Utilisation de la RMN pour la caractérisation structurale et cinétique d'associations peptide-liposome comme aide à la conception de formulation

Camille Doyen

▶ **To cite this version:**

Camille Doyen. Utilisation de la RMN pour la caractérisation structurale et cinétique d'associations peptide-liposome comme aide à la conception de formulation. Chimie analytique. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASS110 . tel-03200192

HAL Id: tel-03200192
https://theses.hal.science/tel-03200192

Submitted on 16 Apr 2021

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

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

Thèse de doctorat

NNT : 2020UPASS110

université PARIS-SACLAY

Utilisation de la RMN pour la caractérisation structurale et cinétique d'associations peptide - liposome comme aide à la conception de formulation

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569 : innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : biochimie et biologie structurale

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CNRS, Institut de Chimie des Substances Naturelles, UPR 2301, 91198, Gif-sur-Yvette, France.
Référent : Faculté de pharmacie

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 23 juin 2020, par

Camille DOYEN

Composition du Jury

Aurélie MALZERT-FREON Professeure des universités, Université de Caen (CERMN)	Présidente du jury
Burkhard BECHINGER Professeur des universités, Université de Strasbourg (Institut de chimie)	Rapporteur
Arnaud BONDON Directeur de recherche, HDR, CNRS (ISCR)	Rapporteur
Amélie BOCHOT Professeure des universités, Université Paris-Saclay (Institut Galien)	Examinatrice
Ewen LESCOP Chargé de recherche, CNRS (ICSN)	Directeur de thèse
Christina Sizun Chargée de recherche, CNRS (ICSN)	Co-directrice de thèse
Jean-Pierre BURNOUF Project Management Innovation (Sanofi)	Invité

Table des matières

REMERCIEMENTS ..... **VII**

ABRÉVIATIONS ..... **VIII**

INTRODUCTION **1**

PARTIE I : CONTEXTE DE CE TRAVAIL **2**

CHAPITRE 1 : DIFFÉRENTES APPROCHES POUR AUGMENTER LA DURÉE DE VIE DES MÉDICAMENTS *IN VIVO* 2

1.1. Les solutions ou suspensions classiques *24*

1.2. Formulations à base de cyclodextrines *24*

1.3. Les Hydrogels *25*

1.4. Les sphères polymériques *27*

1.5. Micelles polymériques *27*

1.6. Les liposomes *27*

1.6.1 Structure et composition des liposomes 28

1.6.1 Transition de phase dans les liposomes 29

1.6.2 Les différentes méthodes de préparation des liposomes 30

a) Formation des liposomes 30

b) Réduction de la taille des liposomes 31

c) Encapsulation de molécules dans les liposomes 33

1.6.3 Préparation des liposomes au niveau R&D et industriel et encapsulation de principes actifs 34

1.6.4 Les différents types de liposomes 36

a) Les liposomes PEGylés 36

b) Les liposomes vectorisés 37

c) Les liposomes multifonctions 37

d) Les liposomes thermosensibles 37

e) Les suspensions liposomales commercialisées 38

1.6.5 Stabilité des liposomes 39

1.6.6 Impact du cholestérol sur la membrane des liposomes 40

1.6.7 Optimisation des liposomes pour ralentir et contrôler le relargage 41

CHAPITRE 2 : LES PEPTIDES THÉRAPEUTIQUES 23

2.1. Généralités *23*

2.1.1 La place des peptides dans l'industrie pharmaceutique 23

2.1.2 Méthodes de synthèse 25

2.1.1 Avantages et inconvénients des peptides thérapeutiques par rapport aux petites molécules, aux protéines et aux anticorps 27

2.2. Approches pour augmenter la durée de vie des peptides médicaments in vivo *28*

2.2.1 Substitution d'acides aminés naturels par des acides aminés non naturels 28

2.2.2 Cyclisation des peptides 28
2.2.3 PEGylation des peptides 28
2.2.4 Greffage de chaînes lipidiques 28
2.2.5 Conjugaison avec de l'albumine 29
2.2.6 Encapsulation des peptides dans les liposomes 29
CHAPITRE 3 : APELINE ET LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES 3
3.1. Le rôle de l'apeline dans l'homéostasie du système cardiovasculaire 3
3.2. Etudes actuelles et place de l'apeline dans les recherches pharmaceutiques 3
3.2.1 Etude des structures des peptides apeline 3
3.2.1 Dégradation de l'apeline *in vivo*, exemple 4
3.2.2 Modification chimique réalisée sur la série de peptides apeline pour augmenter sa durée de vie *in vivo* 5
3.2.3 Etudes cliniques 6
3.2.4 Autre application du peptide apeline 6
3.3. Autres molécules possédant une affinité pour le récepteur APJ 6
CHAPITRE 4 : PRINCIPES DES MÉTHODES D'ANALYSES COURAMMENT UTILISÉES POUR ÉTUDIER LES LIPOSOMES 3
4.1. Diffusion quasi-élastique de la lumière 3
4.2. Dialyse 2
4.3. Potentiel Zêta 2
4.4. Résonance Magnétique Nucléaire 3
4.4.1 RMN 1H 5
4.4.2 RMN ^{31}P 6
4.4.3 RMN ^{19}F 8
4.5. Microscopie électronique à transmission 8
4.6. Chromatographie Liquide 10
4.7. Centrifugation analytique ou ultracentrifugation 11
4.8. Cytométrie de flux 11
4.9. Diffusion des rayons X aux petits angles 12
4.10. Résumé des méthodes 12
CHAPITRE 5 : OBJECTIFS ET STRATÉGIE DE CETTE THÈSE 51

PARTIE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES 2

CHAPITRE 1 : PROTOCOLES DE SYNTHÈSES 2
1.1 Synthèse des peptides 2
1.1.1 Synthèse sur phase solide 2
a) Mécanisme 2
b) Ajout des chaînes lipidiques 3
1.1.2 Purification du peptide 4
1.1.3 Echange de sel du peptide : TFA vers acétate 5
1.2. Synthèse des molécules paramagnétiques 5

CHAPITRE 2 : PRÉPARATION DES LIPOSOMES ET ENCAPSULATION DE PEPTIDE 2

2.1. Méthode de préparation des liposomes *2*

2.1.1 La sonication 2

2.1.2 L'extrusion 2

2.1.3 Détermination du nombre de phospholipides par vésicule 3

2.2. L'encapsulation de peptides *3*

2.2.1 Séparation des peptides à l'extérieur des liposomes et des liposomes chargés 3

2.2.2 Quantification des peptides encapsulés 4

CHAPITRE 3 : MÉTHODES D'ANALYSES 2

3.1. Résonance Magnétique Nucléaire *2*

3.1.1 Acquisition des spectres ^{1}H 2

a) Attribution des spectres des peptides 2

b) Diffusion Ordered Spectroscopy 2

3.1.2 Acquisition des hétéro-noyaux 4

a) Acquisition des spectres ^{31}P 4

b) Acquisition des spectres ^{19}F 5

3.1.3 Traitement des spectres RMN 1D 1H pour l'analyse par composante principale 5

3.2. Diffusion quasi-élastique de la lumière *5*

3.2.1 Mesure de la taille des particules 6

3.2.2 Suivi de taille des particules en fonction de la température 6

3.3. Cryo-TEM *6*

3.4. Mesure d'osmolarité *7*

PARTIE III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS 3

CHAPITRE 1 : ETUDE DE LA STRUCTURE DES PEPTIDES EN SOLUTION 3

1.1. Fragment d'apeline – K14P *3*

1.1.1 Attribution du spectre RMN de K14P et détermination de sa structure 2

1.1.2 Etat d'auto-association de K14P par RMN 5

1.2. Peptides dérivés d'apeline *6*

1.2.1 C16-K14P 6

a) Attribution du spectre RMN de la forme monomère de C16-K14P et détermination de sa structure 7

b) Etat d'auto-association de C16-K14P par RMN et DLS 8

1.2.2 C11-K14P 11

a) Attribution du spectre RMN de la forme monomère de C11-K14P et détermination de sa structure 11

b) Etat d'auto-association de C11-K14P par RMN et DLS 12

1.2.3 C11F-K14P 13

a) Attribution du spectre RMN de la forme monomère de C11F-K14P et détermination de sa structure 14

b) Identification des signaux RMN ^{19}F 14

c) Etat d'auto-association de C11F-K14P par RMN et DLS 15

1.3. Conclusion *16*

CHAPITRE 2 : ETUDE DE LA STRUCTURE DES LIPOSOMES 2

2.1. Nomenclature des échantillons 2

2.2. Etudes des liposomes blancs 129

2.2.1 Etude de la structure des liposomes soniqués blancs et effet de la température sur leur structure 129

a) Attribution des spectres RMN 1D 1H des liposomes soniqués blancs à différentes températures 129

b) Détermination de la température de transition des liposomes soniqués blancs par RMN 1D ^{1}H 132

c) Structure des liposomes soniqués blancs par RMN ^{31}P à différentes températures 134

d) Structure des liposomes soniqués blancs par cryo-TEM et DLS 137

2.2.2 Impact de la durée de la sonication sur la structure des liposomes 139

a) Liposome sans sonication : « Giant Multilamellar Vesicles » 140

b) Liposomes avec différentes durées de sonication 141

2.2.3 Structure des liposomes extrudés blancs 144

a) Etude de la structure des liposomes extrudés blancs par cryo-TEM et DLS 144

b) Détermination de la température de transition des liposomes extrudés 146

c) Structure des liposomes extrudés par RMN 31P et comparaison avec les liposomes soniqués 147

2.3. Effet de l'encapsulation de peptides dans des liposomes 148

2.3.1 Effet de l'encapsulation sur les liposomes soniqués 148

a) Impact de l'encapsulation de peptides sur la structure des liposomes soniqués étudié par RMN 1D ^{1}H 148

b) Impact de l'encapsulation de peptides sur des liposomes soniqués étudié par RMN ^{31}P 149

2.3.2 Effet de l'encapsulation sur les liposomes extrudés 150

a) Evolution de la taille des liposomes extrudés en fonction de leurs chargements par DLS 150

b) Impact de l'encapsulation de K14P sur les liposomes extrudés par RMN ^{31}P 151

c) Impact de l'encapsulation de C16-K14P sur la structure des liposomes extrudés par RMN ^{31}P 152

d) Observation directe d'encapsulation de peptides sur les liposomes extrudés par cryo-TEM 154

2.3.3 Rendement d'encapsulation en fonction du peptide et du mode de préparation des liposomes 155

2.4. Effet du cholestérol sur les liposomes blancs 156

2.4.1 Détermination de la température de transition par RMN 1D ^{1}H des liposomes blancs pour différentes quantités de cholestérol 156

2.4.2 Evolution de la taille des liposomes blancs avec la température par DLS 157

2.4.3 Impact du cholestérol sur la structure des liposomes blancs par ^{31}P RMN 159

a) Liposomes extrudés 159

b) Liposomes soniqués 160

2.4.4 Observation directe de l'impact de la température et du cholestérol des liposomes extrudés par Cryo-TEM 161

2.5. Conclusion 162

CHAPITRE 3 : ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE PEPTIDES ET LIPOSOMES 129

3.1. Détermination de la concentration en liposomes 129

3.2. Etude des interactions entre peptides et liposomes soniqués 2

3.2.1 Optimisation du protocole 2

3.2.2 Titrage de K14P en l'absence de sel 3

3.2.3 Titrage de K14P en présence de sel 4
3.2.4 Titrage de C16-K14P à une concentration inférieure à la concentration micellaire critique 5
3.2.5 Titrage de C16-K14P à une concentration supérieure à la CMC 7
3.3. Etude des interactions entre peptides et liposomes extrudés 7
3.3.1 Titrage de K14P 8
3.3.2 Titrage de C16-K14P 9
3.3.3 C11-K14P 9
3.3.4 C11F-K14P 10
3.4. Comparaison et classement des peptides en fonction de leur interaction avec les liposomes extrudés 11
3.5. Comparaison et classement des liposomes extrudés et soniqués 12
3.6. Conclusion 12
CHAPITRE 4 : DIFFÉRENCIATION DES PEPTIDES À L'INTÉRIEUR ET À L'EXTÉRIEUR DES LIPOSOMES 143
4.1. Différenciation des peptides encapsulés et libres à partir des spectres RMN 1D ^{1}H 143
4.1.1 Variation des déplacements chimiques 2
4.1.2 Estimation de la quantité de peptide encapsulé et libre 5
4.2. Différenciation des peptides encapsulés et libres à l'aide d'agents paramagnétiques 5
4.2.1 Utilisation d'un agent relaxant : $Gd(DOTA)^-$ 7
4.2.2 Utilisation d'agents affectant les déplacements chimiques : $Dy(DOTP)^{5-}$, $Tb(DOTP)^{5-}$ et $Tm(DOTP)^{5-}$ 9
a) Synthèse des complexes 10
b) Simulation de l'encapsulation et de relargage des peptides 10
c) Influence de $Ln(DOTP)^{5-}$ sur les liposomes 14
d) Effet du champ magnétique sur la relaxation transversale du peptide en présence d'un complexe paramagnétique 15
4.3. Différenciation des peptides encapsulés et libres à partir de spectres RMN DOSY ^{1}H 16
4.3.1 Optimisation des paramètres 16
a) La puissance des gradients 16
b) Les délais de la séquence 17
c) La température d'acquisition 17
d) Le nombre de scans 17
4.3.2 Traitement des données et extraction des coefficients de diffusion 18
a) Comparaisons de l'analyses des spectres à partir de l'intensité et de l'intégrale des signaux 18
b) Répétabilité de l'analyse des données avec le logiciel Dynamics Center 19
4.3.3 Coefficient de diffusion du peptide libre 19
4.3.4 Coefficient de diffusion de peptides encapsulés et différenciation des peptides libres et encapsulés 20
4.3.5 Estimation de la quantité de peptide encapsulé et libre 22
4.3.6 Comparaison des coefficients de diffusion mesurés avec ceux extraits de la littérature 22
4.4. Conclusion 23
CHAPITRE 5 : CINÉTIQUE DE RELARGAGE DES PEPTIDES 166

5.1. Suivi de la cinétique de relargage de K14P encapsulé dans des liposomes soniqués et quantification 166

5.1.1 Etablissement d'un plan d'expériences 166

5.1.2 Suivi de la cinétique de relargage de K14P par DOSY et 1D ^{1}H sans sonde paramagnétique (tube 1) 2

a) RMN 1D ^{1}H 3

b) Détermination du coefficient de diffusion du peptide par DOSY et quantification 5

c) Utilisation des acquisitions DOSY comme filtre 7

d) Lavage de l'échantillon après les traitements thermiques 8

e) Est-il plus adéquat d'analyser les échantillons à la température du traitement thermique ou à 5 °C ? 8

f) Suivi du relargage de l'HEPES pendant le traitement thermique 9

g) Suivi du relargage de l'eau pendant le traitement thermique 11

5.1.3 Analyse de la cinétique de relargage de K14P avec un agent paramagnétique affectant les déplacements chimiques Dy(DOTP)$^{5-}$ (Tube 2) 12

a) Spectres RMN 1D ^{1}H 12

b) Utilisation des acquisitions DOSY pour suivre la cinétique de relargage et la quantifier 13

c) Utilisation des acquisitions DOSY comme filtre 14

d) Etude de l'impact du complexe paramagnétique sur les mesures de coefficients de diffusion. 15

5.1.4 Suivi de la cinétique de relargage pour mieux comprendre les mécanismes impliqués 17

5.1.5 Utilisation d'analyse en composantes principales 20

5.2. Etude de la cinétique de relargage de C16-K14P dans des liposomes soniqués 21

5.2.1 RMN 1D ^{1}H 22

5.2.2 DOSY 26

5.3. Etude de la cinétique de relargage de K14P dans des liposomes extrudés 26

5.3.1 RMN 1D ^{1}H 27

5.3.2 Cinétique de relargage de K14P dans des liposomes extrudés contenant 0 % de cholestérol 29

5.4. Etude de la cinétique de relargage de C16-K14P dans des liposomes extrudés 31

5.4.1 RMN 1D ^{1}H 31

5.4.2 DOSY 34

5.5. Conclusion 35

CHAPITRE 6 : CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 2

6.1. Structure des peptides 2

6.2. Structure des liposomes 2

6.3. Interactions peptide - liposome 4

6.4. Différentiation des peptides libres et encapsulés dans les liposomes et cinétique de relargage 6

6.5. Intérêt de la RMN pour étudier les associations peptide - liposome 7

6.6. Conclusion et perspectives 8

ANNEXE I. ATTRIBUTION DES SPECTRES RMN 1D ^{1}H DES PHOSPHOLIPIDES DANS DU CHLOROFORME 1

ANNEXE II. SÉQUENCE DOSY MODIFIÉE 4

BIBLIOGRAPHIE 9

Remerciements

Je remercie tout d'abord le Professeur Burkhard Bechinger et le Docteur Arnaud Bondon de me faire l'honneur d'être rapporteurs de ce travail. Merci aussi au Professeure Amélie Bochot, au Professeure Aurélie Malzert-Fréon pour la participation au jury de thèse.

Merci Carine van Heijenoort pour m'avoir accueilli dans son équipe à l'ICSN et merci à Serge Sablé pour l'accueil dans le labo RMN de Sanofi.

Un grand merci à mes directeurs de thèse, Ewen Lescop et Christina Sizun. Merci pour vos conseils, vos relectures et votre écoute. Ewen, merci pour le temps passer sur la théorie de la RMN et devant les spectros. Christina, merci pour ta disponibilité et pour avoir gardé ta porte ouverte pour toutes mes questions. Merci à vous de m'avoir guidé pendant ces trois années.

Merci à Frederic Herman, Oriane Frances, Jean-Pierre Burnouf et Marie-Françoise Nicolas pour votre aide et pour m'avoir soutenu sur ce projet.

Merci à Ronan Larget, Alexandre Raux et Géraldine Manet pour l'accueil dans le laboratoire de synthèse peptidique et l'aide que vous m'avez apportée.
Merci à Lahlou Nait-Bouda et Eric Serruau pour votre aide dans le laboratoire de formulation.
Merci à Philippe Durand pour les conseils pour la synthèse des complexes paramagnétiques.
Merci à Eric Larquet pour l'analyse de mes liposomes par cryo-TEM.
Merci à Maïna Kerbrat pour les analyses ACP.

J'aimerai remercier tous les permanents du 23b : Alda pour les repas et les thés partagés dans la cafét du labo, Vero pour les one-woman show du matin, Guillaume pour tes blagues incorrectes et décalées, Nelly pour ta gentillesse et ton esprit toujours positif, François G. pour les blagues toujours placées avec discrétion, François B. pour le partage de ta culture scientifique et philosophique, Nadine pour ton écoute et ta bonne humeur.

Merci aussi à tous les non-permanents du labo : Louise pour les débriefs du matin et dans le RER, Anaïs pour toutes nos discussions et nos échanges de boutures, Corentin pour avoir partagé ta culture geek et pour les démonstrations de rubik's cube, Claire-Marie pour ta bonne humeur dans le labo et les « chocolats d'urgence », Luiza, Ludmilla, Augustin, Christophe et Florian pour votre humour et les discussions dans le labo. Merci aussi à tous les stagiaires, (Ndèye, Marie, …).

Je tiens à remercier toute l'équipe RMN de Sanofi, Caroline, Eric, Giles, Isabelle Marie-Line, Philippe, Sylvie et Valérie. Merci à vous pour les pauses thé (avec ou sans gâteaux), votre bonne humeur et vos blagues (surtout celle du vendredi). J'aimerai aussi remercier tous les stagiaires et alternants qui sont passés par le labo : Abder, Amandine, Chloé, Laurene, Sebastien et Tatiana.

Merci à toute l'équipe du CEI 2018 pour le soutien mutuel, le temps passé à préparer et manger des crêpes et pour cette partie d'UNO géante mémorable. Merci à Oriane pour la découverte de la pizzeria aux Gobelins. Merci à Pauline, Charlotte et Vincent pour tous les midis passés avec vous.

Merci à toutes les personnes qui m'ont soutenu en dehors du labo : Shirley pour ton écoute, ta franchise et nos diners sucrés, Julien pour ta curiosité et ton envie de tout comprendre, Eugénie pour ton initiation au scoutisme (ah non toujours pas ?), Gwendoline pour nos aventures de voyages. Lucie, Julien, Jean-Thomas, Mathilde, Lauriane, Marion, Baptiste, Kate et Martine pour tous les moments de qualité passés avec vous. Merci à Geoffroy de m'avoir nourri pendant les mois de rédaction.
Merci aussi aux AfterH, cet after pro qui s'est transformé en rendez-vous potins mensuel ! Merci à Julien, Isabelle et Gaelle pour toutes les soirées passées avec vous.

Enfin, merci à ma famille : mes parents qui m'ont soutenu tout au long de mes études, sans qui je ne serais pas là aujourd'hui, ma sœur, Mathilde, pour nos heures passées au téléphone et les voyages que nous avons partagés et mes grands-parents pour leur soutien.

Abréviations

ACP	Analyse en composantes principales
ADN	Acide désoxyribonucléique
Akt	Protéine kinase B
Bpa	4-benzoyl-L-phenylalanine
BMS	« Bulk magnetic susceptibility »
Cha	β-cyclohexylalanine
CHOL	Cholestérol
CMC	Concentration micellaire critique
cryo-TEM	cryo-Microscopie électronique à transmission
CTC	Chlorure de 2-chloro-trityle
cGMP	Guanosine monophosphate cyclique
D	Coefficient de diffusion
d1	Délai de recyclage
DAG	Diacyl glycérol
DDS	« Drug delivery systems »
DIEA	N,N-diisopropyléthylamine
DLS	« Dynamic light scattering », diffusion quasi-élastique de la lumière
DMF	N,N-diméthylformamide
DMPG	1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol)
DOPC	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DOSY	Diffusion ordered spectroscopy
DOTP	Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétrayltétrakis-(méthylphosphonique)
DPPC	1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine
DSPC	1,2-distearoylphosphatidylcholine
DSS	Acide 4,4-diméthyl-4-silapentane-1-sulfonique
ECA1	Enzyme humaine de conversion de l'angiotensine 1
ECA2	Enzyme humaine de conversion de l'angiotensine 2
eNOS	Oxyde nitrique synthase endothéliale
EPC	Phosphatidylcholine d'œuf
EPG	Phosphatidyl glycérol d'œuf
FDA	« Food and drug administration »
Fmoc	9-fluorénylméthyloxycarbonyle
GMV	« Giant multilamellar vesicles »

GUV	« Giant uni-lamellar vesicle »
GTP	Guanosine triphosphate
HCTU	O-(6-chlorobenzotriazol-1-yl)-N,N,N′,N′-tetramethyluronium hexafluorophosphate
HPH	« High pressure homogenizer »
HPLC	Chromatographie liquide haute pression
Ig	Immunoglobuline
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
IRM	Imagerie par résonance magnétique
LUV	« Large uni-lamellar vesicle »
MLV	« Multi-lamellar vesicle »
MSPC	1-Myristoyl-2-stearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
MVL	« Multi vesicular liposome »
Nle	Norleucine
NO	Oxyde nitrique
NOESY	« Nuclear overhauser effect spectroscopy »
NS	Nombre de scans
OLV	« Oligo-lamellar Vesicle »
OPP	Octadecyl-(1,1-dimethyl-4-piperidino-4-yl)-phosphate
PA	Principe actif
PAA	Poly(acide acrylique)
PCS	« Pseudocontact Shift»
PdI	Index de polydispersité
PEG	Polyéthylène glycol
PEG_{2000}DSPE	N-(O-methyl-polyethylenglyc- yl)-l,2-distearyl-s,n-glycero-3-phosphoethanol-amine
pI	Point isolélectrique
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PM	Poids moléculaire
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RS	Réticulum sarcoplasmique
SAXS	Diffusion des rayons X aux petits angles
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique
sGC	Guanylate cyclase soluble
SUV	« Small Uni-lamellar Vesicle »

T_1	Relaxation longitudinale
T_2	Relaxation transversale
^{t}Boc	tert-Butyloxycarbonyl
τ_c	Temps de corrélation rotationnel
T_m	Température de transition
t_R	Temps de rétention
TFA	Acide trifluoroacétique
TIS	Tri-isopropylsilane
TOCSY	« Total corelation spectroscopy »
UV	« Uni-lamellar vesicle »

Introduction

L'encapsulation de principes actifs (PA) dans des liposomes est utilisée dans de nombreux domaines tels que les industries pharmaceutiques et cosmétiques. Les liposomes sont des « Drug delivery systems » (DDS) utilisés pour leur relargage contrôlé des PA. Dans ce projet les PA sélectionnés sont des peptides. Ces molécules sont appréciées pour leur sélectivité et leur affinité relativement importante pour les cibles pharmaceutiques. Cependant les peptides ont des temps de demi-vie courts, réduisant le temps pendant laquelle ils sont efficaces *in vivo*. Une méthode pour augmenter l'efficacité de peptides est de les encapsuler dans des liposomes qui serviront à les transporter et les protéger. Il est ensuite possible d'optimiser les liposomes et, lorsque cela est possible, les peptides pour contrôler le relargage des peptides après injection sous-cutanée. Pour cela il faut jouer à la fois sur la composition des liposomes et la structure des peptides. Les paramètres à améliorer sont leurs interactions, l'efficacité d'encapsulation et la cinétique de relargage. L'objectif est ici d'évaluer l'intérêt de la spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) pour caractériser les peptides, les liposomes et leurs comportements pendant le relargage afin de mieux comprendre comment maîtriser ces paramètres. Les peptides utilisés dans cette étude sont dérivés de l'apeline, peptide qui a un intérêt pour la régulation homéostatique du système cardiovasculaire.

Les chapitres d'introduction permettront de positionner ce travail par rapport à la littérature ainsi que de décrire les objets étudiés et les méthodes utilisées. Le premier chapitre présente différentes techniques utilisées afin d'augmenter la durée de vie d'un PA *in vivo*. Les liposomes sont une des méthodes existantes et seront présentés plus en détails avec notamment une présentation des différents types de liposomes, leurs modes de préparation, leur stabilité et les stratégies déjà mises en place pour optimiser et contrôler le relargage de leurs PA encapsulés. Le deuxième chapitre permettra de positionner les peptides en tant que PA dans l'industrie pharmaceutique ainsi que les méthodes déjà utilisées pour augmenter la durée de vie *in vivo* de ces molécules. Le peptide étudié, l'apeline, est principalement connu pour ses effets sur le système cardiovasculaire. Son rôle dans les voies de signalisation ainsi que les études actuelles sur ces peptides seront présentés dans le chapitre 3. Le chapitre 4 sera consacré à l'état de l'art des méthodes analytiques couramment utilisées pour étudier les peptides, les liposomes, leurs interactions et leurs cinétiques de relargage. Enfin le chapitre 5 présentera les objectifs de cette thèse et les approches utilisés pour les atteindre.

La partie II « matériels et méthodes » sera l'occasion de détailler les différentes méthodes et protocoles utilisés pendant ce projet, de la synthèse des peptides à la préparation des liposomes et aux méthodes utilisées pour caractériser les peptides, les liposomes et les cinétiques de relargage des peptides.

La dernière partie « résultats » est divisée en six chapitres. Le premier sera consacré à l'étude structurale par RMN de 4 peptides dérivés de l'apeline. Trois d'entre eux ont en plus de la séquence d'apeline une chaîne lipidique accrochée en position N-terminale et une de ces chaînes est une chaîne fluorée. Le deuxième chapitre est une étude de la structure des liposomes, ainsi que de l'influence de certains paramètres sur leurs structures. Ces paramètres sont : la température ou la quantité de cholestérol dans la formulation. Une majorité des expériences a été réalisée sur deux types de liposomes : des liposomes préparés par sonication ou par extrusion. Une fois les peptides et les liposomes caractérisés, il est possible d'étudier leurs interactions, ce qui est présenté dans le chapitre 3. Avant de pouvoir étudier des cinétiques de relargage, le chapitre 4 présente différentes méthodes employées pour différencier les peptides encapsulés et libres, par RMN. Ce chapitre présentera également le cheminement réalisé pour optimiser les différentes méthodes. Le chapitre 5 montrera les méthodes utilisées pour suivre la cinétique de relargage de peptides encapsulés dans des liposomes ainsi que les informations extraites quant aux mécanismes de relargage et aux possibilités pour augmenter la durée de vie des PA *in vivo*. Finalement, les discussions sur ces résultats et la conclusion se trouvent dans le chapitre 6.

Partie I : Contexte de ce travail

Chapitre 1 : Différentes approches pour augmenter la durée de vie des médicaments *in vivo*

Un des objectifs principaux de l'industrie pharmaceutique est d'améliorer le confort des patients. Pour cela le développement de formulations permettant d'une part d'espacer les administrations, d'autre part, de cibler certains organes en diminuant les effets secondaires est très important. Ce projet porte sur des formulations administrables par voie sous cutanée, qui est une voie d'administration parentérale. Les techniques décrites dans ce chapitre concernent, de manière plus générale, la voie parentérale. Plusieurs approches sont connues pour permettre d'optimiser la libération d'un PA ainsi que sa demi-vie dans l'organisme de manière à diminuer sa fréquence d'administration. Parmi ces approches, les plus couramment utilisées sont :

- le développement de suspensions classiques ou de formulations dont le véhicule va diffuser très rapidement après administration et conduire à une précipitation locale du PA. Dans ce cas, la cinétique de solubilisation du PA aura un fort impact sur son profil pharmacocinétique. Ce type de formulation n'est pas destiné à la voie intra veineuse mais plus particulièrement aux voies sous-cutanée ou intramusculaire.
- la modification du PA par couplage à une protéine (par exemple l'albumine) ou à une cyclodextrine (Uekama, Hirayama and Irie, 1998), dans ces deux cas, l'élimination du PA sera

ralentie ; la liaison à une protéine spécifique peut également permettre un ciblage de certains organes et, en conséquence, une potentielle diminution de la dose et des effets secondaires (Kratz, 2008).

- le développement de DDS dans lesquels le PA est encapsulé tels que les matrices polymériques (par exemple les hydrogels), les nanoparticules (qui peuvent être polymériques mais également à base d'albumine), les liposomes (Kratz, 2008).

1.1. Les solutions ou suspensions classiques

Toutes formulations de PA destinées à une administration parentérale sont fabriquées par ajout d'excipients ou d'additifs au principe actif dans le but, par exemple, d'augmenter la solubilité du PA, de rendre possible sa lyophilisation ou encore de prolonger sa durée de vie dans l'organisme (Pramanick, Singodia and Chandel, 2013).

Il est possible d'augmenter la solubilité d'un PA en utilisant un tensioactif, qui réduit la tension de surface des molécules permettant une meilleure solubilité, ou bien un co-solvant, qui est un second solvant ajouté au solvant principal pour permettre une meilleure solubilisation du PA. L'utilisation d'une solution tampon pour stabiliser le pH des formulations permet d'améliorer la solubilité du PA et/ou de limiter sa dégradation chimique pendant le stockage de la formulation. Pour être bien tolérée les formulations doivent avoir une osmolarité la plus proche de l'osmolarité du sang. Il est donc nécessaire dans certains cas d'ajuster la concentration osmotique des formulations avec des molécules telles que le dextrose, la glycérine ou le mannitol. Ensuite des conservateurs sont utilisés pour augmenter la durée de conservation des formulations. Ce sont principalement des antioxydants (acide ascorbique), des antimicrobiens (parabènes) et des agents complexants. Finalement, les formulations peuvent être lyophilisées pour augmenter leur stabilité pendant le stockage. L'étape de lyophilisation peut être optimisée par l'utilisation d'un ballast. Le ballast permet de structurer le lyophilisat et y former un système de canaux pour permettre la sublimation de l'eau et faciliter sa re-dissolution avant administration. Ils représentent moins de 2 % de la formulation. Des lyoprotecteurs, généralement des sucres, sont quant à eux utilisés pour augmenter la stabilité des molécules présentes dans les formulations et éviter les dégradations pendant l'étape de lyophilisation.

1.2. Formulations à base de cyclodextrines

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques de formule brute $(C_6H_{10}O_5)_n$ avec n un nombre typiquement compris entre 6 et 8 (Figure 1). Elles possèdent une cavité pouvant accueillir un PA. Les cyclodextrines sont peu toxiques, ont une taille de cavité modulable et une activité pharmacologique faible. Elles permettent également d'augmenter la solubilité et la stabilité des PA et d'améliorer leur profil pharmacocinétique (Arun, Ashok and Sravanthi, 2008).

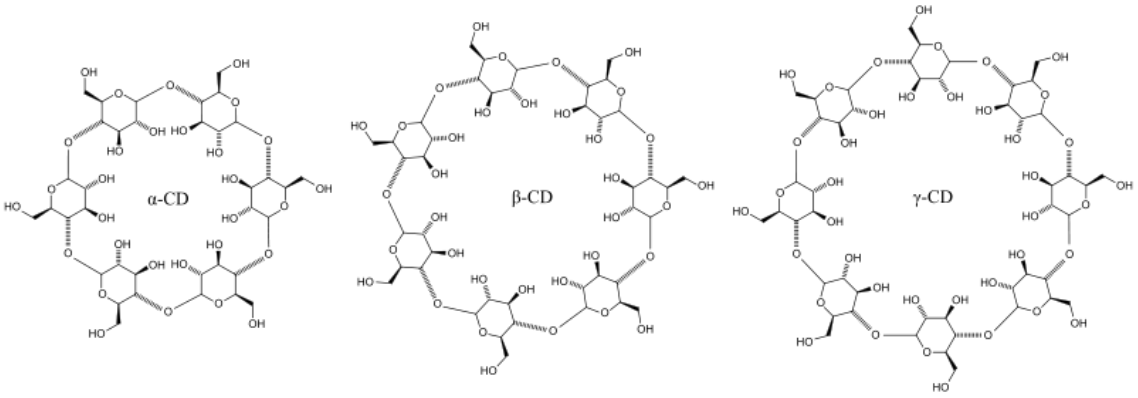


Figure 1 : α-Cyclodextrine (CD) n=6, β-cyclodextrine n=7 et γ-cyclodextrine n=8.

1.3. Les Hydrogels

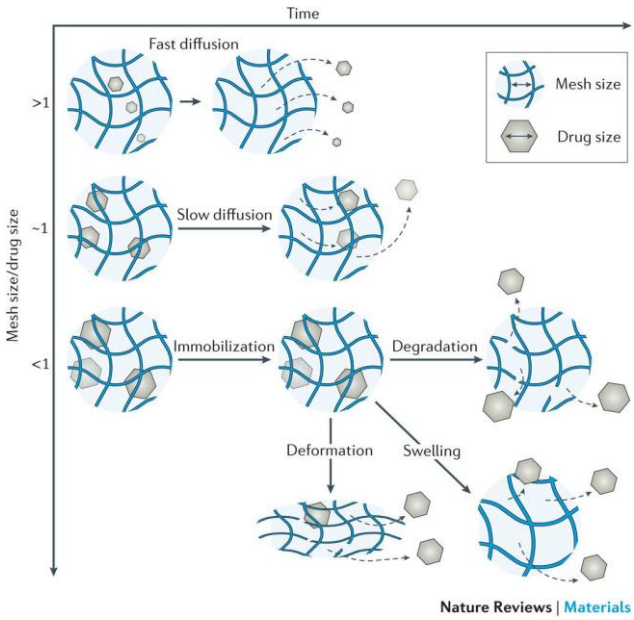


Figure 2 : Impact de la taille du maillage sur la vitesse de relargage des PA (Li and Mooney, 2016).

Les hydrogels sont des structures 3D polymériques pouvant contenir des PA et ainsi être utilisés comme des DDS (Mourtas *et al.*, 2007; Amin, Rajabnezhad and Kohli, 2009). Ils correspondent à des formulations contenant un polymère qui, une fois injecté va se charger en eau et former un hydrogel. Ce sont des maillages de chaînes de polymères réticulés dans lesquelles le PA est dispersé, sous forme solubilisée ou non. Le PA pourra diffuser à travers le maillage ou bien être libéré par dégradation ou coupure du polymère. La libération du PA peut être simplement liée à sa solubilisation et diffusion à travers le gel ou conditionnée par un stimulus externe comme un changement de pH ou de température (Figure 2). Il est possible de diviser les hydrogels en deux catégories : les hydrogels chimiques, dont la réticulation est due à des liaisons covalentes, et les hydrogels physiques, dont les liaisons sont non covalentes telles que les liaisons hydrogènes ou électrostatiques (Mishra *et al.*, 2018). L'avantage

majeur de cette technique est de fournir une formulation biocompatible et biodégradable et d'engendrer une faible réponse immunitaire.

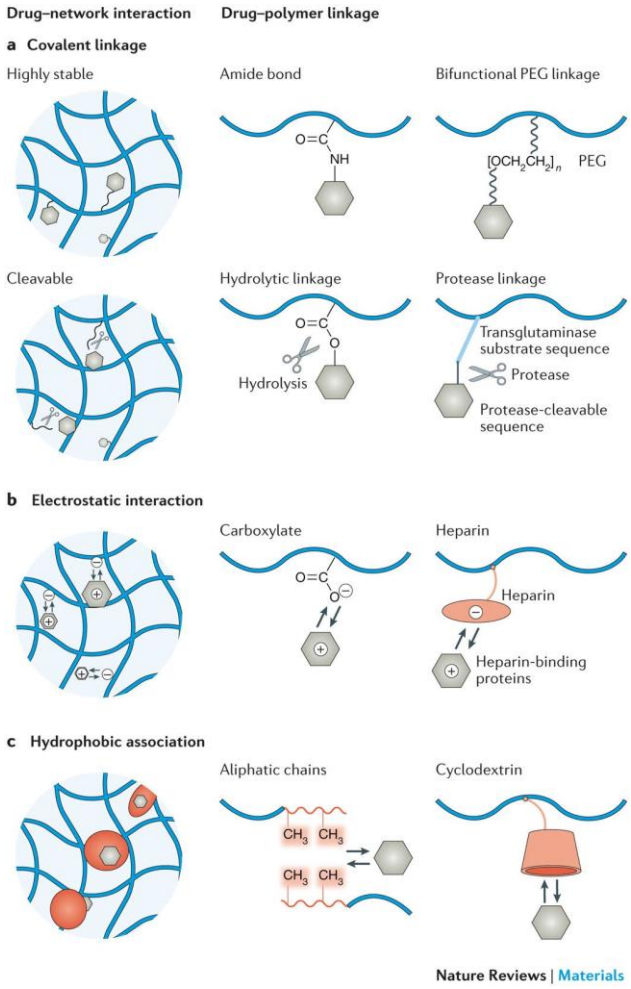


Figure 3 : Présentation de différentes techniques pour encapsuler les PA dans des hydrogels (Li and Mooney, 2016).

Différentes techniques de préparation des hydrogels existent. L'utilisation d'agent de réticulation permet de former les maillages et de prévenir les relargages initiaux trop rapides. La réticulation de certains polymères peut se faire par substitution nucléophile ou bien par réaction radicalaire en utilisant des radicaux ou une irradiation UV (Mishra *et al.*, 2018). Les polymères couramment utilisés sont par exemple le collagène, le poly(2-hydroxypropyl méthacrylate) ou le poly(acide acrylique) (PAA) (Li and Mooney, 2016). Les PA peuvent être liés par liaisons covalentes aux polymères du gel, dans ce cas leur libération est directement liée à la dégradation du gel (Figure 3). Cette méthode permet d'obtenir des cinétiques de relargage longues (environ 15 jours) dans un modèle de souris (Li and Mooney, 2016). D'autres méthodes consistent à lier le PA au gel par interactions électrostatiques ou en créant des associations hydrophobes en ajoutant des composés spécifiques au gel tels que des cyclodextrines ou du cholestérol. Lorsque les hydrogels sont administrés par voie sous cutanée, ils forment un réservoir sous la peau permettant un relargage lent du PA (Peppas *et al.*, 2000). Leurs applications dépendent de leur taille : pour les administrations systémiques un gel de 10 à 100 nm sera préféré pour éviter une

élimination trop rapide tout en permettant aux complexes de circuler dans les vaisseaux sanguins et traverser les membranes pour atteindre d'autres tissus.

1.4. Les sphères polymériques

Les sphères polymériques sont des sphères de 3 à 200 nm composées d'un ou plusieurs polymères. Elles consistent généralement en une première sphère pleine recouverte d'une couche d'un second polymère. Les PA peuvent être soit encapsulés dans la matrice soit liés de manière covalente aux polymères (Lee and Nan, 2012). Cette méthode permet également d'encapsuler ou d'accrocher plusieurs PA différents sur la même sphère. Les microsphères peuvent être réalisées en polymères naturels et donc biodégradables ou bien en polymères synthétiques, pas forcément biodégradables. Plusieurs méthodes de préparation existent. Les principales sont la réticulation à l'aide d'agent de réticulation et la microémulsion, qui consiste à mélanger le polymère dans une solution aqueuse ou non aqueuse sous agitation dans le but de former une émulsion puis d'enclencher la réticulation par la chaleur. De nouvelles techniques de préparations de ces sphères par micro fluidique sont actuellement en cours d'études dans plusieurs laboratoires (Deveza *et al.*, 2015).

1.5. Micelles polymériques

Les micelles polymériques sont des sphères composées d'une monocouche de polymères, elle-même composée d'une partie hydrophile et d'une partie hydrophobe. L'intérieur de ces micelles est hydrophobe alors que la surface extérieure est hydrophile. Ces micelles se forment donc dans des tampons aqueux et peuvent contenir des PA hydrophobes. Typiquement la taille d'une micelle polymérique est inférieure à 100 nm et leur polydispersité est faible (Patra *et al.*, 2018). Les micelles se forment lorsque la concentration en polymère est supérieure à la Concentration Micellaire Critique (CMC). Les méthodes couramment utilisées pour former les micelles sont la dialyse, la formation d'une émulsion suivie d'une évaporation du solvant ou bien l'ajout de polymères jusqu'à obtenir une concentration supérieure à la CMC (Xu, Ling and Zhang, 2013).

1.6. Les liposomes

Les liposomes sont constitués d'une ou plusieurs bicouches lipidiques en forme de sphères. La structure des liposomes peut être modifiée en fonction de leur composition et de leur mode de préparation. Ils sont ensuite classés selon leur taille et leur lamellarité (Figure 4) : « Small Uni-lamellar Vesicles » (SUV), « Large Uni-lamellar Vesicules » (LUV), « Multi-Lamellar Vesicules » (MLV) ou « Multi Vesicular Liposome » (MVL). Ils peuvent servir de réservoirs ainsi que de transporteurs de PA et ont également pour certains un rôle de vecteur pour favoriser l'accumulation du PA dans des zones spécifiques. Il est possible de contrôler le relargage des PA en optimisant la sélection des lipides pour rendre les liposomes sensibles au pH ou à la température par exemple (Needham and Dewhirst, 2001).

Les liposomes sont actuellement utilisés pour des objectifs et dans des modes d'administrations très variés (Tan *et al.*, 2015) tels que le transport dans les vaisseaux sanguins, l'internalisation dans les cellules cibles ou l'administration par d'autres voies telles que l'inhalation ou l'application topique. Ils sont également utilisés en thérapie génique (Smyth Templeton and Lasic, 1999), pour des applications locales, des vaccins (Needham and Dewhirst, 2001) ou encore en chimiothérapie (Cattel, Ceruti and Dosio, 2003). Les principaux inconvénients des liposomes sont leur durée de stockage courte, leur faible durée de vie et leur faible rendement d'encapsulation (Akbarzadeh *et al.*, 2013). Le rendement d'encapsulation est défini comme la masse de PA encapsulée sur la masse de PA engagée.

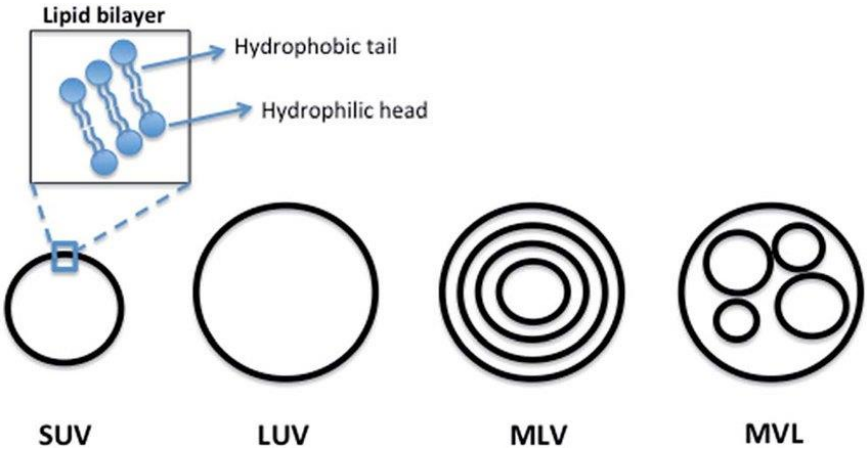


Figure 4 : Schéma de la structure de liposomes (Salim et al., 2014). SUV (Small Uni-lamellar Vesicle) LUV (Large Uni-lamellar Vesicle), MLV (Multi Lamellar Vesicle), MVL (Multi Vesicular Liposome).

1.6.1 Structure et composition des liposomes

Les liposomes peuvent donc être classifiés en fonction de leur taille et de leur nombre de couches de lipides (Storm and Crommelin, 1998) (Tableau 1).

Abréviation	Type de liposome	Taille
MLV	Multi-lamellar Large Vesicle	> 0,5 μm
OLV	Oligo-lamellar Vesicle	0,1 – 1 μm
UV	Uni-lamellar Vesicle	Toutes tailles
SUV	Small Uni-lamellar Vesicle	20 - 100 nm
LUV	Large Uni-lamellar Vesicle	> 100 nm
GUV	Giant Uni-lamellar Vesicle	> 1 μm
MVV	Multi-vesicular Vesicle	> 1 μm

Tableau 1 : Classification des liposomes en fonction de leur taille et leur nombre de bicouche.

Ils sont composés majoritairement de phospholipides qui eux-mêmes sont composés de chaînes hydrophobes et d'une tête hydrophile (Figure 5). Cette combinaison hydrophobe/hydrophile permet la formation de vésicules bicouches. Il est possible d'ajouter du cholestérol dans la formulation pour les rendre plus résistants à l'agrégation induite par le sérum *in vivo*. Le cholestérol permet aussi de rigidifier la bicouche phospholipidique (Weinstein and Leserman, 1984).

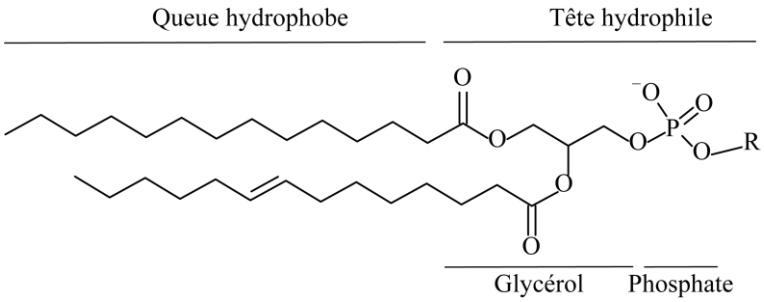


Figure 5 : Structure d'un phospholipide.

1.6.1 Transition de phase dans les liposomes

Les bicouches de phospholipides, qui composent les liposomes, peuvent se trouver sous différentes phases : une phase gel (aussi appelée la phase ordonnée ou phase solide) où les phospholipides sont ordonnés les uns à côté des autres et une phase fluide (aussi appelée la phase liquide) où les phospholipides gagnent en mobilité (Figure 6). L'existence de ces phases dépend de plusieurs conditions dont la température. En effet il existe une température appelée T_m définie comme étant la température de transition (« melting temperature ») entre la phase gel et la phase fluide. Le relargage de molécules encapsulées dans les liposomes thermosensibles serait nul ou très faible en dessous de T_m, maximum au niveau de T_m et ralenti au-dessus de T_m (Marsh, Watts and Knowles, 1976). La vitesse de diffusion en dessous et au-dessus cette température est donc ralentie pour certaines formulations de liposomes (Papahadjopoulos *et al.*, 1973). Cependant la publication (Guo and Kim, 2015) montre une formulation de liposomes à base de phosphatidylcholine d'œuf (EPC) et d'acide cinnamique dont la cinétique de relargage augmente avec la température et ne diminue donc pas au-dessus de la T_m. Il semblerait qu'un mélange de phases fluides et solides soit nécessaire pour que le relargage du PA puisse avoir lieu. La présence des deux phases permettrait d'avoir des irrégularités dans la bicouche des liposomes ainsi que dans l'épaisseur des bicouches créant des canaux laissant passer les molécules (Marsh, Watts and Knowles, 1976). Il est possible de choisir une T_m pour une formulation en jouant sur la composition en phospholipides des liposomes thermosensibles. Des études ont mis en évidence l'intérêt d'ajouter un lysolipide dans la formulation des liposomes pour favoriser l'apparition de ces canaux. En effet les lysolipides permettent de stabiliser la courbure de la membrane en reliant la monocouche supérieure et inférieure des liposomes (Schaefer, Ma and Harris, 2012).

L'équipe de Huangying Guo décrit une formulation de liposomes composée d'EPC et d'acide cinnamique dont la cinétique de relargage de leur contenant augmente avec la température entre 20 et 50 °C (Guo and Kim, 2015). L'EPC est un mélange de phospholipides possédant des chaînes de longueur différentes (16 à 18 atomes de carbones, avec 0 à 2 insaturations) et sa T_m est inférieure à 0 °C. Ces liposomes sont donc en phase fluide sur toute la durée de l'expérience. Cette propriété des liposomes contenant du EPC avait déjà été mise en évidence par MinHui Wang (Wang and Kim, 2014).

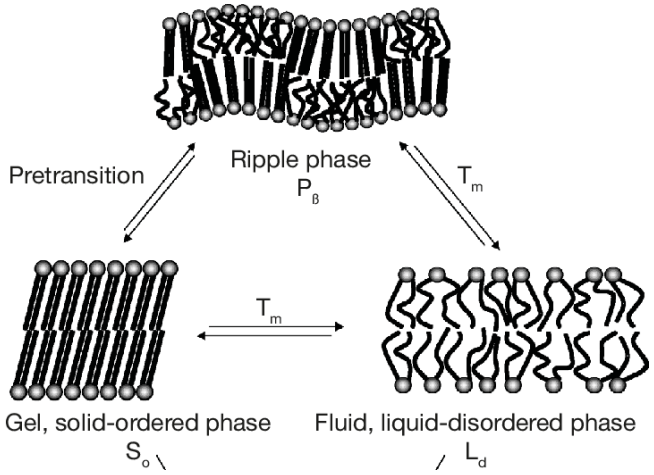


Figure 6 : Schéma représentant les différents états d'une bicouche de lipides en milieu aqueux (Eeman and Deleu, 2010). S_0 représente la phase gel d'une bicouche, où les phospholipides sont ordonnés. En augmentant la température au-dessus de la T_m les phospholipides deviennent désordonnés et la bicouche se trouve en phase fluide, L_d. Entre ces deux phases se trouve une phase intermédiaire, P_β, où des phospholipides ordonnés et désordonnés se côtoient.

1.6.2 Les différentes méthodes de préparation des liposomes

Il existe plusieurs méthodes pour réaliser des liposomes. La taille des vésicules peut ensuite être réduite et homogénéisée par différentes méthodes impliquant des stress mécaniques. Ces différentes méthodes sont détaillées ci-dessous.

a) Formation des liposomes

La méthode la plus simple est la méthode dite par hydratation d'un film de phospholipides (Bangham, De Gier and Greville, 1967), aussi appelée méthode de Bangham. Cette méthode permet de former des MLV dont la taille pourra être réduite dans un second temps. Le principe est de sécher une solution de phospholipides dissous dans un solvant organique, typiquement du chloroforme, puis d'hydrater, sous agitation, le film de lipides formé à l'aide d'une solution aqueuse tamponnée dans laquelle est solubilisé le PA. Cette méthode comporte néanmoins des inconvénients : les objets obtenus sont polydispersées et la méthode est difficilement adaptable à l'échelle industrielle.

Il est aussi possible de former des liposomes à partir d'un détergent. Cette méthode permet d'obtenir des LUV homogènes avec un rendement d'encapsulation élevé (Zumbuehl and Weder, 1981), cependant des résidus de détergent restent présents dans le mélange. Les phospholipides sont solubilisés dans une phase organique et mélangés à une seconde phase organique, typiquement méthanol ou chloroforme, contenant des détergents. Les solvants organiques sont ensuite évaporés sous vide. Il reste un mélange phospholipides/détergents auquel la phase aqueuse est ajoutée. Les détergents sont ensuite retirés par dialyse (Milsmann, Schwendener and Weder, 1978; Alpes *et al.*, 1986) ou par des méthodes chromatographique (Enoch and Strittmatter, 1979).

La dernière méthode, appelée « évaporation en phase inverse », consiste à injecter un solvant organique, éthanol ou éther, contenant les phospholipides dans la phase aqueuse. Il est possible, en utilisant cette méthode, de former spontanément des SUV (Batzri and Korn, 1973). Lorsque la solution organique est miscible à l'eau (par exemple l'éthanol), les liposomes se forment par diffusion du solvant dans la phase aqueuse. Si le solvant organique n'est pas miscible dans la phase aqueuse (par exemple l'éther), une émulsion se forme et la formation des liposomes démarre lorsque le solvant commence à être évaporé (Deamer and Bangham, 1976; F. Szoka and Papahadjopoulos, 1978; Schieren *et al.*, 1978; Kim, Jacobs and White, 1985). La taille des liposomes, la polydispersité et le nombre de bicouches peuvent être contrôlés en jouant sur la concentration en phospholipides dans la phase organique. Il est également possible de modifier l'homogénéité des particules en jouant sur la vitesse d'injection de la phase organique et l'agitation de la solution tampon. Ainsi une injection rapide de la phase organique avec une agitation rapide de la solution tampon entraîne la formation de liposomes plus homogènes (Chowhan, Yotsuyanagi and Higuchi, 1972; Kremer *et al.*, 1977). Cette méthode permet d'obtenir aussi bien des SUV que des MLV ou LUV avec un rendement d'encapsulation élevé, environ 60 %. Cette méthode n'a pas de contrainte sur le volume de formulation (Batzri and Korn, 1973) et peut donc être adaptée à l'échelle industrielle. En revanche, il est nécessaire de vérifier la stabilité du PA dans le solvant organique. De plus, la quantité de solvant dans la formulation doit être déterminée de façon précise car celui-ci peut générer des effets secondaires s'il est en proportion trop importante. Le contrôle du taux solvant résiduel est donc une contrainte supplémentaire à prendre en compte si ce procédé de préparation est choisi (spécifications réglementaires dépendantes de la nature du solvant) (Mozafari, 2005).
Une variante de cette méthode existe et consiste à mélanger les phases aqueuses et organiques par micro-fluidique. Un flux d'eau et un flux d'une solution organique contenant des phospholipides sont véhiculés dans les canaux d'une micropuce. Ces deux phases entrent en contact au sein de la micro-puce et permettent la formation des liposomes (Jahn *et al.*, 2004, 2007). Le solvant couramment utilisé est l'alcool isopropylique. Il est possible de contrôler la taille des liposomes en jouant sur la concentration de lipides (augmenter la concentration permet d'obtenir des particules plus larges), sur le débit des solutions (augmenter le débit permet d'obtenir des particules plus petites), et sur la taille des canaux (des canaux plus petits pour l'arrivée de la solution de lipides permet d'obtenir des particules plus petites) (Pradhan *et al.*, 2008). L'avantage principal est de pouvoir calibrer de manière très précise la taille des liposomes et d'obtenir des lots de liposomes de taille très homogènes. Cette méthode ne nécessite pas d'étape de réduction de taille, contrairement aux méthodes présentées ci-dessus. Le principal inconvénient pour le moment reste l'industrialisation.

b) Réduction de la taille des liposomes

Dans un deuxième temps les MLV et LUV peuvent être réduits en taille par différentes méthodes. La plus simple et rapide à mettre en œuvre est la sonication (Johnson *et al.*, 1971) qui consiste à utiliser les

ultrasons pour créer des forces de cisaillement permettant de réduire la taille des liposomes (Figure 7). La sonication peut se faire avec une sonde ou bien un bain à sonication. La durée de sonication est variable en fonction de la taille des liposomes souhaitée. Cette méthode a aussi de nombreux inconvénients : la sonication génère une augmentation de température qu'il faut contrôler pour ne pas oxyder/hydrolyser les phospholipides ou dégrader les PA encapsulés. Cette méthode ne permet pas d'obtenir une formulation avec une distribution de taille des liposomes très étroite. Dans le cas de l'utilisation d'une sonde, des dépôts de titane peuvent se retrouver dans les échantillons. Pour finir, cette méthode n'est pas adaptée à grande échelle.

Figure 7 : Sonde utilisée pour la sonication d'échantillons de MLV pour former des SUV.

Pour obtenir de meilleurs rendements d'encapsulation, il est possible d'utiliser l'extrusion (Hope *et al.*, 1985) (Figure 8). Le principe est de faire passer, à plusieurs reprises, la solution aqueuse contenant les MLV à travers une membrane de taille fixée (entre 30 et 1000 nm) pour réduire leurs tailles. Les liposomes obtenus sont homogènes et de taille plus grande qu'avec la sonication. Cette méthode permet un meilleur contrôle de la température.

Figure 8 : Mini-Extruder d'Avanti Polar Lipids Inc., appareil de paillasse pour extruder les liposomes.

Finalement la méthode adaptée à l'échelle industrielle est l'homogénéisation à haute pression (HPH, « High pressure homogenizer ») (Figure 9). C'est un processus mécanique qui consiste à faire passer un fluide à travers un passage étroit à haute pression (typiquement 140 - 200 MPa). Le fluide est alors sujet à des forces de cisaillement élevées permettant de réduire la taille des liposomes. Plus la taille de particules voulues est faible, plus la pression appliquée dans le système doit être élevée (Stang, Schuchmann and Schubert, 2001). Il est possible de jouer sur la concentration en phospholipides pour obtenir des particules plus ou moins homogènes. Ainsi diminuer la concentration des phospholipides permet d'obtenir une taille de particules plus homogène.

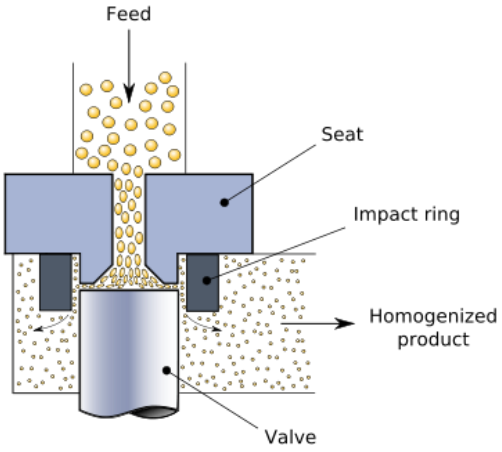


Figure 9 : Schéma du fonctionnement de l'homogénéisation à haute pression.

c) Encapsulation de molécules dans les liposomes

Les molécules sont considérées comme encapsulées lorsqu'elles sont soit dans la cavité des liposomes, soit incorporées dans la ou les bicouches de phospholipides des liposomes ou soit ancrées dans la membrane. L'adsorption d'un PA à la surface externe d'un liposome n'est pas considérée comme une encapsulation, même si les méthodes d'estimation du rendement d'encapsulation prennent souvent en compte ces peptides adsorbés en surface. Différentes méthodes pour encapsuler des PA dans des liposomes existent (Vemuri and Rhodes, 1995). Il est possible de les encapsuler passivement lors de la formation des liposomes, c'est-à-dire en ajoutant le PA dans la phase aqueuse ou organique au moment de la formation des liposomes, ou bien activement après la formation des liposomes. Ainsi des composés très hydrophobes s'ancrent très facilement dans la bicouche phospholipidique auquel cas le rendement d'encapsulation est très élevé et tend vers 100 %. Les composés hydrophiles ont un rendement d'encapsulation souvent inférieur à 30 % à cause de leur bonne solubilité dans le milieu extérieur et du faible volume de solution aqueuse encapsulée par les liposomes : 0,5 - 16 µL par mg de lipides en fonction de la composition (Francis Szoka and Papahadjopoulos, 1978). Pour augmenter ce rendement, il est possible de réaliser des cycles successifs de congélation rapide et décongélation lente (Pick, 1981; Mayer *et al.*, 1985; Ohsawa, Miura and Harada, 1985; Llu and Yonetani, 1994). La congélation permet de déstabiliser la membrane lipidique à cause de l'augmentation du volume interne, puis au moment de la décongélation, le PA diffuse à travers les perturbations créées dans la membrane. L'augmentation du nombre de molécules encapsulées serait due au passage de vésicules multi-lamellaires à uni-lamellaires (Chaize *et al.*, 2004) augmentant ainsi le volume de solution encapsulé. Il est également important de noter que l'utilisation de lipides chargés permet d'augmenter la quantité de soluté encapsulée grâce aux forces électrostatiques de répulsion (Weinstein and Leserman, 1984) ou d'attraction (Mayer *et al.*, 1986) en jouant sur la charge du PA. En effet, des études ont montré qu'il était possible d'augmenter l'efficacité d'encapsulation en utilisant des lipides chargés négativement et un PA chargé positivement (Gabizon *et al.*, 1982).

Il est également possible d'augmenter ce rendement pour les molécules possédant un groupement amine protonable en réalisant une encapsulation active à l'aide d'un gradient de pH (Madden *et al.*, 1990; Haran *et al.*, 1993; Chonn and Cullis, 1995) (Figure 10). Des liposomes vides sont d'abord préparés par les méthodes standards dans un tampon acide (par exemple 300 mM citrate à pH 4), puis le tampon extérieur aux liposomes est remplacé par une solution tampon à pH plus élevé (par exemple 20 mM HEPES 150 mM NaCl à pH 7.5) contenant le PA. Le système va tendre à équilibrer le pH à l'intérieur et à l'extérieur des liposomes. Des échanges vont donc avoir lieu entre les deux compartiments. Les molécules dé-protonables vont diffuser à l'intérieur des liposomes et se protoner. Ainsi le pH dans la cavité des liposomes va augmenter et les molécules protonées se retrouvent piégées. Lorsque le pH à l'intérieur et extérieur des liposomes est équivalent, la diffusion s'arrête. Pour que ce procédé fonctionne le PA doit être globalement neutre à l'extérieur des liposomes et être chargé une fois à l'intérieur. Ainsi le pKa du PA doit être proche du pH extérieur des liposomes, pour permettre à une certaine quantité de PA d'être neutre, et éloigné du pH interne des liposomes.

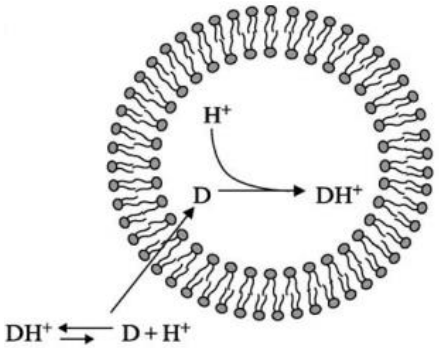


Figure 10 : Méthode d'encapsulation active par gradient de pH (Fenske and Cullis, 2005). D = principe actif, pH interne = 4, pH externe =7,5. Le PA à l'extérieur des liposomes va se déprotoner. Il diffuse alors à l'intérieur des liposomes où il se protone, permettant de conserver le PA encapsulé et d'augmenter le pH interne des liposomes. La diffusion du PA de l'extérieur vers l'intérieur des liposomes s'arrête lors que les pH interne et externe sont équilibrés.

Quelle que soit la méthode utilisée, une fois le process d'encapsulation terminé, il est nécessaire de retirer le PA non encapsulé. La méthode la plus utilisée est la centrifugation sur filtre en choisissant un seuil de coupure ne laissant pas passer les liposomes.

1.6.3 Préparation des liposomes au niveau R&D et industriel et encapsulation de principes actifs

Au niveau des laboratoires R&D, l'une des méthodes les plus utilisées est l'hydratation d'un film de phospholipides suivie d'une étape de sonication. L'avantage de cette technique est qu'elle est facile et rapide à exécuter (de l'ordre de quelques minutes), qu'elle est adaptée aux petits volumes d'échantillons (de l'ordre du mL). Cependant il n'y a pas de contrôle de la température pendant la sonication et les échantillons obtenus sont polydispersés (typiquement avec un index de polydispersité, PdI = 0,2). C'est donc un bon compromis entre qualité des échantillons et vitesse d'obtention de résultats. La seconde

méthode est l'hydratation de films de phospholipides suivie d'une étape d'extrusion de vésicules, typiquement à travers un filtre de 100 nm.

Au niveau industriel, la préparation des liposomes se fait par émulsification et évaporation de solvant (Figure 11). La méthode de Bangham (hydratation d'un film de lipides) n'est, en effet, pas adaptable à l'échelle industrielle. L'encapsulation des PA se fait passivement lorsque le PA est hydrophobe : le PA est solubilisé dans la phase organique et les phospholipides au moment de la formation des liposomes. Lorsque le PA est hydrophile et contient un groupement amine, une méthode d'encapsulation active est utilisée : le gradient de pH. Dans ce cas le PA est injecté dans la phase aqueuse après formation des liposomes.

La réduction de la taille des liposomes se fait par une homogénéisation à haute pression, méthode de référence à l'échelle industrielle. Cette technique permet de réduire la taille des particules jusqu'à 30 nm (Bachmann, Brandl and Gregoriadis, 1993).

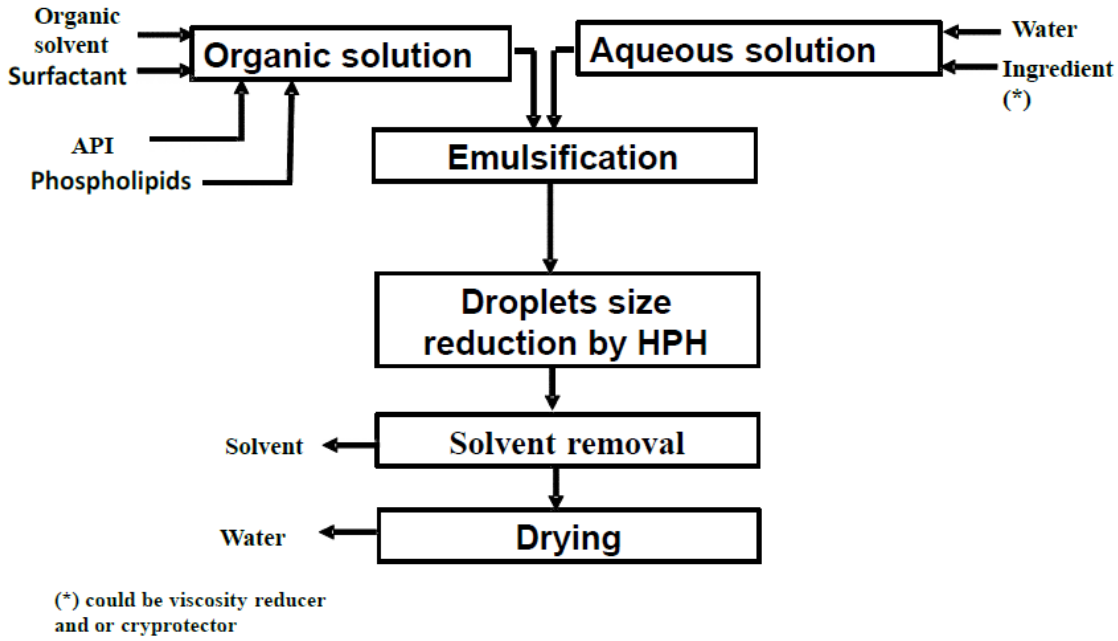


Figure 11 : Méthode de fabrication de liposomes par la méthode d'injection directe dans le cas d'un PA hydrophobe (Dua, Rana and Bhandari, 2012) utilisée au niveau industriel. HPH (« High Pressure Homogenizer »).Une solution organique contenant le PA, les phospholipides et les surfactants est mélangée à une solution aqueuse pouvant contenir des molécules telles que des cryoprotecteurs. L'émulsion entre la phase organique et la phase aqueuse permet de former des liposomes. La taille des liposomes est ensuite réduite par HPH. Finalement le solvant est évaporé et la solution peut être lyophilisée pour le stockage.

Les suspensions de liposomes ne sont pas suffisamment stables pour être stockées directement avant commercialisation. Ils doivent donc être utilisées rapidement après leur préparation (quelques jours) ou être lyophilisées. La lyophilisation contient une étape de congélation cependant les liposomes ne supportent pas la congélation. Il est donc nécessaire d'ajouter des molécules cryoprotectrices comme des disaccharides (Harrigan, Madden and Cullis, 1990; Mohammed, Coombes and Perrie, 2007). Des

études ont montré qu'elles avaient peu d'impact sur la structure des liposomes (Stark, Pabst and Prassl, 2010). Néanmoins la mise au point de la lyophilisation de liposomes n'est pas évidente et ne fonctionne pas sur toutes les préparations.

1.6.4 Les différents types de liposomes

Les liposomes peuvent être divisés en plusieurs catégories présentées ci-dessous (Figure 12).

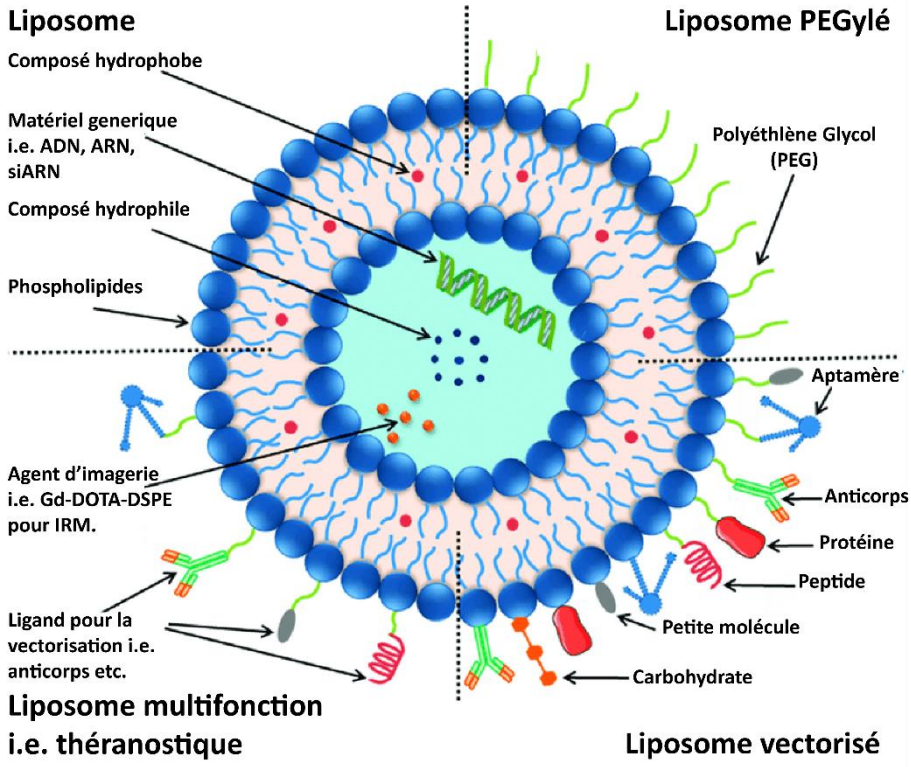


Figure 12 : Schéma de différents types de liposomes (Riaz et al., 2018).

a) Les liposomes PEGylés

Les liposomes PEGylés ont été développés pour augmenter leur temps de résidence dans la circulation (Riaz *et al.*, 2018). Ils sont aussi appelés liposomes furtifs. La surface des liposomes est recouverte de polymères hydrophiles tels que le polyéthylène glycol (PEG). Le PEG sert alors de couche de protection pour éviter les contacts entre les phospholipides des liposomes et les composés présents dans le sérum. Le polymère permet de stabiliser la bicouche et augmente l'encombrement stérique permettant de diminuer l'absorption de protéines à la surface et donc de limiter la reconnaissance du liposome par le système réticulo-endothélial. L'inconvénient majeur de cette technique est qu'elle diminue drastiquement la capacité des liposomes à être internalisés par les cellules (Hatakeyama, Akita and Harashima, 2013).

b) Les liposomes vectorisés

Certains liposomes ont été « construits » pour se lier de manière préférentielle à certains récepteurs ou molécules pour permettre au PA d'atteindre plus facilement sa cible. Une méthode consiste à greffer un ligand de manière covalente directement sur les lipides ou bien en bout de chaîne PEG, déjà lié à un lipide par exemple. Ces lipides modifiés peuvent être incorporés au début de la fabrication des liposomes ou dans un second temps par une technique d'insertion du ligand post formation des liposomes. Cette technique consiste à incuber des liposomes recouverts de PEG avec des micelles du ligand à greffer aux PEG ou aux lipides (Riaz *et al.*, 2018). Le ligand peut être un anticorps : dans ce cas il est attaché de manière covalente sur les liposomes par des liaisons disulfures (Martin and Papahadjopoulos, 1982). Plus récemment, des dérivés de peptides (*i.e.* chaîne d'acides aminés) ont été synthétisés et directement ajoutés dans la formulation de lipides pour former les liposomes (Accardo and Morelli, 2015). Il a déjà été montré que, s'ils sont vectorisés, les liposomes permettent de multiplier au moins par 3 la quantité de PA assimilée par leur cible (Arta *et al.*, 2018).

c) Les liposomes multifonctions

Il est possible de combiner plusieurs fonctions parmi celles décrites ci-dessus pour créer des liposomes multifonctions : par exemple des liposomes possédant un vecteur et un agent d'imagerie pour cibler préférentiellement une zone à observer (Portnoy *et al.*, 2011) ou les liposomes théranostiques qui possèdent un agent d'imagerie et un agent thérapeutique (Li *et al.*, 2012).

d) Les liposomes thermosensibles

Les liposomes thermosensibles (Kneidl *et al.*, 2014) sont souvent composés de DPPC (1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine) ou 1-Myristoyl-2-stearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (MSPC). Chaque phospholipide possède une température de transition (T_m). Lors du mélange de plusieurs phospholipides, la température de transition globale est impactée. L'impact dépend des phospholipides utilisées et de leur proportion. Ainsi l'équipe de Bayerl montre que la T_m des liposomes constitués de DPPC et DODAB est très coopérative et supérieure à la T_m des phopholipides purs lorsque le ratio des deux phospholipides est équimolaire. En revanche pour tout autre ratio de ces phospholipides ils semblent y avoir plusieurs T_m, comprises entre les T_m des phospholipides purs (Linseisen, Bayerl and Bayerl, 1996). Ainsi il est possible de jouer sur les compositions de phospholipides, et leurs T_m, pour permettre aux liposomes de relarguer leur contenu à une température donnée. Ces liposomes peuvent être divisés en deux catégories : les liposomes sensibles aux hautes températures (*i.e.* un relargage induit à une température de 42 - 45 °C) qui sont difficiles à utiliser chez les patients à cause des effets secondaires liés à l'augmentation à de telles températures des tissus même localement et les liposomes sensibles aux basses températures (*i.e.* un relargage induit à une température de 39 – 42 °C) (Landon *et*

al., 2011). La libération du PA se fait à une température proche de la T_m et est accéléré lorsqu'il y a des défauts dans la membrane des liposomes *i.e.* des imperfections dans l'arrangement des lipides. La vitesse de relargage est encore plus accélérée en présence de lysolipides (lipide avec une seule chaîne acyle) dans la formulation car ils permettent la formation de nanopores dans les membranes. Ils peuvent être utilisés dans le traitement de cancers combinés à l'ablation par radiofréquence pour augmenter localement la température du patient et ainsi permettre le relargage du PA dans la zone sélectionnée. Par exemple ThermoDox®, dont les résultats positifs en phase clinique III ont été publiés en 2019 (Yang *et al.*, 2019), permet d'obtenir 25 fois plus de PA dans la zone à traiter, qu'une injection par voie veineuse (Bulbake *et al.*, 2017).

e) Les suspensions liposomales commercialisées

Actuellement des liposomes sont déjà utilisés pour l'administration de certains PA. Ils sont majoritairement présents dans les thérapies contre le cancer. Mais certains liposomes sont utilisés dans le cas de maladies fongiques, l'administration analgésique de vaccins viraux ou de thérapie photo-dynamique. La première formulation acceptée par la « Food and Drug Administration » (FDA) était le Doxil en 1995 (Bulbake *et al.*, 2017) : c'est un liposome PEGylé chargé de Doxorubicin (PA de masse molaire 543 $g.mol^{-1}$) utilisé par injection intraveineuse pour, entre autre, un traitement contre le cancer des ovaires.

Un des objectifs de l'utilisation de liposomes est également de diminuer la fréquence d'administration des PA. DepoFoam™, développé par Pacira Pharmaceuticals Inc., Parsippany, NJ, USA, permet d'obtenir un relargage allant de 1 à 30 jours. Ce système consiste en une sphère de 3 - 30 µm composée de cavités pouvant accueillir les PA (Figure 13) (Bulbake *et al.*, 2017).

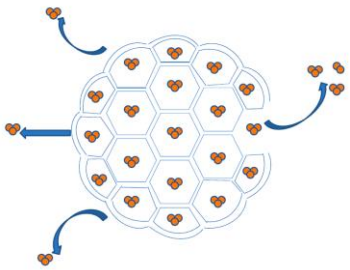


Figure 13 : Structure des liposomes DepoFoam™ (Bulbake et al., 2017).

D'autres liposomes réagissent à d'autre stimuli, par exemple le Visudyne® a été développé pour être activé par la lumière (Bulbake *et al.*, 2017). Il traite la néovascularisation engendrée par la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Il est formulé avec de la DMPC et du phosphatidyl glycérol d'œuf (EPG).

L'encapsulation de molécules à haut poids moléculaire (PM) telles que des protéines est aussi de plus en plus étudiée (Joanitti *et al.*, 2018) et des essais de faisabilité ont déjà été réalisés pour le

développement de vaccins (Schwendener, 2014). Les méthodes d'encapsulation classiques ne sont pas toutes applicables aux macro-biomolécules en fonction de leurs propriétés (Colletier *et al.*, 2002).

1.6.5 Stabilité des liposomes

La dégradation des phospholipides est principalement due à deux phénomènes : l'oxydation et l'hydrolyse (Grit and Crommelin, 1993).

L'oxydation concerne principalement les phospholipides insaturés. Cependant les phospholipides saturés, sous l'effet de la température peuvent également subir des oxydations telles que des réactions radicalaires initiées par la lumière et/ou la température (Brodnitz, 1968) (Figure 14). Pour réduire les risques d'oxydation, les différents composés doivent être conservés à -80 °C, sans oxygène ni lumière. L'utilisation d'antioxydants peut aussi réduire les risques d'oxydation des liposomes.

$$RH \rightarrow R^\circ + H^\circ$$

$$ROOH \rightarrow RO^\circ + OH^\circ$$

$$2(ROOH) \rightarrow RO^\circ + RO_2^\circ + H_2O$$

Figure 14 : Réactions d'auto-oxydation de lipides initiées par la température ou la lumière permettant la formation de radicaux libres, qui vont réagir avec l'oxygène, et d'autres chaînes carbonés entrainant leur clivage et la formation d'autres molécules telles que des radicaux.

L'hydrolyse des phospholipides concerne les liaisons esters (Figure 15). Chaque phospholipide en possède deux. Cette réaction est catalysée par la présence d'acides ou de bases. Le mécanisme est différent si la réaction est catalysée par une base ou un acide. En effet dans le premier cas une réaction d'addition-élimination est en jeu. Dans le second cas, l'ester est protoné, puis les molécules d'eau sont retirées par substitution nucléophile. Des études ont montré que l'interface hydrophobe/hydrophile d'une bicouche de phospholipide se trouve au niveau du premier groupement CH_2 de la chaîne carbonée. Les têtes polaires sont donc entièrement en contact avec l'eau ce qui rend possible l'hydrolyse des esters et l'hydrolyse des phospholipides (Scherer, 1989). L'hydrolyse des phospholipides mène à la production de 1-acyl et 1-acyl lysophospholipides, qui peuvent à leur tour être hydrolysés jusqu'à former de l'acide glycérophosphorique.

