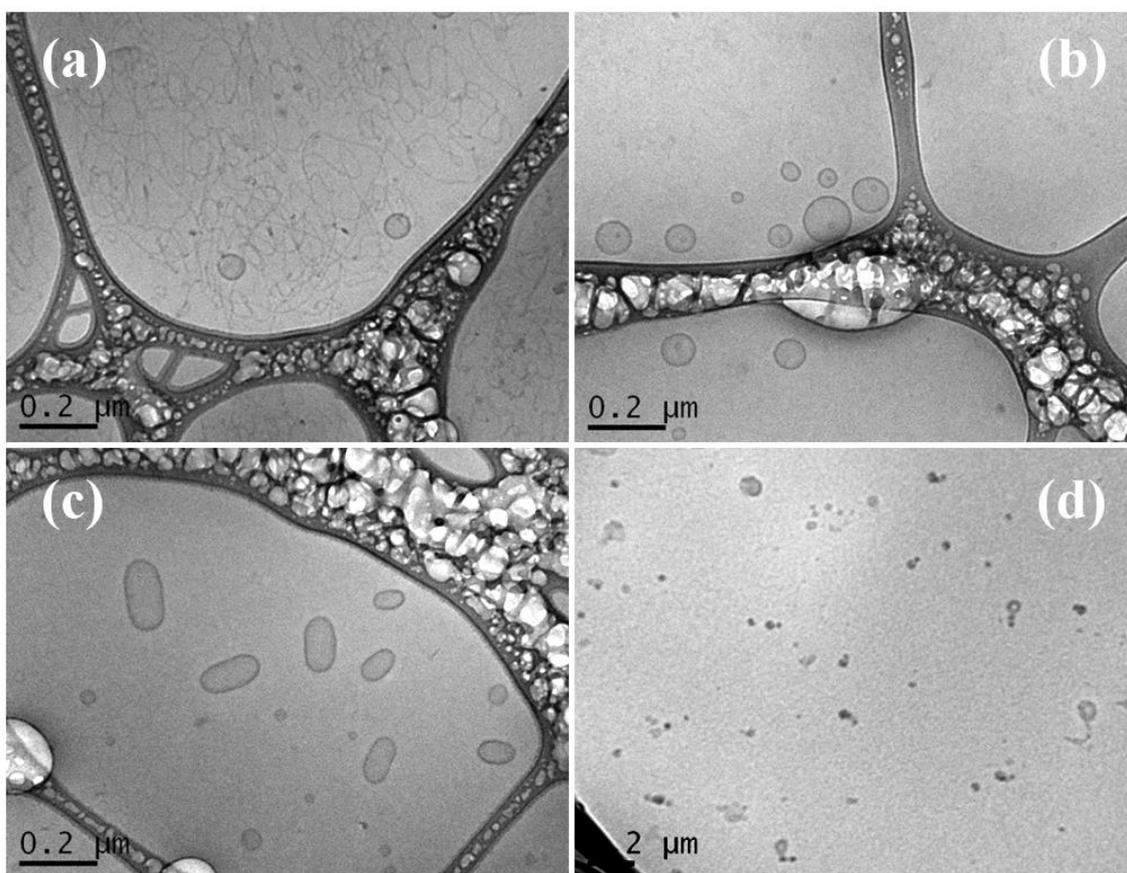


Figure 3.7. Images de cryo-TEM pour diC18:1-dT-Phe différentes concentrations dans l'HEPES 50 mM, pH 7.2. (a) 10 mM, (b) 5 mM, (c) 2.5 mM et (d) 1.25 mM. Barre d'échelle = 200 nm.

Les images montrent les différentes morphologies d'objets en fonction de la concentration de NL. Pour l'échantillon le plus concentré (10 mM), on observe la formation de structures micellaires de type « worm-like » et aussi la présence de quelques vésicules. En diminuant la concentration (5 mM) on observe seulement des vésicules, qui deviennent des vésicules déformées à des concentrations plus petites (2.5 mM) jusqu'à observer une perte de structure pour les systèmes les plus dilués (1 mM).

Cette diversité de morphologie n'est pas nouvelle pour ce type de système, Baglioni et collaborateurs (Baldelli Bombelli et al., 2002; Bombelli et al., 2002) ont déjà montré que le nucléolipide DLPU montre un changement de phase en fonction de la concentration. Ils observent en particulier une transition micelles sphériques vers micelles cylindrique (« worm-like ») en augmentant la concentration. Cette transition est observée à la concentration de 10 mM. L'explication proposée est corrélée à la courbure spontanée du film de surfactant qui, en fonction de sa nature chimique et de sa charge, peut déterminer différentes préférences d'assemblage (« packing »). Pour des concentrations plus grandes que la cmc (concentration micellaire critique), les micelles grossissent en fonction de la concentration par la loi d'action de masse. Pour des micelles sphériques cette croissance est très limitée, mais dans des conditions particulières de force ionique, les répulsions intramicellaires sont masquées, et favorisent donc la formation de structures micellaires cylindriques, qui peuvent grossir à l'infini en direction axiale. Le contrôle de la forme de ces systèmes pourrait représenter une propriété intéressante pour la délivrance d'acides nucléiques ou leur utilisation comme « templates » pour la fabrication de nanostructures. Le groupe de Safinya (Zidovska et al., 2009) a montré la formation d'un type particulier de vésicules appelées « block »-liposomes, où des vésicules lipidiques sont connectées par des nanotubes ou des nanofilaments. Ces systèmes sont constitués de deux composants, le DOPE et le MVLBG2. Le MVLBG2 est un lipide cationique multivalent avec une partie lipidique constituée de deux chaînes oléoyl et une tête polaire dendritique avec une charge globale de +16. Cette molécule, avec une géométrie en forme de cône, peut induire une forte courbure spontanée, C_0 dans les membranes lipidiques. Les auteurs ont montré qu'une forte concentration de MVLBG2 dans les parties de connexion entre les vésicules conduit à la formation de structures tubulaires ou filamenteuses qui demandent une forte courbure membranaire. Cette plasticité membranaire est très similaire à celle observée *in vivo* pour les membranes cellulaires. Les cellules sont en effet capables de modifier la courbure spontanée de leurs membranes grâce à la présence de certaines protéines membranaires.

Pour mieux caractériser la morphologie et la taille de ces systèmes on a besoin d'utiliser une technique complémentaire, qui apporte une meilleure statistique par rapport aux techniques de microscopie qui permettent l'observation d'un nombre limité d'objets. Cette technique est la diffusion dynamique de la lumière.

3.3.3 Diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière (dynamic light scattering ou DLS) est la technique la plus utilisée pour la mesure de la taille des particules colloïdales. Les expériences de DLS consistent à envoyer un faisceau de lumière monochromatique sur un échantillon et de

mesurer l'intensité du faisceau diffusé avec un détecteur placé à un certain angle, θ , par rapport au faisceau transmis (figure 3.8).

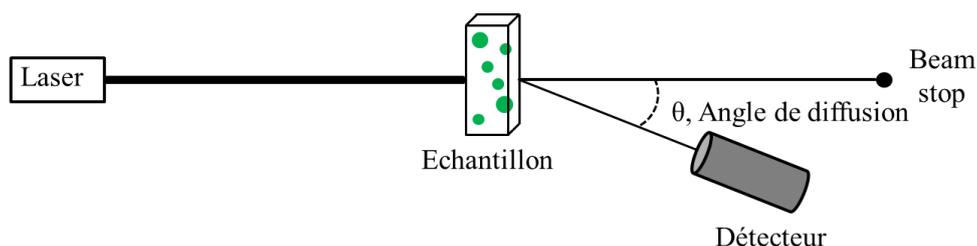


Figure 3.8. Représentation schématique d'un montage utilisé dans les expériences de DLS.

Tous les éléments (solvant et particules) qui se trouvent dans le volume, V , défini par le faisceau incident et le faisceau diffusé, vont diffuser la lumière dans toutes les directions à une certaine intensité, cela de façon dépendante à leur polarisabilité, α .

Le principe de la DLS est basé sur la diffusion de la lumière de particules en mouvement, cela implique la mesure des fluctuations de l'intensité de la lumière diffusée à cause de leur mouvement. C'est le mouvement Brownien des particules qui provoque ces fluctuations en raison de la formation d'interférences constructives ou destructives dans le faisceau de lumière diffusé. Ces fluctuations dépendent fortement de la dynamique des particules diffusantes et en particulier des leurs propriétés comme la taille, la forme, les interactions moléculaire, les répulsions, etc. L'analyse de ces fluctuations est à l'origine des techniques de DLS. Le signal détecté, l'intensité, I , est enregistré en fonction du temps et il est ensuite transformé à travers une fonction de corrélation (figure 3.9).

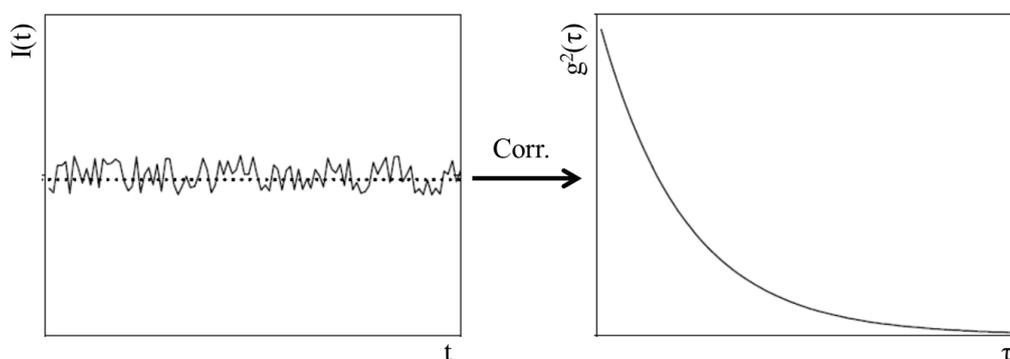


Figure 3.9. Principe de la DLS.

La fonction d'autocorrélation est définie comme (équation 3.1):

$$g^2(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}$$

Equation 3.1

A travers cette relation, il est possible de déterminer les variations d'intensité de la lumière diffusée à deux moments différentes, $I(t)$ et $I(t+\tau)$. On peut facilement voir que quand le signal est comparé avec lui-même, la corrélation est parfaite et $g^2(\tau) = \langle I^2 \rangle / \langle I \rangle^2$. En revanche, quand il n'y a pas de corrélation, $g^2(\tau) = 1$, la particule a « perdu » l'information sur sa position initiale à cause du mouvement Brownien. Dans le cas d'une distribution Gaussienne de la lumière diffusée, on peut utiliser la relation de Siegert pour obtenir la relation entre les fonctions d'autocorrélation de l'intensité diffusée, $g^2(\tau)$ et le champ électrique diffusé, $g^1(\tau)$, qui correspond à la transformée de Laplace inverse des temps de relaxation. Comme conséquence on peut obtenir les temps de relaxation à partir de l'information contenue dans la fonction $g^2(\tau)$ (équation 3.2).

$$g^2(\tau) = 1 + \beta [g^1(\tau)]^2$$

Equation 3.2

β est un facteur qui dépend de la géométrie expérimentale (il vaut 1 dans la limite idéale) et B est la ligne de base, et correspond à la valeur des temps très long de $g^2(\tau)$, $B=1$ d'après l'équation 3.1. Ils existent différentes méthodes pour l'analyse des fonctions d'autocorrélations, dont la méthode des cumulants, développée par Koppel (Friskens, 2001; Koppel, 1972), la fonction d'autocorrélation de le champ électrique diffusé, $g^1(\tau)$, est écrite comme somme ou distribution d'exponentiels, $G(\Gamma)$ (équation 3.3), avec les taux de relaxation proportionnel aux coefficients de diffusion des particules.

$$g^1(\tau) = \int_0^{\infty} G(\Gamma) \exp(-\Gamma\tau) d\Gamma$$

Equation 3.3

Dans le cas de systèmes polydisperses, le première cumulants correspond à un temps de relaxation moyen, tant que le second cumulants μ_2 correspond à l'index de polydispersité ($PDI = \mu_2 / \Gamma^2$). L'équation 3.3, après la relation de Siegert, devient l'équation 3.4.

$$g^2(\tau) = 1 + \beta \exp(-2\bar{\Gamma}\tau) \left(1 + \frac{\mu_2}{2!} \tau^2 + \dots \right)^2$$

Equation 3.4

Cette forme permette d'ajuster les données et de déduire les valeurs des fréquences de relaxation, $\bar{\Gamma}$. Ces valeurs dépendent généralement de l'angle de diffusion et dans le cas de particules diffusantes, cette fréquence est dépendante de q^2 , comme montré dans la relation suivante (équation 3.5).

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

Equation 3.5

q est l'amplitude du vecteur d'onde diffusé, défini comme la différence entre le vecteur d'onde incident et le vecteur d'onde diffusé, n est l'index de réfraction du solvant, λ est la longueur d'onde du laser dans le vide et θ est l'angle de diffusion.

Il est donc possible de calculer le coefficient de diffusion par l'équation 3.6.

$$\frac{\Gamma}{q^2} = D$$

Equation 3.6

Le calcul du rayon hydrodynamique pour des particules sphériques se fait à partir du coefficient de diffusion et à travers la relation de Stokes – Einstein (équation 3.7),

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$$

Equation 3.7

k_B est la constante de Boltzmann, T est la température et η est la viscosité dynamique du solvant.

L'étude par diffusion dynamique de la lumière est faite en deux parties : la première partie où on va présenter les fonctions d'autocorrélation pour les différentes molécules et les meilleurs ajustements obtenus. À partir de leur paramétrage on a calculé le diamètre hydrodynamique qui peut être comparé à la taille des objets observés en cryo-TEM. Dans la deuxième partie, on fait varier les concentrations des molécules pour les systèmes diC18:1-dT et diC14-dT pour essayer de trouver une corrélation avec le polymorphisme des objets observés en cryo-TEM.

Les données expérimentales ont été normalisées par rapport à la ligne de base, B (équation 3.8),

$$C(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle - B}{B}$$

Equation 3.8

et les ajustements ont été obtenus en ajustant les paramètres (β , Γ et μ_2) de l'équation 3.4. A partir de la valeur de la fréquence de relaxation, Γ , obtenue, on peut donc calculer, en utilisant les équations 3.5 et 3.6, le coefficient de diffusion, D , et ainsi le diamètre hydrodynamique des objets grâce à la loi de Stokes – Einstein (équation 3.7). Le second cumulant, μ_2 , correspond à la distribution des temps de relaxation et nous permet de calculer l'index de polydispersité ($PDI = \mu_2 / \Gamma^2$). Les fonctions d'autocorrélation ont été enregistrées à différents angles (50° , 90° , 130°), cela nous donne une estimation de la distribution de taille, vu que la diffusion de la lumière est fortement dépendant de la taille et de l'angle de diffusion.

La figure 3.10 montre les fonctions d'autocorrélation pour les différentes molécules, ainsi que les ajustements obtenus.

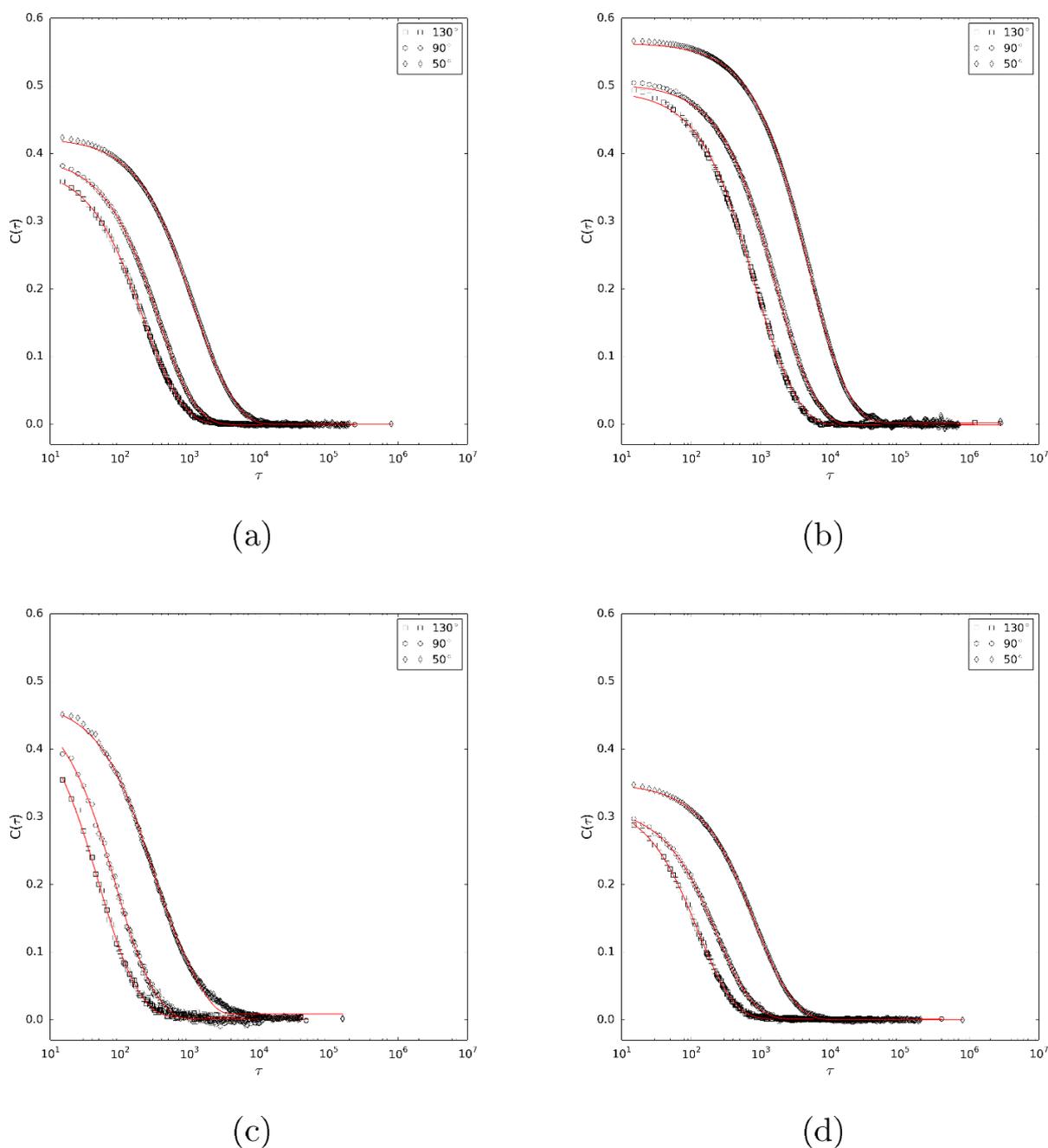


Figure 3.10. Fonctions d'autocorrélation de DLS à différents angles pour les NLs, diC18:1-dT 5 mM (a) et diC14-dT 5 mM (c), et pour les ANLs, diC18:1-dT-Phe 2 mM (b) et diC14-dT-Phe 5 mM (d). Les dispersions des lipides ont été obtenues dans un tampon HEPES 50 mM pH 7.2.

A partir de l'équation 3.6, $\Gamma = Dq^2$, on peut analyser les données, en représentant dans un graphique les valeurs des fréquences de relaxation, Γ , en fonction de l'angle de diffusion au carré, q^2 . La figure 3.11 montre un exemple de cette représentation pour le diC14-dT.

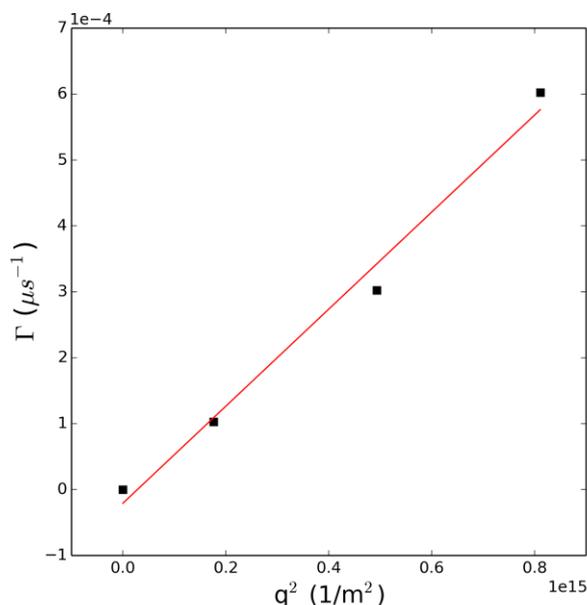


Figure 3.11. Γ en fonction de q^2 pour le diC14-dT 5 mM.

La variation linéaire de Γ en fonction de q^2 indique que le processus de relaxation est de nature diffusive. La pente de la droite correspond donc au coefficient de diffusion, D . A partir de la relation de Stokes-Einstein (équation 3.7) et en considérant des objets isotropes (vésicules), on peut ainsi estimer la taille des objets.

Le tableau 3.1 montre les différentes valeurs de tailles trouvées et les polydispersités moyennes estimées pour les NLs et ANLs.

	d (nm)	polydispersity
diC14-dT	36	0.52
diC14-dT-Phe	89	0.36
diC18:1-dT	151	0.44
diC18:1-dT-Phe	583	0.49

Tableau 3.1. Diamètres et polydispersité obtenus par DLS pour les NLs et ANLs.

L'analyse des données nous permet de dire que les valeurs trouvées sont compatibles avec les données obtenues en microscopie. De plus on peut souligner que dans les cas des systèmes ANLs les diamètres obtenus sont toujours plus grands par rapport à ceux des systèmes NLs. Les valeurs de polydispersité nous indiquent que les objets ne sont pas uniformes en taille, cela peut dépendre de la méthode de préparation, en effet les échantillons ne subissent aucun

procédé visé à la calibration en taille (extrusion, sonication).

La figure 3.12 montre les fonctions d'autocorrélation pour différentes concentrations de diC18:1-dT.

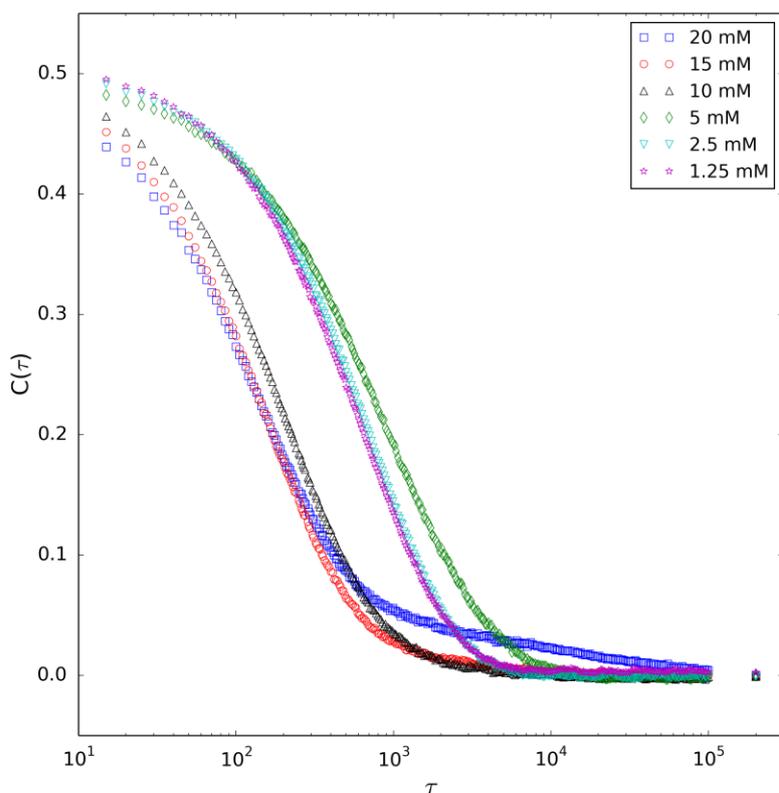


Figure 3.12. Fonctions d'autocorrélation de DLS à 60° pour le diC18:1-dT. Les différentes concentrations sont 1.25 mM, 2.5 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM et 20 mM dans le tampon HEPES 50 mM à pH 7.2.

Une première analyse qualitative des courbes montre la présence de deux familles de courbes. L'une pour les concentrations élevées (20 mM, 15 mM, 10 mM) qu'on appellera régime concentré et l'autre pour les concentrations plus faibles (5mM, 2.5 mM, 1.25mM) qu'on appellera régime dilué. Dans le cas du régime concentré, les fonctions d'autocorrélation présentent un processus de relaxation rapide (première partie de la courbe) et un processus de relaxation lent (deuxième partie de la courbe), en revanche pour le régime dilué on observe un seul type de relaxation. La figure 3.13 montre les fonctions d'autocorrélation en fonction de l'angle de diffusion pour deux exemples caractéristiques de chaque famille, à 20 mM pour le régime concentré et à 2.5 mM pour le régime dilué.

On peut voir clairement dans la figure 3.13b que les ajustements obtenus en utilisant le modèle des cumulants (équation 3.4) permet d'ajuster assez bien les fonctions d'autocorrélation pour le diC18:1-dT à 2.5 mM (régime dilué). L'analyse des paramètres conduit à une estimation d'une taille caractéristique de 101 nm avec une polydispersité moyenne de 0.4. En revanche pour le diC18:1-dT à 20 mM (régime concentré), le modèle des

cumulants n'est pas adapté pour ajuster de façon satisfaisante les données, en particulier pour le processus de relaxation lent.

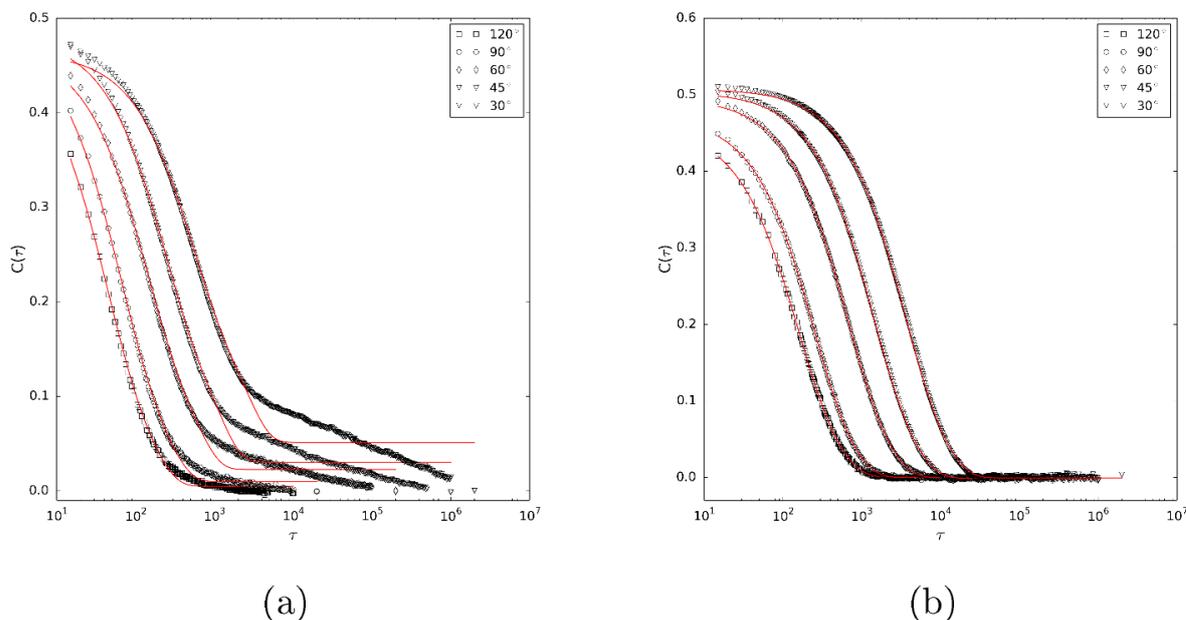


Figure 3.13. Fonctions d'autocorrélation de DLS à différents angles pour le diC18:1-dT à deux concentrations différentes, 20 mM (a) et 2.5 mM (b). Les fits obtenus avec le modèle des cumulants (équation. 3.4) sont reportés en rouge.