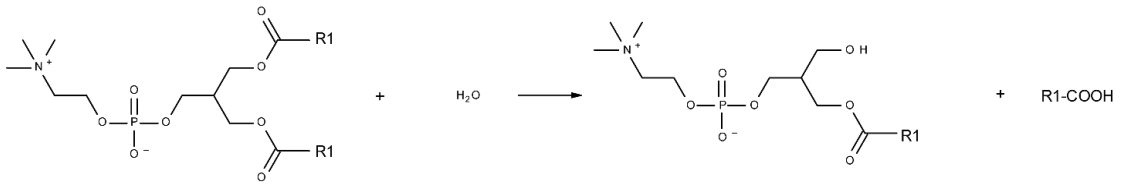


Figure 15 : Réaction d'hydrolyse d'un phospholipide menant à la formation d'un lysophospholipide et d'une chaîne carbonée.

Le pH affecte la vitesse d'hydrolyse des phospholipides, *i.e.* hydratation des groupements esters des phospholipides pour former un lysophospholipide. Il a été montré à différentes températures (40 et 70 °C) que la réaction était minimisée pour un pH de 6,5 dans les cas de distearoyl phosphatidylcholine

(DSPC), de la Phosphatidyl Choline de soja naturelle et de la Phosphatidyl Choline d'œuf partiellement hydrogénée (Grit and Crommelin, 1993). Les ions H^+ catalysent l'hydrolyse des phospholipides. Des expériences ont pu mettre en évidence l'effet du tampon (tampon citrate, acétate et Tris) sur l'hydrolyse des phospholipides (Grit *et al.*, 1989), il peut agir comme catalyseur. Cet effet est encore plus marqué à pH 7,5.

L'ajout de cholestérol dans la formulation des liposomes influence aussi l'hydrolyse des phospholipides. Des liaisons hydrogène se forment entre les groupements alcool du cholestérol et le carbonyle des phospholipides. Plus ces interactions sont fortes, plus elles protègent les phopholipides de l'hydratation en rendant inaccessibles les liaisons esters. Cependant d'autres études montrent que l'ajout de cholestérol augmente l'hydratation de la tête polaire des phospholipides et donc augmente la vitesse d'hydrolyse (Grit and Crommelin, 1993).

Les liposomes peuvent avoir tendance à s'agréger et/ou à fusionner. Cela dépend de leur nature, de leur formulation et de l'environnement. Il a été montré que la présence d'acide gras libre dans une bicouche de liposomes augmente les risques d'agrégation (Grit and Crommelin, 1993). En revanche l'utilisation de phospholipides chargés tend à limiter cette agrégation.

1.6.6 Impact du cholestérol sur la membrane des liposomes

Dans la phase fluide, le cholestérol limite la mobilité des chaînes aliphatiques des phospholipides alors qu'en phase gel il favorise la mobilité des chaînes (Coderch *et al.*, 2000), diminuant la coopérativité de la transition entre les deux phases (Sułkowski *et al.*, 2005). Pour une concentration molaire supérieure à 30 % en cholestérol, la transition de phase des liposomes est complètement éliminée (Sharma and Sharma, 1997) avec un passage de la phase gel à la phase fluide de manière très progressive. Cependant la publication de Sułkowski *et al.* montre que pour une fomulation contenant principalement de la dipalmitoyl phosphatidyl choline (DPPC), l'effet du cholestérol sur la fluidité des liposomes ne change plus au dessus de 11 mol% en cholestérol. En effet dans ce cas, le paramétre d'ordre S des bicouches, déterminé à partir de mesures de résonance paramagnétique électronique (RPE) ne montre pas de différence significative lorsque les liposomes contiennent 11 mol% ou plus de cholesterol. Zeisig *et al.* montrent quant à eux que diminuer la quantité de cholestérol de 50 à 30 % permet d'augmenter la rigidité de la membrane (Zeisig *et al.*, 1998) comme le montre la fuite de PA plus rapide lorsque les liposomes d'octadecyl-(N,N-dimethyl-piperidino-4-yl)-phosphate (OPP) contiennent 50 % de cholesterol plustôt que 30 %. L'impact du cholestérol sur les liposomes est donc très dépendant de la composition des liposomes étudiés.

La revue de la litérature, réalisée par Yang, détaille l'impact que le cholestérol peut avoir sur des membranes (Figure 16) (Yang *et al.*, 2016). Ainsi il est montré que le cholestérol ordonne les lipides en défavorisant la conformation trans-gauche des lipides insaturés par exemple. Ceci rend la phase liquide de la membrane ordonnée, contrairement aux membranes de liposomes où la phase liquide est

désordonnée. Le cholestérol permet aussi de réduire la dynamique au sein des bicouches, réduisant la diffusion latérale et la rotation des lipides. Le cholestérol intéragit préferentiellement avec les chaînes lipidiques longues et saturées. Ces lipides ont généralement une T_m elevée. Dans des membranes composés d'un mélange de lipides, le cholestérol rend hétérogène la répartition des lipides dans la membrane créant ainsi des zones riches en cholestérol qui seront en phase liquide ordonnée et des zones pauvres en cholestérol qui seront en phase liquide désordonnée. De plus comme le cholestérol rigidifie les chaînes carbonées des lipides, il tend à augmenter l'épaisseur des bicouches. Et dans le cas où des zones pauvres et riches en cholestérol cohabitent, cela crée des discontinuités dans les membranes. Ces discontinuités jouent aussi un rôle dans la courbure des membranes, et par extension sur la taille des liposomes.

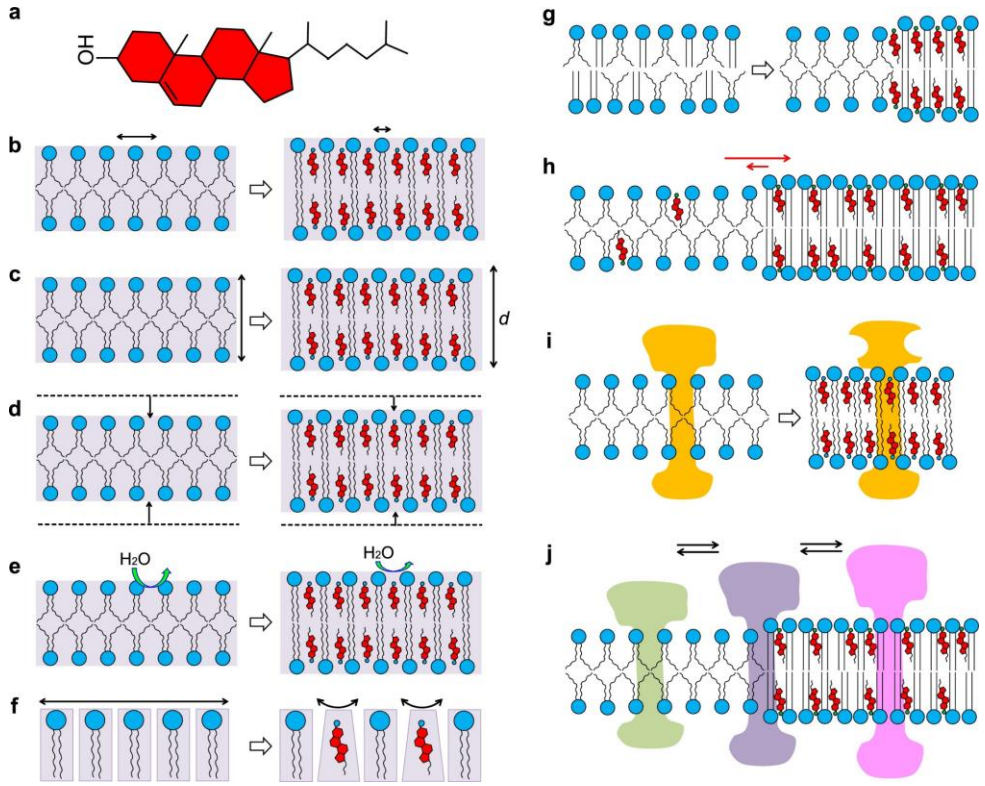


Figure 16 : Impact du cholestérol sur une membrane lipidique. le cholestérol (a) influence la fluidité (b), l'épaisseur (c), la compressibilité (d), la pénétration de l'eau et la courbure (f) de la bicouche lipidique. Le cholestérol est aussi à l'origine de la séparation des lipides dans un mélange (g), de la sélectivité entre différentes phases lipidiques coexistantes (h), peut entraîner des changements dans les interactions avec une protéine de membrane et donc un changement de conformation (i) ou une redistribution dans la membrane (j) (Yang et al., 2016).

1.6.7 Optimisation des liposomes pour ralentir et contrôler le relargage

Mauer *et al.* décrivent certaines modifications réalisées sur les liposomes qui affectent la cinétique de relargage des molécules qu'ils contiennent (Maurer, Fenske, & Cullis, 2001). D'abord les lipides utilisés : la présence de cholestérol diminue la perméabilité des membranes. La longueur de leurs chaînes carbonées, le nombre d'insaturations de ces chaînes affecte aussi le relargage. Ces auteurs comparent la

cinétique de relargage de la doxorubicine dans deux formulations de liposomes : EPC/CHOL et DSPC/CHOL (DSPC : 1,2-Distearoylphosphatidylcholine). EPC et DSPC sont tous les deux des phospholipides possédant deux chaînes de 18 atomes de carbones avec la même tête polaire mais EPC possède une insaturation sur une des chaînes carbonées. Les résultats montrent que 50 % de la doxorubicine encapsulée dans EPC/CHOL (55/45 mol%) relargue en 1 h alors que les molécules encapsulées dans DSPC/CHOL (55/45 mol%) ne relarguent pas de manière significative au bout de 24 h. Il semble donc, que pour cette formulation et ce PA, la présence d'une insaturation augmente drastiquement la vitesse de relargage du PA. L'utilisation de lipides de charges opposées au PA permet également de diminuer la vitesse de relargage. Dans la même publication le PA précipite au centre du liposome, permettant aussi de réduire sa vitesse de relargage. D'autres exemples de PA qui précipitent dans les liposomes ont été observés lorsque le chargement des liposomes est réalisé par gradient de pH. Cependant d'autres publications contredisent ces données (Zeisig *et al.*, 1998) et montrent que diminuer la quantité de cholestérol d'une formulation de liposomes permet de réduire la vitesse de relargage. La formulation de liposomes utilisée est OPP/CHOL/x/PEG_{2000}DSPE avec x = dicetylphosphate pour les liposomes chargés négativement et dioctadecyl-dimethylamine bromide pour les liposomes chargés positivement. La molécule utilisée pour suivre la cinétique de relargage est la calcéine, qui possède quatre charges négatives à pH 7,4. Les liposomes chargés positivement semblent permettre une vitesse de relargage plus rapide que les liposomes chargés négativement.

L'impact des différents paramètres (quantité de cholestérol, charge des phospholipides) affecte la cinétique de relargage des liposomes. Cet impact est dépendant de la composition des liposomes et de la nature des molécules encapsulées. Par exemple, l'équipe de van Deenen a montré qu'augmenter la quantité de cholestérol dans les formulations de liposomes permettait de réduire les fuites des composés encapsulés (Demel, Bruckdorfer and Van Deenen, 1972).

Chapitre 2 : Les peptides thérapeutiques

Ce chapitre présente l'utilisation des peptides dans l'industrie pharmaceutique, leurs méthodes de préparation ainsi que leurs avantages et inconvénients comparés à d'autres type de PA. L'inconvénient principal des peptides est leur temps de demi-vie faible. La deuxième partie du chapitre sera donc consacrés aux méthodes utilisées pour augmenter la durée de vie *in vivo* des peptides.

2.1. Généralités

2.1.1 La place des peptides dans l'industrie pharmaceutique

68 peptides ont obtenu l'autorisation par les agences réglementaires des Etats-Unis, Europe et Japon, pour être commercialisés entre 1980 et 2018 (Figure 17). Cela représente 1 à 2 autorisations en moyenne sur environ 25 autorisations de nouveaux médicaments par an (moyenne sur les 30 dernières années). Parmi ces peptides il y a le Lixisenatide (Sanofi), autorisé en 2013 pour le traitement du diabète de type II, et Apidra (Sanofi), autorisé en 2004, un analogue recombinant de l'insuline humaine utilisé pour le traitement du diabète. 1 550 peptides sont actuellement en développement clinique dont environ la moitié en phase II (Lau and Dunn, 2018). Parmi ces peptides en développement clinique, environ un tiers sont des peptides conjugués, *i.e.* liés à une protéine, à un autre peptide ou à une petite molécule (l'ajout d'une chaîne lipidique ou une chaîne de polymère n'est pas considéré comme de la conjugaison)

(Figure 18).

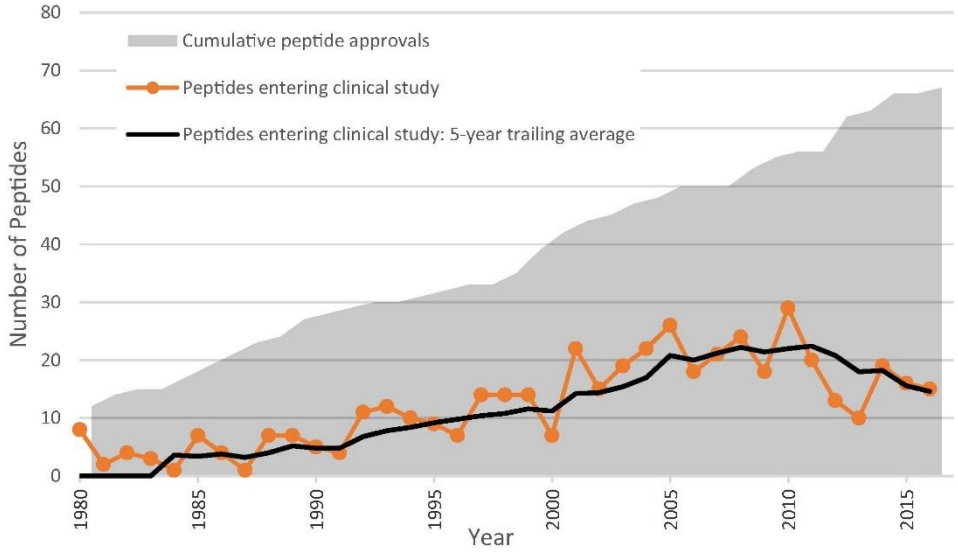


Figure 17 : Statistiques sur le nombre de peptides autorisés par la FDA (Lau and Dunn, 2018).

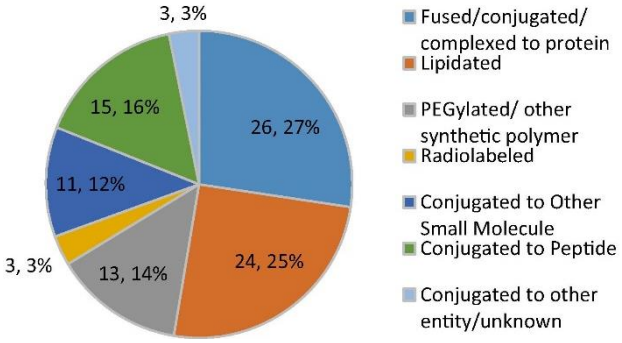


Figure 18: Distribution des types de conjugaison des peptides (Lau and Dunn, 2018).

Ces peptides en développement clinique ciblent principalement les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (Figure 19). Ces récepteurs font partie de la grande famille de récepteurs membranaires des mammifères. Ils jouent un rôle dans la communication cellulaire. Une autre cible importante des peptides est constituée des récepteurs de la famille des immunoglobulines (Ig).

Les deux grands avantages à l'utilisation de peptides sont leur efficacité et leur sélectivité (Fosgerau and Hoffmann, 2015). De plus la méthode de synthèse des peptides est standard, rendant la production de ces molécules relativement aisée. Cependant ces molécules sont rapidement éliminées dans le plasma et ont un temps de demi-vie généralement court (inférieur ou égal à quelques minutes). Les peptides sont rapidement filtrés par les reins ou détruits par des protéases. Les peptides sont également sujets à l'agrégation, l'hydrolyse et l'oxydation. De plus ils sont difficilement administrables par voie orale car instables dans les fluides gastro-intestonaux et ont une faible perméabilité à travers les membranes (Fosgerau and Hoffmann, 2015), limitant leurs applications à des cibles extra cellulaires.

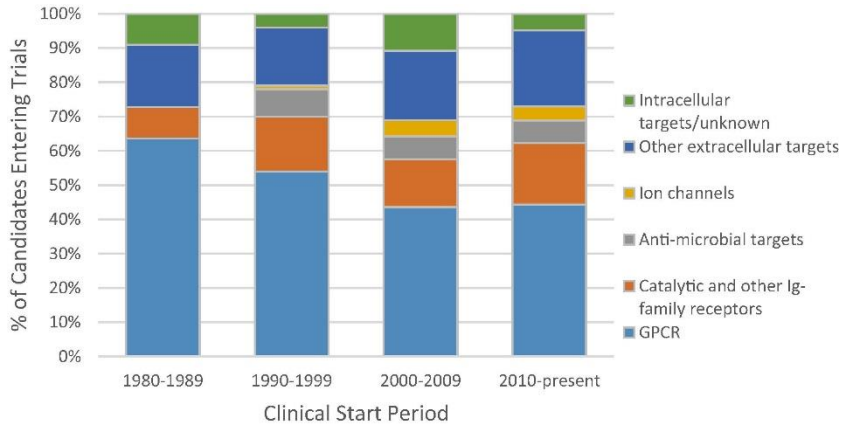


Figure 19 : Cibles des peptides entrés en développement clinique (Lau and Dunn, 2018).

2.1.2 Méthodes de synthèse

La première synthèse d'un dipeptide a été publiée en 1882 (Curtius, 1882) (Figure 20), mais le début des recherches sur la synthèse peptidique a réellement démarré en 1901 (Fischer and Fourneau, 1901) avec la préparation d'un dipeptide de glycine à partir de l'hydrolyse de 2,5-dicétopipérazine (Kimmerlin and Seebach, 2005) (Figure 21). La synthèse de 2,5-dicétopipérazines a par la suite été largement décrite sur phase solide (Scott *et al.*, 1996; Szardenings *et al.*, 1997; Smith, Bobko and Lee, 1998). Les premières méthodes de synthèses de peptides développées sont des synthèses en phase liquide par couplage à l'aide d'azoture (Curtius, 1904) ou alors de chlorure d'acyle (Fischer, 1905).

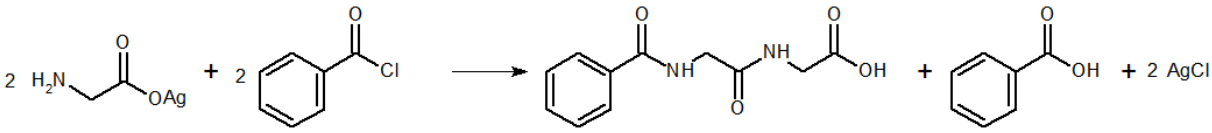


Figure 20 : Synthèse d'un dipeptide par Theodor Curtius (Curtius, 1882).

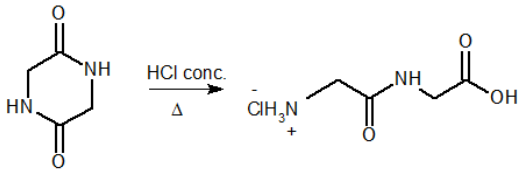


Figure 21 : Synthèse de peptides par Emile Fischer (Fischer and Fourneau, 1901).

L'introduction du groupe de protection *tert*-butyloxycarbonyl (Boc) en 1957 (Carpino, 1957; McKay and Albertson, 1957), permettant de protéger les chaînes latérales des acides aminés, a augmenté considérablement les possibilités de synthèse de peptide. D'autres groupements de protection et d'agents de couplage ont continué à être développés ce qui a permis la mise en place de la synthèse peptidique sur phase solide par Bruce Merrifield en 1963 (Merrifield, 1963) (Figure 22). Cette méthode étant très itérative, elle est idéale pour être automatisée. B. Merrifield obtint le prix Nobel pour le développement de cette méthodologie de synthèse en 1984. Par la suite de nouveaux groupements de protection tels que

le 9-fluorénylméthyloxycarbonyle (Fmoc) ainsi que différents types de résine utilisés comme support solide pour les réactions ont été mis au point.

Actuellement, les méthodes de synthèse utilisées en laboratoire reposent principalement sur la synthèse en phase solide. Cette méthode est plus facile à mettre en œuvre et plus rapide que la synthèse en phase liquide. La synthèse en phase liquide est plus facilement utilisée pour assembler plusieurs chaînes de peptides préparés préalablement par synthèses sur phase solide. Le rendement global de la synthèse d'un peptide est faible à cause des nombreuses étapes nécessaires, en particulier pour les peptides les plus long. A l'échelle industrielle, les deux méthodes peuvent être utilisées.

D'autres méthodes de production de protéines ou peptides recombinants existent comme l'utilisation de cultures bactériennes ou bien l'extraction à partir de leurs sources naturelles mais elles sont moins utilisées car les étapes de purifications sont plus difficiles qu'à partir d'une solution de peptides obtenues par synthèse (Mason, 2010).

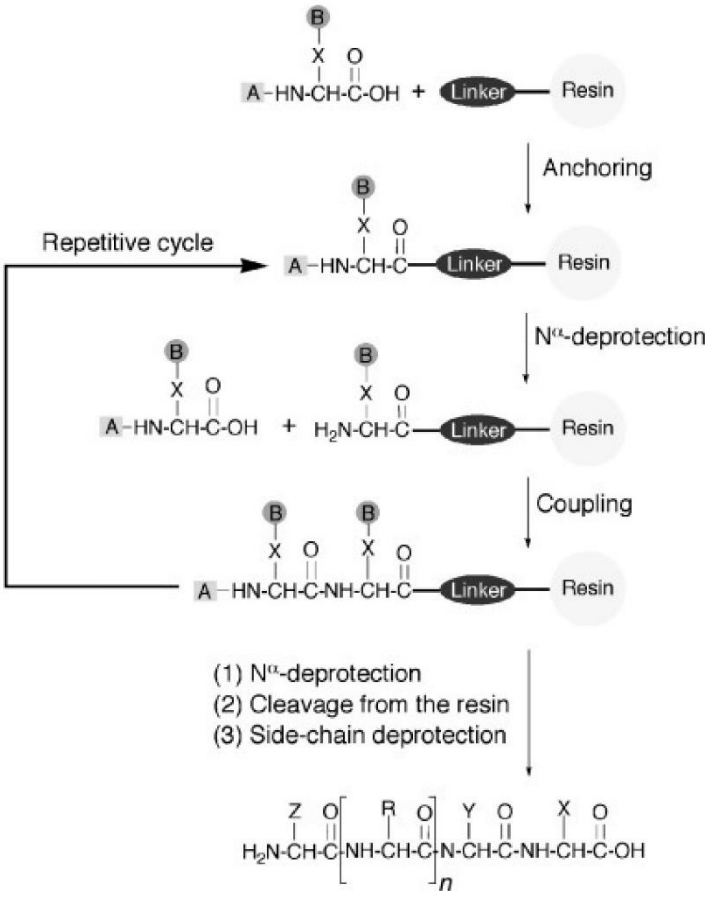


Figure 22 : Synthèse sur support solide de peptides par Bruce Merrifield (Merrifield, 1963).

2.1.1 Avantages et inconvénients des peptides thérapeutiques par rapport aux petites molécules, aux protéines et aux anticorps

Les PA peuvent être classés dans plusieurs catégories selon leur PM, avec pour extrêmes les molécules de poids moléculaire inférieur à 500 Da d'une part et les macromolécules biologiques de poids moléculaire supérieur à 5 000 Da d'autre part. Entre les deux se trouvent les peptides qui ont pour but de couvrir l'intervalle entre ces deux types de molécules. Les petites molécules, dont le PM est inférieur à 500 Da sont souvent préférées dans l'industrie pharmaceutique, car elles ont un faible coût de fabrication et leur faible masse molaire leur permettent d'être administrées oralement, d'autant plus qu'elles sont moins sensibles à la dégradation dans l'estomac et l'intestin. Cependant ces molécules manquent de sélectivité et peuvent s'accumuler dans des tissus sains avec des risques d'effets secondaires accrus. Généralement ces molécules suivent la règle des cinq de Lipinski : un PM de moins de 500 Da, un coefficient de partition octanol-eau (Log P) de moins de 5, moins de 5 atomes donneurs de liaisons H (*i.e.* nombre de groupements OH et NH), moins de 10 atomes accepteurs de liaisons H (*i.e.* nombre d'atomes d'oxygène et d'azote).

Les PA avec un poids moléculaire plus élevée (PM > 5 000 Da), comme les protéines ou les anticorps, sont plus sélectifs grâce à leur structure secondaire et à leur taille qui leur permettent d'avoir une surface d'interaction plus grande. Les inconvénients de ces molécules viennent de leur faible perméabilité à travers les membranes et de leur instabilité métabolique qui les rendent non administrables par voie orale. Le mode de production utilisé (*i.e.* culture bactérienne ou eucaryote) peut conduire à des variations entre les lots de produits finaux qu'il est alors difficile de caractériser. De plus, les coûts de production de ces PA sont souvent élevés (Craik *et al.*, 2013).

Les peptides sont une classe de molécules qui se trouvent dans l'intervalle entre ces deux catégories de PA. Ces molécules ne respectent pas les règles de Lipinski et ne sont donc pas adaptées à des administrations orales car elles sont rapidement dégradées par les enzymes présentes dans l'estomac et sont souvent sensibles au pH. Il est donc préférable d'utiliser d'autres voies d'administration : la voie parentérale (sous-cutanées, intramusculaires ou intraveineuses) ou la voie nasale (nébulisation). Mais les peptides ont également les avantages des molécules de masse moléculaire élevée, comme une forte activité, une très bonne sélectivité, peu d'accumulation dans les tissus ce qui réduit les risques d'effets secondaires. En revanche, ils ont une stabilité métabolique et une perméabilité transmembranaire faibles, un coût de production élevé, une élimination rapide et, dans certains cas, des problèmes de solubilité (Mason, 2010).

2.2. Approches pour augmenter la durée de vie des peptides médicaments *in vivo*

Le faible temps de demi-vie des peptides est une problématique à résoudre. Pour augmenter leur temps de demi-vie, plusieurs approches, exposées ci-dessous, sont utilisées.

2.2.1 Substitution d'acides aminés naturels par des acides aminés non naturels

Des études sur différents peptides montrent que la substitution d'un acide aminé de la séquence par un acide aminé non naturel (par exemple les acides aminés D au lieu de L) permet d'augmenter la durée de vie du peptide dans le plasma (Gerbier *et al.*, 2017). Les acides aminés D (Figure 23) sont plus résistants et ont une faible immunogénicité, leurs géométries ne sont généralement pas reconnues par les protéines (L) telles que les protéases. Il est aussi possible d'utiliser des acides aminés β à la place d'acides aminés α ou encore méthyler la fonction amide pour fabriquer des peptides β et des peptoïdes qui sont moins facilement métabolisés.

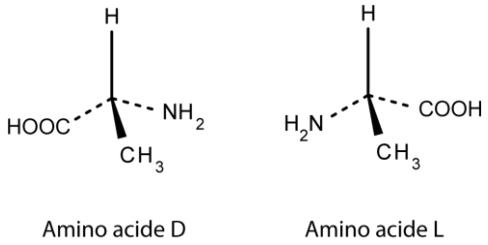


Figure 23 : Structure des acides aminés D et L.

2.2.2 Cyclisation des peptides

La cyclisation des peptides permet d'augmenter leur stabilité protéolytique (Clark *et al.*, 2005; Jensen *et al.*, 2012) et leur activité (Veber *et al.*, 1978; Haramura *et al.*, 2001). Il est possible de réaliser la cyclisation entre les extrémités N- et C-terminales, entre des chaînes latérales ou bien une extrémité et une chaîne latérale (Davies, 2003).

2.2.3 PEGylation des peptides

L'ajout d'une chaîne PEG permet de diminuer l'élimination du peptide (Milton Harris and Chess, 2003), le polymère formant une barrière permettant de protéger le PA des dégradations enzymatiques et de diminuer son élimination par voie rénale.

2.2.4 Greffage de chaînes lipidiques

Il est possible de greffer, de manière covalente, des chaînes de lipides en C- ou N-terminal ou sur les chaînes latérales (Bhatnagar and Gordon, 1997). Des études cliniques, sur l'apeline, ont mis en évidence l'intérêt d'un tel ajout. Il a également été montré que l'ajout d'un acide palmitique (chaîne lipidique en

C16) sur la Lys_{26} du liraglutide, agoniste du récepteur GLP-1 impliqué dans la régulation de la glycémie et cible intéressante pour soigner le diabète de type II, permettait au peptide de se lier de manière réversible à l'albumine présente dans le sang. Cela permet de diminuer la dégradation enzymatique de ce peptide, de ralentir son élimination et en conséquence d'augmenter son action. Le second avantage de la chaîne lipidique est de permettre au liraglutide de s'auto-associer en heptamères au niveau du point d'injection permettant de retarder l'absorption de la molécule et donc de prolonger son action après injection sous cutanée (Knudsen, 2010).

2.2.5 Conjugaison avec de l'albumine

Il est possible de conjuguer des peptides à de l'albumine pour augmenter la durée de vie du PA *in vivo* (Witt *et al.*, 2001), car l'albumine a naturellement une durée de vie longue dans la plasma humain, environ 19 jours (Peters, 1985). L'avantage de cette technique est également de faciliter le passage des peptides à travers la barrière hématoencéphalique (Bickel, Yoshikawa and Pardridge, 2001) dans le cas où de l'albumine cationique (point isolélectrique, pI de 8,5-9) est utilisée pour la conjugaison. En effet, l'albumine traverse la barrière hématoencéphalique par ses capillaires par transcytose (Kumagai, Eisenberg and Pardridge, 1987).

2.2.6 Encapsulation des peptides dans les liposomes

L'intérêt d'encapsuler des peptides dans des liposomes est de permettre au PA d'être protégé une fois administré aux patients et d'être relargué progressivement. Jusqu'en 2015, 10 médicaments formulés avec des liposomes ont été approuvés par la FDA (Bobo *et al.*, 2016). D'autres avantages sont cités pour ces formulations comme la diminution de la toxicité du PA et de ses effets secondaires. Cet aspect ainsi que d'autres méthodes de protection des peptides à l'aide de la formulation du PA sont décrits dans le premier chapitre de cette partie (Partie I - Chapitre 1).

Chapitre 3 : Apeline et les maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont l'une des causes principales de décès dans le monde (Nowbar *et al.*, 2019). Elles touchent principalement les individus de plus de 50 ans avec un risque de défaillances cardiaques augmentant avec l'âge (Mosterd and Hoes, 2007). Il est donc important de trouver de nouvelles thérapies dans ce domaine.

3.1. Le rôle de l'apeline dans l'homéostasie du système cardiovasculaire

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) jouent un rôle majeur dans le système cardiovasculaire et sont donc de potentielles cibles thérapeutiques contre les maladies cardiovasculaires (Japp and Newby, 2008). En 1993 a été découvert un nouveau récepteur nommé APJ (O'Dowd *et al.*, 1993), protéine de 380 acides aminés (Pitkin *et al.*, 2010) dont le gène codant se trouve sur le chromosome 11. Son ligand endogène, l'apeline, a été découvert cinq ans plus tard par screening (Tatemoto *et al.*, 1998). Le principe pour cette identification a été de cultiver des cellules d'ovaires d'hamsters chinois possédant le récepteur APJ ou non. Ces cellules ont ensuite été mises en contact avec différents ligands potentiels. En cas d'interaction entre APJ et un ligand, une différence de pH, mesurée à l'aide d'un cytosenseur, était attendue. L'apeline correspond à une série de peptides dont les différentes formes moléculaires

présentes dans la nature sont composées de 36, 17 ou 13 résidus (Figure 24). Ils sont formés à partir d'un pro-peptide de 77 acides aminés, la proapeline.

L'apeline est présente à de nombreux endroits dans le corps humain tels que le système nerveux central, l'endothélium des petites artères d'organes (*i.e.* foie, rein, poumon, pancréas, intestin, rate) et les tissus adipeux. Les effets biologiques de l'apeline sont nombreux : action diurétique, régulation de la glycémie, inhibition de l'insuline, formation des os. Un intérêt thérapeutique particulier réside dans sa capacité à augmenter la force contractile du myocarde par un effet inotrope positif (augmentation de la contractilité des cellules musculaires myocardiques), à diminuer le rythme cardiaque entraînant une diminution de la pression artérielle et à dilater des vaisseaux sanguins (effet vasodilatateur). Ces effets ont principalement lieu dans les cellules cardiaques ainsi qu'à la périphérie des veines (Tatemoto *et al.*, 2001).

Apeline 36	L	V	K	P	R	T	S	R	T	G	P	G	A	W	Q	G	G	R	R	K	F	R	R	Q	R	P	R	L	S	H	K	G	P	M	P	F
Apeline 17																				K	F	R	R	Q	R	P	R	L	S	H	K	G	P	M	P	F
Pyr-apeline-13																							Pyr	Q	R	P	R	L	S	H	K	G	P	M	P	F
Apeline 13																								Q	R	P	R	L	S	H	K	G	P	M	P	F
Apeline 12																									R	P	R	L	S	H	K	G	P	M	P	F
K14P																				K	F	R	R	Q	R	P	R	L	S	H	K	G	P			
N°																				**1**				**5**					**10**				**14**			

Figure 24 : Fragments d'apeline. Le N-terminal des chaînes se trouvent à gauche du tableau et le C-terminal à droite.

L'effet inotrope de l'apeline se manifeste majoritairement dans les cellules cardiaques. Le mécanisme est le suivant (Figure 25) : l'apeline se lie à son récepteur l'APJ couplé à la protéine Gq. Le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) est coupé en diacyl glycérol (DAG) et inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) grâce à l'activation de la phospholipase C (PLC) par cette protéine G. Ensuite deux voies de signalisations sont possibles : d'abord l'IP3 se lie à un de ses récepteurs, le canal calcium présent dans le réticulum sarcoplasmique (RS), ce qui entraîne une augmentation de la concentration en Ca^{2+} dans la cellule. La deuxième voie concerne le DAG qui active la protéine kinase C (PKC). La PKC stimule l'échangeur Na^+/H^+ qui secrète des protons à l'extérieur de la cellule et fait entrer du sodium dans la cellule entraînant une augmentation du pH intracellulaire. L'augmentation de sodium dans la cellule active l'échangeur Na^+/Ca^{2+}, entraînant une augmentation de la concentration en ion calcium dans la cellule et permettant de conserver son équilibre osmotique. L'effet inotrope de l'apeline est donc dû à l'augmentation intracellulaire de la concentration en Ca^{2+} ainsi qu'à l'augmentation de la sensibilité des myofilaments au Ca^{2+}. Ces deux effets entraînent la contractilité du myocarde.

L'effet vasodilatateur se situe quant à lui au niveau des veines et son mécanisme est le suivant (Figure 26) : le peptide se lie à son récepteur APJ, couplé cette fois ci avec deux types de protéines G. D'abord avec une protéine Gq qui suit la même voie de signalisation qui a lieu dans le cœur, entraînant une augmentation de la quantité en calcium dans la cellule et l'activation de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS). Parallèlement, le récepteur APJ est aussi couplé avec une protéine G inhibitrice qui active aussi eNOS grâce à la phosphorylation par la protéine kinase B (Akt). eNOS catalyse ensuite une réaction permettant la production d'oxyde nitrique (NO). Les molécules de NO diffusent dans les cellules musculaires voisines pour activer la guanylate cyclase soluble (sGC) entraînant la production

de guanosine monophosphate cyclique (cGMP) à partir de guanosine triphosphate (GTP) provoquant l'effet vasodilatateur (Chandrasekaran, Dar & McDonagh, 2008; Sorli, van den Berghe, Masri, Knibiehler & Audigier, 2006).

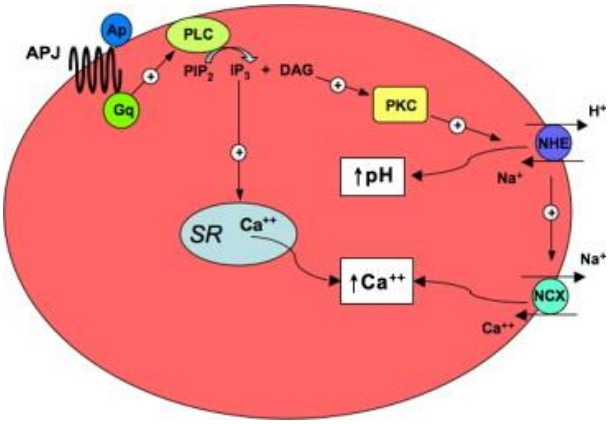


Figure 25 : Mécanismes possibles à l'origine de l'effet inotrope positif de l'apeline. L'ovale rouge représente une cellule cardiaque. AP : apeline ; APJ : récepteur de l'apeline ; Gq : protéine G ; PIP2 : phosphatidylinositol 4,5-biphosphate ; DAG : diacyl glycérol ; IP3 : inositol 1,4,5-triphosphate ; PLC : phospholipase C ; RS : réticulum sarcoplasmique ; NHE : échangeur Na^+/H^+ ; NCX : échangeur Na^+/Ca^{2+} (Japp and Newby, 2008).

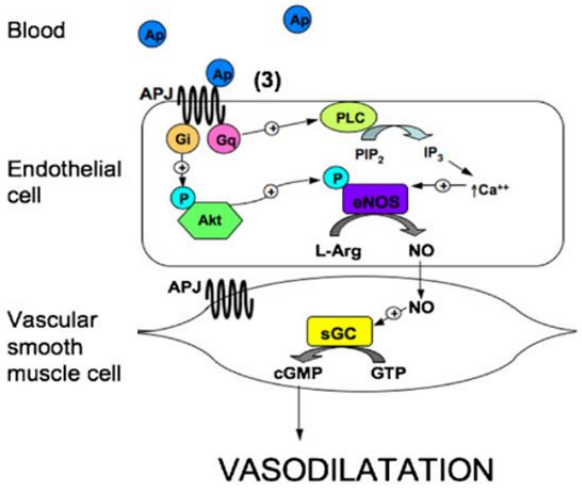


Figure 26 : Mécanismes possibles à l'origine de l'effet vasodilatateur de l'axe de signalisation APJ-Apeline. Gi, Gq : protéine G ; Akt : protéine kinase B ; eNOS : l'Oxyde Nitrique Synthase endothéliale ; NO : oxyde nitrique ; sGC : Guanylate Cyclase soluble ; cGMP Guanosine Monophosphate cyclique ; GTP : Guanosine Triphosphate (Japp and Newby, 2008).

3.2. Etudes actuelles et place de l'apeline dans les recherches pharmaceutiques

3.2.1 Etude des structures des peptides apeline

L'équipe de Rainey a publié une étude sur les structures de plusieurs peptides issus d'apeline par dichroïsme circulaire et RMN (Langelaan *et al.*, 2009). Les peptides étudiés sont apeline-36 (LVQPRGSRNGPGPWQGGRRKFRRQ**RPRLSHKGPMPF**), apeline-17 (KFRRQ**RPRLSHKGPMPF**), Pyr-apeline-13 (Pyr-R**PRLSHKGPMPF**), apeline-13 (Q**RPRLSHKGPMPF**) et apeline-12

(**RPRLSHKGPMPF**). Le motif qui se répète dans toutes les chaînes de peptide a été mis en gras et la numérotation est présentée dans la Figure 24. Les spectres de dichroïsme circulaire ne montrent pas de signe de structure d'hélice α ou de feuillet β mais ils ne sont pas non plus en accord avec une forme « random coil ». Ces spectres mettent donc en évidence que les peptides sont principalement non structurés. Cependant des bandes correspondantes à des restrictions de conformations sont visibles à 5 °C mais pas à 35 °C. Ceci montre que le peptide tend à se structurer légèrement à basse température. La zone Arg_6 - Leu_9 du peptide montre des signes de structure aux deux températures. Cette zone correspond à la zone qui se lie à l'APJ et permet l'activation de la protéine. A 35°C une seconde zone montre des signes de structures : Gly_{13} – Phe_{17}. Ensuite les déplacements chimiques des analyses RMN sont similaires aux déplacements chimiques « random coil ». Les analyses RMN ont été réalisées à 5 et 35 °C et mettent en évidence que la température n'affecte pas les déplacements chimiques des peptides. Ainsi, cela confirme qu'il y a peu de variations de structure avec la température. Ces spectres montrent aussi que le peptide a plusieurs conformations du fait des isomérisations cis/trans des résidus proline, principalement les deux résidus Pro_{14} et Pro_{16} les plus proche du C-terminal. D'après les spectres, les auteurs estiment que les conformations majoritaires sont les conformations composées uniquement de proline trans ou de proline cis avec un ratio 4:1 respectivement à 5 °C. Quelques années plus tard, l'équipe de Rainey a réalisé une autre étude sur la structure des peptides apeline-36 et apeline-55 (Shin, Sarker, *et al.*, 2017). Ils mettent en évidence que les spectres ^{1}H-^{15}N HSQC sont superposables pour les régions similaires dans les 7 peptides d'apeline étudiés, *i.e.* la zone des résidus 25 à 36. Les signaux supplémentaires sont seulement dus aux résidus supplémentaires sur certains peptides. Plusieurs ensembles de déplacements chimiques peuvent être attribués aux peptides à 5 °C alors qu'il n'y en a qu'un en à 35 °C. Ils expliquent ces différences par un changement d'équilibre entre les différentes formes du peptide dépendant de la température et que les différentes conformations du peptide ont une vitesse d'échange intermédiaire voire lente.

3.2.1 Dégradation de l'apeline *in vivo*, exemple

L'inconvénient majeur des peptides est leur faible durée de vie *in vivo* : ils sont rapidement éliminés. Le fragment de l'apeline majoritairement retrouvé dans le plasma humain est Pyr1-apeline-13 (pGlu RPRLSHKGPMPF). Il est probablement issu du clivage de l'apeline-36 par des protéases à sérine, puis d'une cyclisation du résidu glutamine (Zhen, Higgs and Gutierrez, 2013). Cependant sa durée de vie *in vivo* est courte ($t_{1/2}$ = 14 min dans le plasma de rat) : le peptide se clive une première fois entre les acides aminés Leu_5 et Ser_6 puis une seconde fois entre les acides aminés Ser_6 et His_7 (Murza *et al.*, 2014).
Ce peptide peut aussi être hydrolysé entre Pro_{12} et Phe_{14} par l'enzyme humaine de conversion de l'angiotensine 2 (ECA2) (Vickers *et al.*, 2002). Cette enzyme est une métalloprotéase possédant un atome de zinc dans son site actif. C'est un homologue de l'enzyme humaine de conversion de l'angiotensine 1 (ECA1).

3.2.2 Modification chimique réalisée sur la série de peptides apeline pour augmenter sa durée de vie *in vivo*

Ce paragraphe présente des modifications, répertoriées dans la littérature, réalisées sur apeline dans le but d'augmenter sa durée de vie *in vivo*. L'analogue Pyr1-apeline-13 a été longuement étudié dans Murza et al., 2014. Il est possible de remplacer l'acide aminé Met_{11} par une norleucine (Nle), Leu_5 par son isomère D ou par la β-cyclohexylalanine (Cha) et Phe_{13} par 4-Benzoyl-L-phénylalanine (Bpa) (Figure 27). Ces modifications permettent d'augmenter considérablement la durée de vie du peptide, jusqu'à plus de 2 h.

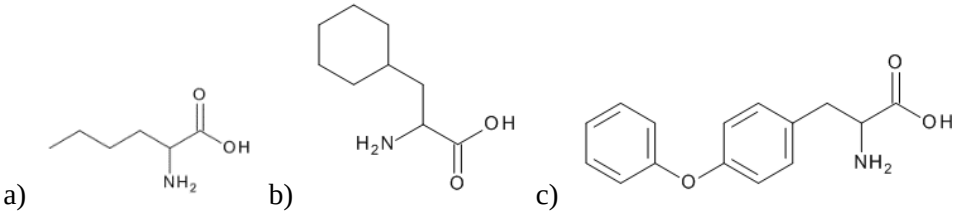


Figure 27 : Structure d'acides aminés non naturels : (a) norleucine (Nle), (b) β-cyclohexylalanine (Cha) et (c) 4-benzoyl-L-phenylalanine (Bpa).

La cyclisation d'apeline-12, entre les acides aminés 1 et 6, permet d'obtenir un peptide avec une activité plus faible sur le système β-arrestine impliqué dans l'internalisation du récepteur. En revanche, le peptide est beaucoup plus actif (de l'ordre de 350 à 1 300 fois plus) dans le processus de signalisation impliquant le récepteur de l'apeline (Brame *et al.*, 2015). D'autres études ont comparé l'effet de différentes cyclisations sur le fragment apeline-12 (RPRLSHKGPMPF) qui a un effet cardioprotecteur similaire à son homologue linéaire (Hamada *et al.*, 2008).

Des études ont montré que l'effet inotrope de l'apeline-36 pouvait être prolongé en greffant une chaîne de polymère PEG au niveau de l'extrémité N-terminale (Jia *et al.*, 2012). Cependant, cette méthode a perdu en partie de son intérêt avec l'augmentation des questions de sécurité et de la tolérance autour de l'utilisation du PEG dans des solutions injectables (European Medicines Agency, 2012). Il semblerait que l'injection répétée de PEG (PM > 40 000 Da) soit à l'origine de la vacuolisation de cellules notamment dans le plexus choroïde qui est la source principale de sécrétion du fluide cérébrospinal et une source de facteur de croissance. C'est-à-dire que les molécules de PEG vont s'accumuler dans les vacuoles des cellules. Son effet n'est pas très bien connu mais il pourrait affecter le fonctionnement des cellules où ils s'accumulent et pourrait par exemple diminuer la production du fluide cérébrospinal.

Il a aussi été montré que l'ajout d'une chaîne fluorée au niveau N-terminal du peptide K17F permettait d'augmenter la stabilité et donc la durée de vie du peptide dans le plasma (Gerbier *et al.*, 2017). Ceci s'expliquerait par l'auto-organisation du peptide en empilement permettant d'augmenter sa résistance à la coupure enzymatique.

3.2.3 Etudes cliniques

L'apeline et plusieurs de ses dérivés ont été testés sur des tissus humains *in vitro*, sur animaux et sur l'homme *in vivo* pour prouver leurs effets inotropes et contractiles. Les résultats de ces études ont été regroupés dans une publication (Yu *et al.*, 2014). Les maladies étudiées étaient notamment l'athérosclérose, les maladies coronariennes, l'insuffisance cardiaque, l'hypertension, l'hypertension artérielle pulmonaire et la fibrillation atriale. La grande majorité de ces études montre l'effet protecteur des peptides testés sur le système cardiovasculaire. De plus, 5 études cliniques sont répertoriées sur le site de clinicaltrials.gov : NCT00901888 (2009), NCT00901719 (2009), NCT01179061 (2010), NCT01049646 (2010), NCT02259686 (2014). Elles ont toutes été réalisées à l'université d'Édimbourg. Certains de ces résultats ont été publiés (Barnes *et al.*, 2013) et montrent l'impact positif des peptides apeline pour le traitement de l'insuffisance cardiaque. Cependant aucune suite n'a été donnée à ces études à ma connaissance. En effet, la publication de Yu suggère que ces peptides entraînent des effets secondaires non négligeables comme une augmentation des sécrétions d'acide gastrique ce qui empêcheraient leur administration sur le long terme (Yu *et al.*, 2014).

3.2.4 Autre application du peptide apeline

L'apeline a aussi était étudié pour d'autres pathologies. Par exemple l'étude de Gourdy *et al.* montre que l'apeline permet d'augmenter l'efficacité de l'insuline sans effet secondaire (Gourdy *et al.*, 2018). Ces résultats suggèrent donc que l'apeline pourrait être une nouvelle stratégie pour lutter contre la résistance à l'insuline chez des patients atteint de diabète type II.

3.3. Autres molécules possédant une affinité pour le récepteur APJ

D'autres molécules, non peptidiques, ont été criblées dans le but d'identifier des interactions avec le récepteur de l'apeline. L'avantage de ce type de molécule est de pouvoir être plus facilement modifiable qu'un peptide, pour augmenter son affinité avec le récepteur. La première molécule mise en évidence est la E339-3D6 (Figure 28) par l'équipe de Catherine Llorens-Cortes (Iturrioz *et al.*, 2010) qui permet d'obtenir un effet vasodilatateur *ex vivo* sur l'aorte de rat similaire au peptide K17F. Cette même publication montre, par modélisation moléculaire, que E339-3D6 et K17F se lient de la même manière au récepteur. Cependant ce composé n'a finalement pas atteint la phase clinique du fait d'une affinité trop faible avec APJ, de la présence d'un fluorophore (augmentant les risques de toxicité) et un PM trop élevée (https://www.college-de-france.fr/site/en-cirb/llorens-cortes.htm).

Entre temps un second ligand endogène d'APJ a été découvert et caractérisé en 2013. Ce ligand peptidique est appelé elabela (MRFQQFLFAFFIFIMSLLLISGQRPVNLTMRRKLRKHNCLQRRCM PLHSRVPFP) (Chng *et al.*, 2013). Cependant aucune étude clinique n'a été publiée sur ce sujet à ma connaissance.

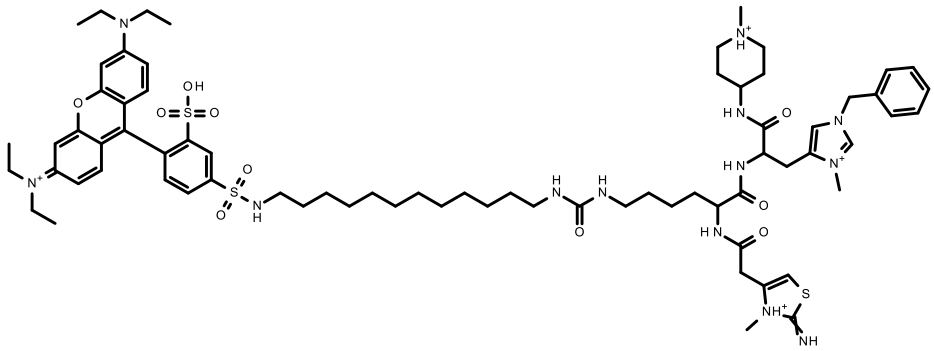


Figure 28 : Structure de E339-3D6 (Iturrioz et al., 2010).

Chapitre 4 : Principes des méthodes d'analyses couramment utilisées pour étudier les liposomes

Plusieurs caractéristiques des liposomes sont utiles à connaître pour comprendre les mécanismes de relargage ainsi que les interactions avec les PA, comme leurs tailles et leurs distributions de taille, le nombre de bicouches, le rendement d'encapsulation, la stabilité. Les différentes méthodes couramment utilisées pour caractériser les liposomes sont présentées dans ce chapitre.

4.1. Diffusion quasi-élastique de la lumière

La diffusion quasi-élastique de la lumière (Dynamic Light Scattering, DLS) est une technique spectroscopique permettant de mesurer, dans un échantillon, la taille et la distribution en taille des objets en suspension. Un faisceau monochromatique est envoyé sur l'échantillon et la lumière diffusée à l'angle de rétrodiffusion (ici, 173°) est analysée. L'intensité de la lumière mesurée dépend de la taille des particules : les petites particules, plus mobiles, vont avoir des valeurs d'intensité diffusée variant plus rapidement au cours du temps que les grosses particules. L'analyse de ces fluctuations permet d'obtenir la vitesse du mouvement des particules (*i.e.* le coefficient de diffusion, D) qui est liée à leur taille grâce à la relation de Stokes-Einstein (Équation 1).

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

Équation 1, avec k_B la constante de Boltzman (1,3806503 x 10^{-23} J K^{-1}), T la température (K), η la viscosité dynamique du solvant (cP), R_h le rayon hydrodynamique (m), D le coefficient de diffusion ($m.s^{-1}$) (https://www.malvern.com/fr/support/resource-center/technical-notes/TN101104DynamicLightS) (Øgenda, 2016).

Les avantages de cette technique sont qu'elle est rapide et facile à mettre en place. Cependant les mesures peuvent être faussées par la présence de bulles ou d'agrégats dans l'échantillon.

4.2. Dialyse

Cette technique permet la séparation des PA à l'extérieur des liposomes grâce à une membrane dont la taille des pores permet de laisser passer les PA mais pas les liposomes. Cette technique permet de calculer le rendement d'encapsulation et faire du suivi de cinétique de relargage en prélevant régulièrement la solution contenant le PA relargué pour l'analyser par une méthode telle que la chromatographie liquide haute pression (HPLC) (Henriksen *et al.*, 1995; Saarinen-Savolainen *et al.*, 1997). Les membranes les plus courantes sont à base de cellulose régénérée. La taille des pores utilisés est comprise entre 10 000 et 1 000 000 Da en fonction de la taille des liposomes.

4.3. Potentiel Zêta

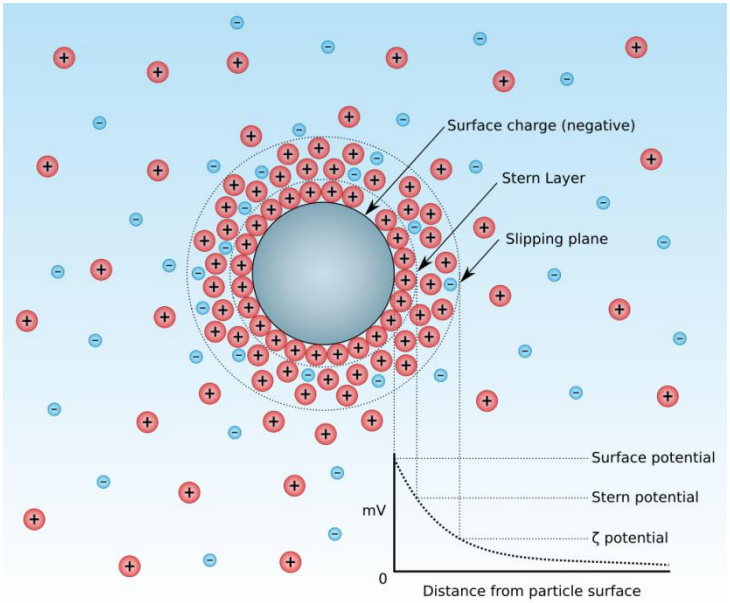


Figure 29 : Différentes couches d'hydratation d'une molécule.

Le potentiel zêta correspond au potentiel électrique entre le « slipping plane » de l'objet étudié et l'environnement (*i.e.* interface entre la couche d'hydratation de l'objet et le tampon ou le solvant dans lequel est dissous l'objet) (Figure 29). Pour obtenir cette information il faut mesurer la mobilité électrophorétique des molécules de l'échantillon (*i.e.* mouvements de particules en suspension dans un

liquide soumis à un champ électrique) en faisant traverser l'échantillon par un courant électrique. Il est ensuite possible d'en déduire le potentiel zêta à partir de l'équation d'Henry (Équation 2), connaissant la viscosité du tampon (ɳ) de l'échantillon et sa constante diélectrique (ε).

Le potentiel zêta peut être utilisé pour optimiser les formulations comme les suspensions, les émulsions et les solutions de protéines, favoriser la formation de films et de revêtements. Il peut également être utilisé comme aide pour prédire la stabilité d'une formulation à long terme.

$$z = \frac{3\eta}{2\,\varepsilon f(ka) U_E}$$

Équation 2, avec U_E la mobilité électrophorétique, ε *la constante diélectrique du milieu, z le potentiel zêta,* ɳ *la viscosité, $f(ka)$ la fonction d'Henry avec a le rayon de la particule et k l'inverse de la longueur de Debye. La fonction d'Henry dépend de l'épaisseur de la bicouche par rapport au rayon de courbure du liposome et peut prendre des valeurs comprises entre 1 et 1,5 (D'orlyé, 2009).*

La valeur du potentiel zêta à température ou à pH donné, confère un côté prédictif à la stabilité de l'échantillon (*i.e.* permet d'estimer la capacité ou non de l'échantillon à s'agréger ou sédimenter rapidement). Si toutes les particules en suspension ont une charge du même signe alors elles auront tendance à se repousser et conduiront à une meilleure stabilité de la formulation. En revanche, si les particules ont des valeurs de potentiel zêta proche de zéro, il y aura peu de répulsions électrostatiques pour empêcher l'agrégation des particules. Une suspension est considérée stable si le potentiel zêta est supérieur à 30 mV en valeur absolue. Cependant, la nature du dispersant est à prendre en compte. Si les particules ont une densité supérieure au dispersant, même si elles sont dispersées, elles finiront par sédimenter. L'interprétation du potentiel zêta d'une particule doit donc être mise en parallèle avec les caractéristiques du dispersant. L'équipe de Nakanishi a ainsi mis en évidence, grâce à des mesures de potentiel zêta, que la charge de la surface des liposomes avaient un impact sur leur capacité à être internalisés pour la transfection de gène (Takeuchi *et al.*, 1996).

Cette méthode fait l'hypothèse que les particules étudiées sont sphériques, rigides, non conductrices et cette équation se limite aux cas des faibles potentiels de surface (< 25 mV, approximation de Debye-Hückel). Plusieurs facteurs affectent le potentiel zêta comme le pH, la conductivité de l'échantillon, la concentration des composés de la formulation. Ces paramètres jouent sur la quantité d'ions présents et donc sur la charge globale de l'échantillon. En modifiant le pH, par exemple, les objets sont déplacés plus ou moins loin de leurs points isoélectriques (pI, point à laquelle les charges d'un objet sont nulles) entraînant ainsi une variation du potentiel zêta.

4.4. Résonance Magnétique Nucléaire

La RMN est une méthode d'analyse utilisée pour l'élucidation de structures de molécules aussi bien organique que biologique (protéine, acide désoxyribonucléique *i.e.* ADN, anticorps, …), la quantification de composés, l'étude d'interactions, le suivi de réactions, …

Le spectromètre utilisé pour les acquisitions est composé d'un aimant supraconducteur refroidi par des cryo-fluides (azote −195,79 °C et hélium −269 °C). Il est possible d'utiliser des aimants de champs différents en fonction de l'application. Typiquement des spectromètres de 300 à 600 MHz vont être utilisés pour l'analyse de molécules de petites tailles ou des peptides, alors que pour analyser des molécules plus complexes des champs de 700 MHz à 1,2 GHz sont utilisés. Une sonde est placée dans l'aimant. Cette sonde va permettre d'envoyer les ondes radios fréquences (RF) qui permettront de travailler avec les spins à étudier. Différents types de sondes existent en fonction de l'application et du noyau à observer. Cette sonde est ensuite reliée à une console qui permet de faire le lien entre les signaux collectés et la numérisation des données. Ces connexions engendrent du bruit électrique qui peut être diminué en utilisant des cryo-sondes. Ce sont des sondes dont la bobine de détection est refroidie à l'hélium gaz, pour réduire le bruit causé par les composants électroniques. La console est elle-même reliée à un ordinateur qui permet de contrôler l'appareil et d'analyser les données

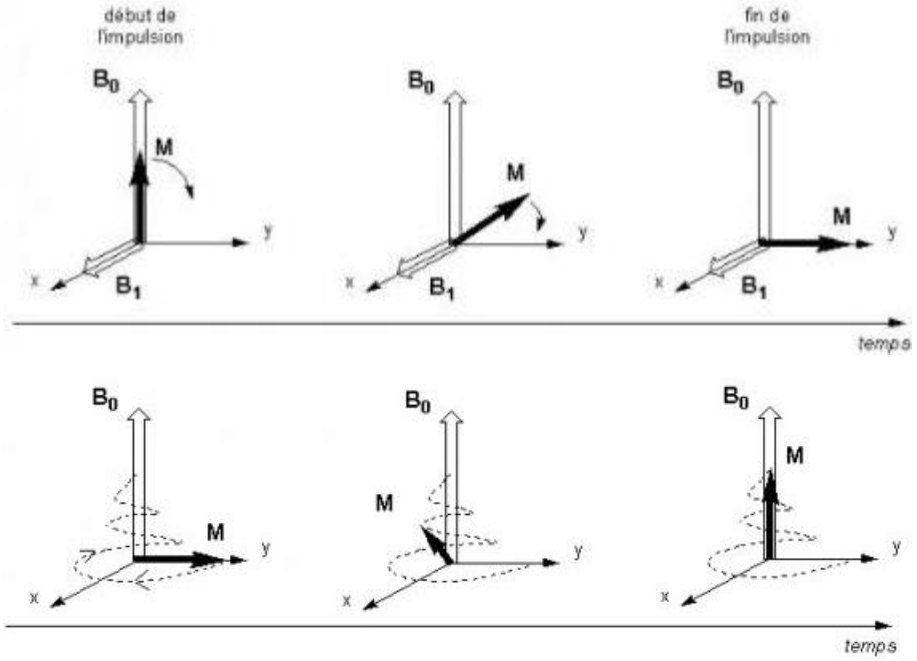


Figure 30 : L'aimantation nucléaire (M) est orientée selon B0, puis une impulsion B1 est appliqué au système et permet à M de se placer dans le plan xy, perpendiculaire à B0. Le retour à l'équilibre peut ensuite être mesuré, il est représenté sur la seconde ligne de l'image.

Les spins des noyaux des atomes présents dans un échantillon possèdent un moment magnétique appelé μ et sont orientés de manière aléatoire dans l'espace. Une fois l'échantillon placé dans le champ B_0 de l'aimant du spectromètre, les spins vont s'orienter suivant les règles de la mécanique quantique. Ainsi les spins d'un atome d'hydrogène pourront prendre deux orientations + 1/2 et - 1/2 correspondant aux orientations + z et - z, avec z l'axe du champ B_0. L'état de plus basse énergie (spins orientés selon la direction de B_0, + z) sera légèrement plus peuplé que l'état de haute énergie (spins orientés dans la direction opposée à B_0, - z). Ainsi la somme des moments magnétiques de l'échantillon est différente de zéro et est appelée aimantation nucléaire (M). M ne peut pas être observée lorsqu'elle se trouve sur l'axe

z. Pour réaliser une acquisition il faut donc appliquer un champ de radio fréquence B_1 sur l'échantillon qui va permettre d'exciter les spins des noyaux étudiés (Figure 30). Typiquement cette impulsion permet de faire tourner les spins de 90° et de les positionner dans le plan xy. La somme des moments magnétiques est nulle selon B_0 (axe z, axe longitudinal) et non nulle dans le plan xy (axe transversal). Ceci permet d'avoir M perpendiculaire à B_0. Le retour à l'équilibre de M va ensuite être mesuré. Il correspond au retour des moments magnétiques selon l'axe z. M va tourner autour de B_0 à la fréquence de larmor pendant ce retour à l'équilibre. Cette précession permet d'obtenir les déplacements chimiques des noyaux étudiés. Le retour à l'équilibre dépend également de la relaxation longitudinale (T_1) et de la relaxation transversale (T_2) des spins. Le signal mesuré est un FID (Free Induction Decay) qui est ensuite traité par une transformée de Fourier pour obtenir un spectre avec des déplacements chimiques en abscisse (ppm) et une intensité en ordonnée, dans le cas d'un spectre 1D. Les déplacements chimiques des atomes observés dépendent de leur environnement chimique, ce qui permet de les différencier.
Les méthodes présentées ici concernent la RMN du liquide.

4.4.1 RMN 1H

La RMN du proton a déjà été utilisée pour déterminer le rendement d'encapsulation d'un PA sensible au pH (homocarnosine), sans séparer physiquement les PA internes et externes aux liposomes (Zhang *et al.*, 2004). Le pH de la solution à l'extérieur des liposomes est abaissé, sans affecter le pH interne des liposomes. A pH faible, l'homocarnosine se protone faisant varier les déplacements chimiques de certains de ses protons. Il est alors possible de distinguer les molécules à l'intérieur des liposomes et à l'extérieur par différences de fréquences. Il est aussi possible d'observer des variations de déplacements chimiques pour les molécules à l'intérieur et à l'extérieur en ajoutant un complexe paramagnétique ($Tm(DOTP)^{5-}$) à l'extérieur des liposomes (Zhang *et al.*, 2004). Le complexe paramagnétique peut induire une variation de déplacement chimique pour les protons dont il est proche, *i.e.* ceux des molécules à l'extérieur des liposomes.
La Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY) est une technique qui permet de mesurer les coefficients de diffusion de molécules. Ce coefficient est dépendant de la taille apparente des molécules. Le principe est détaillé dans le Chapitre 3 de la Partie II. Plusieurs publications ont mis en évidence des coefficients de diffusion différents entre une molécule libre et la même molécule encapsulée (Hinton and Johnson, 1994; Cabeca *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2014). Ceci est principalement dû à des contraintes ajoutées par les liposomes sur les molécules encapsulées qui les empêchent de diffuser librement, affectant leur coefficient de diffusion.
Il est également possible d'observer les signaux des phospholipides de la bicouche des liposomes, lorsque les phospholipides sont suffisamment mobiles *i.e.* lorsque la température de l'échantillon est suffisamment élevée pour que les phospholipides commencent à devenir fluides. Les interactions entre phospholipides et un PA ont ainsi pu être mis en évidence grâce aux variations de déplacements

chimiques des protons des phospholipides sur des spectres protons (Pawlikowska-Pawlęga *et al.*, 2013), ainsi que l'impact de l'inclusion de molécules hydrophobes dans la formulation et donc la bicouche des liposomes (Gabrielska and Gruszecki, 1996).

4.4.2 RMN ^{31}P

Les liposomes sont composés de phospholipides qui possèdent chacun un atome de phosphore. Le seul isotope stable présent naturellement est le phosphore 31 (spin ½), avec un rapport gyromagnétique de 10,8 x 10^7 rad.(T.s)$^{-1}$. Ce rapport gyromagnétique est le troisième plus intense après ceux de ^{1}H et ^{19}F (γ_H = 26,752 x 10^7 rad (T.S)$^{-1}$, γ_F = 25,2 x 10^7 rad (T.S)$^{-1}$). La sensibilité de ce noyau est donc relativement élevée ce qui en fait un élément de choix pour les analyses RMN.

La RMN du phosphore a été utilisée pour étudier des membranes biologiques (Davis and Inesi, 1972; McLaughlin *et al.*, 1975) ainsi que des liposomes (De Kruijff, Cullis and Radda, 1975; Cullis, De Kruyff and Richards, 1976) principalement par RMN du solide, la masse moléculaire de ces objets étant élevée. Il est possible d'extraire des informations sur la structure des objets en fonction de leurs formes de raies (Figure 31) qui, ici, dépendent principalement de l'anisotropie de déplacement chimique (σ). Les spectres ^{31}P de phospholipides dans des vésicules ont une σ qui dépend de la quantité de bicouches parallèles et perpendiculaires au champ magnétique. Cela se traduit par un signal caractéristique des spectres de poudre à savoir un signal relativement fin et un épaulement à ce signal (voir les spectres de vésicules uni ou multi-lamellaires et phases hexagonales inversées ci-dessous). Les micelles auront une largeur de raie plus fine car leurs mouvements en solution permettront de moyenner σ.

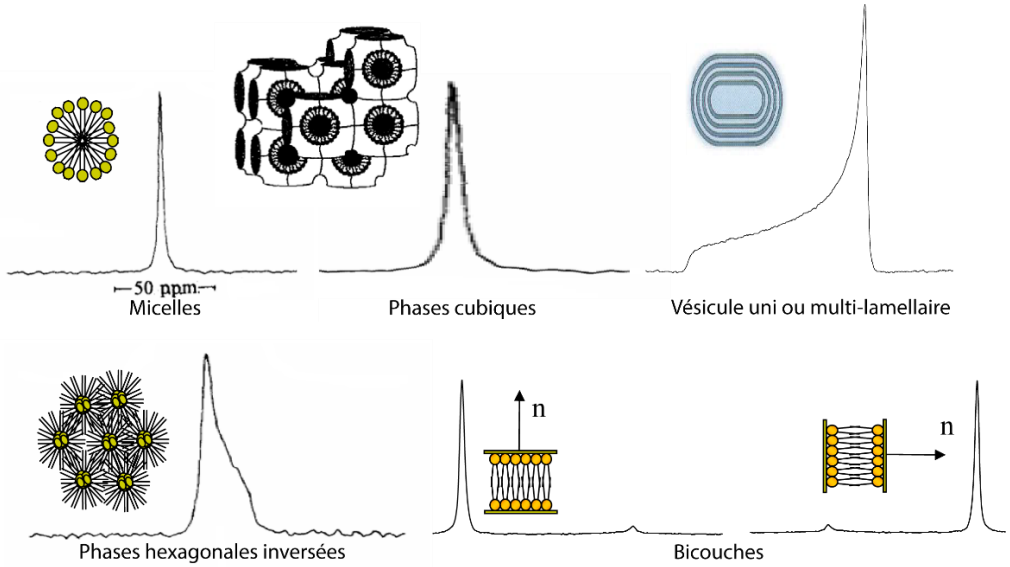


Figure 31 : Signaux ^{31}P RMN solide caractéristiques de différents assemblages de phospholipides. Adapté du cours de Michèle Auger, « NMR of phospholipids and membrane-bound systems » 2008.

La RMN du phosphore peut être utilisée pour obtenir des informations sur le nombre de bicouches des vésicules ainsi que sur l'épaisseur de ces bicouches (Talsma *et al.*, 1987).

La quantité de tête polaire en contact avec le milieu extérieur dépend du nombre de bicouches des liposomes. Elle peut aller de 5 % pour les LMV (Schwartz and McConnell, 1978) à 70 % pour les SUV (Barenholz *et al.*, 1977). Ce ratio peut être déterminé par RMN ^{31}P. L'ajout de Mn^{2+}, un élément paramagnétique relaxant, à l'extérieur des liposomes permet d'élargir les signaux ^{31}P des phospholipides sur la couche extérieure des liposomes, jusqu'à extinction de ce signal. Les signaux restant sur le spectre ne correspondent plus qu'aux phospholipides sur les couches internes des liposomes, protégés de l'ion Mn^{2+} (Mayer, Hope and Cullis, 1986). Cette méthode a ses limites. Il a été mis en évidence que certains paramètres influençaient les résultats comme le tampon utilisé, la quantité de Mn^{2+} ajoutée, le pH ou encore la diffusion de l'élément paramagnétique à travers les bicouches (Fröhlich, Brecht and Peschka-Süss, 2001). Ainsi les tampons MOPS et TRIS à faible concentration (10 mM) favorisent la perméabilité des membranes à l'élément paramagnétique, rendant impossible la distinction des têtes polaires de la couche interne et externe des liposomes. En revanche, l'utilisation de tampons tels que l'HEPES (quel que soit sa concentration) ou le TRIS (50 mM) ne permet pas à Mn^{2+} de traverser les bicouches des liposomes. Cette méthode permet d'estimer la lamellarité des liposomes (L, i.e. nombre de bicouches moyen des liposomes présents dans un échantillon) avec Équation 3. L'étude montre aussi qu'avec une concentration de Mn^{2+} de 10 mM la lamellarité d'OVL était mesurée à 1 (*i.e.* uni-lamellaire) alors qu'avec une concentration de 5 mM la lamellarité de ces mêmes liposomes était estimée à 1,22. Finalement à pH basique l'élément paramagnétique se trouve sous la forme $Mn(OH)_2$ favorisant également son passage à travers la bicouche des liposomes.

$$L = \frac{100}{2 \times \textit{perte relative du signal RMN } {}^{31}P\ (\%)}$$

Équation 3, si la baisse d'intensité est de 50 % alors L = 1, les liposomes sont en moyenne uni-lamellaire, si la baisse d'intensité est de 25 % alors L = 2, les liposomes ont en moyenne deux bicouches).

La RMN ^{31}P permet aussi d'obtenir des informations sur les interactions entre les molécules encapsulées et les liposomes en observant principalement la forme de raies des signaux ^{31}P des phospholipides (Mertins *et al.*, 2010) ainsi que les déplacements chimiques (Da Costa *et al.*, 2007). Par exemple si l'intensité des signaux de phospholipides en présence d'un PA est diminuée par rapport à un échantillon sans PA, il est possible d'en déduire que des interactions entre les PA et les phospholipides diminuent la mobilité des phospholipides. Des données sur le mouvement des têtes polaires (Cullis, De Kruyff and Richards, 1976) peuvent également être obtenues en reliant la largeur des signaux à la vitesse de rotation des phospholipides sur leur axe long. Ainsi Cullis et son équipe montrent qu'en dessous de la T_m des phospholipides, les signaux RMN ^{31}P sont larges et qu'ils s'affinent aussi au-dessus de cette température. Ceci correspond à une augmentation des mouvements de la tête polaire au-dessus de la T_m et à une diminution de ces mouvements en dessous de la T_m. Ils montrent aussi qu'en présence de cholestérol, il n'y a plus de différence de vitesse de mouvement en dessous et au-dessus de la T_m. Les mouvements observés correspondent à ceux observés au-dessus de la T_m, en absence de cholestérol.

4.4.3 RMN ^{19}F

L'atome de fluor 19 (spin ½) a une abondance naturelle de 100 % et un rapport gyromagnétique pratiquement équivalent au rapport gyromagnétique de l'atome d'hydrogène, ce qui en fait un atome de choix pour les analyses RMN.

Il est possible d'utiliser des phospholipides fluorés pour étudier les mouvements dans la bicouche des liposomes (Da Costa *et al.*, 2007). Il est aussi possible d'ajouter des atomes de fluor sur les PA qui seront encapsulés dans des liposomes pour étudier les interactions PA - vésicule ou encore déterminer le coefficient de partition du PA entre le tampon et la membrane (Da Costa *et al.*, 2007).

La relaxation T_2 de molécules a également été utilisée pour étudier le positionnement du PA dans la membrane de phospholipides. Par exemple Urano et ses collaborateurs ont mesuré le T_2 de noyaux de fluor 19 de la vitamine E dont certains protons ont été remplacés par des fluors pour observer son positionnement dans une membrane de phosphatidylcholine (Urano *et al.*, 1993).

4.5. Microscopie électronique à transmission

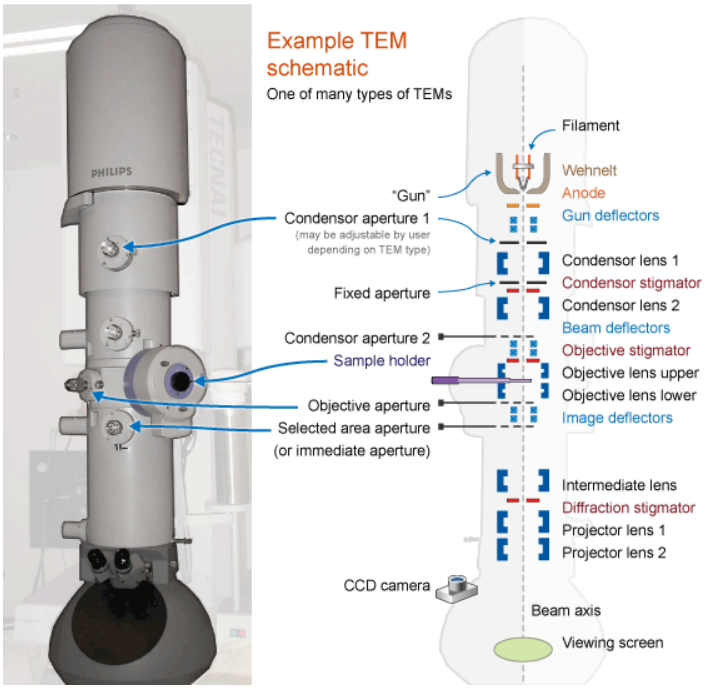


Figure 32 : Schéma d'un microscope électronique à transmission (https://myscope.training/legacy/tem/introduction/).

Le principe de la microscopie électronique à transmission (TEM) est le suivant : un flux d'électrons est envoyé à travers une colonne dans laquelle se trouvent des bobines formant des champs magnétiques qui contrôlent le faisceau d'électrons jusqu'à l'échantillon (Figure 32). L'échantillon est placé dans une chambre sous vide quel que soit son mode de préparation et les faisceaux d'électron rétrodiffusés sont détectés. Ils vont permettre de reconstruire une image avec des contrastes différents en fonction de la densité électronique de l'échantillon : les zones chargées en électrons apparaîtront plus foncées sur

l'image. Les atomes lourds, souvent présents dans les échantillons inorganiques sont donc facilement observables car leur grand nombre d'électrons permet d'obtenir un contraste intense avec le milieu.

La microscopie électronique est une méthode adaptée pour observer directement les objets de la taille du nanomètre avec une résolution de 0,4 à 20 nm. Il est possible, par exemple, d'étudier la dynamique d'objets biologiques et de leurs processus, de déterminer la structure 3D d'objet biologique ou inorganique (2D et 3D) (Nayeem *et al.*, 2010) ou encore d'étudier des interactions virus-cellules (Roingeard, 2008). Les techniques de microscopie électronique sont utilisées aussi bien sur des échantillons biologiques que sur des échantillons inorganiques en science des matériaux (Kang and Ceder, 2009). Cette technique a été très tôt utilisée sur des échantillons de liposomes (Szoka, 1980). Elle permet d'observer la forme des liposomes et le nombre de bicouches, de mesurer la taille et la polydispersité de l'échantillon. La Figure 33 montre différentes images de liposomes enregistrés par cryo-Microscopie Electronique à transmission (cryo-TEM).

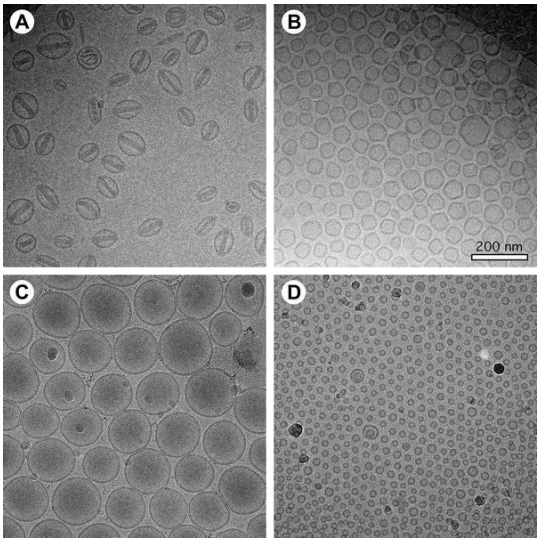


Figure 33 : Images de liposomes enregistrés par cryo-TEM : (a) Doxil®, liposomes chargés de doxorubicin (b) liposomes de DPPC en phase gel à température ambiante (c) et (d) liposomes mono-dispersés (Baxa, 2018).

Il existe différentes méthodes de préparations d'échantillons dans le but de les garder intacts lors de leur mise sous vide. La méthode utilisée conventionnellement est une méthode chimique consistant à mélanger l'échantillon avec du glutaraldéhyde puis du tétroxyde d'osmium avant l'étape de déshydratation et d'imprégnation dans une résine choisie en fonction de l'échantillon et de l'information recherchée. Une mince lame de l'échantillon est ensuite découpée. Il est possible d'augmenter le contraste de l'échantillon par coloration négative en ajoutant une solution contenant des atomes lourds (par exemple : molybdate d'ammonium (Olson, Hunt, Szoka, Vail, & Papahadjopoulos, 1979; Papahadjopoulos & Miller, 1967), phosphotungstate de sodium (Batzri and Korn, 1973), acétate d'uranyle, silicotungstate d'ammonium, tungstate de méthylamine, acétate d'uranyle (1-2% w/v)). Cette méthode permet d'observer des liposomes de 25 à 500 nm (Batzri and Korn, 1973; Olson *et al.*, 1979) et a l'avantage de ne pas dégrader les phospholipides (Batzri and Korn, 1973). Il y a cependant un risque

de distorsion des liposomes à cause des étapes de séchage sous vide (Ruozi *et al.*, 2011). Une autre méthode est la cryo-fracture qui consiste à congeler l'échantillon dans l'azote liquide après un traitement à l'aide d'un cryoprotecteur (le glycérol par exemple). L'échantillon est ensuite coupé à l'aide d'un microtome (permettant de couper des tranches d'échantillons d' de l'ordre du µm). La tranche d'échantillon est alors recouverte de platine et de carbone. La réplique métallique est cryodécapée, *i.e.* nettoyée avec un agent chimique (par exemple l'acide chromique ou l'hypochlorite de sodium) (Severs, 2007). Une troisième méthode consiste en la congélation ultrarapide de l'échantillon à l'éthane liquide. Le but est d'obtenir de l'eau sous forme de glace amorphe. L'eau sous forme cubique absorbe les faisceaux d'électron ce qui noircit l'image observée et rend donc impossible l'observation par microscopie électronique. Pour cela l'échantillon doit être congelé rapidement et rester à une température inférieure à -120 °C, température de vitrification de l'eau. L'échantillon est donc refroidi à l'éthane liquide (-183 °C).

4.6. Chromatographie Liquide

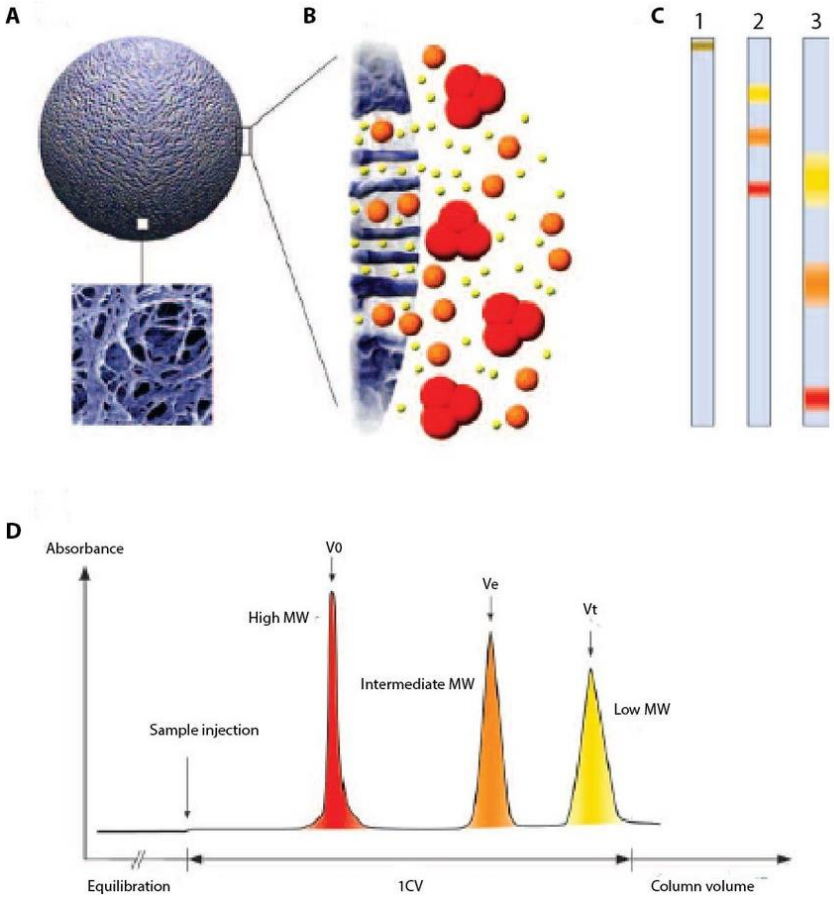


Figure 34 : Fonctionnement de la chromatographie d'exclusion stérique (Abidin, 2016). *A. billes servant à remplir les colonnes. B. pores présentes sur les billes servant à séparer les molécules en fonction de leur taille. C. 1 injection 2 et 3 élutions des molécules : PM_{rouge}>PM_{orange}>PM_{jaune}. D. profil d'élution des trois composés.*

Le principe de la chromatographie liquide est de séparer des molécules en fonction de leur mobilité dans une colonne de résine. Il existe une catégorie de chromatographie appelée Chromatographie d'exclusion stérique (SEC) : la résine utilisée pour remplir la colonne possède des pores (Grabielle-Madelmont, Lesieur and Ollivon, 2003). La séparation des particules se fait alors en fonction de leur taille et leur capacité à entrer dans les pores de la résine (Figure 34). Ainsi une petite particule passera par tous les pores de la colonne et éluera plus lentement qu'une grosse particule qui n'aura pas accès aux pores et suivra un chemin plus linéaire. En se servant de cette méthode pour séparer les objets présents dans un échantillon de liposomes il est possible de différencier les PA relargués (qui élueront lentement) et les liposomes (qui élueront rapidement). Cette technique peut donc être utilisée pour déterminer le rendement d'encapsulation ou suivre le relargage d'un PA (Xuan, Zhang and Ahmad, 2006).

4.7. Centrifugation analytique ou ultracentrifugation

Le principe de cette méthode est de placer un échantillon dans un tube et de le centrifuger dans le but de séparer les composés de l'échantillon en fonction de leur masse. Ainsi les composés les plus lourds se retrouveront au fond du tube centrifugé alors que les particules les plus légères se retrouveront proches de la surface. Il est ensuite possible de séparer les fractions, les identifier et les quantifier. Cette technique est utilisée pour déterminer le rendement d'encapsulation et suivre des cinétiques de relargage de PA.

L'équipe de Gilliland utilise cette technique pour déterminer le ratio de PA libre et encapsulé ainsi que pour déterminer la taille et la distribution en taille des particules de ses échantillons (Mehn *et al.*, 2017). L'équipe de Piel, sépare aussi le PA encapsulé et libre par ultracentrifugation cependant il montre que le PA peut fuir de sa capsule à cause de l'ultracentrifugation (Gillet *et al.*, 2011).

4.8. Cytométrie de flux

Le principe de cette technique est de faire passer les particules les unes après les autres devant des faisceaux laser et de mesurer l'intensité faisceau réfracté. La cytométrie de flux permet d'obtenir des informations sur la taille et la forme de particules (Vorauer-Uhl *et al.*, 2000). Contrairement aux analyses par DLS où l'échantillon est statique, l'échantillon est en mouvement et circule en continu devant le faisceau laser. Différents lasers sont utilisés en fonction de l'information recherchée : la lumière diffusée aux petits angles est utilisée pour obtenir des informations sur la taille des particules, la lumière diffusée à 90° pour obtenir des informations sur la forme et la granulométrie des particules, des signaux de fluorescence pour obtenir des informations de quantification. L'équipe de Yomo utilise la cytométrie de flux pour mettre en évidence des variations de lamellarité et de distribution de lamellarité entre différentes méthodes de préparation de liposomes et différentes formulations (Nishimura *et al.*, 2009). Par exemple la formation des liposomes par simple hydratation semble favoriser la formation de LUV, tandis que si l'échantillon est vortexé une dizaine de secondes après la formation des liposomes, il est

possible d'obtenir des liposomes multi-lamellaire. L'équipe de Katinger a mis en place une méthodologie permettant de mesurer la taille et la polydispersité des liposomes par cytométrie de flux (Vorauer-Uhl *et al.*, 2000). Un des inconvénients de cette technique repose sur le coût d'investissement du matériel, par rapport aux appareils plus commun tels que la DLS. Cependant il devient de plus en plus commun dans les laboratoires de recherche.

4.9. Diffusion des rayons X aux petits angles

La méthode de diffusion des rayons X aux petits angles (« Small Angle X-ray Scattering », SAXS) consiste à mesurer la diffusion des rayons X sur un échantillon en fonction de l'angle de diffusion (entre 0,1 et 5 degrés). La diffusion sera différente en fonction de la densité électronique rencontrée par le rayon diffusé. Il est possible d'obtenir des informations de distribution de la taille des particules, sur la forme, la structure des particules, l'agrégation, l'épaisseur des bicouches des vésicules et leurs nombres de bicouche (lamellarité) (Jousma *et al.*, 1987; Talsma *et al.*, 1987; Varga *et al.*, 2012).

4.10. Résumé des méthodes

Méthode	**Informations**	**Avantages**	**Inconvénients**
DLS	Taille des particules, distributions	Coût des analyses	Résultat facilement faussé si présence de grosses particules/bulles dans l'échantillon
Potentiel Zêta	Stabilité des formulations	Coût des analyses	La préparation des échantillons peut être technique
Dialyse	Rendement d'encapsulation Suivi de cinétique de relargage	Coût et disponibilité des appareils	Le suivi de cinétique n'est pas *in-situ*
RMN	Forme des vésicules Lamellarité Suivi de cinétique	Analyses *in-situ*	Coût des appareils
Cryo-TEM	Taille des particules, distribution Forme des particules Lamellarité	Méthode fiable	Coût des analyses Préparation des échantillons longue et complexe
HPLC	Rendement d'encapsulation Suivi de cinétiques de relargage	Méthode utilisable en routine	Temps d'analyses
Ultracentrifugation	Rendement d'encapsulation Suivi de cinétiques de relargage Taille des particules	Préparation des échantillons simples Informations sur la taille des particules et le rendement d'encapsulation en une seule mesure	L'échantillon doit être prélevé pour quantifier le relargage, l'analyse n'est donc pas faite *in-situ* Risque de fuite du PA pendant l'analyse
Cytométrie de flux	Taille des particules, distribution Forme des particules Lamellarité	Quantitatif	Coût de l'appareil
SAXS	Distribution de taille Lamellarité Epaisseur des bicouches	Résultats précises	Coût des analyses et disponibilité des appareils

Chapitre 5 : Objectifs et stratégie de cette thèse

Le premier objectif de cette thèse est de comprendre comment augmenter l'efficacité de PA (ici des peptides issues de la série apeline) encapsulés dans des liposomes en contrôlant leur relargage après une administration sous cutanée. Ces informations pourront ensuite être utilisées pour optimiser des liposomes en jouant à la fois sur la composition des liposomes et sur la structure des peptides. Les paramètres qui peuvent potentiellement être améliorés sont les interactions peptide - liposome, l'efficacité d'encapsulation et la cinétique de relargage. Le second objectif est d'évaluer l'intérêt de la spectroscopie par RMN pour caractériser les peptides, les liposomes et leurs comportements lors de la cinétique de relargage. Il existe un certain nombre d'études sur la caractérisation des liposomes par RMN : par exemple l'étude des bicouches par RMN ^{31}P (Cullis, De Kruyff and Richards, 1976), l'étude de la dégradation des liposomes par RMN ^{1}H (Foradada *et al.*, 2000) ou même l'étude de cinétique de relargage par mesure de diffusion (Wan, Angleson and Kutateladze, 2002) ou à l'aide d'un agent paramagnétique (Ivanov *et al.*, 1985). Cependant ces études concernent des molécules de bas PM. Il n'y a pas, à ma connaissance, d'étude réalisée par RMN avec des molécules à PM plus élevée telles que les peptides, que ce soit pour la caractérisation des molécules encapsulées dans les liposomes ou leur relargage. Les dernières avancées techniques réalisées sur les spectromètres RMN, telles que l'utilisation de cryo-sonde, et les nouvelles séquences d'impulsions ou l'utilisation d'agents

paramagnétiques permettent d'augmenter la sensibilité des appareils et devraient permettre de caractériser les PA encapsulés dans les liposomes en observant des différences entre PA encapsulé et libre non détectés précédemment.

L'utilité de cette démarche est de comprendre les mécanismes de relargage de peptides encapsulés dans des liposomes et mettre en évidence les paramètres qui influencent ce relargage.

La stratégie employée pour mener à bien ce projet a été dans un premier temps de caractériser la structure des liposomes et des peptides ainsi que leurs interactions par RMN ^{1}H, ^{31}P et par cryo-TEM. Ensuite la question s'est posée de différencier le compartiment intérieur et extérieur des liposomes par RMN pour pouvoir dans un deuxième temps suivre les cinétiques de relargage. Pour cela des méthodes de diffusion par RMN ont été utilisées, en s'appuyant sur la taille apparente des molécules. Les cinétiques de relargage ont également été quantifiées par intégration spectrale de spectres RMN ^{1}H. Afin de comprendre les mécanismes du relargage des peptides, différents peptides ont été analysés. Ils possèdent la même chaîne d'acides aminés mais certains ont une chaîne lipidique accrochée en position N-terminal. Et plusieurs méthodes de préparation des liposomes ont été comparées : la sonication et l'extrusion.

Pour ce projet, je me suis chargée de la synthèse des différents peptides, du greffage des chaînes lipidiques ainsi que des échanges des contres ions des peptides. Je me suis occupée de la préparation des liposomes et de l'encapsulation des PA par sonication et de la mise en place de l'extrusion au laboratoire. J'ai réalisé les analyses d'osmolarité, DLS, HPLC, RMN ainsi que l'interprétation de toutes les données présentées ici. Ces étapes ont été réalisées dans 5 laboratoires différents.

Partie II : Matériels et méthodes

Chapitre 1 : Protocoles de synthèses

1.1 Synthèse des peptides

1.1.1 Synthèse sur phase solide

a) Mécanisme

Les synthèses des peptides ont été réalisées sur les conseils du Dr. Ronan Larget, Alexandre Raux et Géraldine Manette (Sanofi – Chilly-Mazarin). Le protocole de synthèse de peptide utilisé dans cette étude est inspiré de la publication de Merrifield de 1963 (Merrifield, 1963) qui utilise des groupements protecteurs Boc. La synthèse est réalisée sur phase solide avec une résine chloro-trityle (CTC) et les groupements protecteurs sont des Fmoc. Cette résine est constituée d'un support polymérique fonctionnalisé avec du chlorure de 2-chloro-trityle (CTC) (Figure 35) via une liaison covalente. Le chlorure sert à fixer le premier acide aminé de la chaîne peptidique par substitution nucléophile (Figure 36). La résine est vendue avec une charge de 1,6 $mmol.g^{-1}$, c'est-à-dire qu'il serait possible d'introduire 1,6 mmol d'acide aminé sur la résine si le rendement était de 100 %. Typiquement, 0,5 mmol de résine sont utilisés pour la synthèse d'un peptide.

La synthèse est réalisée par ajouts successifs des acides aminés de la chaîne peptidique en commençant par l'acide aminé en position C-terminale vers l'acide aminé en position N-terminale, soit dans le cas du peptide K14P (KFRRQRPRLSHKGP) : de la proline Pro_{14} vers la lysine Lys_1.

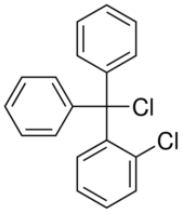


Figure 35 : Structure du chlorure de 2-chloro-trityle (CTC).

La première étape de la synthèse est d'introduire le premier acide aminé sur la résine CTC grâce à une réaction de substitution nucléophile. Dans le cas de K14P, cet acide aminé est la proline dont la fonction amine est protégée par un groupement Fmoc. Le premier acide aminé n'est jamais chargé à 100 % à cause d'effets stériques de la structure de la résine, tous les chlorures n'étant pas disponibles pour réagir. Lorsque la proline est utilisée comme premier acide aminé, une charge d'environ 0,16 $mmol.g^{-1}$ est obtenue, soit environ 10 %. En général, pour les autres acides aminés elle est comprise entre 0,4 et 0,6 $mmol.g^{-1}$.

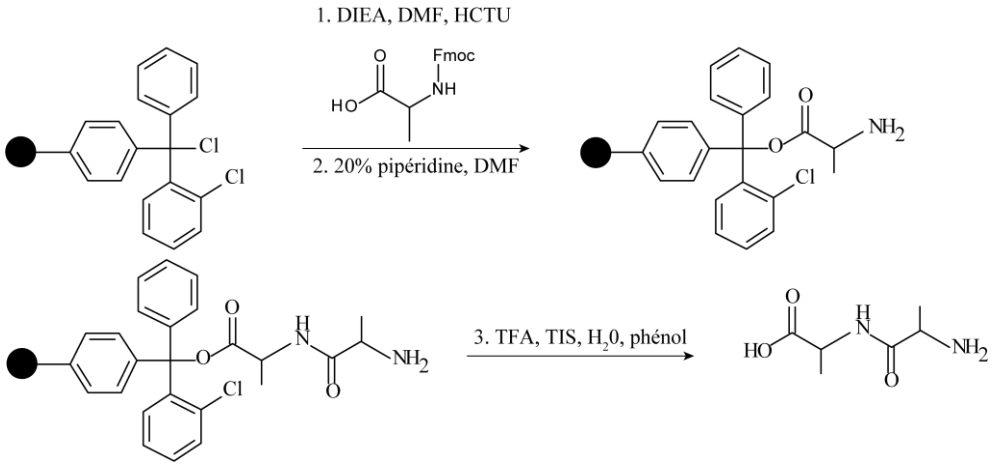


Figure 36 : Synthèse peptidique sur phase solide. L'étape 1 permet d'ajouter un acide aminé, l'étape 2 permet de déprotéger le N terminal. Ces deux opérations sont répétées plusieurs fois pour accrocher tous les acides aminés nécessaires. L'étape 3 permet ensuite de décrocher la chaîne de la phase solide.

Ensuite, les acides aminés suivants sont ajoutés un à un. Les acides aminés (1,5 mmol) utilisés sont protégés en N-terminal par un groupement Fmoc qu'il est nécessaire de cliver avant de rajouter l'acide aminé suivant. Le clivage du Fmoc se fait par un mélange de 20 % de pipéridine dans du N,N-diméthylformamide (DMF). Cette réaction libère du fulvène que l'on peut doser par spectrométrie UV/Visible pour déterminer la charge de la résine. Les chaînes des acides aminés sont protégées par différents groupements chimiques (Boc, ^{t}Bu…) pour limiter les réactions secondaires pendant la synthèse puis seront déprotégées à la fin de la synthèse.

Pour ajouter un nouvel acide aminé à la chaîne peptidique sur résine et ainsi créer une nouvelle liaison peptidique, un agent de couplage est utilisé en présence d'une base dans le DMF. L'agent de couplage utilisé est le O-(6-chlorobenzotriazol-1-yl)-N,N,N′,N′-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HCTU) (1,5 mmol) en présence de *N*,*N*-diisopropyléthylamine (DIEA, 8 mL 2M, soit un excès de 5 équivalent). L'agent de couplage permet d'activer la fonction acide de l'acide aminé qui va réagir avec l'amine de l'acide aminé N-1 pour former une liaison amide. Un schéma des réactions successives est donné dans la Figure 22 et la Figure 36. Pour améliorer les rendements, certains acides aminés peuvent subir un double couplage après lavage de la résine dans du DMF.
Cette synthèse est réalisée de façon automatique à l'aide d'un synthétiseur de peptides (Tribute UV-IR de la marque Protein Technology Inc, Figure 37).

Figure 37 : Synthétiseur de peptides Tribute UV-IR.

Le peptide est décroché de la résine à l'aide d'un cocktail de clivage. Ce cocktail permet aussi de cliver les groupements protecteurs des chaînes latérales des acides aminés. Il est composé d'un mélange d'acide trifluoroacétique (TFA), d'eau, de phénol et de Tri-isopropylsilane (TIS), utilisé dans une proportion 88/5/5/2 v/v. Le mélange est laissé sous agitation pendant 4 à 5 h. Le TFA permet de couper la liaison entre le peptide et la résine et de cliver les groupements protecteurs des chaînes latérales des acides aminés. Le TIS et le phénol permettent de piéger les carbocations formés. Une fois la résine filtrée, la solution contenant le peptide clivé et déprotégé est concentrée sous pression réduite puis le peptide est précipité à l'aide d'éther froid. Ce précipité est lavé plusieurs fois à l'éther froid avec centrifugation et élimination du surnageant entre chaque lavage. Finalement le solide est séché sous vide avant d'être purifié.

b) Ajout des chaînes lipidiques

Il est possible d'ajouter une chaîne lipidique en N-terminal de la chaîne peptidique. Cette réaction est réalisée avec le peptide toujours greffé à la résine via une réaction d'acylation entre le dérivé lipidique et l'amine N-terminale du peptide dont le Fmoc a été clivé selon le protocole décrit précédemment. Un protocole général est présenté dans la suite : la résine (2 grammes) portant le peptide d'intérêt est gonflée (« swellée ») dans 3 x 15 mL de dichlorométhane. Le dichlorométhane est filtré puis une solution contenant le chlorure d'acide de l'acide lipidique (2 équivalents par rapport à la quantité de peptide

présent sur la résine), 3,5 équivalents de DIEA dans 10 mL de dichlorométhane est ajoutée sur la résine. La suspension est agitée pendant au moins une heure. La résine est filtrée puis lavée plusieurs fois au dichlorométhane. Un clivage est réalisé sur une petite quantité de résine pour vérifier, par analyse LC/UV/MS, que la réaction est terminée. Si la réaction est terminée, la totalité de la résine est clivée suivant le protocole décrit précédemment. Le brut ainsi obtenu est alors purifié par HPLC comme décrit ci-dessous. Il est finalement possible de déprotéger tous les groupements Fmoc du peptide à l'aide d'une solution de DMF contenant 20 % de pipéridine.

1.1.2 Purification du peptide

Une fois le brut issu du clivage de la résine séché, il est purifié pour éliminer les impuretés et notamment les chaînes d'acides aminés tronquées. Cette purification est réalisée par chromatographie HPLC par Vincent Gervat (Sanofi – Chilly-Mazarin). Le protocole utilisé dans ce projet est le suivant : le brut est solubilisé dans un volume minimal d'un mélange acétonitrile/eau (proportion variable en fonction de la solubilité du brut), filtré sur membrane PTFE 0,45µM et injecté sur colonne. Le nombre d'injection sur la colonne sera fonction du volume de brut à injecter. La chromatographie a été réalisée sur un appareil Gilson GX271 avec une colonne CSH C18 de marque Waters (dimension 50 x 250 mm et granulométrie 5 µm). Les solvants d'élution sont : eau (A) et acétonitrile (B), tous les deux additionnés de 0,1 % de TFA. Le débit de solvant est de 150 $ml.min^{-1}$ et la colonne est à température ambiante.
Le gradient est adapté à chaque peptide en fonction de son temps de rétention (t_R) mesuré sur une HPLC analytique. Le gradient de base utilisé démarre avec un pourcentage (X - 10) % d'acétonitrile déterminé par une analyse HPLC analytique. Pour ce projet, les valeurs de X sont de l'ordre de 10 - 20 % pour les peptides linéaires (K14P) et de 30 - 40% pour les peptides lipidés (C16-K14P, C11-K14P et C11F-K14P) (Tableau 2). Pour les séparations les plus difficiles, un palier isocratique de 15 min correspondant à X % d'acétonitrile est intercalé à un t_R de 15 min. Le peptide est alors élué autour de t_R = 35 - 40 min.

Temps (min)	**%A**	**%B**	
0	110 - X %	X - 10 %	
5	110 - X %	X - 10 %	Elution du peptide, Typiquement t_R = 20 – 25 min
25	90 - X %	X + 10 %	
30	5%	95%	Elution des impuretés les plus hydrophobes
35	5%	95%	
36	110 - X %	X - 10 %	Reconditionnement de la colonne
40	110 - X %	X - 10 %	

Tableau 2 : Protocole d'élution des peptides.

Les fractions de collecte en tête et queue de pics sont analysées par LC-MS pour vérifier la pureté des pics, et s'assurer de la séquence du peptide. Les fractions contenant le peptide avec la meilleure pureté sont alors réunies, l'acétonitrile est évaporé et le reste de la solution est lyophilisée.

1.1.3 Echange de sel du peptide : TFA vers acétate

Les conditions de purification des peptides conduisent à des dérivés sous forme de sels de TFA. Cependant pour les études *in vivo* et cliniques, le contre-ion acétate est préféré. En effet, des études ont mis en évidence l'impact du TFA dans des études *in vivo* : diminution de la production de cellules et la synthèse de protéines (Cornish *et al.*, 1999), effet immunogène (Boullerne *et al.*, 2014), activation des voies de signalisation comme le canal d'ion potassium (Han, Kim and Kim, 2001).

L'échange d'ions se fait grâce à une résine « Dowex hydroxide » que l'on charge en ion acétate. Le protocole utilisé est le suivant : la résine Dowex hydroxyde (Résine BT AG 1-X4 resin biotechnology grad, 100-200 mesh, hydroxide form, Bio-Rad 143-1345 MFG) (4,5 g pour 150 mg de peptide) est traitée 3 x 20 minutes par 50ml d'acide acétique 1,6 M puis 3 x 10 minutes par 50 mL d'acide acétique 0,16 M. La résine est filtrée et le peptide solubilisé dans 40 mL d'eau de qualité analytique y est ajouté. La suspension est agitée pendant 1 h. La résine est filtrée puis lavée par 2 x 20 mL d'eau. Les filtrats sont réunis puis lyophilisés pour donner le peptide sous forme de sel d'acétate. L'élimination du TFA et l'échange vers l'acétate sont vérifiés par chromatographie ionique. Le principe de cette méthode consiste à séparer, sur une colonne de résine échangeuse d'ions, les composés chargés en fonction de leur taille et de leur quantité de charges. Les ions TFA et acétate ont le même nombre de charge, ils sont donc séparés selon leur taille. Pour éluer les différents composés il faut réaliser un gradient de force ionique.

1.2. Synthèse des molécules paramagnétiques

La préparation des complexes paramagnétiques a été réalisée en suivant les conseils du Dr Philippe Durand (ICSN – Gif-sur-Yvette). Le principe est de préparer deux solutions équimolaires de ligand (((1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrayl)tetrakis(methylene))tetrakis(acide phosphorique), DOTP, $C_{12}H_{32}N_4O_{12}P_4$, CheMatech, typiquement 50 mg dans 5 mL) (Figure 38) et d'un sel de chlorure du cation paramagnétique (Tm^{3+}, Dy^{3+}, ou Tb^{3+}) dans de l'eau et d'ajouter par fraction la solution contenant l'élément paramagnétique dans la solution contenant le ligand. Le lanthanide est complexé par les groupements phosphates déprotonés. Il ne faut pas qu'il reste de lanthanide libre pour utiliser le complexe par RMN, car cet élément perturbe le signal des protons de l'échantillon dont ceux de l'eau et empêche de « locker » les échantillons. Alors qu'un excès de DOTP, par rapport à l'élément paramagnétique, aura peu d'impact sur les spectres. Il est donc préférable d'avoir un excès de DOTP par rapport à l'élément paramagnétique libre.

Pour vérifier si la réaction a bien eu lieu plusieurs méthodes existent. Le suivi du pH de la solution : au cours de la complexation des ions H^+ sont libérés entrainant une diminution du pH du milieu réactionnel. Le pH devient stable quand tout le complexe est formé. Si le pH descend en dessous de 3 les groupements phosphates se reprotonent, le lanthanide perd ses interactions avec le DOTP ce qui empêche la formation du complexe et casse les complexes formés jusqu'ici. Si le pH monte au-dessus

de 9-10, il se forme l'hydrate du lanthanide ($Ln(OH)_3$) qui précipite : il ne peut donc plus se complexer. Il faut donc ajuster le pH au cours de la réaction. Il est aussi possible de suivre la réaction avec un test colorimétrique qui permet de détecter les lanthanides non complexés grâce au xylénol. Le principe de ce dosage consiste à mélanger 5 µL de la solution à analyser avec 1 mL d'une solution tampon (0,5 M d'hexamethylenetetramine, pH ajusté à 6,1 avec une solution de HNO_3) et deux gouttes de solution de xylénol (quelques grains de xylénol dissous dans 1 mL d'eau, solution jaune/orange). Si la solution contient des lanthanides libres, la solution devient violette, sinon elle reste jaune-orange pâle.

Les sels de chlorure contenant l'élément paramagnétique sont hygroscopiques. Les flacons utilisés étaient anciens et leur pourcentage d'hydratation n'était pas connu. Pour cela la réaction a été réalisé plusieurs fois en ajoutant progressivement l'élément paramagnétique jusqu'à trouver la quantité de sel permettant de complexer le DOTP sans obtenir de lanthanide en excès. Ceci explique que les quantités utilisés ci-dessous ne sont pas équimolaire.

Le protocole utilisé est le suivant : une solution de 500 µL de DOTP à 166 mM dans du tampon (HEPES 80 mM NaCl 100 mM à pH 7,4) est mélangée à 50 µL d'une solution 2 M de lanthanide dans le même tampon. Le mélange est ensuite laissé tout un weekend dans une étuve à 70°C. Avec ces quantités pour laisser le temps au lanthanide de se positionner au centre du cycle et obtenir la conformation finale du complexe, il ne reste pas de lanthanide non complexé dans le mélange réactionnel.

La concentration finale en complexe paramagnétique est estimée en comparant l'intégrale des signaux RMN de DOTP non complexé restant après la réaction avec un échantillon de DOTP de concentration connue.

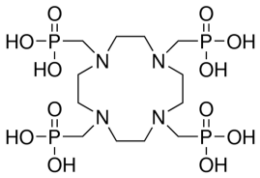


Figure 38 : Structure de l'acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétrayltétrakis-(méthylphosphonique) (DOTP).

Chapitre 2 : Préparation des liposomes et encapsulation de peptide

La préparation des liposomes et l'encapsulation des peptides ont aussi bien été réalisées chez Sanofi à Vitry-sur-Seine dans le département « Early Development » qu'au sein de l'ICSN à Gif-sur-Yvette.

Pour cette étude, une formulation de liposomes composée de DPPC, 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (DMPG) et cholestérol (CHOL) a été sélectionnée. Le mélange de lipides a déjà été utilisé dans des formulations pour injections sous-cutanées (Powell and Chow, 2008; Ohyanagi *et al.*, 2011). Les proportions utilisées sont présentées Tableau 3 et ont été inspirées par la publication de J. Samuel (Lutsiak, Kwon and Samuel, 2002). Cette formulation a été choisie car elle est censée pouvoir relarguer sa charge une fois injectée sous la peau du patient. C'est une formulation déjà utilisée pour l'administration de PA peu solubles lors d'études *in vivo*. Le DMPG est utilisé comme stabilisant

et apporte une charge négative au liposome. L'intérêt du cholestérol est ici d'augmenter la rigidité de la membrane.

	DPPC (16:0 PC)	**DMPG (14:0 PG)**	**CHOL**
En % moles	74,6	5,2	20,2
En % de masse	82,8	5,4	11,8

Tableau 3 : Composition des liposomes.

2.1. Méthode de préparation des liposomes

Une solution de lipides contenant du DMPG, du DPPC et du cholestérol a été préparée dans un mélange 50/50 v/v de dichlorométhane et éthanol. 1 mL de cette solution est prélevé dans un pilulier et séché, d'abord dans un bain d'eau à 55 °C sous flux d'azote puis sous vide. Un film de lipides est alors formé dans le pilulier. Ce film est ensuite hydraté par une solution de tampon (HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4). Il existe plusieurs méthodes pour former des SUV. La sonication et l'extrusion ont été utilisées et vont être développées ci-dessous.

2.1.1 La sonication

Dans la méthode par sonication, une fois le film hydraté par une solution aqueuse, une sonde à ultrason est placée dans le pilulier et actionnée pendant 2 fois 2 minutes à une amplitude de 7 µm en continue. La taille et la polydispersité des particules sont vérifiées par DLS.

La sonde utilisée est une Soniprep 150 Ultrasonic Desintegrator® (Figure 39). La réduction de taille des particules est visible à l'œil nu : en effet, l'échantillon change et devient moins turbide. Cet effet peut être contrôlé en adaptant différents paramètres comme la puissance des ultrasons et la durée du traitement.

Figure 39 : Appareil de sonication - Soniprep 150.

2.1.2 L'extrusion

Dans la méthode par extrusion, la solution contenant le film hydraté par le tampon (HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4) est placée dans une seringue reliée à une seconde seringue et séparées par une membrane en polycarbonate avec des pores. Il est possible d'utiliser des membranes de porosité variant de 30 à 1 000 nm et pour ce projet j'ai utilisé des membranes de porosité 100 nm. Le montage doit être chauffé à une température supérieure à la T_m des phospholipides pour que les bicouches lipidiques soient

en phase fluide. J'ai donc chauffé le montage à 55 °C, à l'aide d'une plaque chauffante, car la température maximale théorique de transition des lipides était ici de 41 °C pour le DPPC. L'appareil utilisé est le Mini-Extruder d'Avanti Polar Lipids Inc (Figure 8). Quinze allers-retours de la solution à travers la membrane permettent d'obtenir des liposomes de la taille désirée (100 nm) avec une polydispersité satisfaisante (PdI = 0,2).

2.1.3 Détermination du nombre de phospholipides par vésicule

Il est possible d'estimer le nombre de phospholipides (Nb) à partir de l'Équation 4 connaissant la surface du liposome (Équation 5).

$$Nb = \frac{S + 4\pi\left(d/2 - e\right)^2}{A}$$

Équation 4, avec S la surface d'une vésicule, d le diamètre des liposomes, e l'épaisseur de la bicouche et A l'air de la tête polaire des phospholipides (estimée à 40 Å),

$$S = 4\pi\left(d/2\right)^2$$

Équation 5, avec d le diamètre des liposomes.

Le diamètre des liposomes, d, est mesuré par DLS. L'aire de la tête polaire des phospholipides, A, est estimée à 40 Å (Brouillette *et al.*, 1982). L'épaisseur de la bicouche, e, peut être mesurée par SAXS ou cryo-TEM (Tahara and Fujiyoshi, 1994). Elle dépend de la composition des vésicules en phospholipides (Uhríková *et al.*, 2000) et en cholestérol (Johnson, 1973; Gallová *et al.*, 2004), et de la température. Pour les calculs, elle a été fixée à 4 nm (Tahara and Fujiyoshi, 1994). Ainsi pour la formulation étudiée, le nombre de lipides par vésicules est estimé à 142 000. Connaissant la masse molaire moyenne des lipides composant ces liposomes, au prorata de leur pourcentage en mole, la masse molaire d'un liposome est estimée à 94 x 10^6 g.mol^{-1}.

2.2. L'encapsulation de peptides

L'ajout des peptides dans la formulation se fait à l'étape d'hydratation du film lipidique. Une quantité de peptide est dissoute dans le tampon (HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4). La solution obtenue est ensuite mélangée au film de lipides. Les quantités de peptide utilisées sont adaptées pour obtenir une solution de 10 mg.mL^{-1} de peptide.

2.2.1 Séparation des peptides libres et des liposomes chargés

Une fois le film de phospholipides hydraté et les liposomes formés par sonication ou extrusion, il faut séparer les liposomes chargés des peptides qui n'ont pas été encapsulés. Pour cela un tube à centrifuger (Amicon®) muni d'un filtre en cellulose avec un seuil de coupure de 100 000 Da est utilisé pour séparer les objets en fonction de leur taille. La suspension est dilluée dans du tampon et centrifugée à 5 000 rpm

pour reconcentrer la solution. Cette étape est réalisée 5 fois. Les liposomes chargés vont rester au-dessus de la membrane alors que les peptides non encapsulés vont traverser la membrane et se retrouver dans le compartiment inférieur de l'Amicon®. L'échantillon est lavé par cette méthode plusieurs fois pour retirer un maximum de peptides libres. Les filtrats sont conservés pour mesurer la quantité de peptide libre et déterminer le rendement d'encapsulation.

2.2.2 Quantification des peptides encapsulés

Une fois les lavages terminés, un bilan de matière est effectué pour déterminer la quantité de peptides encapsulés et le rendement d'encapsulation. Les concentrations en peptide dans les différents filtrats et dans le rétentat sont déterminées par HPLC. Pour le rétentat, 20 µL de la suspension liposomale sont mélangés avec 180 µL de méthanol pour détruire la structure des liposomes libérer le peptide, puis le mélange obtenu est dilué avec 600 µL ACN/H_2O 25%/75%. Les solutions obtenues sont injectées directement sans pré-traitement.

La méthode HPLC (HPLC water® 996 Photodiode Array Detector) utilisée est une méthode adaptée aux caractéristiques des peptides. La phase stationnaire est une colonne de WATERS Xselect® CSH C18 2,5 µm et la phase mobile est constituée de TFA à 0,05 % dans de l'eau déminéralisée (solvant A) et d'acétonitrile pur (solvant B). La température de la colonne est fixée à 60 °C et celle de l'échantillon à 20 °C. Le gradient d'élution utilisé est présenté dans le Tableau 4.

Temps (minutes)	**Débit (mL.min^{-1})**	**%A**	**%B**
0,00	0,6	90	10
3,00	0,6	30	70
4,00	0,6	30	70
4,01	0,6	90	10

Tableau 4 : Conditions expérimentales de la méthode HPLC pour la quantification de peptides.

Une fois que les masses des peptides contenues dans les différentes fractions sont obtenues, la somme est comparée à la masse théorique de peptide mise en jeu. Il est alors possible de déduire la quantité de peptide liée aux liposomes, approximée à la quantité de peptide encapsulé. Le rendement d'encapsulation est alors défini comme le ratio entre la quantité de peptides liée aux liposomes et la quantité totale de peptides mise en jeu.

Chapitre 3 : Méthodes d'analyses

3.1. Résonance Magnétique Nucléaire

Les analyses RMN ont principalement été réalisées à l'ICSN à Gif-sur-Yvette et certaines chez Sanofi à Vitry-sur-Seine pour les analyses ^{19}F et certaines analyses ^{31}P.

3.1.1 Acquisition des spectres ^{1}H

Diffèrent spectromètres équipés d'une cryo-sonde TCI (^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{2}H) ont été utilisés sur un spectromètre Bruker Avance III HD 950 MHz (22,3 T), un spectromètre Bruker Avance III HD 800 MHz (18,8 T), et un spectromètre Bruker Avance I 600 MHz (14,1 T). Un spectromètre Bruker Avance II 700 MHz (16,5 T) avec une sonde TXI ainsi qu'un spectromètre Bruker Avance III HD 600 MHz (14,1 T) avec une sonde TCI ont aussi été utilisés. Les données ont été transformées à l'aide du logiciel Top-Spin de Bruker.

a) Attribution des spectres des peptides

L'attribution des peptides a été réalisée à partir de spectres 1D ^{1}H (zgesgp), 2D TOCSY (dipsi2gpphpr) et 2D NOESY (noesygpphpr). Le spectre TOCSY a permis de relier les différents protons d'un même

résidu. Le spectre NOESY a permis d'assembler les résidus entre eux pour former la chaîne peptidique en observant les corrélations $H^{N}{}_{i}$-$H\alpha_{i-1}$ ainsi que d'observer de potentielles corrélations inter-résidu qui donnent des informations de structure sur le peptide. Le temps de mélange utilisé pour la TOCSY était de 40 ms et de 300 ms pour les acquisitions NOESY.

b) Diffusion Ordered Spectroscopy

L'expérience DOSY est une méthode RMN permettant d'identifier les molécules présentes dans un mélange grâce à leurs vitesses de diffusion. En effet, les molécules possédant une taille apparente plus élevée auront une vitesse de diffusion plus lente et donc un coefficient de diffusion plus petit qu'une molécule de petite taille apparente. Cela peut être modélisé grâce à l'équation de Stokes-Einstein (Équation 6) en faisant l'hypothèse que l'objet étudié est sphérique.

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

Équation 6, avec k_B la constante de Boltzman (1,3806503 x 10^{-23} J K^{-1}), T la température (K), η la viscosité dynamique du solvant (cP), R_h le rayon hydrodynamique (m), D le coefficient de diffusion (m s^{-1}) (Øgenda, 2016).

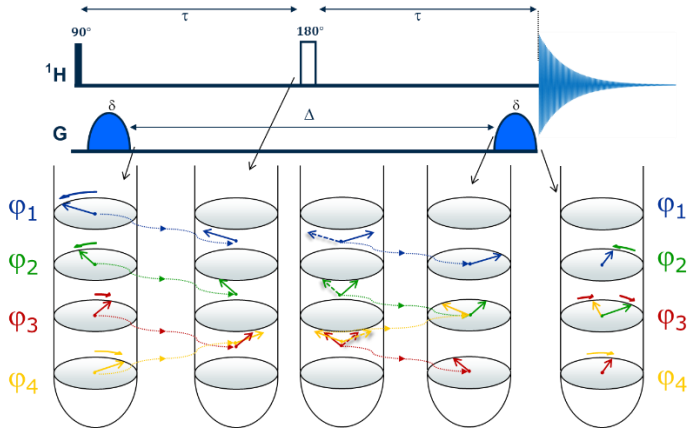


Figure 40 : Séquence DOSY et son effet sur les spins. L'acquisition démarre avec une impulsion 90° permettant de mettre les spins sur l'axe x. Un premier gradient est appliqué, il permet de défocaliser les spins. L'échantillon évolue et les molécules diffusent jusqu'à l'impulsion 180° permettant d'inverser les spins. Pendant le second délais τ les molécules continuent à diffuser jusqu'au dernier gradient permettant de refocaliser les spins avant l'acquisition.

L'expérience DOSY consiste à appliquer un gradient de champ magnétique, en intensité, sur la hauteur du tube (Figure 40). La vitesse de précession des spins, mis préalablement dans le plan transversal, est ainsi dépendante de leur position dans le tube. Les molécules de l'échantillon sont ensuite libres de diffuser pendant un délai fixé (Δ). Une impulsion de 180° pendant ce délai permet d'inverser les spins, puis en appliquant une deuxième fois le gradient, les spins sont refocalisés si la molécule n'a pas diffusé. Lorsque le délai Δ est suffisamment élevé (la valeur est à optimiser en fonction de l'échantillon) les molécules diffusent, entraînant une diminution de l'intensité de leurs signaux sur les spectres RMN (Figure 41). Plus le gradient est élevé, plus la défocalisation des spins est grande et plus la diminution

d'intensité, par rapport à un spectre sans gradient est importante. Ainsi les molécules qui diffusent rapidement pendant Δ (*i.e.* coefficient de diffusion grand) auront une décroissance d'intensité de signaux plus rapide que les molécules qui diffusent lentement (*i.e.* coefficient de diffusion petit) car moins de spins auront pu être refocalisés lors du second gradient (Figure 41).

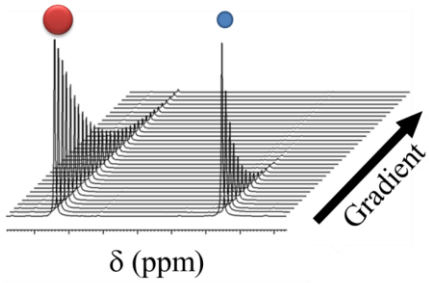


Figure 41 : Evolution des signaux avec l'augmentation de l'intensité du gradient, pour des molécules à haut PM et à bas PM. Les intensités initiales des deux composés sont identiques.

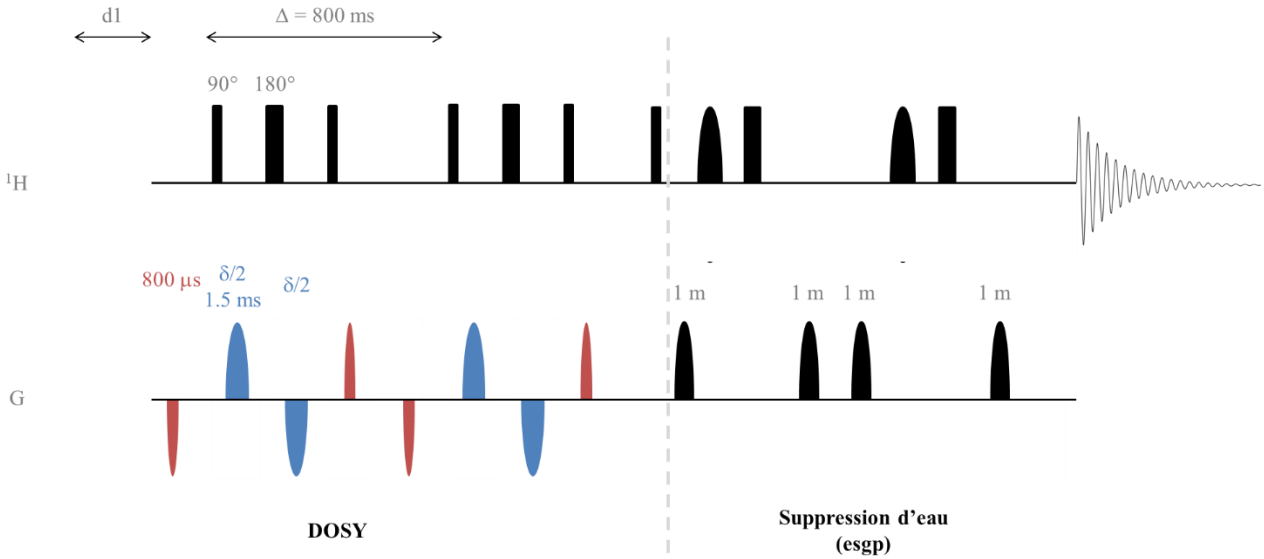


Figure 42 : Séquence d'impulsion de la séquence DOSY optimisée et utilisée dans ce projet.

Pour les échantillons de peptides encapsulés dans des liposomes, une séquence DOSY modifiée est utilisée. Elle contient la séquence DOSY de Bruker (ledbpgp2s) optimisée par l'ajout de gradients négatifs permettant de compenser les premiers gradients (Figure 42) et ainsi d'éviter de perdre le lock au cours de l'acquisition (Wu, Chen and Johnson, 1995). Des gradients de plus faibles intensités (800 µs) placés avant et après deux séries de gradients plus intenses (1,5 ms) servent, quant à eux, à limiter les effets de la convection (Figure 42). Une séquence de suppression d'eau (excitation sculpting, esgpph) est aussi ajoutée après le module DOSY pour supprimer le signal de l'eau. Plusieurs délais de la séquence sont à optimiser en fonction des échantillons analysés comme le délai de diffusion (Δ nommé par défaut p20 dans les séquences DOSY du logiciel Topspin de Bruker), le délai de recyclage (nommé d1 dans le logiciel Top Spin) permettant de laisser le système revenir à l'équilibre avant de lancer une nouvelle acquisition et la durée de l'impulsion du gradient (δ nommé p30 dans le logiciel Top Spin). Le

délai de diffusion est adapté à la vitesse de diffusion des molécules présentes dans l'échantillon. Ainsi lorsque la vitesse de diffusion est lente, le délai de diffusion doit être augmenté pour laisser suffisamment de temps aux molécules pour diffuser et donc pour que l'intensité des signaux RMN soit suffisamment atténuée pour pouvoir mesurer un coefficient de diffusion. Cependant il n'est pas possible d'utiliser un Δ grand dans tous les cas : il ne faut pas que la durée de la séquence soit supérieure au plus petit T_1 des molécules à étudier sinon son signal aura entièrement relaxé avant l'acquisition. L'augmentation de δ permet d'appliquer un gradient plus long, ce qui contribue aussi à la diminution plus rapide de l'intensité des signaux. Les valeurs des différents délais ont été optimisées et sont présentées dans les résultats.

Une série de spectre 1D est ainsi collectée en faisant varier l'intensité du gradient (en bleu sur la Figure 42) à chaque acquisition. La décroissance de l'intensité des signaux au cours des acquisitions est mesurée. Il est possible d'ajuster une courbe du type exponentielle pour suivre l'évolution de l'intensité des signaux et ainsi de déterminer le coefficient de diffusion :

$$f(g) = I_0 e^{-\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) \times D}$$

Équation 7, avec *g l'intensité du gradient (G.cm^{-1}) (en bleu sur la Figure 42), I_0 l'intensité initiale de l'exponentielle (U.A.), γ le rapport gyromagnétique de l'atome étudié, ici le proton (Hz.G^{-1}), δ la durée d'impulsion du gradient (s), Δ le délai de diffusion (s) et D le coefficient de diffusion (m^2.s^{-1}).*

L'analysée des spectres se fait ensuite en traitant les FID seulement selon l'axe direct. Une rectification de la ligne de base est appliquée. Ensuite il est possible d'utiliser le logiciel Dynamics Center de Bruker pour ajuster la décroissance des signaux avec l'équation ci-dessus et obtenir un ou plusieurs coefficients de diffusion. Les données peuvent être importées sous la forme d'un spectre pseudo 2D ou bien de spectres 1D. Cette deuxième option a été utilisée lorsque la ligne de base des spectres 1D était trop différente les unes des autres rendant impossible une correction commune.

3.1.2 Acquisition des hétéro-noyaux

a) Acquisition des spectres ^{31}P

Les spectres ^{31}P ont ainsi été enregistrés avec un spectromètre Bruker Avance III 600 MHz (16,5 T) avec une sonde liquide BBO. Les échantillons étaient préparés avec 5 % de D_2O aussi bien dans des tubes de 5 mm que de 3 mm. La séquence et les paramètres de la séquence utilisée ont été optimisés et sont présentés dans les résultats.

Plusieurs modules d'impulsions et de délais peuvent être ajoutés dans les séquences RMN pour optimiser les acquisitions ^{31}P. Un découplage : il est possible de découpler les signaux sur la fréquence du proton pour supprimer les couplages scalaires entre les spins des noyaux d'hydrogène et de phosphore sur les spectres (sous forme d'élargissement de raies). Pour cela il suffit de saturer la fréquence du proton, pendant l'acquisition. Un écho de Hahn (Rance and Byrd, 1983) : le but de cet écho est de

refocaliser les déplacements chimique et/ou les couplages de spin qui s'expriment pendant la séquence d'impulsion. Après une impulsion 90° (p1), cet écho se présente sous la forme d'un délai τ_1 d'un second pulse 180° et d'un dernier délai τ_2 avant l'acquisition (Figure 43). τ_1 et τ_2 sont choisis pour que les déplacements chimiques, qui évoluent à partir du début de l'impulsion 90°, soient refocalisés au début de l'acquisition, ainsi $\tau_1 = \tau_2 - \frac{2\,p1}{\pi}$.

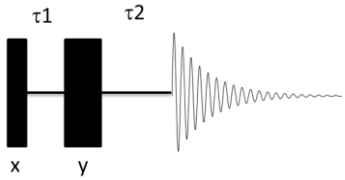


Figure 43 : Séquence d'impulsion de l'écho de Hahn.

Les objets étudiés sont des liposomes et ont PM élevé, leur temps de relaxation T_2 est donc court. Ainsi il faut que les délais τ_1 et τ_2 choisis soient suffisamment petits pour ne pas perdre le signal avant l'acquisition. Il est aussi possible de jouer sur la valeur de ces délais pour faire disparaître du spectre les signaux avec une relaxation rapide et ne garder que les signaux les plus fins, dont le T_2 sera plus long.

b) Acquisition des spectres ^{19}F

Les spectres 1D ^{19}F ont été enregistrés avec un spectromètre Bruker Avance III 600 MHz (14,1 T). équipé d'une cryo-sonde QCI-F 5 mm. Les échantillons étaient préparés avec 10 % de D_2O, 5 % de DMSO-d6, 100 mM d'acide 4,4-diméthyl-4-silapentane-1-sulfonique (DSS) et 500 mM de 3-fluoro-4-methylaniline dans des tubes de 5 mm.

3.1.3 Traitement des spectres RMN 1D 1H pour l'analyse par composante principale

Les spectres RMN 1D 1H ont tous été transformés de la même manière. SI a été fixé à 32 768. Une apodisation sinus carré est utilisée avec décalage « SBS » de 2 et aucun "zero-filling". La phase correction a été corrigée à l'aide d'une fonction quadratique avec à l'orde 0 entre 110 et 120° et en ordre 1 23,1°. La ligne de base a été corrigée avec une fonction polynomial d'ordre 5.
Ensuite les spectres ont été normalisés avec une procédure de correction de ligne de base automatique (IRLS : Iterative Restricted Least Square) et une SNV (Standard Normal Variate). L'analyse par composante principale (ACP) a été réalisé avec le logicile RStudio.

3.2. Diffusion quasi-élastique de la lumière

Le principe de la méthode est présenté dans la Partie I - Chapitre 4. Pour ce projet, les mesures DLS ont aussi bien été réalisées à l'ICSN à Gif-sur-Yvette que chez Sanofi à Vitry-sur-seine.

3.2.1 Mesure de la taille des particules

Les mesures ont toutes été réalisées avec un appareil Zetasizer® Nano-S de Malvern. L'échantillon analysé doit se trouver dans une gamme de concentration ni trop faible (pour que le faisceau laser puisse rencontrer des particules) ni trop élevée (pour que les particules soient suffisamment éloignées les unes des autres). Ainsi 2 µL de la solution à analyser est dilué dans 500 µL de tampon (HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4). La méthode utilisée permet de mesurer le diamètre apparent et la polydispersité des liposomes à 25°C dans des micro-cuves jetables (Z637092). La taille des particules est déterminée en mesurant le rayon laser réfracté sur l'échantillon et à l'aide des équations présentés en introduction.
Les paramètres utilisés pour mesurer la taille des liposomes sont les suivants : Material : « liposome » : RI : 1.450 ; Absorption : 0.010, Dispersant : « water » ; Température : 25.0°C ; viscosité : 1. 0,8872cP ; RI : 1.330, Temps d'équilibre : 500 s, Nombre de mesures : 3.

3.2.2 Suivi de taille des particules en fonction de la température

L'objectif de cette méthode est de suivre la taille des liposomes en fonction de la température. La méthode permet d'automatiser les mesures d'un échantillon sur une gamme de température donnée (20 – 50 °C) avec un incrément de température fixé. Le même protocole de dilution et le même type de cuve que ci-dessus sont utilisés.
Les paramètres utilisés pour mesurer la taille des liposomes sont les suivants : Material : « liposome » : RI : 1.450 ; Absorption : 0.010, Dispersant : « water » ; Température : 20.0°C ; viscosité : 1.0031 cP ; RI : 1.330, Température de départ : 20.0 °C ; Température de fin : 50.0 °C ; Intervalle de température : 1.0°C ; Temps d'équilibre : 500 s, Nombre de mesures : 3.

3.3. Cryo-TEM

Cette méthode a pu être utilisée dans ce projet grâce à une collaboration avec le Dr. Eric Larquet au sein de l'Ecole Polytechnique.
4 µL des suspensions de liposomes, soit utilisées directement soit dilués par 10, ont été déposées sur une grille 200 mesh holey carbon-coated. Après avoir retiré le surplus avec un papier filtre, la grille est refroidie par un plongeon rapide dans de l'éthane liquide, puis insérée dans le microscope à l'aide d'une entrée latérale refroidie à l'azote liquide (Gatan 626 cryo-holder) à une température de – 178 °C. Les observations ont été réalisées sur un microscope à transmission d'électron Thermo Fisher Themis 300 équipé d'un système anticontamination cryo-box et d'une lentille de focalisation C-Twin (Cs: 2,7 mm, Cc: 2,0 mm), à l'aide d'une tension d'accélération de 300 000 V, avec les conditions d'éclairage suivantes : taille de points 3, 150 µm ouverture de condensateur et 70 µm ouverture de l'objectif motorisé. Les images ont été enregistrées (gamme de délocalisation : -1,2 µm à 2,0 µm), à l'aide d'un

système à faible dose d'électrons (10 électrons par $Å^2$ par sec), avec un agrandissement de la gamme de 20 000X à 60 000X sur une caméra à détection directe d'électron 4Kx4K.

3.4. Mesure d'osmolarité

L'osmolarité est le nombre de mole de molécule osmotiquement active en solution, *i.e.* le nombre de mole de molécules effectivement dissous en solution (par exemple NaCl).

La méthode pour mesurer l'osmolarité des échantillons consiste à mesurer la pression de vaporisation. La concentration osmotique d'une solution a un impact sur la pression de vapeur saturante. Ainsi plus concentration osmotique sera élevée, plus la pression de vapeur saturante sera abaissée par rapport au solvant pur. En mesurant cette pression de vapeur il est alors possible d'obtenir l'osmolarité de la solution analysée à partir d'une droite étalon, réalisée avec des solutions standard d'osmolarité connue. Les mesures d'osmolarité ont été réalisées sur un appareil VAPRO® Osmomètre à Tension de Vapeur. 3 échantillons standards à 50, 290 et 850 mOsm sont utilisés pour la gamme étalon. 10 µL de solution à analyser (étalon ou solution d'osmolarité inconnue) est injecté sur un disque en papier sur un porte-échantillon qui sera ensuite inséré dans une chambre hermétique dans l'appareil. Une fois la pression de vapeur équilibrée dans la chambre, l'appareil va pouvoir récupérer cette mesure et comparer à la droite étalon réalisée précédemment. Chaque échantillon est mesuré 3 fois pour calculer une moyenne et un écart type.

Partie III : Résultats et discussions

Chapitre 1 : Etude de la structure des peptides en solution

Comme indiqué dans la première partie de ce manuscrit, l'apeline est impliquée dans le système cardiovasculaire. L'étape initiale de ce travail a été d'étudier la structure d'une série de peptides, issus de l'apeline, qui serviront de modèles pour étudier le relargage à travers des liposomes.

Plusieurs fragments d'apeline ont été identifiées comme ayant une forte activité sur les voies de signalisations, permettant d'augmenter la vasodilatation des vaisseaux sanguins comme l'apeline-36, (Pyr^{1})apeline-13 (Japp *et al.,* 2008) ou bien K14P (KFRRQRPRLSHKGP) (El Messari *et al.,* 2004). Pour ce projet, le fragment K14P a été sélectionné ainsi que trois de ses dérivés obtenus par le greffage d'une chaîne lipidique à la Lys_1. Ce sont des peptides de 14 acides aminés.

Ce chapitre a pour objectif de caractériser ces peptides. Les informations obtenues permettront ensuite d'étudier les phénomènes d'interactions peptide - liposome et de suivre des cinétiques de relargage.

1.1. Fragment d'apeline – K14P

Le premier peptide étudié est K14P (Figure 44). Sa séquence d'acides aminés est identique à celle des autres peptides étudiés dans ce manuscrit.

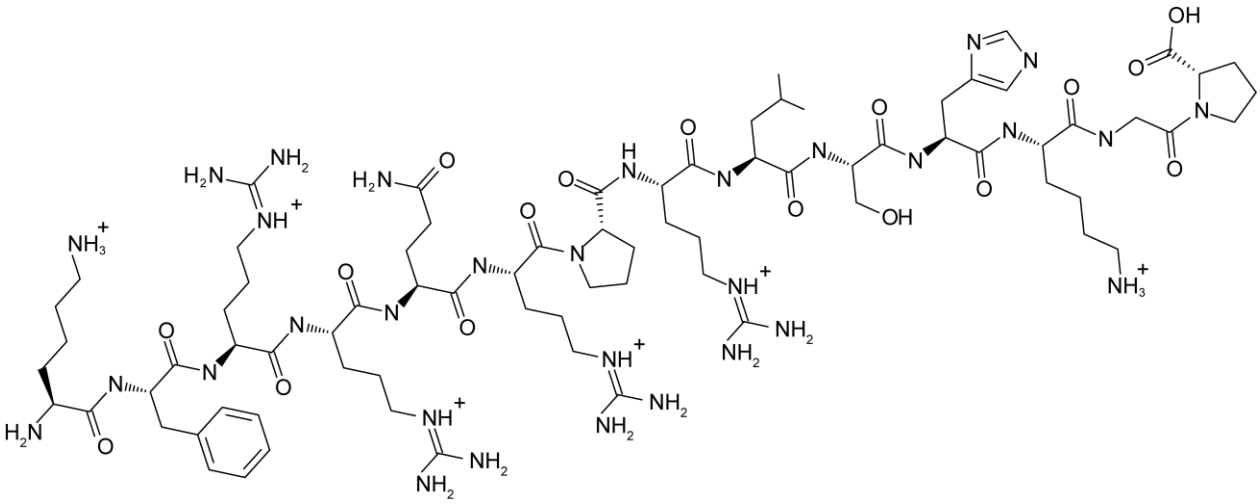


Figure 44 : Structure étendue du peptide K14P (KFRRQRPRLSHKGP).

1.1.1 Attribution du spectre RMN de K14P et détermination de sa structure

La première étape, pour étudier ce peptide, est de déterminer sa structure. La RMN est une méthode de choix pour obtenir la structure de molécule en solution. L'attribution des déplacements chimiques des différents protons du peptide est réalisée avec l'acquisition de spectres « TOtal Corelation SpectroscopY » (TOCSY) et Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY (NOESY). Ces déplacements chimiques sont caractéristiques de la structure secondaire des molécules étudiées. Ensuite ces spectres permettent d'obtenir des informations de distance et de relier les résidus qui constituent la chaîne d'acides aminés. Pour K14P, l'acquisition des spectres 1D ^{1}H et 2D ^{1}H-^{1}H NOESY et TOCSY a été faite à différentes températures (5 et 25 °C) et à différents pH (entre 5,0 et 7,4) dans l'objectif d'identifier les signaux du peptide. La diminution de la température réduit la vitesse d'échange entre les H^N et les protons de l'eau ce qui entraîne une augmentation de la durée de vie T_2 apparente des molécules (*i.e.* décroissance du signal plus lente lors de l'acquisition), et donc des signaux plus fins (Figure 45). Les signaux H^N, non observables à pH 7,4, deviennent visibles sur les spectres à pH plus faible. La diminution du pH par incrément diminue aussi la vitesse d'échange des protons labiles avec le solvant. Les signaux H^N s'affinent donc et l'intensité des corrélations H^N-Hα augmente permettant de distinguer la totalité des systèmes de spins. L'attribution a donc été plus facile et complète à pH 5,0 qu'à pH 7,4. Il a ensuite suffi de suivre les signaux grâce aux incréments de pH pour reporter l'attribution à pH 7,4, conditions dans lesquelles le reste de l'étude a été mené car elles correspondent à des conditions physiologiques.

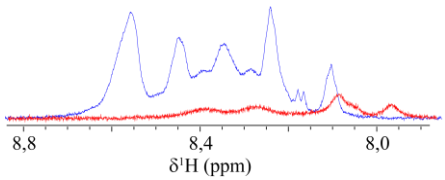


Figure 45 : Signaux des protons H^N de K14P à 5 °C en bleu et 25 °C en rouge. [K14P] = 350 µM, Tris-d11 20 mM, pH 7,4, ^{1}H 600 MHz.

trans/cis Pro$_{14}$	**Residu**	**H^N**	**Hα**	**Hβ**	**Hγ**	**Hδ**	**Hε**	**Hζ**	**Hα rc**
	Lys$_1$	ND	3.54	1.61,1.62	1.27,1.28	1.60,1.60	2.93,2.93		4.22
	Phe$_2$	ND	4.58	3.04,3.04		7.23	7.32	7.28	4.64
	Arg$_3$	8.38	4.25	1.64,1.72	1.51,1.55	3.14,3.14	ND		4.29
	Arg$_4$	8.44	4.18	1.73,1.79	1.62,1.65	3.19,3.19	ND		4.26
	Gln$_5$	8.64	4.29	1.94,2.03	2.34,2.35		6.96,7.65		4.34
	Arg$_6$	8.62	4.55	1.82,1.83	1.65,1.71	3.18,3.18	ND		4.60
	Pro$_7$		4.38	1.84,1.99	2.27,2.27	3.61,3.80			4.43
	Arg$_8$	8.60	4.26	1.74,1.80	1.59,1.65	3.17,3.17	ND		4.31
	Leu$_9$	8.50	4.36	1.52,1.61	1.59	0.85,0.90			4.40
	Ser$_{10}$	8.41	4.40	3.79,3.83	ND				4.40
trans	His$_{11}$	8.23	4.67	2.96,3.26		6.93 (Hδ2)	7.72 (Hε1)		4.70
trans	Lys$_{12}$	8.29	4.31	1.67,1.79	1.35,1.35	1.63	2.95,2.95	ND	4.33
trans	Gly$_{13}$	8.30	4.01,4.07						4.27
trans	Pro$_{14}$		4.23	1.90,1.97	2.20,2.20	3.56,3.59			4.44
cis	Lys$_{12}$	8.34	4.27	ND	1.36,1.36	1.36,1.36	ND	ND	
cis	Gly$_{13}$	8.16	3.69,4.02						
cis	Pro$_{14}$		4.32	1.89,2.09	2.30,2.30	3.47,3.47			

Tableau 5 : Déplacements chimiques des atomes d'hydrogène de K14P en ppm. [K14P] = 350 µM, Tris-d11 20 mM, pH 7,4, 5 °C, ^{1}H 600 MHz.

Sur le spectre TOCSY, il y a peu de variations des déplacements chimiques entre les atomes de protons des chaînes latérales du peptide. La comparaison des déplacements chimiques de tous les protons du peptide et celles correspondant aux « random coil » à 25 °C pH 7,0 (Wuthrich, 1986; Wishart *et al.*, 1995), montre des variations comprises entre 0 et 0,79 ppm en valeurs absolues. La variation la plus importante correspond à Lys$_1$ Hα qui se trouve en début de chaîne. Toutes les autres variations sont inférieures à 0,4 ppm et peuvent s'expliquer par la différence de température et pH entre les déplacements chimiques de référence et expérimentaux. Une différence de déplacement chimique supérieure à 0,4 ppm en valeur absolue est nécessaire pour considérer qu'il peut y avoir une structure en feuillet β ou en hélice α, ce qui n'est pas le cas ici. A partir du spectre NOESY, les signaux identifiés correspondent à des corrélations intra-résidus ou inter-résidus courtes distances (i– i+1). Ces dernières sont soit des corrélations H^N(i+1)-Hα(i) permettant de relier la chaîne d'acides aminés, soit des corrélations entre le proton Hα de Gly$_{13}$ et les protons Hδ de Pro$_{14}$. Ces dernières corrélations montrent que la proline est présente selon leurs deux configurations : cis et trans. L'absence de corrélation longue distance montre que le peptide est déstructuré. Ceci confirme les données de la littérature où il a été

montré par dichroïsme circulaire que l'apeline-36 et l'apeline-13 ne sont pas structurées dans l'eau (Fan *et al.*, 2003).

Certains protons H^N possèdent plusieurs signaux et corrélations sur les spectres 2D tels que Lys_{12}, Gly_{13} et Pro_{14} (Figure 46), mettant en évidence que plusieurs conformations du peptide, en échange lent, sont présentes en solution. La séquence du peptide contient deux résidus proline en position 7 et 14 (KFRRQR**P**RLSHKG**P**). La Pro_{14} permet d'expliquer le dédoublement des signaux de Lys_{12} et Gly_{13}. La proline a deux conformations possibles (cis et trans) elle peut donc donner plusieurs directions au squelette du peptide. Le ratio cis/trans des acides aminés est génaralement faible, cependant dans le cas des résudues proline, ce ratio peut être plus élevé.

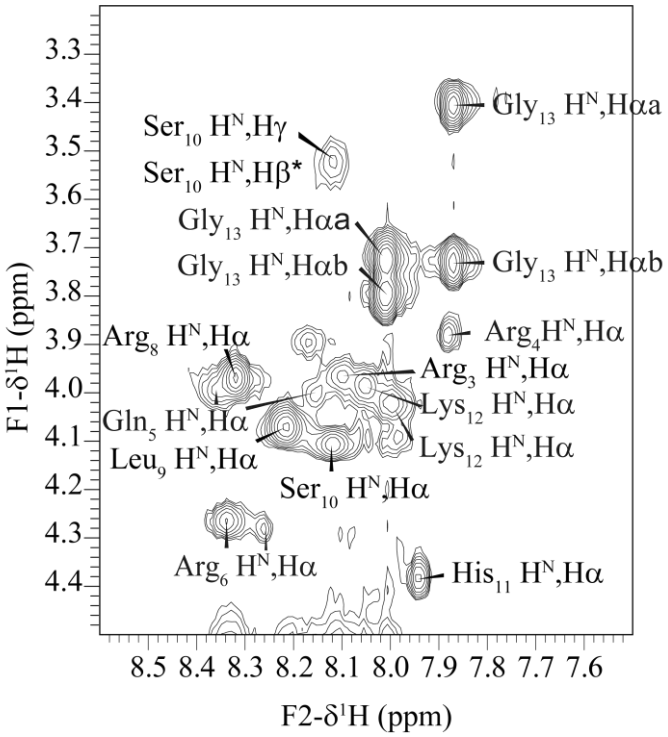


Figure 46 : Extraits des spectres RMN 2D ^{1}H-^{1}H TOCSY de K14P, attribution de la zone des corrélations H^N-Hα. [K14P] = 350 µM, Tris-d11 20 mM, pH 7,4, 25°C, ^{1}H 600 MHz.

Les configurations cis et trans engendrées par l'isomérisation de Pro_{14} peuvent être différenciées grâce à la corrélation entre les protons Pro_{14} Hδ et Gly_{13} Hα sur le spectre NOESY qui sont typiques de la configuration trans (Figure 47). A partir des intégrales des signaux Lys_{12} H^N-Hα et Gly_{13} H^N-Hα des deux conformations sur le spectre ^{1}H-^{1}H TOCSY, un ratio cis/trans de 25/75 est obtenu. Il est connu que la conformation trans est favorisée par rapport à la conformation cis (Zimmerman and Scheraga, 1976) mais les ratios cis/trans sont aussi largement dépendants des résidus voisins et du pH de l'échantillon (Thunecke *et al.*, 1996). Par exemple Zimmerman et Scheraga montrent qu'une proline précédée d'un résidu alanine, valine ou isoleucine présente un ratio cis/trans de 50/50 alors qu'une proline précédée d'un résidu aromatique tel qu'une tyrosine ou une phénylalanine présente un ratio 67/33 et 75/25

respectivement. Il est donc aussi possible que la proline en position C-terminale ou bien la présence de résidu glycine en position 13 stabilise la conformation cis.

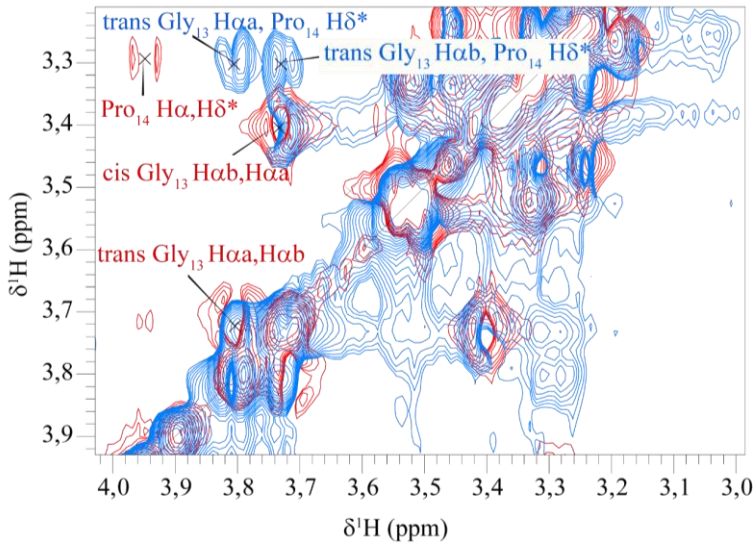


Figure 47 : Spectre RMN 2D ^{1}H-^{1}H TOCSY (rouge) et NOESY (bleu) de K14P. Temps de mélange TOCSY d9 = 40 ms, NOESY d8 = 300 ms. [K14P] = 350 µM, Tris-d11 20mM, pH 7,4, 5°C, ^{1}H 600 MHz.

Finalement, l'attribution des déplacements chimiques de K14P a permis de mettre en évidence le caractère déstructuré de K14P ainsi que la présence de plusieurs conformations pour la liaison peptidique Gly_{13}-Pro_{14} (cis/trans, 42/58). Ces attributions serviront de références pour analyser les spectres des peptides dérivés.

1.1.2 Etat d'auto-association de K14P par RMN

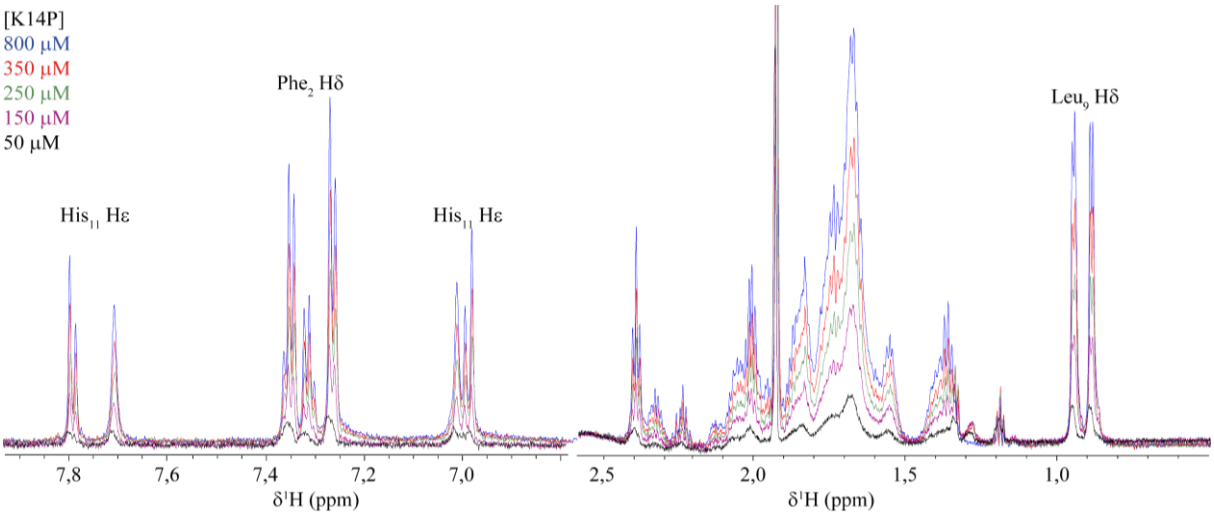


Figure 48 : Extraits des spectres RMN 1D ^{1}H de K14P à différentes concentrations. HEPES 80mM, NaCl=100mM, pH7,4, 5°C, ^{1}H 700 MHz.

Les peptides peuvent potentiellement s'organiser sous la forme de micelles au-dessus d'une certaine concentration appelée CMC. Bien que la structure de K14P ne suggère pas qu'il puisse s'auto associer,

à cause de la présence de nombreux résidus chargés dans la séquence du peptide, l'information a été vérifiée expérimentalement. Pour cela l'intégrale des signaux RMN 1D ^{1}H du peptide a été mesurée pour différentes concentrations de peptides.

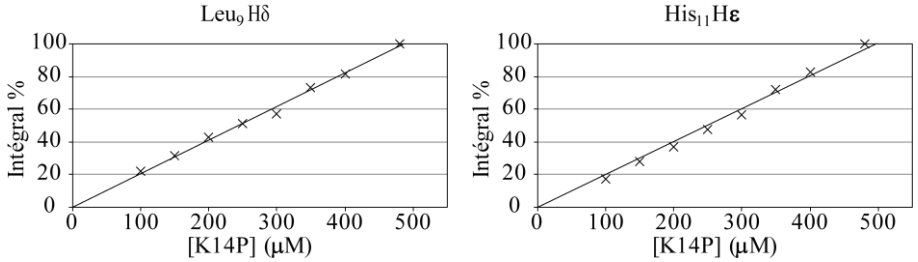


Figure 49 : Intégrale de signaux ^{1}H du peptide à différentes concentrations. Leu$_9$ Hδ 0,99 ppm, His$_{11}$ Hε 6,98 ppm.

Les signaux du peptide baissent en intensité et restent fins lorsque la concentration diminue (Figure 48). L'évolution de l'intégrale de ces signaux est tracée en fonction de la concentration en peptide (Figure 49). Les signaux d'un des doublets de la leucine et d'un atome d'hydrogène aromatique de l'histidine montrent des comportements similaires : l'intensité des signaux diminue linéairement avec la concentration. Ces données sont validées par la superposition des spectres du peptide à 50 et 500 µM : ils se superposent parfaitement lorsque l'intensité du premier est divisée par 10. Ainsi le peptide est présent sous forme monomère en solution dans le tampon HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4 à 5 °C, sur une gamme de concentration allant de 50 – 500 µM. L'attribution des signaux réalisée précédemment à une concentration de 350 µM est donc bien représentative du peptide monomère.

1.2. Peptides dérivés d'apeline

L'analyse structurale de K14P montre que ce peptide est non structuré. Ses dérivés, étudiés dans ce manuscrit, possèdent la même séquence d'acides aminés et une chaîne lipidique greffée sur Lys$_1$. Il est probable que ces peptides soient aussi non structurés. Le greffage de la chaîne lipidique les rend en revanche plus hydrophobes, ils pourraient donc former des micelles.

L'objectif est de déterminer l'état d'association des peptides à différentes concentrations, de confirmer leurs structures puis d'observer l'influence des chaînes lipidiques sur les déplacements chimiques des protons de la chaîne d'acides aminés.

1.2.1 C16-K14P

Ce peptide possède une chaîne lipidique palmitoyl (C16, 16 atomes de carbone). Elle est accrochée par une liaison amide à Lys$_1$ (Figure 50). La première étape a été de déterminer si ce peptide s'auto-associe et donc s'il possède une CMC mesurable. L'acquisition de spectres RMN 1D ^{1}H et 2D ^{1}H-^{1}H (NOESY, TOCSY) permet ensuite de comparer les déplacements chimiques de ses protons par rapport à ceux de K14P. Les analyses ont été réalisées à 5 °C pour rester cohérent avec celles réalisées sur K14P.

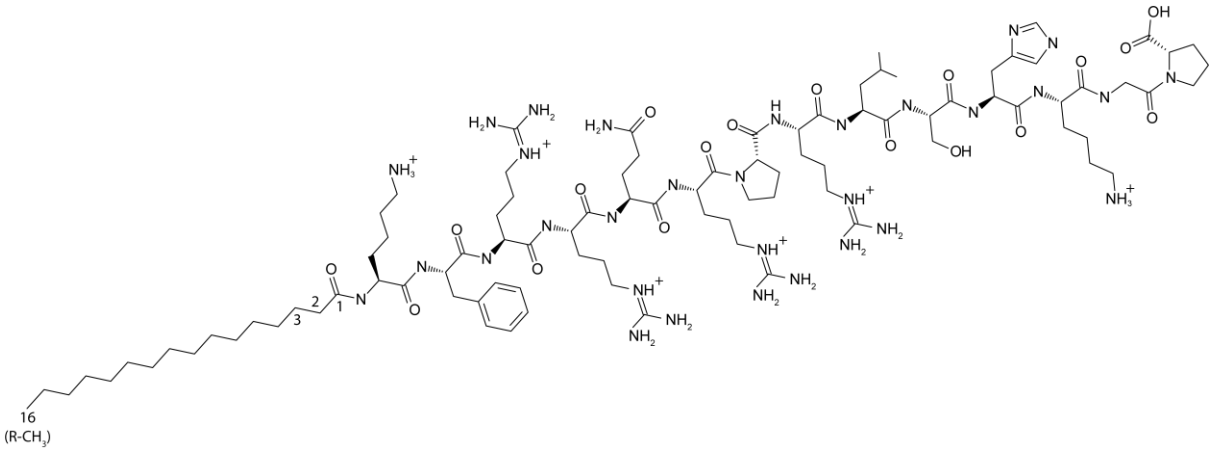


Figure 50 : Structure étendue du peptide C16-K14P (C16-KFRRQRPRLSHKGP).

a) Attribution du spectre RMN de la forme monomère de C16-K14P et détermination de sa structure

Les spectres de C16-K14P à 200 µM ont été acquis dans un tampon HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4 dans l'objectif d'attribuer les signaux et dans un deuxième temps de les comparer aux spectres obtenus précédemment avec K14P.

La superposition des spectres 2D de K14P et C16-K14P montrent que les signaux des deux peptides se superposent relativement bien (Figure 51) et donc que la structure globale du peptide est conservée. Les signaux de la chaîne lipidique du peptide s'identifient facilement grâce à leurs corrélations sur les spectres TOCSY qui ne sont pas présents sur les spectres de K14P. Comme pour K14P les corrélations identifiées sur le spectre NOESY correspondent à des corrélations intra-résidu ou inter-résidu (i – i+1). L'absence de corrélation longue distance confirme que le peptide est déstructuré.

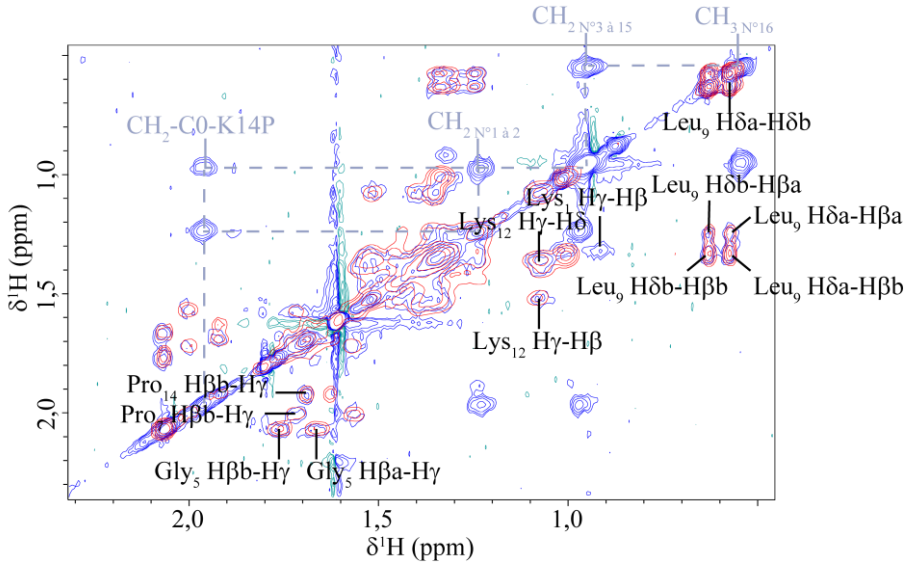


Figure 51 : Signaux des ^{1}H aliphatiques des spectres 2D ^{1}H-^{1}H TOCSY de C16-K14P et K14P. Bleu : [C16-K14P] = 200 µM, HEPES-d18 80 mM, NaCl 100 mM pH 7,4, 5 °C, ^{1}H 700 MHz. Rouge : [K14P] = 180 µM, Tris-d11 20 mM, pH7,4, 5°C, ^{1}H 600 MHz.