Pour pouvoir ajuster les données et obtenir des paramètres qui considèrent les deux processus de relaxation, on a eu besoin d'utiliser un nouveau modèle (equation 3.9).

$$g^2(\tau) = B + \beta \left[p \cdot \exp\left(-\frac{\tau}{\Gamma_1}\right) + (1-p) \cdot \exp\left(-\left(\frac{\tau}{\Gamma_2}\right)^\sigma\right) \right]^2$$

Equation 3.9

Où B est la ligne de base, β est un facteur qui dépend de la géométrie expérimentale, p et $(1-p)$ représentent le poids relatif de chaque population, Γ_1 et Γ_2 sont les deux fréquences de relaxation et σ est le paramètre d'étirement. Dans ce modèle la fonction de relaxation est décrite par la somme d'une exponentielle et d'une exponentielle étirée. Ce modèle a été utilisé par Atmuri et collaborateurs (Atmuri and Bhatia, 2013) pour décrire le comportement d'une dispersion de Laponite, un colloïde à forme de disque anisotrope, dans une solution saline d'acide polyacrylique. Dans ces conditions il y a la formation de « clusters » de nanoparticules qui peuvent se trouver en phase fluide (2%) ou en phase vitreuse (3%) en fonction de la quantité de Laponite. Ce système présente deux dynamiques, l'une est liée au mouvement des particules de Laponite (mode rapide) et l'autre est liée au mouvement des « clusters » de nanoparticules (mode lent).

Ce modèle nous a semblé bien adapté pour décrire une fonction d'autocorrélation qui présente deux processus de relaxation différents même si les systèmes expérimentaux sont très différents.

La figure 3.14 montre à nouveau les fonctions d'autocorrélation pour les deux exemples caractéristiques de chaque famille, à 20 mM pour le régime concentré et à 2.5 mM pour le régime dilué avec les ajustements obtenus à partir du second modèle (équation 3.9).

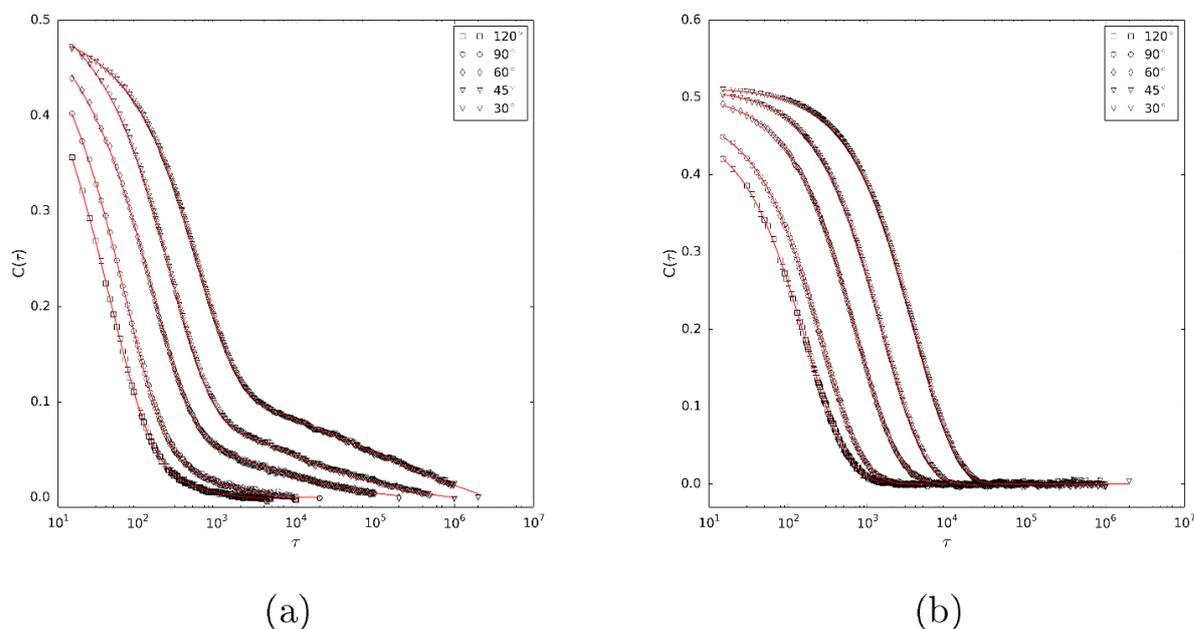


Figure 3.14. Fonctions d'autocorrélation de DLS à différents angles pour le diC18:1-dT à deux concentrations différentes, 20 mM (a) et 2.5 mM (b). Les fits obtenus avec le modèle somme de deux exponentielles (équation. 3.9) sont reportés en rouge.

On peut voir clairement qu'avec ce modèle on est capable d'ajuster correctement toutes les courbes, cependant, il faut être prudent dans l'interprétation physique des paramètres.

On peut analyser les données, en représentant dans un graphique les valeurs des deux fréquences de relaxation, Γ_1 et Γ_2 , en fonction du vecteur d'onde au carré, q^2 , comme montré dans la figure 3.15.

Comme dans l'exemple précédent (figure 3.11), la variation linéaire de Γ en fonction de q^2 indique que le processus de relaxation est de nature diffusive, la pente de la droite correspond alors au coefficient de diffusion, D , et à partir de la relation de Stokes-Einstein (équation 3.7) et considérant des objets isotropes (vésicules), on peut estimer la taille des objets.

Cela est particulièrement vrai pour le diC18:1-dT à 2.5 mM (figure 3.15b), où on est en présence de vésicules, comme montré dans les images de cryo-TEM (figure 3.7c). Les valeurs des deux fréquences de relaxation obtenues par les paramètres du fit des courbes expérimentales, correspondent donc à deux populations d'objets avec des tailles caractéristiques de 72 nm et 184 nm. Ces valeurs sont en accord avec la valeur obtenue avec le modèle des cumulants, de 101 nm.

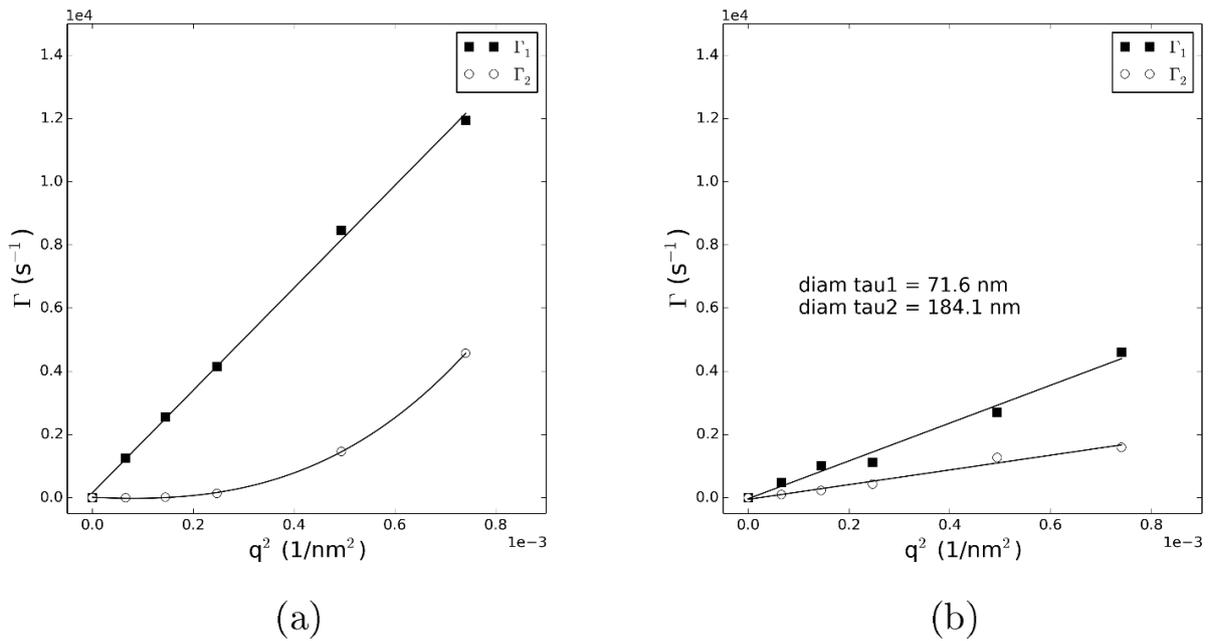


Figure 3.15. Γ_1 et Γ_2 en fonction de q^2 pour le diC18:1-dT à deux concentrations différentes, 20 mM (a) et 2.5 mM (b).

Il faut souligner que le paramètre σ , correspondant à l'exposant d'étirement, étant proche de 1, indique que le modèle en réalité est simplifié à une somme de deux exponentielles simples, et donc on décrit l'échantillon comme deux distributions de tailles. Le paramètre p nous indique le poids relatif de chaque population, il reste malgré tout difficile à interpréter parce que l'intensité diffusée est fortement dépendante de la taille des objets. En conclusion, pour la série d'échantillons du régime dilué (5mM, 2.5 mM et 1.25 mM), le modèle des cumulants est suffisant pour décrire la fonction d'autocorrélation et pour obtenir une taille caractéristique (correspond à leur diamètre hydrodynamique moyenne), pour des objets isotrope comme des vésicules,. Dans le cas du diC18:1-dT à 20 mM (figure 3.15a), on observe deux processus de relaxation différents. Un processus de relaxation rapide (Γ_1) qui varie linéairement en fonction de q^2 et est donc de nature diffusive et un processus de relaxation lent (Γ_2) qui ne varie pas linéairement avec q^2 . Dans le premier cas on est capable de déterminer grâce au coefficient de diffusion une taille caractéristique, en considérant le colloïde en mouvement comme un objet sphérique. Cette taille caractéristique correspond pour le diC18:1-dT 20 mM à 27 nm. Pour le deuxième cas, l'interprétation des données est plus difficile. La figure 3.16 montre une représentation sur une échelle log – log de Γ_2 en fonction de q^2 .

La figure montre qu'il y a deux pentes différentes en relation avec l'exposant d'étirement, σ , selon la relation (équation 3.10)

$$\Gamma_2 \propto q^{2/\sigma}$$

Equation 3.10

La première pente pour les valeurs plus petits de q correspond à $\sigma = 0.207$ et cela indique une contribution importante de l'exposant d'étirement, σ , aux plus petits angles.

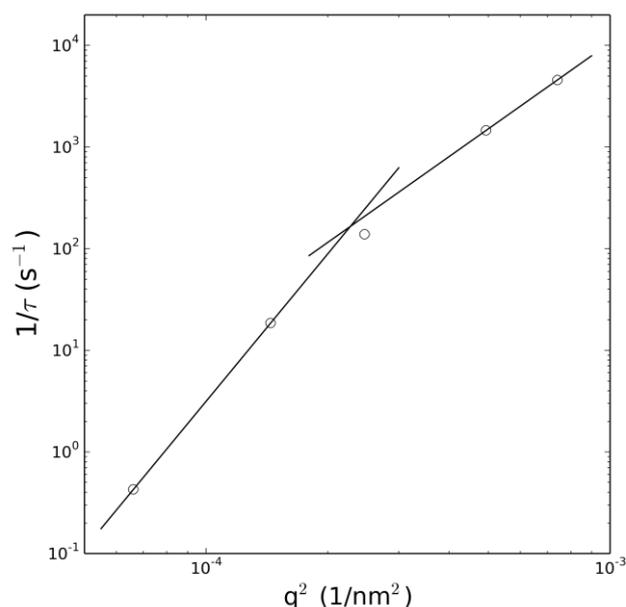


Figure 3.16. Γ_2 en fonction de q^2 pour le diC18:1-dT 20 mM.

La deuxième pente pour les valeurs plus grandes de q correspond à $\sigma = 0.355$, et cela indique que la contribution de l'exponentielle étirée devient moins importante. Cela peut être visualisé sur la figure 3.14a, où on voit qu'aux petits angles de diffusion la fonction d'autocorrélation traîne beaucoup aux temps long et cet effet devient de moins en moins évident aux grands angles.

En conclusion, pour la série d'échantillons du régime concentré (20mM, 15 mM et 10 mM), le modèle des cumulants n'est pas capable d'ajuster correctement les données et on a donc besoin d'un modèle plus complexe qui est le modèle de la somme de deux exponentielle dont une étirée. Ce modèle nous permet d'ajuster les courbes, cependant l'interprétation physique est compliquée à cause de la présence de deux processus de relaxation différents, dont un rapide de nature diffusive et un deuxième lent qui n'est pas de nature diffusive et qui ne nous a pas encore été possible d'interpréter.

Il existe dans la littérature des exemples de système où les fréquences de relaxation ne sont pas linéairement dépendantes de q^2 . Dans le cas de membranes isolées, capables de tourner librement dans l'espace, il a été prévu théoriquement (Zilman and Granek, 1996) et vérifié expérimentalement (Freyssingéas et al., 1997) que la dynamique liée à la moyenne de toutes les fluctuations de la membrane a une dépendance en fonction de $q^{2/\sigma}$ où $\sigma = 2/3$. La figure 3.7a montre l'image de cryo-TEM pour le diC18:1-dT 10 mM, qui fait partie de la série du régime concentré. Dans l'image on peut voir la présence de nombreux filaments et quelque vésicule, cela indique la complexité du système et pourrait suggérer que les différents processus dynamiques pourraient être liés aux vésicules et aux filaments, mais aussi à l'interaction entre les objets qui ne sont donc pas capables de diffuser librement.

Le tableau 3.2 résume les valeurs de tailles et quelques paramètres des ajustements utilisés pour caractériser les deux régimes de concentration.

concentration (mM)	Cumulants		2 exponentielles dont 1 étiré		
	taille (nm)	polydispersité	taille 1 (nm)	taille 2 (nm)	σ moyen
20	-	-	27	-	0.26 (0.20–0.35)
15	-	-	32	-	0.38 (0.25–0.48)
10	-	-	37	-	0.51 (0.42–0.60)
5	104	0.77	58	206	0.73 (0.70–0.74)
2.5	101	0.40	72	184	0.88 (0.84–0.92)
1.25	78	0.50	70	148	0.80 (0.65–0.92)

Tableau 3.2. Valeurs des tailles caractéristiques pour le diC18:1-dT à différentes concentrations, en utilisant deux modèles (cumulants et somme de 2 exponentielles dont 1 étiré).

Cette étude en diffusion dynamique de la lumière nous a permis de confirmer le changement de morphologie, observé en cryo-TEM (figure 3.7) pour le diC18:1-dT en fonction de la concentration. En particulier on a été capable d'identifier deux régimes de concentrations différents. Parmi les différentes hypothèses faites, Baglioni et collaborateurs (Baldelli Bombelli et al., 2002) suggèrent une forte implication de la tête polaire en particulier de sa nature chimique nucléotidique qui implique des interactions qui ne sont pas limitées seulement aux répulsions électrostatiques ou au volume d'exclusion.

Une hypothèse possible pourrait être liée au fait que ce changement de morphologie en fonction de la concentration soit directement lié à un effet de force ionique, vu la faible force ionique du tampon utilisé (14 mM). Une augmentation de la concentration entre 1 mM et 20 mM pour ces molécules chargés négativement, conduit à une force ionique finale de 15 mM pour les faibles concentrations et à plus du double (34 mM) pour les plus concentrées. Pour tester cette hypothèse on a préparé deux séries de diC18:1-dT à différentes concentrations (2.5 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM) dans le tampon HEPES (50 mM, pH 7.2, I=14 mM).

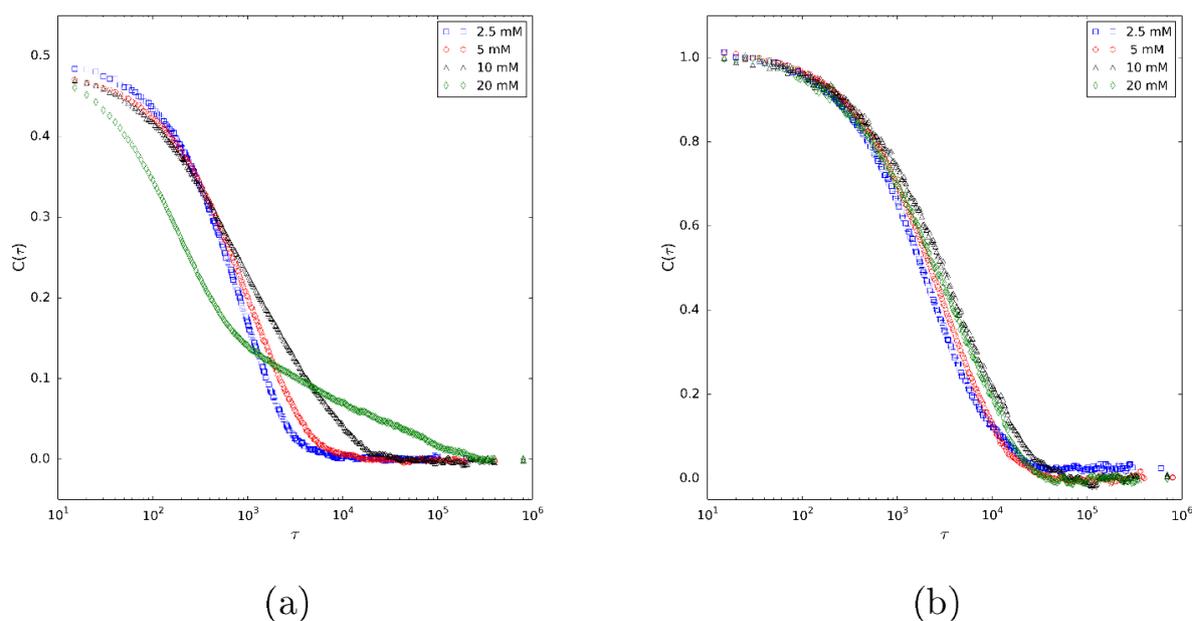


Figure 3.17. Fonctions d'autocorrélation de DLS à 60° pour le diC18:1-dT à différentes concentrations (2.5 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM) à force ionique variable (a) et à force ionique constante de 154 mM (b).

Pour la première série on n'a pas contrôlé la force ionique et dans la deuxième série on a fixé la force ionique à 154 mM (valeur physiologique).

La figure 3.17 montre les fonctions d'autocorrélation pour les deux séries à différentes concentrations de diC18:1-dT (2.5 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM) à force ionique variable (3.17a) et à force ionique constante de 154 mM (3.17b).

L'analyse qualitative des courbes montre une différence majeure en fonction de la force ionique. Pour des faibles valeurs de force ionique (16 – 34 mM, figure 3.17a) on peut identifier clairement un effet de concentration sur la fonction d'autocorrélation qui permet de classer les données en deux familles, régime dilué et régime concentré (pour le régime concentré la fonction d'autocorrélation traîne aux temps longs). Pour des valeurs de force ionique plus élevées (154 mM, figure 3.17b), l'effet de concentration disparaît.

Cela pourrait suggérer qu'il y a bien un effet de force ionique qui a un impact important sur la forme des molécules et donc sur la structure des objets formés. Cependant il faut rester prudent et continuer l'étude de façon plus systématique à différentes forces ioniques, cela pourrait nous indiquer à quelle valeur de force ionique l'effet de concentration est le plus important.

Le tableau 3.3 résume les valeurs des diamètres déterminés à partir des paramètres du fit selon le modèle des cumulants des fonctions d'autocorrélation et les valeurs de polydispersité moyenne.

concentration (mM)	taille (nm)	polydispersité	I (mM)
2.5	129	0.34	16.5
5	123	0.66	19
10	-	-	24
20	-	-	34
2.5	220	0.78	154
5	237	0.78	154
10	260	0.90	154
20	292	0.95	154

Tableau 3.3. Valeurs des tailles caractéristiques pour le diC18:1-dT à différentes concentrations et à différentes forces ioniques en utilisant le modèle des cumulants (les valeurs ne sont pas reportées pour les courbes pas bien ajustées).

Les données suggèrent qu'à des forces ioniques plus importantes la taille des objets augmente ainsi que leurs polydispersité. Cela est bien en accord avec le fait qu'à des forces ioniques plus élevées, les têtes polaires chargées négativement peuvent se rapprocher et cela conduit à une diminution de la surface occupée par la tête polaire sans pour autant changer le volume de la partie lipidique. Ces petites modifications sur le paramètre de « packing » peuvent favoriser la formation de membrane moins courbées et donc de vésicules plus grandes.

Une deuxième hypothèse qu'on a faite par rapport aux différentes morphologies des objets en fonction de la concentration est liée à la cinétique d'hydratation.

Peut-être que les échantillons du régime concentré ont besoin de plus de temps pour arriver à l'équilibre thermodynamique. On a donc étudié l'effet du vieillissement des échantillons et on a effectué des mesures de DLS à trois temps différents, J0, J15 et J30. La figure 3.18 montre les différentes fonctions d'autocorrélation pour les trois temps pour les trois échantillons du régime concentré et un échantillon du régime dilué.

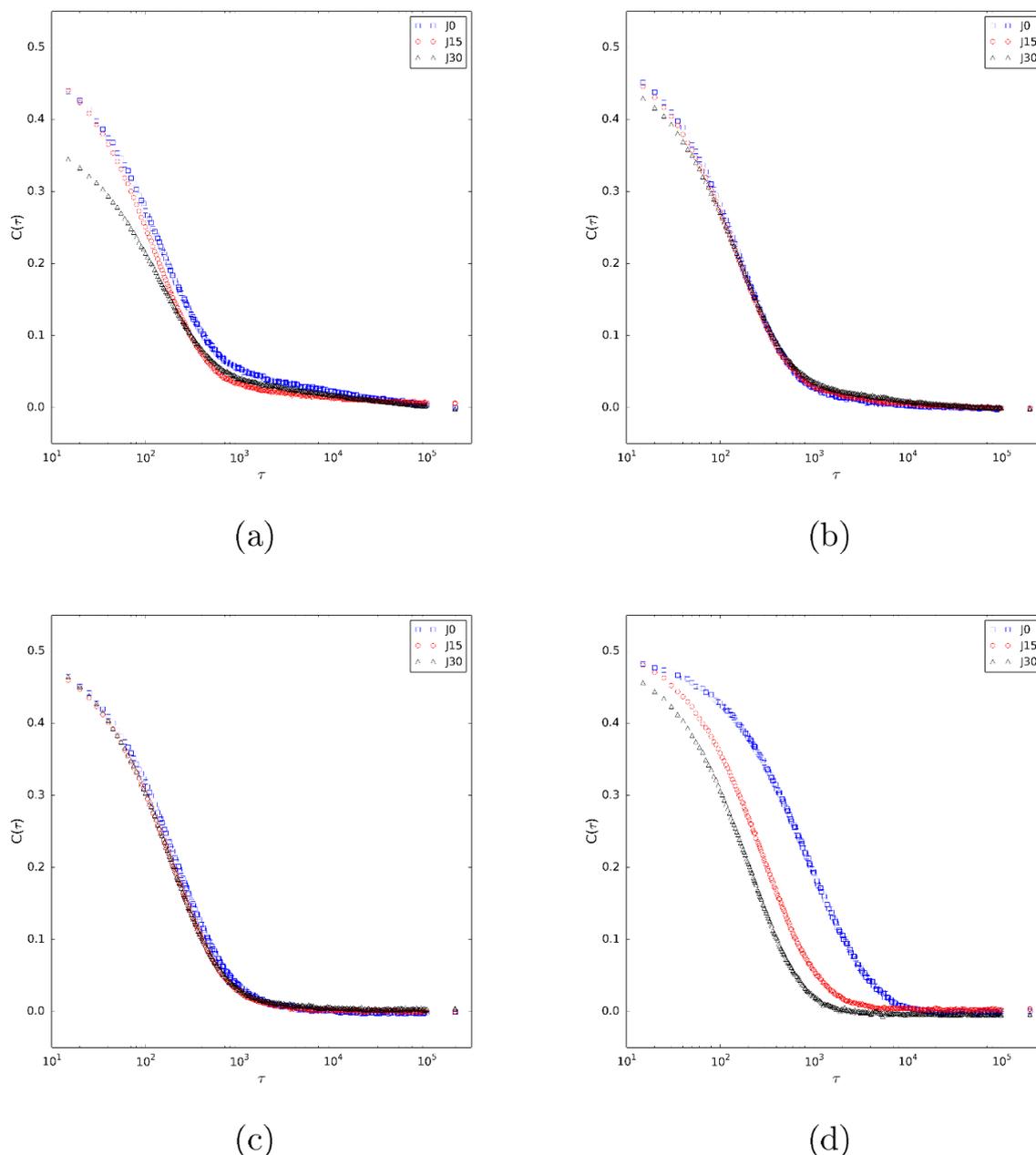


Figure 3.18. Fonctions d'autocorrélation de DLS à 60° pour le diC18:1-dT à différentes concentrations : 20 mM (a), 15 mM (b), 10 mM (c) et 5 mM(d). Les courbes ont été enregistrées à J0, J15 et J30.

Les images montrent que même si il y a des petites évolutions il n'y a pas de changement général de la forme de la fonction d'autocorrélation. L'effet le plus important est observé pour l'échantillon à 5 mM, où la fonction d'autocorrélation se déplace vers les temps plus rapides

et cela implique qu'il y a une diminution de la taille des objets. Cependant comme montré dans la figure 3.19 pour les échantillons plus dilués (2.5 mM et 1.25 mM) on a observé une dégradation du signal en DLS.

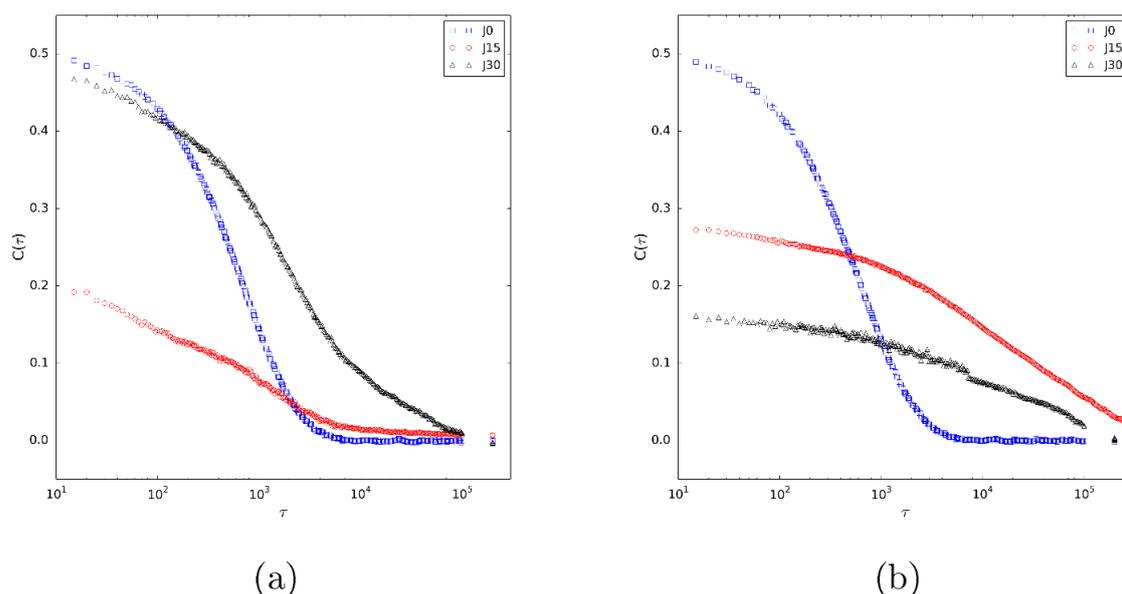


Figure 3.19. Fonctions d'autocorrélation de DLS à 60° pour le diC18:1-dT à 2.5 mM (a) et 1.25 mM(d). Les courbes ont été enregistré à J0, J15 et J30.

Cela correspond à une dégradation au niveau moléculaire des molécules qui a provoqué une déstructuration des objets et qui n'a pas donc permis de faire une acquisition correcte des fonctions d'autocorrélation. Cette dégradation a été confirmée par RMN du ^1H et du ^{31}P . On peut observer cette perte de structure sur les images de cryo-TEM pour l'échantillon plus dilué (figure 3.7d).