La Figure 52 montre les variations de déplacements chimiques des différents protons (H^N, Hα, Hβ, Hδ, Hε, Hγ, Hζ) des acides aminés entre K14P et C16-K14P. Une variation de déplacement chimique de plus de 0,5 ppm est observée pour Lys_1 Hα, 0,16 ppm pour Lys_1 Hβ et 0,31 ppm pour Lys_1 Hδ. Un des protons Phe_2 Hβ varie de 0,12 ppm. Les variations de déplacements chimiques les plus importants concernent les résidus en début de chaîne. La chaîne palmitoylée de C16-K14P est greffée au niveau de Lys_1 ce qui peut expliquer les variations observées. Les variations autour d'His_{11} peuvent facilement s'expliquer par une légère variation de pH entre les tampons des deux préparations, les déplacements chimiques de l'histidine étant très sensibles au pH, autour de pH 7. Les autres variations sont relativement faibles. Lorsque C16-K14P est sous forme monomère, les différences de déplacement chimique entre C16-K14P et K14P sont principalement dues au greffage de la chaîne lipidique.

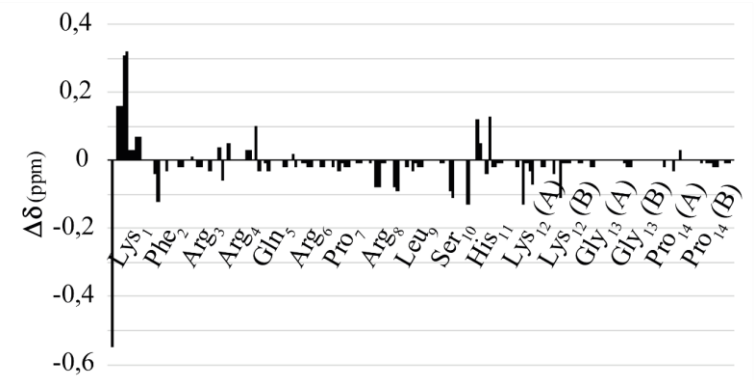


Figure 52 : Variations des déplacements chimiques observés entre la chaîne d'acides aminés de K14P et C16-K14P. Les variations sont présentées pour chaque protons (dans l'ordre Hα, Hβ, Hδ, Hε, Hγ et Hζ) de tous les résidus.

Le tampon utilisé pour les deux peptides est différent. Le spectre de K14P a été réalisé dans un tampon Tris alors que les spectres de C16-K14P ont été réalisés dans un tampon HEPES, au même pH 7,4. Mais des spectres de K14P ont aussi été réalisés dans de l'HEPES non deutéré (non présenté ici) et à concentration en peptide, pH équivalent, les signaux de K14P dans le tampon HEPES ou Tris se superposent exactement. Les déplacements chimiques observés sur les deux spectres sont donc comparables.

b) Etat d'auto-association de C16-K14P par RMN et DLS

La chaîne palmitoylée est hydrophobe. Il est donc possible que le peptide s'auto-associe au-dessus d'une certaine concentration, en micelles par exemple. Pour vérifier cette hypothèse, des spectres ^1H du peptide ont été enregistrés à différentes concentrations, sur une gamme allant de 50 à 700 µM. Les signaux sur les spectres enregistrés pour une concentration en peptide supérieure à 500 µM sont larges et s'affinent lorsque la concentration diminue (Figure 53). Ceci suggère qu'au-dessus de 500 µM le peptide est en partie auto-associé. Il est probable que le peptide se comporte différemment en présence de liposomes selon qu'il se trouve sous forme monomère ou auto-associé. Il est donc important de

connaître la concentration à partir de laquelle des associations se forment (*i.e.* sa CMC) pour l'interprétation des prochaines analyses.

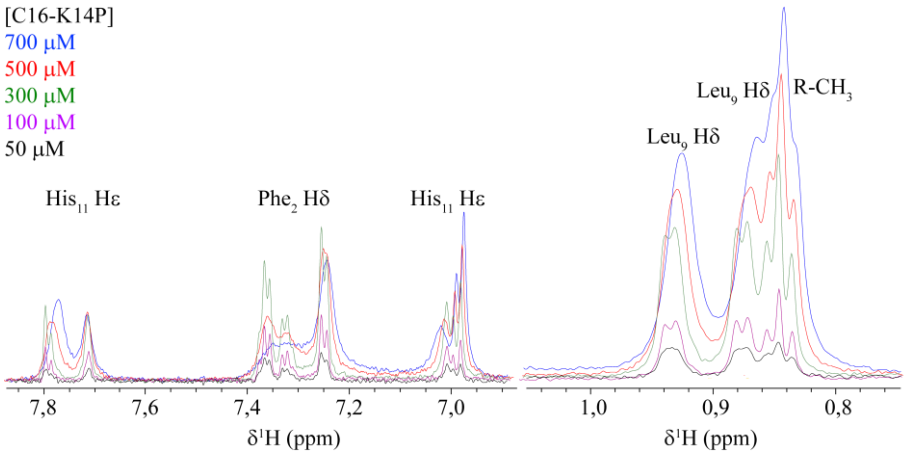


Figure 53 : Extraits des spectres RMN de C16-K14P à différentes concentrations. [C16-K14P] = 700 µM (bleu) 500 µM (rouge) 300 µM (vert) 100 µM (violet) 50 µM (noir), HEPES 80 mM, NaCl 100 mM pH 7,4, 5 °C, ^{1}H 700 MHz.

La CMC peut s'obtenir en mesurant les intégrales de certains signaux du peptide à différentes concentrations car les peptides monomères et sous forme micellaire seront en échange et leurs protons auront des relaxations différentes. Ils auront donc des comportements différents sur les spectres RMN. Les signaux observés sont ceux de la chaîne lipidique (R-CH_2-R'), les signaux aromatiques de Ph_2 (Hδ) et les doublets des méthyles de Leu_9 (Hδ) (Figure 54) car ils sont très peu superposés à d'autres signaux. Sur chaque graphique, deux zones peuvent être identifiées et ajustées par des droites. Le premier régime linéaire (0 - 300 µM) passe par zéro et correspond à une zone où le peptide est seulement sous forme monomère. Pour le second régime (300 – 700 µM), l'ajustement des points peut se faire avec une droite possédant un coefficient directeur beaucoup plus faible, ce coefficient est différent en fonction des protons observés. Il y a donc des peptides auto-associés dans cet intervalle de concentrations. La CMC de ce peptide se trouve à l'intersection des deux droites d'ajustements soit 300 µM.

En observant plus en détail la Figure 53, les signaux aromatiques à 7,75 ppm et 7,73 ppm augmentent en intensité lorsque la concentration en peptide varie de 0 à 300 µM puis ils s'élargissent brusquement à 500 µM et baissent en intensités, sans variation de déplacements chimiques. De plus au-dessus d'une concentration en peptide de 500 µM, le spectre ne revient pas à la ligne de base entre deux signaux aromatiques, suggérant la présence d'un signal très large aux mêmes déplacements chimiques. Ces signaux larges pourraient correspondent à la forme auto-associé de C16-K14P. Les deux formes du peptide sont donc en régime d'échange rapide, avec des déplacements chimiques similaires pour les protons du peptide monomère ou auto-associé. Il n'y a pas de variation non plus de déplacements chimiques des signaux de la chaîne lipidique avec la concentration.

L'intégrale des signaux des protons aromatiques d'His_{11} évolue linéairement sur toute la gamme de concentrations. Ceci s'explique si les signaux aromatiques de l'His_{11} ont la même dynamique et donc la

même largeur de raie sous forme monomère et associée. Ce résidu est loin de la chaîne lipidique, greffée en Lys_1, il semble donc peu affecté par la formation d'association de peptide.

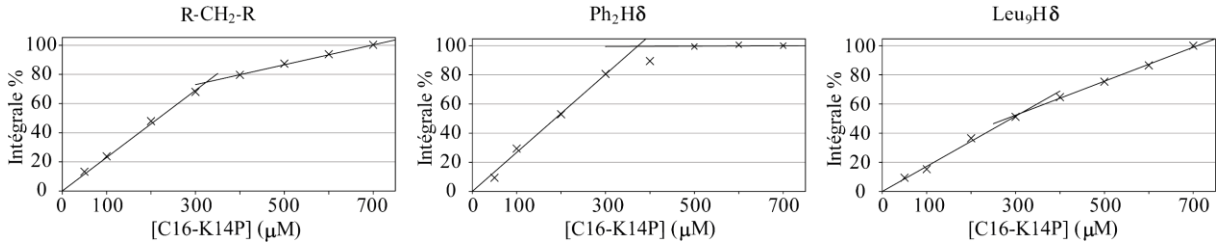


Figure 54 : Variations des intégrales des signaux de C16-K14P en fonction de sa concentration. R-CH2-R' (1,25 ppm) protons aliphatiques de la chaîne lipidique, Phe_2 Hδ (7,29 ppm) et Leu_9 Hδ (0,93 ppm). HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4, 5 °C. « Intégrale % » correspond à l'intégrale du signal du proton observé, 100 % étant calibré sur le spectre avec la plus grande concentration en peptide. Les domaines d'ajustement ont été choisis pour réduire au maximum le coefficient de corrélation des deux droites pour chaque graphique.

Le coefficient directeur des droites sur la gamme de concentration 0 – 300 μM donne une information sur la diminution de l'intégrale des signaux avec la concentration. Cet indicateur peut être utilisé pour identifier les protons les plus impliqués dans la formation de l'association. Ainsi le coefficient directeur est de 0,25 ± 0,03 μM^{-1} pour Phe_2 Hδ et R-CH_2-R' et 0,15 ± 0,02 μM^{-1} pour Leu_9 Hδ et His_{11}. Il semble donc que les intégrales des signaux protons des acides aminés proches de la chaîne lipidique et des protons de la chaîne lipidique diminuent plus rapidement que ceux des protons des acides aminés en milieu et fin de chaîne. La chaîne lipidique et les acides aminés proches de cette chaîne semblent donc impliqués plus spécifiquement, *i.e.* ils sont plus contraints dans l'association des peptides que les acides aminés au milieu ou fin de chaîne peptidique.

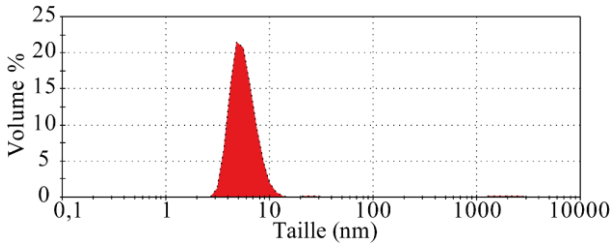


Figure 55 : Distribution de la taille de C16-K14P obtenues à partir d'analyses DLS. [C16-K14P] = 500 μM, HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4, 25°C.

Une mesure DLS d'une solution de peptide à 500 μM montre un signal centré à 9 ± 2 nm (Figure 55). Ce signal est trop grand pour correspondre à du peptide monomère. Selon les déductions faites grâce aux intégrales des signaux RMN, il pourrait donc correspondre à l'association formée par le peptide. Connaissant la longueur d'une liaison C-C (1,4 Å) et en prenant en compte l'angle entre deux liaisons, la longueur du peptide étendue est estimée à 57,4 Å soit environ 6 nm. Cette longueur étendue est inférieure à la taille de particule mesurée par DLS. D'après les données obtenues par RMN et DLS, l'association formée par le peptide pourrait donc être une micelle. Les spectres RMN montrent que les

protons les plus affectés par la formation de l'association sont les protons de la chaîne lipidique et les protons des résidus proches de la chaîne lipidique. Ainsi la partie lipidique de C16-K14P est probablement impliquée dans la formation des micelles alors que la partie peptidique, des résidus 3 à 14, semble être bien exposée au solvant.

Les spectres RMN 1D ^{1}H montrent aussi que les signaux du peptide sont plus larges lorsqu'un tampon HEPES 80 mM NaCl 100 mM est utilisé par rapport à un tampon ne contenant que 80 mM d'HEPES sans sel. La présence de sel favorise donc la formation de micelle et diminue la valeur de la CMC.

1.2.2 C11-K14P

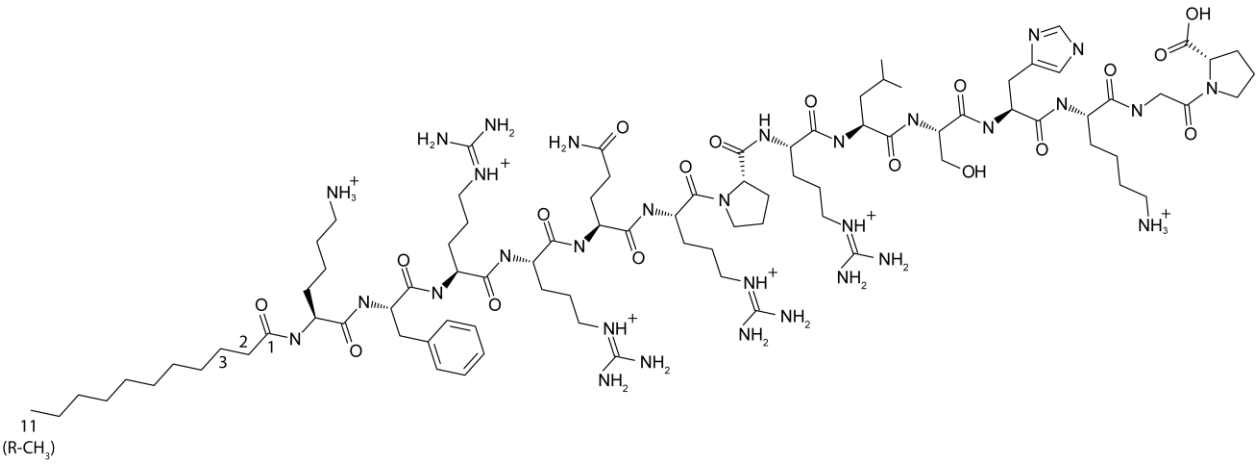


Figure 56 : Structure étendue du peptide C11-K14P (C11-KFRRQRPRLSHKGP).

C11-K14P (Figure 56) possède une chaîne carbonée lipidique de 11 atomes de carbone (C11). Il est moins hydrophobe que C16-K14P, néanmoins, il est aussi possible qu'il s'auto-associe dans l'eau pour former des micelles. Ce paragraphe va donc être l'occasion de déterminer si le peptide s'auto-associe ainsi que sa structure.

a) Attribution du spectre RMN de la forme monomère de C11-K14P et détermination de sa structure

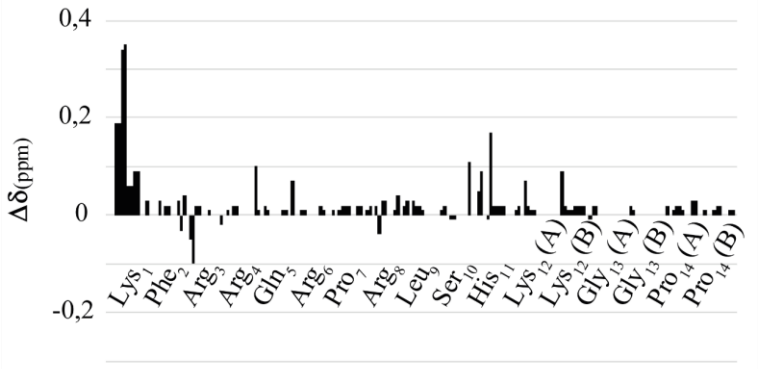


Figure 57 : Variation des déplacements chimiques de la chaîne d'acides aminés de C11-K14P par rapport à K14P. Les variations sont présentées pour chaque protons (dans l'ordre Hα, Hβ, Hδ, Hε, Hγ et Hζ) de tous les résidus.

L'attribution des signaux des spectres RMN de C11-K14P a été réalisée sur des spectres TOCSY et NOESY en partant de l'attribution du spectre de K14P. Les déplacements chimiques des protons de C11-K14P correspondent aux déplacements chimiques « random coil » (Wishart *et al.*, 1995) attendus dans le cas d'un peptide non structuré. Les corrélations identifiées sur le spectre NOE correspondent à des corrélations intra- et inter-résidus i - i+1. L'absence de corrélation longue distance confirme que le peptide est déstructuré.

Les déplacements chimiques des protons de K14P et C11-K14P sont proches. Les variations les plus importantes concernent l'acide aminé Lys_1 (Figure 57) auquel est attachée la chaîne lipidique C11, ce qui explique ces différences, 0,2 ppm pour Lys_1 Hα et 0,35 pm pour Lys_1 Hδ. Les déplacements chimiques des signaux de la chaîne lipidique ne varient pas avec la concentration.

En conclusion, C11-K14P est un peptide déstructuré dans un tampon HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4 à 5 °C. Les déplacements chimiques du peptide sont proches de ceux de K14P excepté pour l'acide aminé Lys_1 car ce résidu est directement lié à la chaîne lipidique.

b) Etat d'auto-association de C11-K14P par RMN et DLS

La chaîne lipidique de C11-K14P est moins hydrophobe que la chaîne palmitoylée. C'est-à-dire que s'il s'auto associe, sa CMC devrait être plus élevée que celle de C16-K14P. Pour vérifier cette hypothèse, le même protocole que pour les peptides précédents a été suivi et des spectres RMN 1D ^{1}H ont été enregistrés à différentes concentrations en peptide. L'intégrale des signaux a ensuite été tracée en fonction de la concentration en peptide.

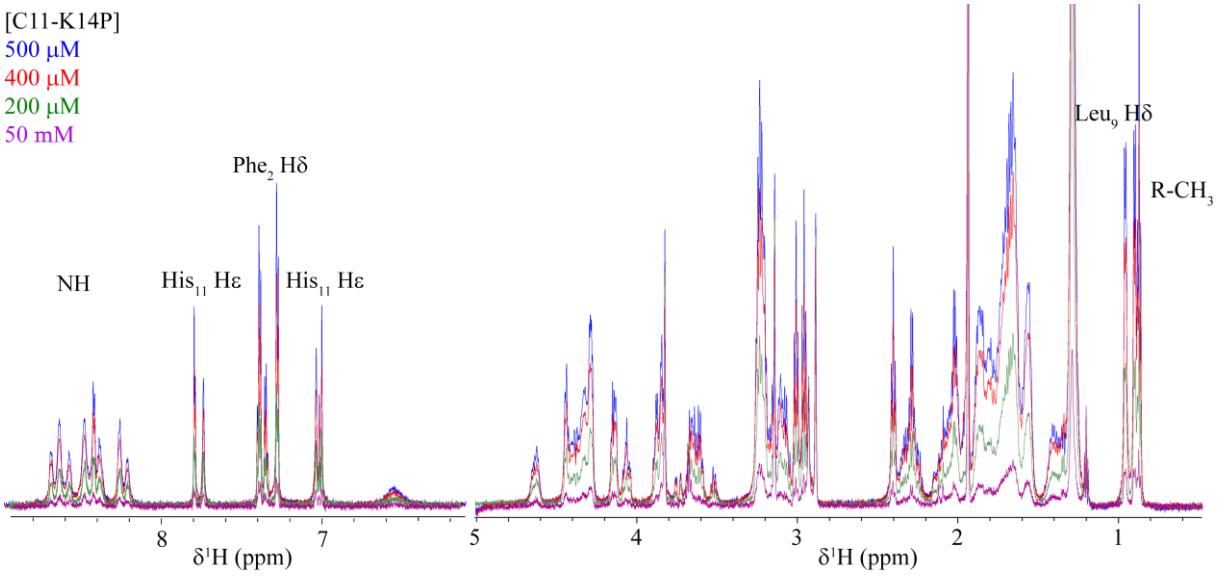


Figure 58 : Extraits de spectres RMN 1D ^{1}H de C11-K14P à différentes concentrations de peptide. [C11-K14P] = 500 µM (bleu) 400 µM (rouge) 200 µM (vert) 50 µM (violet), HEPES 80 mM, NaCl 100 mM pH 7,4, 5 °C, ^{1}H 700 MHz.

La Figure 58 montre qu'il n'y a pas de variation de déplacements chimiques de ce peptide lors des dilutions. De plus la diminution de l'intégrale des signaux est linéaire avec la concentration (Figure 59).

Ce peptide reste donc dans la même forme entre 50 et 500 µM. Pour rappel, C16-K14P forme des micelles à une concentration supérieure à 300 µM. Au vu de la largeur des raies de C11-K14P, en comparaison de celles observées avec C16-K14P, il s'agit du monomère. La taille du peptide mesurée par DLS à 500 µM est de 1 ± 2 nm (Figure 60). L'incertitude de cette valeur est importante car la taille des objets observés est proche de la taille minimale d'analyse en DLS, annoncée à 0,3 nm par le constructeur. La longueur étendue du peptide est estimée à 5 nm. Si le peptide formait des micelles à cette concentration, un signal supérieur à 5 nm aurait été observé. Ainsi le peptide ne s'auto associe pas entre 50 et 500 µM.

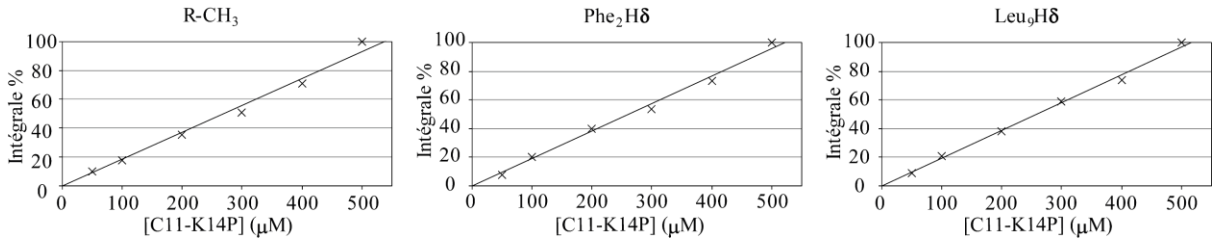


Figure 59 : Intégrale des signaux RMN 1D ^{1}H de C11-K14P à différentes concentrations. « Intégrale % » correspond à l'intégrale du signal du proton observé, 100% étant calibré sur le spectre avec la plus grande concentration en peptide (500 µM).

La longueur de la chaîne lipidique du peptide a une grande influence sur la CMC du peptide. Si C11-K14P possède une CMC, elle se trouve au-dessus de 500 µM, ce qui est supérieur à la CMC de C16-K14P (300 µM). Il semble donc que plus la chaîne lipidique est longue, plus la CMC est basse.

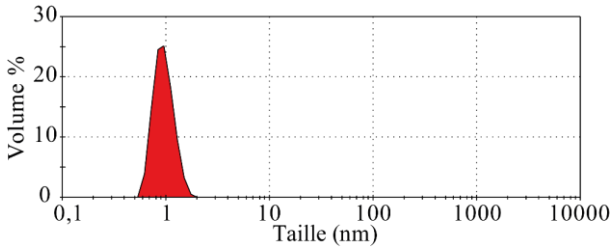


Figure 60 : Distribution de la taille de C11-K14P par DLS. [C11-K14P] = 500 µM, HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4, 25 °C.

1.2.3 C11F-K14P

C11F-K14P (Figure 61) possède aussi une chaîne lipidique composée de 11 atomes de carbone. La différence avec le peptide précédent est que les 8 derniers atomes de carbones de la chaîne lipidique portent des atomes de fluor à la place des atomes d'hydrogène. L'avantage de l'utilisation d'une chaîne fluorée par rapport à une chaîne hydrogénée sur des peptides thérapeutiques est d'augmenter la durée de vie du peptide dans le plasma (Gerbier et al., 2017). De plus les atomes de fluor étant plus hydrophobes que les atomes d'hydrogène, il est probable que la CMC de C11F-K14P soit plus basse que celle de C11-K14P.

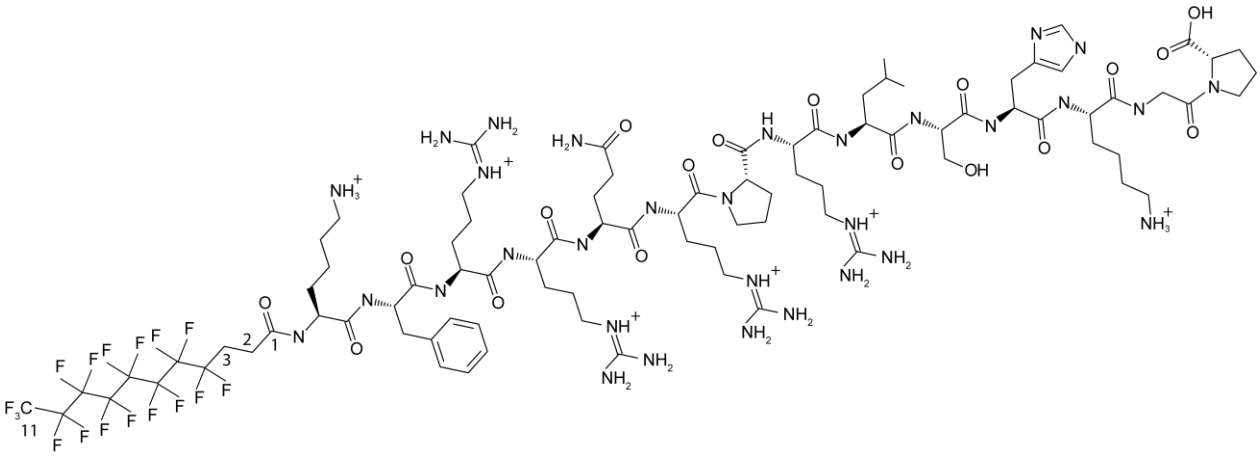


Figure 61 : Structure étendue du peptide C11F-K14P (C11F- KFRRQRPRLSHKGP).

a) Attribution du spectre RMN de la forme monomère de C11F-K14P et détermination de sa structure

L'attribution des signaux des spectres RMN du peptide a été réalisée sur des spectres TOCSY et NOESY en partant de l'attribution du spectre de C11-K14P. Les déplacements chimiques des deux peptides sont proches (Figure 62). Les plus grandes variations concernent l'acide aminé Lys_1. Cet acide aminé est le premier acide aminé relié à la chaîne lipidique, c'est donc le résidu le plus affecté par la présence des atomes de fluor. Comme pour C11-K14P, les déplacements chimiques des protons de la partie peptidique de C11F-K14P correspondent aux déplacements chimiques « random coil », le peptide est donc non structuré. Les corrélations identifiées sur le spectre NOE correspondent à des corrélations intra-résidu ou inter-résidu (i - i+1). L'absence de corrélation longue distance confirme que le peptide est déstructuré.

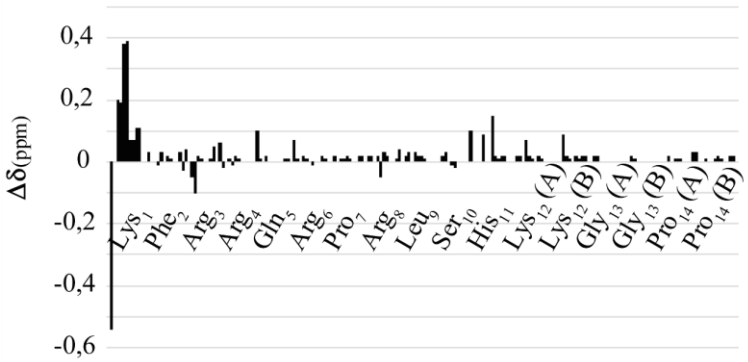


Figure 62: Variation des déplacements chimiques de la chaîne d'acide aminé de C11F-K14P par rapport à K14P. Les variations sont présentées pour chaque protons (dans l'ordre Hα, Hβ, Hδ, Hε, Hγ et Hζ) de tous les résidus.

b) Identification des signaux RMN ^{19}F

L'analyse par RMN 1D ^{19}F de C11F-K14P met en évidence une large gamme de déplacements chimiques pour les atomes de fluor composant la chaîne lipidique du peptide (Figure 63). Le

déplacement chimique du groupe CF_3 est caractéristique et il se trouve à -79,8 ppm. Le deux atomes de fluor les plus proches de la fonction carbonyle de la Lys_1 se trouvent, quant à eux, à -113,5 ppm. Les autres déplacements chimiques n'ont pas été attribués, mais serviront pour les études d'interactions entre le peptide et les liposomes.

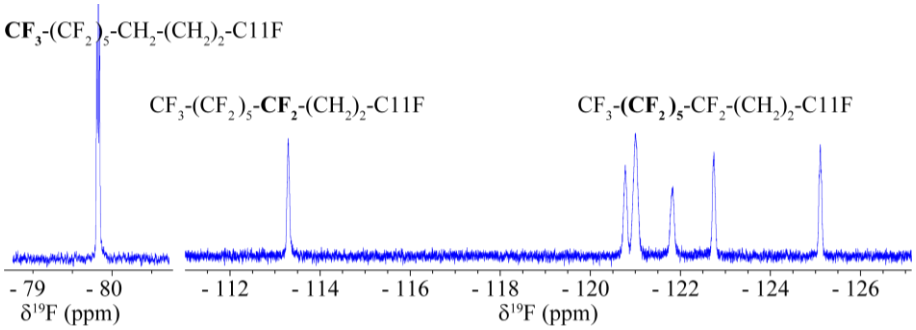


Figure 63 : Extraits des spectres ^{19}F de C11F-K14P. [C11F-K14P] = 88 µM, HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4, 25°C, ^{1}H 600 MHz.

c) Etat d'auto-association de C11F-K14P par RMN et DLS

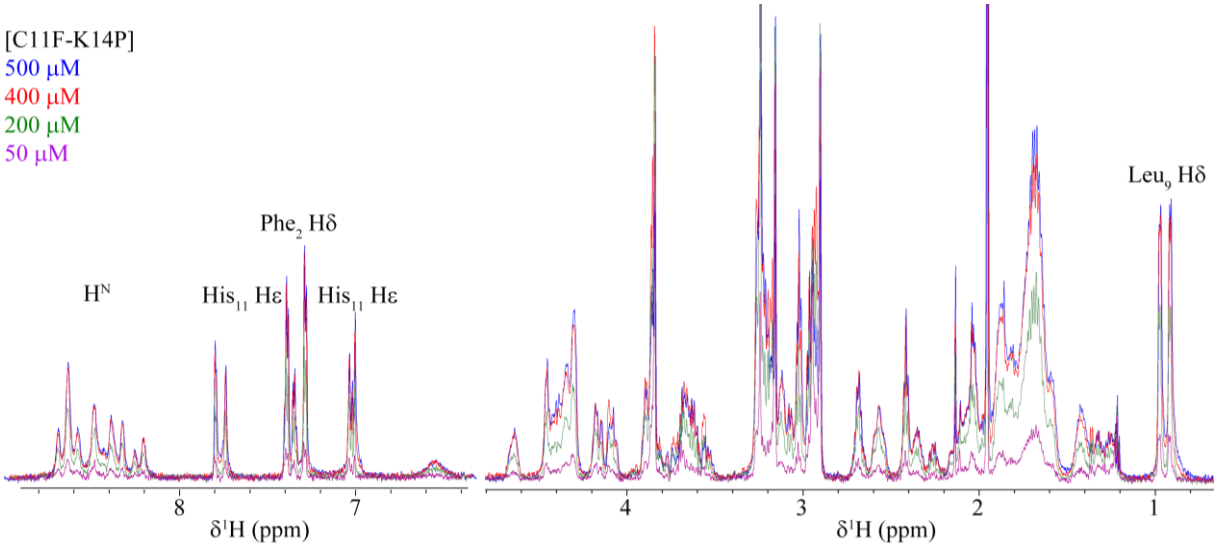


Figure 64 : Extraits de spectres RMN 1D ^{1}H de C11F-K14P à différentes concentrations. [C11F-K14P] = 500 µM (bleu) 400 µM (rouge) 200 µM (vert) 50 µM (violet), HEPES 80 mM, NaCl 100 mM pH 7,4, 5 °C, ^{1}H 700 MHz.

Les déplacements chimiques des protons du peptide ne varient pas avec la concentration sur la gamme de 50 à 500 µM (Figure 64). En revanche la variation de l'intégrale des signaux du peptide en fonction de sa concentration n'est pas linéaire. Son évolution (Figure 65) montre que des micelles se forment à partir de 200 - 300 µM. La CMC peut être estimée à 200 µM dans un tampon HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4 à 5 °C. Les signaux sont relativement fins quelle que soit la concentration en peptide. Aucun signal large n'est visible sur les spectres. Aucune variation des déplacements chimiques des protons du peptide ou de la chaîne lipidique (CH_2 n° 2 et 3 à 2,57 et 2,69 ppm) en fonction de la concentration n'est

observée. Les protons des peptides sous forme micellaire se trouvent donc aux mêmes déplacements chimiques que ceux du peptide monomère.

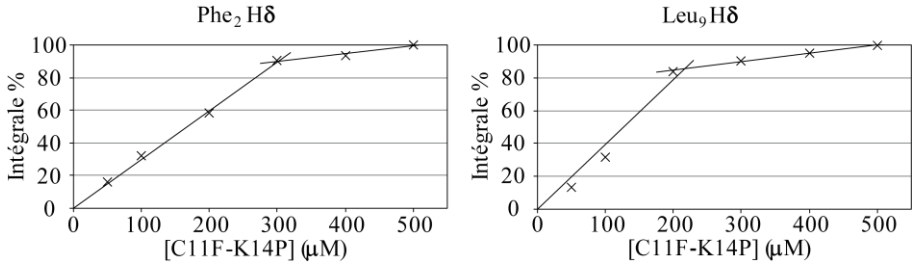


Figure 65 : Intégrale des signaux RMN 1D ^{1}H du peptide C11F-K14P à différentes concentrations de peptide. « Intégrale % » correspond à l'intégrale du signal du proton observé, 100% étant calibré sur le spectre avec la plus grande concentration en peptide.

Une solution de peptide à 500 µM a été analysée par DLS et un signal à 9 ± 2 nm est observé (Figure 66), ce qui correspond à deux fois la taille du peptide étendu, appuyant l'interprétation, faite à partir des données RMN, que le peptide s'auto-associe en micelle.

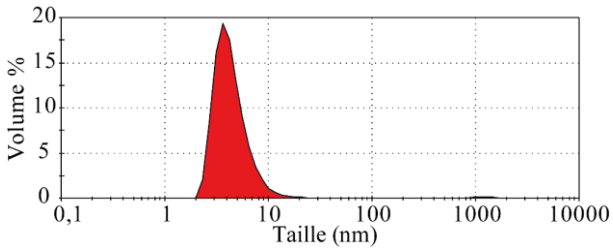


Figure 66 : Distribution de la taille des particules de C11F-K14P. [C11F-K14P] = 500 µM, HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4, 25 °C.

1.3. Conclusion

Dans ce chapitre le caractère déstructuré de K14P et de ses dérivés (C16-K14P, C11-K14P et C11F-K14P) a été mis en évidence, ce qui est en accord avec les données de la littérature (Fan *et al.*, 2003). Les déplacements chimiques de leurs protons sont similaires excepté pour la Lys_1, résidu auquel sont greffées les différentes chaînes lipidiques. Certains de ces peptides peuvent former des micelles au-dessus d'une certaine concentration dans le tampon HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4 à 5 °C : 300 et 200 µM pour C16-K14P et C11F-K14P respectivement. C11F-K14P formes des micelles à plus basse concentration que C16-K14P, ce qui est cohérant avec le fait que C11F est une chaîne lipidique plus hydrophobe que C16 (les atomes de fluor étant plus hydrophobes que les atomes d'hydrogène). K14P et C11-K14P quant à eux restent sous forme monomère au moins jusqu'à une concentration de 700 et 500 µM respectivement.

Chapitre 2 : Etude de la structure des liposomes

2.1. Nomenclature des échantillons

Ce chapitre présente les résultats permettant de caractériser les liposomes. Pour nommer les échantillons de liposomes, la nomenclature suivante a été utilisée (Tableau 6). Par exemple l'échantillon S-CHOL12-C0-J1-T5 correspond à des liposomes soniqués composés de 12 % de cholestérol, chargés de K14P, analysés 1 jour après leur préparation et conservés à 5 °C, avant analyse. Les liposomes ne contenant pas de peptides sont appelés « liposomes blancs ».

Méthode de préparation	**S**	Soniqué
	E	Extrudé
Quantité de cholestérol	**CHOL0**	0 %
	CHOL5	5 %
	CHOL12	12 %
Molécule encapsulée	**Ø**	Aucune
	C0	K14P
	C11	C11-K14P
	C11F	C11F-K14P
	C16	C16-K14P
Nombre de jours entre la préparation et l'analyse	**J0**	Analysé le jour de la préparation
	J1	Analysé le lendemain de la préparation
Température de conservation de l'échantillon	**T5**	5 °C (au réfrigérateur)
	Tamb	température ambiante

Tableau 6 : Nomenclature des échantillons de liposomes.

2.2. Etudes des liposomes blancs

Les peptides de la série apeline présentés dans le chapitre précédent ont pour objectif d'être injectés par voie sous cutanée. Comme présenté en introduction, ces peptides ont une durée de vie *in vivo* très courte. Pour augmenter la durée de vie du PA dans le corps humain, la méthode choisie est son encapsulation dans des liposomes. Avant de pouvoir comprendre quelles sont les interactions peptide - liposome ainsi que les paramètres qui régissent le relargage, il est important d'étudier la structure des liposomes ainsi que les paramètres qui peuvent influencer cette structure.

La formulation de liposomes choisie est composée de DPPC, DMPG et cholestérol (Tableau 3). Cette formulation a pour objectif de relarguer leur charge, à vitesse modérée, une fois injectée sous la peau du patient. Les liposomes doivent donc être perméables aux PA au-dessus de 35 °C, température sous cutanée chez les humains.

L'objectif de ce chapitre est de caractériser les liposomes par différentes méthodes, puis d'observer l'effet de la température et de l'encapsulation de PA sur leurs structures. Pour l'atteindre, plusieurs méthodes d'analyse ont été mises en place. Les liposomes sont constitués majoritairement de phospholipides qui eux-mêmes sont composés d'une tête polaire avec un groupement phosphate et de deux chaînes carbonées. Il est donc possible d'obtenir des données sur la structure des liposomes en étudiant les signaux RMN de leurs atomes d'hydrogène et de phosphore. La taille des liposomes a été mesurée par DLS. Finalement la microscopie électronique a été utilisée pour observer directement les liposomes.

Plusieurs liposomes ont été analysés : des liposomes préparés par sonication et d'autres par extrusion. L'effet du cholestérol sur les liposomes extrudés a été étudié, ainsi que l'impact de l'encapsulation de peptide (K14P et C16-K14P).

2.2.1 Etude de la structure des liposomes soniqués blancs et effet de la température sur leur structure

a) Attribution des spectres RMN 1D 1H des liposomes soniqués blancs à différentes températures

L'acquisition des spectres RMN 1D ^{1}H permet d'obtenir des informations rapidement, car les acquisitions sont courtes. Les premières questions qui se sont posées avaient pour objectifs de déterminer s'il était possible d'observer les liposomes par RMN 1D ^{1}H, à différentes températures, et quelles informations pouvaient être extraites des spectres.

Les liposomes sont des objets de hauts PM, ce qui peut compliquer leur analyse par RMN liquide. Les objets avec une masse molaire élevée ont un τ_c lent et une relaxation de spin nucléaire transverse du proton (temps caractéristique T_2) rapide lorsqu'il n'y a pas de mobilité interne. Les signaux de ces objets sur les spectres RMN 1D ^{1}H sont donc larges et peuvent même ne pas être visibles.

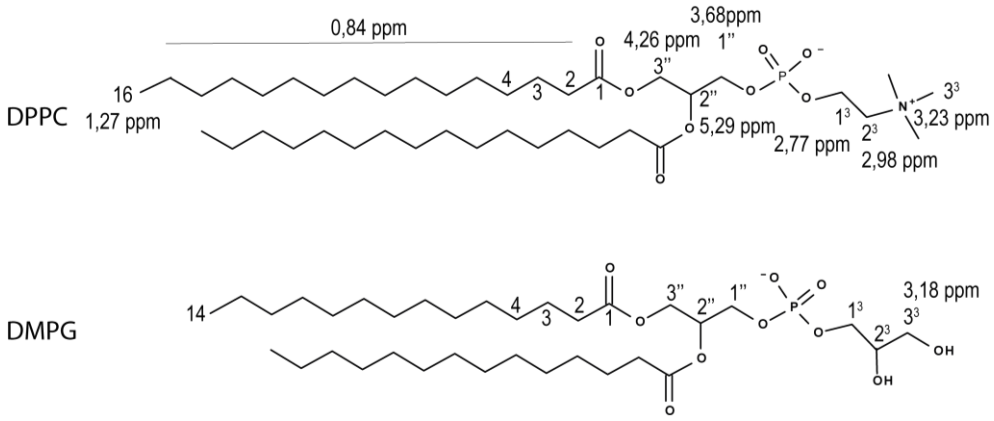


Figure 67 : Structure des phospholipides DPPC, DMPG et nomenclature utilisée pour la numérotation de leurs protons.

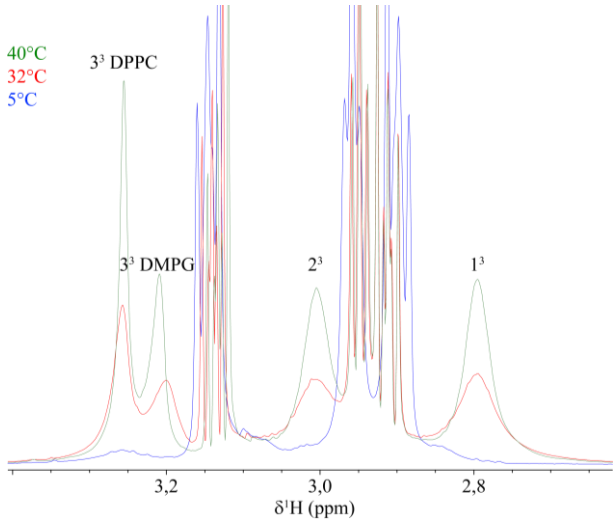


Figure 68 : Extraits des spectres RMN 1D ^{1}H de liposomes soniqués blancs à différentes températures montrant uniquement la zone des protons de la tête polaire des phospholipides. [liposomes] = 83 µM, HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4, ^{1}H 600 MHz, S-CHOL12- Ø -J1-T5. Les signaux fins entre 2,85 et 3 ppm puis 3,1 et 3,2 ppm appartiennent à l'HEPES.

Plusieurs spectres 1D ^{1}H de liposomes soniqués blancs, ont été enregistrés entre 5 et 40 °C (Figure 68). La nomenclature des phospholipides est présentée dans la Figure 67. Les différents signaux ont été identifiés à l'aide d'une attribution réalisée dans le chloroforme (Annexe I) par Amandine Coffinet (stagiaire IUT, Sanofi – Vitry-sur-Seine). Les phospholipides sont solubles dans le chloroforme et sont donc sous forme monomère pendant l'analyse. Ainsi sur les spectres protons réalisés à partir d'un échantillon de liposomes dans un tampon HEPES 80 mM NaCl 100 mM à pH 7,4, il est possible d'affirmer que les signaux observés dans la zone 0 – 2 ppm correspondent aux protons des chaînes carbonées, la zone 2,5 – 3,4 ppm aux protons des têtes polaires et la zone 2,5 – 5,0 ppm aux protons des chaînes carbonées proches du groupement ester des phospholipides. L'attribution des spectres sont présentées dans la Figure 67 et le Tableau 7.

N°	2 - 15	16	1^3	2^3	3^3 DMPG	3^3 DPPC	1''	3''	2''
T (°C) / δ (ppm)	0,84	1,27	2,77	2,98	3,18	3,23	3,68	4,26	5,29
5						X			
15						X			
20			X			X			
32	X		X	X	X	X	X	X	X
35	X	X	X	X	X	X	X	X	X
40	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Tableau 7: Signaux des phospholipides présents sur les spectres RMN 1D ^{1}H en fonction de la température. Les X indiquent la présence du signal à chaque température observée.

Les spectres Figure 68 mettent en évidence l'apparition de plusieurs signaux des liposomes lorsque la température augmente. Le Tableau 7 récapitule ces signaux et la température à laquelle ils apparaissent. Les protons de l'extrémité de la tête polaire (3^3) apparaissent en premier. Ces protons se trouvent sur l'extérieur des bicouches et sont donc les protons les moins impliqués dans la formation des liposomes. Le temps de corrélation rotationnel (τ_c) a été comparé à la relaxation transversale (T_2) pour déterminer si l'augmentation de l'intensité des signaux est due à l'accélération des mouvements globaux des liposomes en solution ou bien si d'autres mouvements locaux interviennent (*i.e.* lié à la bicouche). En effet il est possible de relier T_2 à τ_c par $\frac{1}{T_2} = \frac{3\gamma^4\hbar^2}{20\,r^6}\,[3J_0(0) + 5J_1(\omega) + 2J_2(2\omega)]$ avec $J_1(\omega) = \frac{\tau_c}{1+\omega^2\tau_c^2}$, pour J_0 et J_2 il faut remplacer ω par 0 et 2ω respectivement. Il est possible de faire l'approximation du rétrécissement extrême i.e. les molécules ont un mouvement rapide et $\omega\tau_c << 1$. Ainsi la formule devient $\frac{1}{T_2} = \frac{3\gamma^4\hbar^2}{20\,r^6}\,[3\tau_c + 5\tau_c + 23\tau_c]$ soit $\frac{1}{T_2} = \frac{3\gamma^4\hbar^2}{2\,r^6}\,\tau_c$. Le τ_c représente les mouvements globaux des liposomes. Il est défini par l'Équation 8. Cette formule fait l'hypothèse que l'objet étudié est une sphère pleine. Ensuite T_2 des liposomes est estimée à partir de l'Équation 9 et de la mesure de la largeur de raie des signaux à 2,80 ppm et 3,25 ppm.

$$\tau_c = \frac{4\pi\eta r^3}{3kT}$$

Équation 8, avec η la viscosité du tampon, r le rayon de l'objet, k la constante de Boltzmann (1,38 x 10-23 J.K^{-1}) et T la température.

$$T_2 = {}^1\!/_{(\pi W_{1/2})}$$

Équation 9, avec $W_{1/2}$ la largeur à mi-hauteur d'un signal en Hz.

	5 °C		40 °C	
δ ^{1}H (ppm)	**T_2 (ms)**	**τ_c (ms)**	**T_2 (ms)**	**τ_c (ms)**
2,80	0*	1,7	6	0,6
3,25	5		10	

*Tableau 8 : Détermination de T_2 et τ_c de deux signaux de protons de phospholipides à 5 et 40 °C. Les valeurs de viscosités utilisées sont 1,52×10^{-3} Pa.s à 5 °C et 0,65×10^{-3} Pa.s à 40 °C. * signal très large.*

Le Tableau 8 montre les valeurs de T_2 et τ_c calculé pour deux signaux de protons des phospholipides. Les différences de T_2 entre 5 et 40 °C pour chaque signaux montrent que la valeur de τ_c affecte peu le T_2. L'accélération des mouvements globaux des liposomes en solution lorsque la température augmente

n'est donc pas à l'origine de l'augmentation d'intensité des signaux des liposomes, mais d'autres mouvements locaux sont en jeu. Pour que ces signaux apparaissent sur les spectres, il faut donc que la structure des liposomes perde en rigidité. Ainsi ces données mettent en avant la fluidification de la bicouche des liposomes lorsque la température augmente et concorde avec la littérature (Eeman and Deleu, 2010).

b) Détermination de la température de transition des liposomes soniqués blancs par RMN 1D ^{1}H

La T_m est définie comme la température où la même quantité de phospholipides est en phase fluide et en phase gel. La phase fluide correspond à un état où les phospholipides gagnent en mobilité, la membrane des liposomes est alors fluide. Le paragraphe ci-dessus (a) montre que la fluidité peut être observée par RMN 1D ^{1}H. L'objectif de ce paragraphe est de déterminer la T_m des liposomes à partir de ces données RMN.

La littérature montre qu'il est possible de déterminer la T_m de liposomes par RMN du proton (Pentak, 2014). Le principe est de suivre l'intégrale des signaux correspondant aux protons des têtes polaires des phospholipides à différentes températures. En dessous de la T_m, ces signaux ne sont pas visibles ou de faible intensité, tandis qu'au-dessus les signaux deviennent intenses. L'augmentation de la température permet d'augmenter la dynamique des lipides dans la bicouche et ainsi d'observer leurs signaux sur les spectres. Par conséquent, il est possible d'estimer les proportions de phospholipides dans les deux phases. L'évolution de l'intégrale de ces signaux en fonction de la température est idéalement une sigmoïde dont le point d'inflexion correspond à la T_m de l'échantillon. Pour appliquer ce raisonnement, il faut faire l'hypothèse que l'intégrale des signaux dans chacune des phases ne dépend pas de la température. Dans ce cas, l'intégrale devrait atteindre un plateau correspondant à 100 % de la forme fluide. En revanche si l'intensité continue à augmenter sans atteindre de plateau, cela signifierait que la dynamique, et donc la relaxation et l'intensité des protons concernés, de la forme fluide est affectée par la température.

L'intégrale des signaux de la tête polaire des phospholipides, entre 3,16 et 3,33 ppm, a donc été tracée en fonction de la température (Figure 69). La courbe obtenue peut être ajustée avec une double sigmoïde (Équation 10) dont les paramètres sont présentés Tableau 9, une sigmoïde simple ne permet pas d'ajuster correctement les points au niveau des températures 20 et 50 °C.

$$y = {}^{a}/_{(1 + e^{k_0*(Tm_0 - T)})} + {}^{b}/_{(1 + e^{k_1*(Tm_1 - T)})}$$

Équation 10, avec a et b le poids de chaque sigmoïde, $k_{0/1}$ des constantes reflétant la coopérativité de la transition (°C^{-1}), $T_{m0/1}$ les températures de transition (°C), T la température de la mesure (°C) et y l'intégrale du signal mesurée (normalisée entre 0 et 1).

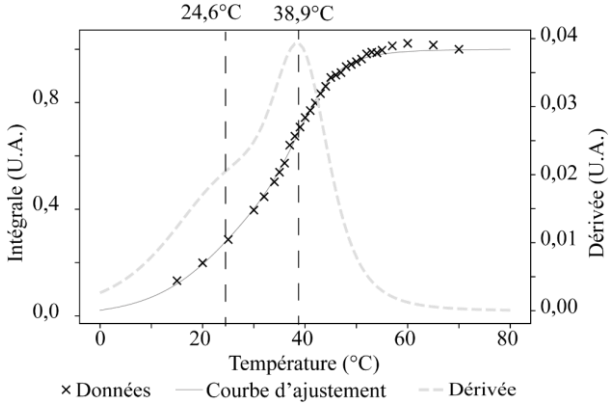


Figure 69 : Détermination de la T_m de liposomes soniqués blancs. Evolution de l'intégrale des signaux de la tête des phospholipides en fonction de la température (x), courbe d'ajustement de ces points et dérivée de la sigmoïde (--). T_m= 24,6 et 38,1 °C. S-CHOL12- Ø-J1-Tamb.

Liposomes	a	k_0 ($°C^{-1}$)	T_{m0} (°C)	b	k_1 ($°C^{-1}$)	T_{m1} (°C)
S-CHOL12	0,50 ± 0,16	0,12 ± 0,05	24,6 ± 4,8	0,52 ± 0,15	0,26 ± 0,06	38,1 ± 1,3

Tableau 9 : Récapitulatif des T_m mesurées et des différents paramètres de la sigmoïde.

Ainsi deux T_m, 24, 6 ± 4,8 et 38,1 ± 1,3 °C, sont obtenues. Il est important de remarquer que les signaux RMN 1D ^1H de la tête polaire sont visibles même à basse température. La sigmoïde ne démarre donc pas tout à fait à zéro ce qui biaise le calcul de la dérivée et donc les T_m. Les lipides de l'échantillon sont complètement en phase fluide quand l'intégrale du signal RMN ne change plus avec la température. La zone d'inflexion correspond à un état où la moitié des phospholipides de la bicouche se trouve dans l'état gel et l'autre moitié dans l'état fluide. Les valeurs de k_0 et k_1 représentent la coopérativité de la transition, plus la valeur est élevée plus la transition a une coopération élevée. Ici $k_1 > k_0$, donc la transition à 38,1 °C est plus coopérative que la transition à 24,6 °C. La transition à 38,1 °C a donc plus d'impact sur la structure des liposomes que celle à 24,6 °C. Dans la suite du manuscrit la transition la plus coopérative est appelée la « transition principale ». Les constantes a et b ne sont pas significativement différentes, les deux sigmoïdes semblent donc avoir des poids équivalents.

Les liposomes étudiés sont composés de DPPC et DMPG qui ont des T_m différentes : 41 et 23 °C respectivement. Un manque d'homogénéité dans la bicouche des liposomes pourrait expliquer que plusieurs T_m sont observées par formulation. Il y aurait des zones plus concentrées en certains lipides que d'autres, ce qui serait cohérent avec le fait que le cholestérol peut séparer les phospholipides d'une membrane mixte. La répartition en taille des liposomes peut aussi expliquer ces T_m. En effet il est possible que la T_m des liposomes dépende de leur taille. Si les liposomes sont multi-lamellaires il se peut que les différentes bicouches n'aient pas toutes la même T_m.

Cependant, il est probable que les signaux intégrés ne correspondent pas à des signaux de phospholipides. En effet, d'autres zones des spectres ont été étudiées : 5,10 ppm, 1,13 ppm et 0,70 ppm, correspondant aux protons des phospholipides. L'évolution de l'intégrale de ces signaux est linéaire

avec la température pour les liposomes contenant du cholestérol. Lorsque les liposomes ne contiennent pas de cholestérol, il existe une transition mais aucun plateau n'est observé au-dessus de la Tm, l'intensité des intégrales continue à augmenter linéairement avec la température. Ainsi ces signaux sont dépendant de la température contrairement aux signaux entre 3,16 et 3,33 ppm. Il semblerait donc qu'il y ait un biais sur les signaux observés entre 3,16 et 3,33 ppm . Cette technique mériterait une étude plus approfondie. Une analyse compléte sera présenter dans un article à venir.

c) Structure des liposomes soniqués blancs par RMN ^{31}P à différentes températures

La RMN ^{31}P est une méthode couramment utilisée pour étudier les membranes. Les atomes de phosphore sont de bons indicateurs de la structure et de la mobilité des phospholipides dans la membrane (McLaughlin *et al.*, 1975; Schiller *et al.*, 2007). L'objectif est d'obtenir des informations sur la forme des vésicules présentes dans les échantillons et sur l'impact de différents paramètres, tels que la température ou la quantité de cholestérol, sur la structure des liposomes et la mobilité des phospholipides dans la membrane.

Comme les liposomes sont des objets de haut PM, les mouvements d'ensemble et les mouvements locaux ne sont pas suffisamment rapides pour moyenner l'anisotropie de déplacement chimique des atomes de phosphore 31. L'idéal aurait été de disposer d'une sonde RMN solide pour acquérir des spectres RMN ^{31}P mais cela n'a pas été le cas. La sonde solide permet d'appliquer des impulsions de puissance plus importante qu'avec une sonde liquide, ce qui permet d'utiliser des impulsions plus courtes et donc d'exciter une plus grande gamme de déplacements chimiques. Les analyses ont ainsi été réalisées sur un spectromètre 600 MHz avec une sonde liquide BBO. La première étape a été d'optimiser les paramètres de l'acquisition. Une séquence simple a été choisie avec une seule impulsion d'excitation de 30° suffisamment courte pour exciter tout le spectre, avec un délai de recyclage (d1) suffisamment long pour permettre un retour à l'équilibre des spins selon T_1. Une série de spectres a été enregistrée pour optimiser la durée de l'impulsion p1, le délai d1 et NS. L'objectif est de choisir une impulsion permettant d'exciter toute la gamme de fréquences de l'atome de phosphore (de -250 à 250 ppm). L'impulsion de 90° (p1) a été calibrée sur un échantillon d'acide phosphorique, p1 = 32,5 µs pour une puissance de 7 692 Hz. Cette puissance sera conservée pour l'acquisition de tous les spectres RMN ^{31}P. Et le p1 calibré servira de base pour l'optimisation sur les échantillons de liposomes.

La Figure 70 montre que des signaux isotropes (signal RMN fin et symétrique, lié à un objet dont les propriétés n'ont pas de dépendance directionnelle) et des signaux anisotropes (signal plus large et non symétrique, lié à un objet dont les propriétés ont une dépendance directionnelle) sont observés sur les spectres. L'intensité des signaux est maximale pour un p1 de 32,5 µs, un d1 de 3 s lorsque les acquisitions sont réalisées à 5 °C pour la séquence zg30. Cette séquence correspond à une impulsion de 30° (0,33*p1), théoriquement, suivie de l'acquisition. En ajustant les 4 spectres à la même intensité, les signaux se superposent exactement, *i.e.* le signal isotrope et anisotrope sont affectés de la même manière

par les paramètres testés. Les paramètres d'acquisition utilisés sont donc optimisés pour le signal symétrique et asymétrique. L'utilisation d'un découplage proton (zgcw30) permet d'empêcher les couplages ^{31}P-^{1}H et ainsi d'augmenter l'intensité des signaux. Cependant, pour ces échantillons, une baisse d'intensité est observée pour les spectres avec un découplage par rapport aux acquisitions zg30. L'utilisation d'une impulsion ^{31}P plus longue que 10,8 µs (0,33 x 32,5 µs) diminuerait la zone du spectre excitée et ne permettrait pas d'observer les composantes anisotropes larges de ces spectres. Un NS de 8 000 est suffisant pour observer toutes les composantes du signal, l'acquisition est alors de 3 h. Un délai d1 plus court que 3 secondes réduit aussi l'intensité des signaux. La séquence utilisée par la suite est donc la séquence Bruker zg30 avec pour paramètres d1 = 3 s, p1= 32,5 µs et un temps d'acquisition de 53 ms. Typiquement, des concentrations de 25 et 50 mg.mL^{-1} de liposomes sont utilisés pour les analyses. Les déplacements chimiques des atomes de phosphore sont référencés à partir d'un échantillon d'acide phosphorique dont le signal est à 0 ppm.

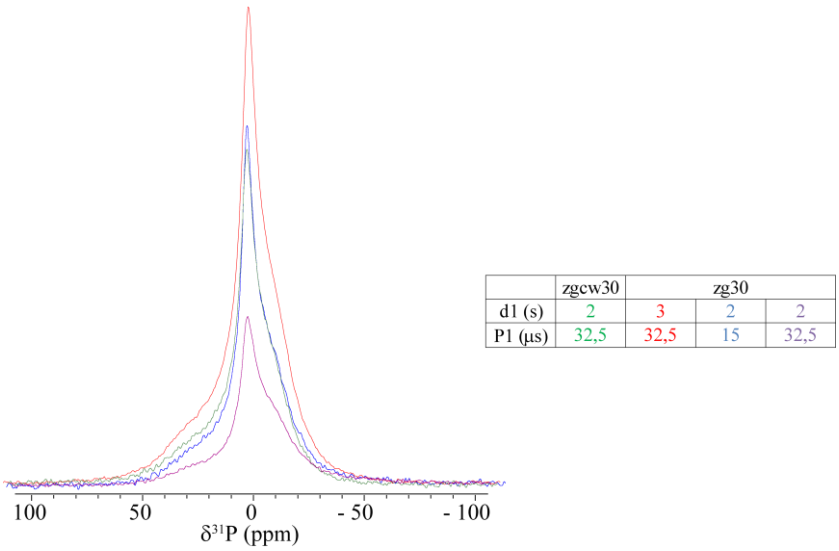


Figure 70 : Spectre RMN ^{31}P de liposomes blancs (DMPG-DPPC-CHOL) à 5 °C. Séquence zgcw30, vert : d1 = 2s P1 = 32,5 µs. Séquence zg30, bleu : d1 = 2s p1 = 15 µs (soit 5 µs pour l'impulsion 30°) ; rouge : d1 = 3s p1 = 32,5 µs (soit 10,8 µs pour l'impulsion 30°) ; violet : d1 = 2s p1 = 32,5 µs. [liposome] = 60 mg.mL^{-1}, HEPES80 mM NaCl 100 mM pH 7,4, 5 °C, ^{31}P 243 MHz. S-CHOL12-Ø-J1-T5.

Maintenant que les paramètres d'acquisition sont validés, il est possible d'observer plus en détails les données. Le spectre RMN ^{31}P de liposomes blancs à 5 °C montre deux composantes : une composante isotrope, centrée à 2,8 ppm, et une composante anisotrope. La composante anisotrope correspond à un objet rigide et sa forme de raie est caractéristique des liposomes présentés dans la littérature (Dufourc, Smith and Dufourcq, 1986; Mertins *et al.*, 2010). La composante isotrope, avec une largeur à mi-hauteur de 5 ppm montre qu'une partie flexible est présente dans l'échantillon. D'après la littérature (Schiller *et*

al., 2007) cette composante pourrait correspondre à des micelles (largeur à mi-hauteur de 20 ppm (Dufourc, Smith and Dufourcq, 1986)) ou bien une partie plus fluide des liposomes.

La Figure 71 montre qu'en augmentant la température des échantillons la composante isotrope s'affine et augmente en intensité. La composante anisotrope diminue en intensité. Il y a donc un changement de population entre les deux états ou les deux objets. Ces résultats peuvent être corrélés avec ceux obtenus par RMN 1D ^{1}H, où l'augmentation de la température permettait d'augmenter la fluidité dans les bicouches de liposomes avec le passage de la bicouche d'un état gel à fluide.

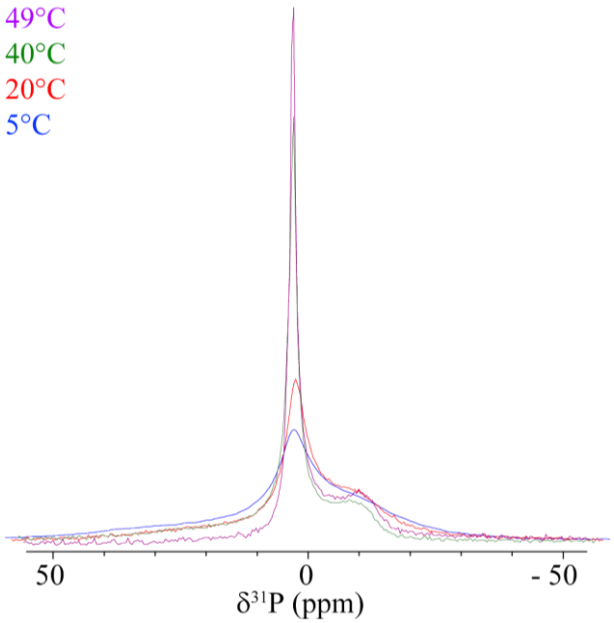


Figure 71 : Spectres RMN ^{31}P de liposomes blancs à différentes températures. 5 °C. (bleu) 20 °C (rouge) 40 °C (vert) 49 °C (fuchsia). [Liposome] = 60 mg.mL^{-1}, HEPES 80mM NaCl 100mM, ^{31}P 243 MHz. S-CHOL12-Ø-J1-T5

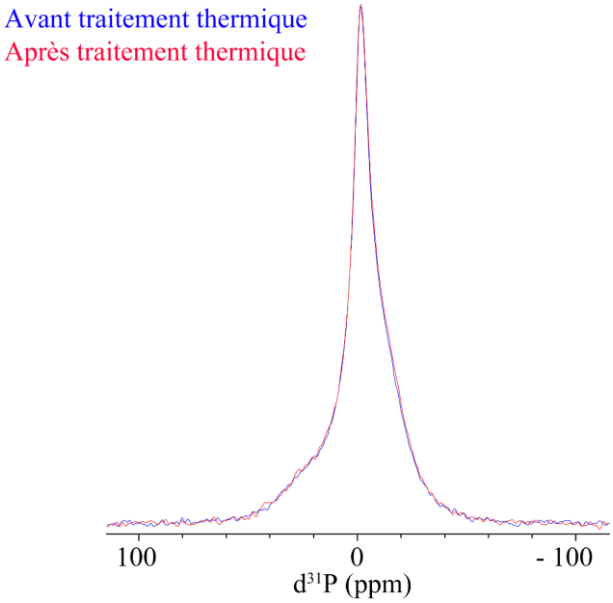


Figure 72 : Spectres d'un échantillon de liposomes blancs à 5 °C avant (bleu) et après (rouge) un traitement thermique à 50 °C pendant 19 h. [liposome] = 60mg.mL^{-1}, HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4, 5 °C, ^{31}P 243 MHz. S-CHOL12-Ø-J1-T5.

La Figure 72 montre la superposition des spectres de liposomes blancs enregistrés à 5 °C avant et après un traitement thermique à 50 °C pendant 19 h. Les formes des signaux avant et après traitement thermiques sont identiques. L'effet de la température sur l'échantillon semble réversible. Ceci suggère que le signal isotrope est donc plutôt une partie fluide dans la bicouche des liposomes plutôt qu'une micelle. Les données RMN ^{31}P sont cohérentes avec les données RMN 1D ^{1}H et montrent que chauffer l'échantillon permet d'augmenter la fluidité de la bicouche.

d) Structure des liposomes soniqués blancs par cryo-TEM et DLS

Jusqu'ici la RMN a été utilisée pour caractériser les liposomes, mais cette méthode ne permet pas d'observer directement leurs formes ni de mesurer la taille des vésicules. La taille des liposomes a donc été mesurée par DLS et comparée aux mesures réalisés sur des images de microscopie électronique. Cette dernière méthode permet d'avoir une image directe des liposomes.

La taille des liposomes blancs soniqués a été mesurée par DLS sur 3 préparations différentes. Les solutions ont été analysées entre 1 et 3 jours après leurs préparations, laissant le temps aux liposomes de s'équilibrer. Pour pouvoir comparer les données avec celles présentées plus tard, obtenues par cryo-TEM, la taille de particules utilisées est la taille, en fonction des volumes. La moyenne sur trois mesures d'un même échantillon ainsi que l'écart type sur ces trois mesures permettent d'obtenir 77 ± 31 nm. La polydispersité est ensuite calculée avec l'Équation 11.

$$PdI = \left(\sigma/_{moyenne}\right)^2$$

Équation 11, avec σ l'écart type des valeurs utilisés pour la moyenne.

Cette formule fait l'hypothèse que la forme du signal est gaussienne et que le pic est unique. La Figure 73 montre que la distribution des particules est composée de deux gaussiennes : le pic majoritaire est à 50 nm et un second pic se trouve à 500 nm correspondant à quelques liposomes de grandes tailles. La polydispersité de ces liposomes soniqués a donc été calculée sur le pic majoritaire et est de 0,16.

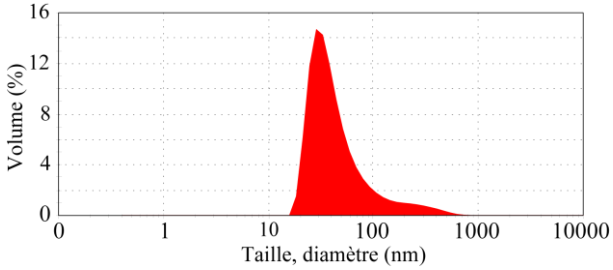


Figure 73 : Distribution de la taille des liposomes soniqués blancs à 25 °C. S-CHOL12-Ø-J1-Tamb

Un échantillon de liposomes soniqués blancs a été analysé par cryo-TEM sans dilution : la concentration totale en lipides est de 60 mg.mL^{-1}. Les mesures ont été faites par le Dr. Eric Larquet à l'Ecole Polytechnique. Les échantillons sont déposés sur des plaques de carbones possédant des cavités. Les

jonctions entre le support en carbone et les cavités dans lesquels est retenu l'échantillon sont facilement identifiables sur les images.

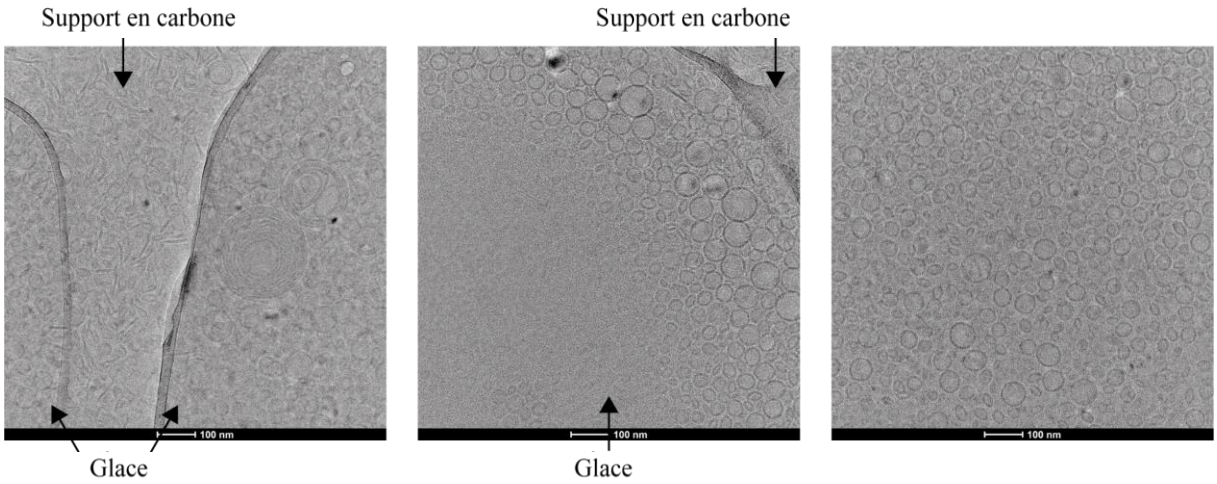


Figure 74 : Image cryo-TEM de liposomes blancs préparés par sonication. S-CHOL12-Ø-J1-Tamb.

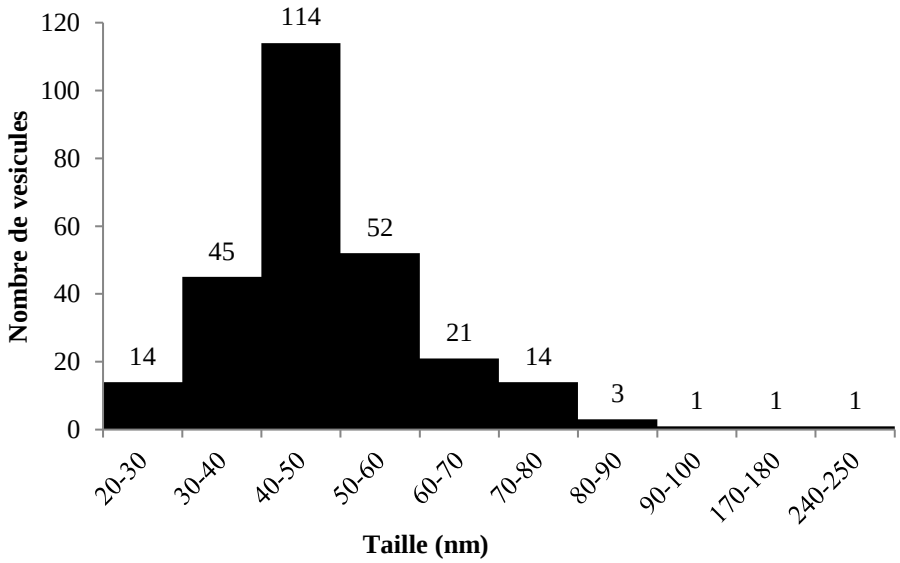


Figure 75 : Distribution en taille des liposomes blancs préparés par sonication. S-CHOL12-Ø-J1-Tamb.

Sur l'image la plus à gauche de la Figure 74, il y a à gauche un compartiment qui est un trou rempli d'échantillon, au centre une zone de carbone et à droite un second trou rempli d'échantillon. L'image centrale de la Figure 74 ne comporte qu'une toute petite partie carbone en haut à droite. Les liposomes dans le trou sont principalement situés proche des bords et ils sont triés par tailles : plus ils sont proches du bord plus les diamètres des liposomes sont grands. Ceci montre que la glace de cet échantillon est fine : l'épaisseur au centre des trous est trop fine pour accueillir des liposomes. Les images montrent que les objets présents dans les échantillons sont des vésicules sphériques possédant une bicouche. Il y a beaucoup de SUV et deux grands MLV sur l'image à gauche de la Figure 74. En dehors des trous, sur les parties en carbone de la plaque de l'échantillon, il y a des filaments, des bicouches planes ou des vésicules aplaties. Les tailles des SUV semblent hétérogènes. Le diamètre de 266 liposomes a été mesuré

à l'aide du logiciel ImageJ pour évaluer la taille moyenne et la polydispersité de l'échantillon (Figure 75). Le diamètre moyen des liposomes est de 50 nm, les plus petits ont une taille de 20 à 30 nm et le plus gros de 240 à 250 nm. A partir de ces données, la polydispersité des liposomes est déterminée avec la même formule utilisée pour les données DLS (Équation 11), ce qui permettra de les comparer. Le PdI calculé est de 0,15.

Le Tableau 10 résume les mesures réalisées avec les deux techniques d'analyses, DLS et cryo-TEM. Le diamètre moyen des liposomes est surestimé en DLS par rapport à la valeur obtenue par cryo-TEM. La différence entre ces valeurs peut s'expliquer en regardant les limites des deux méthodes. Dans le cas de la DLS, les grosses particules ont un poids plus important que les petites particules dans le calcul de la moyenne : elles font donc tendre la moyenne de la taille des liposomes vers une valeur supérieure. Il est aussi possible que les liposomes multicouches impactent la mesure de la taille moyenne des liposomes par DLS. Dans le cas de la cryo-TEM, la méthode de congélation de la plaque tend à trier les liposomes en fonction de leurs tailles et éjecter les particules les plus grandes. Cette observation est d'autant plus vraie lorsque la concentration en particules est élevée, ce qui était le cas ici. Ceci s'explique car la glace n'est pas homogène sur le support. En effet la glace est mince au centre des cavités et épaisse en bordure. Ainsi, si les liposomes ont un diamètre supérieur à l'épaisseur de la glace, ils sont soit éjectés du support soit écrasés. Cependant si les incertitudes des moyennes de diamètres sont prises en compte les deux valeurs se recouvrent. Il n'y a donc pas de différence significative entre les mesures réalisées avec ces deux techniques. De plus leurs PdI sont identiques. Les résultats obtenus avec les deux méthodes sont donc cohérents.

	Taille (nm)	**PdI**
DLS	62 ± 5	0,29
Cryo-TEM	49 ± 19	0,15

Tableau 10 : Taille moyenne et de polydispersité de liposomes soniqués obtenues par DLS et cryo-TEM.

Pour conclure, la préparation de liposomes par sonication permet de former de petits liposomes, majoritairement uni-lamellaires, avec une taille moyenne de 50 nm. Pour rappel, les données RMN ^{31}P montraient qu'un signal isotrope était présent sur les spectres des liposomes soniqués mais pas des liposomes extrudés. Ainsi, ces signaux isotropes pourraient être dû à la présence de très petits liposomes ainsi qu'à l'augmentation de la fluidité dans la bicouche des liposomes. Les « filaments » sur le support en carbone correspondent sûrement à des liposomes aplatis ou éclatés pendant la préparation des échantillons.

2.2.2 Impact de la durée de la sonication sur la structure des liposomes

Les mesures de tailles réalisées précédemment par DLS montrent une certaine variabilité entre les échantillons. L'étape de sonication dans le protocole de préparation des liposomes a été identifiée comme l'étape pouvant créer le plus de variabilité. Ainsi l'objectif de cette partie est de mettre en

évidence l'impact de la sonication sur la structure des liposomes et d'observer l'effet de la température sur des liposomes préparés avec différents temps de sonication.

a) Liposome sans sonication : « Giant Multilamellar Vesicles »

Les « Giant Multilamellar Vesicles » (GMV) sont préparées avec la formulation classique de phospholipides et ne subissent aucune étape de sonication ou extrusion. Les vésicules se forment par agitation lors de l'hydratation du film de lipides. Cependant l'échantillon se décante lentement au cours du temps laissant apparaître clairement deux phases : une phase supérieure limpide ne contenant *a priori* que du tampon et une phase inférieure, laiteuse, contenant les vésicules.

Des spectres RMN ^{31}P de l'échantillon ont été enregistrés à différentes températures pour observer l'effet sur la structure de ces vésicules. L'échantillon était homogénéisé entre chaque analyse pour s'assurer que des vésicules se trouvaient dans la zone d'analyse du spectromètre et que l'échantillon n'était pas entièrement décanté à la fin de chaque enregistrement.

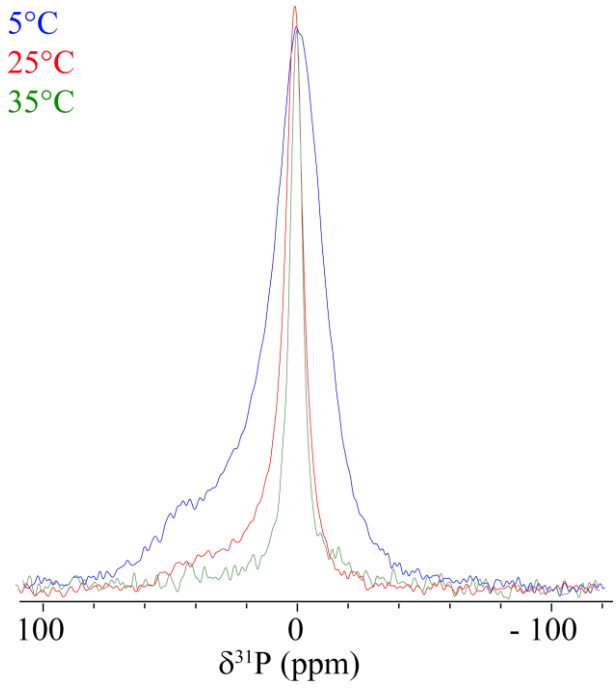


Figure 76 : Signaux RMN ^{31}P de liposomes blancs à différentes températures, ^{31}P 243 MHz. Ø-CHOL12-Ø-J0-Tamb.

La Figure 76 montre que le signal des atomes de phosphore 31 à 5 °C est anisotrope, il correspond à un spectre de « poudre » où toutes les orientations sont équivalentes, mais les contributions des différentes parties du signal ne sont pas les mêmes que celle obtenues avec les liposomes extrudés ou soniqués : aucune composante isotrope n'est observée à 5 °C. En augmentant la température le signal s'affine. La superposition des spectres réalisés à 5 °C avant et après les différentes mesures à hautes températures montre que ces spectres sont identiques : la température a donc un effet réversible sur ces liposomes.

Les acquisitions de spectres RMN 1D ^{1}H entre 5 et 42 °C de l'échantillon n'ont pas permis d'observer de signaux correspondant aux phospholipides. Les acquisitions ^{1}H étant courtes (< 5 min), l'échantillon

n'avait pas le temps de décanter suffisamment dans le tube RMN pour observer l'apparition des deux phases. Des liposomes sont donc bien présents au niveau de la bobine du spectromètre lors des acquisitions.

L'analyse par DLS n'a pas non plus apporté de réponse quant à la taille des liposomes non soniqués en fonction de la température. La taille moyenne des particules est très grande (> 5 000 nm) (Figure 77), ainsi que la polydispersité (supérieure à 0,7), rendant impossible l'observation de variation de taille lors des changements de température.