En conclusion de ce chapitre, l'étude morphologique des systèmes faite par microscopie électronique (cryo-TEM) et diffusion dynamique de la lumière (DLS), nous a permis de montrer que les NLs et les ANLs sont capables de s'autoassembler pour former des objets supramoléculaires. Pour tous les systèmes, à une concentration donnée, on observe la formation de vésicules (figure 3.5). La présence de l'acide aminé a un impact important sur la tête polaire de ces molécules et conduit à la formation de structures multilamellaires, cela grâce à la modification du paramètre de « packing » et donc à la modification de la courbure spontanée et/ou grâce à la présence d'interactions intermoléculaire importantes au niveau des têtes polaires. La DLS nous permis dans ce cas d'estimer avec une bonne statistique la taille des objets formés. Une étude plus systématique pour le diC18:1-dT, en fonction de la concentration, a mis en évidence à travers la cryo-TEM et la DLS la présence de structures avec une morphologie différente en fonction de la concentration. En particulier les systèmes plus concentrés présentent des morphologies de type filament dont on n'a pas encore identifié la structure et la dynamique. Ce changement de morphologie est moins évident à des forces ioniques élevées et ne dépend pas de la cinétique d'hydratation

3.4 Partie expérimentale

3.4.1 Microscopie à contraste de phase

Une goutte d'échantillon (5 μl) est déposée sur une lame de verre de microscopie et tout de suite recouverte par une lamelle en verre. Les échantillons ont été observés dans un microscope à contraste de phase Axiovert S-100 (ZEISS) avec un objective de 63x. Le microscope est couplé à une camera CCD High Performance 4912 (COHU). Les images et les vidéos ont été enregistrées par le logiciel Scion image et analysées par le logiciel Image J.

3.4.2 Cryo-TEM

Les expériences de cryo-TEM ont été effectuées en collaboration avec Cédric Gaillard, de l'unité INRA UR 1268 Biopolymères Interactions Assemblages à Nantes.

Les échantillons pour l'observation en cryo-TEM ont été préparés en utilisant une station automatique de congélation CP3 Cryoplunge (Gatan) dans laquelle une microgoutte de dispersion de l'échantillon est déposée sur une grille TEM recouverte d'un film mince à trou en carbone (Ted Pella). La grille est ensuite épongée avec du papier filtre pour enlever l'excès de liquide et former ainsi une couche mince de liquide, qui est ensuite vitrifiée, plongeant rapidement la grille dans de l'éthane liquide ($-178\text{ }^{\circ}\text{C}$) refroidit par de l'azote liquide. Les échantillons vitrifiés sont montés sur un support Gatan 910 qui est inséré dans le microscope à travers un système de cryotransfer CT-35000 (Gatan) et refroidit par l'azote liquide. Les images de microscopie électronique sont alors obtenues en observant les échantillons conservés dans la glace vitrifiée et suspendus dans les trous du film de carbone. Les échantillons sont alors observés dans des conditions de bas dosage ($<10\text{ e}^{-}/\text{\AA}^2$), à $-178\text{ }^{\circ}\text{C}$, en utilisant un cryomicroscope JEM-1230 (Jeol) qui travaille à 80 kV. Il est équipé d'un filament LaB6. Toutes les images sont enregistrées avec une camera CCD Gatan 1.35 K x 1.04 K x 12 bit ES500-W.

3.4.3 Diffusion dynamique de la lumière

Les expériences de diffusion dynamique de la lumière ont été effectuées avec un appareil Brookhaven (BI 9000AT digital correlator et BI 200 SM goniometer). Le signal a été détecté par un tube photomultiplicateur EMI 9863B/350, positionné à différents angles (30° , 45° , 60° , 90° , 120°) par rapport au faisceau de lumière incidente sur l'échantillon. Le diaphragme a été choisi en fonction de l'intensité du signal enregistré (150 μm , 200 μm , 400 μm). La source de lumière a été un laser diode (532 nm), polarisé linéairement dans la direction verticale. Un temps d'acquisition de 3 minutes a été utilisé pour chaque mesure. La température pour tous les expériences a été de 20°C . Les tubes échantillons ont été remplis avec 700 μl de dispersion de particules et immergés, pendant la mesure, dans un bain thermostaté de decaline (decahydronaphtalène), pour mieux accorder les indices de réfraction. Les fonctions d'autocorrélation de la lumière diffusée ont été enregistrées et analysés avec, notamment, la méthode des cumulants.

4 Structure des systèmes

4.1 Introduction

Dans le chapitre précédent on a étudié les caractéristiques morphologiques des NLs et ANLs, la forme et la taille. Les expériences de cryo-TEM ont aussi montré la formation de structures lamellaires pour les ANLs. Ce chapitre a pour objectif de décrire les études conduites pour investiguer la structure des objets. Ces études seront organisées en trois parties principales : la première partie sur l'étude de la fluidité des bicouches, la deuxième partie sur l'étude de la structure et la troisième partie sur l'effet du calcium sur ces structures. Les techniques utilisées seront la calorimétrie différentielle à balayage et les rayons X aux grands angles pour l'étude de la fluidité des membranes et les rayons X aux petits angles pour les études structurales.

4.2 Fluidité membranaire

Les lipides amphiphiles dans l'eau forment spontanément des agrégats microscopiques avec leurs parties hydrophobes en contact les unes avec les autres et les parties hydrophiles en contact avec l'eau. Cela minimise la surface hydrophobe exposée, et donc le nombre de molécules d'eau ordonnées présentes à l'interface lipides-eau, causant une augmentation de l'entropie. Les interactions hydrophobes sont donc la force motrice thermodynamique qui permet la formation et la stabilisation de ces agrégats. En fonction de la nature des lipides et des conditions physico-chimiques du système, différents type d'agrégats peuvent se former. Les micelles (figure 4.1a) sont des structures sphériques qui présentent les parties hydrophobes vers l'intérieur, et les parties hydrophiles à la surface en contact avec l'eau. Ces structures sont favorisées quand l'aire de la section de la tête polaire est plus grande que celle de la partie hydrophobe. Un deuxième type de structure sont les bicouches (figure 4.1b), dans lesquelles une bicouche de lipides forme un feuillet bidimensionnel où les chaînes hydrophobes interagissent entre eux. Dans ce cas, la courbure spontanée de l'objet est nulle. Ces structures sont favorisées quand l'aire de la section de la tête polaire est similaire à celle de la partie hydrophobe. Les bicouches peuvent être instables et peuvent se plier pour former des sphères creuses appelées vésicules (figure 4.1c). La forme sphérique évite la présence de parties hydrophobes en contact direct avec l'eau.

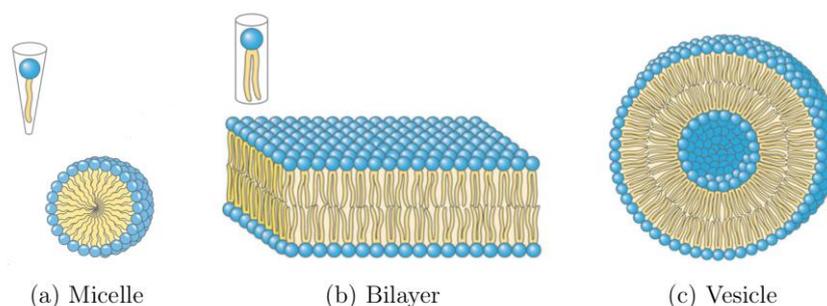


Figure 4.1. Agrégats de lipides amphiphiles dans l'eau. Adapté depuis (Nelson et al., 2008).

4.2.1 Calorimétrie différentielle à balayage

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) est une technique d'analyse thermique qui est utilisée pour étudier les transitions de phase thermotropes. La technique est bien adaptée pour étudier les transitions de phase dans les membranes lipidiques parce qu'elle est très sensible et l'échantillon est analysé tel quel sans préparation préalable. Le principe de la technique implique le chauffage (ou refroidissement) simultané de l'échantillon et d'une référence inerte, qui est normalement un matériel comparable en termes de masse et de capacité thermique, qui ne produit pas des phénomènes thermotropes dans le domaine de température d'intérêt et à la vitesse de chauffage du calorimètre. Le calorimètre est différentiel parce qu'il est conçu pour pouvoir mesurer la différence de flux de chaleur entre l'échantillon et la référence inerte. La température initiale de l'expérience est normalement éloignée du phénomène thermotrope qu'on veut étudier, les températures de l'échantillon et de la référence changeront alors de façon linéaire avec l'augmentation (ou la diminution) de la température. La différence entre les deux cellules sera donc constante et sera enregistrée par l'ordinateur comme une ligne de base horizontale. Pendant le phénomène thermotrope le calorimètre enregistre une différence thermique entre les deux cellules. Principalement, il existe deux types de calorimètres : à compensation de puissance ou à flux de chaleur. Dans le premier système les températures de l'échantillon et de la référence peuvent être contrôlées et variées de façon indépendante l'une de l'autre. L'appareil est programmé pour maintenir les deux cellules à la même température et pour enregistrer l'énergie nécessaire à faire cela. Dans le calorimètre à flux de chaleur, les deux cellules sont en contact avec la même source de chaleur, et l'appareil enregistre passivement les variations de flux de chaleur dans la cellule échantillon. Les deux types de systèmes enregistrent la différence de flux de chaleur entre la cellule échantillon et la cellule référence, sous forme de déviations endothermiques ou exothermiques de la ligne de base. A la fin du phénomène thermique le système revient à la ligne de base et dessine un graphique où la différence de flux de chaleur est reportée en fonction de la température. L'analyse de la courbe peut nous fournir les températures et l'enthalpie des transitions de phase.

Pour pouvoir mesurer les transitions de phase et étudier la fluidité membranaire de nos systèmes, on les a d'abord formulés comme décrit dans le chapitre précédent (dispersion aqueuse jusqu'à complète hydratation). La mesure de la faible énergie nécessaire pour la transition a été réalisée avec un microDSC. La microDSC possède un capteur tridimensionnel constitué d'une série de thermocouples qui entourent les cellules de mesure dans les trois dimensions. Le volume d'une cellule est de 0.8 ml. Cela confère une haute sensibilité et une bonne précision à l'appareil. Cela permet aussi d'utiliser des volumes plus importants d'échantillon et d'utiliser des vitesses de balayage réduites. L'ensemble de ces caractéristiques permet d'étudier des phénomènes faiblement enthalpique, difficilement observable en DSC classique.

Le protocole thermique est décrit en détail dans la partie expérimentale. On a réalisé des cycles de chauffage et de refroidissement entre 10° C et 55° C à la vitesse de 0.5° C/min. L'utilisation de ces températures a été conditionnée par le fait d'avoir des dispersions aqueuses. Pour des températures inférieures à 0°C on aurait eu la cristallisation de l'eau et pour des températures supérieures à 60-70° C la pression à l'intérieur des cellules de mesure, à cause de l'évaporation de l'eau pouvait atteindre des valeurs élevées. De plus, à ces

températures élevées, il pouvait y avoir une possible dégradation de la molécule. La stabilité des molécules a été vérifiée par chromatographie sur couche mince à la fin de l'expérience. Les courbes pour les NLs et ANLs avec des chaînes dioleoyl ne sont pas montrées parce qu'il n'a pas été observé de transition. Cela a été montré pour les analogues phospholipidiques avec des chaînes oleoyl (DOPC), comme montré dans le tableau dans la section 1.5, ou sont reportées des T_m en dessous de 0 °C. Le diC14-dT ne présente pas de pic de transition de phase dans la gamme de températures analysée. En revanche le diC14-dT-Gly présente un pic à 22.1 °C avec une enthalpie de transition de 29.4 kJ/mol. La figure 4.3 montre la courbe obtenue pour le diC14-dT-Gly.

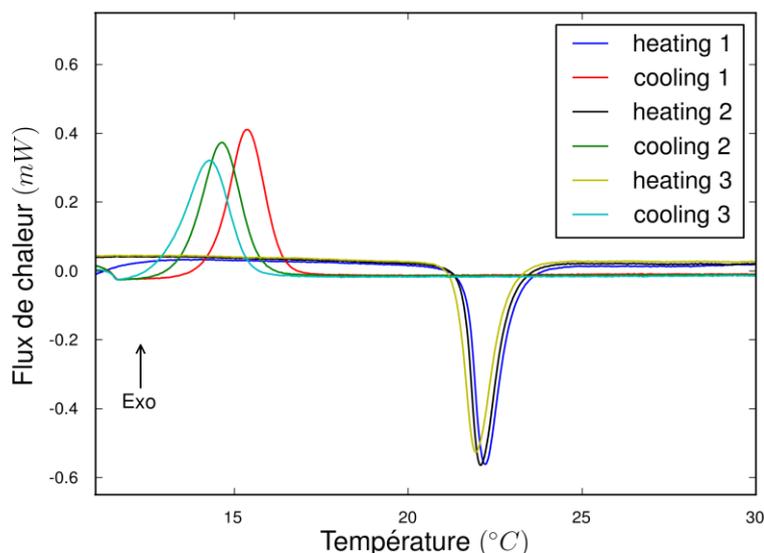


Figure 4.3. Courbe DSC pour le diC14-dT-Gly. Trois cycles de chauffage et de refroidissement entre 10 °C et 55 °C à 0.5 °C/min.

On peut observer la reproductibilité de la transition de phase pendant l'étape de chauffage. On observe aussi le phénomène d'hystérésis thermique pendant la phase de refroidissement. Ce mécanisme est associé à la présence d'états métastables et il est caractéristique des transitions de phase du premier ordre. Le déplacement du pic de cristallisation vers les basses températures pourrait dépendre de l'élimination des défauts et d'impuretés présentes dans les bicouches avec les différents cycles thermiques, cela implique aussi des conséquences sur la cinétique de la transition qui se traduit par un élargissement du pic. L'intégration de la surface du pic donne l'enthalpie de transition, la valeur trouvée est de 29.4 kJ/mol et est en bon accord avec les valeurs présentes dans la littérature pour le DMPC (24 kJ/mol) (Koynova and Caffrey, 1998). Le même comportement a été observé pour un autre ANLs, le diC14-dT-Phe (données non montrées), avec une T_m de 18.7 °C et une enthalpie de transition de 28.5 kcal/mol.

En conclusion, l'analyse thermique pour les différents systèmes n'a pas montré de transition pour les molécules (NLs et ANLs) avec des chaînes insaturées de type oleoyl. En revanche elle a montré un pic de transition pour les ANLs avec des chaînes de type miristoyl autour de 20 °C, cela a été observé avec deux types différents d'acides aminés (Gly et Phe) et semble indiquer la présence du groupe amino dans la tête polaire comme responsable majeur de l'organisation des lipides dans la bicouche par rapport à la nature chimique des résidus acide

aminés. Le diC14-dT, par contre, montre un comportement surprenant, parce que contrairement à ses analogues ANLs, il ne montre aucune transition dans la gamme de température étudiée. Les raisons pourraient être une cinétique très lente et donc une transition étendue sur une grande plage de température. La nature chimique de la tête polaire, chargée négativement par la présence du groupe phosphate, et par la présence de la thymine (à cause de son hydrophobicité), pourrait perturber l'organisation de la membrane. Des études structurales complémentaires, qui seront présentées dans la section suivante, seront donc nécessaires pour comprendre l'organisation de la membrane.

4.2.2 Diffusion des rayons X aux grands angles

La technique de diffusion des rayons X fait partie des techniques de diffusion des radiations électromagnétiques. Dans la diffusion de la lumière, comme décrit dans le chapitre 3, la radiation incidente à une longueur d'onde comprise entre 400 nm et 700 nm, capable d'interagir avec des objets de taille similaire. Cela nous permet d'étudier la taille des objets colloïdaux. Les rayons X possèdent une longueur d'onde comprise entre 0.02 nm et 0.2 nm. Ils sont donc l'outil idéal pour caractériser la structure des molécules et des agrégats supramoléculaires.

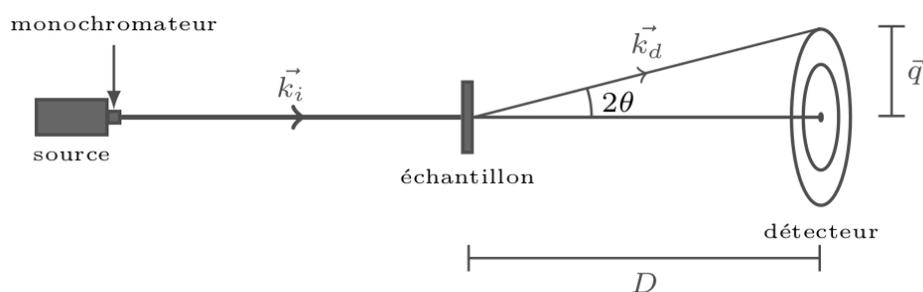


Figure 4.4. Schéma sur le principe de la diffusion des rayons X. \vec{k}_i , vecteur d'onde incidente, \vec{k}_d , vecteur d'onde diffusé, \vec{q} vecteur de diffusion, 2θ angle de diffusion, D distance échantillon – détecteur.

La figure 4.4 montre le principe de la diffusion de rayons X, un faisceau monochromatique avec une longueur d'onde, λ_i , et vecteur d'onde, \vec{k}_i , illumine un échantillon et la radiation diffusée (λ_d , \vec{k}_d) est analysée en fonction de l'angle de diffusion 2θ . Les modules des vecteurs d'onde incidente et diffusé sont définis dans l'équation 4.1 :

$$|\vec{k}_i| = \frac{2\pi n}{\lambda_i} \qquad |\vec{k}_d| = \frac{2\pi n}{\lambda_d}$$

Equation 4.1

avec λ_i et λ_d la longueur d'onde dans le vide des faisceau incident et diffusé et n l'indice de réfraction du milieu (très proche de 1).

L'intensité de diffusion dans une direction arbitraire est définie par le vecteur de diffusion \vec{q} (équation 4.2):

$$\vec{q} = \vec{k}_i - \vec{k}_d$$

Equation 4.2

Dans le cas d'une diffusion élastique (sans transfert d'énergie) des rayons X, les modules des deux vecteurs d'onde ont les mêmes valeurs (équation 4.3):

$$|\vec{k}_i| = |\vec{k}_d|$$

Equation 4.3

En combinant les équations précédentes (4.1, 4.2, 4.3) on peut écrire le module du vecteur de diffusion comme fonction de l'angle de diffusion (équation 4.4):

$$|\vec{q}| = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin(\theta)$$

Equation 4.4

L'intensité diffusée mesurée peut être décrite, de façon générale, par l'équation 4.5 :

$$I(q) = N * \Delta\rho_{el}^2 * P(q) * S(q)$$

Equation 4.5

avec N le nombre d'objets diffusants et $\Delta\rho_{el}$ le contraste de densité électronique par rapport au milieu. $P(q)$ est le facteur de forme qui correspond à l'autocorrélation au sein d'un objet et contient des informations sur sa forme, $S(q)$ est le facteur de structure qui correspond aux corrélations entre objets distincts et contient des informations sur leur organisation. L'utilisation de la diffusion des rayons X aux grands angles permet donc d'accéder à des valeurs de vecteur de diffusion, $q = 22 \text{ nm}^{-1}$, qui correspondent à des distances dans l'espace réel de 0.29 nm. Cela permet des études structurales au niveau atomique et il est particulièrement adapté pour étudier les corrélations entre les chaînes lipidiques et peut être également utilisé pour étudier la fluidité des membranes. Ces expériences, conduites au Centre Recherche Paul Pascal, Pessac, ont utilisé comme source de rayons X une anode tournante de longueur d'onde de radiation $\lambda=0.154 \text{ nm}$. Le détecteur a été placé à la distance de 103 mm pour pouvoir accéder à des grands angles de diffusion. Les capillaires des échantillons étaient insérés à l'intérieur d'un support thermostaté. La détermination de la distance échantillon – détecteur et des coordonnées du centre du faisceau ont été effectuées après enregistrement du diffractogramme de behenate d'argent (BeAg, sel d'argent d'un acide gras C22), normalement utilisé comme standard pour la calibration.

La figure 4.5 montre les diffractogrammes obtenus pour différents NLs et ANLs à 27 °C, à la concentration de 5 mM.

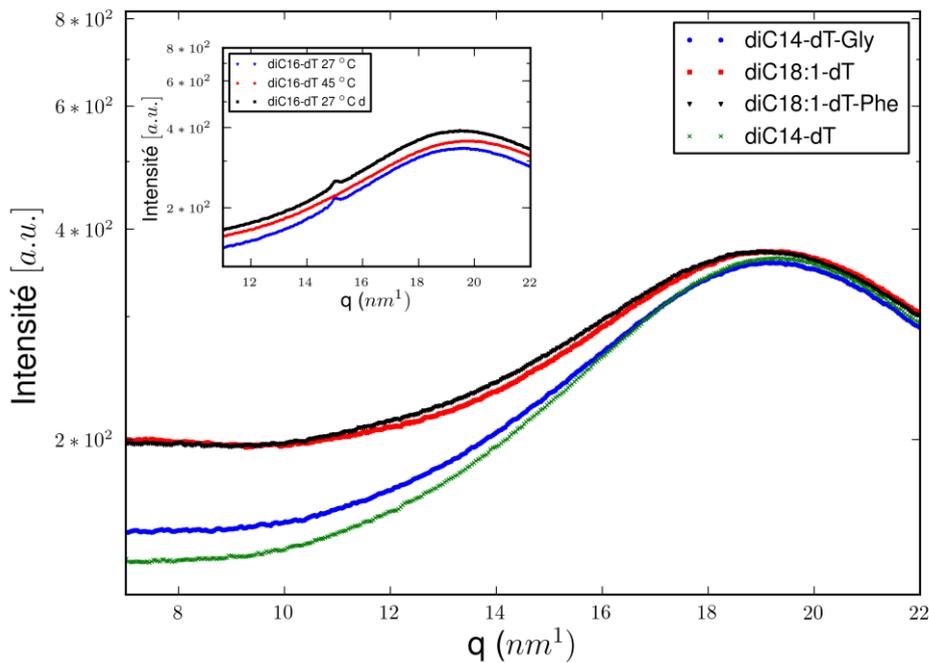


Figure 4.5. Spectres de rayons X (WAXS) obtenus pour différentes NLs et ANLs à 27°C. Les échantillons sont à 5 mM dans le tampon HEPES (50 mM, pH 7.2). L' « inset » montre les spectres WAXS obtenus pour le diC16-dT (10 mM) à différentes températures (27 °C et 45 °C).

Les profils des WAXS pour tous les échantillons montrent la présence d'un seul large pic à 19 nm^{-1} , cela correspond aux corrélations entre les molécules d'eau et il est caractéristique des solutions aqueuses.

Dans les diffractogrammes, il n'est pas possible d'observer le pic correspondant à une phase fluide des bicouches à cause de la concentration relativement faible des NLs et ANLs (5 mM). L'absence d'un pic fin vers 15 nm^{-1} suggère que la bicouche est en phase « fluide » ($L\alpha$). Il est montré dans l' « inset » de la figure 4.5 une transition de phase, $L\beta \rightarrow L\alpha$, observée pour le diC16-dT, un analogue de NLs étudié dans ce travail. Le diC16-dT, se trouve à la concentration de 10 mM dans le tampon HEPES (50 mM, pH 7.2) montre un pic en DSC vers 37 °C (T_m). Pour étudier la fluidité de la membrane, on a enregistré un diffractogramme WAXS à la température de 27 °C , 45 °C et à nouveau 27 °C . Dans l' « inset » de la figure 4.5, on peut observer la présence d'un pic vers 15 nm^{-1} pour une température inférieure à la T_m . Pour des températures supérieures à la T_m on observe la disparition du pic qui peut réapparaître si on refroidit le système à nouveau à des températures inférieures de la T_m . Cela nous permet de conclure qu'on est capable d'étudier la transition de phase, même pour des concentrations relativement faibles de lipides et donc affirmer que les NLs et les ANLs étudiés dans ce travail sont fluides à température ambiante. Cependant le diC14-dT-Gly a montré un pic à 22 °C , cela pourrait indiquer que la transition de phase se fait à des températures plus basses. On a effectué une étude WAXS en fonction de la température avec des cycles thermiques et on a enregistré des diffractogrammes à 11 °C , 27 °C et à nouveau à 11 °C . Les diffractogrammes (non montrés) ne présentent pas de différence. Ces résultats

pourraient suggérer que le pic observé en DSC ne correspond pas à une transition de phase de type $L\beta \rightarrow L\alpha$,

La conclusion de cette partie sur l'étude de la fluidité des membranes est que, après la caractérisation par DSC et WAXS, les bicouches lipidiques dans les structures formées par les NLs et ANLs sont fluides à la température ambiante (25 °C). L'étape suivante sera d'étudier par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS), la structure des objets formés par les NLs et ANLs.

4.3 Caractérisation structurale par diffusion des rayons X aux petits angles

Dans la section précédente on a présenté les études de fluidité de la membrane qui nous permettent d'avoir des informations structurales sur la corrélation entre les chaînes lipidiques dans la membrane. On a présenté les principes de la diffusion des rayons X et montré que cela pouvait nous fournir des informations sur la corrélation entre les différents éléments constituent les objets supramoléculaires. L'analyse du signal diffusé aux différents angles de diffusion nous donne des informations à différentes échelles dans l'espace réel, comme montré dans l'équation 4.4. Pour des grand angles de diffusion, WAXS, ($q = 10\text{-}20 \text{ nm}^{-1}$) on a des informations dans l'espace réel à niveau atomique (0.3-0.6 nm), pour des petits angles de diffusion, SAXS, ($q = 0.05\text{-}5 \text{ nm}^{-1}$) on a des informations dans l'espace réel au niveau moléculaire et colloïdale (1.2-120 nm). La diffusion des rayons X aux petits angles est l'outil idéal pour étudier la forme et l'organisation moléculaire des objets supramoléculaires.

Les sources de rayons X utilisées pour l'étude de SAXS ont été la radiation synchrotron et une source conventionnel de laboratoire. Les expériences synchrotron ont été conduits sur la ligne SWING du synchrotron SOLEIL à Saclay (proposal n° 20120613). Les expériences avec la source conventionnelle ont été conduits sur un NANOSTAR Bruker au Centre de Recherche Paul Pascal à Pessac. La figure 4.6 montre une schématisation de la ligne SWING-SOLEIL.

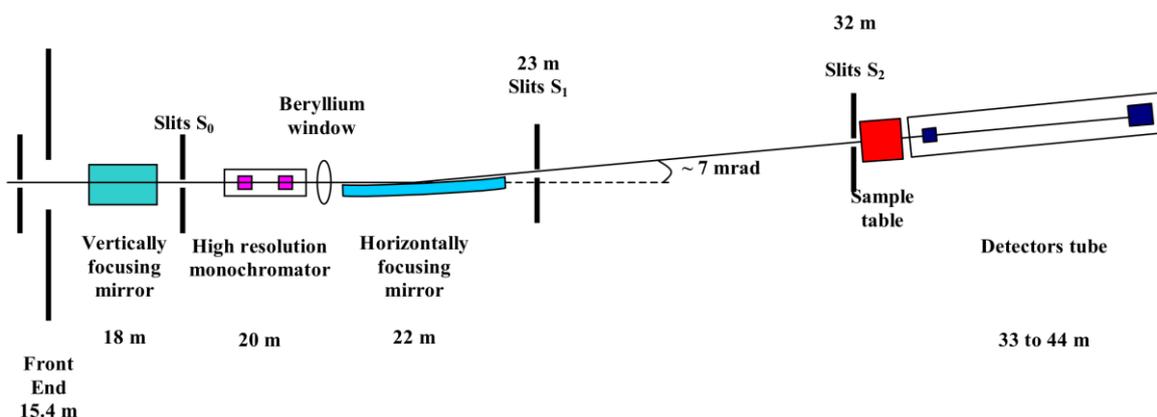


Figure 4.6. Schéma générale de la ligne SWING-SOLEIL.
Adaptée depuis la notice de la page web SWING-SOLEIL.

L'utilisation d'une source synchrotron par rapport à une source conventionnelle possède plusieurs avantages, notamment au niveau de l'intensité de la radiation, de la résolution et du temps d'acquisition. De plus par rapport au détecteur on a la possibilité d'accéder à une

gamme de valeurs de q plus importante. Ces caractéristiques sont assez importantes pour des échantillons relativement dilués comme dans notre cas. Les détails techniques des conditions expérimentales seront donnés dans la partie expérimentale. La longueur d'onde de la radiation utilisée était $\lambda = 0.103$ nm. Si on considère la distance échantillon – détecteur utilisée (1.58 m) la gamme de q accessibles a été $0.07 - 7$ nm⁻¹. Les capillaires contenant les échantillons étaient insérés dans un support dans lequel il y avait un liquide pour contrôler la température à 25 °C.

La figure 4.7 montre la configuration du NANOSTAR Bruker, la source conventionnelle de rayons X utilisée au laboratoire.