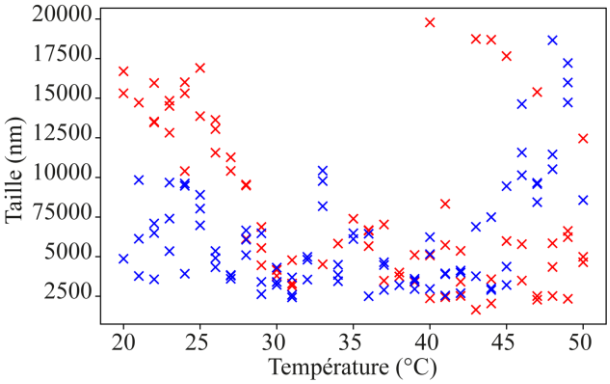


Figure 77 : Evolution de la taille des GMV en fonction de la température. Montée en température en rouge et descente en température en bleu. Ø-CHOL12-Ø-J0-Tamb.

b) Liposomes avec différentes durées de sonication

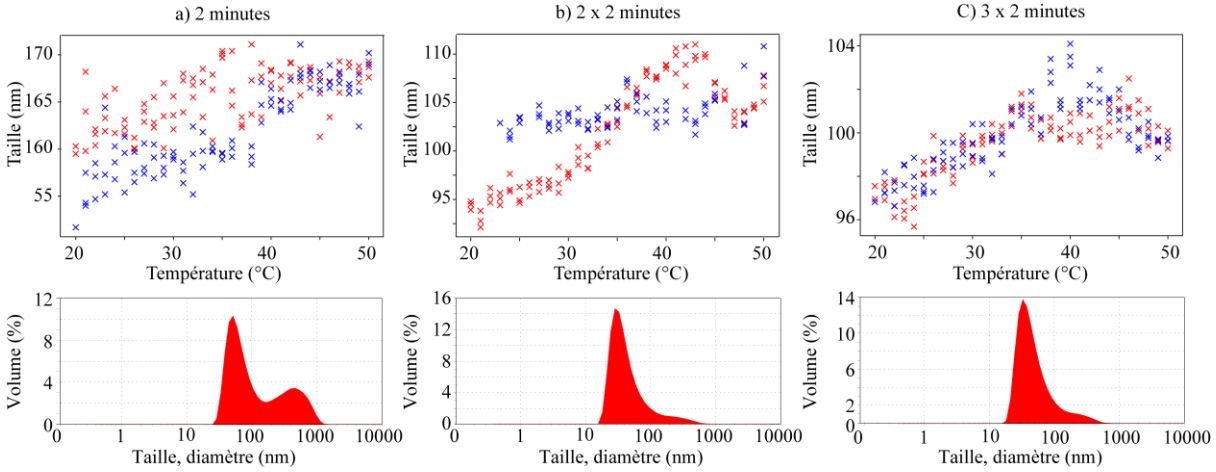


Figure 78 : Evolution de la taille des vésicules en fonction de la température. Les vésicules ont été soniquées (a) 2 minutes, (b) 2 x 2 minutes et (c) 3 x 2 minutes. S-CHOL12-Ø-J0-Tamb. (a) la taille moyenne est estimée à 161 ± 2 nm avec un PdI de 0,41 (b) la taille moyenne est estimée à 101 ± 2 nm avec un PdI de 0,34 (c) la taille moyenne est estimée à 99 ± 1 nm avec un PdI de 0,28.

L'effet du temps de sonication sur les vésicules a ensuite été observé. D'abord par DLS, la Figure 78 montre que la valeur du PdI diminue avec la durée de sonication. Il ne semble pas y avoir de différences significatives de taille entre les liposomes soniqués 2 x 2 minutes et 3 x 2 minutes à 25 °C. En revanche,

l'évolution de la taille des liposomes en fonction de la température est différente entre les deux échantillons. L'évolution de la taille des particules lorsque la température augmente est en rouge et l'évolution de la taille des particules lorsque la température diminue, après la phase d'augmentation, est en bleu. Ces évolutions sont identiques pour les liposomes soniqués 3 x 2 minutes, montrant que l'effet de la température est réversible sur cet échantillon, alors que ces évolutions sont différentes dans le cas de l'échantillon 2 x 2 minutes. La taille des liposomes augmente avec la température mais ne retourne pas à son état initial lorsque la température diminue. Cette augmentation de taille avec la température peut être expliquée par une augmentation de la fluidité des phospholipides dans la bicouche des liposomes avec l'augmentation de la température, ce qui est cohérent avec les observations réalisées précédemment sur les spectres RMN 1D ^{1}H et ^{31}P. En revanche la taille des liposomes soniqués 2 minutes et 2 x 2 minutes ne suit pas la même courbe quand la température monte (points rouges) et quand la température descend (points bleus). L'effet de la température sur ces deux formulations ne semble pas réversible, ce qui n'est pas cohérant avec l'analyse faite par RMN ^{31}P sur les liposomes soniqués 2 x 2 minutes. Les liposomes soniqués 3 x 2 minutes semblent avoir un comportement réversible avec les changements de température. En observant les distributions de tailles par DLS après le traitement thermique de ces solutions, les proportions des deux gaussiennes changent. La proportion de particules proche de 500 – 1 000 nm augmente. Cette observation n'est pas faite pour les liposomes soniqués 3 x 2 minutes. Il semblerait donc qu'augmenter le temps de sonication diminuerait le risque d'agrégation ou de fusion des liposomes lors d'un traitement thermique.

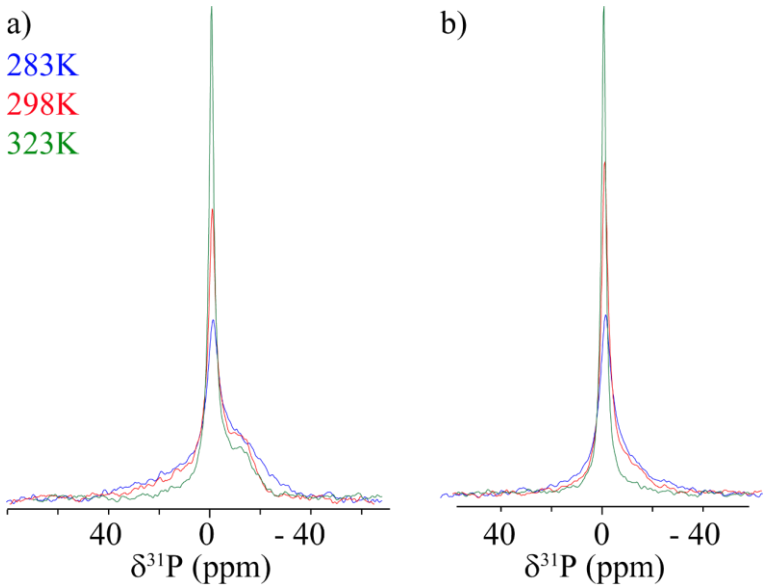


Figure 79 : Spectres RMN ^{31}P de liposomes blancs en fonction de la température et de la durée de sonication : (a) 2 minutes (b) 3 x 2 minutes. S-CHOL12-Ø-J0-Tamb.

Ces échantillons de liposomes préparés avec différents temps de sonication ont ensuite été analysés par RMN ^{31}P.

Les signaux RMN ^{31}P des liposomes soniqués 2 minutes (Figure 79a) contiennent une composante anisotrope et une composante isotrope alors que les signaux des liposomes soniqués 3 x 2 minutes (Figure 79b) ont une composante isotrope marquée et une composante anisotrope très faible. Pour rappel les spectres ^{31}P des GMV ne montrent aucune composante isotrope. Ceci suggère que la composante isotrope est due à l'étape de sonication des échantillons. Les liposomes de petites tailles (< 50 nm) semblent avoir des propriétés sans dépendance directionnelle, leur permettant d'avoir un signal relativement fin sur les spectres RMN ^{31}P.

Finalement, les liposomes soniqués 2 minutes et 2 x 2 minutes ont été observés par cryo-TEM pour comparer leurs tailles et leurs polydispersités. La comparaison des images, Figure 80, montre une grande différence de polydispersité entre les échantillons. Les mesures de taille des liposomes soniqués 2 minutes donnent 49 ± 23 nm avec un PdI de 0,23, et 49 ± 19 nm avec un PdI de 0,14 pour les liposomes soniqués 2 x 2 minutes. Leur taille moyenne est sensiblement la même (49 nm), mais la polydispersité est plus faible dans le cas des liposomes soniqués 2 x 2 minutes. La variation de polydispersité entre les deux modes de préparation est due aux LUV et MLV présent dans l'échantillon de liposomes soniqués 2 minutes, visibles sur les images de cryo-TEM. Pour conclure, la polydispersité des liposomes est très sensible à la durée de la sonication. Tout ceci concorde à ce que la sonication amène à former des petits liposomes plutôt homogènes de taille proche de 50 nm.

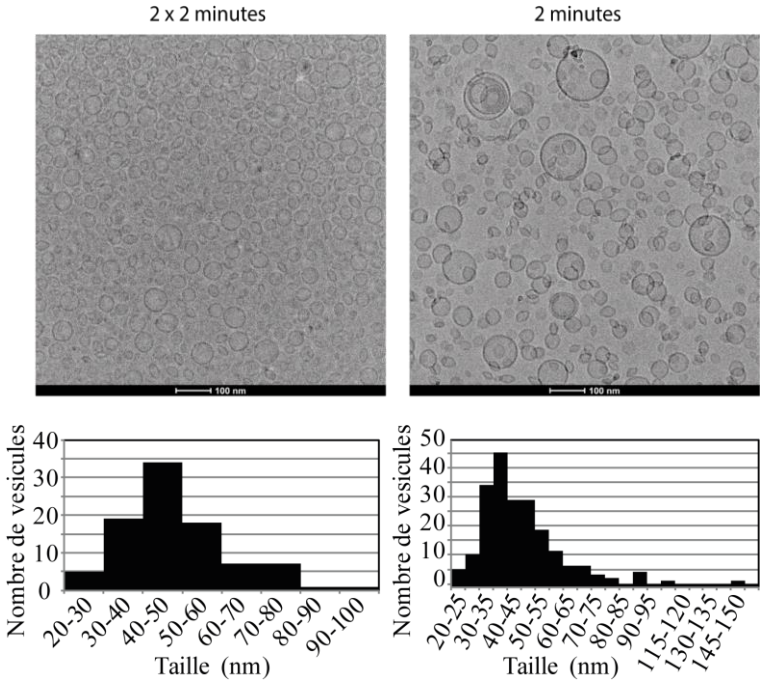


Figure 80 : Images cryo-TEM de liposomes avec différentes durées de sonication et leur distribution en taille. (2 x 2 minutes) 49 ± 19 nm avec un PdI de 0,14 (2 minutes) 49 ± 23 nm avec un PdI de 0,23

2.2.3 Structure des liposomes extrudés blancs

Les liposomes étaient initialement préparés par sonication, mais les premières expériences de cinétique de relargage ont mis en évidence un manque de reproductibilité. Une seconde méthode de fabrication a donc été mise en place : l'extrusion à travers une membrane avec une taille de pores de 100 nm.

a) Etude de la structure des liposomes extrudés blancs par cryo-TEM et DLS

De la même manière que pour les liposomes soniqués, les liposomes extrudés ont été observés directement par microscopie électronique. Les mesures de diamètres réalisées sur ces images ont ensuite été comparées avec les tailles de particules mesurées par DLS.

Les analyses DLS ont été réalisées sur 3 préparations de liposomes indépendantes, le jour même de leurs préparations. La moyenne de ces mesures donne une taille de 111 ± 1 nm et un PdI très faible de 0,09. La Figure 81 montre que les solutions sont presque mono-disperses.

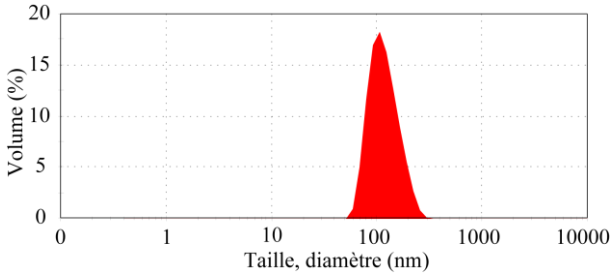


Figure 81 : Distribution de la taille des liposomes extrudés blancs à 25 °C. E-CHOL12-Ø-J0-Tamb

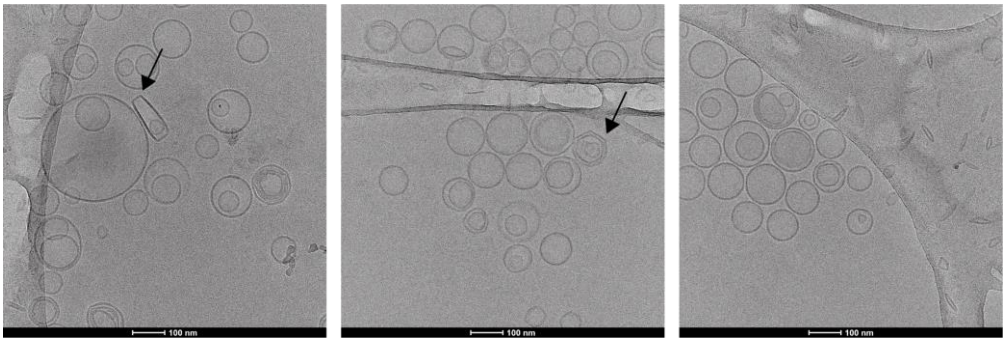


Figure 82 : Image cryo-TEM de liposomes blancs préparés par extrusion. E-CHOL12-Ø-J2-Tamb

Ensuite un échantillon de liposomes blancs extrudés a été étudié par cryo-TEM (Figure 82), avec une dilution au 1/10^{e} par rapport aux liposomes soniqués (*i.e.* 5 mg.mL^{-1} en lipides), deux jours après leurs préparations ils ont donc dû avoir le temps de s'équilibrer. L'observation des échantillons met en évidence la présence de liposomes au centre des trous de la plaque, c'est-à-dire que la glace formée lors des étapes de préparation est épaisse contrairement à l'échantillon précédent. Une glace épaisse évite de trier et éjecter les liposomes de la plaque en fonction de leurs tailles. Cette différence peut être due aux problèmes de manipulation rencontrés lors de l'insertion de l'échantillon dans l'appareil pour les liposomes soniqués et qui a conduit à un réchauffement de l'échantillon. La taille des liposomes est plus

grande que celle obtenue par sonication. La bicouche de certains liposomes forme des angles, marqués par des flèches sur la Figure 82. Ces angles pourraient être expliqués par la présence de cholestérol dans la formulation des liposomes. Comme montré Partie I - Chapitre 1, le cholestérol n'a pas la même affinité avec tous les phospholipides, il peut donc être réparti de manière hétérogène dans la membrane et former des discontinuités car la bicouche aura tendance à être plus épaisse dans les zones où se trouve le cholestérol. De plus le cholestérol augmente la rigidité des membranes. Donc les zones de la membrane chargées en cholestérol auront plus de difficulté à se courber que les zones pauvre en cholestérol, créant ainsi des angles. La membrane devra alors créer des angles pour pouvoir se refermer. Il y a très peu de liposomes de taille inférieure à 50 nm. 40 % des liposomes sur les images sont des MLV, principalement composés de 2 bicouches. Des ellipsoïdes ou des bâtonnets sur les zones de carbone sont aussi observables. Le diamètre moyen des liposomes de l'échantillon est de 102 ± 34 nm avec un PdI de 0,1. Ces valeurs ont été obtenues en mesurant 245 liposomes.

Le Tableau 11 récapitule les mesures obtenues par cryo-TEM et DLS. Comme pour les liposomes soniqués, la taille des liposomes est légèrement surestimée en DLS par rapport aux données obtenues par cryo-TEM. En prenant en compte les incertitudes, les deux valeurs ne sont pas significativement différentes. L'incertitude sur la taille des liposomes est 10 fois plus grande pour l'analyse cryo-TEM que DLS.

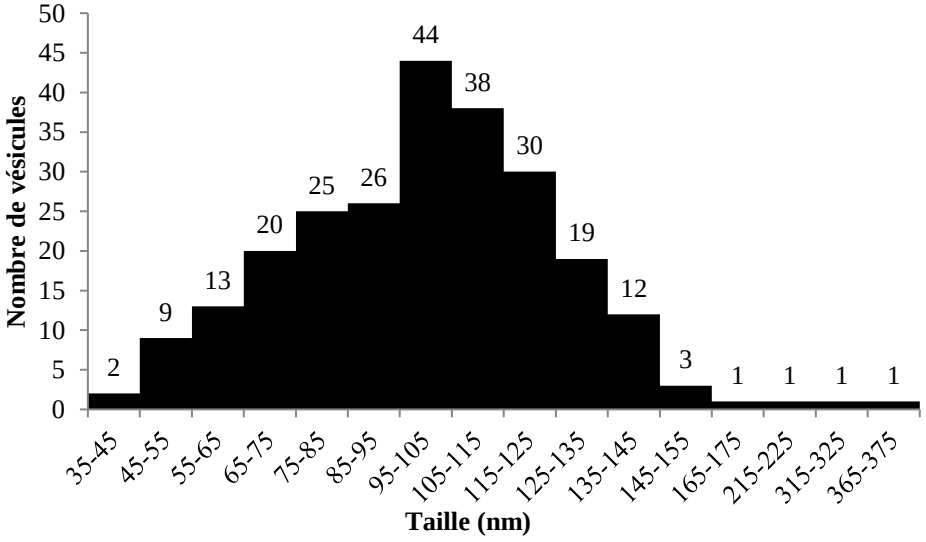


Figure 83 : Distribution en taille de liposomes blancs préparés par extrusion. E-CHOL12-Ø-J2-Tamb.

	Taille (nm)	**PdI**
DLS	119 ± 3	0,0005
Cryo-TEM	102 ± 34	0,11

Tableau 11 : Taille moyenne et polydispersité des liposomes extrudés blancs, obtenues par DLS et cryo-TEM.

Ces données montrent que la taille des liposomes soniqués, quelle que soit la méthode d'analyse, est inférieure à la taille des liposomes extrudés. La polydispersité des liposomes est plus faible dans le cas des liposomes extrudés par rapport aux liposomes soniqués 2 x 2 minutes qui ont un PdI de 0,15.

Dans le cas de liposomes composés de DPPC, DMPG et CHOL, la méthode d'extrusion permet donc de former des particules plus homogènes en taille mais hétérogènes en terme de lamellarité. Ceci va à l'encontre de ce qui est connu dans la littérature. Lapinski M. et al (Lapinski *et al.*, 2007) comparent des liposomes de 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) avec ou sans cholestérol préparés par sonication ou extrusion et montrent par TEM et DLS que les liposomes sont uni-lamellaires avec les deux formulations et protocoles de préparation. Il est aussi connu que la taille de liposomes peut varier énormément en fonction des phospholipides utilisés (Hope *et al.*, 1986). Il est donc probable que le nombre de bicouche des liposomes dépendent aussi des phospholipides utilisés ici.

b) Détermination de la température de transition des liposomes extrudés

En suivant la même méthode que précédemment avec les liposomes soniqués, il est possible de déterminer la T_m des liposomes en mesurant l'intégrale des signaux RMN 1D ^1H de la tête polaire des phospholipides à différentes températures (Figure 84). L'objectif est de déterminer si la méthode de préparation des liposomes a un impact sur leurs T_m.

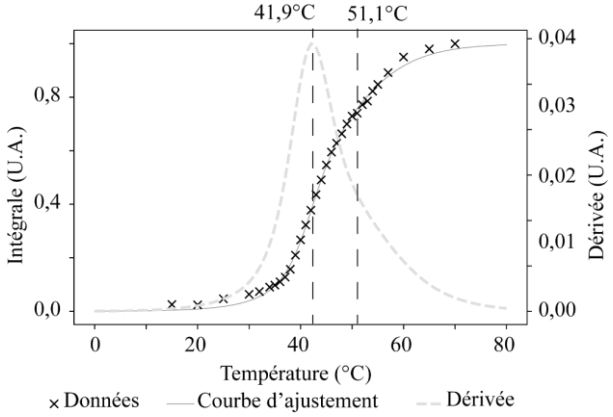


Figure 84 : Détermination de la T_m des liposomes blancs extrudés. Evolution de l'intégrale des signaux de la tête des phospholipides en fonction de la température (x), ajustement de ces points par une sigmoïde et dérivée de la sigmoïde (--). T_m= 41,9 et 51,1 °C. E-CHOL12- Ø-J0-Tamb

Liposomes	a	k_0 ($°C^{-1}$)	T_{m0} (°C)	b	k_1 ($°C^{-1}$)	T_{m1} (°C)
E-CHOL12	0,64 ± 0,11	0,14 ± 0,04	51,1 ± 5,1	0,43 ± 0,14	0,46 ± 0,11	41,9 ± 0,8

$$y = {}^{a}/_{(1 + e^{k_0*(Tm_0 - T)})} + {}^{b}/_{(1 + e^{k_1*(Tm_1 - T)})}$$

Tableau 12 : Récapitulatif des T_m mesurées et des différents paramètres de la sigmoïde.

Les intégrales mesurées en fonction de la température ont pu être ajustées à l'aide d'une double sigmoïde, une sigmoïde simple ne permettant pas d'ajuster les points entre 50 et 60 °C. Ainsi l'ajustement de la courbe permet d'obtenir deux T_m : 41, 9 ± 0,8 et 51,1 ± 5,1 °C. $k_1 > k_0$ donc 41,9 °C est la transition la plus coopérative (Équation 12). Les poids des deux sigmoïdes sont équivalents.

Les valeurs de T_m sont très différentes de celles obtenues pour les liposomes soniqués avec les mêmes proportions de lipides (pour rappel les T_m des liposomes soniqués sont de 24,6 ± 4,8 et 38,1 ± 1,3 °C).

La méthode de préparation des liposomes a donc un impact sur la T_m des liposomes. La comparaison de la sigmoïde obtenue pour les liposomes soniqués et extrudés montre que les gammes de T_m sont plus larges dans le cas des liposomes soniqués qu'extrudés. Les différences les plus notables entre ces liposomes sont leurs polydispersités et leurs tailles. La T_m des liposomes semble donc être corrélée à la structure et peut-être à la taille des liposomes. Ainsi des liposomes plus petits auraient une T_m plus basse que des liposomes plus larges. Il est possible que ces différences de Tm entre des liposomes de taille différente soient liées à leur rayon de courbure. Les SUV ont un rayon de courbure plus important que les LUV, ce qui engendre plus de contraintes dans leur bicouche et pourrait les rendre plus réactif à la température. Avoir une grande polydispersité de liposomes permettrait donc d'avoir une grande gamme de T_m, i.e. faible coopérativité pour la Tm.

c) Structure des liposomes extrudés par RMN 31P et comparaison avec les liposomes soniqués

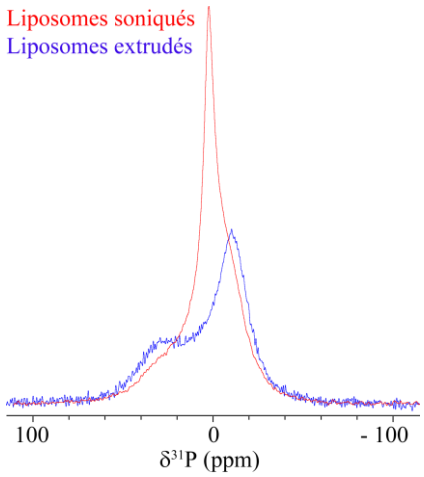


Figure 85 : Spectres RMN ^{31}P de liposomes soniqués et extrudés blancs à 5 °C. HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4. ^{31}P 243 MHz. S-CHOL12-Ø-J1-T5, E-CHOL12-Ø-J0-T5

Les spectres RMN ^{31}P ont été acquis avec les mêmes paramètres que ceux utilisés sur les liposomes soniqués. Le spectre de liposomes extrudés acquis à 5 °C (Figure 85) montre un signal très différent de celui obtenu avec des liposomes soniqués. Seul un signal anisotrope est observé pour les liposomes extrudés. Ce signal a une forme en adéquation avec la présence des liposomes (Partie I - Chapitre 2). En corrélant ces données avec les images de cryo-TEM, il est possible d'associer le signal isotrope sur les spectres à 5 °C, seulement présent sur le spectre des liposomes soniqués, aux SUV de taille inférieure à 50 nm présents en grande quantité dans les échantillons de liposomes soniqués.

L'analyse des liposomes extrudés blancs à différentes températures (Figure 86) montre que le signal anisotrope s'affine et augmente en intensité lorsque la température augmente. Les délais d1 utilisés pour ces acquisitions sont suffisamment longs pour que l'analyse soit quantitative. La bicouche des liposomes se fluidifie avec l'augmentation de la température.

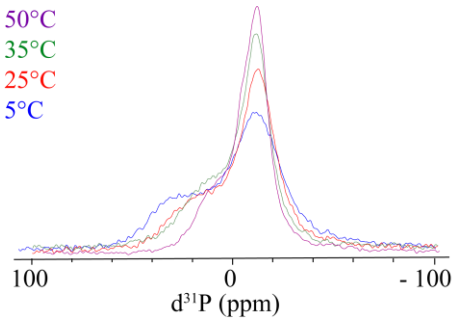


Figure 86 : Spectre NMR ^{31}P de liposomes extrudés blancs en fonction de la température. [liposome] = 60 mg.mL^{-1}. HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4. ^{31}P 243 MHz. E-CHOL12-Ø-J0-Tamb.

2.3. Effet de l'encapsulation de peptides dans des liposomes

L'intérêt des liposomes est de pouvoir transporter des PA pour les protéger une fois administrés mais aussi pour optimiser le relargage et donc l'administration du PA. L'objectif de cette partie est de déterminer si le comportement et la structure des liposomes sont affectés lorsque des PA sont encapsulés, quel que soit le mode de préparation.

Pour cela des analyses DLS, RMN ^{31}P et cryo-TEM ont été réalisées avec des peptides extrudés chargés de K14P et C16-K14P puis comparées avec celles obtenues par les mêmes techniques sur les liposomes blancs. Dans un deuxième temps les rendements d'encapsulation de K14P et C16-K16P ont été comparés pour les liposomes soniqués et extrudés.

2.3.1 Effet de l'encapsulation sur les liposomes soniqués

a) Impact de l'encapsulation de peptides sur la structure des liposomes soniqués étudié par RMN 1D ^{1}H

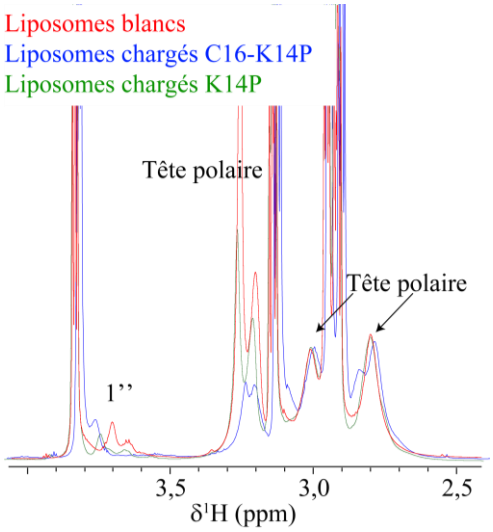


Figure 87 : Signaux des lipides des liposomes blancs ou chargés de K14P ou C16-K14P à 35 °C. [Liposome] = 60 mg.mL^{-1} (600 MHz), [K14P] = 840 µM (950 MHz), [C16-K14P] = 4,4mM (800 MHz), HEPES 80 mM NaCl 100mM, pH7,4. S-CHOL12- Ø -J0-Tamb, S-CHOL12-C0-J1-T5, S-CHOL12-C16-J0-Tamb.

La première étape est de déterminer si des peptides encapsulés affectent la structure des liposomes. La méthode la plus rapide est d'enregistrer un spectre 1D ^{1}H de liposomes avec différents chargements à haute température (*i.e.* température à laquelle les signaux des liposomes sont observables) et de le comparer au spectre équivalent de liposomes blancs. La comparaison des signaux correspondant aux chaînes des phospholipides et à leurs têtes polaires donnera des informations sur la fluidité de la bicouche et sur l'impact des peptides sur celle-ci.

La Figure 87 montre que les signaux correspondant aux protons des phospholipides qui composent les liposomes n'ont pas le même comportement en fonction du chargement des liposomes, principalement pour les signaux entre 3,2 et 3,5 ppm (*i.e.* signaux des protons des têtes polaires de phospholipides). Ces signaux sont plus intenses pour les liposomes blancs, puis les liposomes chargés de K14P et sont le moins intenses pour les liposomes chargés de C16-K14P. Il a été vérifié que la chaîne lipidique (C16) n'avait aucun signal ^{1}H entre 3,2 et 3,5 ppm à 35 °C pouvant se superposer avec les signaux des phospholipides. Les variations de ces signaux sont donc seulement dues à la présence des différents peptides. Ainsi l'encapsulation de peptides perturbe les protons de la tête polaire des liposomes, quel que soit le peptide encapsulé. Les protons de la tête polaire des phospholipides sont sûrement en interaction avec les peptides qui se collent à la membrane des liposomes, réduisant leur mobilité. La baisse d'intensité des signaux la plus importante est observée pour C16-K14P, suggérant que ce peptide a plus d'interactions avec les liposomes que K14P. Une explication serait que la chaîne lipidique de C16-K14P s'ancre dans la membrane des liposomes. En revanche, les signaux des protons des chaînes carbonées proches du groupement ester ne sont pas affectés par l'encapsulation, suggérant que la chaîne lipidique de C16-K14P ne s'ancre pas très profondément dans la membrane.

b) Impact de l'encapsulation de peptides sur des liposomes soniqués étudié par RMN ^{31}P

Ensuite l'impact de l'encapsulation d'un peptide sur la structure des liposomes a été étudié par RMN ^{31}P. L'intérêt de cette technique par rapport au paragraphe précédent est de pouvoir apporter des informations sur la structure des liposomes. Des spectres RMN ^{31}P ont été enregistrés à différentes températures, avec des liposomes chargés de K14P et C16-K14P puis les spectres ont été comparés avec ceux obtenus pour des liposomes blancs.

La superposition des spectres de liposomes chargés de K14P et de liposomes blancs ne montre aucune différence, suggérant que ce peptide n'affecte pas la bicouche des liposomes. En revanche des différences sont observées pour C16-K14P (Figure 88). L'impact de l'encapsulation d'un peptide possédant une ancre lipidique sur la structure des liposomes a donc été étudié plus en détail.

La superposition des spectres, à basse température, des liposomes soniqués blancs et chargés de C16-K14P montre que le signal des liposomes blancs contient une composante isotrope et une composante anisotrope, alors que les liposomes chargés de peptides n'ont qu'une composante anisotrope. La

composante isotrope avait précédemment été reliée à des liposomes de taille inférieure à 50 nm. Le peptide avec une chaîne lipidique semble donc structurer la bicouche des liposomes soniqués et favorise la formation de liposomes plus grands. A 35 °C, les liposomes blancs voient l'intensité de leur signal isotrope augmenter et la largeur du signal anisotrope diminuer. Pour les liposomes chargés de C16-K14P, la largeur du signal anisotrope diminue aussi (de 90 à 60 ppm) et son intensité augmente. Une composante isotrope (proche de 0 ppm) apparaît mais elle est de faible intensité. Ceci montre que l'encapsulation d'un peptide lipidé dans les liposomes permet aux liposomes de conserver leur rigidité lorsque la température augmente. De plus il n'y a pas de différence entre les spectres RMN ^{31}P à 5 °C avant et après avoir chauffé l'échantillon de liposomes chargés de peptides à 35 °C : l'effet de la température sur les liposomes semble donc réversible.

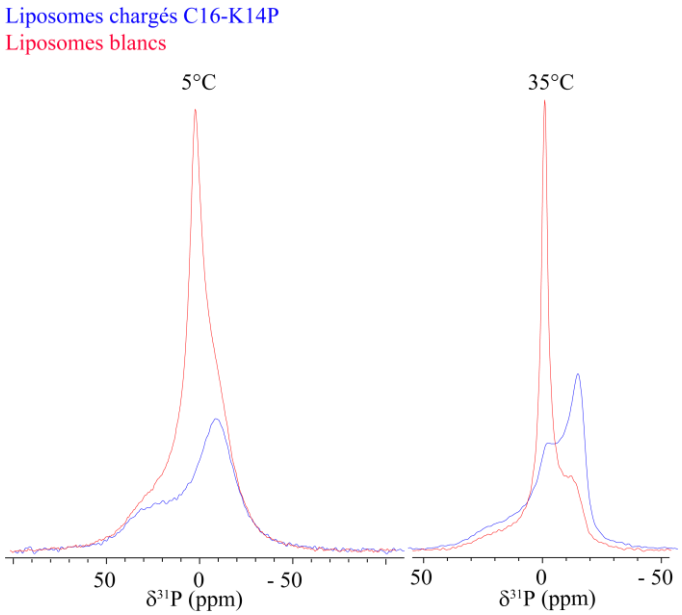


Figure 88 : Spectres RMN ^{31}P de liposomes soniqués blancs et chargés de C16-K14P à différentes températures. [liposome] = 60 mg.mL^{-1}, [C16-K14P] = 4,4 mM, HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4, ^{31}P 243 MHz. S-CHOL12-C16-J0-T5.

2.3.2 Effet de l'encapsulation sur les liposomes extrudés

a) Evolution de la taille des liposomes extrudés en fonction de leurs chargements par DLS

Les résultats précédents montrent que les liposomes soniqués sont très affectés par l'encapsulation de C16-K14P. Cette partie va permettre de déterminer si l'encapsulation affecte aussi la structure et les propriétés des liposomes extrudés.

La Figure 89 montre l'évolution de la taille des liposomes, par DLS, en fonction de la température. Les diamètres des liposomes à 20 °C sont différentes en fonction du chargement : 117 ± 1 nm pour les liposomes chargés de K14P, 127 ± 2 nm pour les liposomes chargés de C16-K14P et 122 ± 1 nm pour les liposomes blancs. Cependant l'évolution de la taille apparente des liposomes en fonction de la

température semble être linéaire, jusqu'à 50 °C pour les liposomes blancs et chargés de C16-K14P et jusqu'à 40 °C pour les liposomes chargés de K14P où un plateau semble être atteint. Les coefficients directeurs des droites formées sont équivalents pour les trois formulations (environ 0,8 nm.°C^{-1}). Il ne semble pas y avoir de différence significative visible sur les données DLS pour ces échantillons. De plus, les courbes obtenues en augmentant ou diminuant la température se superposent exactement montrant l'effet réversible de la température. Pour conclure, il semble que les peptides n'ont pas d'impact sur l'effet réversible de la température sur les liposomes ni sur l'évolution de la taille des liposomes en fonction de la température.

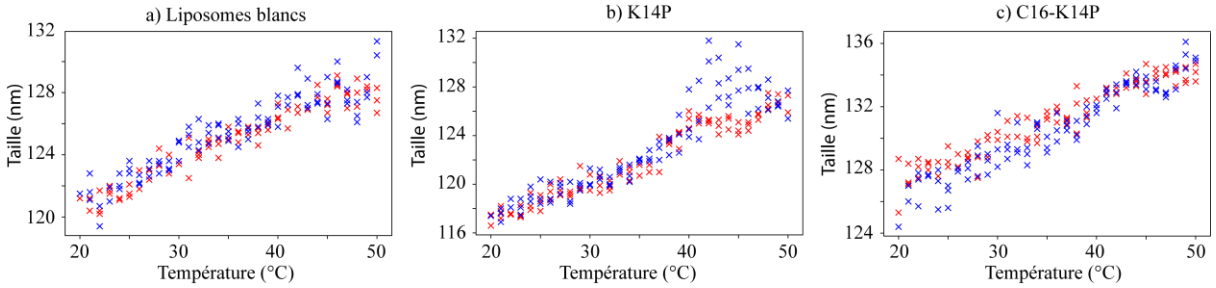


Figure 89 : Evolution de la taille des liposomes extrudés blancs ou chargés en fonction de la température, mesuré par DLS. Suivi de l'augmentation de la température en rouge puis de la diminution de la température en bleu. (a) E-CHOL12-Ø-J0 (b) E-CHOL12-C0-J1 (c) E-CHOL12-C16-J2

b) Impact de l'encapsulation de K14P sur les liposomes extrudés par RMN ^{31}P

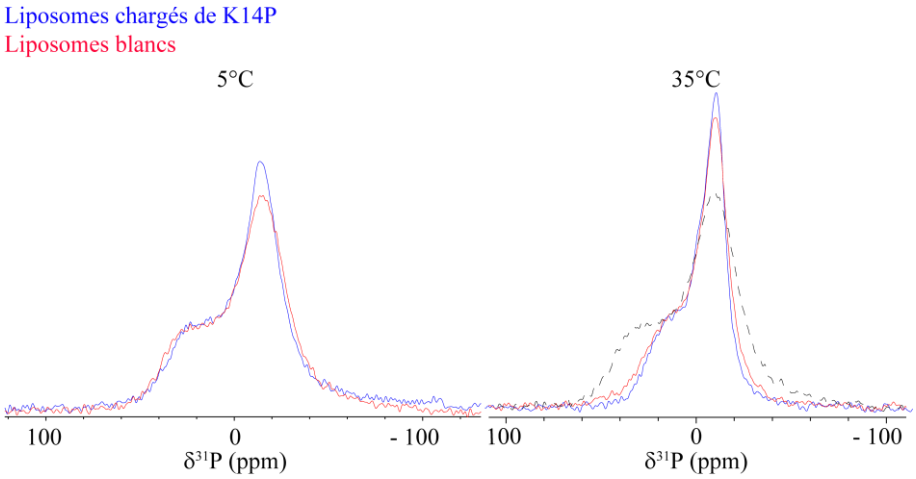


Figure 90 : Spectres RMN ^{31}P de liposomes extrudés blancs et chargés de K14P à différentes températures. [liposome] = 60 mg.mL^{-1}, [K14P] = 840 µM, HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4, ^{31}P 243 MHz. E-CHOL12- C0-J1-Tamb. Le signal en pointillé correspond aux liposomes blancs à 5 °C.

Des spectres RMN ^{31}P ont été acquis sur des liposomes blancs et chargés de K14P à différentes températures. La superposition de ces spectres permet de comparer les structures des liposomes et donc observer l'impact de K14P sur celle-ci.

La Figure 90 montre que les spectres de liposomes blancs et chargés de K14P à 5 et 40 °C se superposent bien. La forme des signaux est la même. Il y a donc peu de différences entre les deux échantillons à 5 et

40 °C. A 40 °C, la composante isotrope du signal est légèrement plus présente dans le cas des liposomes chargés de peptides. De plus la superposition des spectres avant et après traitement thermique ne montre, encore une fois, aucune différence. La température a donc un effet réversible sur ces liposomes.

Comme précédemment, le suivi de l'intégrale des signaux RMN des protons de la tête polaire permet de mesurer la T_m des liposomes (Figure 91). Les liposomes extrudés chargés de K14P ont des T_m à 42,0 ± 0,6 et 47,4 ± 1,6 °C (Tableau 13). Les poids des deux sigmoïdes sont environ de 0,5 et ne sont pas significativement différents. Les autres paramètres obtenus pour ajuster les données montrent que la T_m la plus coopérative (*i.e.* la T_m principale) est celle à 42,0 °C. Les T_m sont relativement proches des valeurs obtenues pour les liposomes extrudés blancs (*i.e.* 41,9 ± 0,8 °C pour la T_m principale et 51,1 ± 5,1 °C). Les T_m principales des liposomes extrudés blancs et chargés de K14P ne sont pas significativement différentes. L'encapsulation de K14P ne semble donc pas affecter la structure ni les propriétés des liposomes extrudés.

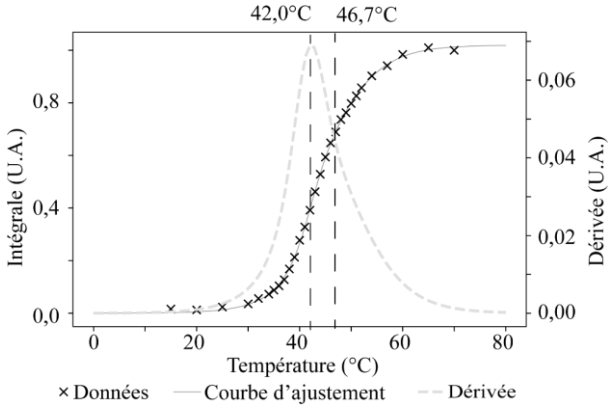


Figure 91 : Détermination de la T_m de liposomes extrudés, chargés de K14P. Evolution de L'intégrale des signaux de la tête des phospholipides en fonction de la température (x), courbe d'ajustement de ces points et dérivée de la sigmoïde (--). T_m = 42,0 et 46,7 °C. E-CHOL12- C0-J5-Tamb.

Liposomes	a	k_0 (°C^{-1})	T_{m0} (°C)	b	k_1 (°C^{-1})	T_{m1} (°C)
E-CHOL12- C0	0,61 ± 0,13	0,18 ± 0,03	46,7 ± 1,6	0,42 ± 0,14	0,47 ± 0,09	42,0 ± 0,6

Tableau 13 : Paramètres utilisés pour ajuster la double sigmoïde sur l'Équation 10.

c) Impact de l'encapsulation de C16-K14P sur la structure des liposomes extrudés par RMN ^{31}P

C16-K14P a la particularité d'avoir une chaîne lipidique qui peut s'ancrer dans la bicouche des liposomes. Il a été montré précédemment que son encapsulation affectait la membrane des liposomes soniqués (2.3.1). Il est donc probable que ce peptide affecte aussi plus la structure et les propriétés des liposomes extrudés que K14P. C'est ce qui va être étudié par RMN ^{31}P dans ce paragraphe.

Les spectres ^{31}P des liposomes blancs et chargés de C16-K14P ont été superposés Figure 92. Ils montrent peu de différences à 5 °C : l'intensité des signaux des liposomes est plus élevée dans le cas des liposomes chargés. En revanche, à 40 °C il y a une différence à peine marquée : un signal isotrope très faible est

observable pour les liposomes chargés contrairement aux liposomes blancs. Il pourrait s'agir de la formation de particules plus petites comme des micelles de phospholipides et peptides ou bien à une différence de fluidité entre les deux formulations. La bicouche des liposomes chargés de C16-K14P serait plus fluide à 40 °C que celle des liposomes blancs. L'encapsulation de C16-K14P fragiliserait donc la bicouche des liposomes extrudés, contrairement aux liposomes soniqués ou l'encapsulation de C16-K14P rigidifiait la structure. Cette fois-ci aussi, la superposition du spectre de liposome chargé à 5 °C avant et après un traitement thermique à 40 °C ne montre aucune différence. L'effet de la température est donc réversible sur ces liposomes.

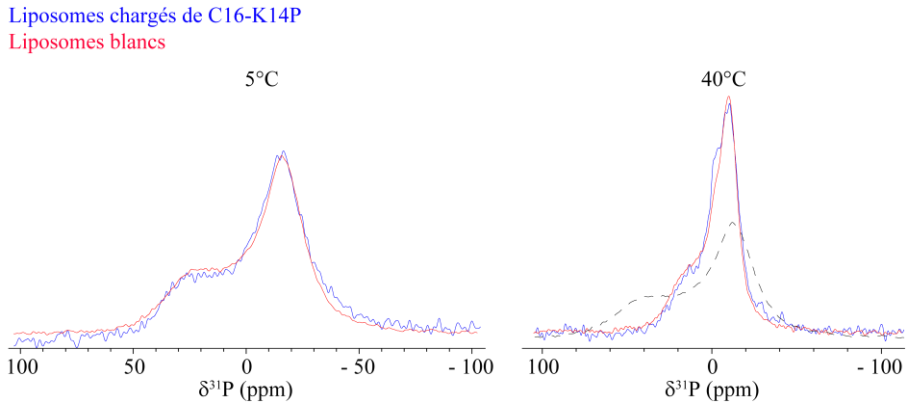


Figure 92 : Spectres RMN ^{31}P de liposomes blancs et chargés de C16-K14P à différentes températures. [liposome] = 60 mg.mL^{-1}, [C16-K14P] = 4,4 mM, HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4, ^{31}P 243 MHz. E-CHOL12- C16-J0-Tamb. Le signal en pointillé correspond aux liposomes blancs à 5 °C.

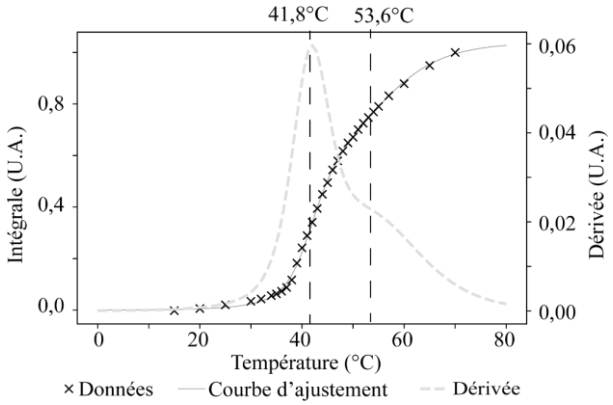


Figure 93 : Détermination de la T_m des liposomes chargés de C16-K14P à partir des spectres RMN ^{1}H. Evolution de l'intégrale des signaux de la tête des phospholipides en fonction de la température (x), courbe d'ajustement de ces points et dérivée de la sigmoïde (--). T_m= 41,8 et 53,6 °C. E-CHOL12- C16-J0-Tamb.

Liposomes	a	k_0 (°C^{-1})	T_{m0} (°C)	b	k_1 (°C^{-1})	T_{m1} (°C)
E-CHOL12-C16	0,57 ± 0,10	0,16 ± 0,04	53,6 ± 2,6	0,47 ± 0,10	0,44 ± 0,08	41,8 ± 0,4

Tableau 14 : Paramètres utilisés pour ajuster la double sigmoïde sur l'Équation 10.

L'analyse de la T_m des liposomes extrudés chargés de C16-K14P donne les températures 41,8 ± 0,4 et 53,6 ± 2,6 °C (Figure 93, Tableau 14). La transition principale est la température la plus basse. Ces valeurs pour les liposomes blancs sont de 41,9 ± 0,8 °C pour la T_m principale et 51,1 ± 5,1 °C pour la

seconde. La transition principale des deux échantillons est identique. La T_m secondaire est plus élevée pour l'échantillon contenant du C16-K14P que l'échantillon de liposomes blancs mais la différence n'est pas significative. Ces résultats suggèrent que l'encapsulation de C16-K14P n'affecte pas de manière significative les propriétés des liposomes extrudés.

d) Observation directe d'encapsulation de peptides sur les liposomes extrudés par cryo-TEM

Jusqu'ici, les résultats montrent que l'encapsulation de peptide (K14P ou C16-K14P) a peu d'impact sur la T_m, de liposomes extrudés. En revanche, les spectres RMN ^{31}P montrent des différences dans la structure des liposomes entre les liposomes bancs et chargés de peptides. L'objectif des images cryo-TEM est d'observer de manière directe la structure des liposomes et ainsi déterminer si ces différences sont visibles avec cette technique (Figure 94).

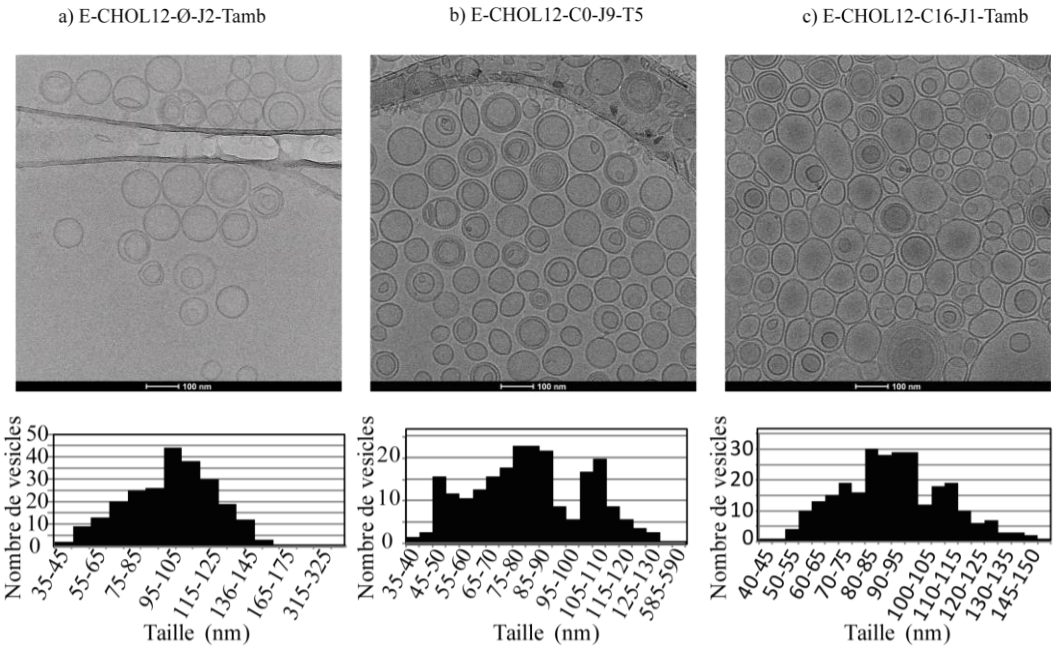


Figure 94 : Images Cryo-TEM de liposomes extrudés blancs, chargés de K14P ou C16-K14P. (a) E-CHOL12-Ø-J2-Tamb ; 102 ± 34 nm avec un PdI de 0,10 (b) E-CHOL12-C0-J9-T5 ; 84 ± 40 nm PdI 0,22 (c) E-CHOL12-C16-J1-Tamb ; 91 ± 21 nm avec un PdI de 0,05.

Le PdI des trois échantillons (liposomes blancs, chargés de K14P ou chargés de C16-K14P) sont équivalents et les tailles moyennes ne sont pas significativement différentes. Les échantillons n'ont pas été analysés le même nombre de jour après leurs préparations mais ils ne montraient aucun signe de dégradation. L'effet de l'encapsulation sur les liposomes n'est donc pas visible par cryo-TEM.

2.3.3 Rendement d'encapsulation en fonction du peptide et du mode de préparation des liposomes

Lors de l'encapsulation de PA, il est possible de mesurer le rendement d'encapsulation comme présenté dans la partie matériels et méthodes. Le rendement d'encapsulation est défini comme le ratio entre la quantité de peptide encapsulée et la quantité totale de peptide utilisée lors de l'encapsulation. L'optimisation de ce paramètre permet de limiter la perte de PA pendant l'encapsulation, le PA non encapsulé étant éliminé de l'échantillon. L'intérêt de mesurer ce paramètre est aussi d'obtenir des informations supplémentaires sur les interactions peptide - liposome. En effet il serait cohérent d'observer un rendement d'encapsulation plus élevé pour les peptides ayant une forte affinité avec les liposomes par rapport aux peptides ayant moins d'affinité. Les différents rendements d'encapsulation des peptides sont présentés ci-dessous, pour K14P et C16-K14P en fonction de la méthode de préparation (Tableau 15).

Rendement d'encapsulation	Sonication	Extrusion
K14P	30 %	50 %
C16-K14P	100 %	100 %

Tableau 15 : Rendements d'encapsulation de K14P et C16-K14P, en fonction de la méthode de préparation des liposomes.

Ce tableau montre donc que les rendements d'encapsulation sont fortement influencés par le type de peptide encapsulé mais aussi par le mode de préparation. Comme attendu le peptide possédant les affinités les plus importantes avec les liposomes (C16-K14P) a les rendements d'encapsulation les plus importants, 100 % quelle que soit la méthode de préparation des liposomes. L'affinité de sa chaîne lipidique avec les phospholipides est tellement importante qu'il est, en quelque sorte, encapsulé activement. Le mode de préparation n'a donc pas d'impact sur l'encapsulation de ce peptide. En revanche K14P montre un rendement d'encapsulation faible par rapport à ceux obtenus pour C16-K14P avec 30 % pour les liposomes soniqués et 50 % pour les liposomes extrudés, suggérant que K14P a des interactions plus faibles avec les liposomes que C16-K14P. K14P montre aussi de grandes variations de rendement d'encapsulation en fonction du mode d'encapsulation. L'explication la plus simple serait que l'extrusion est une méthode de préparation des liposomes plus douce que la sonication. En effet la sonication permet de réduire la taille des liposomes en cassant les membranes qui vont ensuite se reformer pour former des liposomes plus petits, les phospholipides étant naturellement plus stables sous forme de vésicule dans un milieu aqueux. A chaque fois que les membranes sont cassées, les peptides auront tendance à sortir des liposomes et ne seront pas forcement réintégrés dans une vésicule. Dans le cas de l'extrusion, une pression est appliquée sur les liposomes pour les obliger à traverser la membrane possédant des tailles de pores calibrées. Avec cette méthode les membranes se courbent pour former des liposomes de tailles plus petites sans que les vésicules ne s'ouvrent complétement, ne permettant donc pas au peptide de s'échapper.

2.4. Effet du cholestérol sur les liposomes blancs

Il est connu que le cholestérol a un impact sur la fluidité des bicouches de phospholipides : il augmente la fluidité en dessous de la T_m et la diminue au-dessus (Coderch *et al.*, 2000) ce qui entraîne une coopérativité plus faible au niveau de la T_m c'est-à-dire une transition entre les phases fluide et gel de la bicouche moins marquée.

Ici l'impact du cholestérol sur la structure des liposomes utilisés et surtout l'effet du cholestérol sur la fluidité des membranes à différentes températures vont être étudiés. La cinétique de relargage de principe à travers les liposomes pourrait être influencée par la présence ou non de cholestérol. Comprendre l'impact de celui-ci sur les membranes pourra aider à comprendre les mécanismes de relargage.

2.4.1 Détermination de la température de transition par RMN 1D ^{1}H des liposomes blancs pour différentes quantités de cholestérol

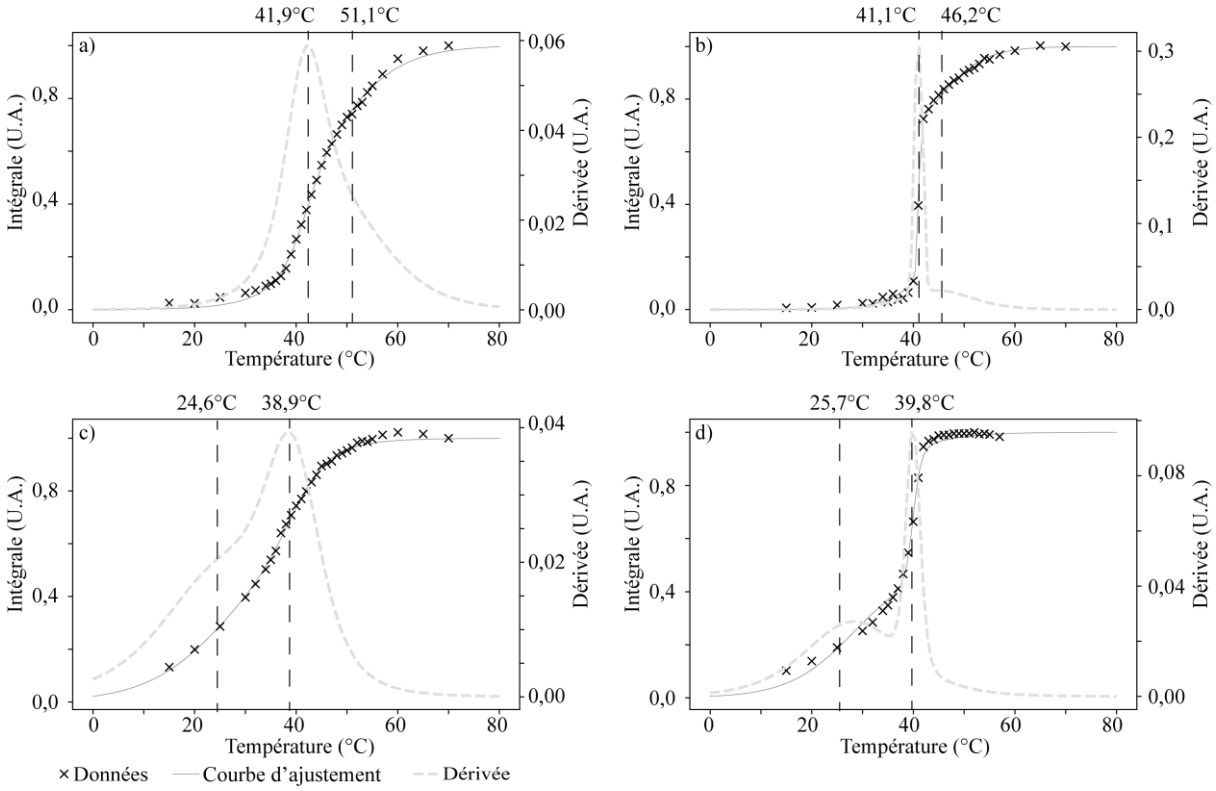


Figure 95 : Evolution de l'intégrale des signaux de la tête des phospholipides en fonction de la température (x), ajustement des points par une sigmoïde et dérivée de la sigmoïde (--). (a) Liposomes extrudés 12 % cholestérol (b) Liposomes extrudés 0 % cholestérol (c) liposomes soniqués 12 % cholestérol (d) Liposomes soniqués 0 % cholestérol.

Comme expliqué dans le paragraphe 2.2.1, il est possible de mesurer la T_m des liposomes par RMN 1D ^{1}H. Un des paramètres importants des liposomes est leur(s) température(s) de transition. Les variations de ce paramètre sont mises en avant ci-dessous, en fonction de la quantité de cholestérol utilisée dans la formulation de liposomes (0 et 12 %) pour les deux modes de préparation (sonication et extrusion).

Les T_m des liposomes extrudés et soniques blancs composés de 0 et 12 % de cholestérol sont présentés Figure 95 et Tableau 16. Deux T_m sont obtenues pour chaque formulation. Les valeurs de k sont plus élevées pour les liposomes sans cholestérol qu'avec cholestérol, montrant que les transitions sont plus coopératives dans les formulations sans cholestérol. Ainsi l'ajout de cholestérol rend moins abrupte la transition entre la phase gel et la phase fluide, ce qui potentiellement permet d'élargir la zone de transition de phase des liposomes.

Liposomes	a	k_0 ($°C^{-1}$)	T_{m0} (°C)	b	k_1 ($°C^{-1}$)	T_{m1} (°C)
E-CHOL12	0,64 ± 0,11	0,14 ± 0,04	51,1 ± 5,1	0,43 ± 0,14	0,46 ± 0,11	41,9 ± 0,8
S-CHOL12	0,50 ± 0,16	0,12 ± 0,05	24,6 ± 4,8	0,52 ± 0,15	0,26 ± 0,06	38,1 ± 1,3
E-CHOL0	0,35 ± 0,04	0,21 ± 0,04	46,0 ± 1,4	0,65 ± 0,04	3,38 ± 1,18	41,4 ± 0,1
S-CHOL0	0,43 ± 0,08	0,17 ± 0,08	25,7 ± 3,1	0,59 ± 0,07	1,01 ± 0,19	39,8 ± 0,2

$$y = {}^{a}/_{(1+e^{k_0*(Tm_0-T)})} + {}^{b}/_{(1+e^{k_1*(Tm_1-T)})}$$

Tableau 16 : Récapitulatif des T_m mesurées et des différents paramètres de la sigmoïde.

2.4.2 Evolution de la taille des liposomes blancs avec la température par DLS

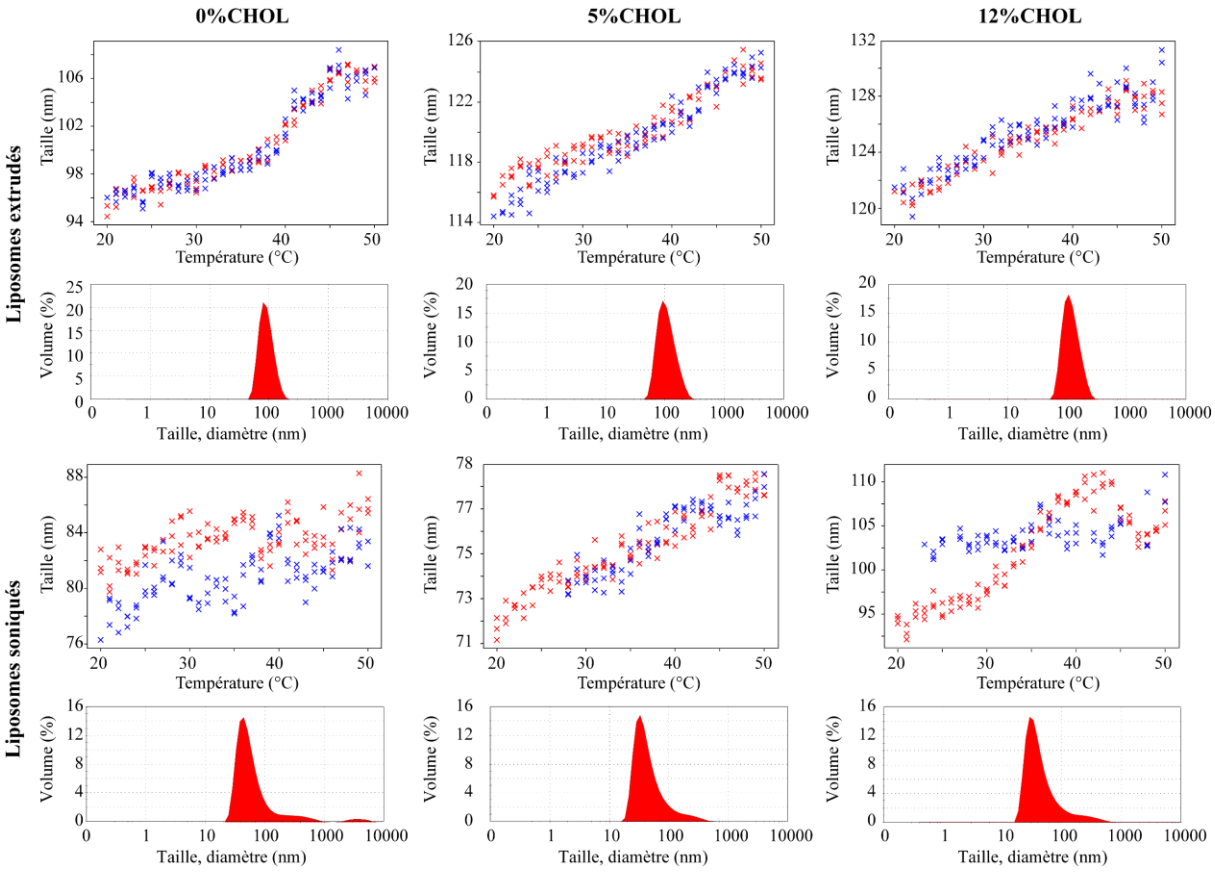


Figure 96 : Evolution de la taille de liposomes blancs, soniqués et extrudés contenant 0 %, 5 ou 12 % de cholestérol en fonction de la température. Liposomes extrudés : (0% CHOL) 97 ± 1 nm PdI 0,05 (5% CHOL) à 117 ±1 nm PdI 0,07 (12% CHOL) 120 ± 2 nm PdI 0,08. Liposomes soniqués : (0% CHOL) 83 ± 1 nm PdI 0,27 (5% CHOL) à 74 ± 1 nm PdI 0,21 (12% CHOL) 99 ± 1 nm PdI 0,28.

L'évolution de la taille des liposomes en fonction de la température a ensuite été suivie par DLS pour différentes quantités de cholestérol et méthodes de préparation dans l'objectif de comparer l'effet de la température sur la taille et donc la structure de ces liposomes. La Figure 96 permet d'abord de comparer la taille des liposomes à température ambiante. Pour les liposomes extrudés, la taille de départ des liposomes est plus petite lorsque la quantité de cholestérol est faible voire nulle. Il semblerait donc que la taille globale des vésicules soit influencée par la présence de cholestérol. Pour les liposomes soniqués, cette évolution n'est pas observée sauf si les données des liposomes à 0 % de cholestérol sont exclues à cause d'une polydispersité trop large.

Ensuite l'évolution de la taille des particules peut être observée en fonction de la température. Les liposomes extrudés montrent une polydispersité plus faible que les liposomes soniqués. La taille des liposomes extrudés contenant 0 % de cholestérol augmente de manière importante entre 5 et 50 °C avec une cassure autour de 42 °C. En augmentant à 5 % la quantité de cholestérol, la transition autour de 40 °C est moins coopérative et devient beaucoup plus faible. Plus aucune transition nette n'est observée lorsque la quantité de cholestérol atteint les 12 %. Les tailles lors de la montée (croix rouges) ou de la descente (croix bleues) en température se superposent exactement montrant que la température a un effet réversible sur l'échantillon. Pour les liposomes soniqués, aucune transition n'est observée entre 20 et 50 °C à 0 % de cholestérol. A 5 % de cholestérol, il existe une transition très peu coopérative et l'évolution de la taille des liposomes est la même en augmentant la température qu'en la diminuant. Pour les liposomes soniqués à 12 % de cholestérol, l'évolution de la taille des vésicules en augmentant la température montre une transition très coopérative, en revanche l'évolution de la taille des vésicules n'est pas la même en descente de température et ne montre pas de transition. L'effet de la température ne semble pas être réversible sur les liposomes soniqués contenant 12 % de cholestérol.

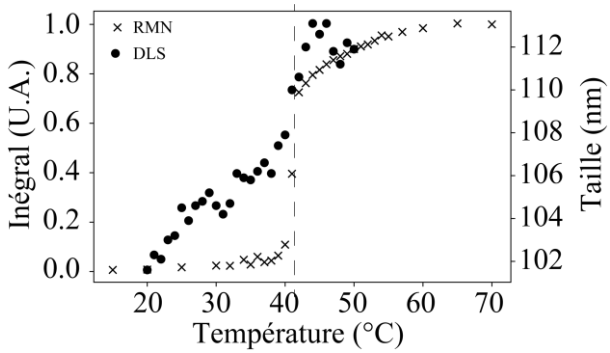


Figure 97 : Evolution de l'intégrale des signaux RMN 1D ^{1}H de la tête polaire de phospholipides et évolution de la taille des liposomes par DLS en fonction de la température pour les liposomes extrudés à 0 % de cholesterol. E-CHOL0-Ø1-Tamb

La superposition des données DLS et RMN 1D ^{1}H des liposomes extrudés contenant 0 % de cholestérol (Figure 97) montre que la transition de taille des liposomes observée par DLS se situe à la même température que la transition d'intensité observée par RMN et attribuée à la transition gel/fluide des liposomes. Ainsi pour cette formulation de liposome, lorsqu'une transition de taille nette est observée

par DLS, elle correspond à la transition de phase des lipides formant les liposomes. L'augmentation de la taille des liposomes semble liée à l'augmentation de la fluidité des bicouches. En conclusion il semble possible d'utiliser les analyses DLS pour estimer la T_m de liposomes extrudés sans cholestérol. L'avantage de cette technique est de demander peu d'échantillon, d'être rapide à mettre en place et plus rapide que les analyses RMN.

2.4.3 Impact du cholestérol sur la structure des liposomes blancs par ^{31}P RMN

L'objectif est ici d'observer par RMN ^{31}P l'impact du cholestérol sur la structure et la fluidité des liposomes et de mettre en relation ces données avec les valeurs de T_m mesurées pour les liposomes soniqués et extrudés avec 0, 5 ou 12 % de cholestérol.

a) Liposomes extrudés

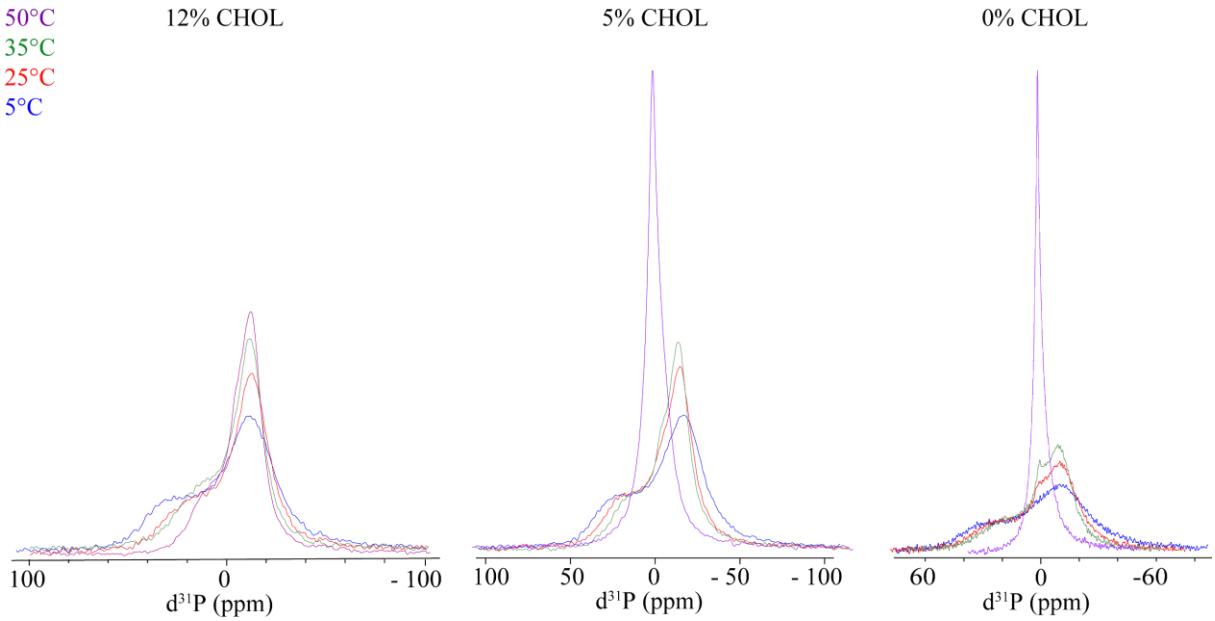


Figure 98 : Spectres RMN ^{31}P des liposomes blancs extrudés contenant 12, 5 et 0 % de cholestérol à différentes températures. HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4. ^{31}P 243 MHz. E-CHOL12-Ø-J0-Tamb, E-CHOL5-Ø-J0-Tamb, E-Ø-Ø-J0-Tamb.

La Figure 98 montre l'évolution du signal ^{31}P des liposomes extrudés contenant 0, 5 ou 12 % de cholestérol. Les spectres à 5 °C avant et après les analyses à hautes températures sur les trois préparations de liposomes sont exactement superposables, montrant une nouvelle fois l'effet réversible de la température sur les bicouches des liposomes. Lorsque la température augmente le signal s'affine et augmente en intensité. En effet la bicouche des liposomes se fluidifie avec l'augmentation de la température. A 50 °C le signal anisotrope a disparu pour les liposomes sans cholestérol mais il est encore présent pour les liposomes avec 12 % de cholestérol. Ainsi les liposomes sans cholestérol ont une transition entre leurs phases gel et fluide plus coopérative que la transition des liposomes contenant 12 % de cholestérol. Ceci est cohérent avec les mesures de T_m réalisées précédemment. Pour rappel, les T_m des liposomes extrudés sont de 41,9 ± 0,8 et 51,1 ± 5,1 °C lors qu'ils sont composés de 12 % de

cholestérol et 41,4 ± 0,1 et 46,0 ± 1,4 °C lorsqu'ils sont composés de 0 % de cholestérol. La T_m la plus coopérative pour chaque formulation est 41,9 et 41,4 °C pour 12 % et 0 % de cholestérol respectivement. Ces deux valeurs de T_m sont proches l'une de l'autres. En revanche la T_m la moins coopérative est de 51,1 °C pour les liposomes extrudés à 12 % de cholestérol et 46,0 °C pour les liposomes extrudés à 0 % de cholestérol. Cette T_m secondaire semble donc augmenter lorsque la quantité de cholestérol augmente. En conclusion, l'augmentation de la quantité de cholestérol dans la formulation de liposome permet de conserver une certaine rigidité de la bicouche à haute température.

b) Liposomes soniqués

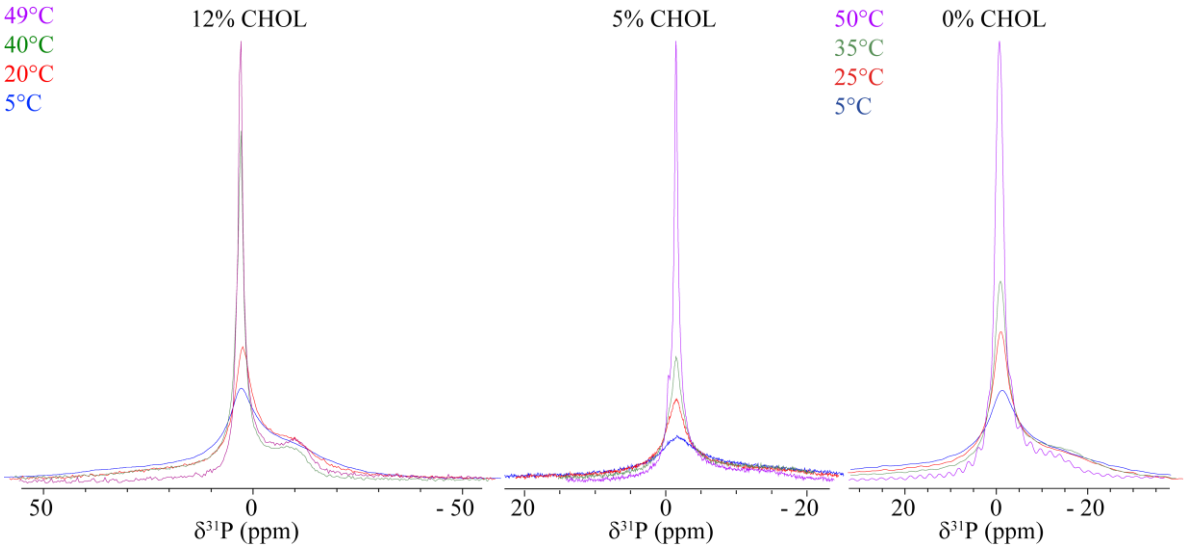


Figure 99 : Spectres RMN ^{31}P des liposomes soniqués blancs contenant 12, 5 et 0 % de cholestérol. HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4. ^{31}P 243 MHz. S-CHOL12-J1-Tamb, S-CHOL5-J1-Tamb, S-Ø-Ø-J1-Tamb.

L'acquisition de spectres ^{31}P a ensuite été réalisée sur des liposomes soniqués contenant différentes quantités de cholestérol (Figure 99). Les signaux s'affinent et augmentent en intensité avec la température pour les trois formulations de liposomes. A 50 °C les liposomes soniqués contenant 12 % de cholestérol ont encore un signal anisotrope, les liposomes à 0 % de cholestérol ont eux aussi un reste de signal anisotrope. En revanche les liposomes contenant 5 % de cholestérol n'ont plus de signal anisotrope à cette température. Ceci ne suit pas la logique présentée pour les liposomes extrudés à température équivalente, la composante anisotrope diminue plus rapidement lorsque la quantité de cholestérol dans la formulation est faible. Il est possible que ceci soit dû au manque de reproductibilité et aux variations rencontrées dans la production de liposomes soniqués.

Les T_m mesurées précédemment donnaient 38,1 ± 1,3 et 24,6 ± 4,8 °C pour les liposomes soniqués à 12 % de cholestérol et 39,8 ± 0,2 et 25,7 ± 3,1 °C pour les liposomes soniqués à 0 % de cholestérol. Les spectres ^{31}P réalisés à 50 °C sont donc bien au-dessus des deux T_m de ces formulations. 12 % de cholestérol dans la formulation des liposomes permet donc de conserver une bicouche relativement rigide.

2.4.4 Observation directe de l'impact de la température et du cholestérol des liposomes extrudés par Cryo-TEM

Il a été mis en évidence que l'effet de l'encapsulation de peptide n'était pas visible par cryo-TEM. Ainsi, les images enregistrées vont pouvoir être utilisées pour étudier l'impact d'autres paramètres sur la structure des liposomes tels que les traitements thermiques ou la quantité de cholestérol présent dans la formulation.

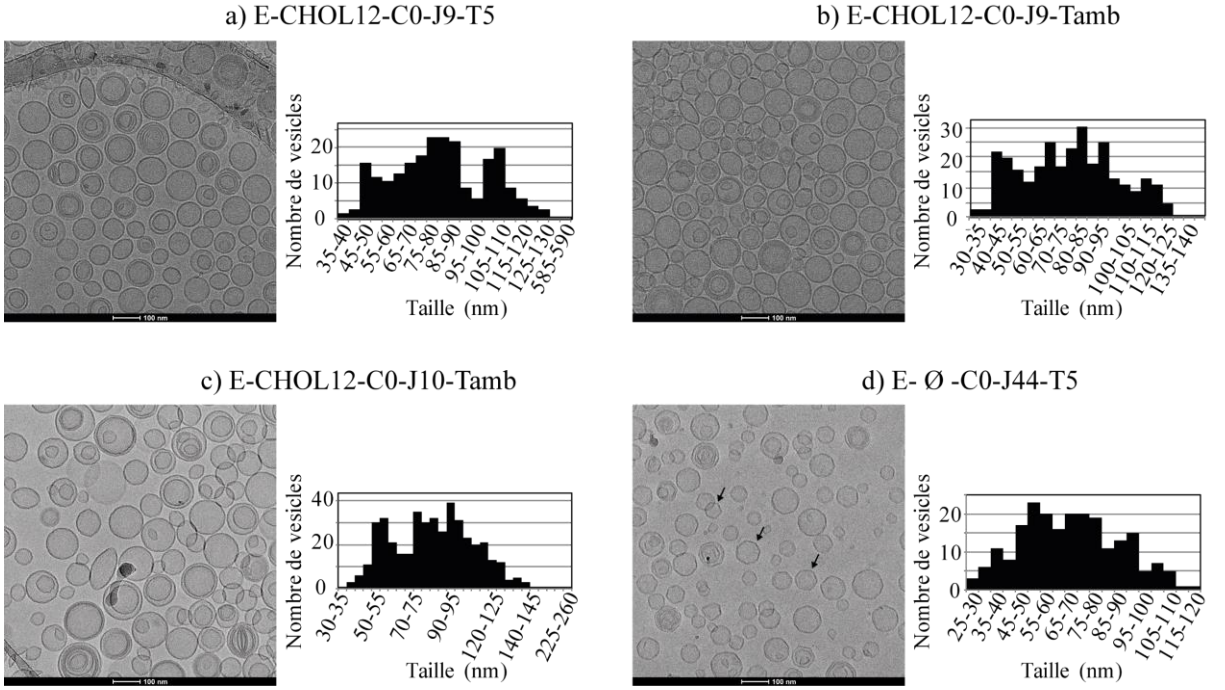


Figure 100 : Images Cryo-TEM de liposomes extrudés chargés de K14P avec différentes quantités de cholestérol et ayant subi différents traitements thermiques. (a) E-CHOL12-C0-J9-T5 ; 84 ± 40 nm PdI 0,22 b) E-CHOL12-C0-J9-Tamb après chauffage à 40 °C 8 jours ; 77 ± 23 nm PdI 0,09 c) E-CHOL12-C0-J10-Tamb ; 88 ± 31 PdI = 0,12. d) E- Ø -C0-J44-T5, chauffés pendant 1 mois à 40 °C avec plusieurs passages à 5 °C ; 67 ± 20 nm PdI 0,09

Le premier objectif est d'observer l'impact de traitement thermique sur les liposomes. Pour cela il faut comparer les images Figure 100a, b et c. Ces trois images montrent des liposomes extrudés contenant 12 % de cholestérol chargés de K14P ayant subi différents traitements thermiques : a) échantillon conservé à 5 °C (84 ± 40 nm PdI 0,22), b) échantillon chauffé à 40 °C pendant 8 jours (77 ± 23 nm PdI 0,09), c) échantillon conservé à température ambiante (67 ± 20 nm PdI 0,09). La comparaison des tailles et des incertitudes montre qu'il n'y a pas de différences significatives visibles sur les images de cryo-TEM entre les liposomes ayant subi différents traitements thermiques, appuyant le fait que la température semble réversible sur les liposomes.

Le second objectif consiste à observer l'impact du cholestérol sur la structure des liposomes. La Figure 100b montre un échantillon de liposomes avec 12 % de cholestérol et la Figure 100d un échantillon de liposomes sans cholestérol. Une des premières observations est la présence d'angles (marqués par des flèches sur la Figure 100d) dans la membrane des liposomes sans cholestérol qui ne sont pas présents

dans les liposomes avec cholestérol. Les angles mettent en avant des zones d'inhomogénéité des phospholipides dans la bicouche. L'échantillon de liposomes sans cholestérol est ancien, il a été analysé 44 jours après sa préparation. Les spectres RMN protons de cet échantillon à 44 jours ne montraient aucune trace de contamination d'organismes qui auraient pu dégrader les échantillons. De plus il n'y avait aucun dépôt au fond du vial suggérant que l'échantillon n'est pas dégradé. Ainsi la présence de ces angles est due à l'absence de cholestérol dans la formulation. Le cholestérol permet de lisser la surface des liposomes et rendre la membrane plus homogène, suggérant que les lipides ne se mélangent pas de manière homogène dans les bicouches lipidiques. Pour rappel les mesures réalisées dans ce chapitre montrent que les liposomes possèdent deux T_m. Une des explications proposées est un manque d'homogénéité dans les bicouches. Les images de cryo-TEM et l'observation d'angles dans les bicouches confortent cette interprétation. Les phospholipides seraient donc regroupés par type dans certaines zones plutôt que d'être uniformément répartis dans la bicouche. En revanche, l'observation d'angles dans la bicouche de liposomes extrudés en Figure 82 laisse penser que la présence de cholestérol favoriserait la présence de ces angles alors qu'ici la conclusion est différente. Il semblerait plutôt que la présence de cholesterol aide à « lisser » la bicouche des liposomes mais 12 % de cholestérol ne semble pas suffisant pour faire disparaître toutes les irrégularités des membranes.

2.5. Conclusion

Ce chapitre a permis d'étudier la structure des liposomes indirectement par RMN (^{31}P et ^{1}H) et DLS et de manière directe par cryo-TEM. La méthode de préparation des liposomes a un impact important sur leurs structures, leurs tailles et leurs polydispersités. Les liposomes soniqués sont en moyenne plus petits et plus polydispersés que les liposomes extrudés. Plus la sonication est longue, plus la taille des liposomes est petite. Les liposomes soniqués sont principalement des SUV contrairement aux extrudés qui contiennent 40 % de bi-lamellaires. Il est aussi possible de faire varier la coopérativité de la T_m des liposomes en jouant sur le pourcentage de cholestérol de la formulation.

La sonication est à première vue une méthode plus facile à mettre en place que l'extrusion. Mais cette technique ne permet pas de contrôler la température de l'échantillon, ce qui peut poser un problème si le PA à encapsuler est thermosensible. De plus une petite variation dans le temps de sonication change la taille des liposomes obtenus, ce qui peut amener à des problèmes de reproductibilité si le même protocole n'est pas exactement appliqué. Finalement, l'encapsulation de certains PA, ici de peptides lipidés, a aussi une influence sur la structure des liposomes. En effet, les interactions entre les PA et la tête polaire des phospholipides augmentent la rigidité de la bicouche des liposomes. Ce phénomène est d'autant plus marqué que les liposomes ont été préparés par sonication. En revanche les T_m sont très peu affectées par l'encapsulation de PA, quel que soit le mode de préparation des liposomes. Les peptides non lipidés ont quant à eux très peu d'influence sur la structure des liposomes.

Chapitre 3 : Etude des interactions entre peptides et liposomes

L'intérêt des liposomes est de pouvoir transporter et protéger des PA *in vivo* avant de les relarguer de manière contrôlée. L'étude du relargage passe par la compréhension des interactions qui existent entre les liposomes et les PA. La structure des peptides et des liposomes a été déterminée au chapitre précédent, et va être utilisée pour étudier les interactions peptide – liposome dans ce chapitre. La première étape a été d'estimer une concentration en liposomes, et non une concentration de lipides dans l'échantillon comme utilisé jusqu'à présent. Ensuite les peptides ont été titrés par les liposomes contenant 12 % de cholestérol, préparés par sonication ou extrusion. Le suivi du titrage a été réalisé par RMN 1D ^{1}H. Le principe est de mesurer l'intégrale des signaux des peptides en fonction de la quantité de liposomes ajoutée. Ces données devraient permettre de classer les peptides en fonction de leur interaction avec les liposomes.

3.1. Détermination de la concentration en liposomes

Dans le chapitre précédent (Chapitre 2), les concentrations de liposomes étaient exprimées en mg.mL^{-1} de lipide. Ce paragraphe présente le raisonnement suivi pour estimer la concentration en liposomes (et non en lipides) en µM dans les échantillons. Ces concentrations ont été estimées à l'aide des données

suivantes : la masse molaire d'une entité (au prorata des mol% des phospholipides) formant les vésicules est de 730 $g.mol^{-1}$. Le nombre d'entités par liposome varie en fonction de la taille des liposomes et donc de la manière de les préparer. Cependant la quantité de lipides par vésicule n'augmente pas de manière linéaire par rapport au diamètre des vésicules : elle augmente en fonction du rayon des vésicules au carré (Figure 101).

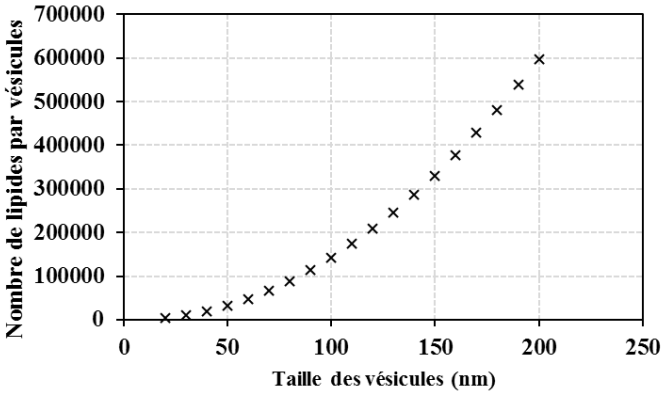


Figure 101 : Nombre de lipides par vésicule en fonction de la taille des vésicules déterminé à partir de l'Équation 4.

Le nombre d'entités par liposome peut être estimé à partir de l'Équation 4 (voir page 7). 142 000 entités par vésicule sont obtenues pour les liposomes extrudés. La masse molaire d'une vésicule est le nombre d'entités multiplié par la masse molaire d'une entité, soit 1 x 10^8 $g.mol^{-1}$. Une concentration de 60 $mg.mL^{-1}$ de lipides correspond à une concentration de 0,5 µM de liposomes extrudés. Pour les liposomes soniqués, la concentration en liposomes est différente même si la quantité de lipides initiale est la même, car la taille des liposomes soniqués est en moyenne de 50 nm contrairement aux liposomes extrudés dont la taille est estimée à 100 nm (Partie III - Chapitre 2). Dans le cas des liposomes soniqués, le nombre de phospholipides par vésicule est de 32 200 lipides. La masse molaire d'un liposome soniqué est donc de 2 x 10^7 $g.mol^{-1}$ et la concentration de la solution de liposomes soniqués de 2 µM (équivalent à 60 $mg.mL^{-1}$ de lipides).

3.2. Etude des interactions entre peptides et liposomes soniqués

L'objectif de cette partie est de caractériser les affinités entre les peptides et des liposomes dans le cas des liposomes soniqués. Les titrages ont été réalisés sur deux peptides différents : K14P et C16-K14P. Les peptides sont ensuite classés suivant la force de leur interaction avec les liposomes. Pour cela des spectres RMN 1D ^1H ont été enregistrés à différentes concentrations de liposomes.

3.2.1 Optimisation du protocole

Au cours du titrage, l'intensité des signaux des atomes d'hydrogène du peptide diminue globalement avec les ajouts de liposomes. Ceci montre qu'il y a des interactions entre les peptides et les liposomes. Une diminution de l'intensité des signaux du peptide est également observée avec le temps. Des signaux fins à 1,2 et 3,7 ppm sont présents sur le spectre et correspondent à des traces d'éthanol. Ce solvant est

utilisé dans le protocole de préparation des liposomes : les lipides sont dissous dans un mélange de solvant EtOH / ACN (50 % / 50 % v / v) avant que le solvant ne soit séché pour former le film de lipides. Le séchage du film de lipides ne semble donc pas complet. De plus si l'éthanol est utilisé pour dissoudre les lipides, il influence probablement la structure et la rigidité des liposomes. L'éthanol est un composé volatil. Sa quantité dans le tube peut diminuer avec le temps à cause de son évaporation ce qui pourrait expliquer l'évolution de l'échantillon au cours du temps. Il a donc été mis en évidence que l'intensité des signaux de K14P était influencée lorsqu'il restait de l'éthanol dans la solution de liposomes. Pour résoudre ce problème, le protocole de préparation des films de lipides a été modifié en ajoutant une étape de séchage des films de lipides dans une étuve sous vide à 50 °C pendant 2 h, et ainsi retirer un maximum d'éthanol de la préparation. Les liposomes utilisés pour les expériences précédentes (Partie III - Chapitre 2) ont tous été réalisés avec ce protocole optimisé.

3.2.2 Titrage de K14P en l'absence de sel

K14P est une chaîne de 14 acides aminés, sans chaîne lipidique. Le titrage se fait en ajoutant des liposomes à la solution de peptide. Si le peptide interagit avec les liposomes, une baisse d'intensité des signaux devrait être observée : une fois lié aux liposomes le peptide se comporte comme le liposome et son signal n'est alors plus visible sur le spectre RMN.

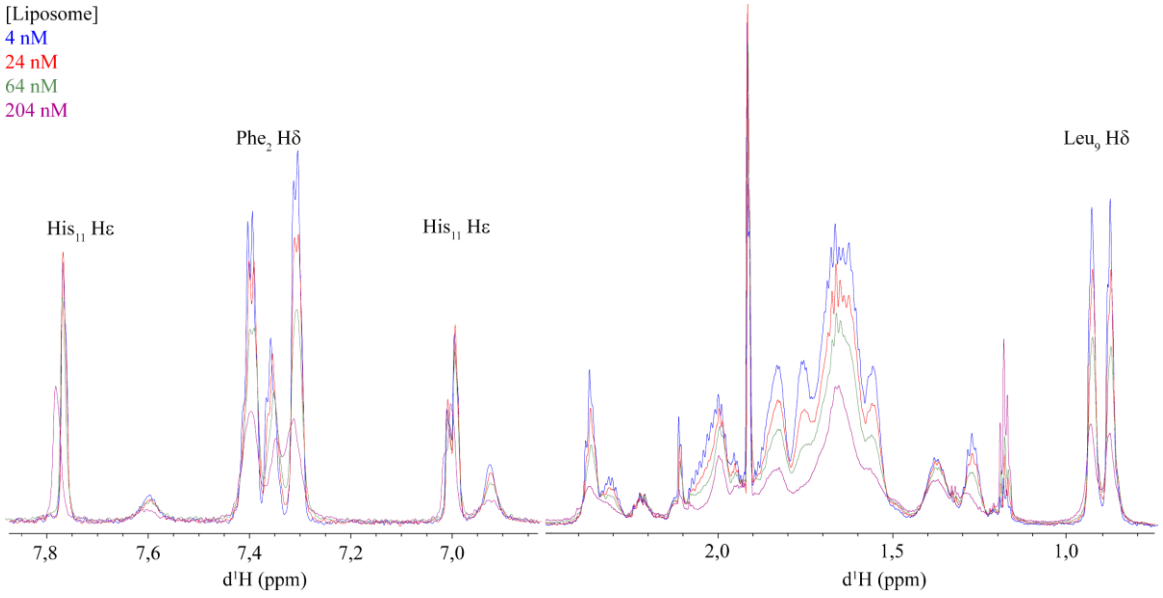


Figure 102 : Extraits des spectres RMN 1D ^{1}H de K14P titré par une solution de liposomes soniqués dans un tampon de faible force ionique. [K14P] = 210 µM, HEPES-d$_8$ 80 mM, pH 7,4, 25 °C, ^{1}H 700 MHz. S-CHOL12-Ø-J1-T5.

Le titrage de K14P a ensuite été réalisé avec des liposomes soniqués dont le film de lipides a été lyophilisé. Le tampon utilisé pour cette expérience contient 80 mM d'HEPES et pas de sel. La baisse d'intensité des signaux avec l'ajout des liposomes est représentée dans la Figure 102. Il n'y a pas de signaux de liposomes visibles sur la figure, ce qui est en accord avec les observations faites sur les spectres des liposomes réalisés à différentes températures dans le Partie III - Chapitre 2. Le volume total

de solution de liposomes ajouté à la fin du titrage représente 10 % du volume total de l'échantillon. La diminution d'intensité des signaux du peptide est supérieure à 10 % et n'évolue pas avec le temps. La diminution d'intensité des signaux n'est donc pas liée à la dilution de l'échantillon et peut donc être interprétée comme la présence d'interactions entre les peptides et les liposomes.

Il a été montré Partie III - Chapitre 1 que K14P est sous forme monomère à 210 µM. Ainsi l'intensité de ces signaux est directement proportionnelle à sa concentration et ceci en l'absence de liposome. Les spectres du titrage montrent que tous les signaux de K14P ne sont pas affectés de la même manière par les ajouts de liposomes. En effet lorsque la quantité de liposomes augmente, des signaux voient leur intensité diminuer plus fortement que d'autres jusqu'à une disparition complète de certains d'entre eux. La zone la plus affectée se trouve entre 1,4 et 3,0 ppm. La superposition des spectres TOCSY avant et après le titrage permet d'identifier les protons dont les signaux ont disparu : Hβ des résidus d'arginine (Arg_3, Arg_4, Arg_6 et Arg_8), Lys_{12}, proline (Pro_7 et Pro_{14}), Gln_5 et Leu_9. Il semblerait que les protons des chaînes latérales du peptide aient plus d'interactions que les protons du squelette du peptide avec les liposomes. Les résidus des protons les plus impactés par les liposomes sont présentés en gras dans la séquence : KF**RRQRPRL**SH**K**G**P**. La diminution d'intensité des signaux peut s'expliquer si le peptide se colle à la membrane des liposomes. Ainsi le peptide lié aux liposomes voit son T_2 diminuer ce qui explique la disparition de ses signaux sur le spectre. La séquence du peptide, riche en acides aminés chargés positivement, ainsi que son point isoélectrique (pI, *i.e.* pH auquel la charge globale d'une molécule est nulle) de 13 indiquent que le peptide est chargé positivement à pH 7,4. Les liposomes, chargés négativement du fait de la présence de DMPG, pourraient donc former des interactions électrostatique avec le peptide. Les résidus impactés sont répartis sur la longueur de la chaîne peptidique, suggérant que toute la chaîne du peptide se colle à la surface des liposomes.

3.2.3 Titrage de K14P en présence de sel

En l'absence de sel, les protons ayant le plus d'interactions avec les liposomes appartiennent à des acides aminés chargés. Il est donc possible que les interactions entre les liposomes et les peptides soient électrostatiques. Pour vérifier l'hypothèse, le titrage de K14P a été réalisé une nouvelle fois avec des liposomes soniqués, dans un tampon, plus physiologique, HEPES 80 mM et NaCl 100 mM (Figure 103). La présence de sel devrait écranter les charges présentes dans l'échantillon et diminuer les interactions peptide - liposome.

La Figure 103 montre que l'ajout de liposomes résulte en la diminution de l'intensité des signaux du peptide et il n'y a toujours pas de signal de liposomes sur ces zones de spectre. La perte d'intensité, en présence de sel, est inférieure à celle observée lors du dosage sans sel à concentration en liposomes identique (Figure 102). Pour diminuer l'intensité des peptides de 50 %, il faut 124 nM de liposomes lorsque le tampon ne contient pas de sel et 164 nM de liposomes lorsque le tampon contient 100 mM de NaCl. Ainsi en présence de sel, les peptides et les liposomes ont moins d'interaction du fait de

l'écrantage des charges des têtes polaires des phospholipides par le sel. Cette étude montre que les interactions dominantes entre K14P et les liposomes soniqués sont bien électrostatiques.

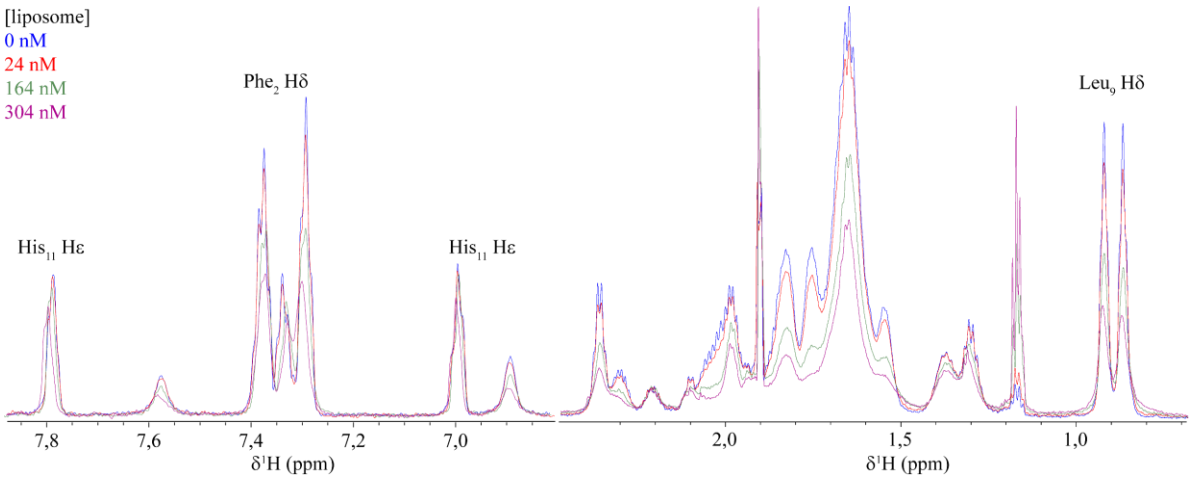


Figure 103 : Extraits des spectres RMN 1D ^{1}H de K14P titrés par une solution de liposomes soniqués dans un tampon physiologique. [K14P] = 210 µM, HEPES-d_8 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4, 25 °C, ^{1}H 700 MHz. S-CHOL12-Ø-J1-T5.

La diminution d'intensité n'est pas homogène pour tous les signaux du peptide. Comme pour le titrage sans sel, la zone 1,5 - 2,1 ppm est la plus affectée et perd le plus en intensité. Les protons les plus affectés par les liposomes sont, comme précédemment, les Hβ des résidus chargés.

Cette étude a mis en évidence que K14P interagit avec la surface des liposomes soniqués (DMPG-DPPC-CHOL) en partie par des interactions électrostatiques. Il semblerait que toute la chaîne du peptide ne se comporte pas de la même manière avec les ajouts de liposomes. Certaines zones (résidus 3-4-5-6-7-8-9-12-14) ont plus d'interactions avec les liposomes soniqués. Plus de la moitié de ces résidus sont chargés positivement (arginine et lysine) ou polaires (glutamine). Ceci conforte l'existence d'interactions électrostatiques entre les peptides et les liposomes. De plus les protons les plus affectés par les liposomes appartiennent à des acides aminés répartis sur toute la chaîne du peptide, suggérant une nouvelle fois que le peptide se colle de toute sa longueur sur le liposome.

3.2.4 Titrage de C16-K14P à une concentration inférieure à la concentration micellaire critique

L'effet des liposomes soniqués sur C16-K14P a ensuite été étudié et leurs interactions ont été évaluées pour observer l'effet de la présence d'une chaîne lipidique. Pour cela un premier titrage du peptide lipidé par des liposomes a été réalisé dans le tampon contenant 80 mM d'HEPES et 100 mM de NaCl à pH 7,4 (Figure 104). La concentration de C16-K14P utilisée était de 50 µM pour éviter les biais potentiels dus à la formation de micelles de peptides au-dessus de 300 µM. 0,2 nM de liposome ont été nécessaires pour que l'intensité des signaux du peptide diminue de 25 %. Le volume de liposome ajouté pour atteindre cette concentration est de 0,2 µL dans un volume total de 500 µL. La baisse d'intensité observée n'est donc pas due à un effet de dilution.

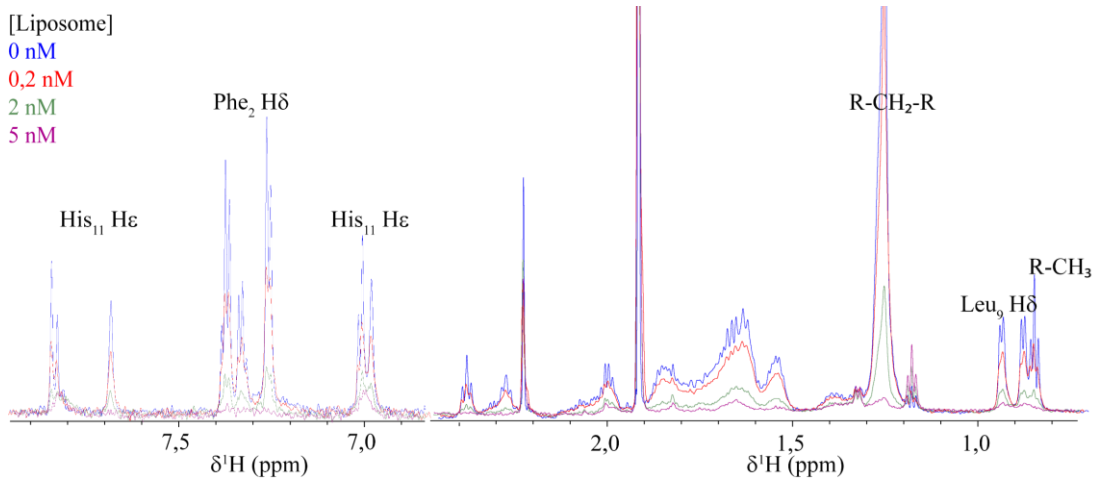


Figure 104 : Extraits des spectres RMN 1D ^{1}H de C16-K14P titré par une solution de liposomes soniqués. [C16-K14P] = 50 µM, HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4, 5 °C, ^{1}H 700 MHz. S-CHOL12-Ø-J1-T5.

Une baisse globale et homogène d'intensité est observée pour tous les signaux du peptide avec l'ajout des liposomes. Seuls les signaux des peptides libres sont observés sur la Figure 104. Les signaux des liposomes n'apparaissent pas car la relaxation des liposomes à 5 °C est trop rapide et le peptide lié au liposome agit de la même façon que le liposome. Le signal des CH_2 n°3 à 15 de la chaîne lipidique (1,25 ppm) diminue plus rapidement que les signaux du reste du peptide. Aucune variation de déplacement chimique ni de largeur de raie n'est observée lors de la titration. La forme libre est donc en échange lent, à l'échelle des variations de déplacements chimiques, avec la forme liée dont les signaux sont suffisamment larges pour ne pas être visibles sur les spectres. La chaîne lipidique étant hydrophobe, elle va très probablement s'insérer dans la bicouche des liposomes. Les signaux des molécules ancrées dans sa bicouche vont s'élargir et devenir inobservables.

L'affinité de K14P et C16-K14P avec les liposomes soniqués a été évaluée en comparant les titrages, effectués à différentes concentrations en peptides. Les températures différentes ont été utilisées par erreur : 5 °C pour C16-K14P et 25 °C pour K14P, ce qui peut avoir un impact sur les résultats. Les signaux de la chaîne peptidique de C16-K14P diminuent drastiquement après l'ajout d'une faible quantité de liposomes (0,2 nM), contrairement à K14P qui demande plus de liposomes pour que l'intensité de ses signaux diminue. Pour diviser par 3 l'intensité des signaux RMN des deux peptides, le rapport [Peptide]/[Liposome] est de 38 pour K14P et de 500 pour C16-K14P, avec [K14P] = 210 µM, [C16-K14P] = 50 µM. Ainsi C16-K14P semble avoir une affinité plus de 10 fois plus grande avec les liposomes que le K14P. En conclusion la présence de la chaîne lipidique augmente la fore de l'interaction du peptide avec les liposomes.

3.2.5 Titrage de C16-K14P à une concentration supérieure à la CMC

Le titrage de C16-K14P par des liposomes soniqués, à une concentration supérieure à sa CMC a aussi été réalisé (Figure 105). L'objectif est d'observer l'impact des micelles de peptides sur les interactions peptide - liposome.

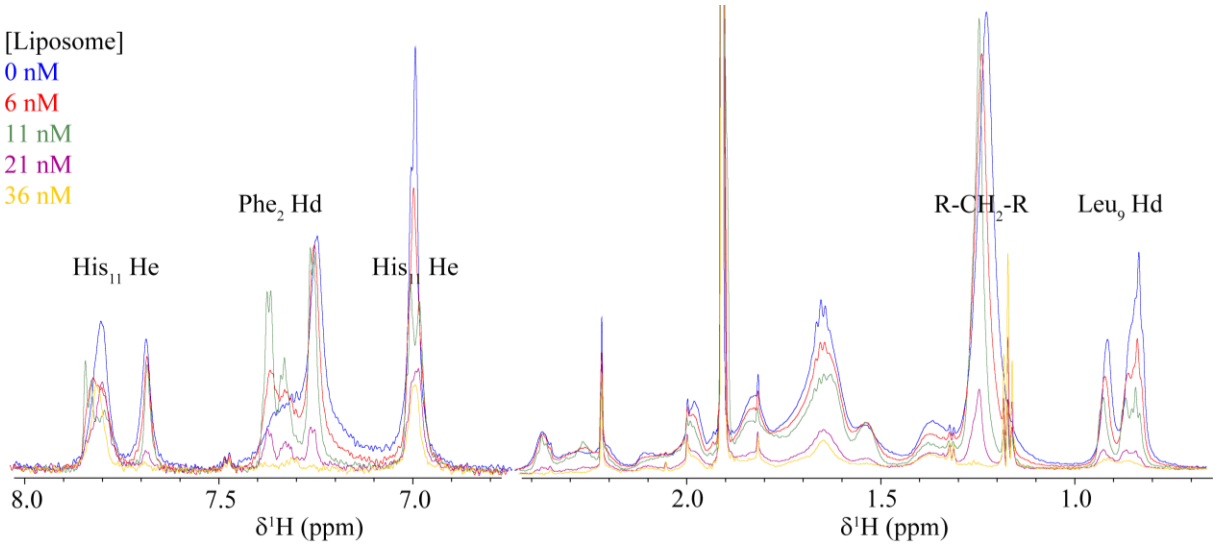


Figure 105 : Extraits des spectres RMN 1D ^{1}H de C16-K14P titré par une solution de liposomes soniqués à une concentration supérieure à sa CMC. [C16-K14P] = 288 µM, HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4, 5 °C, ^{1}H 700 MHz. S-CHOL12-Ø-J1-T5.

Les spectres de C16-K14P avec 0 nM de liposomes soniqués montrent des signaux larges en accord avec la présence de micelle de peptide. L'intensité des signaux est légèrement diminuée après l'ajout de 6 nM de liposomes. Lorsque la concentration en liposomes atteint 11 nM, les signaux du peptide s'affinent et certains augmentent en intensité (Phe_2, His_{11} et R-CH_2-R). Les ajouts de liposomes suivants font à nouveau diminuer l'intensité des signaux du peptide. Ce comportement suggère qu'il existe un équilibre entre le peptide sous forme micellaire et le peptide lié aux liposomes. En ajoutant des liposomes, l'équilibre se déplace principalement vers la formation de complexe peptide - liposome et la baisse de concentration en peptides libres réduit la formation de micelles. Les interactions peptide - liposome sont donc plus fortes que la formation des micelles.

3.3. Etude des interactions entre peptides et liposomes extrudés

Ce paragraphe a pour objectif d'étudier les interactions peptide - liposome dans le cas de liposomes extrudés.

Les titrages ont été réalisés sur quatre peptides différents : K14P, C11-K14P, C11F-K14P et C16-K14P. Pour rester cohérent dans ce paragraphe, la concentration en peptide utilisée est identique pour tous les titrages : 88 µM, concentration inférieure aux CMC des quatre peptides. L'intégrale des signaux du peptide est ensuite suivie en fonction de la concentration en liposomes dans l'échantillon.

3.3.1 Titrage de K14P

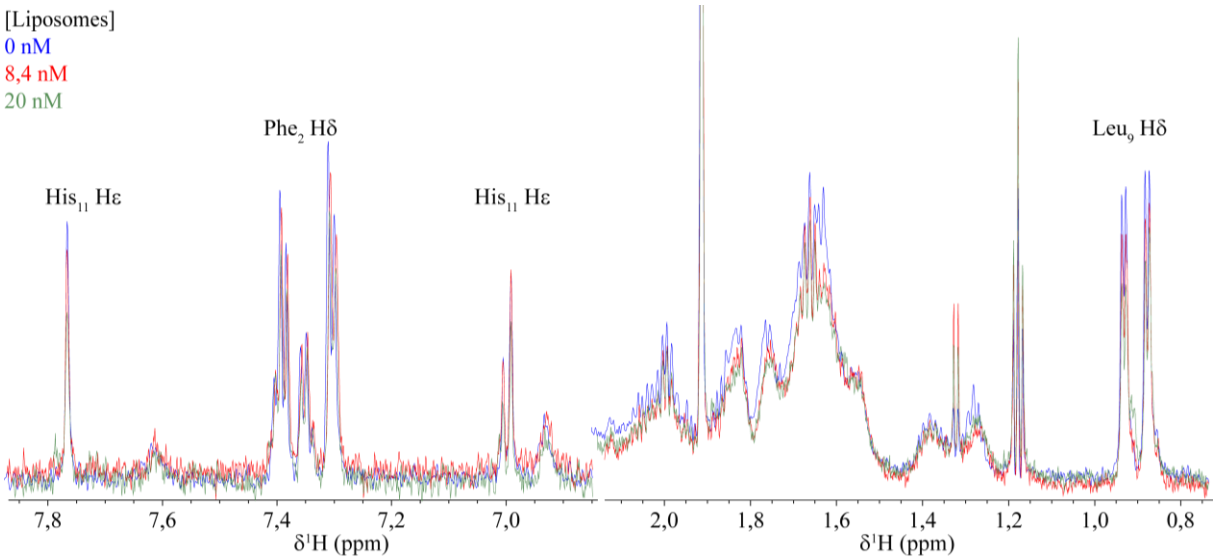


Figure 106 : Extraits des spectres RMN 1D ^{1}H de K14P titré par une solution de liposomes extrudés. [K14P] = 88 µM, HEPES 80 mM NaCl 100 mM, pH 7,4, 25 °C, ^{1}H 700 MHz. E-CHOL12-Ø-J4-Tamb.

Le premier peptide étudié est K14P. Il ne possède pas de chaîne lipidique et devrait donc être le peptide ayant l'interaction la plus faible avec les liposomes. Son titrage par des liposomes extrudés (Figure 106) montre une baisse d'intensité des signaux protons du peptide très faible, suggérant peu d'interaction avec eux. En effet, l'ajout de 20 nM de liposomes extrudés (2,4 mg.mL^{-1} de lipides) fait diminuer l'intensité des signaux de seulement 15 % alors que dans le cas des liposomes soniqués, une concentration de 6 nM (0,18 mg.mL^{-1} de lipides) faisait diminuer de 15 % l'intensité des signaux de K14P concentré à 210 µM, soit 2,3 fois plus concentré que dans le titrage avec les liposomes extrudés. Les liposomes extrudés semblent donc avoir moins d'affinité avec les peptides que les liposomes soniqués.

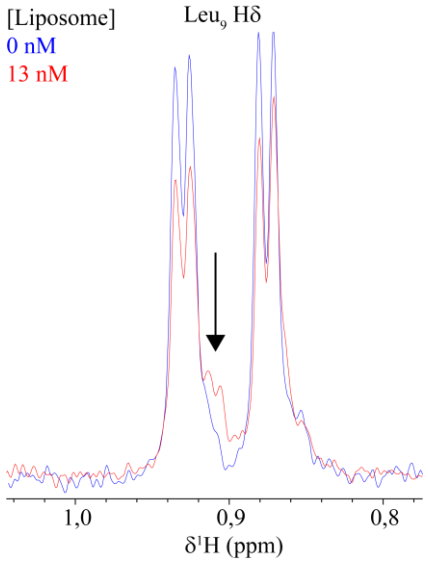


Figure 107 : Extraits des spectres de K14P avec 0 et 13 nM de liposomes. E-CHOL12-Ø-J4-Tamb.

A partir de 13 nM de liposomes ajoutés, l'intensité des signaux des méthyles de Leu_9 diminue de 30 %, mais de nouveaux signaux apparaissent avec un décalage de 0,02 ppm (Figure 107). Ces signaux pourraient correspondre à des peptides qui seraient entrés dans les liposomes.

3.3.2 Titrage de C16-K14P

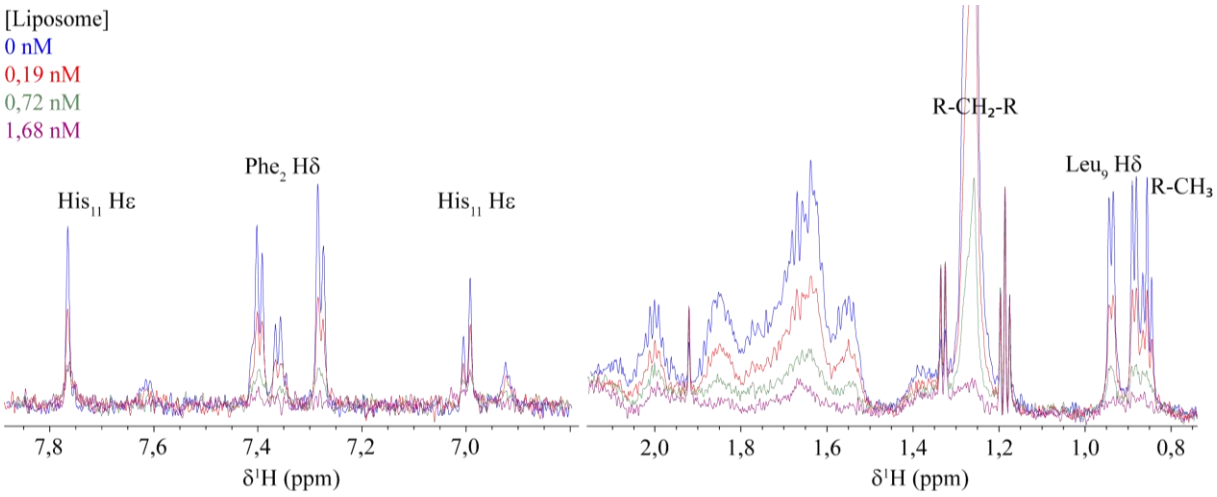


Figure 108 : Extraits de spectre RMN 1D ^{1}H de C16-K14P titré par une solution de liposomes extrudés. [C16-K14P] = 88 µM, HEPES 80 mM NaCl 100 mM, pH 7,4, 25 °C, ^{1}H 700 MHz. E-CHOL12-Ø-J1-Tamb.

Le deuxième peptide étudié est C16-K14P. Le titrage avec les liposomes soniqués a montré qu'il a plus d'interaction avec les liposomes soniqués que K14P. Ainsi le même résultat était attendu pour les liposomes extrudés. Li titrage de C16-K14P par des liposomes extrudés va permettre de vérifier cette hypothèse. La Figure 108 montre la superposition des spectres de C16-K14P avec différentes concentrations de liposomes. 0,14 nM de liposomes extrudés sont nécessaires pour diminuer l'intensité des peptides de 45 %, soit 143 fois moins de liposomes que pour faire diminuer l'intensité de K14P de 30 %. C16-K14P a donc beaucoup plus d'interactions avec les liposomes que K14P. Ceci s'explique par la chaîne lipidique palmitoylé. Cette chaîne est hydrophobe et peut donc s'ancrer dans la bicouche des liposomes.

3.3.3 C11-K14P

C11-K14P est un peptide possédant une chaîne lipidique plus courte que C16-K14P. Il a donc moins de surface d'interaction avec la bicouche des liposomes que C16-K14P laissant penser qu'il aura moins d'interaction avec les liposomes que C16-K14P. Le titrage de C11-K14P par des liposomes montre une diminution de l'intensité des signaux du peptide avec l'ajout de liposomes (Figure 109). Il faut 0,36 nM de liposomes pour diminuer l'intensité des signaux de 35 %. Il a donc moins d'interactions pour les liposomes que C16-K14P. Le phospholipide majoritaire des liposomes est le DPPC dont les chaînes lipidiques sont composées de 16 atomes de carbones. Il est possible que C11-K14P s'ancre moins

profondément que C16-K14P, diminuant ainsi les points de contact avec la bicouche des liposomes et donc leurs interactions.

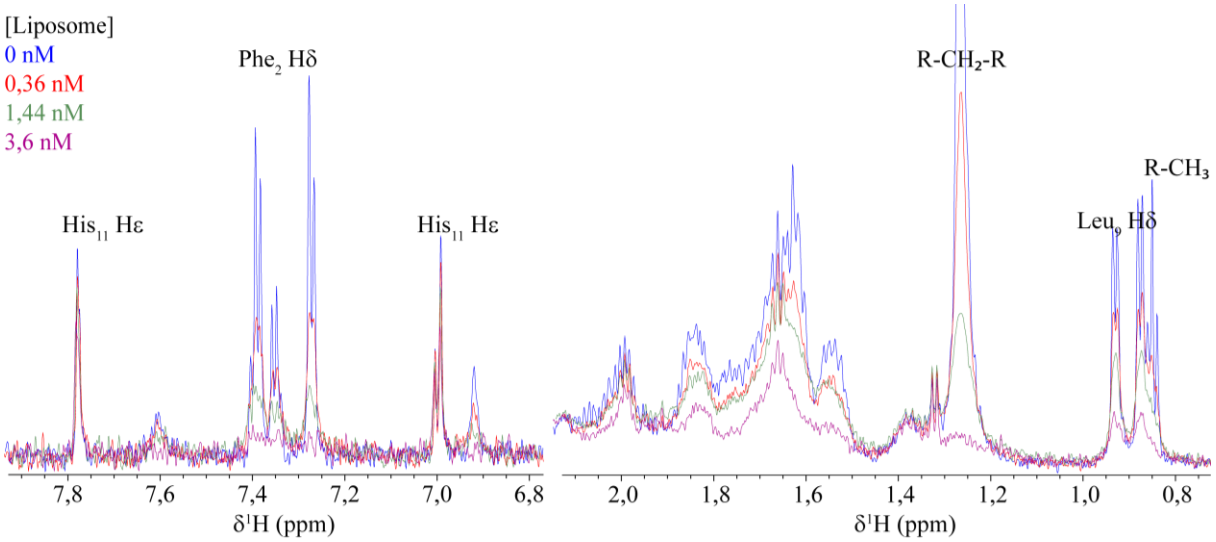


Figure 109 : Extraits de spectres RMN 1D ^{1}H de C11-K14P titré par une solution de liposomes extrudés. [C11-K14P] = 88 µM, HEPES 80 mM NaCl 100 mM, pH 7,4, 25 °C, ^{1}H 700 MHz. E-CHOL12-Ø-J0-Tamb.

3.3.4 C11F-K14P

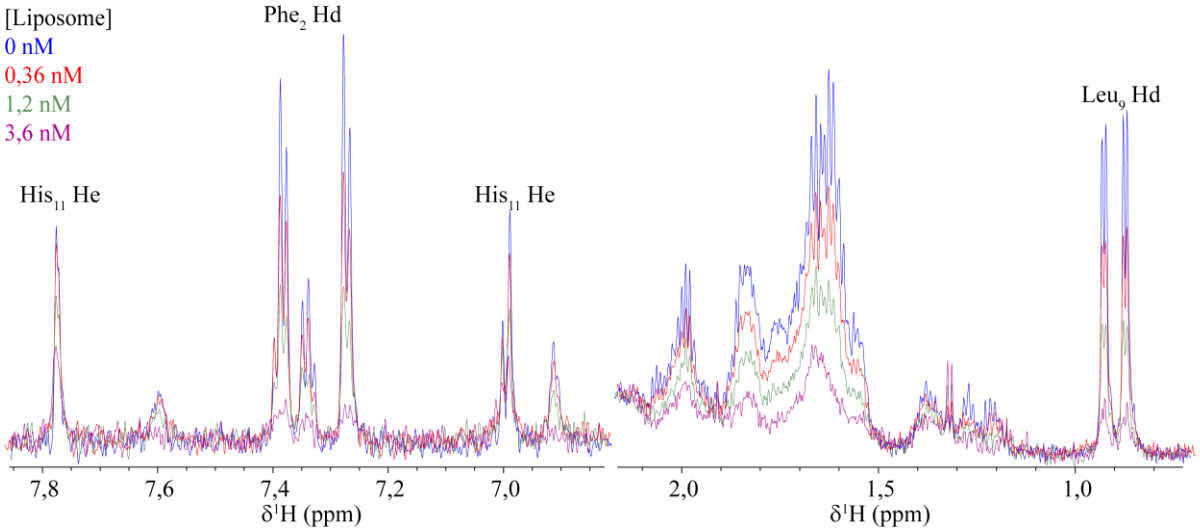


Figure 110 : Extraits des spectres RMN 1D ^{1}H de C11F-K14P titré par une solution de liposomes extrudés. [C11F-K14P] = 88 µM, HEPES 80 mM NaCl 100 mM, pH 7,4, 25 °C, ^{1}H 700 MHz. E-CHOL12-Ø-J1-Tamb.

Le dernier peptide étudié est C11F-K14P. La présence d'atomes de fluor à la place des hydrogènes le rend plus hydrophobe que C11-K14P, suggérant qu'il aura plus d'interactions avec la membrane des liposomes que C11-K14P. La Figure 110 montre l'évolution du spectre de C11F-K14P en fonction de la quantité de liposomes ajoutée. 0,36 nM de liposomes sont nécessaires pour faire diminuer les signaux de 30 %. Le peptide a donc moins d'interaction que C16-K14P mais la différence d'interactions avec C11-K14P n'est pas significative. Comme pour le paragraphe précédent, la longueur de la chaîne

lipidique, plus courte pour C11F-K14P que C16-K14P, explique certainement les différences d'interaction entre les deux peptides.

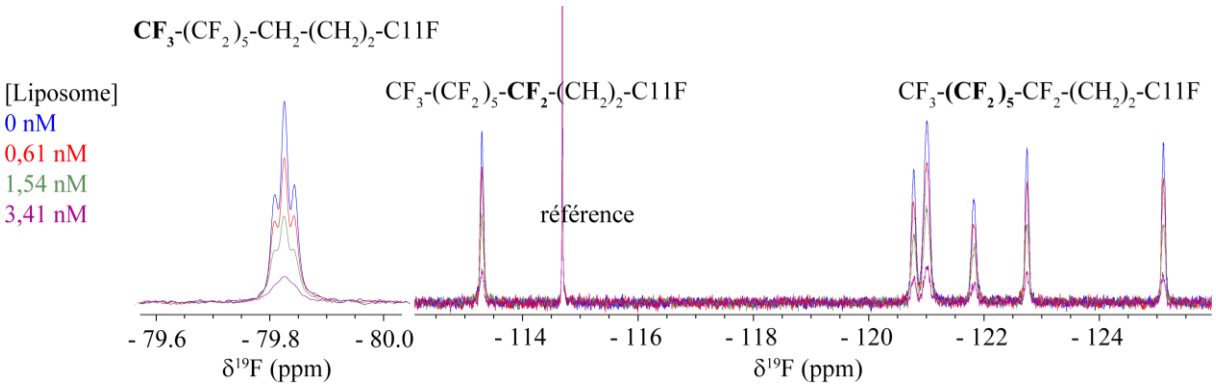


Figure 111 : Extraits des spectres RMN ^{19}F de C11F-K14P titré par une solution de liposomes extrudés. [C11F-K14P] = 88 µM, HEPES 80 mM NaCl 100 mM, pH 7,4, 25 °C, ^{19}F 565 MHz. Reference = 3-fluoro-4-methylbenzamidine. E-CHOL12-Ø-J1-Tamb.

L'avantage de C11F-K14P est d'avoir une chaîne fluorée qui peut être analysée par RMN ^{19}F. L'abondance naturelle de cet isotope est de 100 %. De plus la gamme de déplacement chimique du fluor est large, permettant de différencier facilement les différents atomes de fluor et donc d'observer les interactions avec les liposomes pour chacun d'eux. La Figure 111 montre l'évolution de l'intégrale des signaux des atomes de fluor en fonction de la quantité de liposomes ajoutée. L'intégrale des différents signaux diminuent de la même manière au cours du titrage. Ils ont donc des interactions équivalentes avec les liposomes. Ceci suggère que la chaîne s'ancre entièrement dans la bicouche.

3.4. Comparaison et classement des peptides en fonction de leur interaction avec les liposomes extrudés

Pour comparer les interactions des peptides avec les liposomes extrudés, il est possible de comparer l'évolution de l'intégrale de certains signaux (ici Hδ Phe_2) en fonction de la quantité de liposomes ajoutée (Figure 112). La concentration de chaque peptide est identique, ainsi que la composition du tampon et la température. Les résultats montrent qu'en ajoutant des liposomes, les signaux des peptides restent fins et diminuent en intensité. Les signaux observés correspondent aux peptides libres. La forme libre est en échange lent avec la forme liée dont les signaux sont suffisamment élargis pour ne pas être observables. Ce qui est cohérent avec le fait qu'à 25°C, aucun signal des liposomes n'est visible sur les spectres. Cette diminution est la moins forte dans le cas de K14P, où la quantité de liposomes doit être de 2 nM pour que l'intensité du signal diminue de 15 %. Il s'agit donc du peptide présentant le moins d'affinité avec les liposomes. Pour les trois autres peptides la diminution d'intensité est beaucoup plus importante : une diminution de 70 % de l'intensité est observée pour des concentrations de 0,005 à 0,03 µM. C16-K14P est le peptide présentant le plus d'interactions avec les liposomes extrudés puis C11-K14P et C11F-K14P et enfin K14P.

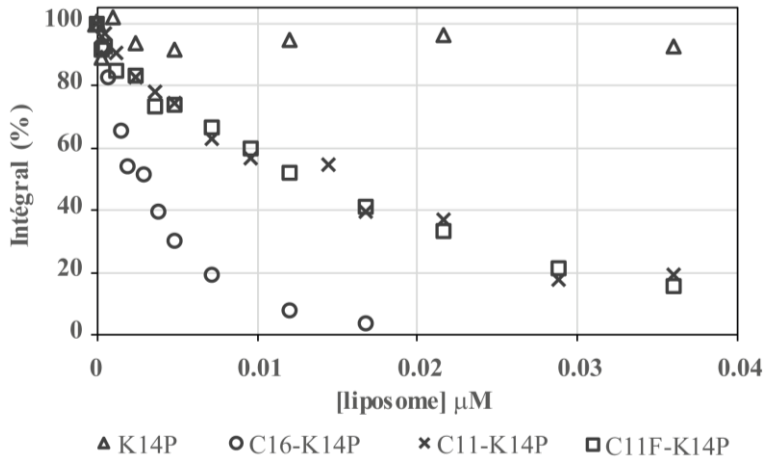


Figure 112 : Intégrale de Phe$_2$ Hδ en fonction de la concentration en liposomes, pour les peptides K14P, C16-K14P, C11-K14P et C11F-K14P. .

3.5. Comparaison et classement des liposomes extrudés et soniqués

Il est possible de comparer les interactions des liposomes extrudés et soniqués avec les peptides en observant les titrages de K14P et C16-K14P avec les liposomes soniqués et extrudés. L'intensité des signaux des peptides (K14P ou C16-K14P) diminue plus rapidement dans les cas des titrages avec les liposomes soniqués qu'extrudés. Il semblerait donc que les liposomes soniqués aient des interactions plus fortes avec les peptides que les liposomes extrudés. Cela pourrait s'expliquer soit par une interaction plus forte ou un plus grand nombre de sites d'interactions. Plusieurs facteurs peuvent l'expliquer. Les images de Cryo-TEM (Partie III Chapitre 3) ont montré que la taille et la structure des liposomes soniqués ou extrudés sont différentes. En comparant une vésicule unique, un liposome soniqué a une taille moyenne plus petite qu'un liposome extrudé : la surface disponible pour les contacts avec les peptides est donc plus faible dans le cas du liposome soniqué. Pour une différence de diamètre d'un facteur 2, il y a un facteur 4 sur la surface disponible. En revanche, pour une même quantité de lipides le nombre de liposomes soniqués sera supérieur aux liposomes extrudés et la surface totale disponible aussi. De plus les liposomes extrudés contiennent 40 % de bi-lamellaires, ce qui diminue encore la quantité de lipides disponibles à la surface extérieure des liposomes extrudés. D'après les résultats obtenus il semblerait donc qu'en moyenne la surface de lipides disponibles pour interagir avec les peptides soit supérieure dans le cas des liposomes soniqués qu'extrudés. Il est aussi possible d'expliquer les différences d'interactions peptide - liposome par la courbure différente de la surface des liposomes extrudés et soniqués. Les interactions peptide - liposome augmenteraient avec la courbure de la surface des liposomes.

3.6. Conclusion

Ce chapitre permet de classer les peptides en fonction de leurs interactions apparentes avec les liposomes : C16-K14P > C11-K14P ~ C11F-K14P >> K14P. La différence d'interaction entre les

peptides est principalement expliquée par la présence d'une chaîne lipidique. Plus cette chaîne est longue, plus les interactions peptide - liposome sont fortes.

Chapitre 4 : Différenciation des peptides à l'intérieur et à l'extérieur des liposomes

Dans les chapitres précédents les peptides et les liposomes isolés ainsi que les interactions peptide - liposome ont été caractérisés. L'intérêt des liposomes est de pouvoir encapsuler des PA dans l'objectif de prolonger leur durée de vie *in vivo*, d'optimiser leur relargage et donc leur administration. Pour les étudier, il faut être capable de suivre le relargage des PA encapsulés dans les liposomes *in vitro*. Pour cela, la première étape est de différencier les peptides à l'intérieur et l'extérieur des liposomes. Des échantillons de peptides encapsulés ont été analysés avant et après le relargage de peptides initié par un traitement thermique. La technique d'analyse choisie est la RMN et ce chapitre va présenter différentes options possibles pour différencier les peptides libres et encapsulés. Ce chapitre a donc pour objectif de mettre en place les outils qui permettront de suivre le relargage de PA encapsulés dans des liposomes. Les résultats des cinétiques de relargages seront présentés dans le chapitre suivant.

4.1. Différenciation des peptides encapsulés et libres à partir des spectres RMN 1D ^{1}H

Le spectre RMN le plus simple à enregistrer est un spectre 1D ^{1}H. L'isotope ^{1}H est présent naturellement à 99,98 % dans les échantillons et son rapport gyromagnétique est de 267,513 x 10^{6} rad.s^{-1}.T^{-1}, ce qui

en fait un bon candidat aux analyses RMN. L'acquisition d'un spectre proton peut ne durer que quelques secondes. Il peut donc être très utile pour le suivi de cinétiques de relargage. L'échantillon devrait donc peu évoluer pendant l'acquisition, contrairement à des expériences à plusieurs dimensions ou avec la détection d'un autre noyau moins sensible ou moins abondant, dont l'enregistrement peut durer plusieurs heures.

4.1.1 Variation des déplacements chimiques

Un échantillon 320 µM de K14P encapsulé dans des liposomes soniqués, 60 mg.mL^{-1}, (S-CHOL12-K14P-J1-5) a été observé à 5 °C par RMN 1D ^{1}H avant et après 2 h de traitement thermique à 35 °C (Figure 113). Les signaux RMN 1D ^{1}H du peptide avant traitement thermique sont larges. Après traitement thermique, l'intensité des signaux larges a diminué et de nouveaux signaux fins apparaissent (marqué par * sur la Figure 113). Ces signaux fins ressemblent aux signaux larges avec une variation de déplacement chimique de 0,06 ppm pour les signaux des méthyles de Leu$_9$ du peptide. Le signal fin est toujours plus déblindé que le signal large.

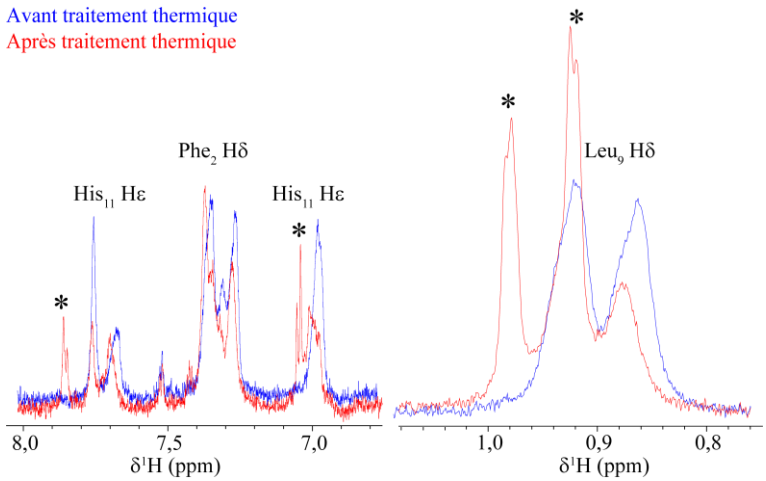


*Figure 113 : Signaux des protons aromatiques et de Leu$_9$ Hδ avant (bleu) et après (rouge) un traitement thermique à 35 °C pendant 2 h d'un échantillon de K14P encapsulé dans des liposomes soniqués. Les signaux fins, apparaissant après le traitement thermique, sont marqués par *. [K14P] = 320 µM, [liposome] = 60 mg.mL^{-1}. HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4, 5 °C, 950 MHz. S-CHOL12-C0-J11-T5.*

Il semble donc qu'il y ait deux populations de peptides dans l'échantillon après le traitement thermique. Les signaux larges pourraient être expliqués par un τ_c élevé et un T_2 faible, comme si la masse molaire des peptides correspondants aux signaux larges était plus grande que la masse molaire des peptides correspondants aux signaux fins. Ceci pourrait être expliqué par l'encapsulation du peptide : une fois encapsulé il serait contraint, dans ses mouvements, par le liposome ou en échange avec le liposome ce qui lui permettrait de se comporter comme une molécule de PM plus élevé. Il est donc probable que les signaux fins correspondent aux peptides relargués, qui ne sont plus contraints par les liposomes. La superposition des spectres RMN du peptide encapsulé après traitement thermique et du peptide seul

montrent que les signaux attribués aux peptides à l'extérieur des liposomes correspondent aux déplacements chimiques du peptide seul.

Ceci a été vérifié par des analyses DOSY (voir paragraphes suivants). La Figure 114 montre la décroissance d'intensité des signaux aromatiques du peptide en fonction du gradient appliqué au cours d'une expérience DOSY. Les signaux fins sont plus intenses à faible gradient que les signaux larges et ont une décroissance rapide par rapport aux signaux larges. Les signaux fins sont donc des signaux de molécules libres et les signaux larges de molécules encapsulées. En conclusion il est donc possible d'identifier les signaux de peptides encapsulés et libres par leur largeur de raie.

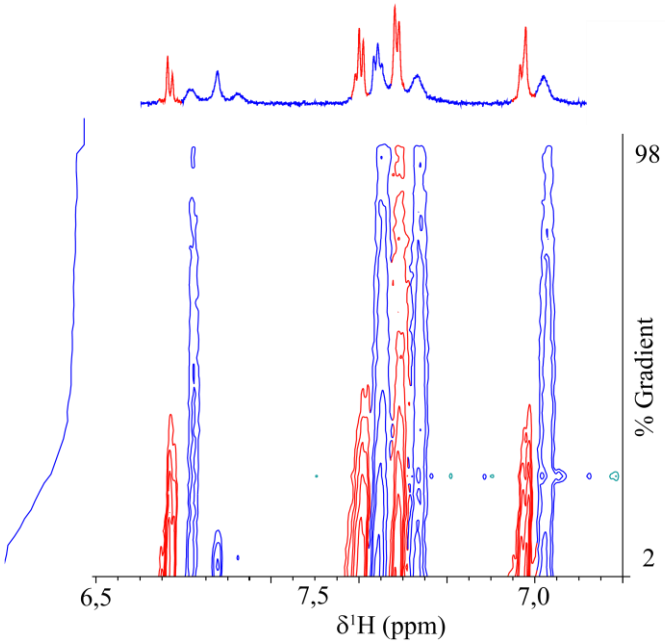


Figure 114 : Zoom sur la décroissance des signaux aromatiques du peptide observée lors d'une acquisition DOSY. Acquisition réalisée après un traitement thermique de 2 h à 35 °C. [K14P] = 320 µM, [liposome] = 22 mg.mL^{-1}, HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4, 5 °C, ^{1}H 950 MHz. S-CHOL12-C0-J11-T5.

Il existe plusieurs hypothèses pouvant expliquer la variation des déplacements chimiques entre les peptides libres et encapsulés. Tout d'abord une variation de pH pourrait créer des différences de déplacements chimiques entre les peptides libres et encapsulés. Cependant ces variations de déplacements chimiques devraient être dépendantes du proton observé, ce qui n'est pas le cas, la variation est globale (environ 0,06 ppm) pour le spectre de peptide entier. De plus la même solution tampon est utilisée pendant la préparation des échantillons, il est donc très probable que le pH interne et externe aux liposomes soient identiques. Ensuite les liposomes sont chargés négativement et le tampon contient 100 mM de NaCl. Il est possible qu'autour des membranes des liposomes il y ait un gradient d'ion (Na^+, Cl^-). Ainsi les ions Na^+ seraient en concentration plus importante proche de la membrane (pour écranter les charges négatives de la membrane) et diminueraient en concentration en s'éloignant. Cela créerait aussi un gradient de concentration pour les ions Cl^-. La concentration en sel ne serait donc pas homogène dans l'échantillon. Ainsi au moment de l'encapsulation, l'attraction des charges pourrait

faire que la concentration en ion ne soit pas la même à l'intérieur et à l'extérieur des liposomes. La concentration en sel serait inférieure à l'intérieur des liposomes ce qui pourrait potentiellement créer une variation de déplacement chimique. Cependant l'analyse de la structure de K14P réalisée par RMN avec des tampons contenant différentes concentrations de sel montrent qu'il n'y a pas de variation de déplacements chimiques entre les différentes solutions. Une variation de sel ne peut donc pas expliquer les variations de déplacement chimique. La dernière hypothèse serait que le liposome se déforme sous l'action du champ magnétique du spectromètre. Si les liposomes ont une forme ovale plutôt que sphérique, cela crée une certaine anisotropie qui pourrait engendrer une variation de déplacements chimiques entre les peptides libres et encapsulés. La publication de Tenforte et Liburdy présente plusieurs modèles permettant d'expliquer leurs données expérimentales où ils observent une variation de la cinétique de relargage de molécules encapsulées dans des liposomes en fonction du champ magnétique extérieur (Tenforde and Liburdy, 1988). D'après eux, les liposomes pourraient former des ellipses au moment de la transition de phase où une partie des lipides se trouve en phase gel et une partie en phase solide. A 35 °C, d'après les mesures de T_m réalisées dans le Partie III - Chapitre 2, les liposomes soniqués devraient se trouver dans cette phase de transition. Dans ce projet, il paraît donc possible que les différences de déplacements chimiques observées entre les peptides libres et encapsulés soient liées à la forme ellipsoïde du liposome en présence des champs magnétiques. Brumm *et al.* montre aussi que la forme ellipsoïde des phospholipides dépend de la température et du nombre de bicouches. Pour une formulation contenant du DPPC et 30 % de cholestérol, les MLV sont ellipsoïdes à 30 °C mais plus à 50 °C alors que des liposomes uni ou bi-lamellaires vont rester sphériques (Brumm *et al.*, 1992). Ils prouvent la présence des ellipsoïdes en réalisant des images de microscopie électronique sur des échantillons congelés dans un champ magnétique de 9,4 Tesla, ce qui correspond à un aimant avec une fréquence ^{1}H de 400 MHz. En revanche Aime *et al.* montrent que les liposomes sont sphériques sous l'effet d'un champ magnétique en regardant la variation de déplacement chimique de l'eau interne et externe aux liposomes à l'aide d'un lanthanide encapsulé dans les liposomes (Aime, Castelli and Terreno, 2009). La variation de déplacement chimique des protons dépend de plusieurs termes dont le « bulk magnetic susceptibility » (BMS) qui est nul lorsque le lanthanide est encapsulé dans un environnement sphérique et qui augmente lorsque la vésicule s'aplatit. Pour déformer les liposomes et obtenir des ellipsoïdes, les auteurs augmentent l'osmolarité du tampon à l'extérieur des liposomes. Selon cette étude, le champ magnétique n'influe pas sur la forme des liposomes. Afin de déterminer si le champ magnétique influait sur la variation des déplacements chimiques entre les peptides libres et encapsulés, des spectres de K14P encapsulé dans des liposomes extrudés ont été comparés à 2 champs magnétiques différents (500 et 950 MHz), en faisant l'hypothèse que les liposomes extrudés et soniqués ont le même comportement vis-à-vis du champ magnétique. Aucune variation de déplacement chimique dû au champ n'est visible. Les seules variations de déplacement chimique observées concernent les multiplets, par exemple les signaux des protons aromatiques de Phe_2 : le

déplacement chimique central est identique quel que soit le champ en revanche les déplacements chimiques de chaque pic sont légèrement différents (Figure 115). Ceci s'explique car les couplages de protons sont définis en Hz, ainsi sur un axe en ppm, de spectromètres de champs différents, les déplacements chimiques des couplages seront légèrement différents. Le champ magnétique des spectromètres ne semble donc pas impacter non plus la variation des déplacements chimiques des peptides libres et encapsulés.

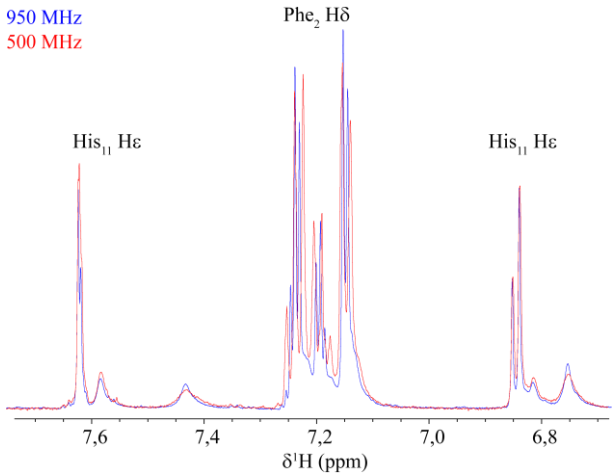


Figure 115: Signaux des protons aromatiques de K14P, encapsulés dans des liposomes extrudés, à différents champs magnétiques. [K14P] = 4,8 mM, [liposome] = 60 mg.mL^{-1}, HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4, 25 °C. E-CHOL12-C0-J0-Tamb.

4.1.2 Estimation de la quantité de peptide encapsulé et libre

Le paragraphe précédent a montré qu'il était possible de différencier les peptides internes et externes aux liposomes grâce à la forme de raie et déplacement chimique de leurs signaux RMN. De plus la variation de déplacement chimique est suffisante pour séparer certains signaux (histidine à 7,0 et 7,7 ppm et leucine à 0,9 ppm). L'intégrale et l'intensité des signaux RMN sont proportionnelles à la quantité de la molécule correspondante. De plus la séquence utilisée contient une suppression d'eau qui ajoute un délai supplémentaire lorsque les spins sont dans le plan avant l'acquisition. Ce délai a donc un impact sur l'effet de la relaxation T_2 et sur l'expression des couplages ce qui peut changer l'intensité et la forme des raies du spectre. Pour que l'acquisition soit quantitative il faut faire l'hypothèse que les T_2 des protons soient identiques. Ainsi en superposant dans un premier temps les signaux du peptide encapsulé ou libre, il est possible de comparer l'intensité des signaux et donc d'estimer la proportion de peptides relargués lors d'une cinétique.

4.2. Différenciation des peptides encapsulés et libres à l'aide d'agents paramagnétiques

Les agents paramagnétiques sont utilisés en RMN pour leurs pouvoirs relaxant ou leur impact sur les déplacements chimiques et mettre en évidence des zones d'interactions entre protéines ou pour

déterminer le repliement d'une protéine (Otting, 2010). Dans le cas des peptides encapsulés dans les liposomes, l'intérêt d'ajouter un complexe affectant les déplacements chimiques à l'extérieur des liposomes serait d'augmenter la variation de déplacement chimique du peptide à l'extérieur des liposomes pour permettre une meilleure séparation des signaux, grâce à l'effet « PseudoContact Shift » (PCS) du complexe. Alors que l'utilisation d'un complexe relaxant permettrait de diminuer, voire de faire disparaître, l'intensité des signaux du peptide à l'extérieur des liposomes, grâce à l'effet « Paramagnetic Relaxation Enhancement » (PRE) du complexe. Plusieurs complexes paramagnétiques ont été testés, un relaxant ($Gd(DOTA)^-$) et trois affectant les déplacements chimiques ($Ln(DOTP)^{5-}$ avec Ln = Tm^{3+}, Dy^{3+} ou Tb^{3+}). Les effets attendus sur les signaux RMN du peptide, en fonction des propriétés du complexe paramagnétique, sont présentés en Figure 116. Ces méthodes ont déjà été utilisées pour le suivi de cinétique de relargage dans des liposomes par Gent et Prestegard par exemple où les auteurs utilisent le complexe $K_3Fe(CN)_6$ comme agent affectant les déplacements chimiques (Gent and Prestegard, 1976). L'équipe de Thompson quant à elle utilise le Pr^{3+} comme agent affectant les déplacements chimiques (Schmidt, Barenholz and Thompson, 1977). Dans les deux cas aucune variation de déplacement chimique n'était observée entre les molécules encapsulées et libres avant l'ajout de la sonde paramagnétique, les tailles des vésicules n'étant pas précisées dans les publications.

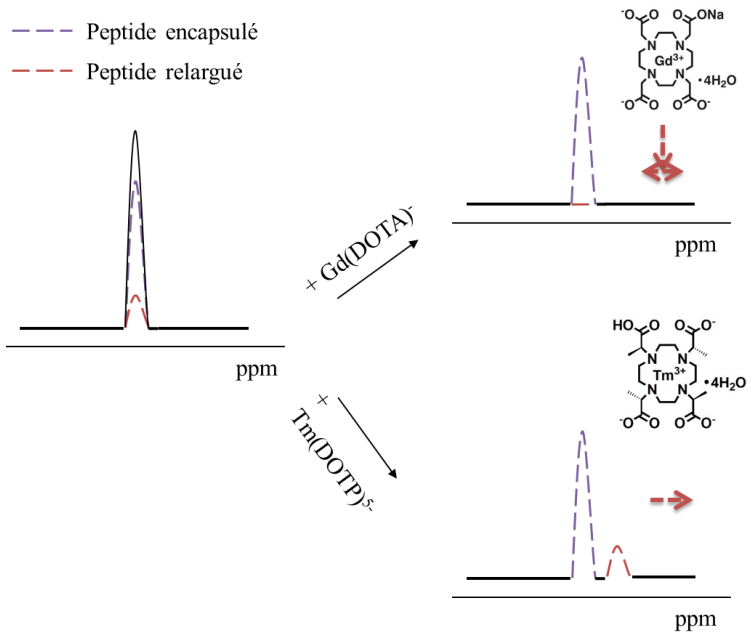


Figure 116 : Effet attendu sur le spectre RMN en présence d'un complexe paramagnétique relaxant ($Gd(DOTA)^-$) à l'extérieur des liposomes et en présence d'un complexe paramagnétique affectant les déplacements chimiques ($Tm(DOTP)^{5-}$). Les signaux violets correspondent aux signaux du peptide encapsulé et les signaux rouges au peptide libre. Le spectre à gauche représente un spectre où le relargage du peptide est observé, sans variation de déplacement chimique entre le peptide libre et encapsulé. En ajoutant $Gd(DOTA)^-$, une disparition des signaux du peptide relargué à l'extérieur des liposomes devrait être observée. En ajoutant $Tm(DOTP)^{5-}$, une variation des déplacements chimiques pour le peptide libre devrait être observée.

4.2.1 Utilisation d'un agent relaxant : $Gd(DOTA)^-$

L'utilisation d'un agent relaxant conduit à l'élargissement des signaux protons proches de la sonde diminuant ainsi leur intensité jusqu'à potentiellement une disparition complète. Le Dotarem est une formulation commerciale utilisée comme agent de contraste pour les analyses d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). Il est composé d'un complexe paramagnétique $Gd(DOTA)^-$ (Figure 117) à 0.5 mmol mL^{-1} et d'excipients : de la méglumine et de l'eau. L'agent paramagnétique permet de réduire les temps de relaxation T_1 et T_2 et donc d'accélérer la relaxation des molécules dont il est proche dans l'espace. Le gadolinium n'a pas d'effet PCS *i.e.* il n'induit pas de variation de déplacement chimique.

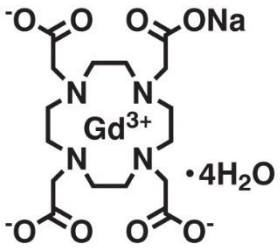


Figure 117 : Structure de $Gd(DOTA)^-$, Na^+.

L'objectif est d'ajouter le complexe paramagnétique à l'extérieur des liposomes pour faire disparaître les signaux des peptides relargués. L'intensité des signaux RMN du peptide encapsulé devrait diminuer au cours du relargage et aucun signal de peptides relargués ne devrait apparaître. Cela permettrait d'observer seulement les peptides encapsulés sur les spectres si la quantité d'agent relaxant est suffisante pour que le signal des peptides relargués soit annulé.

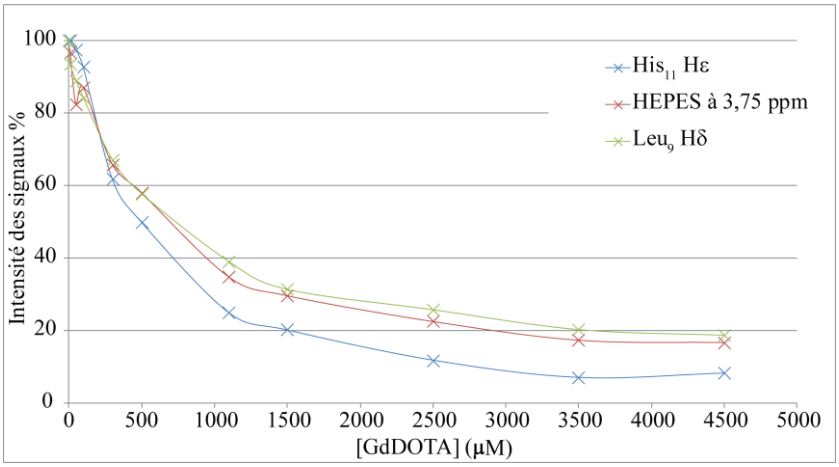


Figure 118 : Décroissance des signaux de K14P en fonction de la concentration en $Gd(DOTA)^-$ à 25°C. [K14P] = 200 µM, HEPES 80 mM NaCl 100 mM. Courbe bleue : protons aromatiques (entre 6,5 et 7,7 ppm), courbe rouge : l'HEPES à 3,75 ppm, courbe verte : méthyle de Leu_9 à 0,8 ppm, ^1H 700 MHz.

Afin de déterminer la quantité de complexe nécessaire pour faire disparaître les signaux du peptide un titrage de K14P par le complexe paramagnétique a été réalisé. L'effet relaxant dépend de la concentration locale de l'agent paramagnétique : plus la quantité de complexe est importante, plus l'effet

relaxant sera efficace. Les premiers résultats montrent que les différents signaux du peptide sur les spectres ne se comportent pas de la même façon en présence du complexe. La décroissance d'intensité des signaux suit une courbe exponentielle, mais la décroissance est un peu plus marquée dans le cas des signaux aromatiques du peptide (Figure 118).

Certains points du titrage ont été enregistrés à différentes températures (5, 15 et 37°C) pour déterminer si l'impact du complexe paramagnétique sur l'intensité des signaux dépend de la température de l'échantillon. Les résultats (Tableau 17) montrent que 300 µM de $Gd(DOTA)^-$ permettent de faire diminuer de 51 % les signaux aromatiques à 5°C, mais seulement 38 % à 25°C et 19 % à 37°C. L'impact du complexe paramagnétique sur la relaxation du peptide est donc dépendant de la température.

	Signal RMN %								
	Ar. 7,7 – 6,5 ppm			**HEPES 3,75 ppm**			**Leu_9 Hδ 0,8 ppm**		
[$Gd(DOTA)^-$] mM	**5 °C**	**25 °C**	**37 °C**	**5 °C**	**25 °C**	**37 °C**	**5 °C**	**25 °C**	**37 °C**
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,3	49	62	81	70	66	86	68	67	80
4,5	3	8	17	16	17	37	13	19	16

Tableau 17: Intensité des signaux deK14P en fonction de la concentration de $Gd(DOTA)^-$ et de la température. Les incertitudes des valeurs sont estimées à 15 %. Ar. correspond à la zone des protons aromatiques de K14P (Phe_2 Hδ et His11 Hε).

$Gd(DOTA)^-$ permet bien de réduire l'intensité des signaux RMN. Il est possible d'augmenter cet effet ajustant la température à laquelle les analyses sont enregistrées : plus la température est élevée, plus la quantité de $Gd(DOTA)^-$ doit être importante pour diminuer l'intensité des signaux. Il est probable que la température joue sur les interactions entre le complexe et le peptide, avec des interactions moléculaires plus fortes à basse température (5 °C) qu'à haute température (37 °C). Cependant, la courbe de décroissance des signaux tend vers un plateau, c'est-à-dire qu'une très grande quantité de $Gd(DOTA)^-$ est nécessaire pour faire disparaître les 10 % restant des signaux.

Plus l'ajout de $Gd(DOTA)^-$ est important plus les risques de fragiliser les liposomes augmentent. En effet, l'ajout de $Gd(DOTA)^-$ à l'extérieur des liposomes pourrait induire une différence d'osmolarité entre l'intérieur et l'extérieur des liposomes qui fragiliserait les liposomes et favoriserait un relargage plus rapide. L'effet du complexe paramagnétique sur la stabilité du liposome a donc été étudié pour vérifier qu'il ne changeait pas significativement l'osmolarité de l'échantillon. Les mesures d'osmolarités ont été réalisées à l'aide d'un appareil VAPRO® Osmomètre à Tension de Vapeur. Des mesures du diamètre des liposomes ont aussi été réalisées par DLS pour vérifier que le complexe n'agissait pas sur cette caractéristique. Les échantillons testés étaient les suivants : le tampon seul (HEPES 80 mM, NaCl 100 mM), le tampon avec des liposomes (60 $mg.mL^{-1}$), le tampon avec des liposomes et $Gd(DOTA)^-$. Une concentration en $Gd(DOTA)^-$ de 4,5 mM a été choisie, elle devrait correspondre à la concentration maximum de complexe susceptible d'être d'ajoutée dans un échantillon de liposomes soniqués. Les résultats (Tableau 18) ont montré qu'il n'y avait aucune différence significative d'osmolarité ou de taille des liposomes entre les échantillons contenant du $Gd(DOTA)^-$ et ceux n'en contenant pas. Il est donc

possible d'utiliser ce complexe pour suivre le relargage de peptide en dehors des liposomes sans influencer la stabilité des liposomes et donc sans jouer sur la cinétique de relargage.

Osmolarité mOsm.Kg^{-1}	Tampon seul	Liposomes	Liposomes + Gd(DOTA)$^-$
J0	383 ± 6	383 ± 3	393 ± 3
J+7	/	373 ± 2	374 ± 2

Tableau 18 : Mesure d'osmolarité d'échantillons contenant du tampon HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4, des liposomes et du Gd(DOTA)$^-$. Les mesures ont été répétées 3 fois.

Un moyen pour faire disparaître les signaux sans augmenter la quantité de Gd(DOTA)$^-$ consiste à ajouter un filtre T_2 dans la séquence RMN. L'ajout d'un spin-lock dans la séquence permet de démarrer l'acquisition après que les signaux des molécules libres, qui sont au contact ou à proximité de la sonde paramagnétique, aient fini de relaxer. Ne sont visibles que les signaux ayant un T_2 suffisamment long *i.e.* les molécules éloignées de l'agent relaxant. L'inconvénient de ce filtre est qu'il diminue aussi l'intensité de tous les signaux présents dans le spectre, y compris ceux d'intérêt comme les signaux des peptides encore encapsulés. Cela réduit le rapport signal-sur-bruit. Les résultats (Figure 119) montrent qu'ajouter un filtre de 10 ms diminue de 20 % supplémentaire l'intensité des signaux des méthyles de Leu_9 de K14P à une concentration de 200 µM lorsque la quantité de Gd(DOTA)$^-$ est de 4,5 mM, dans un tampon contenant 80 mM d'HEPES et 100 mM de NaCl à pH 7,4 à 5 °C.

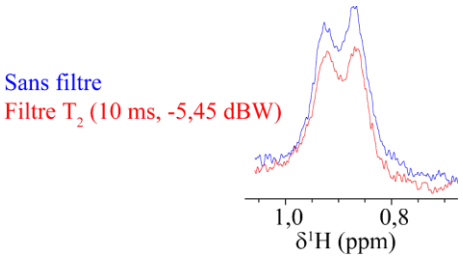


Figure 119 : Signaux Leu_9 Hδ de K14P, comparaison du même échantillon avec (rouge) et sans filtre (bleu). [K14P] = 200 µM, [Gd(DOTA)$^-$] = 4,5 mM, HEPES 80 mM NaCl 100 mM. 5°C. 700 MHz.

Pour conclure, Gd(DOTA)$^-$ ne permet que partiellement de diminuer l'intensité des signaux du peptide à l'extérieur des liposomes. De ce fait il ne remplit pas l'objectif de départ qui était d'observer seulement les peptides encapsulés. Il a donc peu d'intérêt pour suivre la cinétique de relargage de peptides encapsulés dans des liposomes.

4.2.2 Utilisation d'agents affectant les déplacements chimiques : Dy(DOTP)$^{5-}$, Tb(DOTP)$^{5-}$ et Tm(DOTP)$^{5-}$

L'intérêt en ajoutant un complexe paramagnétique affectant les déplacements chimiques à l'extérieur des liposomes est d'augmenter la différence de déplacement chimique entre les peptides libres et encapsulés. Cette méthode devrait permettre de conserver l'information des peptides encapsulés et libres contrairement à l'utilisation d'un agent relaxant qui fait disparaître l'information des signaux du peptide libre.

Trois complexes paramagnétiques ont été testés : $Tm(DOTP)^{5-}$, $Dy(DOTP)^{5-}$, $Tb(DOTP)^{5-}$. Ces complexes sont formés des lanthanides affectant le plus fortement les déplacements chimiques et parmi ceux qui impactent le moins T_2 (Geraldes, Sherry, & Kiefer, 1992). La cage $DOTP^{8-}$ a été choisie car elle forme avec des lanthanides des complexes affectant fortement les déplacements chimiques, très stables et déjà utilisés dans la littérature (Sherry, Malloy, Jeffrey, Cacheris, & Geraldes, 1988). De plus elle permet de former des complexes de charge négative ce qui permet, pour ce projet, de favoriser les interactions avec le peptide, de charge positive, et de limiter les interactions avec le liposome, de charge négative.

a) Synthèse des complexes

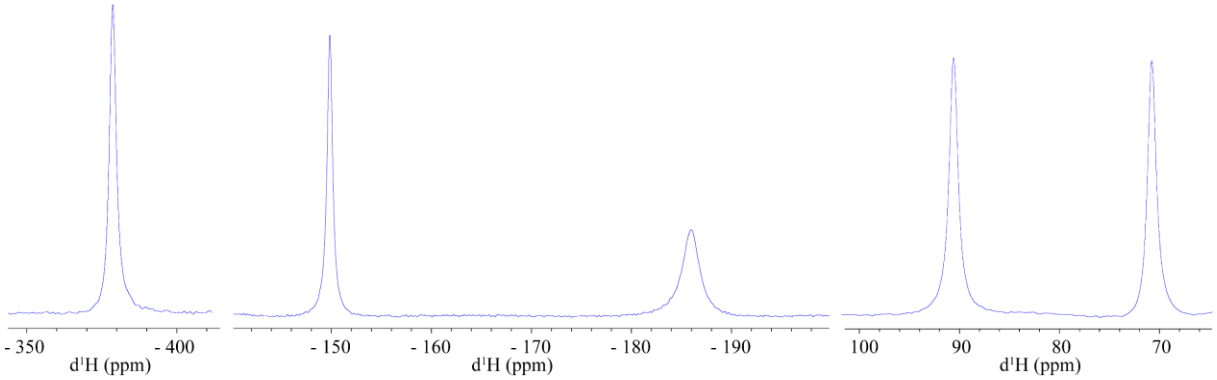


Figure 120 : Spectres RMN ^1H de $Tm(DOTP)^{5-}$.

Les complexes ont été synthétisés selon le protocole présenté Partie II - Chapitre 1. Le suivi de synthèse, pour optimiser ces protocoles, a pu être réalisé par RMN 1D ^1H. Les déplacements chimiques des atomes d'hydrogènes du DOTP complexé à des éléments paramagnétiques sont très éloignés de la gamme classique pour le proton (Figure 120). Ainsi les déplacements chimiques du DOTP, en fonction de l'élément paramagnétique auquel il est complexé, sont présentés Tableau 19.