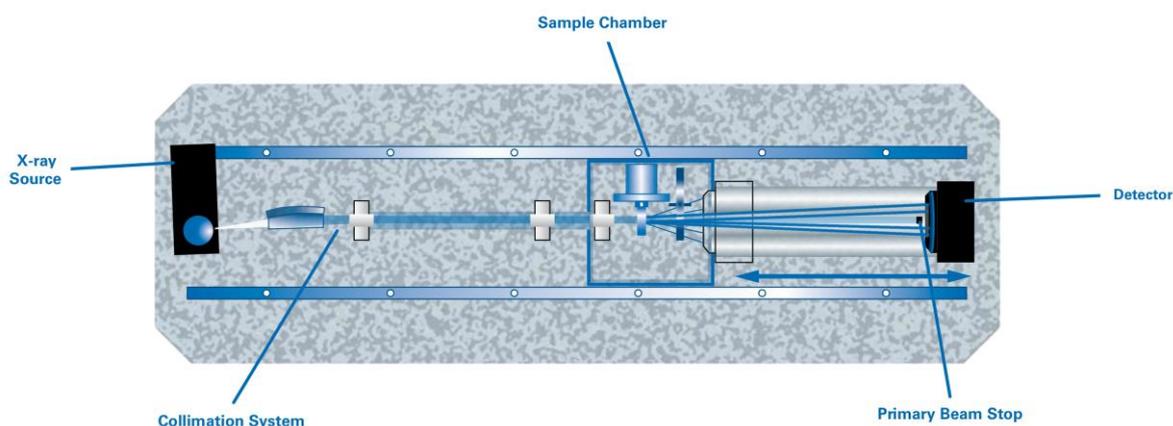


Figure 4.7. Configuration du montage NANOSTAR Bruker. Adaptée de la brochure NANOSTAR Bruker.

Ce système, bien que moins puissant d'un synchrotron permet facilement l'acquisition de diffractogrammes SAXS. Le système est sous vide pour éviter la diffusion des particules présentes dans l'air et il utilise un système de collimation à 3 pin-holes pour garantir un faisceau de rayons X parallèle possédant une bonne intensité. De plus le détecteur est basé sur un système à gaz de façon à avoir un niveau de bruit très faible. Toutes ces caractéristiques font que l'appareil est capable de fournir des diffractogrammes avec un bon rapport signal sur bruit. La chambre échantillon permet l'utilisation d'un passeur d'échantillons. Le support pour les capillaires était thermostaté à 25 °C. La distance entre le détecteur et l'échantillon peut varier entre 250 et 1050 mm et donner accès à des valeurs de q entre 0.1 et 8 nm⁻¹.

La détermination de la distance échantillon – détecteur et des coordonnées du centre du faisceau ont été effectuées, comme sur l'anode, après enregistrement d'un diffractogramme de behenate d'argent. Pour chaque série d'expérience on a enregistré le diffractogramme d'un capillaire de tampon HEPES (50 mM, pH 7.2), pour pouvoir soustraire le bruit de fond. La soustraction a effectué selon l'équation 4.6.

$$I_{corr} = \frac{I_e}{t_e} - \frac{I_b}{t_b} * f$$

Equation 4.6

Où I_e et I_b correspondent aux intensités enregistrées, t_e et t_b correspondent aux temps d'acquisition pour l'échantillon et pour le bruit et f est un facteur qui tient en compte des différences de transmission et d'autre facteur expérimentales (ex. taille des capillaires).

La résolution instrumentale, Δq , a été calculée de façon expérimentale à travers les diffractogrammes de BeAg. On peut considérer que la largeur des pics du BeAg est limitée par la résolution instrumentale. Dans ce cas une estimation de la largeur de ce pic à mi-hauteur peut être réalisée à l'aide d'une fonction gaussienne (équation 4.7).

$$I(q) = B + A \cdot \exp \left[-\frac{(q - q_n)^2}{2(\Delta q)^2} \right]$$

Equation 4.7

Où B est la ligne de base, A est l'amplitude du pic et q_n est la position du maximum. Le paramètre Δq est l'écart type de la fonction gaussienne et il est corrélé avec la largeur à mi-hauteur (FWHM, full width half max) par la relation (équation 4.8).

$$\Delta q = \frac{FWHM}{2\sqrt{2\ln(2)}}$$

Equation 4.8

La figure 4.8 montre un exemple de pic du deuxième ordre pour le BeAg. Le fit montré a été obtenu en utilisant l'équation 4.7.

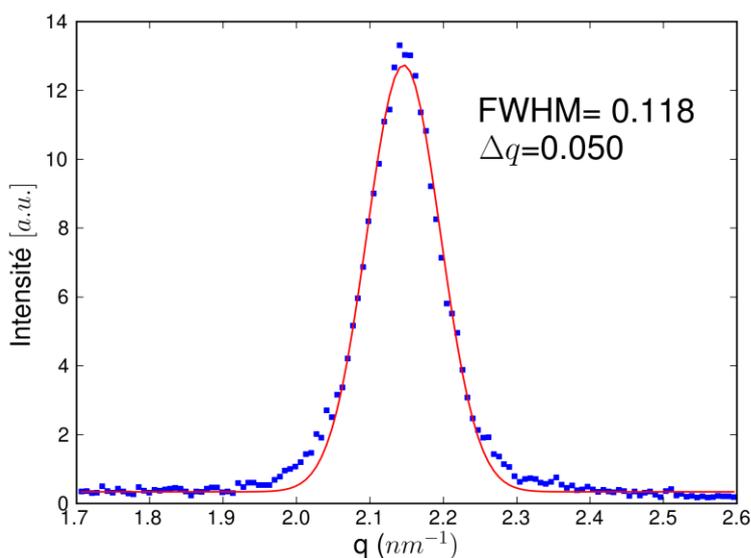


Figure 4.8. Profil SAXS pour BeAg. Pic du deuxième ordre avec le fit de une gaussienne, équation 4.7.

Il faut souligner que cette méthode pour la détermination de la résolution tend à surestimer la vraie valeur de la résolution à cause du désordre cristallin du BeAg.

Pour les systèmes qui présentent une symétrie lamellaire l'indexation des pics a été faite selon l'équation 4.9

$$q_n = (n + 1) \times q_0$$

Equation 4.9

Où n est un numéro entier et q_0 est la position du pic de premier ordre.

Comme décrit au début du chapitre, les lipides amphiphiles peuvent s'auto-assembler en différents type d'agrégats. Dans le cas de formation de bicouches, celle-ci peuvent s'empiler les unes sur les autres pour former des phases de symétries lamellaires. Une caractéristique fondamentale de ce type de structure est la capacité à incorporer du solvant (eau) entre les différentes bicouches. Plus le système est hydraté, plus grande sera l'épaisseur de la couche aqueuse, d_w . On définit la périodicité lamellaire, $d = \delta_m + d_w$, où δ_m est l'épaisseur de la bicouche, comme montré dans la figure 4.9.

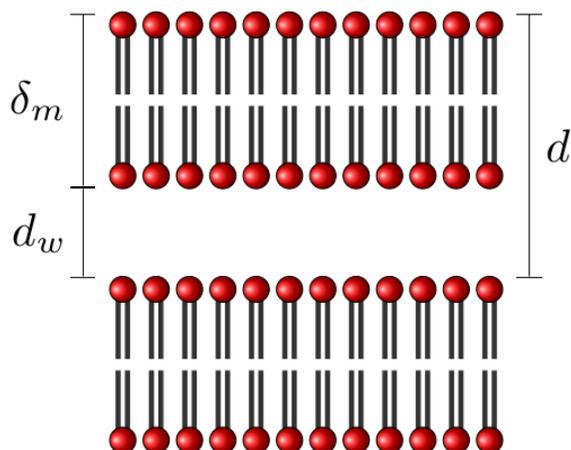


Figure 4.9. Phase lamellaire avec indication des épaisseurs caractéristiques.

La périodicité lamellaire peut être calculée selon la relation suivante (équation 4.10):

$$d = \frac{2\pi}{q_0}$$

Equation 4.10

Dans le cas de formation de structure supramoléculaires de type vésicule, on a besoin d'introduire un modèle plus complexe pour la caractérisation des agrégats. Le modèle utilisé a été décrit en détail par Nallet et collaborateurs dans (Nallet et al., 1993).

L'idée est de décrire brièvement ce modèle en mettant en évidence les paramètres physiques qu'on peut en déduire et ses limites. Ce modèle possède l'avantage mais aussi l'inconvénient d'être relativement simple (Bouglet and Ligoure, 1999). La simplicité vient du fait qu'on considère les phases lamellaires comme constituées de différentes bandes ou couches (eau, partie hydrophile, partie hydrophobe) empilées. Cela a l'avantage de pouvoir ajuster plus facilement les données, surtout pour des profils SAXS avec une gamme limitée de vecteur de diffusion, et donc de pouvoir en déduire les paramètres structuraux (Loudet-Courreges et al., 2011). Cependant, ce modèle considère les changements des profils de densité électronique, entre les différentes couches, de façon assez simplifiée (fonction créneau) et donc il donne une description de la structure de la membrane assez rudimentaire (voir figure 4.10).

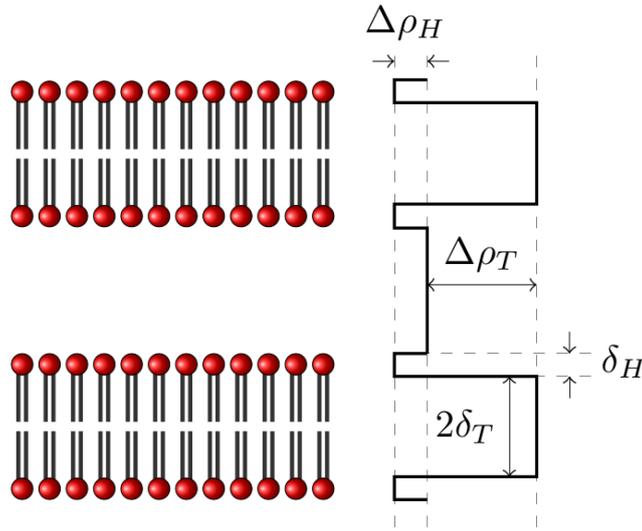


Figure 4.10. Schéma du profil de densité électronique, ρ_0 , pour les bicouches lipidiques selon le modèle de (Nallet et al., 1993).

Le facteur de forme utilisé pour ajuster les données possède trois paramètres (équation 4.11) :

$$P(q) = \frac{1}{q^4} \left\{ \sin(q\delta_T + \delta_H) - \sin(q^*[\delta_T + \delta_H]) \frac{\sin(q\delta_T)}{\sin(q^*\delta_T)} \right\}^2$$

Equation 4.11

Où δ_T et δ_H correspondent à l'épaisseur de la partie hydrophobe et de la partie hydrophile, comme définie dans le modèle à créneau de la figure 4.10. Le paramètre q^* correspond mathématiquement au premier minimum du facteur de forme dans l'espace réciproque et sa valeur peut être facilement lue dans les données expérimentales. Il est aussi corrélé physiquement au rapport des contrastes de densité électronique selon l'équation 4.12.

$$\frac{\Delta\rho_T}{\Delta\rho_H} = \frac{(\rho_T - \rho_{water})}{(\rho_H - \rho_{water})} \quad \frac{\sin(q^*[\delta_T + \delta_H])}{\sin(q^*\delta_T)} = 1 - \frac{\Delta\rho_T}{\Delta\rho_H}$$

Equation 4.12

Dans les cas où les pics de Bragg sont visibles, un facteur de structure, $S(q)$, avec un nombre fini de bicouches empilées et avec des distorsions élastiques, est utilisé (équation 4.13).

$$S(q) = 1 + 2 \sum_1^{N-1} \left(1 - \frac{n}{N}\right) \cos\left(\frac{q_z dn}{1 + 2\Delta q^2 d^2} \alpha(n)\right) \times \\ \times \exp\left(\frac{-2q_z^2 d^2 \alpha(n) + \Delta q^2 d^2 n^2}{2(1 + 2\Delta q^2 d^2 \alpha(n))}\right) \times \frac{1}{\sqrt{1 + 2\Delta q^2 d^2 \alpha(n)}}$$

Equation 4.13

Les paramètres physiques qui peuvent être déterminés sont la périodicité lamellaire, d , le nombre de bicouches empilées, N , et le paramètre de Caillé, η , contenu dans le terme $a(n)$. Ce paramètre décrit la force du désordre thermique et donc la largeur et l'amortissement du pic de Bragg.

Le modèle complet peut être écrit dans sa forme finale (équation 4.14)

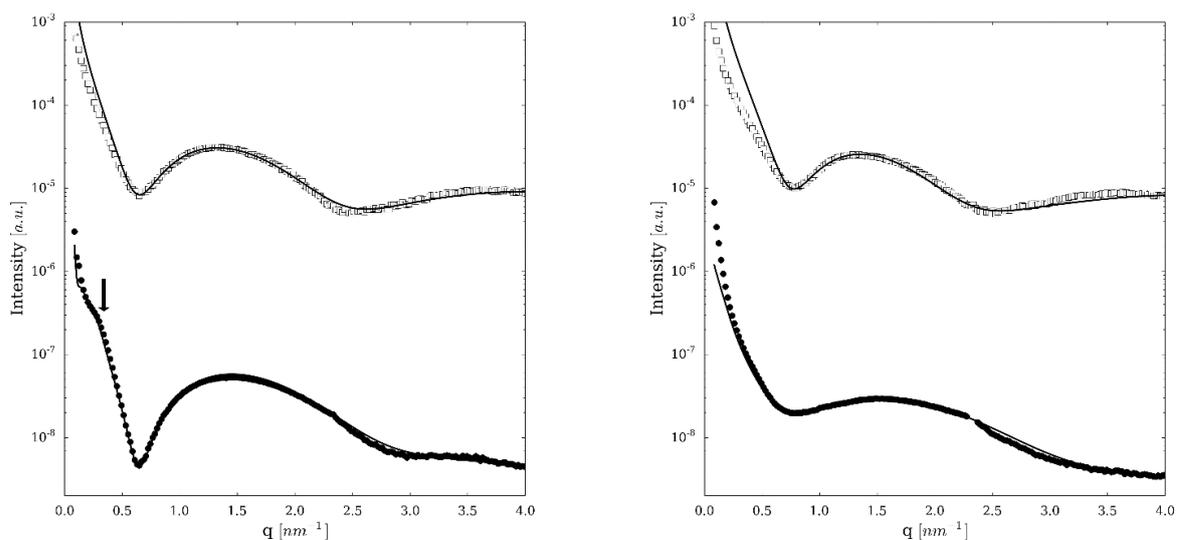
$$I(q) = \frac{kP(q)S(q)}{q^2} + I_b$$

Equation 4.14

Où k est un facteur scalaire et I_b est l'intensité du bruit de fond.

On a donc 8 paramètres indépendants pour le modèle complet. De plus il faut souligner que ce modèle considère la bicouche comme étant infiniment large dans les dimensions x,y , cela est particulièrement important, dans le cas de vésicules. La taille des objets n'est pas considérée dans le modèle, mais vu les résultats de DLS (chapitre 3), la taille est suffisamment grande pour pouvoir rentrer dans la gamme de q analysée dans l'ajustement.

La figure 4.11 montre les profils SAXS pour les NLs et les ANLs avec leurs fit.



(a) diC18:1-dT (\square) et diC18:1-dT-Phe (\bullet)

(b) diC14-dT (\square) et diC14-dT-Phe (\bullet)

Figure 4.11. Profils SAXS pour le NLs et ANLs préparés dans le tampon HEPES (50mM, pH 7.2) à la concentration de 5 mM.

Les résultats montrent deux types de profils : dans le cas des NLs, un pic large correspond au facteur de forme d'un objet de type vésiculaire (Blaurock, 1982), tandis que dans le cas du diC18:1-dT-Phe, on observe une caractéristique particulière (indiquée par la flèche dans la figure 4.11) qui peut être interprétée comme un pic de Bragg superposé à un pic large. Le profil du diC14-dT-Phe est mieux décrit comme un pic de Bragg superposé à un pic large plutôt que seulement un facteur de forme de vésicule. Pour les deux ANLs, le pic large correspond au facteur de forme de vésicule. Le pic de Bragg pour le diC18:1-dT-Phe correspond au facteur de structure d'empilement multilamellaire de bicouches (Loudet-

Courreges et al., 2011). On interprète donc les NLs comme des vésicules unilamellaires et les ANLs comme des vésicules multilamellaires. La périodicité lamellaire et le nombre de couches corrélés ont été estimés en ajustant les courbes expérimentales avec le modèle. De plus, dans tous les cas, on a obtenu une description de la bicouche en analysant le facteur de forme. Dans la figure 4.11 sont représentés les meilleurs ajustements obtenus pour les différents échantillons. Pour les NLs on a utilisé le facteur de forme du modèle pour pouvoir extraire les valeurs correspondantes à l'épaisseur de la partie hydrophile (δ_H) et de la partie hydrophobe (δ_T) de la bicouche. Dans le cas du diC18:1-dT-Phe, l'ajustement de la courbe, avec les facteurs de forme et de structure, nous a permis d'extraire également des valeurs de périodicité lamellaire (d) et du nombre de couches corrélées (N). Les valeurs des paramètres obtenus sont reportées dans le tableau 4.1.

	δ_T (nm)	δ_H (nm)	d (nm)	N
diC14dT	0.84	1.84	-	-
diC14dT-Phe	0.70	1.40	25.0	3
diC18:1dT	0.84	1.74	-	-
diC18:1dT-Phe	0.70	1.70	18.5	3

Tableau 4.1. Paramètres des facteurs de forme et de structure obtenus par le fit des données expérimentales SAXS pour les NLs et ANLs.

Pour le diC14-dT, le pic de Bragg n'est pas observable mais conformément aux images de cryo-TEM (chapitre 3), on a choisi de fixer la valeur de périodicité lamellaire à 25 nm et on a déduit les valeurs de N , δ_T et δ_H . Il faut souligner que l'ajustement de cette courbe avec le seul facteur de forme ne donne pas des résultats satisfaisants et nous impose donc de considérer le facteur de structure même si le pic n'est pas visible.

L'épaisseur de la bicouche ($2\delta_T + 2\delta_H$), le nombre de couches corrélées (N) et la périodicité lamellaire pour le diC18:1-dT-Phe, obtenus des données SAXS, sont compatibles avec les informations estimées des données cryo-TEM. Pour essayer d'expliquer le fait que le pic de Bragg est observé seulement pour le diC18:1-dT-Phe et non dans le cas du diC14-dT-Phe, on peut suggérer de comparer les images cryo-TEM pour les deux systèmes. Dans le cas du diC18:1-dT-Phe l'empilement des bicouches est beaucoup plus régulier par rapport au diC14-dT-Phe. De plus la périodicité lamellaire est plus importante dans le cas du diC14-dT-Phe et donc le pic de Bragg est attendu à des valeurs de q plus petits, où il devient plus difficile de les observer à cause de la contribution du faisceau direct.

En conclusion de cette partie, l'analyse structurale, grâce à l'utilisation de techniques complémentaires, comme le SAXS et la cryo-TEM des différentes NLs et ANLs nous a permis de conclure que les NLs forment plutôt des vésicules unilamellaires et les ANLs forment plutôt des vésicules multilamellaires. L'explication de ce phénomène est à chercher dans la nature de la tête polaire. Dans le cas des ANLs la présence d'un acide aminé pourrait contribuer à la formation d'interactions intermoléculaires entre les différentes bicouches. Le groupe amino libre peut former des liaisons hydrogène au niveau des têtes polaires. Cependant il faut considérer, vu les valeurs de périodicité lamellaire, que les bicouches sont

beaucoup hydratées et trop espacées les unes des autres et donc il est difficile de parler d'interaction directe entre les bicouches. On pourrait alors faire une hypothèse géométrique des molécules, avec le changement du paramètre de « packing », en particulier entre les NLs et les ANLs. Cela se traduit dans un changement de la courbure spontanée de la membrane, à laquelle peuvent contribuer les interactions intermoléculaires discutées plus haut, mais cette fois au niveau de la même couche lipidique.

4.4 Etude structurale par SAXS de complexes de nucléolipides avec le calcium et acides nucléiques

L'étude des interactions entre les objets formés par les NLs et les ANLs seront présentées dans le chapitre suivant. On va présenter ici les études obtenues sur des complexes de NL et des acides nucléiques avec l'utilisation de calcium. L'utilisation de calcium pour former des complexes entre les acides nucléiques et des lipides anioniques a été déjà explorée par d'autres auteurs (Kapoor and Burgess, 2012; Khiati et al., 2009; Montis et al., 2012; Patil et al., 2004). L'utilisation de lipides cationiques pour la formation de complexes (lipoplexes) pour la délivrance d'acides nucléiques a été largement explorée, comme décrit dans le chapitre 1. A cause de leur charge positive ces systèmes représentent des candidats de choix pour pouvoir complexer les acides nucléiques, chargés négativement, et ce sont les systèmes les plus efficaces parmi les vecteurs de type non viral. Cependant leur charge positive conduit à des interactions non spécifiques avec les composants biologiques chargées négativement, comme les protéines sériques, les opsonines ou les enzymes. Cela peut conduire à une cytotoxicité de ces systèmes élevée, surtout pour une utilisation *in vivo*. De plus, la présence de sérum conduit à la neutralisation des charges et donc à l'inactivation des complexes formés. L'idée est donc de trouver des nouveaux systèmes moins toxiques et stables en présence de sérum. L'utilisation de lipides anioniques peut offrir une alternative à des formulations basées sur les lipides cationiques due à l'absence de charges positives. Cependant, l'utilisation de lipides anioniques pour complexer des acides nucléiques peut représenter un vrai défi, à cause de la répulsion électrostatique entre les charges négatives, qui se traduit par un faible taux d'encapsulation. Pour favoriser cette interaction on a besoin d'utiliser un troisième composant (agent de pontage) qui puisse interagir avec les lipides anioniques et les acides nucléiques. Il existe plusieurs stratégies pour faire cela, par exemple l'utilisation d'un polymère ou d'un lipide cationique (Mignet et al., 2008) pour précomplexer l'acide nucléique, former donc un complexe chargé positivement qui pourra donc ensuite interagir avec des lipides anioniques et être finalement chargés négativement. Cependant ce système présente l'inconvénient lié à la toxicité de l'agent de pontage utilisé, de plus ce dernier peut déstabiliser le précomplexe déjà formé. Une autre stratégie consiste à utiliser des cations divalents physiologiques, comme le calcium, pour préparer les complexes (Kapoor and Burgess, 2012).

Dans cette section on va donc présenter les études structurales des complexes formés, dans une première partie, entre les lipides et le calcium, et dans une deuxième partie, entre les lipides, le calcium et l'acide nucléique. L'idée est aussi de mettre en évidence une éventuelle interaction spécifique entre la tête polaire nucléotidique (thymine) et des acides nucléiques portant des bases complémentaires (polyA).

4.4.1 Complexes binaires lipides – calcium

Le protocole de préparation des complexes sera décrit en détail dans la partie expérimentale. Il consiste essentiellement dans l'ajout, à une dispersion de NL ou ANL, d'une solution concentrée de CaCl_2 , pour obtenir la concentration désirée en calcium sans trop diluer la dispersion initiale. Il y a alors formation d'agrégats qui précipitent. Pour pouvoir étudier facilement le précipité, on a décidé de faire formuler directement à l'intérieur des capillaires de rayons X et de les étudier par SAXS, comme précédemment décrit.

Dans cette partie on va étudier les complexes binaires NL et ANL avec le calcium, en particulier on a étudié l'effet de la concentration de calcium, l'effet de la force ionique et l'effet cinétique sur les complexes.

La figure 4.12 montre les profils SAXS obtenus pour le diC14-dT et le diC14-dT-Phe. Les courbes ont été obtenues avec une source de rayons X de laboratoire, le Nanostar, décrit plus haut.

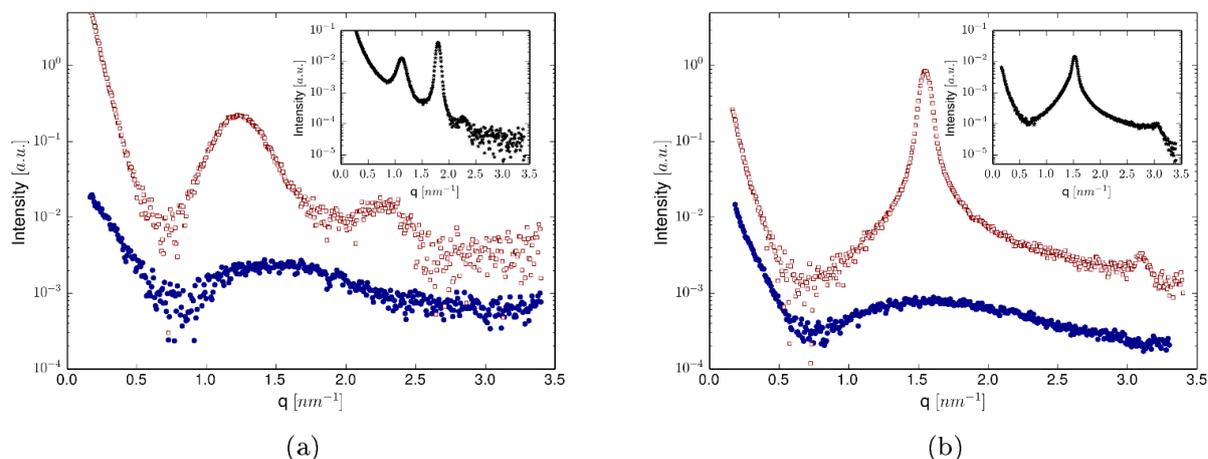


Figure 4.12. Profils SAXS pour le diC14-dT (a) et le diC14-dT-Phe dans le tampon HEPES (50 mM, pH 7.2) (•), en présence de 10 mM de Ca^{++} (□). Dans l'insert le profil SAXS des poudres sèches.

On peut voir dans la figure 4.12 les profils SAXS pour les lipides dispersés dans le tampon HEPES (50 mM, pH 7.2). Cela a été décrit dans la section précédente. Si à cette dispersion on ajoute une petite quantité d'une solution concentrée de CaCl_2 , on observe la formation d'un précipité. Dans la figure, il est possible d'observer les profils SAXS obtenus pour ce précipité. Pour le diC14-dT (figure 4.12a), on observe un pic large autour de 1.23 nm^{-1} et une deuxième oscillation autour de 2.26 nm^{-1} . Dans l'insert il est présenté le profil SAXS de la poudre sèche, avant l'étape d'hydratation. Les deux pics sont positionnés à 1.12 nm^{-1} et 1.80 nm^{-1} . Pour le diC14-dT-Phe (figure 4.12b), on observe un pic autour de 1.55 nm^{-1} et un deuxième petit pic autour de 3.10 nm^{-1} . Le profil SAXS de la poudre présente un pic vers 1.52 nm^{-1} et un deuxième pic de faible intensité autour de 3.04 nm^{-1} . Pour le diC14-dT, on observe probablement un facteur de forme de vésicule dont l'intensité est assez élevée à cause de la quantité de matière présente dans le précipité. Dans le cas du diC14-dT-Phe, le pic est assez fin et le profil SAXS correspond bien au profil SAXS de la poudre. Il faudra noter que le pic à 1.55 nm^{-1} correspond à une distance dans l'espace réel de 4 nm et que l'épaisseur de la bicouche déterminée par l'ajustement des profils SAXS dans la section précédente était de

4.2 nm. Cela indique que l'ajout de calcium, conduit à la formation de phase lipidique déshydratée pour le diC14-dT-Phe.

L'étape suivante a été d'étudier l'effet de la variation de calcium et de force ionique sur les propriétés structurales des complexes. En effet la variation de la concentration de calcium toute seule conduit à une variation importante de la force ionique. La force ionique peut être facilement calculée à partir de l'équation 4.15.

$$I = \frac{1}{2} \sum_i C_i z_i^2$$

Equation 4.15

Pour une concentration de CaCl₂ de 10 mM on aura une force ionique de 30 mM, à laquelle il faudra ajouter 14 mM, qui correspond à la force ionique d'une solution d'HEPES 50 mM. La force ionique totale sera donc 44 mM. Si on décide d'augmenter la concentration de calcium à 25 mM, la force ionique totale sera de 89 mM. Ces variations de force ionique peuvent se traduire par le changement de la distance à laquelle les charges peuvent se rapprocher (longueur de Debye). Cette distance peut être estimée à partir de l'équation 4.16

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\epsilon_r \epsilon_0 k_B T}{2 N_A e^2 I}} \quad \kappa^{-1} = \frac{1}{\sqrt{8 \pi \lambda_B N_A I}} \quad \kappa^{-1} = \frac{0.304}{\sqrt{I}}$$

Equation 4.16

Où κ^{-1} est la longueur de Debye, ϵ_r est la constante diélectrique, ϵ_0 est la permittivité dans le vide, k_B est la constante de Boltzmann, T est la température absolue (°K), N_A est le nombre d'Avogadro, e est la charge élémentaire, I est la force ionique (en mol/m³ pour les 2 premières expressions), λ_B est longueur de Bjerrum (0.7 nm dans l'eau).

On trouve alors une valeur d'environ égale à 1.5 nm pour $I = 44$ mM et une valeur de 1.0 nm pour $I = 89$ mM. On a décidé alors de faire varier la force ionique pour ces 2 concentrations de calcium (10 mM et 25 mM) à des valeurs de $I = 44$ mM, $I = 89$ mM et $I = 154$ mM. La dernière valeur a été choisie par rapport à la force ionique physiologique. Les ajustements de force ionique ont été faits avec le NaCl. La figure 4.13 montre les profils SAXS obtenus pour le diC14-dT et le diC14-dT-Phe.

L'analyse des profils SAXS pour le diC14-dT (figure 4.13a) montre qu'il n'y a pas de grande différence entre les courbes, à la nuance près des variations d'intensité liées aux variations des volumes diffusants. On voit toujours la présence d'un pic large vers 1.23 nm⁻¹ et un deuxième pic avec des valeurs qui oscillent entre 2.25 et 2.45 nm⁻¹. En revanche pour le diC14-dT-Phe (figure 4.13b) on observe la présence d'un pic à 1.55 nm⁻¹ pour la concentration la plus basse de calcium (10 mM) et pour la force ionique la plus basse (44 mM). Avec l'augmentation de la force ionique, on observe l'apparition d'un deuxième pic vers 1.26 nm⁻¹.

Cet effet trouve son maximum à 25 mM de calcium et 89 mM de force ionique. Le deuxième pic aussi évolue, comme conséquence de l'apparition du doublement du pic principal, sous forme d'un élargissement du pic. Le pic à 1.26 nm⁻¹, il est à des valeurs de q plus petits, et cela correspond à des distances plus importantes dans l'espace réel, dans notre cas 5.0 nm.

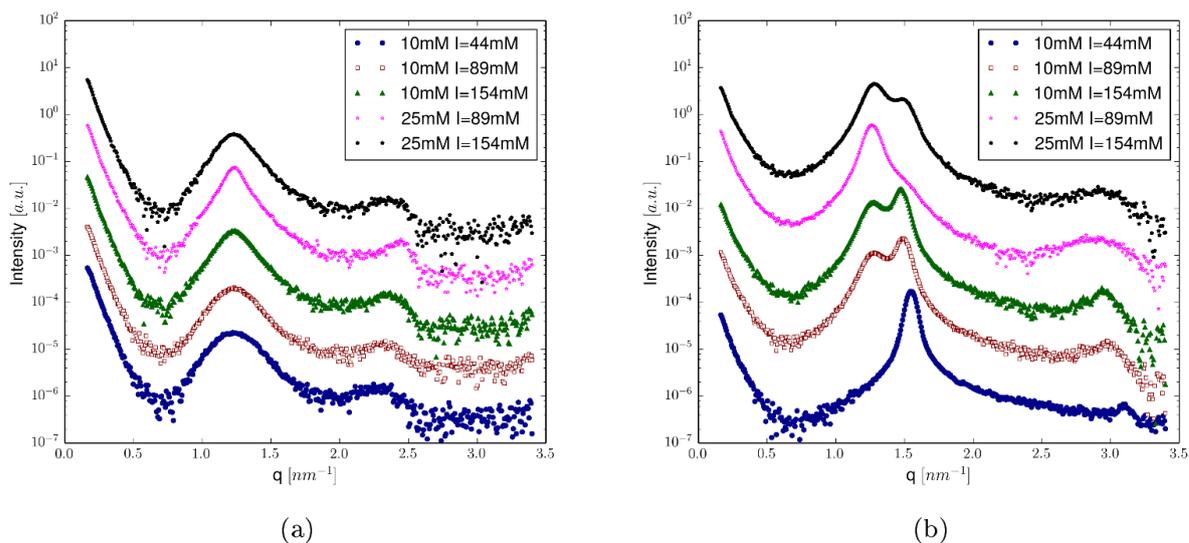


Figure 4.13. Profils SAXS pour le diC14-dT (a) et le diC14-dT-Phe (b) en présence de 10 mM et 25 mM de calcium, à 44 mM, 89 mM et 154 mM de force ionique.

Cela pourrait indiquer que la phase lipidique se trouve dans un état plus hydraté, et cela est favorisé par l'augmentation de la force ionique ou de la concentration en calcium.

Pour éviter, d'avoir des problèmes d'interprétations des courbes, pour les expériences suivantes on a décidé de travailler à des valeurs de force ionique de 154 mM. Cette valeur correspond aussi à la valeur physiologique, donc pourrait être plus prédictif du comportement de ces systèmes en conditions biologiques.

La figure 4.14 montre les profils SAXS obtenus pour le diC14-dT et le diC14-dT-Phe, à différentes concentrations de calcium mais à force ionique constante de 154 mM.

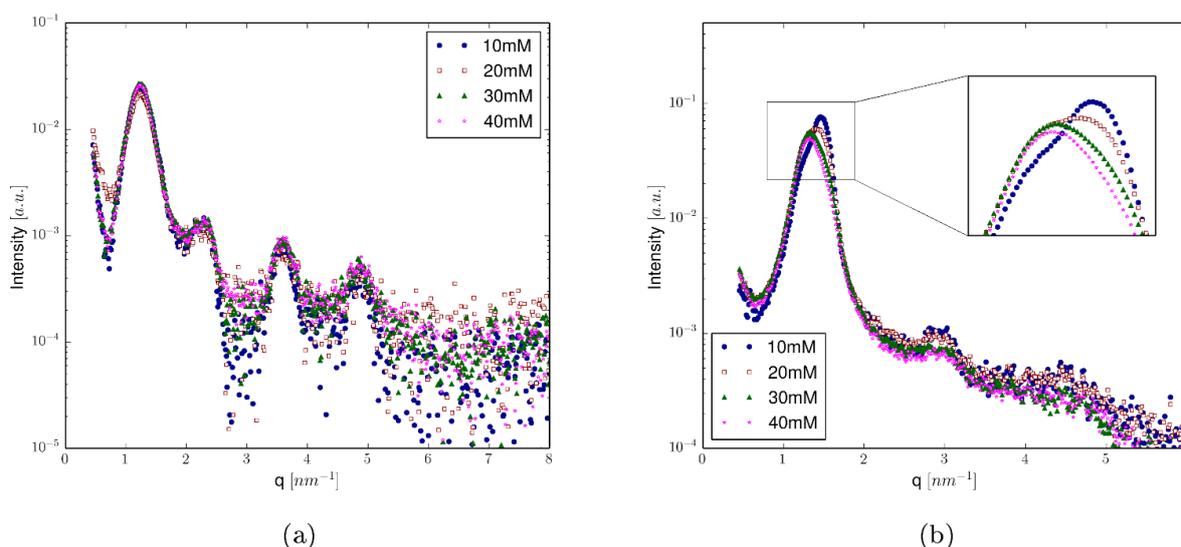


Figure 4.14. Profils SAXS pour le diC14-dT (a) et le diC14-dT-Phe (b) en présence de 10 mM, 20 mM, 30 mM et 40 mM de calcium, à 154 mM de force ionique.

Il faut noter que la gamme du vecteur de diffusion, q , est différente par rapport aux images précédentes. Le fait d'avoir diminué la distance échantillon – détecteur, permet d'accéder à

des valeurs de q plus importantes. Cela a l'avantage de pouvoir visualiser les ordres supérieurs des pics de Bragg et des oscillations. En revanche on perd de la résolution. La figure 4.14a montre l'effet de la concentration de calcium sur une dispersion de diC14-dT, on peut déduire qu'il n'y a pas d'effet du changement de la concentration de calcium et cela est en accord avec l'expérience présentée dans la figure 4.13a. Cependant, pour le système diC14-dT-Phe (figure 4.14b), on peut voir un déplacement du pic vers des valeurs de q plus basses en augmentant la concentration de calcium. Comme décrit plus haut, cela indique une phase lipidique plus hydratée. Si on compare les profils SAXS avec ceux obtenus dans la figure 4.13b, on peut déduire que le pic large qui est observé, est en réalité formé par deux pics qu'on voit fusionner à cause de la faible résolution de l'expérience.

Dans l'objectif de comprendre ces différences d'hydratation, on a décidé de faire une expérience de cinétique et d'analyser à nouveau les mêmes capillaires après un ou deux mois de stockage dans le frigo, pour limiter les phénomènes de dégradations. Les capillaires étant scellés, il n'y avait pas de risques d'évaporation du solvant.

La figure 4.15 montre les profils SAXS obtenus avant et après une période de vieillissement d'un mois ou deux mois à 4 °C.

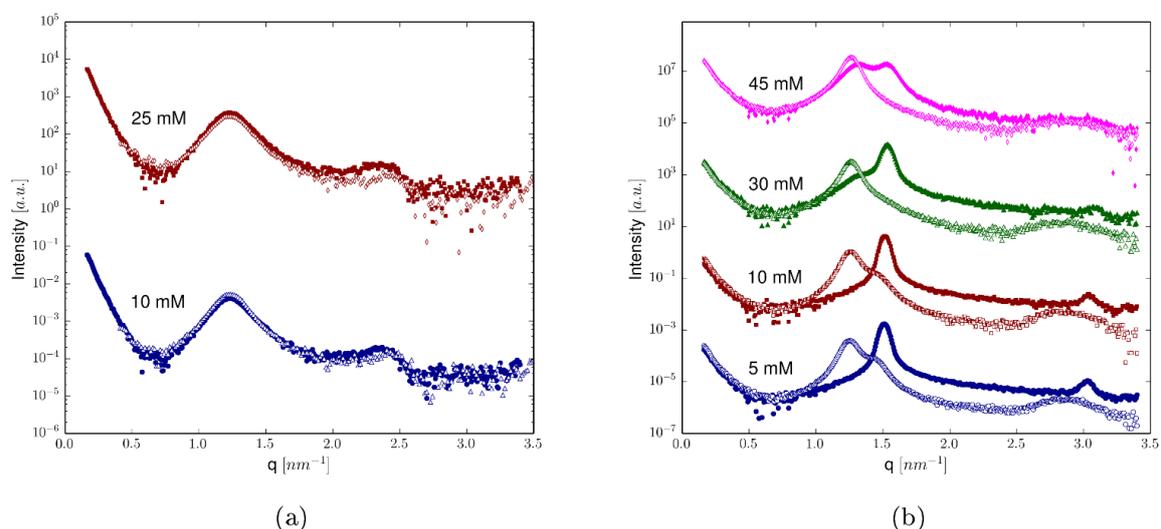


Figure 4.15. Profils SAXS pour le diC14-dT (a) et le diC14-dT-Phe (b) à différentes concentrations de calcium et à 154 mM de force ionique. Les symboles vides représentent les échantillons vieillis.

L'analyse des profils SAXS pour le diC14-dT (figure 4.15a) montre qu'il n'y a pas d'effet de vieillissement sur la structure des objets après un mois de stockage à 4°C et cela de façon indépendante de la concentration de calcium. En revanche dans le cas du diC14-dT-Phe (figure 4.15b), après deux mois de vieillissement à 4 °C, on voit un déplacement du pic principal vers des valeurs de q plus petites, et donc vers une phase lipidique plus hydratée. Cet effet est plus marqué pour les concentrations plus élevées en calcium pour lesquels on voit disparaître la coexistence de phase pour atteindre un système monophasique dilué.

En conclusion de cette partie on a montré l'effet de l'addition de calcium à une dispersion de NL et ANL, en particulier pour les molécules diC14-dT et diC14-dT-Phe. Dans les deux cas on obtient un précipité, l'analyse SAXS des précipités pour le diC14-dT a montré un léger

changement sur le facteur de forme (figure 4.12a) sans nous donner des éléments pour affirmer qu'il s'agit de phases lamellaires ou de vésicules. Ces structures formées restent les mêmes en faisant varier la concentration de calcium, la force ionique et la cinétique. En revanche l'étude des profils SAXS pour le diC14-dT-Phe montre un comportement différent dû à la présence de l'acide aminé. Ce lipide tend à former des vésicules multilamellaires en dispersion dans le tampon, l'addition de calcium provoque un changement important dans la structure de la bicouche. On voit l'apparition d'un pic de Bragg à 1.55 nm^{-1} qui correspond à une périodicité lamellaire de 4 nm. Ce pic correspond bien au pic observé pour la poudre sèche et aussi à la valeur trouvée pour le facteur de forme de la bicouche. Cette bicouche faiblement hydratée tend à transiter vers une bicouche plus hydratée et cela est mis en évidence par l'apparition d'un deuxième pic de Bragg à 1.26 nm^{-1} qui correspond à une périodicité lamellaire de 5 nm. Cette transition n'est pas immédiate mais passe une étape de coexistence de deux types de phases lamellaires. Plusieurs facteurs peuvent favoriser la formation de la phase plus hydratée, comme l'augmentation de la concentration en calcium, de la force ionique, et la cinétique.

4.4.2 Complexes ternaires lipides – calcium – acide nucléique

Dans cette section on va étudier les complexes ternaires lipide – calcium – acide nucléique. L'idée est d'étudier par SAXS la structure des complexes formés, étudier s'il y a un effet de la présence de l'acide nucléique dans la structure des complexes binaires lipides – calcium et étudier s'il y a un effet de spécificité par la présence de la thymine dans la tête polaire nucléotidique en fonction du type d'acide nucléique utilisé (polyA, polyU ou ADN à double filament).

La base azotée présente sur les NLs et ANLs est la thymine, c'est pour cela qu'on a étudié l'interaction avec le polyA. Le polyA est un acide nucléique monofilament, de taille comprise entre 50 et 100 paires de bases, dont les bases ne sont constituées que d'adénine. Il représente le candidat idéal pour étudier l'interaction avec sa base complémentaire (thymine) présente dans la tête polaire des NLs et ANLs. Son caractère monofilament lui permet d'interagir directement avec les bases complémentaires des lipides. La préparation des complexes se fait en mélangeant pendant 30 minutes la dispersion de vésicules avec le polyA dans un rapport de concentration 1 : 1 en sous unités (le poids moléculaire du polyA n'est pas connu). Une partie du mélange est alors transférée dans un capillaire dans lequel il est ajoutée une faible quantité de solution de calcium. La concentration de cette solution est calculée pour avoir la concentration finale souhaitée. Il y a tout de suite formation d'un précipité qui, après centrifugation, sera analysé par SAXS.

La figure 4.16 montre les profils SAXS obtenus pour le diC14-dT et le diC14-dT-Phe, sans ou avec le polyA, à la concentration de calcium 10 mM et force ionique à 154 mM. L'analyse des profils montre, dans les deux cas, un changement important des spectres. Pour le diC14-dT (figure 4.16a), on observe un pic assez large et asymétrique vers 0.9 nm^{-1} , on peut observer aussi l'apparition d'un deuxième pic large vers 3.9 nm^{-1} .

De plus, le premier minimum est beaucoup moins profond. Le diC14-dT-Phe (figure 4.16b) en présence de polyA présente un profil SAXS modifié avec des points en commun avec le profil qu'on vient de décrire. Le pic de la phase lamellaire faiblement hydratée vers 1.5 nm^{-1} est toujours présent, on peut aussi observer le pic large vers 0.9 nm^{-1} et un deuxième pic large

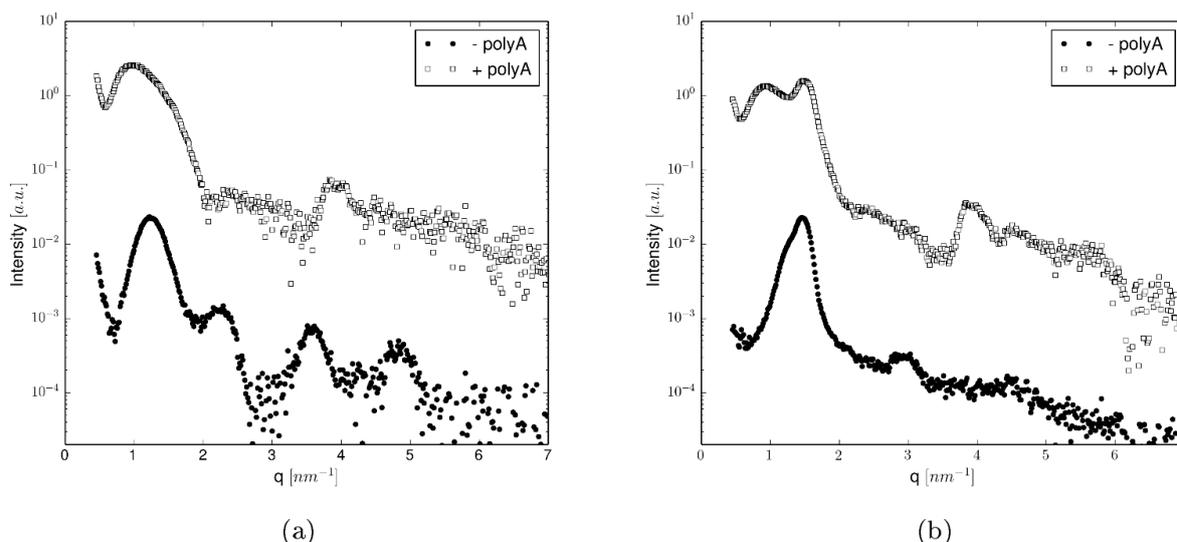


Figure 4.16. Profils SAXS pour le diC14-dT (a) et le diC14-dT-Phe (b) à 10 mM de calcium et à 154 mM de force ionique sans (symboles pleines) ou avec 10 mM de polyA (symboles vides).

vers 3.9 nm^{-1} . De plus on retrouve la caractéristique d'avoir le premier minima moins marqué. Ces éléments en commun pour les deux familles de nucléolipides complexés avec le polyA pourraient suggérer la formation de structures similaires. La structure des complexes formés n'a pas été encore déterminée, mais des éléments des profils SAXS, en particulier pour le diC14-dT, comme la profondeur du premier minima et l'asymétrie du pic, pourraient indiquer la présence d'une bicouche asymétrique. Cela a été étudié et modélisé par différents auteurs (Brzustowicz and Brunger, 2005; Oliveira et al., 2012). Si les deux monocouches de la membrane ne sont pas identiques, on peut en effet s'attendre à ce que les profils de densité électronique ne soient pas symétriques et donc que le profil du facteur de forme soit lui-même affecté. Cela pourrait être vrai dans le cas d'une distribution différente de lipides entre les deux couches de la membrane, par exemple dans le cas de membranes cellulaires. L'hypothèse qu'on peut faire dans notre cas est que le polyA interagit fortement, grâce à la présence du calcium, avec les nucléolipides, mais cela ne peut se faire que seulement sur le côté externe de la bicouche extérieure de la vésicule.

Dans le but d'étudier si l'interaction avec le polyA est spécifique, on a enregistré les profils SAXS pour des mélanges lipides – calcium – polyU ou ADN à filament double. Le poly U est, comme le polyA, un acide nucléique monofilament qui possède seulement des bases uracile qui ne sont pas complémentaires de la thymine. L'ADN à double filament est formé par les 4 types de nucléotides, mais les deux filaments sont sous forme d'hélice double, donc les bases ne sont pas directement disponibles pour l'interaction avec les bases portées par les lipides. Le protocole opérationnel a été exactement le même que celui décrit pour le poly A. La figure 4.17 montre les profils SAXS pour le diC14-dT et le diC14-dT-Phe sous forme de complexes ternaires avec le calcium à 40 mM et force ionique de 154 mM. Les courbes montrent aussi le complexe binaire avec seulement le calcium comme référence. L'analyse des spectres montre que les deux nucléolipides ont un comportement similaire. Les profils des complexes ternaires avec le polyU et l'ADN sont très proches de ceux obtenus pour les complexes binaires avec le calcium. Le profil des complexes ternaire avec le polyA

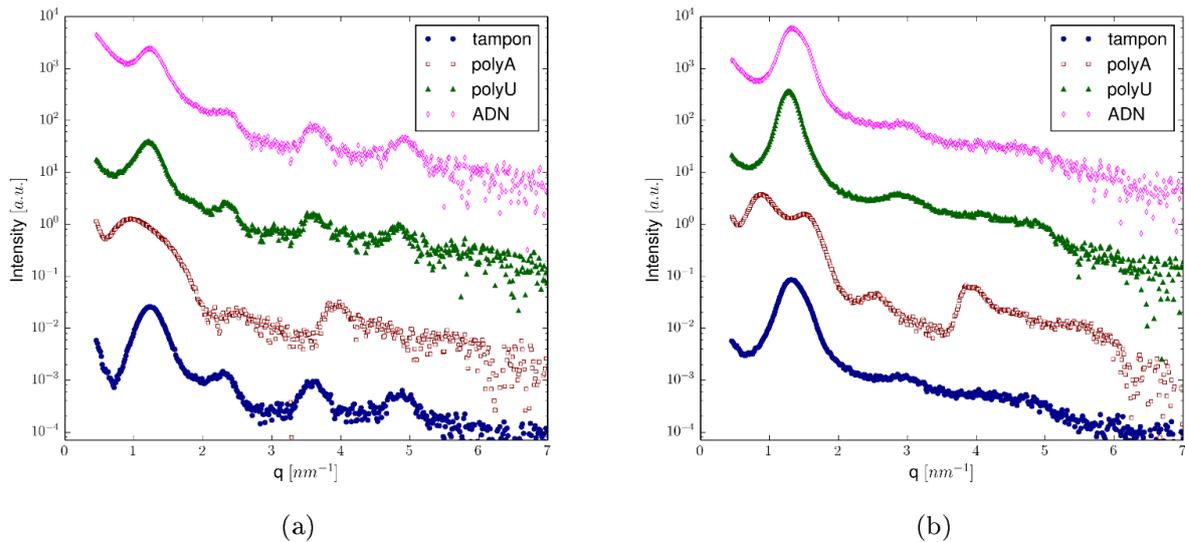


Figure 4.17. Profils SAXS pour le diC14-dT (a) et le diC14-dT-Phe (b) à 40 mM calcium et à 154 mM de force ionique pour des complexes avec le polyA, le polyU et l'ADN à filament double. La courbe tampon indique le complexe binaire avec le calcium.

reste très différent dans les deux cas. Cependant il faut souligner que tous les complexes ternaires montrent un premier minima moins marqué par rapport aux complexes binaires. Cette analyse semble suggérer que même s'il existe une interaction de type électrostatique dans tous les types de complexes, dans le cas du polyA on a une structure de la membrane différente et cela en raison des interactions spécifiques de type Watson-Crick qui peuvent être le moteur de la formation du complexe.

En conclusion on a mis en évidence la formation de complexes entre les nucléolipides, le calcium et les acides nucléiques, ces complexes sont différents par rapport aux complexes binaires lipides – calcium. En particulier, il est intéressant de noter que les diffractogrammes de rayons X semblent présenter les caractéristiques de la formation d'une membrane asymétrique liée à l'interaction du poly A avec le feuillet externe de la bicouche extérieure de la vésicule. De plus on a montré qu'il est possible d'avoir une spécificité en fonction du type d'acide nucléique présent, en particulier grâce aux interactions de type Watson-Crick entre la thymine et l'adénine. Il faudrait toutefois envisager l'utilisation d'autres techniques, comme par exemple la RMN, qui permettrait d'étudier finement des changements de l'orientation des groupes dans la tête polaire.

4.5 Partie expérimentale

4.5.1 Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

Les mesures de calorimétrie ont été conduites en utilisant un microcalorimètre Micro-DSC III (Setaram). Les cellules utilisées étaient de type batch Hastelloy C276. Les cellules sont remplies à température ambiante avec la même masse d'échantillon et de référence (400 μl d'eau osmosée). L'échantillon avait une concentration de 5 mM, cela signifie la préparation de 2 mg de produit dispersé dans 400 μl de tampon HEPES (50 mM, pH 7.2). Le protocole thermique consistait à l'enregistrement des thermogrammes entre 10 °C et 55 °C à la vitesse de 0.5 °C/min soit en chauffant soit en refroidissant, avec des isothermes de 20 minutes avant chaque rampe, pour un total de 3 cycles complets. La soustraction de la ligne de base, la détermination des températures caractéristiques et le calcul de l'enthalpie ont été effectués en utilisant le logiciel Calisto (Setaram).

4.5.2 Diffusion des rayons X aux grands angles (WAXS)

Les expériences de diffusion des rayons X aux grands angles (WAXS) ont été conduites sur un montage fait par le laboratoire (home-made machine), qui utilise comme source de rayons X une anode tournante (MicroMax-007 HF Rigaku). La longueur d'onde de la radiation était $\lambda = 0.154 \text{ nm}$, la distance échantillon – détecteur était de 103 mm. La gamme de q était comprise entre 3 nm^{-1} et 22 nm^{-1} . Le système de détection était une « image plate » mar345 (Marresearch) couplée avec un scanner. La matrice de détection était composée de 1200x1200 pixels et chaque pixel avait une taille de 150 μM . Les dispersions, à la concentration de 10 mM, étaient transférées dans des capillaires en quartz de 1.5 mm de diamètre qui étaient scellés à la flamme. Les capillaires étaient insérés dans un passeur d'échantillons équipé d'une enceinte dans laquelle circule de l'eau à une température contrôlée. Les acquisitions ont été conduites à différentes températures (11 °C, 27 °C, 45 °C) et la durée de chaque acquisition était environ de 6 heures. Les images ont été analysées avec le logiciel FIT2D.

4.5.3 Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)

Les expériences de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) ont été conduites en utilisant deux sources de rayons X différentes : la radiation synchrotron et une source conventionnel de laboratoire.

Les expériences synchrotron ont été conduites sur la ligne SWING du synchrotron SOLEIL à Saclay (proposal n° 20120613). La longueur d'onde de la radiation était $\lambda = 0.103 \text{ nm}$, la distance échantillon – détecteur était de 1.58 m. La gamme de q était comprise entre 0.007 nm^{-1} et 7 nm^{-1} . La taille du faisceau à la position de l'échantillon était de 0.4 x 0.1 mm (H x V). Les images ont été capturées par le détecteur Avix CCD de la ligne SWING. La matrice de détection était composée de 1024x1024 pixels et chaque pixel avait une taille de 165 μM . La résolution du détecteur a été estimée en fittant les pics obtenus sur les diffractogrammes du behenate d'argent, la valeur trouvée était d'environ $\Delta q = 4.3 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-1}$. Les dispersions ont été transférées dans des capillaires en quartz de 1.5 mm qui étaient après scellés à la flamme. Les capillaires étaient insérés dans un passeur d'échantillons équipé d'une enceinte dans

laquelle circule de l'eau à une température contrôlée. Les acquisitions ont été conduites à 25 °C et la durée de chaque acquisition était environ de 1 second. Les données ont été moyennées radialement et corrigées par le bruit de fond utilisant le logiciel Foxtrot, développé par le personnel de la ligne SWING.

Les expériences avec la source conventionnelle de rayons X ont été conduites au Centre Recherche Paul Pascal, à Pessac sur un montage Nanostar (Bruker). La longueur d'onde de la radiation était $\lambda = 0.154$ nm, la distance échantillon – détecteur était de 250 mm, 650 mm ou 1050 mm. La gamme de q était comprise entre 0.1 nm^{-1} et 2.1 nm^{-1} (1050 mm), 0.16 nm^{-1} et 3.4 nm^{-1} (650 mm) et 0.4 nm^{-1} et 8.0 nm^{-1} (250 mm). La taille du faisceau déterminé par les différentes pin – holes était de 0.45 mm (\varnothing). Les images ont été capturées par le détecteur HiStar (Bruker). La matrice de détection était composée de 1024x1024 pixels et chaque pixel avait une taille de 100 μM . La résolution du détecteur a été estimée en fittant les pics obtenus sur les diffractogrammes du behenate d'argent, la valeur trouvée était d'environ $\Delta q = 1.5 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$ (1050 mm) ou $\Delta q = 6.5 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$ (250 mm). Les dispersions ont été transférées dans des capillaires en quartz de 1.5 mM qui étaient après scellés à la flamme. Les capillaires étaient insérés dans un passeur d'échantillons équipé d'une enceinte dans laquelle circule de l'eau à une température contrôlée. Les acquisitions ont été conduites à 25 °C et la durée de chaque acquisition était environ de 6-12 heures. Les données ont été traitées avec le logiciel SAXS-Bruker et corrigées par le bruit de fond utilisant d'autres logiciels d'analyse comme GNU Plot ou Python.