Complexe	**δ ^1H (ppm)**
$Tb(DOTP)^{5-}$	130, -105, -115
$Dy(DOTP)^{5-}$	110, -86, -92, -410
$Tm(DOTP)^{5-}$	70, 90, -150, -195, -400

Tableau 19 : Déplacements chimiques des atomes d'hydrogènes des complexes paramagnétiques.

b) Simulation de l'encapsulation et de relargage des peptides

Avant de tester les complexes sur une solution de peptides encapsulés dans des liposomes, un capillaire a été utilisé pour simuler l'encapsulation de peptides. L'échantillon utilisé est un tube contenant 450 µL de K14P à une concentration 43 µM et un capillaire contenant 200 µL de K14P à une concentration de 43 µM ainsi que 20 µL de D_2O. Au cours du titrage, le complexe paramagnétique a été ajouté dans le tube à l'extérieur du capillaire. L'avantage de cette expérience est d'observer l'effet du complexe en faisant abstraction de l'effet des liposomes. L'objectif est de déterminer s'il est possible de faire varier

suffisamment les déplacements chimiques des signaux du peptide à l'extérieur du capillaire avec l'ajout des complexes et ainsi différencier les deux populations en fonction de leurs déplacements chimiques. Ensuite la quantité de complexe paramagnétique optimale à utiliser pourra être déterminée. Ce sera un compromis entre la quantité nécessaire pour différencier les déplacements chimiques des peptides à l'intérieur et à l'extérieur du capillaire et la perte en intensité due à la relaxation T_2.

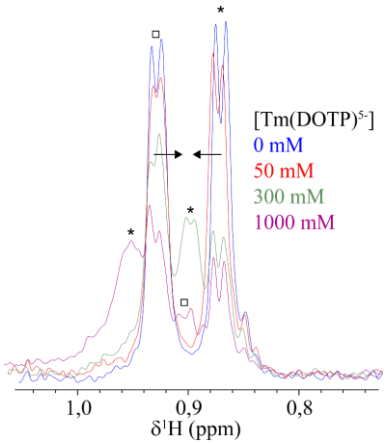


Figure 121 : Signaux de Leu$_9$ Hδ lors du titrage simulant l'encapsulation de peptides avec le Tm(DOTP)$^{5-}$. [K14P] = 43 µM, HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4, [Tm(DOTP)$^{5-}$] = 0 µM (bleu) 50 µM (rouge) 300 µM (vert) 1000 µM (violet). Le signal à 0,9 ppm dans le spectre violet vient du doublet de droite. 5 °C, ^{1}H 700 MHz. Les flèches indiquent la direction des variations des déplacements chimiques pour chaque signal. Les étoiles et les carrés permettent d'identifier les deux doublets de Leu$_9$ sur chaque spectre.

Le premier complexe étudié est celui contenant du thulium, Tm(DOTP)$^{5-}$. Il a été préparé en mélangeant les solutions de ligand et de l'élément paramagnétique comme présenté dans le matériels et méthodes. Les déplacements chimiques des protons du complexes sont très éloignés de la gamme de déplacements chimiques du proton. La complexation a donc pu être suivie par RMN 1D ^{1}H. Les premiers résultats ont montré qu'aucune variation de déplacement chimique n'était visible au niveau des protons aliphatiques du peptide entre 1,2 et 2,5 ppm pour une quantité de complexe allant de 0 à 1,25 mM dans un tampon HEPES 80 mM et NaCl 100 mM. Les signaux des arginines à 1,45 ppm disparaissent avec 50 µM de complexe. Les signaux aromatiques de l'histidine à 7,0 ppm se déplacent de 0,09 ppm avec 50 µM de complexe et diminuent de 50 %. Ils disparaissent complétement à 150 µM de complexe. Les signaux les plus intéressants sont ceux des méthyles de Leu$_9$ à 0,9 ppm (Figure 121). Pour ces signaux, il est possible d'observer des différences de déplacements chimiques entre les peptides à l'intérieur et à l'extérieur du capillaire dès que la concentration en complexe paramagnétique atteint 300 µM (Figure 121, spectre vert). Cependant le doublet de la leucine à 0,87 ppm (*), en contact avec le complexe paramagnétique, se déplace vers la gauche du spectre jusqu'à se retrouver sous le doublet à 0,93 ppm (□). Ce doublet à 0,93 ppm se déplace avec une amplitude plus faible vers les déplacements chimiques bas. Il est donc possible de séparer les signaux du peptide libre et encapsulé pour le doublet à 0,87 ppm mais la quantité nécessaire de complexes paramagnétiques à ajouter est assez importante,1 mM de Tm(DOTP)$^{5-}$. Cela

augmente la vitesse de relaxation R_2, entraînant une diminution de l'intensité des signaux sur le spectre et donc du ratio signal-sur-bruit. Il est alors plus difficile d'identifier et d'intégrer les signaux.

Il faut aussi noter l'importance de la valeur du pH. En effet à un pH proche de 8, c'est-à-dire avec une différence de 0,6 unité par rapport au pH de référence de 7,4, l'amplitude de variation des déplacements chimiques est plus faible, pour la même quantité de complexe paramagnétique. Ce complexe serait donc peut être plus adapté pour faire varier les déplacements chimiques de protons à pH acide.

En conclusion, $Tm(DOTP)^{5-}$ permet de faire varier les déplacements chimiques du peptide mais la quantité nécessaire pour observer une variation fait que du PRE est observé, entraînant une diminution de l'intensité des signaux. Le complexe paramagnétique est de charge nette négative et certains résidus du peptide sont chargés positivement comme l'arginine et l'histidine. Les baisses d'intensités des signaux sont justement plus importantes dans les zones du spectre correspondant à ces résidus. De plus l'effet PRE des complexes paramagnétiques dépend de la distance entre le complexe paramagnétique et le proton observé en $^1/_{r^6}$. Plus le complexe est proche d'un proton plus l'intensité du proton sera impactée. Le complexe va donc interagir de manière préférentielle avec les résidus d'arginine et d'histidine. Il serait plus commode de travailler avec un complexe permettant de déplacer les signaux du doublet à 0,87 ppm vers les déplacements chimiques bas et le doublet à 0,93 ppm vers les déplacements chimiques hauts *i.e.* dans la direction opposée aux variations observées en présence de thulium. Ainsi il n'y aurait aucune superposition entre les signaux des protons des méthyles de la leucine encapsulée et libre. Deux autres complexes ont donc été étudiés : $Dy(DOTP)^{5-}$ et $Tb(DOTP)^{5-}$. Ils devraient engendrer une variation de déplacements chimiques de sens opposé à $Tm(DOTP)^{5-}$.

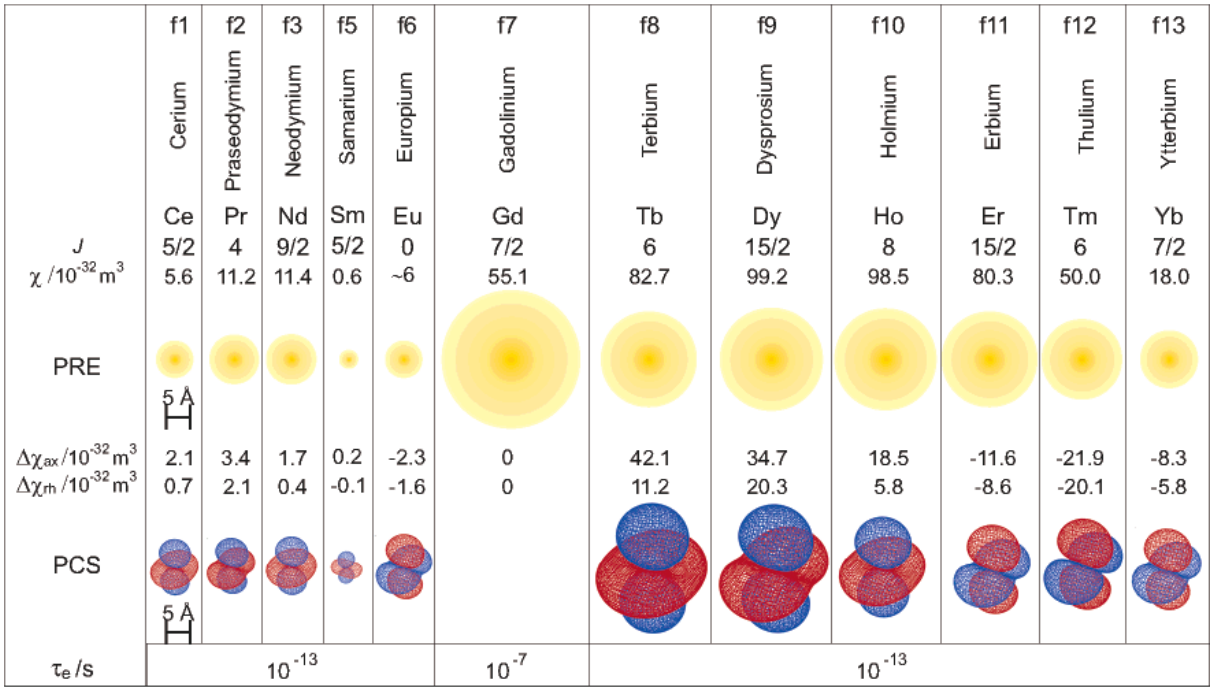


Figure 122 : Récapitulatif des effets des lanthanides paramagnétiques ainsi que le schéma des orbitales (Pintacuda *et al.*, 2007).

Les doublets des méthyles de Leu_9 ont des comportements similaires dans les deux complexes : leurs déplacements chimiques se décalent dans les mêmes directions *i.e.* vers les déplacements chimiques élevés du spectre. D'après les expériences de Geraldes *et al.* (Geraldes, Sherry and Kiefer, 1992) les variations observées devraient être opposées à celles observées pour $Tm(DOTP)^{5-}$. Ce qui est le cas que pour un des deux doublets de la Leu_9, à 0,95 ppm. La direction des variations de déplacements chimiques dépend de l'orientation du proton par rapport au complexe paramagnétique et aux orbitales des lanthanides. Le dysprosium et le terbium ont des orbitales similaire contrairement au thulium (Figure 122). Les deux méthyles de la leucine doivent donc se trouver dans des lobes d'orbitales différents.

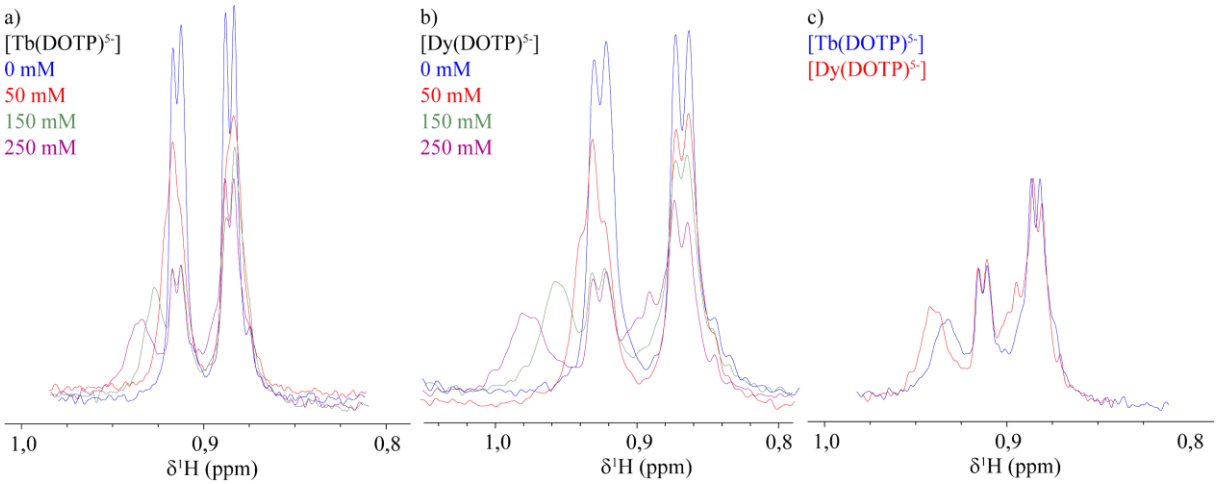


Figure 123 : Signaux de Leu_9 Hδ lors du titrage simulant l'encapsulation de peptide. [K14P] = 43 µM, HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4, 5°C, 700MHz. (a) [$Tb(DOTP)^{5-}$] = 0 µM (bleu) 50 µM (rouge) 150 µM (vert) 250 µM (violet). (b) [$Dy(DOTP)^{5-}$] = 0 µM (bleu) 50 µM (rouge) 150 µM (vert) 250 µM (violet). (c) [$Tb(DOTP)^{5-}$] = 250 µM (bleu) [$Dy(DOTP)^{5-}$] = 200 µM (rouge).

$Dy(DOTP)^{5-}$ montre une plus grande capacité à décaler les déplacements chimiques, c'est-à-dire qu'une plus petite quantité de $Dy(DOTP)^{5-}$ est nécessaire par rapport à $Tb(DOTP)^{5-}$, pour un déplacement des signaux RMN de la même valeur (Figure 123c). D'après la publication de Geraldes *et al.* (Geraldes, Sherry and Kiefer, 1992), la présence de $Tb(DOTP)^{5-}$ génère une variation de déplacements chimiques plus importante que $Dy(DOTP)^{5-}$. D'après la publication de Pintacuda *et al.* (Pintacuda *et al.*, 2007), le dysprosium a un effet PRE légèrement plus important que le terbium. Les signaux RMN devraient donc avoir une intensité plus faible en présence de dysprosium que de terbium, mais le contraire est observé sur les spectres de la Figure 123. L'expérience montre que jusqu'à une concentration de 250 µM de $Dy(DOTP)^{5-}$, l'effet PRE du dysprosium affecte faiblement l'intensité des signaux. Il se peut que $Dy(DOTP)^{5-}$ est moins d'interaction avec le peptide que $Tb(DOTP)^{5-}$. Si $Dy(DOTP)^{5-}$ est plus éloigné du peptide que $Tb(DOTP)^{5-}$, son effet PRE sera réduit ou bien une erreur dans la synthèse du complexe ou sa quantification indique que la concentration en complexe estimée n'est pas la bonne.

Les signaux des protons aromatiques du peptide ont aussi été observés. Leurs signaux s'élargissent et diminuent d'intensité avec l'ajout d'un des agents paramagnétiques, mais aucune variation de

déplacement chimique n'est observée (Figure 124). L'explication la plus probable est que les complexes paramagnétique ont plus affinité avec les résidus aromatiques que la leucine. Ainsi les signaux aromatiques des peptides en contact avec la sonde complexe paramagnétique disparaissent, par effet PRE, dès le premier ajout du titrage

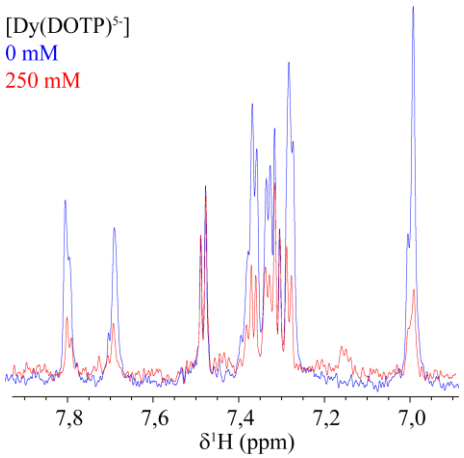


Figure 124 : Extraits de spectres de K14P sans (bleu) et avec Dy(DOTP)$^{5-}$ (rouge). [K14P] = 43 µM, HEPES 80 mM NaCl 100 mM. 5 °C, ^{1}H 700 MHz.

En conclusion les complexes paramagnétiques étudiés permettent de différencier les signaux du peptide à l'intérieur et à l'extérieur du capillaire. Ces expériences mettent en avant que le Dy(DOTP)$^{5-}$ semble être le complexe le plus adapté car il devrait permettre de déplacer les signaux des doublets des méthyles de la leucine du peptide libre par rapport à ceux du peptide encapsulé à plus faible concentration. La concentration sélectionnée pour la suite des expériences est 250 µM. Cette concentration semble un bon compromis entre les écarts des déplacements chimiques et une baisse limitée de l'intensité des signaux due à la relaxation induite par le complexe.

L'étape suivante sera de suivre la cinétique de relargage des peptides à travers les liposomes. Dans les expériences de simulation avec un capillaire, les liposomes ne sont pas pris en compte. Il est donc possible que dans un échantillon de peptides encapsulés les signaux du peptide libre ne varient pas de la même façon et ne se démarque pas des signaux du peptide encapsulé. Dans les expériences précédentes la quantité d'agent paramagnétique était variable alors que dans les échantillons encapsulés, c'est la quantité de peptide qui varie au cours du relargage. L'évolution des déplacements chimiques des peptides libres va donc sûrement être liée à sa concentration en dehors des liposomes.

c) Influence de Ln(DOTP)$^{5-}$ sur les liposomes

L'effet des complexes paramagnétiques affectant les déplacements chimiques sur les liposomes a été étudié. Comme expliqué dans le paragraphe sur les complexes relaxants, il ne faut pas que ces complexes perturbent les liposomes et influencent la cinétique de relargage.

Des mesures d'osmolarité ont donc été réalisées sur le complexe $Ln(DOTP)^{5-}$ (Tableau 20). L'osmolarité du tampon (HEPES 80 mM 100 mM NaCl pH 7,4) a été mesurée seul et en présence de 300 µM de complexe paramagnétique. La concentration en complexe a été choisie pour être légèrement supérieure à la concentration maximum de complexe susceptible d'être ajoutée dans un échantillon de liposome. Il a pu être mis en évidence qu'il n'y avait pas de variation d'osmolarité significative entre les deux solutions. L'équilibre d'osmolarité entre l'intérieur et l'extérieur des liposomes sera donc conservé et les complexes paramagnétiques ne devraient pas fragiliser les liposomes ni influencer le relargage des peptides.

	Tampon	**$Dy(DOTP)^{5-}$**	**$Tm(DOTP)^{5-}$**	**$Tb(DOTP)^{5-}$**
Osmolarité ($mOsm.Kg^{-1}$)	352 ± 7	360 ± 3	350 ± 2	364 ± 2

Tableau 20 : Osmolarité des complexes paramagnétiques dans du tampon HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4. [$Ln(DOTP)^{5-}$] = 300 µM. Les mesures du tampon seul ont été répétées sur deux échantillons (deux jours différents), 3 fois. Les mesures pour les échantillons contenant les complexes paramagnétiques ont été répétées 3 fois.

d) Effet du champ magnétique sur la relaxation transversale du peptide en présence d'un complexe paramagnétique

Ce paragraphe a pour objectif de déterminer si l'effet PRE des complexes paramagnétiques sur les protons du peptide était amplifié par le champ magnétique utilisé. Pour cela l'intensité des signaux du peptide a été observée sur un même échantillon, contenant du peptide et un complexe paramagnétique, avec différents spectromètres de champs magnétiques différents. L'échantillon utilisé est un tube contenant un capillaire avec 200 µL de K14P à 43 µM et 20 µL de D_2O. A l'extérieur du capillaire se trouvent 450 µL de K14P à 43 µM ainsi que 250 µM de $Dy(DOTP)^{5-}$ pour les analyses à 700 et 950 MHz et 300 µM pour les analyses à 600 et 800 MHz.

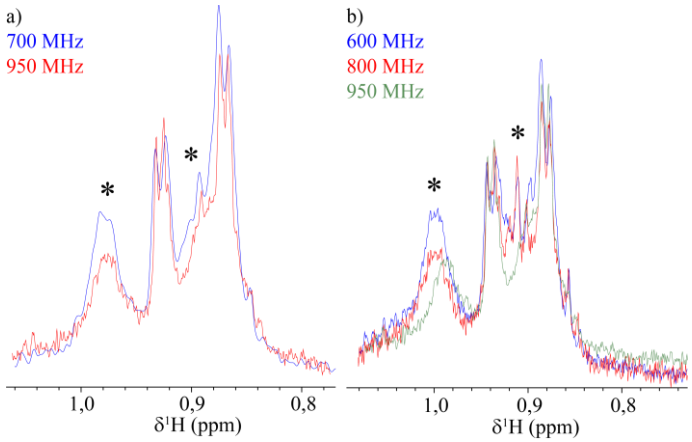


Figure 125 : Siganux de Leu_9 Hδ simulant l'encapsulation de peptide avec $Dy(DOTP)^{5-}$. [K14P] = 43 µM, HEPES 80 mM NaCl 100 mM 5 °C. (a) [$Dy(DOTP)^{5-}$] = 250 µM, 700 MHz (bleu) et 950 MHz (rouge) (b) [$Dy(DOTP)^{5-}$] = 300 µM, ^1H 600 MHz (bleu), 800 MHz (rouge) et 950 MHz (vert). Les spectres ont été ajustés sur l'intensité des signaux des doublets encapsulés.

La Figure 125 montre les signaux des doublets des méthyles de la Leu_9. Les signaux du peptide à l'extérieur du capillaire, en contact avec le complexe paramagnétique, sont marqués d'une étoile (*). La figure montre que ces signaux sont plus larges et moins intenses lorsque le champ est élevé. L'utilisation d'un champ magnétique de 600 MHz devrait donc permettre de mieux distinguer les signaux du peptide relargué lors des analyses de cinétique. Cependant en utilisant un champ bas, les spectres perdent en résolution.

4.3. Différenciation des peptides encapsulés et libres à partir de spectres RMN DOSY ^{1}H

Les acquisitions DOSY permettent de différencier des molécules en fonction de leur coefficient de diffusion (D). Comme présenté dans Partie I - Chapitre 4, la vitesse de diffusion dépend du rayon hydrodynamique de l'objet étudié et par extension de sa masse molaire. Le système peptide - liposome comporte un gros objet, le liposome, et un objet plus petit, le peptide. La masse molaire des peptides étudiés est comprise entre 1 500 et 3 000 $g.mol^{-1}$ et la masse molaire des liposomes est comprise entre 2 000 x 10^4 et 94 000 x 10^4 $g.mol^{-1}$ en fonction du mode de préparation, en supposant que 32 200 ou 142 000 lipides, respectivement, à 730 $g.mol^{-1}$ forme le liposome. Il y a donc plus qu'un facteur 10 000 entre la masse molaire des peptides et des liposomes, ce qui devrait avoir un impact sur leur rayon hydrodynamique. Cependant comme le liposome n'est pas un objet sphérique plein, la prédiction de ses propriétés de diffusion ne peut pas directement être évaluée à partir de l'équation de Stokes-Einstein. En effet, sa diffusion sera gouvernée non seulement par la contribution des lipides mais aussi par le volume de solvant aqueux interne. L'objectif de cette partie est donc de vérifier s'il est possible de différencier les peptides libres et encapsulé des échantillons par l'acquisition de spectres DOSY. La séquence DOSY utilisée est présentée dans le matériels et méthodes. L'objectif est de mesurer des coefficients de diffusion différents pour les peptides libres et encapsulés grâce au modèle présenté dans le Chapitre 2 et en ajustant les données obtenues avec une double exponentielle (Équation 7).

4.3.1 Optimisation des paramètres

De nombreux paramètres de la séquence DOSY et du spectromètre RMN peuvent être optimisés pour obtenir les mesures de coefficients de diffusion les plus fiables. Ce paragraphe montre les différents paramètres modifiés pour optimiser les acquisitions.

a) La puissance des gradients

La force du gradient est incrémentée entre chaque acquisition 1D. Il est possible de choisir sa force minimale et maximale. Plus la force du gradient est faible, plus l'intensité des signaux est élevée et lorsque la force du gradient augmente, l'intensité des signaux diminue car il augmente la diffusion des spins dans le plan, diminuant la probabilité qu'ils puissent être focalisés à la fin de la séquence. Il a donc

été décidé d'utiliser un gradient de 2 à 98 % de la force totale du gradient pour obtenir la plus grande fenêtre de données. La durée de l'impulsion du gradient (δ) peut aussi être optimisée en fonction de l'échantillon : appliquer un délai plus long augmente la durée d'application du gradient ce qui contribue à la diminution plus rapide de l'intensité des signaux. Pour ces échantillons, il est fixé à 1 500 µs.

b) Les délais de la séquence

D'autres délais peuvent être optimisés pour permettre de différencier les molécules de l'échantillon. Le délai de diffusion (Δ) permet de laisser les molécules diffuser plus ou moins longtemps. Si ce délai est long, il est possible d'augmenter la séparation entre les molécules. Cependant cela entraîne aussi la diminution de l'intensité des signaux car pendant ce délai les protons continuent de relaxer en T_1. Ce délai doit donc être optimisé pour chaque échantillon en fonction du peptide, du mode de préparation des liposomes. Δ est compris entre 400 ms pour mesurer préférentiellement la diffusion des molécules libres et 800 ms pour des molécules encapsulées.

c) La température d'acquisition

La température de l'acquisition affecte la viscosité de l'échantillon et donc la diffusion des objets présents dans l'échantillon. Des analyses ont été réalisées à basse température (5 °C) et haute température (35 °C). Elles montrent qu'à haute température il est difficile d'ajuster les données avec une double exponentielle, une seule valeur de coefficient de diffusion correspondant à des molécules libres est obtenue. Une explication peut être qu'à haute température des phénomènes de convection peuvent avoir lieu et interférent avec les mouvements de diffusion des molécules. Une méthode pour diminuer l'effet de la convection est d'utiliser des tubes RMN de 3 mm au lieu de tubes de 5 mm.

d) Le nombre de scans

Finalement le nombre de scans (NS) enregistrés pour chaque gradient peut être modifié. Augmenter NS permet d'augmenter le rapport signal-sur-bruit, mais augmente aussi la durée totale de l'acquisition. Deux expériences avec 32 et 256 scans ont été enregistrées sur un même échantillon de K14P encapsulé dans des liposomes soniqués. Plusieurs zones du spectre ont été intégrées : les signaux des protons aromatiques du peptide, les doublets de la Leu_9 et deux signaux correspondant à l'HEPES (2,7 et 3,7 ppm). L'évolution des intégrales avec les gradients a été ajustée avec une double exponentielle et la moyenne des coefficients de diffusion a été calculée (Tableau 21).

	$\mathbf{D_{molécule\ encapsulée}\ (m^2.s^{-1})}$	$\mathbf{D_{molécule\ libre}\ (m^2.s^{-1})}$
NS = 32	$(7{,}2 \pm 1{,}6) \times 10^{-12}$	$(5{,}6 \pm 1{,}7) \times 10^{-10}$
NS = 256	$(6{,}4 \pm 3{,}1) \times 10^{-12}$	$(4{,}0 \pm 1{,}8) \times 10^{-10}$

Tableau 21 : Coefficients de diffusion obtenus pour le même échantillon avec des nombres de scans différents.

A 32 scans le signal étant trop faible, il n'est pas possible d'ajuster de courbe sur l'évolution de l'intégrale des signaux de Leu_9. Ensuite la comparaison des valeurs de coefficients de diffusion obtenues avec 32 et 256 scans montrent des différences comprises entre 10 % et 30 %. Ce résultat est surprenant car le NS ne devrait pas influer sur la valeur de D, sauf si 32 scans ne permettent pas d'avoir un ratio signal-sur-bruit suffisant entraînant un mauvais ajustement des courbes. Dans ce cas, l'erreur sur le coefficient de diffusion devrait également être élevée. Il ne semble pas y avoir de différence significative sur l'écart type des mesures pour $D_{\text{molécule libre}}$, en revanche l'écart type de $D_{\text{molécule encapsulée}}$ est doublé pour NS = 256 par rapport à NS = 32. Ceci est aussi surprenant car en augmentant NS, le rapport signal-sur-bruit est aussi augmenté ce qui devrait diminuer l'écart type des valeurs.
L'avantage d'utiliser un grand NS est principalement d'être capable d'ajuster toutes les zones intégrées. Cependant un NS de 256 rend l'acquisition très longue (environ 7 h). Un compromis à NS = 128 peut être utilisé pour augmenter le rapport signal-sur-bruit et conserver un temps d'acquisition raisonnable.

4.3.2 Traitement des données et extraction des coefficients de diffusion

a) Comparaisons de l'analyses des spectres à partir de l'intensité et de l'intégrale des signaux

Le traitement des données est fait à l'aide du logiciel Dynamics center de Bruker. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour déterminer les coefficients de diffusion. Il est possible de suivre l'évolution de l'intensité ou bien de l'intégrale des signaux. Pour comparer les deux méthodes, une même série de spectres a été analysée suivant les deux méthodes d'analyses (Tableau 22). Les signaux analysés correspondent aux signaux de l'HEPES.

	D ($m^2.s^{-1}$)
Intensité	$(4{,}69 \pm 0{,}07) \times 10^{-10}$
Aire	$(4{,}58 \pm 0{,}02) \times 10^{-10}$

Tableau 22 : Coefficients de diffusion de l'HEPES mesurés avec l'intensité des signaux ou des aires d'une même acquisition .

Les résultats montrent qu'il y a peu de différence entre les deux modes de traitement. Les signaux de l'HEPES sont 600 fois plus intenses par rapport aux autres signaux du spectre. Les signaux du peptide superposés à l'HEPES n'affectent quasiment pas la mesure du coefficient de diffusion de l'HEPES. Les erreurs sur les coefficients de diffusion sont plus petites dans le cas de l'utilisation des intégrales que des intensités. En conclusion, l'utilisation des intégrales semble donc donner de meilleurs résultats. L'intérêt principal de l'utilisation des intégrales est d'augmenter le rapport signal-sur-bruit et donc diminuer les barres d'erreurs.

b) Répétabilité de l'analyse des données avec le logiciel Dynamics Center

Enfin, la répétabilité du traitement a aussi été testée. En analysant la même série de spectres a plusieurs reprises, à partir de l'intégration des signaux, l'écart type des coefficients de diffusion mesurée est de 2 %. Cette différence peut être expliquée par des variations lors du choix des zones d'intégration des signaux (variation de 0,05 ppm) ou bien des variations lors du calcul des courbes d'ajustement. Les erreurs faites sur les mesures des coefficients de diffusion sur plusieurs protons sont plutôt de l'ordre de 10 %. Les différences observées entre deux analyses de données ne sont donc pas significatives par rapport aux erreurs sur la mesure de coefficients de diffusion elle-même et atteste donc de la répétabilité du traitement.

4.3.3 Coefficient de diffusion du peptide libre

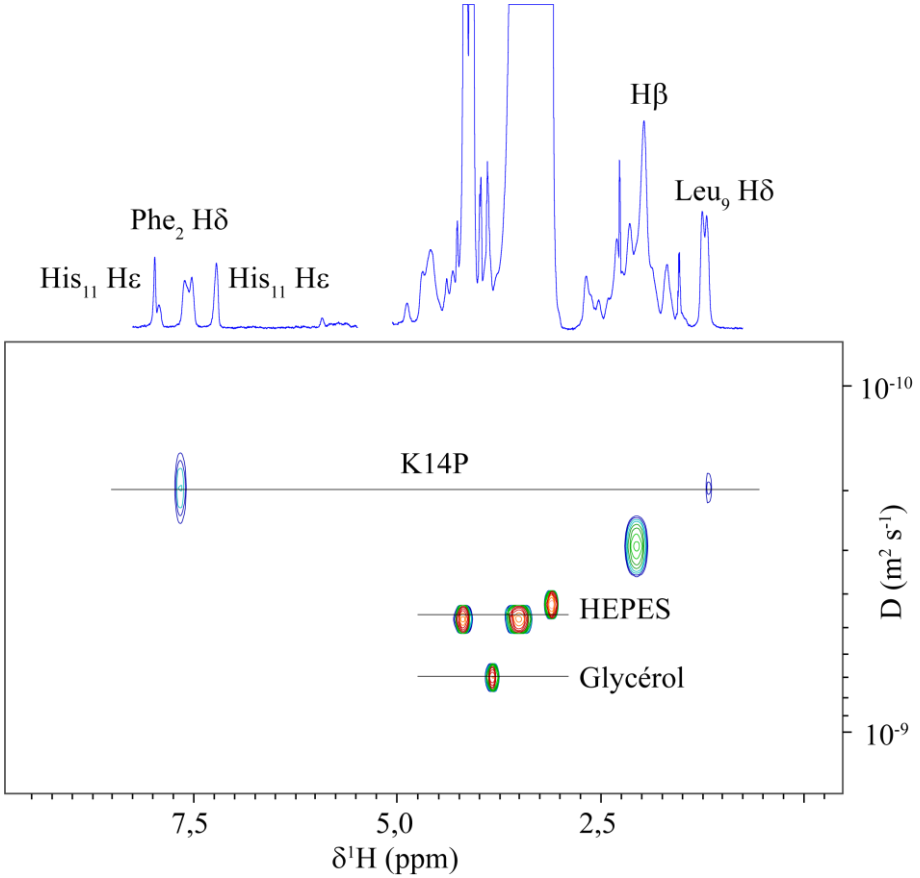


Figure 126 : Spectre DOSY montrant les coefficients de diffusion de K14P, HEPES et glycérol. [K14P] = 210 µM, HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4, 5°C, ^{1}H 700 MHz.

Maintenant que l'acquisition et le traitement ont été mis au point, il est possible de mesurer le coefficient de diffusion des PA. Dans un premier temps le coefficient de diffusion du peptide libre est déterminé et il servira de référence. Pour cela, une acquisition DOSY a été réalisée sur un échantillon contenant 210 µM de K14P seul sans liposome. Cette solution a été obtenue en centrifugeant un échantillon de peptide encapsulé dans des liposomes sur une membrane en cellulose de 10 000 Da (Amicon Ultra-15)

pour séparer le peptide libre du reste. Mais la membrane, conservée avec un peu de glycérol, n'avait pas été préalablement rincée. La solution contient donc du glycérol. Les résultats montrent que le coefficient de diffusion $D_{peptide\ libre}$ est de l'ordre de (2,3 ± 0,6) x 10^{-10} $m^2.s^{-1}$ (Figure 126). Les coefficients de diffusion de l'HEPES et du glycérol ont aussi été mesurés et correspondent respectivement à (4,6 ± 0,2) x 10^{-10} $m^2.s^{-1}$ et (6,9 ± 0,1) x 10^{-10} $m^2.s^{-1}$. La masse molaire de l'HEPES est de 287 $g.mol^{-1}$ et de 92 $g.mol^{-1}$ pour le glycérol. Comme la diffusion est inversement proportionnelle au rayon hydrodynamique des molécules et, dans le cas de molécules sphériques, il serait cohérent qu'une molécule de masse molaire plus élevée ait un rayon hydrodynamique plus grand qu'une molécule possédant une masse molaire plus faible. C'est ce qui est observé ici avec $D_{peptide} < D_{HEPES} < D_{glycérol}$.

4.3.4 Coefficient de diffusion de peptides encapsulés et différenciation des peptides libres et encapsulés

L'objectif de ce paragraphe est de déterminer le coefficient de diffusion des peptides encapsulés. Les expériences DOSY suivantes ont été réalisées avec un échantillon de K14P encapsulé dans des liposomes soniqués (S-CHOL12-C0-J11-T5). La decroissance de l'intégrale de certains signaux du spectre peut être ajustée par une double exponentielle, ce qui correspond à deux valeurs de coefficients de diffusion (Figure 127). Deux ordres de grandeur de coefficients de diffusion se distinguent : 3 x 10^{-10} $m^2.s^{-1}$, du même ordre de grandeur que le coefficient de diffusion des peptides seuls et 7 x 10^{-12} $m^2.s^{-1}$. Ce second coefficient de diffusion correspond donc à un objet beaucoup plus lourd que celui mesuré par la première exponentielle. Il est probable que les deux coefficients de diffusion correspondent aux peptides à l'extérieur des liposomes et aux peptides encapsulés. La valeur du coefficient de diffusion du peptide encapsulé serait plus petite que celle du peptide libre parce que les liposomes contraignent les peptides dans leur diffusion.

$$Nombre\ de\ collisions = \frac{D \times \Delta}{S}$$

Équation 12, Avec D le coefficient de diffusion de la molécule libre, D le délai de diffusion et S la surface maximum d'une tranche de vésicule sphérique

Il est possible d'estimer grossièrement le nombre de collisions entre la molécule encapsulée et la paroi interne d'un liposome en fonction du coefficient de diffusion de la molécule, du délai Δ et la surface maximum d'une tranche du liposome : Équation 12. A partir de cette équation, il est donc possible d'estimer la taille minimum d'un liposome pour qu'il n'y ait aucune collision pour un Δ et un coefficient de diffusion donnés. Dans la gamme de délais de diffusion utilisée, 400 – 800 ms, le diamètre du peptide devrait être supérieur à 5 100 et 7200 nm respectivement pour qu'il n'ait pas d'impact sur la diffusion des peptides. Une seconde explication est que le peptide a une affinité avec les liposomes et il peut se coller sur la membrane des liposomes ce qui diminue aussi sa diffusion.

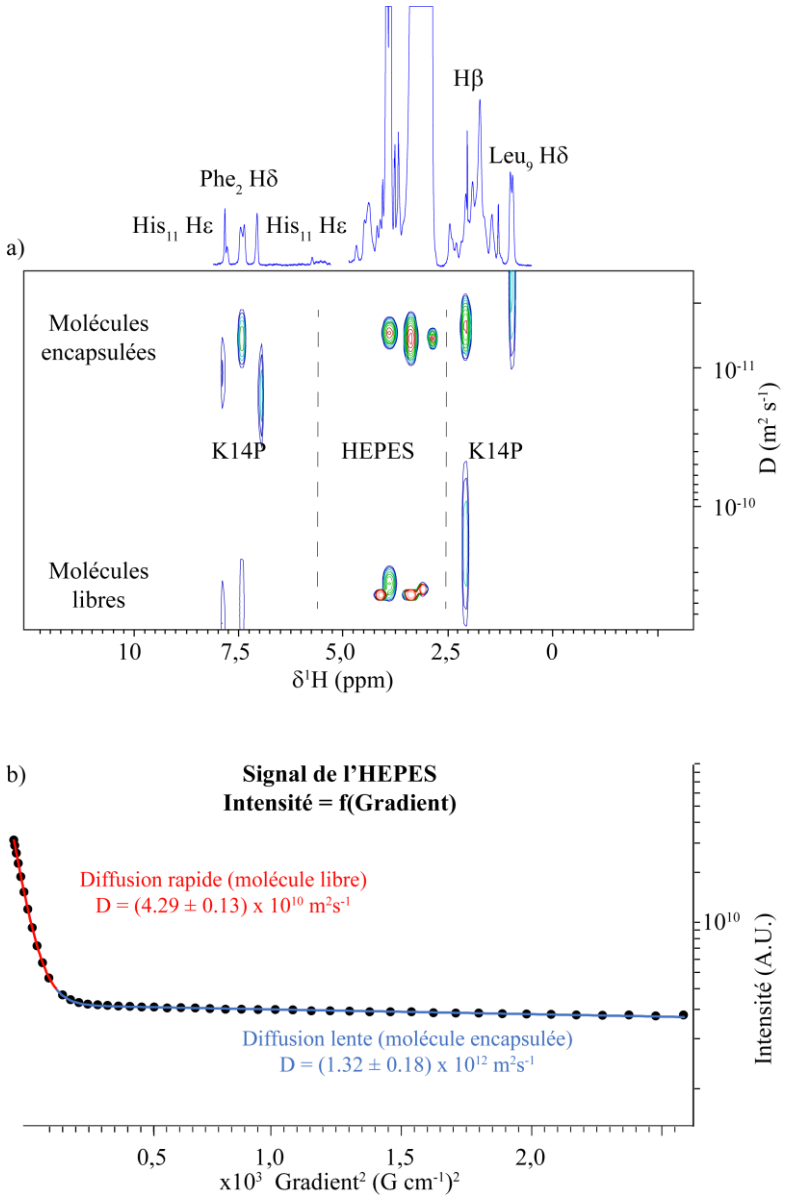


Figure 127 : (a) Spectre DOSY montrant les coefficients de diffusion d'un échantillon de K14P encapsulé dans des liposomes soniqués. (b) ajustement des intégrales des signaux de l'HEPES par une double exponentielle. [K14P] = 840 µM, [liposome] = 60 mg.mL^{-1}, HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4, 5 °C, ^{1}H 700 MHz. S-CHOL12-C0-J11-T5.

En regardant les déplacements chimiques des différents signaux, le signal à environ 0,9 ppm (méthyles de Leu_9) n'a qu'une seule valeur de coefficient de diffusion correspondant à celui d'une molécule encapsulée. Les signaux à 2,5 et 5 ppm correspondant aux signaux du tampon, l'HEPES, ont deux coefficients de diffusion car du tampon se trouve à l'intérieur et à l'extérieur des liposomes. Concernant les autres signaux du peptide à 2,4 ppm et ceux des aromatiques autour de 7,5 pm, certains signaux possèdent deux coefficients de diffusion. A ces mêmes déplacements chimiques, il a été mis en évidence la présence d'impuretés. Ces petites molécules semblent diffuser rapidement à travers la membrane des liposomes même sans traitement thermique. C'est pourquoi elles se retrouvent à l'intérieur et à l'extérieur des liposomes.

4.3.5 Estimation de la quantité de peptide encapsulé et libre

Si l'on fait un ajustement des données avec une double exponentielle, il est possible d'extraire, pour chaque coefficient de diffusion mesuré (*i.e.* molécules encapsulées et libres), un paramètre I_0 qui correspond à l'intégrale du signal lorsque le gradient est nul, en unité arbitraire. Cette intégrale est directement proportionnelle à la quantité de molécule présente dans l'échantillon si le T_1 et le T_2 sont identiques pour tous les protons. Dans ce cas il est possible de relier I_0 à la quantité de peptide encapsulé et libre. En enregistrant une acquisition avant et après un traitement thermique, il sera alors possible d'estimer la quantité de peptide relargué sur une certaine durée, ou au moins d'observer l'évolution d'une des espèces (encapsulés ou libres) en fonction du temps. Cela permet à minima de filtrer les signaux des peptides à l'extérieur car ceux-ci s'estomperont, avec les acqusitions DOSY utilisés dans ce projet, pour des gradients élevés de l'ordre de 35 $G.cm^{-1}$ avec un délai de 600 ms.

4.3.6 Comparaison des coefficients de diffusion mesurés avec ceux extraits de la littérature

	Hinton *et al.* *Chem. Phys. Lipids* 1994	**Cabeça *et al. J. Phys. Chem.* 2009**	**Martins *et al.* *Magn. Reson. Chem.* 2014**	**Valeurs obtenues dans ce projet**
Petite molécule **PM** **Concentration** **Taille de la molécule étendue**	Sucrose *332 g.mol^{-1}* *100 mM* *0,9 nm*	Prilocaine *220 g.mol^{-1}* *1,3 nm*	Dapsone *249 g.mol^{-1}* *1 mM* *1,4 nm*	K14P 1700 g.mol^{-1} 500 µM 5 nm
Capsules **Concentration** **Diamétre**	Liposome POPC *30 mM* 80 nm (DLS)	Liposome PC 400 nm (DLS)	Liposome EPC *5 mM* 400 nm (extrudé)	Liposome DPPC /DMPG/CHOL 60 mg.mL^{-1} 50 nm (sonication, cryo-TEM)
Conditions	40 mM NaCl dans 100 % D_20 22 °C	100 % D_20 25 °C pH 5,5 - 10	Tampon phosphate/bisphosphate 0,1 M, 100 % H_20 25 °C pH 7	HEPES 80 mM, NaCl 100 mM 5 °C pH 7,4
Evolution de D	D ↓ lorsqu'il y a encapsulation			
Valeur de D (m^2s^{-1})	Encapsulé : 10^{-12} Libre : 10^{-10}	Encapsulé : 0,5 x 10^{-10} Libre : 5 x 10^{-10}	Encapsulé : 2 x 10^{-10} (cyclodextrine) 0,8 x 10^{-10} (liposome) Libre : 5 x 10^{-10}	Encapsulé : 7 x 10^{-12} Libre : 3 x 10^{-10}
Remarque		D ∝ pH		

Tableau 23 : Comparaison des données de la littérature et des mesures réalisées pour ce projet.

Les coefficients de diffusion mesurés et la taille des liposomes peuvent être comparés à ceux de la littérature (Tableau 23) obtenus par Hinton et Johnson (Hinton and Johnson, 1994), ainsi que la taille des liposomes. Les résultats de Martins *et al.* (Martins *et al.*, 2014) et Cabeça *et al.* (Cabeca *et al.*, 2009)

mettent quant à eux en avant une faible différence entre les valeurs de coefficients de diffusion des molécules libres et molécules encapsulées. Les coefficients de diffusion mesurés étant de l'ordre de 10^{-10} $m^2.s^{-1}$, comparable à celui d'un petit objet. Le délai de diffusion, des séquences DOSY, utilisé dans ces deux dernières publications est de 0,06 s, alors que ceux utilisés par Hinton sont compris entre 1 à 3 s. Ceci pourrait expliquer la faible différence des coefficients de diffusion entre les molécules libres en encapsulés pour les publications de Cabeça et Martins. En laissant moins de temps aux molécules pour diffuser, les molécules encapsulées vont être moins perturbées par leurs capsules et donc avoir un coefficient de diffusion proche de celui des molécules libres. De plus, la taille, des liposomes, mesurée par Martins *et al.* et Cabeça *et al.* est 5 fois plus grande que celle mesurée pour les liposomes de ce projet ce qui devrait donc nécessiter un délai de diffusion plus long pour observer des différences entre $D_{encapsulé}$ et D_{libre}.

Les travaux de Martins *et al.* et Cabeça *et al.* donnent un diamètre des liposomes de 400 nm et la diffusion de la petite molécule libre de l'ordre de 5 x 10^{-10} $m^2.s^{-1}$. Compte tenu de ces valeurs et à l'aide de l'Équation 12, la molécule peut entrer en collision environ 250 fois avec la membrane des liposomes avec un délai de diffusion de 0,06 s. Dans la publication de Hinton et al., le diamètre des liposomes est de 80 nm et la diffusion de la petite molécule est aussi de l'ordre de 5 x 10^{-10} $m^2.s^{-1}$. La molécule a donc le temps d'entrer en collision 130 000 fois avec la membrane des liposomes pour un délai de diffusion de 0,06 s. Il est donc possible de différencier les molécules encapsulées et libres dans les deux cas. La différence des coefficients de diffusion mesurés pour les molécules encapsulées de Martins *et al.* Cabeça et al. et Hinton et al. par rapport aux molécules encapsulées, peut-être expliquée par la taille des liposomes. Plus la taille des liposomes est petite, plus le coefficient de diffusion de la molécule est petit. La formule précédente permet aussi de montrer que pour un délai de diffusion de 0,06 s, le liposome devrait avoir une taille supérieure à 6 300 nm pour que la diffusion observée ne soit pas gouvernée par le liposome, et 25 000 nm pour un délai de 1 s.

Il est aussi important de souligner que les analyses de ces trois publications ont été réalisées avec des échantillons de l'ordre du mM, alors que les échantillons de ce projet sont de l'ordre du µM. Les incertitudes sur leurs mesures ne permettent pas de détecter des variations aussi faibles que celles observés par Cabeça *et al.* et Martins *et al.*. De plus ces publications réalisent leurs analyses dans du D_2O alors que les analyses de ce projet sont réalisées dans H_20 ce qui nécessite un module de suppression d'eau. Ce module n'est pas entièrement reproductible et peut entraîner des variations de la ligne de base entre deux acquisitions ajoutant de l'incertitude dans les résultats.

4.4. Conclusion

Ce chapitre a mis en évidence plusieurs techniques pour différencier les signaux associés aux peptides libres et aux peptides encapsulés : la variation de déplacement chimique sur les spectres 1D ^1H, les acquisitions DOSY et l'utilisation de complexes paramagnétiques. Les signaux sur les spectres 1D ^1H

correspondant aux peptides libres et encapsulés ont pu être confirmés grâce aux acquisitions DOSY. L'avantage des acquisitions 1D est qu'elles sont rapides, simples à mettre en place et quantitatives. Dans le cas de la ciprofloxacine, une molécule procédant des protons aromatiques, apparaissent des variations de déplacements chimiques entre des molécules encapsulées dans des liposomes et les molécules relarguées (Maurer *et al.*, 1998). Les variations de déplacements chimiques sont surtout marquées sur les protons aromatiques de la molécule. Ces variations sont dépendantes de la concentration en molécules encapsulées : la variation de déplacement chimique augmente avec la concentration en ciprofloxacine. Cullis *et al.* proposent qu'en augmentant la concentration en ciprofloxacine encapsulé, il y a formation d'un empilement de la molécule. Cet empilement change l'environnement électronique des protons aromatiques ce qui engendre les variations de déplacements chimiques, le pH n'ayant pas d'effet sur les variations de déplacements chimiques de la molécule dans la gamme de concentration qu'ils utilisent. L'inconvénient majeur est qu'il peut y avoir des superpositions de signaux qui empêchent de quantifier les produits.

Les mesures de coefficients de diffusion permettent aussi de différencier les PA encapsulés et libres. Le gradient en champs magnétiques combiné à l'écho de spin sert de filtre pour différencier les signaux des peptides libres et encapsulés sur les spectres ou même pour faire disparaître les signaux des peptides libres et ne conserver que ceux des peptides encapsulés. Cette méthode permet aussi d'estimer la quantité de peptide encapsulé et libre. Les complexes paramagnétiques ont montré qu'ils pouvaient être utilisés comme complexe affectant les déplacements chimiques ou relaxants.

Finalement, la meilleure méthode pour suivre la cinétique de relargage semble être l'observation des variations de déplacements chimiques des molécules encapsulées, la méthode de diffusion fonctionne mais est plus contraignante à mettre en place et demande plus de temps pour la collecte et le traitement des données.

Chapitre 5 : Cinétique de relargage des peptides

Le chapitre précédent a permis de montrer qu'il était possible de différencier les peptides à l'intérieur et à l'extérieur des liposomes par RMN 1D ^{1}H et à l'aide d'acquisition DOSY. Ce chapitre va présenter le suivi de cinétiques de relargage pour différentes préparations de liposomes et différents peptides.

5.1. Suivi de la cinétique de relargage de K14P encapsulé dans des liposomes soniqués et quantification

5.1.1 Etablissement d'un plan d'expériences

Les premières cinétiques de relargage de peptides ont été réalisées sur des échantillons de liposomes soniqués. Le but était dans un premier temps de déterminer la température à laquelle le relargage démarre ainsi que la durée nécessaire pour observer le relargage et de comprendre les mécanismes de relargage.

Pour répondre à ces questions, la cinétique de relargage d'un échantillon de K14P encapsulé dans des liposomes a été étudiée de plusieurs manières en parallèle. Les échantillons étaient conservés à 5 °C, le premier spectre, avant toute analyse, était réalisé à 5 °C. L'échantillon a ensuite été analysé à 25 °C pour déterminer si le relargage pouvait avoir lieu à température ambiante. Finalement l'échantillon a été chauffé à 35 °C pour observer la cinétique de relargage proche de la T_m des liposomes estimée dans la

Partie III - Chapitre 2. Les expériences suivantes ont servi à identifier la méthode la plus efficace pour suivre la cinétique de relargage.

L'historique des échantillons est schématisé dans la Figure 128 :

- Tube 1 : étude par RMN du proton en mesurant les spectres 1D ^{1}H et les coefficients de diffusion des peptides. Deux coefficients de diffusion devraient être mesurés, l'un correspondant au peptide libre et l'autre au peptide encapsulé.
- Tube 2 : étude par ajout d'un complexe paramagnétique ($Dy(DOTP)^{5-}$) à l'extérieur des liposomes. Des variations de déplacements chimiques différentes devraient être observées sur les spectres 1D ^{1}H, entre le peptide libre et le peptide encapsulé, par rapport au tube 1 sans complexe paramagnétique.

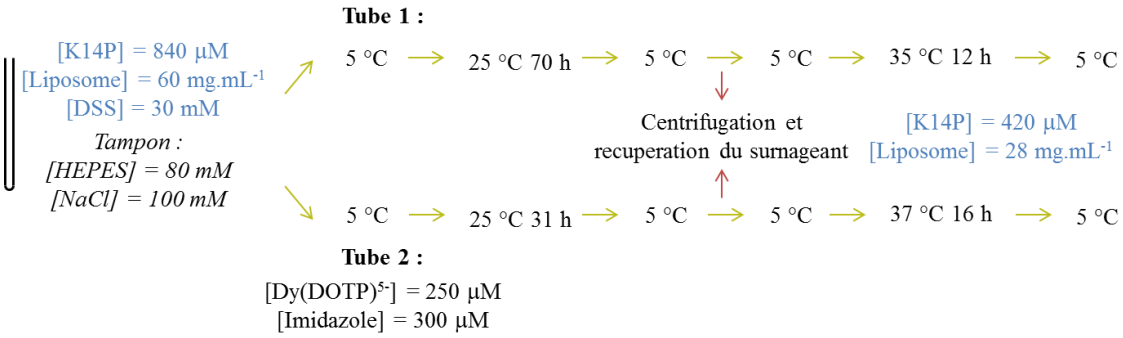


Figure 128 : Historiques des échantillons de K14P encapsulé. Les deux échantillons sont conservés à 5 °C avant les différents traitements thermiques. Entre chaque traitement thermique, des spectres sont enregistrés à 5 °C. Le DSS sert de référence pour les déplacements chimiques du spectre mais aussi pour détecter le relargage d'une autre molécule que le peptide. L'imidazole sert de sonde pour s'assurer de la présence et de l'effet PCS du complexe paramagnétique. S-CHOL12-C0-J1-T5.

5.1.2 Suivi de la cinétique de relargage de K14P par DOSY et 1D ^{1}H sans sonde paramagnétique (tube 1)

L'échantillon est analysé à 5 °C, avant tout traitement thermique, pour obtenir des spectres de référence à t = 0, sans relargage. Plusieurs séries de spectres sont enregistrées : un spectre 1D ^{1}H avec une suppression d'eau (zgesgp) et deux acquisitions DOSY, une acquisition optimisée pour mesurer le coefficient de diffusion de l'eau et une seconde pour mesurer le coefficient de diffusion des peptides et de l'HEPES. Les deux expériences utilisent les mêmes délais Δ et δ. Mais aucun module de suppression d'eau n'est utilisé dans la séquence utilisée déterminer le coefficient de diffusion de l'eau. L'intérêt de cette seconde acquisition DOSY est de distinguer l'eau encapsulée et libre en fonction de son coefficient de diffusion. Cela pourrait apporter des informations quant à la cinétique de relargage de l'eau mais aussi sur l'état du système. Ces résultats seront présentés dans les paragraphes suivants. L'échantillon est également analysé à 35 °C pendant le traitement thermique. Les mêmes séries de spectres qu'à 5°C (1D ^{1}H, et deux DOSY) sont enregistrées.

a) RMN 1D ^{1}H

Plusieurs traitements thermiques ont été appliqués sur l'échantillon. Le tube 1, sans complexe paramagnétique, est chauffé à 25 °C pendant plusieurs jours (70 h). Aucune différence de déplacement chimique ou d'intensité de signaux du peptide n'est observée sur les spectres RMN 1D ^{1}H ou DOSY. Ainsi les liposomes et les peptides encapsulés semblent stables pendant au moins 70 h à 25 °C et les peptides ne semblent pas être relargués. Cependant un signal à 0 ppm apparaît pendant ce traitement thermique. Or l'échantillon contient 30 µM de DSS. Ce composé sert de référence pour les déplacements chimiques des spectres RMN. Avant traitement thermique le DSS a un signal proton large à -0,15 ppm, attribué à du DSS encapsulé. (Figure 129). Après le traitement thermique (70 h à 25 °C), le signal large est encore présent mais un signal plus fin apparait, il est attribué à du DSS libre et est calibré à 0 ppm. Le DSS a donc été relargué pendant le traitement thermique à 25 °C, alors qu'aucun relargage n'est observé pour le peptide. Il semblerait que le DSS ne reste donc pas encapsulé, même lorsque la température est inférieure à la T_m des liposomes (estimée à 38,1 ± 1,3 °C). Une explication pourrait être que la masse molaire du DSS est de 196 g.mol^{-1}, soit presque 10 fois plus petite que la masse molaire de K14P, suggérant que les molécules de faibles masses molaires pourraient diffuser facilement au travers la bicouche des liposomes. Une seconde explication serait que le passage des molécules dans la bicouche soit dépendant de la charge des molécules. En effet le DSS est une molécule chargée negativement et K14P est chargé positivement.

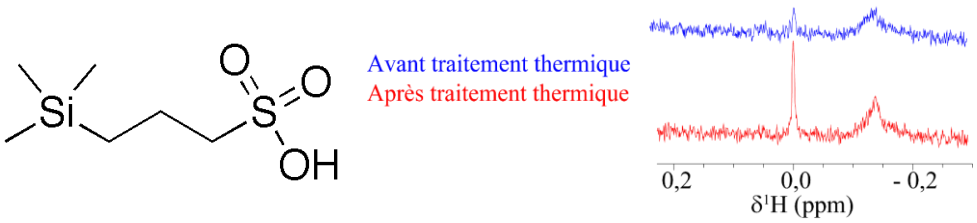


Figure 129 : Structure de 4,4-diméthyl-4-silapentane-1-sulfonique (DSS) et signaux RMN ^{1}H du DSS avant (bleu) et après (rouge) le traitement thermique de 25 °C pendant 70 h. [DSS] = 30 µM [Liposome] = 60 mg.mL^{-1}, HEPES 80 mM, NaCl 100 mM pH 7,4, 5 °C, ^{1}H 600 MHz. S-CHOL12-C0-J1-T5.

Dans un deuxième temps, l'échantillon (tube 1) a été chauffé à 35 °C pendant deux heures. Cette température correspond à la température sous-cutanée chez l'homme (Bierman, 1936). Elle est proche de la T_m principale du liposome estimée à 38 °C dans le Chapitre 2. A la fin du traitement thermique, la température de l'échantillon a été abaissée à 5 °C pour réaliser une nouvelle série de spectres qui pourra être comparée avec la série de spectres initiaux. Un dépôt blanc s'est formé au fond du tube pendant les deux heures à 35 °C et cette fois-ci des différences sont clairement visibles entre les spectres avant et après le traitement thermique (Figure 130). Après le traitement thermique, de nouveaux signaux apparaissent à 0,87, 0,94, 6,98 et 7,80 ppm. Ces signaux ressemblent aux signaux des protons du peptide avec une variation de déplacements chimiques globale de + 0,06 ppm en moyenne. Comme illustré dans le chapitre précédent, ces signaux correspondent aux peptides libres dans l'échantillon. Ceci peut être

dû au relargage de peptides et/ou à la dégradation des liposomes menant aussi au relargage de peptides. Les signaux correspondant aux peptides encapsulés sont encore présents mais moins intenses, il reste donc des peptides encapsulés dans l'échantillon.

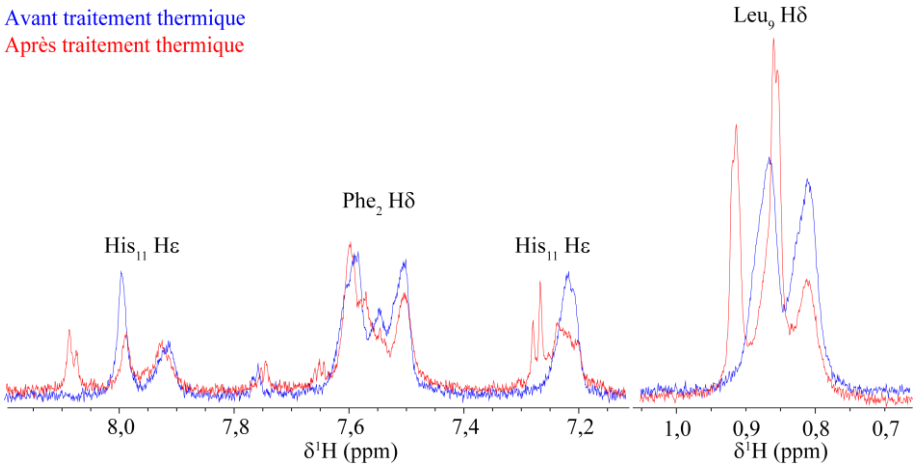


Figure 130 : Spectres RMN ^{1}H avant (bleu) et après (rouge) un traitement thermique de 2 h à 35 °C. [liposome] = 30 mg.mL^{-1}, [K14P] = 420 µM, HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4. 5 °C, ^{1}H 950 MHz. S-CHOL12-C0-J1-T5.

Maintenant que le relargage de K14P est observé dans l'échantillon, il est possible de quantifier le peptide relargué pendant ces 2 h à 35 °C. Afin de pouvoir les comparer, les spectres 1D ^{1}H avant et après traitement thermique ont été enregistrés avec le même NS, les mêmes délais et le même RG (« Receiver Gain »). Ils ont été traités de la même manière. Ces spectres sont donc comparables. Leur superposition (Figure 130) montre qu'il y a une diminution de 55 % de l'intensité des signaux au niveau des doublets de la leucine correspondant à 45 % de peptide encore encapsulé. Les mêmes pourcentages sont obtenus pour His_{11} Hε. L'avantage de cette méthode est de comparer seulement les signaux des peptides encapsulés avant et après les traitements thermiques. Pour comparer ces protons il faut faire l'hypothèse que leurs temps relaxation T_1 et T_2 sont identiques. Cependant la relaxation du peptide encapsulé est contrainte par les liposomes, elle correspond à une moyenne entre la relaxation du peptide libre et lié au liposome et elle dépend du temps durant lequel le peptide reste en interaction avec les liposomes. Pendant le relargage la quantité de peptide encapsulé diminue, ce qui pourrait modifier les interactions peptide – liposome et donc potentiellement la relaxation du peptide encapsulé. Les signaux des peptides encapsulés gardant une largeur de raie à peu près similaires même si une partie de peptides est sortie, on peut donc considérer que les paramètres de relaxation, au moins T_2, ne change pas de manière important suite au relargage.

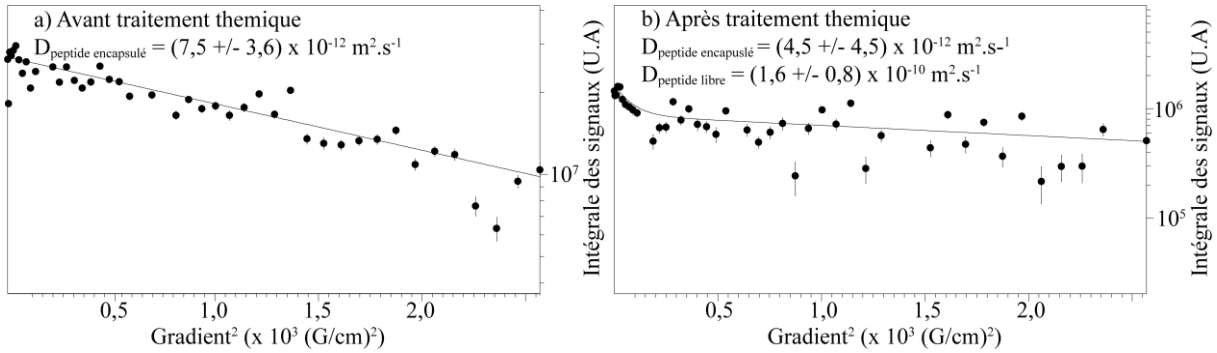
La diminution d'intensité des signaux du peptide n'est pas identique sur tous les signaux. Cette diminution est surtout visible sur les signaux isolés du peptide comme His_{11} Hε et Leu_9 Hδ. Pour les signaux Phe_2 Hδ et la zone des protons aliphatiques, il n'est pas possible de dissocier les signaux du peptide relargué de ceux du peptide encapsulé et donc d'avoir accès au changement d'intensité. Par exemple pour Phe_2 Hδ, le signal à 7,50 ppm montre clairement une baisse d'intensité de 25 % mais les

signaux entre 7,55 et 7,65 ppm sont une superposition de signaux encapsulés et libres qu'il n'est donc pas possible de différencier sur un spectre 1D ^{1}H. Ce qui rend ces signaux moins fiable pour le suivi de cette cinétique de relargage.

b) Détermination du coefficient de diffusion du peptide par DOSY et quantification

Une deuxième méthode utilisable pour quantifier le relargage de K14P est d'utiliser les acquisitions DOSY. L'intérêt de cette méthode est de pouvoir déconvoluer les spectres en fonction des coefficients de diffusion des molécules présentes dans l'échantillon. Ainsi, comme présenté dans le chapitre précédent (Chapitre 4), elle devrait permette de différencier les peptides encapsulés des peptides libres et de confirmer l'attribution des signaux. Les zones du spectre intéressantes à étudier sont les protons aromatiques (7,1 - 8,1 ppm), les protons aliphatiques (1,2 - 2,5 ppm) et Leu_9 Hδ (0,7 – 1,1 ppm). Les intégrales de ces zones sont ensuite tracées en fonction du gradient appliqué. Il est alors possible d'y ajuster une courbe (exponentielle ou bi-exponentielle, présentée dans la Partie III - Chapitre 4) et d'en extraire le ou les coefficients de diffusion de chaque zone ainsi que la valeur maximale de l'intégration de cette région I_0 (Tableau 24). I_0 est définie comme l'intégrale initiale de chaque exponentielle de la courbe d'ajustement. Cette dernière valeur est liée à la quantité de matière correspondant aux espèces présentes dans la zone en faisant l'hypothèse que le T_1 et le T_2 de tous les protons est identique.

L'analyse du tube 1 montre qu'avant le traitement thermique à 35 °C, la courbe DOSY peut être ajustée par une seule exponentielle avec un coefficient de diffusion du peptide de 7,5 ± 3,6 x 10^{-12} $m^2.s^{-1}$. Après le traitement thermique le peptide a deux coefficients de diffusion de 4,5 ± 4,5 x 10^{-12} $m^2.s^{-1}$ et 1,6 ± 0,8 x 10^{-10} $m^2.s^{-1}$ (Figure 131). Le coefficient de diffusion de l'ordre de 10^{-12} $m^2.s^{-1}$ correspond à du peptide encapsulé et le coefficient de diffusion de l'ordre de 10^{-10} $m^2.s^{-1}$ correspond à une molécule qui diffuse plus rapidement dans l'échantillon, *i.e.* du peptide relargué (voir Chapitre 4). Il y a donc bien du relargage dans cet échantillon.



	I_0 x 10^6 (U.A)	D x 10^{-12} ($m^2.s^{-1}$)	I_0 (U.A)	D x 10^{-10} ($m^2.s^{-1}$)
a) Avant traitement thermique	29,0 ± 4,3	7,5 ± 3,6	/	/
b) Après traitement thermique	6,9 ± 2,2	4,5 ± 4,5	13,3 ± 3,3	1,6 ± 0,8

Figure 131 : Courbes correspondantes aux coefficients de diffusion du peptide avant et après le traitement thermique au niveau des signaux des protons aromatiques. a) avant le traitement thermique b) après le traitement thermique.

A partir de ces données, il est possible d'estimer la quantité de peptide relargué par deux méthodes différentes :

- la méthode 1 permet d'estimer la quantité de peptide libre par rapport à la quantité de peptide encore encapsulée par rapport à la quantité de peptide initialement encapsulée :

  $$100 - \frac{I_0\ peptide\ encapsulé\ \boldsymbol{apr\grave{e}s}\ traitement\ thermique}{I_0\ peptide\ encapsulé\ \boldsymbol{avant}\ traitement\ thermique}.$$

  Cette méthode fonctionne seulement s'il n'y aucun peptide relargué dans la première acquisition qui sert de référence.

- la méthode 2 consiste à n'utiliser que les valeurs obtenues avec l'acquisition DOSY réalisée après le traitement thermique c'est-à-dire sans prendre en compte l'intégrale des signaux du peptide encapsulé avant le traitement thermique :

  $$\frac{I_0\ peptide\ libre}{I_0\ peptide\ libre + I_0\ peptide\ encapsulé}.$$

  Ce calcul fait l'hypothèse que les peptides encapsulés et libres relaxent à la même vitesse et que l'aire de leurs signaux est donc quantitative. C'est une approximation car les signaux du peptide libre et encapsulé n'ont pas la même largeur de raie. Ils ont donc des relaxations différentes. Les signaux du peptide encapsulés sont plus larges que les signaux du peptide libre. T_2 du peptide encapsulé est donc accélérée par le fait d'être à l'intérieur des liposomes.

Les résultats obtenus avec la méthode 1 montrent que respectivement 72 ± 8 % et 76 ± 13 % de peptides auraient été relargués pour les zones des protons aromatiques et aliphatiques des spectres (colonne 3 du Tableau 24). Ces deux valeurs ne sont pas significativement différentes et sont donc cohérentes entre elles. La méthode 2 estime 66 ± 13 % et 68 ± 8 % de peptide relargué pour la zone des protons aromatiques et aliphatiques respectivement (colonne 6 du Tableau 24). En faisant l'hypothèse que T_2 du peptide encapsulé est accélérée par rapport à celle du peptide libre, la quantité de peptide libre est surestimée dans la méthode 2 par rapport à la quantité de peptide encore encapsulée. Dans ce cas, le pourcentage de peptide relargué aurait dû être supérieur au pourcentage de peptide encapsulé. Ce qui n'est pas le cas ici. Ainsi la différence de relaxation entre les peptides encapsulés et libres ne semble pas impacter la mesure du pourcentage de peptide relargué. Les deux valeurs de quantité de peptides relargués ne sont pas significativement différentes non plus. Les résultats obtenus avec les deux méthodes sont non significativement différents et donc cohérents. La moyenne des valeurs obtenues avec la méthode 1 et 2 peut donc être calculée : ainsi 70 ± 20 % de peptide auraient relargué. Les valeurs obtenues sont du même ordre de grandeur que celles obtenues en superposant les spectres 1D ^{1}H avant et après traitement thermique qui ont permis d'estimer que 55 % de peptides avaient relargué, ce qui conforte les résultats obtenus.

	Io $_{\text{encapsulé}}$ **x 10^6 (U.A.)**	**Méthode 1** $100 - \frac{I_0\ pep.encap.ap.T}{I_0\ pep.encap.av.T}$	**$D_{pep.\ encap.}$ X 10^{-12} ($m^2.s^{-1}$)**	**Io** $_{\text{libre}}$ **x 10^6 (U.A.)**	**Méthode 2** $\frac{I_0\ pep.libre}{I_0\ pep.libre\ +\ I_0\ pep.encap}$	**$D_{pep.\ Libre}$ X10^{-10} ($m^2.s^{-1}$)**
PROTONS AROMATIQUES (7,7 – 6,5 ppm)						
Av. 35 °C	29,0 ± 4,3	76 ± 13 %	7,5 ± 3,6	0	/	0
Ap. 35 °C	6,9 ± 2,2		4,5 ± 4,5	13,3 ± 3,3	66 ± 13 %	1,6 ± 0,8
PROTONS ALIPHATIQUES (2,2 – 1,1 ppm)						
Av. 35 °C	38,4 ± 2,6	72 ±8 %	5,3 ± 1,5	0	/	0
Ap. 35 °C	10,6 ± 2,2		3,9 ± 3,3	22,7 ± 3,5	68 ± 8 %	2,6 ± 1,0

Tableau 24 : Valeurs des coefficients de diffusion et des intégrales maximales avant et après un traitement thermique à 35 °C pendant 2 h. Les pourcentages de peptides relargués sont présentés colonnes 3 et 6.

c) Utilisation des acquisitions DOSY comme filtre

Les acquisitions DOSY peuvent aussi servir de filtre pour observer uniquement les peptides encore encapsulés. Il a été montré dans le chapitre précédent (Chapitre 4) qu'avec un délai de 600 ms et un gradient de 34 G.cm^{-1} les signaux du peptide libre n'apparaissent plus sur les spectres et que seuls les signaux du peptide encapsulé sont visibles. La comparaison de ces spectres, avant et après traitement thermique, ne contenant que les signaux du peptide encapsulé pourraient servir à estimer la quantité de peptides encore encapsulés après le traitement thermique.

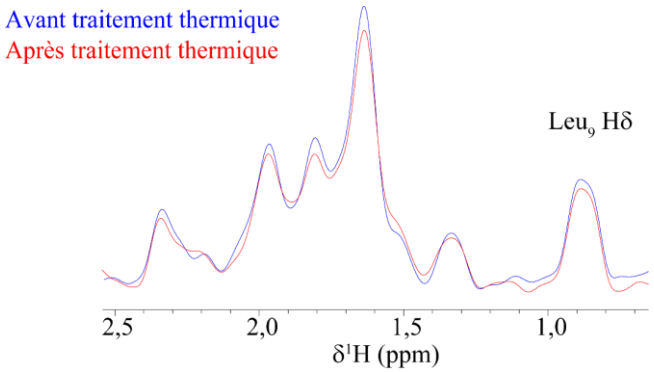


Figure 132 : Zone des protons aliphatiques de K14P des spectres RMN ^{1}H avant traitement thermique (spectre bleu, avec un facteur d'échelle de 0,5) et après (spectre rouge). [liposome] = 30 mg.mL^{-1}, [K14P] = 420 µM, HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4. 5 °C, ^{1}H 950 MHz. S-CHOL12-C0-J1-T5.

Pour cela il est possible de sommer les 33 derniers spectres 1D de l'acquisition DOSY (sur 48 spectres), correspondant à des gradients de 34 à 50 G.cm^{-1} (1,15 à 2,5 x 10^3 (G.cm^{-1})^2), dans lesquels la composante rapide a disparu (Figure 131). L'addition des spectres permet d'obtenir un meilleur rapport signal-sur-bruit. Le nombre de points effectifs du spectre dans la dimension ^{1}H a été diminué à 512 points pour à nouveau gagner en rapport signal-sur-bruit, *i.e.* en réduisant le temps d'acquisition de 600 ms à 35 ms dans la dimension d'acquisition. La superposition des spectres optimisés avant et après le traitement thermique met en évidence une diminution de 50 % de l'intensité des signaux du peptide après le traitement thermique, pour les deux zones observées : les protons aliphatiques (Figure 132) et aromatiques. Cela signifie qu'il reste 50 % de peptide encapsulé. Cette valeur est du même ordre de

grandeur que les valeurs obtenues par les méthodes précédentes (70 % de relargage d'après les acquisitions DOSY et 55 % pour les spectres 1D ^{1}H).

d) Lavage de l'échantillon après les traitements thermiques

Une manière simple de confirmer le relargage des échantillons est de laver l'extérieur des liposomes et d'observer à nouveau les liposomes par RMN. Si les signaux attribués aux peptides extérieurs aux liposomes disparaissent, cela serait une preuve supplémentaire que ces signaux sont bien issus du relargage.

Les spectres RMN de l'échantillon de liposomes lavés (tube 1) ont été comparés avec ceux avant lavage (mais après traitement thermique). Certains signaux fins disparaissent après le lavage : 0,63, 0,58, 6,68, 7,01, 7,16 et 7,50 ppm (Figure 133). Ils correspondent aux méthyles de la leucine et aux protons aromatiques du peptide libre. Ceci confirme que le relargage des peptides a bien lieu à 35 °C. Les signaux identifiés comme appartenant au peptide à l'extérieur des liposomes correspondent vraiment à ceux du peptide relargué et donc l'étape de lavage a bien fonctionné. Les signaux restant sur le spectre correspondent probablement à du peptide encore encapsulé. L'intensité des signaux du peptide encapsulé a diminué après l'étape de lavage de par la dilution de l'échantillon pendant l'opération d'un facteur 1/3.

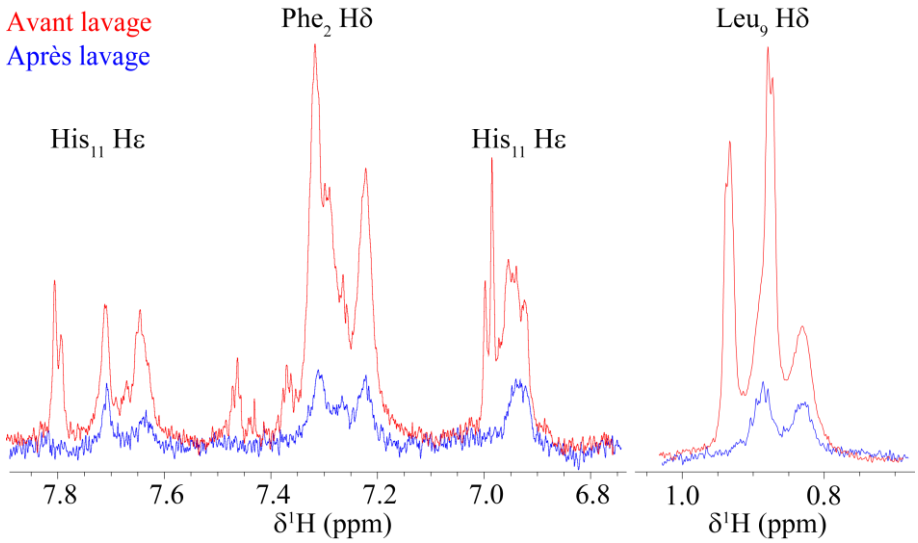


Figure 133: Extraits de spectres RMN ^{1}H de l'échantillon de peptide encapsulé avant (bleu) et après lavage (rouge). [liposome] = 28 mg.mL^{-1}, [K14P] = 144 µM, HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4, 5 °C, ^{1}H 950 MHz. S-CHOL12-C0-J1-T5.

e) Est-il plus adéquat d'analyser les échantillons à la température du traitement thermique ou à 5 °C ?

Les acquisitions RMN sont réalisées à 5 °C, température de conservation des échantillons et à 35 °C, température des traitements thermiques. Les résultats obtenus aux deux températures ont été comparés pour déterminer si une des températures permettaient d'avoir des résultats plus fiables qu'une autre.

Comme le relargage démarre rapidement lorsque la température approche les 35 °C. Il n'est pas possible d'obtenir un spectre à 35 °C sans aucun relargage. Pour mesurer la quantité de peptide relargué à partir des données enregistrées à 35 °C, la seule méthode possible est la méthode 2 ($\frac{I_0\ peptide\ libre}{I_0\ peptide\ libre+Io\ peptide\ encapsulé}$). Cette méthode permet d'estimer la quantité de peptide relargué à partir d'un seul spectre DOSY. Elle ne nécessite donc pas de spectre de référence à t = 0. Les calculs avec la méthode 2 ont été réalisés sur les protons aromatiques du peptide et pour la dernière acquisition DOSY réalisée à 35 °C, avant que la température de l'échantillon ne soit redescendue à 5 °C. Les résultats donnent 52 ± 10 % de peptides relargués. Cette valeur est inférieure à la valeur obtenue pour les acquisitions à 5 °C sur le même échantillon, à méthode de calcul équivalente *i.e.* 66 ± 13 % (Tableau 24). Plusieurs explications sont possibles pour expliquer cette différence. D'abord il a été montré que du relargage avait lieu à 35 °C. Et il y a un laps de temps entre les acquisitions à 35 et 5 °C correspondant à la redescente en température du spectromètre : les peptides ont donc probablement continué à relarguer pendant ce délai. Il est possible d'estimer grossièrement la vitesse de la réaction en faisant le ratio entre le pourcentage de peptide relargué sur le temps de la cinétique, soit 70 % / 12 h. Cela correspond à une perte de 0,09 % de peptide par minute. C'est-à-dire que si le spectromètre a besoin de 30 minutes pour diminuer sa température de 35 à 5 °C, cela représenterait un relargage de peptide de 3 %. Cette valeur est trop faible pour expliquer les différences entre les mesures DOSY à 5 °C et 35 °C. En revanche l'acquisition DOSY dure environs3 h. Pendant l'acquisition environs 16 % de peptides pourraient relarguer et cela pourrait expliquer les différences mesurées.