4.5.4 Préparation des complexes avec le calcium

Les complexes nucléolipides – calcium ont été préparés toujours à l'intérieur de capillaires en quartz de 2 mm. Le volume des capillaires était suffisant pour pouvoir ajouter au moins 100 μl de produits. Les nucléolipides étaient à la concentration de 10 mM, ainsi que le polyA, le polyU et l'ADN double filament. La concentration des différents acides nucléiques a été calculée par rapport à la masse de poudre pesée et en considérant la masse moléculaire d'une sous unité (ex. MW = 330 g/mol pour une sous unité de polyA). La concentration initiale des acides nucléiques était de 50 mM. La concentration initiale de calcium, sous forme de CaCl_2 , était de 2 M ou 0.5 M, en fonction de la quantité et de la concentration finale que l'on voulait obtenir. Le NaCl, utilisé pour ajuster la force ionique à 154 mM, est ajouté sous forme de solution concentrée à 2 M ou 0.5 M, en fonction de la quantité et de la concentration finale on voulait obtenir. L'objectif est d'ajouter des petites quantités pour éviter de trop diluer la concentration de la dispersion de lipides.

Pour les mélanges binaires lipides – calcium, j'ai mélangé dans un tube eppendorf 80 μl de dispersion de lipides 10 mM et j'ai ajouté 4.4 μl de solution de NaCl 2 M (pour régler la force ionique). Après 30 min de agitation, j'ai transféré la totalité dans un capillaire RX et j'ai ajouté 1.6 μl de solution de CaCl_2 à 0.5 M, de façon à avoir une concentration finale de ~10 mM en calcium et ~10 mM en lipides et une force ionique de 154 mM. J'ai alors centrifugé le capillaire, pendant 15 min à 3000 rpm, pour obtenir le maximum de précipité.

Pour les mélanges ternaires lipides – calcium – acide nucléique, j'ai mélangé dans un tube eppendorf 80 μl de dispersion de lipides 10 mM, j'ai ajouté 4.4 μl de solution de NaCl 2 M et j'ai ajouté 16 μl d'acide nucléique 50 mM. Après 30 min d'agitation, j'ai transféré la totalité dans un capillaire RX et j'ai ajouté 1.6 μl de solution de CaCl_2 à 0.5 M, de façon à avoir une concentration finale de ~ 10 mM en calcium, ~ 10 mM en lipides, ~ 10 mM en acide nucléiques et une force ionique de 154 mM. Il faut souligner que les concentrations finales ne sont pas exactement les concentrations attendues à cause des dilutions, cependant on obtient l'équivalence molaires des différentes constituent, de plus le protocole est adopté systématiquement pour tous les échantillons de façon à pouvoir comparer les différentes préparations. Finalement, j'ai centrifugé le capillaire, pendant 15 min à 3000 rpm, pour obtenir le maximum de précipité.

Conc. initiale	(mM)	Lipides (μl)	Ca^{++} (mM)	Ca^{++} (μl)	NaCl (mM)	NaCl (μl)	polyA (mM)	polyA (μl)
Lipides	10	80	5	0.8	125	5	10	16
Ca^{++}	500	80	10	1.6	110	4.4	10	16
NaCl	2000							
polyA	50							

Conc. initiale	(mM)	Lipides (μl)	Ca^{++} (mM)	Ca^{++} (μl)	NaCl (mM)	NaCl (μl)	polyA (mM)	polyA (μl)
Lipides	10	80	20	0.8	80	3.2	10	16
Ca^{++}	2000	80	30	1.2	50	2	10	16
NaCl	2000							
polyA	50							

Conc. initiale	(mM)	Lipides (μl)	Ca^{++} (mM)	Ca^{++} (μl)	NaCl (mM)	NaCl (μl)	polyA (mM)	polyA (μl)
Lipides	10	80	40	1.6	20	3.2	10	16
Ca^{++}	2000	80	45	1.8	5	0.8	10	16
NaCl	500							
polyA	50							

Tableau 4.2. Volumes et concentrations utilisés pour la préparation des complexes ternaires lipides – calcium – acide nucléiques. Les volumes sont donnés en μl . Les concentrations indiquent les valeurs finales en mM.

5 Etude de l'interaction

5.1 Introduction

L'objectif de ce chapitre est de présenter les résultats relatifs à l'étude des interactions entre les nucléolipides et les acides nucléiques en essayant de préciser la nature et la spécificité de ces interactions pour chacun des systèmes. L'idée est de comparer les NLs avec les ANLs pour montrer que la présence de l'acide aminé joue un rôle dans l'interaction. Cette étude représente l'étape de validation de l'efficacité des molécules à interagir avec un acide nucléique avant de faire des essais biologiques sur les cellules ou sur les animaux. L'étude a été faite avec différentes techniques, dans un premier temps on a utilisé des méthodes généralement utilisées pour évaluer l'efficacité d'encapsulation, comme l'essai de retardation sur gel et l'essai à base de sonde fluorescente (RiboGreen[®]) et dans un deuxième temps on a utilisé des techniques capables d'évaluer l'interaction en elle-même, comme la titration calorimétrique isotherme (ITC). L'efficacité d'encapsulation est reliée à la quantité d'acide nucléique qui se trouve dans la formulation lipidique. Elle représente une valeur critique qui est utilisée pour l'optimisation de la formulation. Une valeur élevée d'efficacité d'encapsulation signifie qu'on a un rapport élevé entre la quantité d'acide nucléique et la quantité de lipide. Cela implique plusieurs avantages surtout liés à la faible quantité de lipides utilisés. Avantages pour l'utilisation thérapeutique comme la réduction de la toxicité et facilitation d'élimination de la molécule vectrice. Une valeur élevée d'efficacité d'encapsulation présente aussi des avantages du point de vue industriel comme un bon contrôle du dosage et une meilleure reproductibilité du processus de fabrication. L'encapsulation de l'acide nucléique peut être obtenue pendant le processus de fabrication des vésicules ou après leur préparation. Par exemple, il est possible d'hydrater le film lipidique avec une solution aqueuse dans laquelle est solubilisé l'acide nucléique. Cette méthode passive, utilisée pour des lipides anioniques ou neutres conduit généralement à des faibles taux d'encapsulation, autour de 10-20 % (Foged et al., 2007). Dans le cas d'une interaction forte, par exemple de type électrostatique, entre les lipides cationique et l'acide nucléique, il est possible de préparer les vésicules dans un premier temps et d'ajouter l'acide nucléique dans un second temps. Cela conduit à une complexation qui provoque normalement un changement structural du système. L'efficacité d'encapsulation dépendra alors du rapport entre les charges positives et les charges négatives (N/P ratio).

5.2 Gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose est une méthode utilisée en biochimie pour séparer les acides nucléiques en fonction de leur poids moléculaire. Les acides nucléiques chargés négativement migrent sous l'effet d'un champ électrique. Si cette migration se fait à travers la matrice d'un gel d'agarose, les molécules de petite taille se déplaceront plus rapidement par rapport aux molécules de tailles supérieures. En fonction de la concentration d'agarose on peut cibler la gamme de taille qu'on souhaite séparer. L'utilisation d'un tampon est indispensable pour avoir une conductibilité électrique suffisante et s'assurer que les molécules restent chargées négativement. La méthode de révélation la plus couramment utilisée est la révélation au bromure d'ethidium (BET). Cette molécule est capable d'interagir avec l'acide

nucléique par intercalation, dans l'environnement plus hydrophobe entre deux paires de bases, sa fluorescence augmente de 20 fois par rapport au niveau non intercalé.

Cette technique peut être utilisée pour étudier, plutôt d'un point de vue qualitatif, l'efficacité d'encapsulation des acides nucléiques dans les lipides. Le principe est que l'acide nucléique libre, qui n'a pas été encapsulé migrera vers la cathode à une certaine vitesse qui sera différente par rapport à la vitesse de migration de l'acide nucléique encapsulé ou complexé. Il existe plusieurs facteurs qui peuvent influencer cette migration comme le rapport N/P, la taille des objets, la nature de l'acide nucléique (Kapoor et al., 2011). Cette technique est souvent utilisée pour évaluer le rapport N/P optimal en évaluant l'intensité relative des deux bandes.

Pour évaluer les propriétés d'encapsulation et de complexation des NLs et ANLs, on a utilisé un acide nucléique modèle : le siRNA. Le siRNA est un acide nucléique de petite taille (21 bp) à double filament, cela possède l'avantage de pouvoir facilement révéler le gel avec le BET. Les échantillons ont été préparés en réhydratant le film lipidique (obtenu après évaporation du solvant organique) avec une solution de siRNA dans le tampon HEPES (10 mM, pH 7.2, I=150 mM). La concentration des lipides était de 1 mM et la concentration du siRNA de 1 μ M, donc le rapport lipides/siRNA était de 1000:1. On ne peut pas parler de rapport N/P parce que les lipides sont anioniques ou neutres. Dans la série on a également ajouté un contrôle positif constitué par un lipide cationique : la 2',3'-dioleoyl-5'-trymethylammonium-uridine (DOTAU), qui est bien connu pour complexer les acides nucléiques (Chabaud et al., 2006).

La figure 5.1 montre le gel d'agarose obtenu à partir de la série d'échantillon de NLs et ANLs et leurs complexes avec le siRNA.

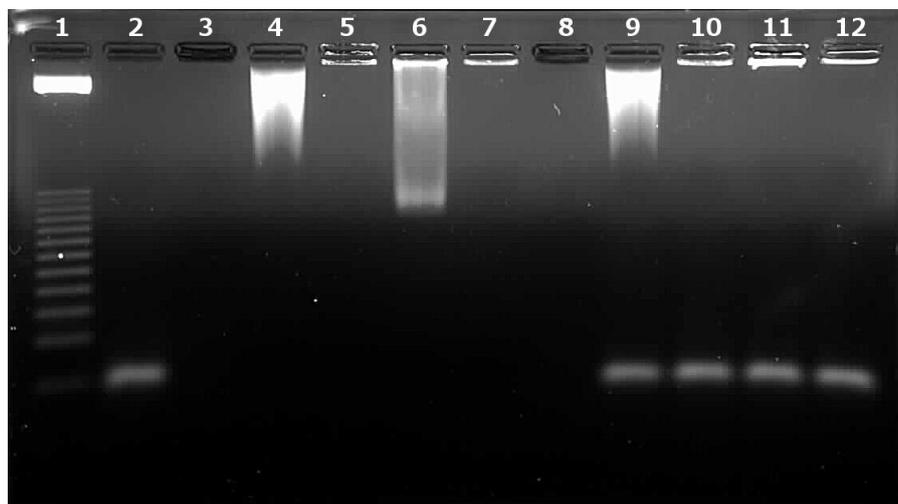


Figure 5.1. Gel d'agarose 3% pour évaluer la mobilité électrophorétique de l'siRNA, de NLs et ANLs et leurs complexes. Les puits ont été chargés avec : marqueur de taille (1), siRNA (2), DOTAU (3), diC14-dT (4), diC14-dT-Gly (5), diC18:1-dT, (6), diC18:1-dT-Phe (7), DOTAU + siRNA (8), diC14-dT + siRNA (9), diC14-dT-Gly + siRNA (10), diC18:1-dT + siRNA (11), diC18:1-dT-Phe + siRNA (12).

L'analyse des résultats du gel montre que la mobilité électrophorétique du siRNA n'est pas modifiée par la présence des NLs ou ANLs. Par contre comme on peut voir dans la figure 5.1 (ligne 8) il n'y a pas de bande correspondant au siRNA dans le cas de la formation du complexe avec la DOTAU, cela indique que sa mobilité électrophorétique a été modifiée sensiblement. Un autre fait important qu'on peut remarquer est que les NLs et les ANLs, sans

acides nucléiques, migrent différemment dans le gel, cela à cause du champ électrique. En effet, le champ électrique appliqué fait que les molécules chargées négativement migrent vers le bas, donc les NLs qui sont anioniques sont déplacés vers le bas, par contre les ANLs qui sont neutres ne sont pas affectés par le champ électrique. Il faut aussi souligner que la matrice du gel d'agarose utilisée ne permet pas aux vésicules de rentrer dans le gel.

En conclusion, cette étude montre qu'il n'y a pas de complexation entre le siRNA et les NLs ou les ANLs. Il faut quand même être critique en disant que le protocole opérationnel (tampon de charge, champ électrique) ne permet pas de mettre en évidence l'éventuelle présence de faibles interactions.

5.3 RiboGreen®

Une deuxième technique qui a été utilisée pour étudier l'encapsulation ou la complexation entre les nucléolipides et les acides nucléiques est basée sur l'utilisation d'une sonde fluorescente, appelée RiboGreen®. Cette molécule est 200 fois plus sensible que le BET. La sonde libre n'est pas fluorescente et une fois liée avec l'ARN, elle est capable d'augmenter sa fluorescence de 1000 fois. Le maximum d'excitation est à 500 nm et le maximum d'émission est à 520 nm. Un autre avantage d'utilisation de cette sonde est que la présence de nucléotides libres ou de contamination peptidique n'interfèrent pas avec la mesure (Jones et al., 1998).

Le principe du test est basé sur le fait que quand on réhydrate le film lipidique avec la solution de siRNA, il y aura une partie du siRNA qui sera piégée dans le volume aqueux à l'intérieur des vésicules, une partie qui peut éventuellement interagir avec les bicouches et une partie libre qui ne sera pas liée aux vésicules. Si on ajoute à ce moment le RiboGreen®, celui-ci pourra se lier avec le siRNA libre mais pas avec le siRNA qui est encapsulé ou complexé dans les vésicules. La dernière phase consiste à ajouter un tensioactif ou détergent (Triton-X100) capable de détruire la structure des vésicules et donc libérer la totalité de siRNA. La différence entre les deux valeurs de fluorescence correspond à la quantité de siRNA qui était encapsulée ou complexée dans les vésicules (Auguste et al., 2008). La figure 5.2 résume de façon schématique le principe de ce test.

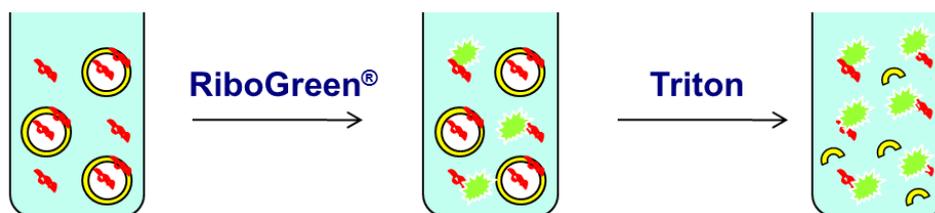


Figure 5.2. Représentation schématique du principe du test RiboGreen®.

L'étude a été effectuée sur la même série d'échantillons utilisés pour le gel d'agarose, avec le contrôle positif (DOTAU). En parallèle on a enregistré une gamme d'étalonnage pour vérifier la linéarité de la relation entre l'absorbance et la concentration.

La figure 5.3 montre les résultats obtenus pour l'essai du RiboGreen[®] pour déterminer l'encapsulation du siRNA avec différents nucléolipides.

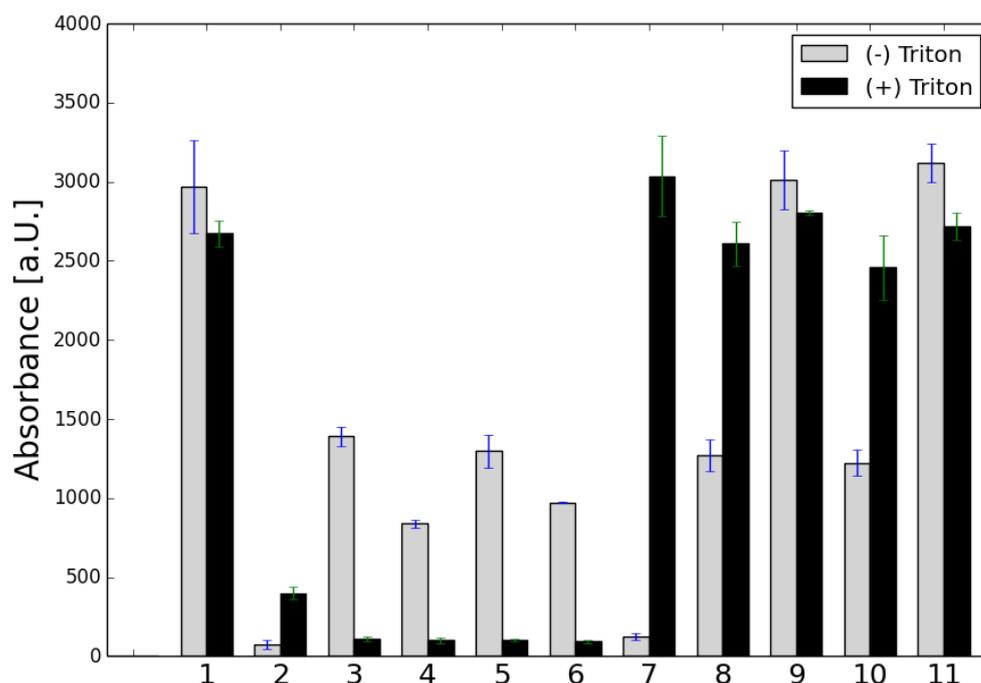


Figure 5.3. Essai du RiboGreen[®] pour déterminer l'encapsulation du siRNA avec différents nucléolipides. Les différentes colonnes représentent l'absorbance enregistré avant et après l'ajoute de Triton-X100 pour siRNA (1), DOTAU (2), diC14-dT (3), diC14-dT-Gly (4), diC18:1-dT, (5), diC18:1-dT-Phe (6), DOTAU + siRNA (7), diC14-dT + siRNA (8), diC14-dT-Gly + siRNA (9), diC18:1-dT + siRNA (10), diC18:1-dT-Phe + siRNA (11).

La fluorescence a été enregistrée avant et après l'ajoute de Triton-X100, pour pouvoir évaluer la quantité totale de siRNA. L'analyse des résultats montre que pour le contrôle négative (colonne 1) avant et après l'ajout de Triton-X100 on trouve la même valeur de fluorescence. Dans le cas du contrôle positif (colonne 7) on voit que avant et après l'ajout de Triton-X100 il y a une très grande différence, cela représente plus de 95% d'encapsulation. Si on compare les NLs (colonne 8, 10) avec les ANLs (colonne 9, 11) on remarquera facilement que dans les cas des ANLs il y a presque 0% d'encapsulation, par contre dans le cas des NLs on a presque 50 % d'encapsulation.

Cependant il faut être prudents sur l'interprétation de ces résultats. Comme on peut voir dans les colonnes contrôle des lipides seuls (colonnes 3 – 6), dans tous les cas on enregistre de la fluorescence à des valeurs non négligeables y compris en absence de siRNA. Cela peut signifier qu'il y a une interaction entre les nucléolipides et la molécule du RiboGreen[®] qui est très proche de l'interaction entre RiboGreen[®] et ARN.

En conclusion, cette méthode nous permet d'évaluer l'encapsulation du point de vue quantitatif, mais il faut rester prudent sur l'interprétation des résultats, en considérant le fait qu'ils sont en désaccord avec ceux obtenus avec l'essai du gel d'agarose.

5.4 Calorimétrie à titration isotherme (ITC)

Les études d'encapsulation et de complexation décrites dans les sections précédentes nous fournissent des informations qualitatives et très limitées par rapport à la nature et à la force de l'interaction entre les nucléolipides et les acides nucléiques. Pour pouvoir répondre à ces questions on a besoin d'effectuer des études sur la thermodynamique des systèmes, de façon à identifier et quantifier les forces motrices de l'interaction (Chaires, 2008). L'utilisation d'un calorimètre à titration isotherme (ITC) a l'avantage d'utiliser ce qui peut être considéré comme un détecteur universel (Freyer and Lewis, 2008). Presque toutes les réactions chimiques et les changements physiques sont accompagnés d'un changement de chaleur ou enthalpie (ΔH). La quantité totale de chaleur prise (processus endothermique) ou donnée (processus exothermique) à l'environnement va dépendre de la quantité de réactifs, produits et de l'enthalpie échangée. La mesure de la vitesse à laquelle la chaleur est échangée nous donne directement des informations sur la vitesse de la réaction. Les mesures calorimétriques peuvent être effectuées avec des réactants qui sont inactifs du point de vue spectroscopique, qui sont opaques, turbides ou hétérogènes et elles peuvent être effectuées dans différentes conditions, qui peuvent être intéressantes du point de vue biologique (température, pH, force ionique). Un autre avantage est que les mesures peuvent être faites en volume, sur un réactif qui se trouve en solution ou en dispersion, sans avoir besoin de le fixer sur un support ou substrat, en éliminant ainsi les effets de surface et d'éventuels artefacts.

La calorimétrie à titration isotherme (ITC) a été décrite pour la première fois par Christensen and Izatt (Christensen et al., 1966) comme une méthode permettant la détermination simultanée de la K_{eq} et le ΔH . Pour un appareil d'ITC à compensation de puissance, la cellule de mesure est contrôlée à une température constante (isotherme) par rapport à une cellule de référence (figure 5.4a).

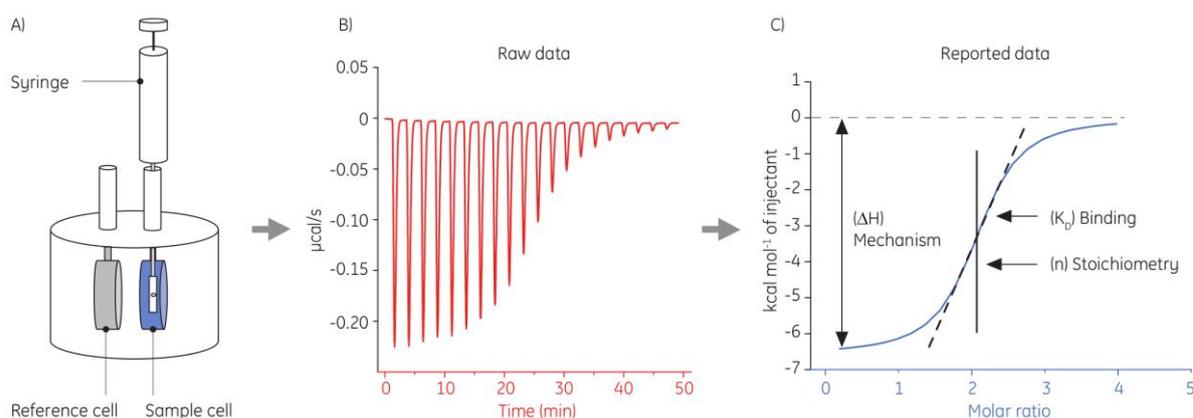


Figure 5.4. Le ligand est titré dans la cellule échantillon (a), une réaction exothermique libère de la chaleur et donne des pics négatifs (b), les pics sont intégrés et présentés dans un plot de Wiseman (c).

Image adapté depuis la brochure MicroCal.

Si un processus énergétique prend place, l'absorption ou le dégagement de chaleur sont ressentis par le capteur de température et de la puissance est fournie ou soustraite au système afin de maintenir la température constante. Le signal brut de ce type d'appareil correspond à

la puissance ($\mu\text{cal}/\text{sec}$ ou $\mu\text{J}/\text{sec}$) utilisée par l'appareil pour maintenir la cellule de mesure à la même température est enregistré en fonction du temps. L'échange de chaleur ou enthalpie (ΔH) correspond à l'intégration de ce signal par rapport au temps de mesure. Une expérience de calorimétrie commence quand on met en contact les réactifs. Pour faire cela un système de titration délivre un certain volume de réactifs dans la cellule échantillon. Un certain nombre d'injections de même volume est alors ajouté dans la cellule de mesure à des intervalles de temps précis jusqu'à la fin de l'expérience. Il faut attendre un certain temps entre deux injections pour laisser le temps au système de revenir aux conditions d'équilibre. Cela est représenté sur la figure 5.4b où chaque injection correspond à un pic dont la surface est l'enthalpie de réaction pour chaque ajout de réactif. Au fur et à mesure des injections, l'échantillon qui était initialement dans la cellule réagit avec les réactifs et l'amplitude de la surface des pics diminue. L'intégration de tous les pics permet d'obtenir la courbe de la figure 5.4c, appelée courbe de Wiseman (Wiseman et al., 1989), qui peut être ajustée avec un modèle d'interaction particulier pour obtenir la constante d'équilibre, l'enthalpie et la stoechiométrie de l'interaction.

Une interaction typique entre un ligand et un récepteur est montrée dans la figure 5.5.

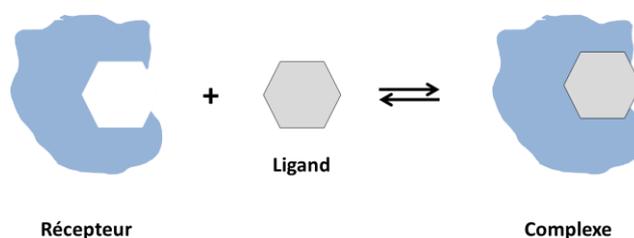


Figure 5.5. Modèle simplifié d'une interaction typique ligand/récepteur.

Du point de vu biologique, le ligand peut être un substrat, inhibiteur, médicament, cofacteur, coenzyme, ion métallique, peptide, oligonucléotide, acide nucléique, lipide, capable d'interagir de façon non covalente avec un site spécifique d'une deuxième molécule (Freyer and Lewis, 2008). Comme on le voit dans la figure, il y a trois espèces à l'équilibre en solution : le récepteur avec le site de liaison, le ligand libre et le complexe. Pour bien caractériser le processus d'interaction on devrait, au minimum, connaître la constante d'équilibre, K_{eq} . Une meilleure compréhension peut être obtenue en connaissant la contribution enthalpique (ΔH) et entropique (ΔS) à la formation du complexe.

Les équations 5.1, 5.2, 5.3, 5.4 résument les relations thermodynamiques les plus importantes.

$$K_{eq} = \left\{ \frac{[Complexe]}{[Recepteur] \times [Ligand]} \right\}_{equilibre}$$

Equation 5.1

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq}$$

Equation 5.2

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \left\{ \frac{[Complexe]}{[Recepteur] \times [Ligand]} \right\}_{actuel}$$

Equation 5.3

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Equation 5.4

K_{eq} est la constante d'équilibre, $[]$ est la concentration molaire des espèces à l'équilibre ou actuel, ΔG° est la variation d'énergie libre standard de Gibbs, R est la constante universelle des gaz, T est la température en Kelvin, ΔG est la variation d'énergie libre actuel, ΔH est la variation d'enthalpie et ΔS est la variation d'entropie. L'avantage principal de l'ITC est la possibilité d'obtenir avec une seule expérience, les valeurs de K , ΔH , $-T\Delta S$ et n , où n est la stœchiométrie de l'interaction. Cela est possible seulement si l'expérience est effectuée dans les conditions optimales, c'est à dire que les variations d'enthalpie doivent être mesurables pour chaque injection et doivent varier en fonction du nombre d'injections pour produire un thermogramme de forme sigmoïdale. La première condition est facile à comprendre, parce que si la variation d'enthalpie n'est pas suffisamment élevée pour pouvoir être enregistrée, l'expérience ne peut pas être effectuée. La deuxième condition est moins triviale, vu que la forme de la courbe du thermogramme dépend à la fois de la concentration et de la constante d'équilibre. Wiseman (Wiseman et al., 1989) avait noté que la forme de l'isotherme, pour un modèle simple avec un seul site indépendant d'interaction, change en fonction du produit de la constante d'équilibre, K_{eq} , et de la concentration totale du récepteur (macromolécule), $[M]_t$. Cette valeur est appelée paramètre « c » de Brandt. L'équation 5.5 généralise cette relation dans le cas où le récepteur (macromolécule) possède un nombre, n , de sites d'interaction identiques et indépendants.

$$c = n K_{eq} M_t$$

Equation 5.5

Pour des valeurs de c supérieures à 10, la courbe est clairement sigmoïdale avec une pente vers le point final de la titration qui tend à être vertical quand c tend vers l'infini (figure 5.6)

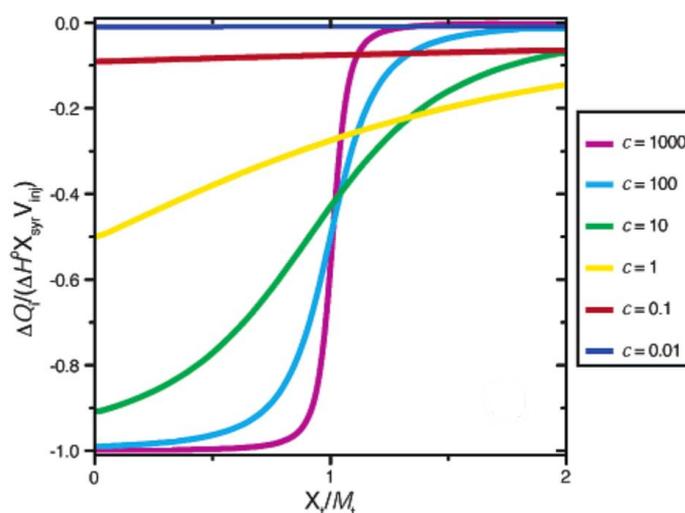


Figure 5.6. La forme de la courbe de titration ITC varie avec « c ». Adapté depuis (Turnbull and Daranas, 2003).

Il est communément suggéré, pour des conditions optimales, pour pouvoir ajuster proprement les données que la valeur de c doit être comprise entre 10 et 500.

Il faut être très prudents dans l'interprétation des paramètres pour des valeurs de $c < 10$ (Turnbull and Daranas, 2003).

Une expérience d'ITC consiste en plusieurs étapes (Freyer and Lewis, 2008): conception de l'expérience (i), en termes de choix des concentrations des réactifs, l'enthalpie doit être suffisamment élevée pour être enregistrée, il faut faire aussi des simulations en fonction de K_{eq} pour essayer d'être dans les conditions optimales ; préparation des solutions des réactifs (ii), les deux solutions doivent être les plus identiques possibles en termes de pH, tampon, force ionique, de plus elles devront être filtrées et dégazées ; enregistrement de données brut ITC (iii), il faut optimiser le nombre et le volume des injections ; enregistrement des données relatives au blanc (iv), il faut mesurer l'enthalpie de dilution du ligand et du récepteur, cela est effectué en injectant du ligand présent dans la seringue vers la cellule contenant le tampon et en injectant du tampon dans la cellule contenant le récepteur ; correction des données (v), selon l'équation 5.6,

$$Q_{corr} = Q_{mes} - Q_{dil,ligand} - Q_{dil,recepteur} - Q_{blanc}$$

Equation 5.6

il faut soustraire les enthalpies liées à la dilution du ligand et du récepteur et pour être rigoureux on devrait soustraire aussi la dilution du tampon dans la seringue vers le tampon dans la cellule, cela représente le blanc de l'appareil ; ajustement des données pour estimer les paramètres thermodynamiques (vi) et interprétation du modèle (vii).

Pour ajuster les données il faut choisir le modèle d'interaction le plus approprié (par exemple, un site ou n sites identiques indépendantes) et utiliser une procédure de régression non linéaire pour ajuster les paramètres (K_{eq} , ΔH , n) du modèle aux données. Le thermogramme est simplement la somme de toutes les enthalpies associées à chaque aliquote de titrant ajouté dans la cellule. Les enthalpies initiales sont plus importantes par rapport aux suivantes parce qu'au départ il y a un grand excès de sites d'interaction libres, cela correspond donc à l'enthalpie associée à une interaction complète du ligand. Au fur et mesure que la titration se fait, il y a de moins en moins de ligands qui interagissent et donc il y a trois espèces différentes en solution : le ligand libre, $[L]$, les sites d'interactions du récepteur non occupés (macromolécule), $[nM]$, et le complexe, $[LM]$.

Pour décrire l'équilibre on peut écrire (équation 5.7) :



Equation 5.7

ou n représente le nombre de sites d'interaction par récepteur (ou macromolécule) et définir la fraction de sites occupés, Θ , par rapport au nombre de sites totaux, nM_t , comme (équation 5.8):

$$\Theta = \frac{[LM]}{nM_t} \quad nM_t = [nM] + [LM]$$

Equation 5.8

En combinant les équations 5.7 et 5.8 on obtient l'équation 5.9:

$$\Theta = \frac{K_{eq}[L]}{1 + K_{eq}[L]}$$

Equation 5.9

La quantité de ligand totale, L_t , de façon analogue à l'équation 5.8, peut être définie comme (équation 5.10) :

$$L_t = [L] + n\Theta M_t$$

Equation 5.10

Les équations 5.9 et 5.10 sont la loi d'action de masse et la loi de conservation de la matière pour le système étudié et combiné ensemble par rapport à $[L]$ donnent un polynôme de deuxième degré (équation 5.11) :

$$\Theta^2 - \Theta \left[1 + \frac{L_t}{nM_t} + \frac{1}{nM_t K_{eq}} \right] + \frac{L_t}{nM_t} = 0$$

Equation 5.11

La quantité totale de chaleur produite peut être calculée à partir de l'équation 5.12:

$$Q = n\Theta M_t \Delta H V_0$$

Equation 5.12

Où V_0 est le volume initial de la solution contenue dans la cellule et ΔH est l'enthalpie molaire de l'interaction. En substituant la seule solution valide de l'équation quadratique 5.11 dans l'équation 5.12 on obtient l'équation 5.13

$$Q = \frac{nM_t \Delta H V_0}{2} \left[1 + \frac{L_t}{nM_t} + \frac{1}{nM_t K_{eq}} - \sqrt{\left(1 + \frac{L_t}{nM_t} + \frac{1}{nM_t K_{eq}} \right)^2 - \frac{4L_t}{nM_t}} \right]$$

Equation 5.13

qui nous permet d'ajuster les données expérimentales pour trouver les paramètres K_{eq} , ΔH et n :

Pour étudier l'interaction entre les nucléolipides et les acides nucléiques on a choisi d'utiliser un acide nucléique modèle, le polyA, comme décrit dans la section 4.4.2. Le choix d'utiliser le polyA dérive du fait que dans les nucléolipides étudiés la base azotée présente est la

thymine, cela peut maximiser les probabilités d'une interaction de type Watson-Crick par complémentarité entre la base portée par le lipide et le polyA.

Le polyA utilisé a une longueur comprise entre 50 et 100 paires de bases. Les concentrations de lipides et de polyA se réfèrent toujours à la concentration des molécules pour les lipides et des sous unités de nucléotide pour le polyA (le poids moléculaire du polyA n'est pas connu). Il faudra tenir compte de ces approximations dans le choix du modèle à utiliser pour ajuster les données expérimentales et dans l'interprétation physique des paramètres. Le modèle utilisé considère que le récepteur (ou macromolécules), dans notre cas les vésicules de lipides, possède n sites identiques indépendants, c'est à dire que chaque site d'interaction présent sur le récepteur est capable d'interagir avec le ligand, dans notre cas le polyA, de façon indépendante avec une constante d'interaction, K , qui est la même pour tous les sites d'interactions. Autrement dit, une macromolécule qui possède 3 sites d'interaction aura le même nombre total de sites d'interaction qu'une macromolécule avec un seul site d'interaction mais 3 fois plus concentré. Dans notre cas, pour les vésicules, le nombre total de sites d'interaction ne peut pas correspondre à la concentration de lipides, si on considère que seulement les lipides présents dans la couche externe de la bicouche extérieure sont capables d'interagir avec le polyA. Le nombre total de site d'interaction, nM_t , sera donc modifié selon l'équation 5.14:

$$nM_t = \frac{n_s M_t}{n_{agg}}$$

Equation 5.14

Où n_s est le nombre de molécules présentes à la surface de la vésicule et n_{agg} est le nombre total de molécules qui forment la vésicule. Pour des vésicules unilamellaires, possédant un diamètre externe, d , et un diamètre interne, $d-2\delta$ (avec δ l'épaisseur de la bicouche), n_s sera proportionnel à la surface externe, d^2 , et n_{agg} sera proportionnel à la somme de la surface externe et interne, $d^2 + (d-2\delta)^2$. On peut alors réécrire l'équation 5.14 sous forme de (équation 5.15) :

$$nM_t = \frac{M_t}{1 + \left(1 - \frac{2\delta}{d}\right)^2}$$

Equation 5.15

De façon similaire pour des vésicules multilamellaires, possédant un diamètre externe, d , et formées d'un nombre de bicouche empilées, N , avec une périodicité de l'empilement, D , n_{agg} sera proportionnel à $d^2 + (d-2\delta)^2 + [d-2D]^2 + [d-2D-2\delta]^2 + \dots + [d-2(N-1)D]^2 + [d-2(N-1)(D+\delta)]^2$ et l'équation 5.14 devient (équation 5.16) :

$$nM_t = \frac{M_t}{1 + \left[1 - 2\frac{\delta}{d}\right]^2 + \left[1 - 2\frac{D}{d}\right]^2 + \left[1 - 2\frac{D+\delta}{d}\right]^2 + \dots + \left[1 - 2\frac{(N-1)D}{d}\right]^2 + \left[1 - 2\frac{(N-1)D+\delta}{d}\right]^2}$$

Equation 5.16

En conclusion cela indique que l'apparente stœchiométrie d'interaction entre le polyA et les nucléolipides, décrite par le paramètre n , devrait être inférieure à 1 et cela en fonction du type d'agrégat supramoléculaire. Il apparaît donc important de bien contrôler la structure des assemblages supramoléculaires afin d'interpréter correctement les valeurs de stœchiométrie. Les expériences d'ITC ont été conduites sur les NLs et ANLs avec l'objectif d'étudier l'interaction et de vérifier si la présence de l'acide aminé pouvait améliorer l'interaction avec l'acide nucléique. Le protocole opérationnel sera décrit en détail dans la partie expérimentale. On a effectué la titration, de la dispersion de lipides (NLs ou ANLs), présents dans la cellule par le polyA, présent dans la seringue. Le polyA était en solution à la concentration de 50 mM dans l'HEPES (50mM, pH=7.2) et les lipides étaient à la concentration de 5 mM dans l'HEPES (50 mM, pH=7.2). La seringue a un volume de 40 μ l et la cellule a un volume de 200 μ l, donc à la fin de la titration les concentrations finale de polyA et de lipides seront respectivement de 8.3 mM et 4.15 mM, donc avec un rapport molaire final de 2. Les expériences contrôle (dilution polyA, dilution lipides) ont été conduites dans les mêmes conditions, pour pouvoir soustraire les enthalpies de dilution respectives (équation 5.6). La figure 5.7 montre les thermogrammes obtenus pour la titration du polyA versus le diC14-dT (figure 5.7a) et le diC14-dT-Phe (figure 5.7b).

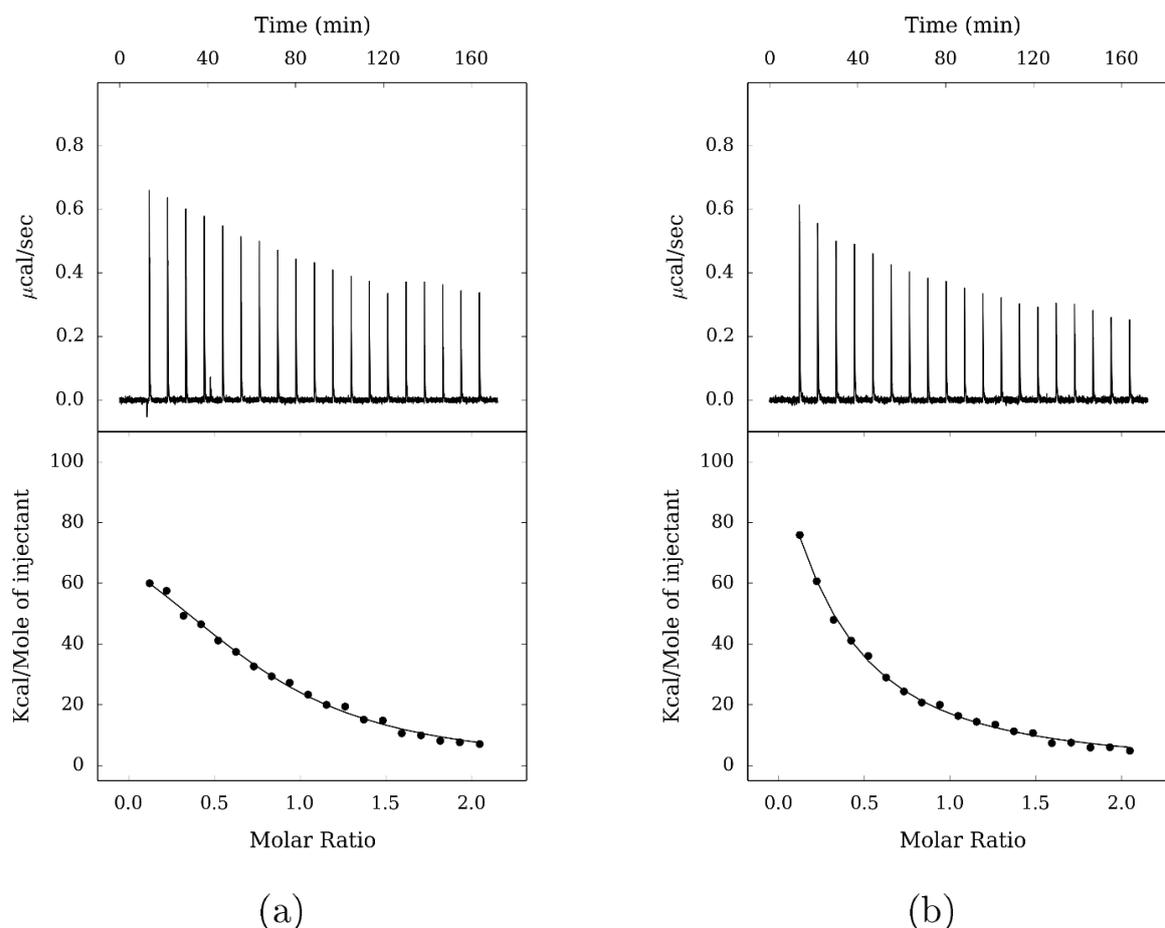


Figure 5.7. Profiles ITC pour la titration du polyA dans une dispersion de diC14-dT (a) et de diC14-dT-Phe dans le tampon HEPES (50mM, pH=7.2) à la concentration de 5 mM.

La partie haute de la figure présente une série de pics endothermiques obtenus après chaque injection d'aliquote de polyA dans la cellule contenant les lipides. L'intégration de ces pics en fonction du temps nous permet de calculer l'enthalpie qui correspond à chaque injection. La partie basse de la figure montre l'enthalpie en fonction du rapport molaire du polyA sur les lipides après chaque injection. L'enthalpie pour chaque pic a été corrigée de l'enthalpie de dilution comme expliqué plus haut. Les ajustements des courbes ont été obtenus à partir du modèle à n sites identiques indépendantes, décrit dans l'équation 5.13 et les paramètres obtenus, n , ΔH et K , sont reportés dans le tableau 5.1. La valeur de ΔS a été calculée à partir des équations 5.2 et 5.4.

	n	K (M^{-1})	ΔH (J/mol)	ΔS (J/mol/deg)
diC14dT	0.77	521	395.2	53.2
diC14dT-Phe	0.13	313	2209.8	55.3

Tableau 5.1. Paramètres du fit pour la titration du polyA dans la dispersion de diC14-dT et diC14-dT-Phe. La valeur de ΔS a été calculée comme expliqué dans le texte.

L'analyse des résultats montre que pour les deux systèmes, l'interaction est de type endothermique et les valeurs de la constante d'affinité sont très faibles. L'apparente stœchiométrie d'interaction est de 0.77 pour le diC14-dT et de 0.13 pour le diC14-dT-Phe. Cette différence de stœchiométrie peut s'expliquer, comme décrit mathématiquement plus en haut, par une différence sur le nombre de sites d'interaction disponible, cela à cause d'une différence structurale entre les NLs (unilamellaire) et les ANLs (multilamellaire).

Le nombre total de sites d'interaction pour chaque système peut être estimé en connaissant les paramètres structuraux comme le diamètre des objets, d , l'épaisseur de la bicouche, δ , la périodicité lamellaire, D , et le nombre de couches corrélées, N . Ces paramètres ont été obtenus à partir des études complémentaires décrites dans les chapitres précédentes, en particulier grâce aux expériences de DLS et de SAXS. En utilisant les équations 5.15 et 5.16, les calculs donnent, pour le diC14-dT, $n = 0.64-0.80$ et pour le diC14-dT-Phe, $n = 0.25-0.40$. Ces valeurs sont en très bon accord avec celles obtenues avec les ajustements des courbes ITC. L'analyse des valeurs de ΔH pour les deux systèmes indique qu'il y a une différence entre le diC14-dT et le diC14-dT-Phe. Dans le cas du système avec l'acide aminé, on a besoin de fournir plus d'énergie pour l'interaction. Cela indique que pour des valeurs de constante d'affinité proches, l'interaction est plus difficile. Bien que l'interaction soit endothermique et que la constante d'affinité soit faible, on observe une interaction, cela implique que le pic enthalpique mesuré soit le résultat de la contribution d'une série d'interaction intermoléculaires, non liants, entre les têtes polaires de nucléolipides, entre les groupes polaires chargés de lipides ou du polyA et l'eau ou les ions du tampon. L'étude détaillée de la contribution de chaque interaction est très difficile à mettre en place. Ce qu'on peut suggérer est que le moteur énergétique à la base de l'interaction est une augmentation de l'entropie, probablement liée à la libération de molécules d'eau associées aux têtes polaires des lipides lors de l'interaction. Il faut quand même être prudent sur l'interprétation quantitative des

paramètres trouvés. Les conditions expérimentales dans lesquelles on a travaillé ne correspondent pas aux conditions optimales décrites par le paramètre « c » de Brandt (équation 5.5). On a essayé de travailler avec les concentrations les plus fortes possibles de polyA et de lipides pour se rapprocher du paramètre de Brandt. Mais la viscosité de la solution de poly A pour des fortes concentrations et les faibles quantités de lipides disponibles limitent fortement les possibilités de faire varier ces différents paramètres. Enfin, il faut noter qu'on a considéré le polyA comme étant formé par des sous unités distinctes qui pouvaient interagir de façon indépendante avec les sites d'interactions présents sur les vésicules. Le polyA étant un polymère il présente une thermodynamique d'interaction plus compliquée par rapport aux simples monomères, soit pour des raisons de coopérativité de l'interaction soit pour des raisons géométriques. Néanmoins il faut souligner qu'un des objectifs de cette étude est de comparer les différences entre les NLs et ANLs et donc les approximations faites restent les mêmes pendant toute l'étude pour chacune des familles moléculaires.

En conclusion, ces études sur l'encapsulation et l'interaction entre les nucléolipides et les acides nucléiques, nous a permis de mettre en évidence une interaction. Toutefois, une analyse plus quantitative de cette interaction montre qu'elle est très faible et il semble donc difficile d'envisager l'utilisation de ces systèmes pour des applications biologiques. Ces résultats obtenus par la technique d'ITC pourraient expliquer la difficulté à étudier l'encapsulation avec des méthodes plus simples et moins sensibles. De plus, le fait d'avoir introduit un acide aminé dans la molécule des nucléolipides montre une diminution de la force de l'interaction. Ce résultat peut être associé à l'augmentation de l'encombrement stérique au niveau de la tête polaire ou à cause d'une augmentation des interactions intermoléculaires entre les têtes des ANLs.

5.5 Partie expérimentale

5.5.1 Gel d'agarose

Le gel d'agarose a été préparé à 3% avec du BET dans du tampon Tris-borate (TB) sans EDTA 0.5x. Les échantillons ont été préparés en solubilisant la quantité nécessaire de lipides dans le DCM, le solvant a été alors évaporé sous en flux d'azote en gardant la solution en rotation. Les films lipidiques ont été ultérieurement séchés sous vide pendant 1h et en suite réhydratés à la concentration de 1 mM avec une solution de tampon HEPES (10 mM, pH 7.2, I=150 mM). Pour la formation des complexes avec le siRNA, la solution d'hydratation contenait 1 μ M de siRNA (antiPGL2, 21 mer). La dispersion a été vortexée jusqu'à décoller complètement le film lipidique et elle a été soniquée jusqu'à homogénéité macroscopique. 20 μ l de chaque un des échantillons ont été mélangés avec 4 μ l de tampon de charge (30% v/v de glycérol, 0.25% w/v de bleu de bromophénol et 0.25 w/v de cyanol de xylène). La migration dans le gel se fait pendant 40 min à 50 V. Les gels sont alors visualisés et photographiés en utilisant une caméra G.BOX.

5.5.2 Essai du RiboGreen®

L'essai du RiboGreen® (Molecular Probes, Invitrogen) a été utilisé pour déterminer l'efficacité d'encapsulation. 100 μ l de solution de RiboGreen® dilué 1:1000 ont été additionnés à 100 μ l de solution contenant le siRNA. L'expérience a été effectuée dans une plaque noire de 96 puits à fond plat. Une gamme d'étalonnage a été enregistrée entre 0 et 0.02 μ M de siRNA (antiPGL2, 21 mer) solubilisé dans le tampon TE fournit dans le kit. Après 5 minutes d'incubation la lecture de la fluorescence a été effectuée en utilisant un spectrofluorimètre (Twinkle LB970, Berthold) lecteur de plaques (excitation 500 nm, émission 525 nm). Le même protocole a été utilisé, pour analyser les complexes nucléolipides-siRNA. Dans ce cas 2 μ l de chaque dispersion a été dilué à 100 μ l d'un volume final avec le tampon TE et donc additionné à 100 μ l de solution de RiboGreen® dilué 1:1000. Pour la série d'échantillons contenant le Triton-X100, 2 μ l de dispersion de complexes et 5 μ l de Triton-X100 2% ont été dilués à 100 μ l de volume finale avec le tampon TE et donc additionné à 100 μ l de solution de RiboGreen® dilué 1:1000. Le temps d'incubation avec le Triton-X100 a été de 5 min. Chaque échantillon a été testé en triplicata.

5.5.3 Calorimétrie à titration isotherme (ITC)

Les expériences de calorimétrie à titration isotherme ont été conduites avec un microcalorimètre ITC200 (MicroCal Inc.). La cellule de travail a un volume de 205.8 μ l et elle a été remplie avec la dispersion de NLs ou ANLs à la concentration de 5 mM dans le tampon HEPES (50 mM, pH = 7.2). La cellule de référence a été remplie avec le même volume d'eau. La seringue pour les injections a été remplie avec la solution d'acide nucléique (polyA ou polyU, degré de polymérisation compris entre 50-100 bp) à la concentration de 50 mM dans le tampon HEPES (50 mM, pH = 7.2). Le programme de titration consistait en 20 injections consécutives de 2 μ l avec un intervalle de 500 seconds entre chaque injection. Les expériences des blancs ont été effectuées dans les mêmes conditions, avec la titration de

l'acide nucléique dans la cellule contenant le tampon HEPES et la titration de la cellule contenant la dispersion de lipides avec la solution de tampon HEPES. Pour éviter la présence de bulles d'air, tous les échantillons ont été dégazés et centrifugés à 6000 rpm pour éliminer toutes les particules insolubles. La seringue était en rotation dans la cellule à la vitesse de 500 rpm et les mesures ont été effectuées à la température de 25°C. La première injection est toujours éliminée à cause de la diffusion de la solution à travers l'extrémité de la seringue pendant la phase d'équilibrage de la température avant la titration. L'analyse des données a été effectuée avec le module complémentaire (MicroCal) du logiciel Origin 7 en utilisant le modèle standard « one-set-of-sites » ou un ligand monofonctionnel interagit avec n sites d'interaction du récepteur de façon équivalente et indépendante.

6 Conclusions et perspectives

Ce travail de thèse nous a permis de synthétiser et d'étudier une nouvelle famille de molécules dérivées des nucléolipides : les acide aminé-nucléo-lipides. Ces molécules sont capables de s'autoassembler pour former des objets supramoléculaires de type vésicules.

La complémentarité des techniques utilisées nous a permis de bien caractériser du point de vue physico-chimique les différents systèmes et de commencer à dresser des relations entre la structure chimique des molécules, leurs propriétés physico-chimiques structurales et la capacité à former des complexes pour une éventuelle application biologique.

Dans le chapitre 2 on a présenté les différentes molécules synthétisées et la stratégie de synthèse adoptée. On a exploré différentes structures chimiques en faisant varier le type de chaîne lipidique (oleoyl ou myristoyl) et le type d'acide aminé (glycine ou phénylalanine).

Les études de microscopie électronique et de diffusion de la lumière présentées dans le chapitre 3, montrent que ces molécules sont capables de former des structures supramoléculaires de type vésicules. Les NLs forment des vésicules unilamellaires et les ANLs forment des vésicules de type multilamellaires.

Cela est dû principalement à la présence de l'acide aminé au niveau de la tête polaire. Les études structurales, présentées dans le chapitre 4 et effectuées par diffusion de rayons X aux petits angles, confirment les données de microscopie électronique.

Comme présentées dans le chapitre 5, ces informations ont été très utiles dans l'interprétation des données obtenues par calorimétrie à titration isotherme sur l'étude de l'interaction entre les vésicules de NLs et ANLs et un acide nucléique modèle (polyA). Les résultats montrent qu'il existe une interaction entre les deux partenaires, mais que cette interaction n'est pas suffisamment forte pour envisager des applications biologiques.

Pour pouvoir augmenter cette interaction une possibilité est d'ajouter un cation divalent comme le calcium, pour pouvoir ponter les charges négatives des nucléolipides et les charges négatives des acides nucléiques.

L'étude de cette stratégie du point de vue structural a été présentée dans le chapitre 4. Les résultats indiquent qu'il y a formation de complexes entre les trois partenaires (NL ou ANL, acide nucléique et calcium). De plus il a été mis en évidence une spécificité dans l'interaction, probablement due à la formation d'interactions de type Watson-Crick entre la thymine des nucléolipides et l'adénine du polyA.

Un dernier point concerne la mise en évidence d'un polymorphisme morphologique en fonction de la concentration, pour les nucléolipides, et en particulier pour le diC18:1-dT. La formation de structures de type vésicule à des faibles concentrations (< 5 mM) et de type « filament » à des concentrations plus élevées (> 10 mM) a été étudié par microscopie électronique et diffusion de la lumière, comme détaillé dans le chapitre 3. Ces transitions de morphologie dépendent de la concentration et nous avons pu montrer qu'elles semblent être provoquées par des variations de forces ioniques. De plus la dégradation observée pour les concentrations plus faibles < 2.5 mM, pourrait indiquer un degré élevé d'hydratation des têtes

polaires. Tout cela pourrait suggérer un rôle important de la tête polaire sur la courbure spontanée des membranes et finalement dans la structure des objets formés.

En perspective, ce travail peut être complété par plusieurs stratégies. Du point de vue chimique, on pourrait travailler sur la structure chimique des molécules, en particulier en proposant des modifications sur la tête polaire à deux niveaux. On peut changer la base azotée des nucléolipides, par exemple on peut mettre une adénine à la place de la thymine. Patwa et al. (Patwa et al., 2013) ont montré que le nucléolipide diC16-dA est capable d'interagir avec le polyU avec une constante d'affinité beaucoup plus élevée par rapport au diC16-dT versus le polyA. Cela peut être dû au système aromatique de l'adénine, de type purinique, qui peut favoriser les interactions de type π -stacking et/ou à la présence du groupe amino qui peut être à l'origine d'éventuelles liaisons hydrogène.

Une autre modification chimique qu'on pourrait envisager est au niveau de la nature de l'acide aminé. Par exemple, on pourrait utiliser des acides aminés chargés positivement, comme la lysine ou l'arginine, ou neutres mais avec des résidus capables de former des liaisons hydrogène, comme la serine ou la glutamine. Finalement, on pourrait envisager de conjuguer, à la place de l'acide aminé, un peptide qui pourrait avoir le rôle d'augmenter l'interaction mais qui pourrait également avoir la possibilité de conférer des propriétés de ciblage aux vésicules formées. Une autre modification chimique intéressante serait de remplacer la liaison ester entre l'acide aminé et l'oxhydryle du ribose avec une liaison amide, cela pourrait augmenter la stabilité de ces molécules et créer de nouveaux sites d'interactions.

Du point de vue physico-chimique, il reste beaucoup de questions ouvertes, en particulier par rapport au changement de morphologie des objets formés par NLs observé en fonction de la concentration. Pouvoir contrôler et maîtriser la forme des objets en jouant sur des paramètres simples comme la concentration et la force ionique, pourrait être intéressant au niveau des applications biologiques, pour la conception d'objets « intelligents », capables de répondre à des changements de conditions externes.

Si on souhaite optimiser l'utilisation des molécules qu'on a synthétisé, pour augmenter l'interaction, l'une des stratégies possibles est celle d'utiliser des molécules chargées positivement qui peuvent agir comme des systèmes de pontage entre les charges négatives des nucléolipides et les charges négatives des acides nucléiques. Parmi les différents choix possibles, nous avons commencé à étudier l'utilisation de cations divalents comme le calcium. La formation de complexes ternaires a été montrée, par contre l'étude de l'interaction par calorimétrie n'a pas été effectuée et cela pourrait se révéler intéressant pour mettre en évidence une éventuelle spécificité vers le polyA par rapport au poly U ou d'autres acides nucléiques.

Une dernière stratégie consistera à effectuer des mélanges entre les différents lipides nucléotides déjà synthétisés afin d'orienter de façon contrôlée les caractéristiques des systèmes. De plus, il faudrait optimiser la formulation et faire des essais de transfection sur des cellules, pour évaluer l'efficacité réelle de la formulation et la mise en évidence d'une éventuelle toxicité.

Bibliographie

Acton, E.M., Ryan, K.J., and Luetzow, A.E. (1977). Antitumor septacidin analogues. *J. Med. Chem.* *20*, 1362–1371.

Agrawal, S., Temsamani, J., Galbraith, W., and Tang, J. (1995). Pharmacokinetics of antisense oligonucleotides. *Clin. Pharmacokinet.* *28*, 7–16.

Ahlers, M., Ringsdorf, H., Rosemeyer, H., and Seela, F. (1990). Orientation, recognition, and photoreaction of nucleolipids in model membranes. *Colloid Polym. Sci.* *268*, 132–142.

Alam, M.R., Maeda, M., and Sasaki, S. (2000). DNA-binding peptides searched from the solid-phase combinatorial library with the use of the magnetic beads attaching the target duplex DNA. *Bioorg. Med. Chem.* *8*, 465–473.

Allain, V., Bourgaux, C., and Couvreur, P. (2012). Self-assembled nucleolipids: from supramolecular structure to soft nucleic acid and drug delivery devices. *Nucleic Acids Res.* *40*, 1891–1903.

Anslyn, E.V., and Dougherty, D.A. (2004). *Modern physical chemistry* (Sausalito, Calif.: University Science).

Arigon, J., Prata, C.A.H., Grinstaff, M.W., and Barthélémy, P. (2005). Nucleic acid complexing glycosyl nucleoside-based amphiphile. *Bioconjug. Chem.* *16*, 864–872.

Atkins, P.W., and De Paula, J. (2010). *Physical chemistry*. (New York: W. H. Freeman and Co.).

Atmuri, A.K., and Bhatia, S.R. (2013). Polymer-mediated clustering of charged anisotropic colloids. *Langmuir ACS J. Surfaces Colloids* *29*, 3179–3187.

Auguste, D.T., Furman, K., Wong, A., Fuller, J., Armes, S.P., Deming, T.J., and Langer, R. (2008). Triggered release of siRNA from poly(ethylene glycol)-protected, pH-dependent liposomes. *J. Controlled Release* *130*, 266–274.

Baglioni, P., and Berti, D. (2003). Self assembly in micelles combining stacking and H-bonding. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* *8*, 55–61.

Baldelli Bombelli, F., Berti, D., Keiderling, U., and Baglioni, P. (2002). Giant Polymerlike Micelles Formed by Nucleoside-Functionalized Lipids. *J. Phys. Chem. B* *106*, 11613–11621.

Bennett, C.F., and Swayze, E.E. (2010). RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *50*, 259–293.

Berti, D., Franchi, L., Baglioni, P., and Luisi, P.L. (1997). Molecular Recognition in Monolayers. Complementary Base Pairing in Dioleoylphosphatidyl Derivatives of Adenosine, Uridine, and Cytidine. *Langmuir* *13*, 3438–3444.

Berti, D., Baglioni, P., Bonaccio, S., Barsacchi-Bo, G., and Luisi, P.L. (1998). Base Complementarity and Nucleoside Recognition in Phosphatidylnucleoside Vesicles. *J. Phys. Chem. B* *102*, 303–308.

- Berti, D., Luisi, P.L., and Baglioni, P. (2000). Molecular recognition in supramolecular structures formed by phosphatidyl nucleosides-based amphiphiles. *Colloids Surfaces Physicochem. Eng. Asp.* *167*, 95–103.
- Bibi, S., Kaur, R., Henriksen-Lacey, M., McNeil, S.E., Wilkhu, J., Lattmann, E., Christensen, D., Mohammed, A.R., and Perrie, Y. (2011). Microscopy imaging of liposomes: From coverslips to environmental SEM. *Int. J. Pharm.* *417*, 138–150.
- Blaurock, A.E. (1982). Evidence of bilayer structure and of membrane interactions from X-ray diffraction analysis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.* *650*, 167–207.
- Bloomfield, V.A., Crothers, D.M., and Tinoco, I. (2000). *Nucleic acids: structures, properties, and functions* (Sausalito, Calif.: University Science Books).
- Bombelli, F.B., Berti, D., Keiderling, U., and Baglioni, P. (2002). Living polynucleotides formed by the spontaneous aggregation of dilauroylphosphonucleosides. *Appl. Phys.* *74*, s1270–s1273.
- Bouglet, G., and Ligoure, C. (1999). Polymer-mediated interactions of fluid membranes in a lyotropic lamellar phase: a small angle X-ray and neutron scattering study. *Eur. Phys. J. B* *9*, 137–147.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J.P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 7297–7301.
- Brzustowicz, M.R., and Brunger, A.T. (2005). X-ray scattering from unilamellar lipid vesicles. *J. Appl. Crystallogr.* *38*, 126–131.
- Caffrey, M. (1993). *Lipidat: Database of Thermodynamic Data and Associated Information on Lipid Mesomorphic and Polymorphic Transitions*.
- Campbell, M.A., and Wengel, J. (2011). Locked vs. unlocked nucleic acids (LNA vs. UNA): contrasting structures work towards common therapeutic goals. *Chem. Soc. Rev.* *40*, 5680–5689.
- Campins, N., Dieudonné, P., Grinstaff, M.W., and Barthélémy, P. (2007). Nanostructured assemblies from nucleotide-based amphiphiles. *New J. Chem.* *31*, 1928–1934.
- Chabaud, P., Camplo, M., Payet, D., Serin, G., Moreau, L., Barthélémy, P., and Grinstaff, M.W. (2006). Cationic Nucleoside Lipids for Gene Delivery. *Bioconjug. Chem.* *17*, 466–472.
- Chaires, J.B. (2008). Calorimetry and thermodynamics in drug design. *Annu. Rev. Biophys.* *37*, 135–151.
- Christensen, J.J., Izatt, R.M., Hansen, L.D., and Partridge, J.A. (1966). Entropy Titration. A Calorimetric Method for the Determination of ΔG , ΔH , and ΔS from a Single Thermometric Titration. *J. Phys. Chem.* *70*, 2003–2010.
- Coomber, D., Bartczak, D., Gerrard, S.R., Tyas, S., Kanaras, A.G., and Stulz, E. (2010). Programmed assembly of peptide-functionalized gold nanoparticles on DNA templates. *Langmuir ACS J. Surfaces Colloids* *26*, 13760–13762.

- Couvreur, P., Stella, B., Reddy, L.H., Hillaireau, H., Dubernet, C., Desmaële, D., Lepître-Mouelhi, S., Rocco, F., Dereuddre-Bosquet, N., Clayette, P., et al. (2006). Squalenoyl Nanomedicines as Potential Therapeutics. *Nano Lett.* *6*, 2544–2548.
- Dervan, P.B. (1986). Design of sequence-specific DNA-binding molecules. *Science* *232*, 464–471.
- Dervan, P.B. (2001). Molecular recognition of DNA by small molecules. *Bioorg. Med. Chem.* *9*, 2215–2235.
- Desbat, B., Arazam, N., Khiati, S., Tonelli, G., Neri, W., Barthélémy, P., and Navailles, L. (2012). Unexpected Bilayer Formation in Langmuir Films of Nucleolipids. *Langmuir* *28*, 6816–6825.
- Dobrovolskaia, M.A., and McNeil, S.E. (2007). Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat. Nanotechnol.* *2*, 469–478.
- Escoffre, J.-M., Portet, T., Wasungu, L., Teissié, J., Dean, D., and Rols, M.-P. (2009). What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues. *Mol. Biotechnol.* *41*, 286–295.
- Fattal, E., and Barratt, G. (2009). Nanotechnologies and controlled release systems for the delivery of antisense oligonucleotides and small interfering RNA. *Br. J. Pharmacol.* *157*, 179–194.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., and Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 7413–7417.
- Firth, J.A. (2002). Endothelial barriers: from hypothetical pores to membrane proteins. *J. Anat.* *200*, 541–548.
- Foged, C., Nielsen, H.M., and Frokjaer, S. (2007). Liposomes for phospholipase A2 triggered siRNA release: preparation and in vitro test. *Int. J. Pharm.* *331*, 160–166.
- De Fougerolles, A., Vornlocher, H.-P., Maraganore, J., and Lieberman, J. (2007). Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* *6*, 443–453.
- Freyer, M.W., and Lewis, E.A. (2008). Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions. *Methods Cell Biol.* *84*, 79–113.
- Freyssingheas, Eric, Roux, D., and Nallet, F. (1997). Quasi-Elastic Light Scattering Study of Highly Swollen Lamellar and "Sponge" Phases. *J. Phys. II* *7*, 913–929.
- Friskens, B.J. (2001). Revisiting the method of cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data. *Appl. Opt.* *40*, 4087–4091.

- Gaillard, C., and Douliez, J.-P. (2012). Cryo-TEM and AFM for the characterization of vesicle-like nanoparticle dispersions and self-assembled supramolecular fatty-acid-based structures: a few examples. In *Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology*, (Badajoz: A.Méndez-Vilas), pp. 912–922.
- Galmarini, C.M., Mackey, J.R., and Dumontet, C. (2002). Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *Lancet Oncol.* 3, 415–424.
- Giacca, M., and Zacchigna, S. (2012). Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 161, 377–388.
- Ginn, S.L., Alexander, I.E., Edelstein, M.L., Abedi, M.R., and Wixon, J. (2013). Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. *J. Gene Med.* 15, 65–77.
- Godeau, G., and Barthélémy, P. (2009). Glycosyl-Nucleoside Lipids as Low-Molecular-Weight Gelators†. *Langmuir* 25, 8447–8450.
- Godeau, G., Brun, C., Arnion, H., Staedel, C., and Barthélémy, P. (2010). Glycosyl-nucleoside fluorinated amphiphiles as components of nanostructured hydrogels. *Tetrahedron Lett.* 51, 1012–1015.
- Good, N.E., Winget, G.D., Winter, W., Connolly, T.N., Izawa, S., and Singh, R.M. (1966). Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry (Mosc.)* 5, 467–477.
- Goodsell, D., and Dickerson, R.E. (1986). Isohelical analysis of DNA groove-binding drugs. *J. Med. Chem.* 29, 727–733.
- Gray, G.D., Nichol, F.R., Mickelson, M.M., Camiener, G.W., Gish, D.T., Kelly, R.C., Wechter, W.J., Moxley, T.E., and Neil, G.L. (1972). Immunosuppressive, antiviral and antitumor activities of cytarabine derivatives. *Biochem. Pharmacol.* 21, 465–475.
- Haensler, J., and Szoka, F.C., Jr (1993). Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug. Chem.* 4, 372–379.
- Höfle, G., Steglich, W., and Vorbrüggen, H. (1978). 4-Dialkylaminopyridines as Highly Active Acylation Catalysts. [New synthetic method (25)]. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 17, 569–583.
- Hynie, S., and Smrt, J. (1978). Effects of adenosine 5'-phosphate esters with lipoid hydroxy compounds (adenosine nucleolipids) on the activity of enzymes of cyclic AMP system. *FEBS Lett.* 94, 339–341.
- Isono, K., Uramoto, M., Kusakabe, H., Kimura, K., Isaki, K., Nelson, C.C., and McCloskey, J.A. (1985). Liposidomycins: novel nucleoside antibiotics which inhibit bacterial peptidoglycan synthesis. *J. Antibiot. (Tokyo)* 38, 1617–1621.
- Jin, Y., Xin, R., Ai, P., and Chen, D. (2008). Self-assembled drug delivery systems 2. Cholesteryl derivatives of antiviral nucleoside analogues: synthesis, properties and the vesicle formation. *Int. J. Pharm.* 350, 330–337.

- Jones, L.J., Yue, S.T., Cheung, C.Y., and Singer, V.L. (1998). RNA quantitation by fluorescence-based solution assay: RiboGreen reagent characterization. *Anal. Biochem.* *265*, 368–374.
- Juliano, R., Bauman, J., Kang, H., and Ming, X. (2009). Biological Barriers to Therapy with Antisense and siRNA Oligonucleotides. *Mol. Pharm.* *6*, 686–695.
- Kapoor, M., and Burgess, D.J. (2012). Efficient and safe delivery of siRNA using anionic lipids: Formulation optimization studies. *Int. J. Pharm.* *432*, 80–90.
- Kapoor, M., Burgess, D.J., and Patil, S.D. (2011). Physicochemical characterization techniques for lipid based delivery systems for siRNA. *Int. J. Pharm.*
- Khalil, I.A., Kogure, K., Akita, H., and Harashima, H. (2006). Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol. Rev.* *58*, 32–45.
- Khiati, S., Pierre, N., Andriamanarivo, S., Grinstaff, M.W., Arazam, N., Nallet, F., Navailles, L., and Barthélémy, P. (2009). Anionic Nucleotide–Lipids for In Vitro DNA Transfection. *Bioconjug. Chem.* *20*, 1765–1772.
- Kodali, D.R., Tercyak, A., Fahey, D.A., and Small, D.M. (1990). Acyl migration in 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol. *Chem. Phys. Lipids* *52*, 163–170.
- Komarova, Y., and Malik, A.B. (2010). Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways. *Annu. Rev. Physiol.* *72*, 463–493.
- Koppel, D.E. (1972). Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants. *J. Chem. Phys.* *57*, 4814.
- Kotz, J.C., Treichel, P., and Townsend, J.R. (2012). *Chemistry & chemical reactivity* (Belmont, CA: Brooks/Cole, Cengage Learning).
- Koynova, R., and Caffrey, M. (1998). Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochim. Biophys. Acta* *1376*, 91–145.
- Koynova, R., and Tenchov, B. (2009). Cationic phospholipids: structure–transfection activity relationships. *Soft Matter* *5*, 3187–3200.
- Kukowska-Latallo, J.F., Bielinska, A.U., Johnson, J., Spindler, R., Tomalia, D.A., and Baker, J.R., Jr (1996). Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 4897–4902.
- Kyogoku, Y., Lord, R.C., and Rich, A. (1969). An infrared study of the hydrogen-bonding specificity of hypoxanthine and other nucleic acid derivatives. *Biochim. Biophys. Acta* *179*, 10–17.
- LaManna, C.M., Lusic, H., Camplo, M., McIntosh, T.J., Barthélémy, P., and Grinstaff, M.W. (2012). Charge-reversal lipids, peptide-based lipids, and nucleoside-based lipids for gene delivery. *Accounts Chem. Res.* *45*, 1026–1038.
- LERMAN, L.S. (1961). Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *J. Mol. Biol.* *3*, 18–30.

- Lévy, R., Thanh, N.T.K., Doty, R.C., Hussain, I., Nichols, R.J., Schiffrin, D.J., Brust, M., and Fernig, D.G. (2004). Rational and Combinatorial Design of Peptide Capping Ligands for Gold Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* *126*, 10076–10084.
- Lewis, G.N. (1916). THE ATOM AND THE MOLECULE. *J. Am. Chem. Soc.* *38*, 762–785.
- Li, W., and Szoka, F.C., Jr (2007). Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Pharm. Res.* *24*, 438–449.
- Liu, X., Howard, K.A., Dong, M., Andersen, M.Ø., Rahbek, U.L., Johnsen, M.G., Hansen, O.C., Besenbacher, F., and Kjems, J. (2007). The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing. *Biomaterials* *28*, 1280–1288.
- Loudet-Courreges, C., Nallet, F., Dufourc, E.J., and Oda, R. (2011). Unprecedented Observation of Days-Long Remnant Orientation of Phospholipid Bicelles: A Small-Angle X-ray Scattering and Theoretical Study. *Langmuir* *27*, 9122–9130.
- Lown, J.W. (1994). DNA recognition by lexitropsins, minor groove binding agents. *J. Mol. Recognit. JMR* *7*, 79–88.
- Luo, D., and Saltzman, W.M. (2000). Synthetic DNA delivery systems. *Nat. Biotechnol.* *18*, 33–37.
- Luscombe, N.M., Austin, S.E., Berman, H.M., and Thornton, J.M. (2000). An overview of the structures of protein-DNA complexes. *Genome Biol.* *1*, REVIEWS001.
- Luscombe, N.M., Laskowski, R.A., and Thornton, J.M. (2001). Amino acid–base interactions: a three-dimensional analysis of protein–DNA interactions at an atomic level. *Nucleic Acids Res.* *29*, 2860–2874.
- MacCoss, M., Ryu, E.K., and Matsushita, T. (1978). The synthesis, characterization, and preliminary biological evaluation of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine-5'-diphosphate-L-1,2-dipalmitin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *85*, 714–723.
- MacLaughlin, F.C., Mumper, R.J., Wang, J., Tagliaferri, J.M., Gill, I., Hinchcliffe, M., and Rolland, A.P. (1998). Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *56*, 259–272.
- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., and Hori, K. (2000). Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *65*, 271–284.
- Makarov, V., Pettitt, B.M., and Feig, M. (2002). Solvation and hydration of proteins and nucleic acids: a theoretical view of simulation and experiment. *Accounts Chem. Res.* *35*, 376–384.
- McBride, L.J., and Caruthers, M.H. (1983). An investigation of several deoxynucleoside phosphoramidites useful for synthesizing deoxyoligonucleotides. *Tetrahedron Lett.* *24*, 245–248.
- McMurry, J., and Fay, R.C. (2012). *Chemistry* (Boston: Prentice Hall).

- Mignet, N., Richard, C., Seguin, J., Largeau, C., Bessodes, M., and Scherman, D. (2008). Anionic pH-sensitive pegylated lipoplexes to deliver DNA to tumors. *Int. J. Pharm.* *361*, 194–201.
- Milani, S., Bombelli, F.B., Berti, D., Hauss, T., Dante, S., and Baglioni, P. (2006). Structural investigation of bilayers formed by 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidyl nucleosides. *Biophys. J.* *90*, 1260–1269.
- Montis, C., Milani, S., Berti, D., and Baglioni, P. (2012). Complexes of nucleolipid liposomes with single-stranded and double-stranded nucleic acids. *J. Colloid Interface Sci.* *373*, 57–68.
- Moreau, L., Barthélémy, P., El Maataoui, M., and Grinstaff, M.W. (2004). Supramolecular Assemblies of Nucleoside Phosphocholine Amphiphiles. *J. Am. Chem. Soc.* *126*, 7533–7539.
- Moreau, L., Campins, N., Grinstaff, M.W., and Barthélémy, P. (2006). A fluorocarbon nucleoamphiphile for the construction of actinide loaded microspheres. *Tetrahedron Lett.* *47*, 7117–7120.
- Moreau, L., Camplo, M., Wathier, M., Taib, N., Laguerre, M., Bestel, I., Grinstaff, M.W., and Barthélémy, P. (2008). Real time imaging of supramolecular assembly formation via programmed nucleolipid recognition. *J. Am. Chem. Soc.* *130*, 14454–14455.
- Morille, M., Passirani, C., Vonarbourg, A., Clavreul, A., and Benoit, J.-P. (2008). Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials* *29*, 3477–3496.
- Nallet, F., Laversanne, R., and Roux, D. (1993). Modelling X-ray or neutron scattering spectra of lyotropic lamellar phases : interplay between form and structure factors. *J. Phys. II* *3*, 487–502.
- Neidle, S. (2001). DNA minor-groove recognition by small molecules. *Nat. Prod. Rep.* *18*, 291–309.
- Neidle, S. (2008). *Principles of nucleic acid structure* (Amsterdam; Boston: Elsevier ; Academic Press).
- Nelson, D.L., Cox, M.M., and Lehninger, A.L. (2008). *Lehninger principles of biochemistry* (New York, NY [u.a.: Freeman).
- Nyilas, Á. (1997). A new protecting group: 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) in the synthesis of 1,2-diacylglycerols. *Chem. Phys. Lipids* *87*, 171–174.
- Oliveira, C.L.P., Gerbelli, B.B., Silva, E.R.T., Nallet, F., Navailles, L., Oliveira, E.A., and Pedersen, J.S. (2012). Gaussian deconvolution: a useful method for a form-free modeling of scattering data from mono- and multilayered planar systems. *J. Appl. Crystallogr.* *45*, 1278–1286.
- Patil, S.D., Rhodes, D.G., and Burgess, D.J. (2004). Anionic liposomal delivery system for DNA transfection. *AAPS J.* *6*, e29.
- Patil, S.D., Rhodes, D.G., and Burgess, D.J. (2005a). DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. *AAPS J.* *7*, E61–77.

- Patil, S.D., Rhodes, D.G., and Burgess, D.J. (2005b). Biophysical characterization of anionic lipoplexes. *Biochim. Biophys. Acta* *1711*, 1–11.
- Patwa, A., Salgado, G., Dole, F., Navailles, L., and Barthélémy, P. (2013). Tuning molecular interactions in lipid-oligonucleotides assemblies via locked nucleic acid (LNA)-based lipids. *Org. Biomol. Chem.* *11*, 7108–7112.
- Pauling, L. (1932). THE NATURE OF THE CHEMICAL BOND. IV. THE ENERGY OF SINGLE BONDS AND THE RELATIVE ELECTRONEGATIVITY OF ATOMS. *J. Am. Chem. Soc.* *54*, 3570–3582.
- Reddy, L.H., Dubernet, C., Mouelhi, S.L., Marque, P.E., Desmaele, D., and Couvreur, P. (2007). A new nanomedicine of gemcitabine displays enhanced anticancer activity in sensitive and resistant leukemia types. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *124*, 20–27.
- De Rosa, G., De Stefano, D., and Galeone, A. (2010). Oligonucleotide delivery in cancer therapy. *Expert Opin. Drug Deliv.* *7*, 1263–1278.
- Rosemeyer, H. (2005). Nucleolipids: natural occurrence, synthesis, molecular recognition, and supramolecular assemblies as potential precursors of life and bioorganic materials. *Chem. Biodivers.* *2*, 977–1063.
- Rubas, W., Supersaxo, A., Weder, H.G., Hartmann, H.R., Hengartner, H., Schott, H., and Schwendener, R. (1986). Treatment of murine L1210 lymphoid leukemia and melanoma B16 with lipophilic cytosine arabinoside prodrugs incorporated into unilamellar liposomes. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *37*, 149–154.
- Schwendener, R., and Schott, H. (2005). Lipophilic arabinofuranosyl cytosine derivatives in liposomes. *Methods Enzymol.* *391*, 58–70.
- Seeman, N.C., Rosenberg, J.M., and Rich, A. (1976). Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *73*, 804–808.
- Spink, N., Brown, D.G., Skelly, J.V., and Neidle, S. (1994). Sequence-dependent effects in drug-DNA interaction: the crystal structure of Hoechst 33258 bound to the d(CGCAAATTTGCG)₂ duplex. *Nucleic Acids Res.* *22*, 1607–1612.
- Strekowski, L., and Wilson, B. (2007). Noncovalent interactions with DNA: an overview. *Mutat. Res.* *623*, 3–13.
- Takatsuki, A., Arima, K., and Tamura, G. (1971). Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization of tunicamycin. *J. Antibiot. (Tokyo)* *24*, 215–223.
- Turnbull, W.B., and Daranas, A.H. (2003). On the Value of c: Can Low Affinity Systems Be Studied by Isothermal Titration Calorimetry? *J. Am. Chem. Soc.* *125*, 14859–14866.
- Underhill, D.M., and Ozinsky, A. (2002). Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu. Rev. Immunol.* *20*, 825–852.

Verma, I.M., and Weitzman, M.D. (2005). Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 711–738.

Voet, D., and Voet, J.G. (2011). *Biochemistry* (Hoboken, NJ: John Wiley & Sons).

WATSON, J.D., and CRICK, F.H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737–738.

Wei, X. (2013). Coupling activators for the oligonucleotide synthesis via phosphoramidite approach. *Tetrahedron* 69, 3615–3637.

Wirth, T., Parker, N., and Ylä-Herttuala, S. (2013). History of gene therapy. *Gene* 525, 162–169.

Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F., and Lin, L.N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* 179, 131–137.

Wolfrum, C., Shi, S., Jayaprakash, K.N., Jayaraman, M., Wang, G., Pandey, R.K., Rajeev, K.G., Nakayama, T., Charrise, K., Ndungo, E.M., et al. (2007). Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. *Nat. Biotechnol.* 25, 1149–1157.

Ylä-Herttuala, S. (2012). Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 20, 1831–1832.

Zidovska, A., Ewert, K.K., Quispe, J., Carragher, B., Potter, C.S., and Safinya, C.R. (2009). Block liposomes from curvature-stabilizing lipids: connected nanotubes, -rods, or -spheres. *Langmuir ACS J. Surfaces Colloids* 25, 2979–2985.

Zilman, and Granek (1996). Undulations and Dynamic Structure Factor of Membranes. *Phys. Rev. Lett.* 77, 4788–4791.

Liste de publications et communications

Publications

Desbat, Bernard ; Arazam, Nessim ; Khiati, Salim ; **Tonelli, Giovanni** ; Neri, Wilfrid ; Barthélémy, Philippe ; et Navailles, Laurence. 2012. « Unexpected bilayer formation in Langmuir films of nucleolipids ». *Langmuir* 28 (17) (mai 1) : 6816-6825. doi : 10.1021/la2047596.

Tonelli, Giovanni ; Oumzil, Khalid ; Nallet, Frédéric ; Gaillard, Cédric ; Navailles, Laurence ; et Barthélémy, Philippe. 2013. « Amino acid-nucleotide-lipids : effect of amino acid on the self-assembly properties ». *Langmuir* 29 (18) (mai 7) : 5547-5555. doi : 10.1021/la400515.

Communications orales

Tonelli, Giovanni. 2011. « Organized systems derived from hybrid amphiphilic molecules (LipNuc) for nucleic acid delivery ». 2^{ème} réunion plénière GDR “Assemblages supramoléculaires et membranes biologiques”, Agde, France. (17-21 Octobre 2011).

Communications par affiche

Tonelli, Giovanni ; Oumzil, Khalid ; Nallet, Frédéric ; Gaillard, Cédric ; Navailles, Laurence ; et Barthélémy, Philippe. 2013. « Amino-acids-nucleotide-lipids : effect of amino acids on the self-assembly properties ». IVth International Symposium on SupraBiomolecular Systems – SupraBio IV – Next generation, Cassis, France. (13-14 June 2013).

Tonelli, Giovanni ; Oumzil, Khalid ; Nallet, Frédéric ; Gaillard, Cédric ; Navailles, Laurence ; et Barthélémy, Philippe. 2013. « Amino-acids-nucleotide-lipids : effect of amino acids on the self-assembly properties ». 13^{ème} Journée de l'Ecole Doctorale Science de la vie et de la Santé, Archachon, France. (10 Avril 2013).

Tonelli, Giovanni ; Nallet, Frédéric ; Navailles, Laurence ; Barthélémy, Philippe. 2012. « Hybrid Aminoacid-Nucleotide-Lipids (ANLs) for nucleic acid delivery ». 12^{ème} Journée de l'Ecole Doctorale Science de la vie et de la Santé, Archachon, France. (28 Mars 2012).

Tonelli, Giovanni ; Nallet, Frédéric ; Navailles, Laurence ; Barthélémy, Philippe. 2011. « Hybrid Aminoacid-Nucleotide-Lipids (ANLs) for nucleic acid delivery ». 26th GTRV (Groupe thématique de recherche sur la vectorisation) scientific meeting, Brussels, Belgique. (5-7 décembre 2011).