L'évolution de l'échantillon à 35 °C peut poser un problème lors des analyses, surtout au début de la cinétique lorsque l'évolution est rapide car l'acquisition d'un spectre DOSY prend environ 3 h. Cependant, pour des traitements thermiques longs, il est intéressant de réaliser les spectres à la température du traitement thermique. Cela permet d'observer les différences au cours du traitement et de collecter un maximum d'informations. Les spectres 1D sont sûrement à privilégier lors des traitements thermiques : le temps d'acquisition étant plus court que pour les DOSY, l'échantillon n'a pas le temps d'évoluer significativement.

f) Suivi du relargage de l'HEPES pendant le traitement thermique

Les signaux du tampon sont très intenses sur les spectres RMN et ont donc un très bon rapport signal-sur-bruit. L'HEPES est présent à l'intérieur et à l'extérieur des liposomes et le Chapitre 4 a mis en évidence qu'il était possible d'extraire deux coefficients de diffusion pour ces signaux, correspondant au molécules d'HEPES libres et encapsulées. L'objectif de ce paragraphe est de vérifier s'il est possible de se servir des signaux de l'HEPES comme marqueur de son relargage. Pour cela les derniers spectres 1D (*i.e.* au gradient le plus élevé) de l'acquisition DOSY avant et après traitement thermique (Figure 134) ont été superposés. Ils ne contiennent que les signaux de l'HEPES encapsulé. L'intensité des

signaux de l'HEPES encapsulé est plus faible sur les spectres avant le traitement thermique par rapport aux spectres après le traitement thermique. Cela suggère que la quantité d'HEPES dans les vésicules augmente avec le traitement thermique et le relargage du peptide.

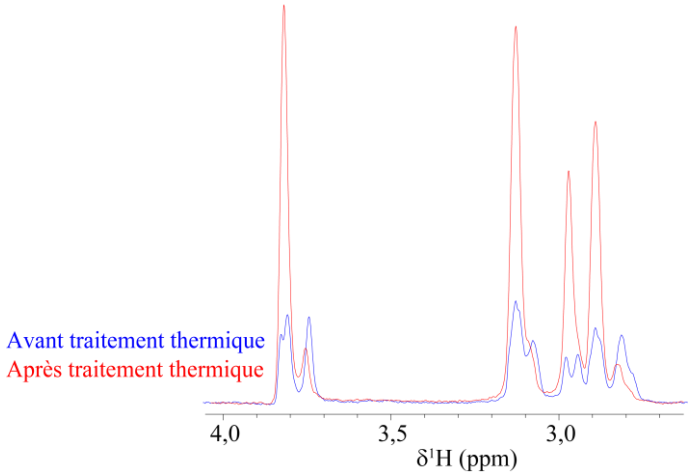


Figure 134 : Signaux RMN ^1H de l'HEPES issus de deux coupes d'acquisition DOSY (gradient de 15,5 G.cm^{-1}) avant traitement thermique (spectre bleu) et après traitement thermique (spectre rouge). A cette intensité de gradient, les signaux observés ne correspondent qu'aux molécules encapsulées dans des liposomes. HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4. 5 °C, ^1H 950 MHz. S-CHOL12-C0-J1-T5.

Des mesures DLS, réalisées sur le tube 2 avant et après un traitement thermique d'une nuit à 37 °C, montrent que la taille des liposomes augmente après le traitement thermique. Les liposomes ont une taille de 87 ± 13 nm avec un PdI de 0,26 avant le traitement thermique et 249 ± 1 nm avec un PdI de 0,25 après le traitement thermique, soit une augmentation de 2,8 (environ 3) de la taille des liposomes. Cette augmentation de taille est probablement due à des fusions de liposomes. La formation d'agrégat a été exclue car l'échantillon avait été centrifugé avant les analyses DLS. Cette augmentation de taille correspond à une multiplication du volume des liposomes par 30 (environ 3^3). Les liposomes doivent être remplis d'une solution, logiquement de l'eau et l'HEPES, entraînant ainsi une augmentation de la quantité d'HEPES encapsulée après le traitement thermique.

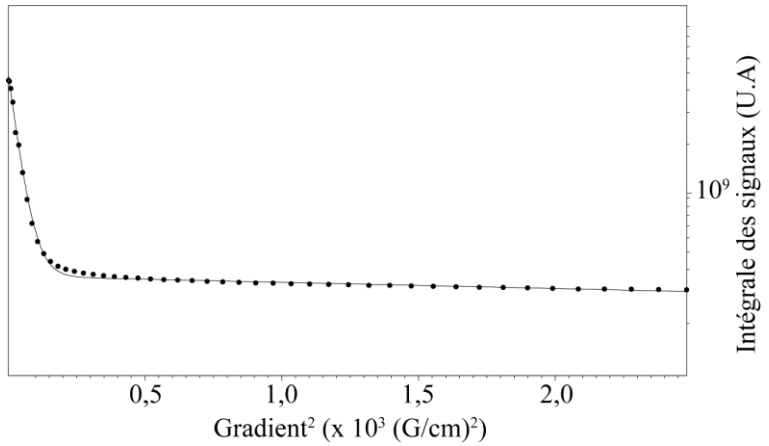
Il est possible de calculer l'augmentation effective de signal attendue pour une augmentation par 3 de la taille des liposomes. Il faut prendre en compte que le nombre de lipides et sans doute la surface totale de bicouches, avant et après le traitement thermique, doivent rester inchangés. La surface des liposomes après traitement thermique est 3^2 fois plus grande que celle avant le traitement thermique, donc il y a 3^2 fois moins de liposomes. L'intensité des signaux de l'HEPES après le traitement thermique devrait donc être $3^3/3^2 = 3$ fois celle de l'intensité avant traitement. Cela est en adéquation avec ce qui est observé dans les spectres DOSY où le signal de l'HEPES encapsulée a triplé en intensité après le traitement thermique. L'HEPES est donc un bon indicateur de l'évolution de ces échantillons et de l'augmentation de la taille des liposomes après le traitement thermique.

Si les liposomes augmentent en taille après les traitements thermiques à 35 ou 37 °C, cela devrait aussi affecter le coefficient de diffusion des peptides encapsulés *i.e.* le coefficient de diffusion des peptides

encapsulés après traitement thermique devrait être plus grand que le coefficient de diffusion des peptides encapsulés avant le traitement thermique. Cependant ceci n'est pas observé dans les résultats (Tableau 24). En augmentant la taille des liposomes de 87 à 249 nm, à coefficient de diffusion identique, les peptides vont percuter 8 fois plus les parois des liposomes. Cette différence de taille ne semble donc pas engendrer de différence significative sur les coefficients de diffusion des peptides encapsulés avant et après le traitement thermique.

g) Suivi du relargage de l'eau pendant le traitement thermique

Le signal le plus intense de l'échantillon appartient à l'eau. Il est aussi bien présent à l'intérieur et à l'extérieur des liposomes. Le paragraphe précédent montre que la taille des liposomes soniqués augmente après le relargage, augmentant ainsi la quantité d'HEPES encapsulée après le relargage. Il est fortement probable que la même observation soit applicable à l'eau. Des analyses DOSY ont donc aussi été enregistrées sans suppression d'eau pour mesurer les coefficients de diffusion de l'eau (Figure 135). Les intégrales I_0 peuvent être utilisées de la même manière que l'intégrale des signaux pour l'HEPES. Les proportions des signaux de l'eau encapsulées et libres sont équivalentes à celles observées pour l'HEPES. Ainsi l'eau peut servir d'indicateur de l'évolution de la taille des liposomes après le traitement thermique.



I_0 x 10^8 (U.A)	D x 10^{-12} (m2.s^{-1})	I_0 x 10^8 (U.A)	D x 10^{-9} (m2.s^{-1})
3,48 ± 0,45	3,49 ± 0,46	43,61 ± 1,06	1,21 ± 0,07

Figure 135 : Courbe obtenue par Dynamics center à partir des mesures DOSY réalisées sur l'eau présente dans l'échantillon de peptide encapsulé avant le traitement thermique.

En conclusion le tube 1 a permis de mettre en évidence qu'il était possible de suivre la cinétique de relargage de peptides encapsulés dans des liposomes par RMN et de quantifier ce relargage par différentes méthodes (1D ^{1}H, DOSY). Le relargage des molécules du tampon peut aussi être utilisé pour caractériser le système, par exemple pour mesurer l'évolution de la taille des liposomes après la cinétique de relargage.

5.1.3 Analyse de la cinétique de relargage de K14P avec un agent paramagnétique affectant les déplacements chimiques $Dy(DOTP)^{5-}$ (Tube 2)

Les mêmes expériences RMN que celles appliquées à l'échantillon précédent (tube 1), 1D ^{1}H et DOSY ont été enregistrées sur l'échantillon contenant l'agent paramagnétique (tube 2). Le but est d'observer la cinétique de relargage du peptide et l'impact du complexe paramagnétique sur celle-ci, ainsi que d'identifier si l'utilisation du complexe paramagnétique pour mesurer ce relargage est une méthode fiable.

Dans un premier temps l'échantillon (tube 2) a été analysé à 5 °C pour référence. Puis il a été chauffé à 25 °C sur 31 h. Aucun changement dans les spectres 1D ^{1}H et DOSY n'a été observé entre avant et après le traitement thermique à 25 °C. L'échantillon a ensuite été conservé à 37 °C pendant une nuit (16 h). Un dépôt avait sédimenté dans le tube. Ces dépôts sont probablement des agrégats de lipides dus à la dégradation des liposomes.

a) Spectres RMN 1D ^{1}H

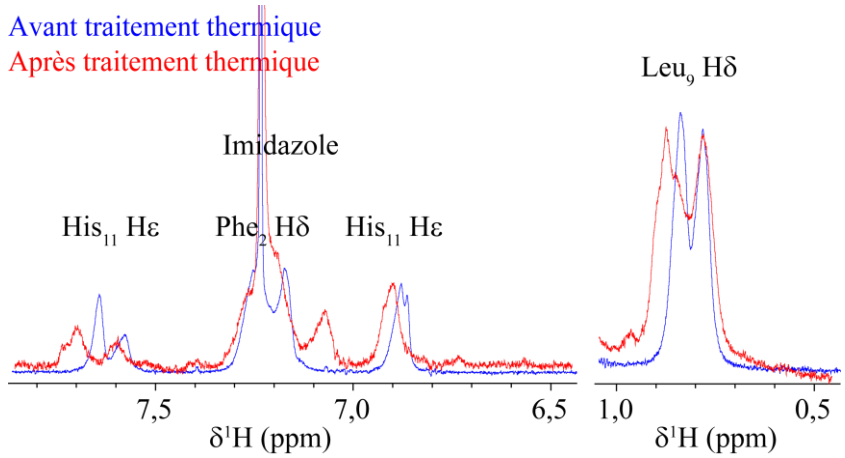


Figure 136 : Extraits des spectres 1D ^{1}H du tube n°2 avant (bleu) et après (rouge) le traitement thermique à 37 °C. L'intensité du spectre bleu a été multipliée par 0,43 pour la zone de Leu$_9$ Hδ. L'intensité du spectre bleu a été multipliée par 0,65 pour la zone des protons aromatiques. [liposome] = 30 mg.mL^{-1}, [K14P] = 420 µM, [imidazole] = 300 µM, HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4, 5 °C, ^{1}H 600 MHz. S-CHOL12-C0-J1-T5. Les signaux utilisés pour ajuster les spectres sont le signal à 0,8 ppm pour la zone de Leu$_9$ Hδ et 7,9 ppm pour la zone des protons aromatiques. S-CHOL12-C0-J1-T5.

La première méthode choisie, pour étudier le relargage et estimer la quantité de peptide relargué, est l'utilisation des spectres 1D ^{1}H. La superposition des spectres collectés à 5°C avant et après traitement montre que les variations de déplacement chimique entre peptide encapsulé et libre ne sont finalement pas aussi marquées que dans l'échantillon ne contenant pas de complexe paramagnétique (tube 1). Il semble donc que le complexe de dysprosium ait rapproché les signaux des doublets des leucines, alors qu'on se serait attendu à les voir s'éloigner comme dans l'étude en tube capillaire. Pour ajuster les signaux en intensité avant/après le traitement, et donc estimer la perte en intensité dans le spectre ^{1}H

pour le peptide encapsulé lié au relargage, différents coefficients ont dû être appliqués pour différentes zones du spectre (Figure 136). En effet, une diminution de 65 % de l'intensité du spectre avant le traitement thermique est suffisante pour ajuster les signaux des protons aromatiques. Cependant il faut le réduire de 43 % pour ajuster les signaux des doublets de la leucine. Dans le cas du tube 1, sans complexe paramagnétique, une seule valeur de pourcentage permettait d'ajuster le spectre initial au spectre après le traitement thermique. Il a déjà été montré dans le chapitre précédent (Chapitre 4) que le complexe avait des interactions privilégiées avec certaines zones du peptide et donc avait des impacts différents sur les intensités en fonction des protons. Ainsi les peptides en contact avec la sonde paramagnétique peuvent réagir différemment au PRE et avoir des baisses d'intensité différentes. Cependant, les signaux comparés sont ceux du peptide encapsulé, qui ne sont à priori pas en contact avec le complexe paramagnétique. Les résultats suggèrent donc que du complexe paramagnétique aurait diffusé à l'intérieur des liposomes, affectant le peptide encapsulé. Il est possible d'estimer le relargage en faisant la moyenne des deux valeurs utilisées pour ajuster les spectres. Ainsi 54 ± 16 % de peptide a relargué au bout de 16 h à 37 °C. L'écart type entre les mesures, réalisées sur différentes zones du spectre, est beaucoup plus grand dans le cas du tube 2 (16 %) que du tube 1 (sans complexe paramagnétique, 3 %). La sonde paramagnétique semble donc aussi avoir un impact sur les mesures réalisées sur les spectres 1D ^{1}H et augmente l'erreur des mesures.

b) Utilisation des acquisitions DOSY pour suivre la cinétique de relargage et la quantifier

L'échantillon a aussi été analysé par DOSY pour vérifier l'impact de la sonde paramagnétique sur ces mesures. Les zones intégrées pour cette analyse sont : 7,7 – 6,5 ppm pour les protons aromatiques, 2,2 -1,1 ppm pour les protons aliphatiques et 0.7 – 1,0 pour les Leu_9 Hδ. Une fois les spectres collectés, les coefficients de diffusion de chaque zone du spectre, mesurés avec les méthodes 1 et 2, ainsi que les intensités I_0 associées ont été extraites (Tableau 25). Les données permettent seulement d'obtenir des informations sur la zone des protons aromatiques. Les autres signaux ont des rapports signaux-sur-bruit trop faibles pour en extraire des coefficients de diffusion. Ceci est certainement dû à la présence du complexe paramagnétique qui perturbe la relaxation des protons et donc joue sur la largeur de raie et l'intensité des signaux. La zone des protons aromatiques, avant le traitement thermique à 37 °C, permet de mesurer à partir du spectre DOSY un coefficient de diffusion lent, correspondant au peptide encapsulé, et un coefficient de diffusion rapide (10^{-10} $m^2.s^{-1}$). Cette zone contient donc des signaiux de molécules extérieures aux liposomes, alors que l'échantillon n'a pas encore été chauffé. Les déplacements chimiques de ces protons correspondent aux déplacements chimiques des protons de l'imidazole qui a été ajouté au début des expériences à l'extérieur des liposomes. L'imidazole avait pour but de servir de sonde pour le complexe paramagnétique. Il est donc normal de mesurer un coefficient de diffusion rapide pour cette zone de protons. Ainsi la méthode 1, comparant les spectres DOSY avant

et après le traitement thermique, semblent moins fiable que la méthode 2, car l'imidazole va contribuer à I_0 libre.

Finalement les résultats obtenus sont 72 ± 6 % et 74 ± 6 % de peptide relargué avec les méthodes 1 et 2 respectivement. Les deux méthodes de calcul donnent des résultats proches. Ces valeurs nes semblent pas significativement différente des valeurs obtenues en comparant les signaux RMN des spectres 1D, à savoir 54 ± 16 % de peptide relargué. Le complexe paramagnétique ne semble pas impacter significativement les signaux des protons aromatiques du peptide.

	Io $_{encapsulé}$ X 10^6 (U.A.)	**Méthode 1 100 - $\frac{Io_{encapsulé\ ap.35°C}}{Io_{encapsulé\ av.35°C}}$**	**$D_{liposome}$ X 10^{-12} ($m^2.s^{-1}$)**	**Io $_{libre}$ (U.A.)**	**Méthode 2 $\frac{Io_{libre\ ap.35°C}}{Io_{encapsulé\ ap.35°C}+Io_{libre\ ap.35°C}}$**	**$D_{peptide}$ X 10^{-10} ($m^2.s^{-1}$)**
PROTONS AROMATIQUES (7.7 - 6.5 ppm)						
Av. 35 °C	60,7 ± 2,5	72 ± 6 %	4,7 ± 0,8	60,1 ± 6,3	N.A.	7,3 ± 1,8
Ap. 35 °C	16,7 ± 2,6		2,4 ± 2,5	48,1 ± 6,2	74 ± 6 %	5,8 ± 1,8

Tableau 25 : Valeurs des coefficients de diffusion et des intégrales maximales avant et après un traitement thermique à 37 °C pendant 16 h. Les pourcentages de peptides relargués sont présentés dans les colonnes 3 et 6. Les quantités de peptides relargués sont présentés colonne 3 et 6.

c) Utilisation des acquisitions DOSY comme filtre

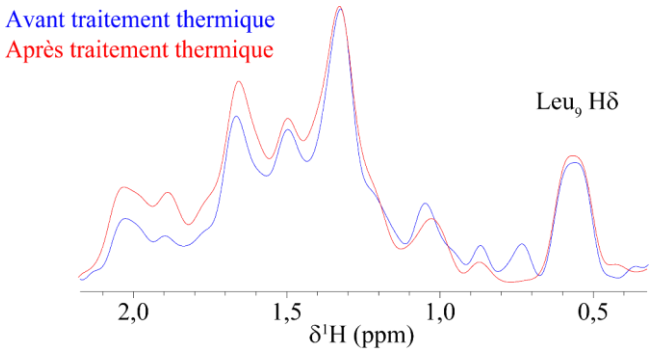


Figure 137 : Somme des 16 derniers spectres 1D ^{1}H des acquisitions DOSY (gradients supérieurs à 65 %) avant (bleu) et après (rouge) le traitement thermique à 37 °C pendant 16 h. L'intensité du spectre bleu a été multipliée par 0,35. [liposome] = 30 mg.mL^{-1}, [K14P] = 420 µM, 5 °C, ^{1}H 600 MHz. S-CHOL12-C0-J1-T5.

De la même manière que pour le tube 1, les 16 derniers spectres de l'acquisition DOSY (sur 32) ont été sommés dans le but d'augmenter le rapport signal-sur-bruit (Figure 137). L'avantage d'utiliser ces spectres par rapport aux spectres RMN 1D ^{1}H est que les 16 derniers spectres ne contiennent plus que des informations sur le peptide encore encapsulé. Les signaux du peptide libre ne sont plus visibles. Il est alors possible de comparer les spectres avant et après traitement thermique pour estimer la quantité de peptide encore encapsulé, ce qui permet donc de remonter indirectement à la quantité de peptide relarguée. D'après ces données, la quantité de peptide relarguée au bout de 16 h à 37 °C est de 65 %. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle obtenue par l'analyse des spectres DOSY complets (73 %).

d) Etude de l'impact du complexe paramagnétique sur les mesures de coefficients de diffusion.

L'objectif de ce paragraphe est de déterminer si le complexe paramagnétique a un impact sur les mesures de coefficient de diffusion des peptides libres et encapsulés. Les complexes paramagnétiques ont une influence sur l'intensité des signaux et les déplacements chimiques et peuvent donc impacter les acquisitions DOSY. Les paragraphes précédents ont déjà montré que le complexe utilisé avait un impact sur la variation des déplacements chimiques et sur l'intensité des signaux du peptide.

Pour chaque tube (1 et 2), les acquisitions 1D ^{1}H et DOSY réalisées à 5 °C après un traitement thermique ont pu être comparées. Les deux tubes montraient des signes de peptides relargués (*i.e.* baisse d'intensité des signaux larges correspondant aux peptides encapsulés et apparition de nouveaux signaux fins avec une variation de déplacement chimique sur les spectres 1D ^{1}H). Ils n'ont pas subi les mêmes traitements thermiques ; il n'est donc pas possible de comparer la quantification des peptides. Cependant les coefficients de diffusion des peptides libres et encapsulés, obtenus à partir des acquisitions DOSY, devraient être équivalents pour les deux tubes si le complexe paramagnétique la diffusion des peptides. L'intégrale de certains signaux du peptide (Leu_9 Hδ, zone des protons aliphatiques non recouvert par l'HEPES et les protons aromatiques) a été mesurée et suivie au cours de l'acquisition DOSY. Il a ensuite été possible d'ajuster une courbe sur ces points. Les courbes étaient des bi-exponentielles, montrant la présence de deux formes du peptide : encapsulé et libre. Les trois zones étudiées ont pu être correctement ajustées pour le tube 1. En revanche pour le tube 2, contenant le complexe paramagnétique, seuls les signaux des protons aromatiques ont permis d'obtenir des coefficients de diffusion. Il semblerait donc que la présence de complexe paramagnétique entraîne une diminution de l'intensité des signaux qui n'est pas négligeable pour les analyses DOSY et empêcherait d'exploiter toutes les données. Si le complexe paramagnétique se trouve seulement à l'extérieur des liposomes, il ne devrait affecter que les peptides relargués et il ne devrait y avoir aucun problème pour intégrer les signaux des peptides encapsulés. Ceci suggère que les peptides encapsulés sont aussi affectés par le complexe paramagnétique, suggérant que le complexe diffuse à l'intérieur des liposomes.

En regardant de plus près les spectres 1D ^{1}H, une variation de déplacements chimiques pour les signaux des peptides encapsulés du tube 2 est visible par rapport aux peptides encapsulés dans le tube 1 par rapport aux déplacements chimiques des peptides encapsulés dans le tube 1. Cela permet de faire l'hypothèse que le complexe paramagnétique diffuse à travers la membrane des liposomes et entre en contact avec les peptides encapsulés.

Intégration des ^{1}H aromatiques de K14P	**$D_{\text{peptide encapsulé}}$ ($m^2.s^{-1}$)**	**$D_{\text{peptide libre}}$ ($m^2.s^{-1}$)**
Tube 1	$(4,5 \pm 4,5) \times 10^{-12}$	$(1,6 \pm 0,8) \times 10^{-10}$
Tube 2 (avec $Dy(DOTP)^{5-}$)	$(2,4 \pm 2,5) \times 10^{-12}$	$(5,8 \pm 1,8) \times 10^{-10}$

Tableau 26 : Coefficients de diffusion des protons aromatiques réalisés sur des tubes contenant des peptides libres et encapsulés dans des liposomes soniqués, en présence (tube 2) ou non (tube 1) d'un complexe paramagnétique, à 5 °C.

La Tableau 26 récapitule les coefficients de diffusion obtenus pour les protons aromatiques des peptides libres et encapsulés dans des liposomes en présence ou non de complexe paramagnétique. Les coefficients de diffusion obtenus pour les peptides encapsulés et libres sont relativement différents entre les tubes 1 et 2, surtout pour les peptides libres. Le complexe paramagnétique est censé se trouver à l'extérieur des liposomes : les milieux internes des liposomes devraient être identiques dans les deux tubes ainsi que les coefficients de diffusion associés. Il serait probable d'observer une plus grande différence pour les peptides libres. La mesure du coefficient de diffusion du peptide libre présente plus d'incertitudes lorsque le complexe paramagnétique est présent dans l'échantillon. Ce qui est cohérent avec l'attendu, confirmant que le complexe paramagnétique et principalement son effet PRE, influe sur les données DOSY. En revanche les coefficients de diffusion mesurés pour le peptide encapsulé ont des incertitudes similaires en présence ou absence de complexes paramagnétiques.

Pour conclure, ce paragraphe a mis en évidence la diffusion des complexes paramagnétiques vers l'intérieur des liposomes, conduisant à une diminution des variations des déplacements chimique entre les peptides encapsulés et libres. Ce comportement ne correspond pas à ce qui a été observé sur les échantillons simulant l'encapsulation de peptide par un capillaire dans le chapitre précédent (Chapitre 4). Cette simulation devait permettre de prédire l'impact des sondes paramagnétiques sur les peptides relargués. Cependant, les compartiments internes et externes étaient séparés par le capillaire, ce qui empêchait tout transfert d'un compartiment vers l'autre et ne reflétait pas suffisamment bien l'échantillon réel. La diffusion du complexe à l'intérieur des liposomes aurait pu être prévisible : sachant que le liposome laisse diffuser des molécules à travers sa membrane pour le relargage du peptide, il n'y avait aucune raison que le complexe paramagnétique ne puisse pas lui aussi diffuser vers l'intérieur des liposomes. De plus l'effet PRE du complexe empêche d'utiliser correctement les données des acquisitions DOSY en diminuant l'intensité des signaux observés.

Il est aussi possible que le complexe paramagnétique impacte la cinétique de relargage du peptide. Le DOTP a été choisie car il permet d'obtenir des complexes paramagnétiques de charge négative. Ils ne vont donc pas interagir avec les liposomes, chargés négativement. En revanche ils pourront interagir avec les peptides chargés positivement. Il est possible d'imaginer que sans complexe paramagnétique, lors du relargage du peptide, du peptide sorte des liposomes et qu'une autre fraction de peptide entre dans les liposomes. En présence de complexe paramagnétique, lorsque le peptide relargue vers l'extérieur des liposomes, il va potentiellement interagir avec un complexe paramagnétique qui pourrait ensuite l'empêcher de retourner à l'intérieur des liposomes. Ceci peut s'expliquer par une augmentation de la taille du complexe peptide-sonde paramagnétique ou un changement de la charge globale par exemple. Ainsi le complexe paramagnétique pourrait favoriser la sortie du peptide des liposomes et augmenter la vitesse de relargage. Finalement, l'utilisation d'un complexe paramagnétique ne semble donc pas adaptée à ces échantillons.

5.1.4 Suivi de la cinétique de relargage pour mieux comprendre les mécanismes impliqués

Le but de ce paragraphe est de déterminer si les statistiques, et principalement l'utilisation d'une analyse par composantes principales, peuvent apporter des informations sur les mécanismes de relargage du peptide et servir à suivre les cinétiques de relargage.

L'historique de l'échantillon utilisé dans ce paragraphe est présenté Figure 138. Les analyses de références ont été réalisées à 5 °C, température de conservation des liposomes chargés de peptides : à cette température le peptide ne relargue pas (voir paragraphe 5.1.2). Les spectres RMN utilisés pour suivre la cinétique ont été réalisés aux températures des cinétiques.

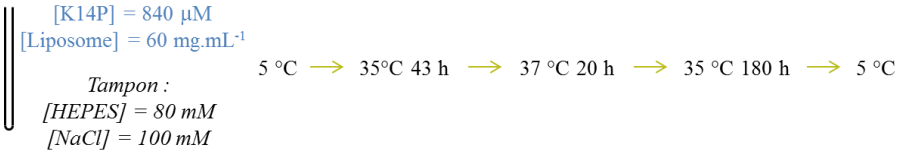


Figure 138 : Historique de l'échantillon : il est conservé à 5 °C avant l'analyse à haute température, l'échantillon est ensuite chauffé à différentes températures et finalement l'échantillon est à nouveau analysé à 5 °C. S-CHOL12-C0-J1-T5.

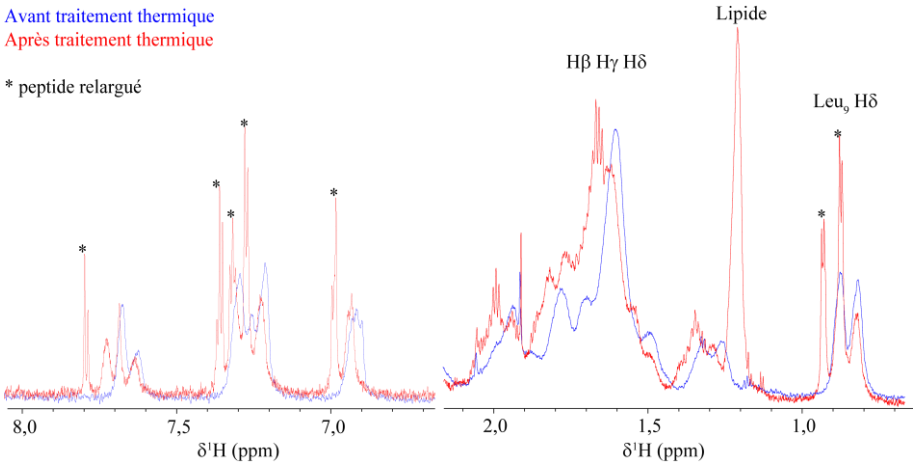


*Figure 139 : Extraits de spectres RMN ^1H à 5 °C avant (bleu, zone A) et après (rouge, zone C) application d'un traitement thermique de 240 h (10 jours au total): 43 h à 35 °C, 20 h à 37 °C et 177 h à 35 °C. [K14P] = 840 µM, [liposome] = 60 mg.mL^{-1}, HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4. 5 °C, ^1H 800 MHz. Les signaux du peptide relargué sont notés par *. S-CHOL12-C0-J1-T5.*

La Figure 139 met en évidence des différences sur les spectres 1D ^1H de l'échantillon avant et après le traitement thermique et l'évolution de la cinétique à 35 °C est présentée en Figure 140. Ces résultats sont proches de ceux observés lors du relargage présenté précédemment, à savoir la diminution de l'intensité des signaux correspondant aux peptides encapsulés dans les liposomes, l'apparition de signaux plus fins avec une légère variation de déplacement chimique correspondant aux peptides libérés dans le milieu extérieur aux liposomes et l'apparition d'un signal à 1,25 ppm correspondant aux lipides. Il semblerait donc que le relargage de K14P soit reproductible. Le signal fin issu d'un lipide semble aussi indiquer que le relargage entraîne l'extraction de phospholipides de la bicouche ou bien que le

traitement thermique ait dégradé partiellement les liposomes menant à un relargage de lipides en solution.

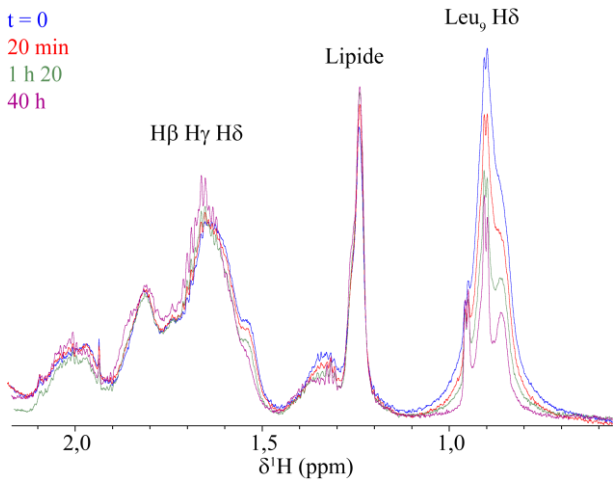


Figure 140 : Extraits de spectres RMN ^{1}H à 35 °C représentant la première cinétique de relargage de K14P encapsulé dans des liposomes. [K14P] = 840 µM, [liposome] = 60 mg.mL^{-1}, HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH7,4, 35 °C, ^{1}H 800 MHz. S-CHOL12-C0-J1-T5. t = 0 représente le premier spectre acquis lorsque l'échantillon a été inséré dans le spectromètre à 35 °C et que les paramètres d'acquisition ont été optimisés.

La Figure 140 présente la zone des protons aromatiques du peptide encapsulé à 35 °C. Le signal de lipide à 1,2 ppm apparaît dès le début du passage de la température de 5 à 35 °C. Les signaux autour de 0,9 ppm contiennent les doublets des méthyles de Leu_9. Le spectre à 40 h montre clairement que la forme de ce massif correspond aux signaux du peptide encapsulé (larges) et libre (fins). Cependant les trois autres spectres ont une forme qui suggère qu'un autre signal se trouve à un déplacement chimique similaire. Ce signal n'est pas visible sur les spectres après le retour à 5 °C. La valeur du déplacement chimique du signal à 0,9 ppm, suggère qu'il correspond à une chaîne carbonée et donc au vu de l'intensité à un signal de lipide, composé majoritaire dans l'échantillon. Ensuite l'évolution des signaux des peptides pendant le traitement thermique montre que l'intensité des signaux, surtout au niveau des deux doublets de la leucine, diminue tout au long de la cinétique avec une vitesse plus rapide les deux premières heures. Ceci montre que la cinétique n'est finalement pas terminée au bout de deux heures (durée du traitement thermique du tube 1 présenté précédemment), mais qu'elle est fortement ralentie. Il est possible d'utiliser l'intégrale de ces signaux pour suivre la cinétique. Ainsi les courbes obtenues représentent la variation de l'intensité des signaux en fonction du temps (Figure 141). Les deux zones analysées sont le signal de lipide à 1,25 ppm et les doublets des méthyles de la leucine du peptide encapsulé et libre ainsi que les CH_3 des phospholipides à 0,9 ppm.

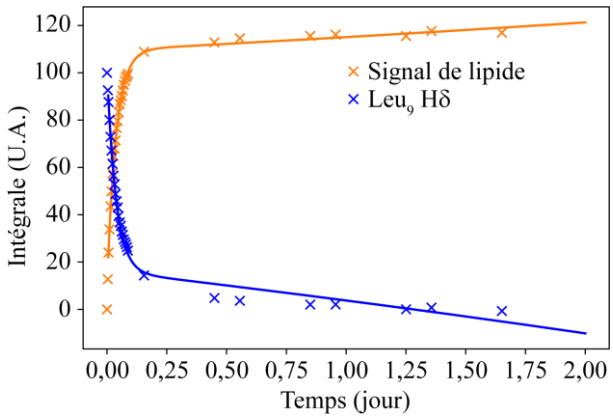


Figure 141 : Evolution de l'intégrale des signaux RMN ^{1}H des méthyles de Leu$_9$ et de lipide en fonction du temps à 35 °C.

Dans les deux cas l'évolution suit une courbe bi-exponentielle (Équation 13) dont les paramètres sont représentés ci-dessous (Tableau 27) avec K une constante, b et d les constantes de temps de la bi-exponentielle. Il est possible d'appliquer les mêmes constantes de temps aux deux courbes, montrant que les événements observés sur les deux zones de signaux sont liés. L'apparition du signal de lipide à 1,25 ppm est probablement liée au relargage des peptides. Le mécanisme le plus probable est que le peptide arracherait des lipides au passage dans la membrane et ceux-ci resteraient associés au peptide, par interactions électrostatiques par exemple.

$$Intensité = K + a.e^{b.t} + c.e^{d.t}$$

Équation 13, avec K, a et c des constantes et b et d des constantes de temps (j^{-1}).

	b (j^{-1})	d (j^{-1})	K	a	c
Signal de lipide	0,18 ± 0,06	- 26,1 ± 0,6	95 ± 7	18 ± 7	- 105 ± 1
Hδ Leu$_9$			80 ± 21	-65 ± 21	85 ± 1

Tableau 27 : Valeurs des coefficients de l'équation bi-exponentielles pour les zones 1 et 2 du spectre RMN 1D ^{1}H.

L'importance de la phase fluide est corroborée par les expériences réalisées à 25 °C ne montrant aucun relargage du peptide (paragraphes précédents) : lorsque la bicouche n'est pas fluide il n'y a pas de relargage du peptide. L'intensité du signal de lipide à 1,25 ppm augmente progressivement, en deux étapes, il est donc probable que la fluidification de la membrane nécessite un certain temps d'équilibration. La sortie progressive du peptide peut aussi augmenter la fluidité la membrane. Il est également possible que le peptide relargué entraîne avec lui des phospholipides.

Un second point à noter est la forme bi-exponentielle des courbes. Le relargage est donc composé de deux phénomènes : un rapide et un lent. Le phénomène rapide se déroule seulement pendant les deux premières heures du relargage puis le phénomène lent tend vers un état d'équilibre. Cela pourrait être lié au choc thermique subi par l'échantillon lorsqu'on le chauffe à 35 °C, puis à l'équilibration de la température dans l'échantillon.

5.1.5 Utilisation d'analyse en composantes principales

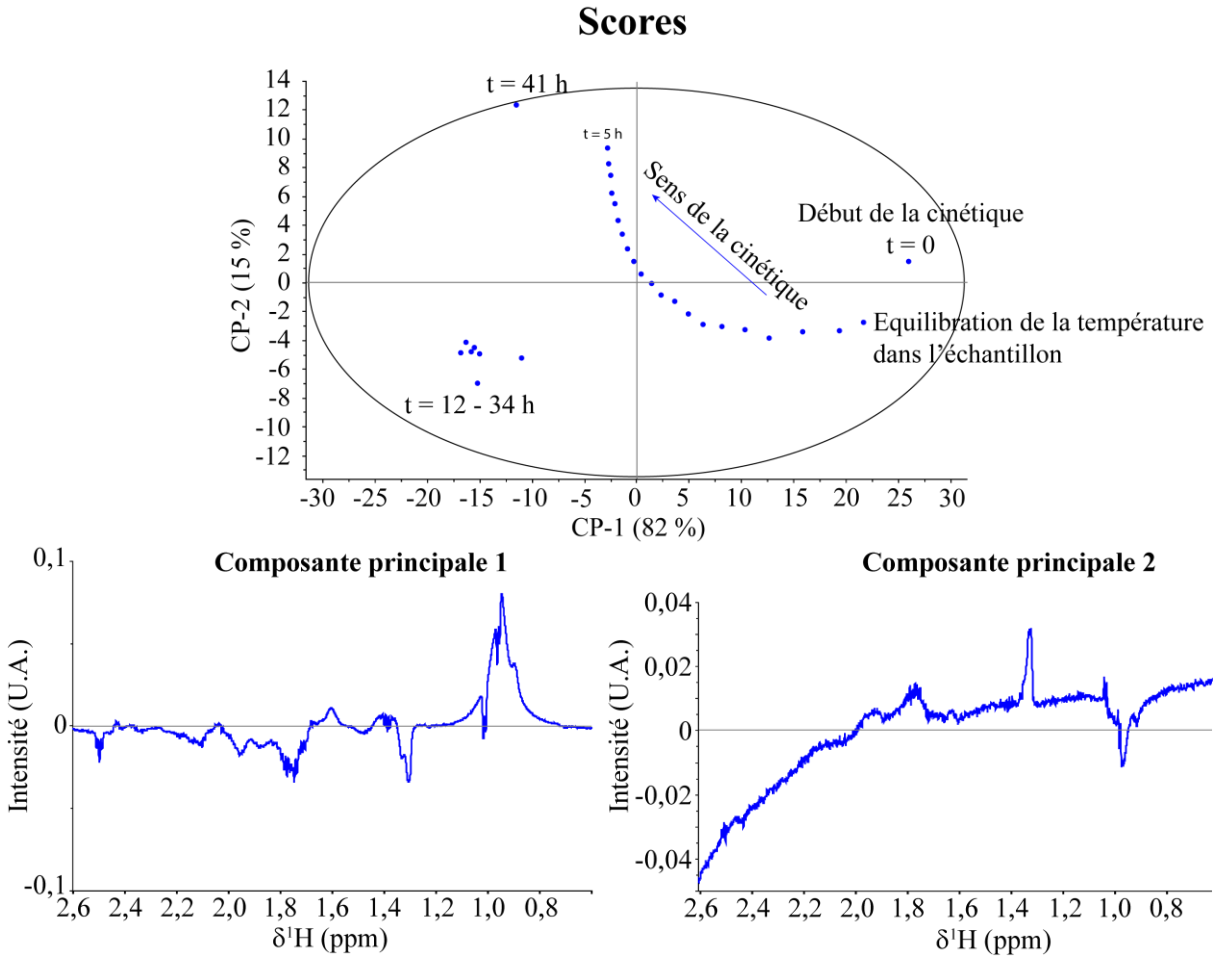


Figure 142 : Représentation de l'ACP sur 30 spectres RMN 1D ^{1}H enregistrés sur un spectromètre Bruker 800 MHz à 35 °C, sur la zone des protons aliphatiques de 0 à 2,2 ppm. Les spectres ont été enregistrés toutes les 5 minutes pendant les deux premières heures puis toutes les 2 h ou 7 h. Les composantes 1 et 2 de l'ACP (PC1 et PC2) sont représentées au bas de la figure et elles représentent 82 % et 15 % des variations des spectres respectivement.

Une étude statistique de la cinétique de relargage du peptide a été réalisée sur les mêmes données pour compléter les résultats obtenus. Les analyses de composantes principales sont utilisées pour analyser une grande quantité de données et en extraire des tendances. Ces analyses ont déjà fait leurs preuves pour suivre des cinétiques de réactions par exemple dans (Svensson, Josefson and Langkilde, 1999). Ici la méthode Analyse en Composantes Principales (ACP) a été utilisée. Les analyses statistiques ont été réalisées par Maïna Kerbrat (IT&M pour Sanofi, Vitry-sur-Seine). Dans le cas de cette étude le principe est de réduire la dimension des données spectrales en composantes principales (CP) qui décrivent le mieux la variabilité entre les spectres RMN. Les CP sont des combinaisons linéaires des variables initiales. Ils présentent les différentes composantes, extraites des courbes, pouvant expliquer les variations des spectres. C'est-à-dire, si les spectres étudiés étaient tous identiques, les composantes principales extraites de l'ACP seraient du bruit. Ainsi lorsque le signal est positif cela signifie que l'intensité de cette zone sur le spectre RMN diminue au cours de la cinétique. Lorsque le pseudo-signal

du loading (PCP) est négatif cela signifie que l'intensité du signal augmente avec le temps. L'intérêt de cette méthode est d'extraire des composantes qui pourraient apporter de nouvelles informations quant aux mécanismes qui régissent le relargage des peptides.

Un premier test a été réalisé sur la zone 0,6 - 2,6 ppm correspondant aux protons aliphatiques du peptide et de lipides (Figure 142). L'ACP met en évidence des composantes qui représentent les différences entre les données. La figure des scores montre une continuité dans la majorité des points. La cinétique démarre en bas à droite : la flèche sur la figure indique la suite de la cinétique à partir de t = 0 jusqu'à 5 h. Les points enregistrés après une demi-journée et une journée n'apparaissent pas dans la continuité de la cinétique. Ceci peut être expliqué car le tube de l'échantillon a été sorti du spectromètre entre chaque journée d'analyse.

CP1 permet d'expliquer 82 % des variations entre les spectres. Il semble que CP1 soit reliée au relargage du peptide et à l'extraction de lipide. Elle montre une diminution d'un signal à 0,9 ppm. Ce signal a été précédemment attribué aux doublets des méthyles de la leucine ainsi qu'à un signal de lipide (CH_3 des phospholipides). Le signal à 1,2 ppm augmente en intensité au cours de la cinétique. Ce signal est attribué à des lipides (CH_2 de chaînes carbonées des phospholipides). Entre 1,4 et 2,6 ppm, les signaux appartiennent aux protons aliphatiques du peptide et leur intensité semble augmenter au cours de la cinétique. L'intensité de ses pseudo-signaux diminue globalement au cours du temps : une diminution de l'intensité des signaux des peptides encapsulés, une augmentation de l'intensité des signaux des peptides libres et peut être également la diminution de l'intensité des signaux des phospholipides. CP2 représente 15 % des variabilités et montre deux pseudo-signaux à 1,0 et 1,3 ppm qui augmentent et diminuent en intensité respectivement. Puis à partir de 2 ppm le pseudo-signal diminue montrant une dérive dans la ligne de base sur les spectres RMN. D'après les spectres RMN 1D ^{1}H, cette variation correspond au pied du signal de l'HEPES, il semble donc que cette deuxième composante soit principalement dû à une variation de la ligne de base entre les échantillons. La composante CP3 représente moins de 3 % de variabilité et elle est principalement composée de bruit. Pour conclure, la cinétique observée à 35 °C est principalement due à un seul phénomène : la fluidification de la membrane permettant de relarguer le peptide. Ce qui permet de confirmer les remarques déjà formulées à partir des spectres 1D ^{1}H.

5.2. Etude de la cinétique de relargage de C16-K14P dans des liposomes soniqués

La partie précédente montre l'étude de la cinétique de relargage de K14P. Dans cette partie la cinétique de relargage de C16-K14P dans des liposomes soniqués va être étudiée. Ce peptide possède la même chaîne d'acides aminés que K14P, avec une chaîne lipidique (C16) accrochée au résidu Lys_1. Le premier point à noter est que le rendement d'encapsulation de ce peptide est de 100 %, soit beaucoup plus efficace que pour K14P. Une explication est que C16-K14P possède une chaîne lipidique hydrophobe.

Cette chaîne va avoir des interactions préférentielles avec les chaînes carbonées des phospholipides et tend à s'insérer dans la membrane des liposomes.

5.2.1 RMN 1D ^{1}H

Deux échantillons de C16-K14P ont été encapsulés selon le même protocole utilisé pour encapsuler K14P. La même formulation de liposome a aussi été utilisée.

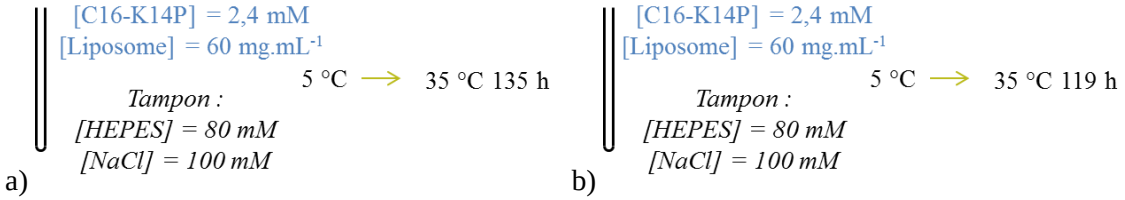


Figure 143 : Historiques des échantillons : a) première cinétique b) seconde cinétique. Les échantillons ont été conservés à 5 °C avant les analyses. Ils ont ensuite été chauffés à 35 °C, 135 et 119 h respectivement. Les derniers spectres sont enregistrés à 5 °C. S-CHOL12-C16-J1-T5.

La cinétique à 35 °C des deux échantillons a été suivie par RMN ^{1}H (Figure 143). Le but est de vérifier la reproductibilité des échantillons et de leur cinétique, puis de comparer l'évolution de C16-K14P avec celle de K14P. Dans les deux cas un dépôt blanc se forme au fond du tube après le traitement thermique, sûrement lié à la dégradation des liposomes.

En comparant les spectres RMN ^{1}H à 5 °C de C16-K14P, il y a un élargissement global des signaux du peptide, dû à la chaîne lipidique liée au peptide, sur les spectres de peptides encapsulés par rapport au spectre de peptides libres. Le massif à 0,9 ppm, correspondant à Leu_9 Hδ et au CH_3 de la chaîne lipidique, voit sa forme changer drastiquement lorsque le peptide est encapsulé. Les signaux s'élargissent et le signal du CH_3 se retrouve à droite dans la base du doublet. Les signaux correspondants aux CH_2 de la chaîne lipidique, à 1,3 ppm, sont très intenses pour le peptide libre à une concentration inférieure à la CMC. Mais ce signal disparaît sur le spectre de peptide encapsulé. La même remarque peut être faite pour les signaux de CH_2 à 2,4 ppm. Ceci montre que la chaîne lipidique du peptide a beaucoup d'affinité avec les liposomes. La structure des liposomes fait qu'ils sont composés d'une bicouche avec des surfaces hydrophiles et le centre de la bicouche hydrophobe. Les chaînes lipidiques étant hydrophobes, il est probable que la chaîne lipidique du peptide s'ancre dans la bicouche des liposomes. La chaîne peptidique de C16-K14P est visible en RMN (Figure 144), même lorsque celui-ci est encapsulé. Cela montre que C16-K14P, même lorsque sa chaîne lipidique est ancrée dans le liposome, garde une certaine flexibilité. Il a été montré précédemment que le rendement d'encapsulation de C16-K14P est de 100 %. Ainsi la concentration de C16-K14P dans l'échantillon est évaluée à 2,4 mM, ce qui est supérieur à la CMC estimée précédemment (300 µM). Il est donc possible que tous les C16-K14P ne soient pas ancrés dans les liposomes, mais que certains restent auto-associés pour former des micelles à l'extérieur ou à l'intérieur des liposomes. Les protons aromatiques de la phénylalanine Phe_2 à 7,3 ppm ne sont pas

présents sur le spectre du peptide encapsulé. Ce résidu est en position numéro 2 sur la chaîne d'acides aminés et est donc proche de la chaîne lipidique. Il y a donc de fortes chances qu'il soit restreint dans sa mobilité par l'ancrage du peptide dans la membrane des liposomes, entraînant un élargissement de ses signaux.

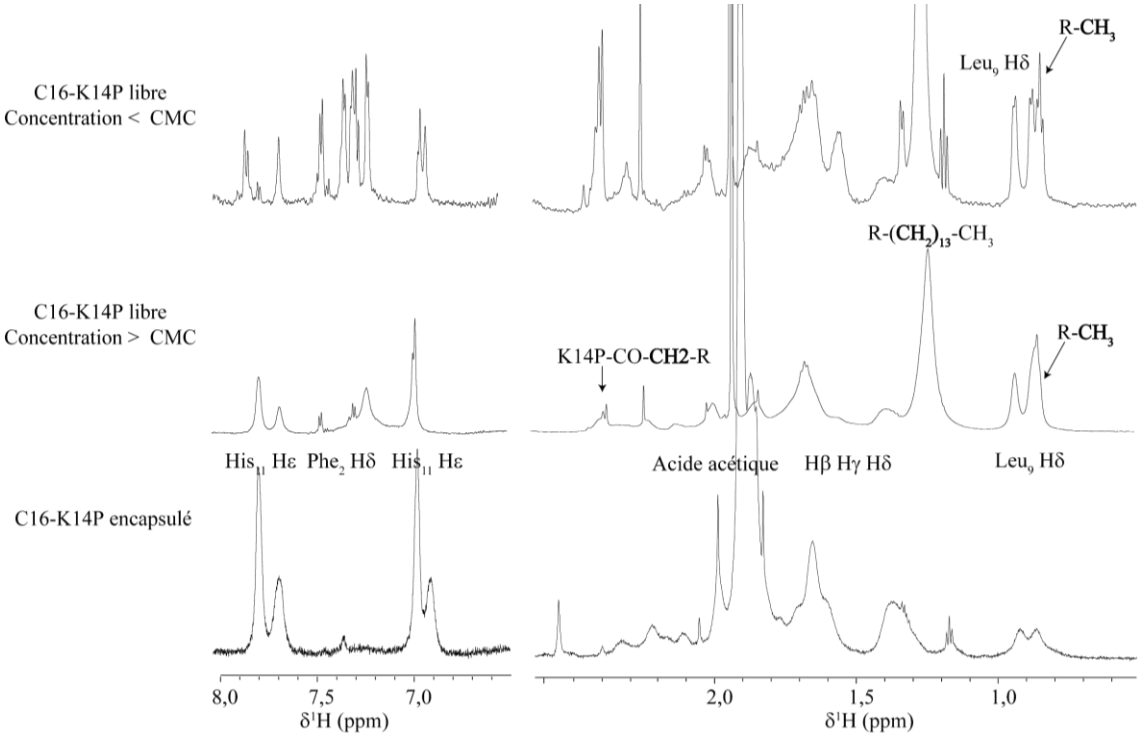


Figure 144 : Extraits de spectres RMN ^{1}H de C16-K14P libre et encapsulé dans des liposomes. [C16-K14P-libre] = 50 µM < CMC, [C16-K14P-libre] = 440 µM > CMC, [C16-K14P] = 2,4 mM, [liposome] = 35 mg.mL^{-1}, HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4. 5 °C. S-CHOL12-C16-J1-T5.

Le signal du DSS vers 0 ppm (Figure 145) est large et peu intense avant le traitement thermique. Après le traitement thermique son signal ne bouge pas, mais un autre signal apparaît à côté, fin et intense. Ce nouveau signal pourrait correspondre à du DSS libre. Comme le signal du DSS encapsulé ne bouge pas, ce DSS libre ne provient pas de l'intérieur des liposomes. Il pourrait s'agir de DSS qui interagissait avec la surface des liposomes par interactions électrostatiques et qui se serait libéré des parois sous l'effet du traitement thermique. La Figure 145 montre aussi que l'intensité des signaux de C16-K14P encapsulé diminue après le traitement thermique. Une diminution de l'intensité des signaux du C16-K14P encapsulé et l'apparition de signaux de peptide libre était attendue, comme pour K14P. Ces résultats suggèrent qu'il n'y a pas de relargage au cours du temps et que la quantité de peptides en interaction avec les liposomes augmente avec un meilleur ancrage dans la membrane. Le dépôt au fond du tube pourrait également entraîner une certaine quantité de peptide avec lui et induire une baisse d'intensité du signal du peptide liée à cette sédimentation. Un triplet à 0,6 ppm apparaît au cours de la cinétique. Après vérification des spectres de K14P encapsulé, ce signal était aussi présent après les traitements thermiques (5.1.2). Il est possible que ce signal soit lié à la détérioration des liposomes.

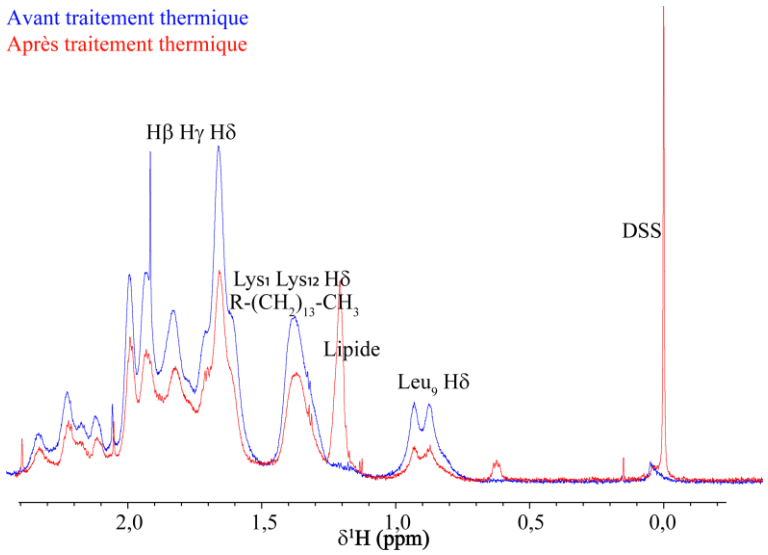


Figure 145 : Extraits de spectres RMN ^{1}H de C16-K14P encapsulé avant (bleu) et après (rouge) 111 h de traitement thermique à 35 °C. [C16-K14P] = 2,4 mM, [liposome] = 35 mg.mL^{-1}, 80 mM HEPES 100 mM NaCl pH 7,4. 5 °C. ^{1}H 800 MHz. S-CHOL12-C16-J1-T5.

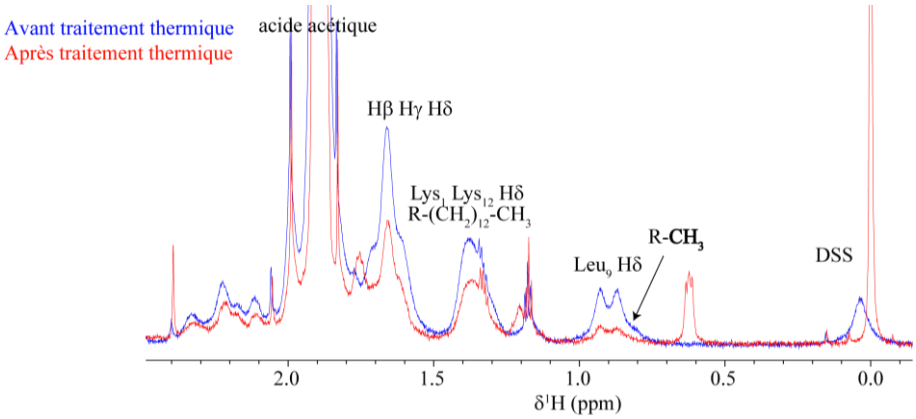


Figure 146 : Extraits de spectres RMN 1D ^{1}H de C16-K14P encapsulé, enregistrés à 5 °C, avant (bleu) et après (rouge) 119 h de traitement thermique à 35 °C. [C16-K14P] = 2,4 mM, [liposome] = 35 mg.mL^{-1}, 80 mM HEPES 100 mM NaCl pH 7,4. 5 °C, ^{1}H 800 MHz. S-CHOL12-C16-J1-T5.

Une seconde cinétique a été réalisée à nouveau pour déterminer si le résultat obtenu était reproductible. La cinétique représentée en Figure 146 (cinétique n°2) est différente de la précédente (Figure 145). Tout d'abord le signal à 1,9 ppm est beaucoup plus intense dès le début de la seconde étude (*i.e.* avant le traitement thermique). Ce signal a été identifié comme étant de l'acide acétique à l'aide de spectres RMN ^{1}H et ^{13}C. Cette molécule vient du lot de peptide (voir paragraphe suivant sur les liposomes extrudés). Ceci s'explique car l'échantillon de la cinétique n°2 n'a pas été centrifugé pour laver l'extérieur des liposomes, contrairement à l'échantillon préparé pour la première cinétique. L'étape de centrifugation a été supprimée car le rendement d'encapsulation de peptides lipidiques dans des liposomes est de 100 %, il n'y a donc pas de peptide libre à l'extérieur des liposomes. Le contre ion acétate du peptide est une petite molécule, qui comme le DSS diffuse à travers la membrane même à température de conservation de l'échantillon. Ainsi l'étape de centrifugation permettait de diminuer la

quantité d'acétate dans l'échantillon. Le signal à 1,2 ppm n'est presque pas visible sur les spectres de la cinétique n°2, à 35 °C et à 5 °C après le traitement thermique. Le triplet à 0,6 ppm est aussi plus intense après le traitement thermique dans la cinétique n°2 que dans la cinétique n°1. La méthode de préparation des échantillons était identique dans les deux cas, suggérant que cette méthode n'est pas complétement reproductible. Finalement l'étape de sonication a été identifiée comme l'étape pouvant engendrer le plus de variation dans l'échantillon, d'après les expériences Chapitre 2.

Les signaux des deux doublets des méthyles de la leucine présentent un épaulement à droite avant le début du traitement thermique (marqué d'une flèche sur la Figure 146). C'est à ce déplacement chimique que se trouve le triplet correspondant au CH_3 de la chaîne lipidique du peptide. Ce signal est devenu très large et cela peut s'expliquer par ses interactions avec les liposomes. Pendant le traitement thermique, l'intensité de l'épaulement diminue à la même vitesse que les doublets de la leucine. Cependant les signaux de cette zone, doublet et épaulement, diminuent plus brusquement que tous les autres signaux du spectre reliés au peptide, montrant que cette zone a plus d'interaction avec la membrane des liposomes que le reste du peptide. La chaîne latérale de la leucine est hydrophobe. Il est possible d'expliquer ces observations si la chaîne lipidique du peptide s'ancre dans la membrane des liposomes puis que la chaîne d'acides aminés du peptide se structure sur la surface des liposomes et que la chaîne latérale de la leucine tend aussi à s'insérer dans la bicouche des liposomes.

Il est possible d'intégrer les doublets de la leucine sur les spectres enregistrés à 35 °C et d'observer l'évolution de cette intégration au cours du temps (Figure 147). La courbe d'ajustement obtenue est une exponentielle simple, avec comme paramètres K = 0,64 ± 0,02 ; a = 0,42 ± 0,08 ; b = -23 ± 6 h^{-1}. Mais cette fois ci la formule représente soit la dégradation/sédimentation des liposomes entraînant les peptides, soit l'augmentation de la quantité de peptide ancré dans la membrane.

$$Intensité = K + a.e^{b.t}$$

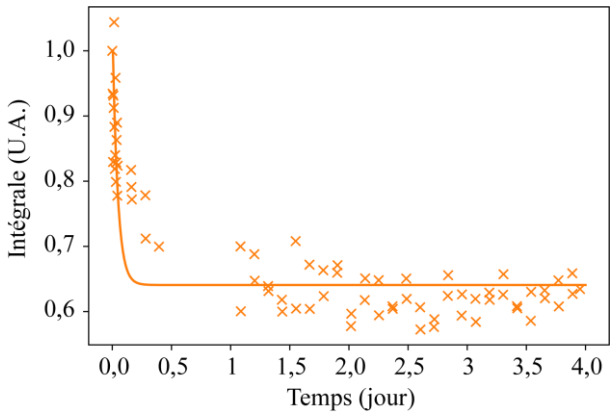


Figure 147 : Evolution de l'intégrales des signaux des doublets de la leucine de C16-K14P encapsulé dans des liposomes au cours de la cinétique de relargage à 35 °C. [C16-K14P] = 2,4 mM, [liposome] = 35 mg.mL^{-1}. HEPES 80mM NaCl 100mM pH 7,4.

En conclusion C16-K14P a un comportement différent de celui de K14P lors d'un traitement thermique. La cinétique suit une exponentielle et arrête d'évoluer au bout de 12 h environ. Dans le cas de K14P

deux phénomènes simultanés étaient observés : la diminution d'intensité des signaux du peptide encapsulé et l'apparition de signaux de peptide libre. En revanche, pour C16-K14P il n'y a que la disparition de signaux de peptides et l'apparition d'un seul signal lié à la dégradation des liposomes. Ces résultats laissent penser qu'il n'y a pas de relargage. Une hypothèse serait que les signaux de C16-K14P visibles sur les spectres sont des signaux correspondant à des micelles de peptides présents dans le lumen du liposome. Au cours du traitement thermique, la bicouche des liposomes se fluidifie, les peptides vont alors préférer s'associer aux liposomes que rester sous forme de micelles.

5.2.2 DOSY

Les données extraites des acquisitions DOSY enregistrées sur ces échantillons présentent des incertitudes de l'ordre de 50 %, ce qui est sûrement dû au faible rapport signal-sur-bruit. L'intensité des signaux du peptide étant faible. Elles ne sont donc pas utilisables.

Pour conclure, les suivis de cinétique de relargage de C16-K14P encapsulé dans des liposomes soniqués montrent que le peptide ne relargue pas après un traitement thermique mais que l'augmentation de la température permet d'augmenter le nombre de peptides ancrés dans la bicouche des liposomes. Cependant ces expériences ne sont pas reproductibles : le signal de lipide, attribué à l'extraction de lipides des liposomes au moment du relargage, n'est pas présent sur toutes les cinétiques. L'étape de préparation des échantillons pouvant expliquer les irrégularités entre les échantillons serait l'étape de sonication, car il a déjà été montré avec les expériences du Chapitre 2 que la durée de sonication des échantillons pouvait avoir un impact important sur la structure et la taille des liposomes.

5.3. Etude de la cinétique de relargage de K14P dans des liposomes extrudés

Un nouveau protocole de préparation des liposomes a été mis en place : l'extrusion. Cette technique permet de mieux contrôler la taille des liposomes et devrait être plus reproductible. De nouvelles cinétiques de relargage de peptides ont alors pu être étudiées à partir de ces nouveaux échantillons.
Lors de la préparation de ces échantillons, il a pu être mis en évidence que le taux d'encapsulation de K14P dans des liposomes extrudés était de 50 %, soit presque 2 fois plus que le taux pour des liposomes soniqués. L'explication la plus simple est que l'extrusion est une méthode plus douce d'encapsulation que la sonication qui casse les membranes pour réduire la taille des liposomes, ce qui permettrait au peptide de sortir des liposomes pendant l'étape de sonication. Alors que les liposomes préparés par extrusion subissent une pressions contre une membrane pour réduire leurs tailles. Ces liposomes sont déformés et aplatis jusqu'à ce que les bicouches soient suffisamment proches pour fusionner et former deux liposomes. Ainsi le peptide n'aurait pas la possibilité de sortir des liposomes pendant leur réduction de taille.

Cette partie va mettre en évidence l'impact des paramètres, tels que la quantité de cholestérol dans la formulation des liposomes ou la méthode de préparation, sur la cinétique de relargage. Les paragraphes suivant concernent des liposomes extrudés contenant 12 % de cholestérol. Le paragraphe 5.3.2 quant à lui présente des liposomes sans cholestérol.

5.3.1 RMN 1D ^{1}H

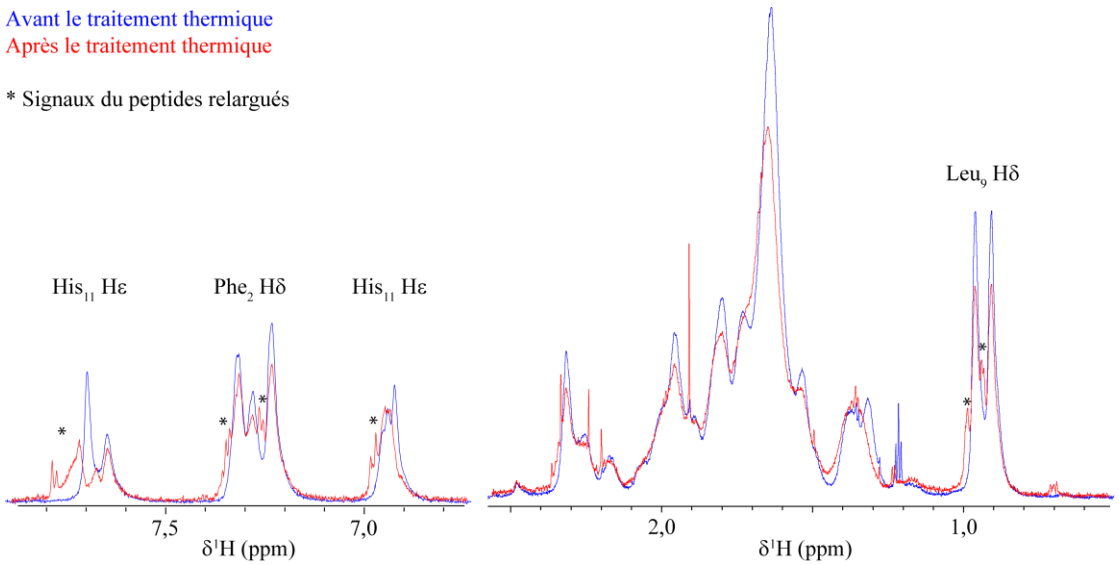


Figure 148 : Extraits de spectres de K14P encapsulé dans des liposomes extrudés, avant et après un traitement thermique de 5 jours à 40 °C. [K14P] = 2,8 mM, [liposome] = 60 mg.mL-1, HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4. MHz. 5 °C. E-CHOL12-C0-J1-T5.

Les spectres 1D ^{1}H sont les premiers à être étudiés, car ils apportent simplement de l'information sur le relargage du peptide et sa cinétique. Ces données peuvent aussi être comparées avec les cinétiques de relargage réalisées sur le même peptide dans des liposomes soniqués.

Tout d'abord aucun relargage du peptide n'est observé à 35 °C pendant 70 h, l'échantillon doit être chauffé à 40 °C pour observer le relargage. Le relargage des peptides des liposomes se présente de la même manière que précédemment : par l'apparition de signaux fins avec une légère variation de déplacements chimiques correspondant au peptide relargué. En superposant les spectres 1D ^{1}H du peptide avant et après traitement thermique, il est possible d'estimer que 30 % de peptide a été relargué en 12 h et 50 % en 5 jours à 40 °C. La cinétique de relargage est différente de celle obtenue avec les liposomes soniqués. En effet pour les liposomes soniqués, 2 h à 35 °C permettaient de relarguer environ trois quarts des peptides encapsulés. Pourtant les liposomes extrudés et soniqués ont 45 % de leurs bicouches sous forme fluide à 40 et 35 °C respectivement, d'après les mesures de T_m réalisées dans la Partie III - Chapitre 2. Ils devraient donc avoir la même quantité de discontinuité dans leurs bicouches, ce qui aurait pu laisser penser qu'ils auraient un comportement de relargage similaire. De plus aucun dépôt n'est observé au fond du tube pendant l'analyse : les liposomes extrudés semblent donc plus résistants à la température que les liposomes soniqués. Cela coïncide avec les mesures de T_m réalisées

précédemment, à savoir que la T_m des liposomes extrudés est supérieure à la T_m des liposomes soniqués. De plus les images de cryo-TEM montraient que les liposomes extrudés comportaient beaucoup de parties bi-lamellaires, contrairement aux liposomes soniqués qui sont presque exclusivement uni-lamellaire. Cela peut expliquer la cinétique de relargage plus lente des liposomes extrudés, lors d'un traitement thermique, par rapport aux liposomes soniqués car pour s'extraire d'un liposome extrudé le peptide aura plusieurs bicouches de lipides à traverser. De plus il est possible que des liaisons ester des phospholipides, qui sont des liaisons fragiles (Scherer, 1989), se cassent lors de l'étape de sonication, formant des lysolipides et des chaînes carbonées isolées. Ces chaînes isolées ne sont pas solubles dans l'eau et tomberont au fond des tubes d'analyse. Les lysolipides sont composés d'une tête polaire et d'une chaîne carbonée et ils peuvent former des micelles, ce qui fait de ces molécules des détergents. Ces molécules peuvent donc ensuite participer à la dégradation des liposomes en catalysant des dégradations chimiques des phospholipides permettant la formation de nouveaux lysolipides.
En complément, l'intégrale de certains signaux correspondant aux peptides a été suivie au cours du temps. Il est possible d'ajuster une courbe à ces données pour en extraire les constantes de temps b et d avec l'Équation 13.

La Figure 149 montre que le modèle bi-exponentiel s'applique aussi à cette cinétique. La cinétique de relargage est encore une fois en deux étapes, une première rapide, en une journée, puis une étape plus lente. En ajustant l'équation de manière simultanée sur les deux signaux de His_{11} et Leu_9, les constantes de temps obtenues sont b = 0,31 ± 0,02 $jour^{-1}$ et d = -3,6 ± 0,1 $jour^{-1}$ (Tableau 28). Les incertitudes ont été calculées par la méthode de Monte Carlo. Ces constantes sont du même ordre de grandeur que celles obtenues pour les liposomes soniqués (b = 0,18 ± 0,06 j^{-1} et d = - 26,1 ± 0,6 j^{-1}). La constante de temps b des liposomes soniqués est inférieure au b des liposomes extrudés, montrant que la première partie des cinétiques est plus rapide dans le cas des liposomes soniqués, ce qui est cohérent avec les observations réalisées ci-dessus. Concernant la deuxième partie de la courbe, le 'd' des liposomes extrudés est supérieur au 'd' des liposomes soniqués, suggérant que la seconde étape du relargage est plus rapide pour les liposomes extrudés que soniqués. Une fois la première étape du relargage terminé, la quantité de peptide restant dans les liposomes soniqués est faible, pouvant expliquer que cette partie de la cinétique de relargage est plus lente que pour les liposomes extrudés. Cette étude montre donc que le profil de cinétique de relargage des liposomes est différent en fonction du mode de préparation. Il semble que les liposomes extrudés permettent un relargage plus homogène du PA que les liposomes soniqués qui relarguent leurs PA par une seule poussée.

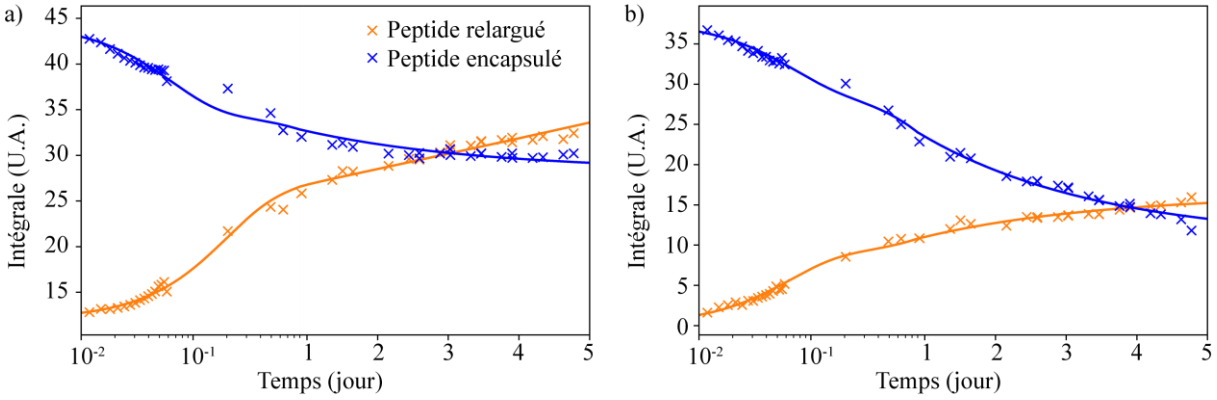


Figure 149 : Evolution de l'intégrale des signaux His_{11} Hε (a) et Leu_9 Hδ (b) en fonction du temps.

	b (j^{-1})	d (j^{-1})	K	a	c
His_{11} relargué	0,31 ± 0,02	-3,6 ± 0,1	10,8 ± 0,2	1,1 ± 0,1	-9,7 ± 0,1
His_{11} encapsulé			26,3 ± 0,4	-3,5 ± 0,3	13,1 ± 0,2
Leu_9 relargué			25,5 ± 0,5	1,8 ± 0,3	-14,7 ± 0,2
Leu_9 encapsulé			31,7 ± 0,2	-0,52 ± 0,07	10,7 ± 0,1

Tableau 28 : Récapitulatif des valeurs des différents paramètres et constantes obtenues pour les courbes d'ajustements de la cinétique de relargage ci-dessus avec l'Équation 13. Les constantes de temps (b et d) ont été fixées comme identiques pour les 4 zones observées. K, a et c sont indépendante pour chaque zone.

5.3.2 Cinétique de relargage de K14P dans des liposomes extrudés contenant 0 % de cholestérol

Un des paramètres facilement modifiables dans la préparation des liposomes est la quantité de chaque lipide. Ici la cinétique de relargage de K14P encapsulé dans des liposomes extrudés ne contenant pas de cholestérol a été étudié. Le Chapitre 2 des résultats a montré que la quantité de cholestérol avait un impact sur la coopérativité des T_m et sur la fluidité de la bicouche. La présence de cholestérol réduisait la coopérativité des T_m. Il est donc probable qu'il impacte la cinétique de relargage du peptide.

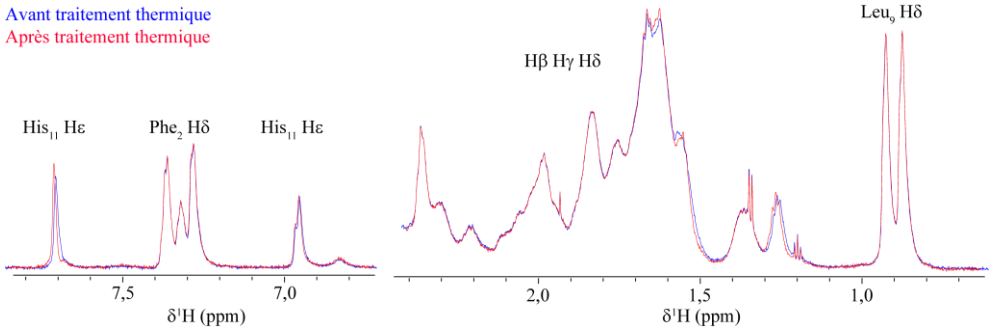


Figure 150 : Extraits de spectres RMN ^{1}H de K14Pencapsulés dans des liposomes extrudés au début (spectre bleu) et après 21 h de traitement thermique (rouge) à 35 °C. [K14P] = 1,4 mM, [liposome] = 30 mg.mL^{-1}, HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4, 5 °C, ^{1}H 800 MHz. E-Ø-C0-J1-Tamb.

Un spectre de référence de l'échantillon est enregistré à 5 °C avant d'observer l'effet d'un traitement thermique à 35 °C. La Figure 150 montre que les signaux du peptide ne changent pas après 21 h de traitement thermique, laissant supposer qu'il n'y a pas de relargage à 35 °C au bout de 21 h. La

température du traitement thermique a donc été augmentée à 40 °C, la T_m principale de cette formulation étant 41 °C (présenté CHAP1). Les signaux du peptide, autour de 0,9 ppm et des protons aromatiques, baissent en intensité et de nouveaux signaux apparaissent. Comme montré précédemment, les nouveaux signaux correspondent au peptide relargué et les signaux dont l'intensité diminue correspondent au peptide encapsulé. Il est possible d'estimer la quantité de peptide relargué à 30 %, sur les spectres collectés à 5 °C après avoir laissé le système 91 h à 40 °C (Figure 151). Comme pour les autres liposomes extrudés, aucun dépôt n'est observé au fond du tube : l'hypothèse d'une agrégation des liposomes est donc exclue.

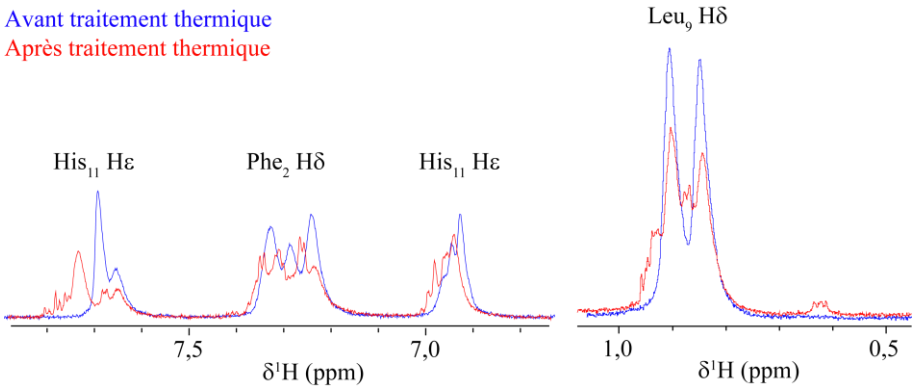


Figure 151 : Extraits de spectres de K14P encapsulé dans des liposomes extrudés avant les traitements thermiques à 35 et 40 °C (bleu) et après (rouge). [K14P] = 1,4 mM, [liposome] = 30 mg.mL^{-1}, 80 mM HEPES 100 mM NaCl pH 7,4, 5 °C, ^{1}H 800 MHz. E-Ø-C0-J1-Tamb.

La cinétique semble encore légèrement plus lente que pour les liposomes extrudés contenant du cholestérol et chargés de K14P (pour rappel 30 % de relargage en 12 h et 50 % en 120 h à 40 °C). Pourtant la T_m de liposomes extrudés contenant du cholestérol est de 42 °C et celle ne contenant pas de cholestérol de 41 °C. La température du traitement thermique, 40 °C, est plus proche de la T_m des liposomes ne contenant pas de cholestérol, laissant penser que la cinétique de relargage aurait plus être plus rapide avec ces liposomes. Mais comme expliqué précédemment, la coopérativité de T_m est plus importante dans le cas des liposomes ne contenant pas de cholestérol. Il est possible d'estimer la quantité de lipides en phase gel et fluide à partir des courbes tracées dans le Chapitre 1 pour déterminer les T_m des liposomes. En considérant que 100 % de lipides est sous forme gel à basse température, quand l'intensité des signaux des protons de la tête polaire des phospholipides est nulle, et que 100 % de lipides est sous formes fluide à haute température quand la courbe atteint un plateau. Ainsi, à la T_m, 50 % des bicouches sont en phase fluide et 50 % en phase gel. Ainsi à 40 °C, les liposomes extrudés contenant du cholestérol contiennent 45 % de leurs lipides en phase fluide alors que les liposomes sans cholestérol n'en contiennent que 25 %. Les liposomes sans cholestérol présentent donc moins de discontinuités dans leurs bicouches à 40 °C que les liposomes contenant du cholestérol. De plus la diminution de cholestérol dans la formulation des liposomes permet d'augmenter la coopérativité des transitions de phases des liposomes. La gamme de température où la bicouche présente le plus de discontinuité (*i.e.* 50 % de phase

fluide et gel) devient alors petite, de l'ordre de 0,5 °C. Ainsi, le fait que la membrane ne soit pas à 50 % de phase fluide et gel pourrait être en lien avec la cinétique de relargage plus lente pour les liposomes sans cholestérol à 40°C par rapport aux liposomes extrudés contenant du cholestérol.

En conclusion, cette expérience permet de confirmer que l'augmentation de la fluidité de la bicouche des liposomes permet d'observer le relargage de peptide. Ainsi diminuer la quantité de cholestérol dans la formulation des liposomes permet d'augmenter la limite basse de température permettant d'observer le relargage. Ceci peut avoir deux effets : d'abord diminuer le risque de fuite pendant le temps de conservation des échantillons et permettre de relarguer le PA encapsulé à une température plus précise, permettant peut-être de mieux cibler la zone où le PA doit agir.

5.4. Etude de la cinétique de relargage de C16-K14P dans des liposomes extrudés

5.4.1 RMN 1D ^{1}H

L'objectif de cette partie est de déterminer si les liposomes extrudés permettent à C16-K14P d'être relargué et ainsi de déterminer si le mode de préparation des échantillons a un impact sur la cinétique de relargage de peptides lipidés.

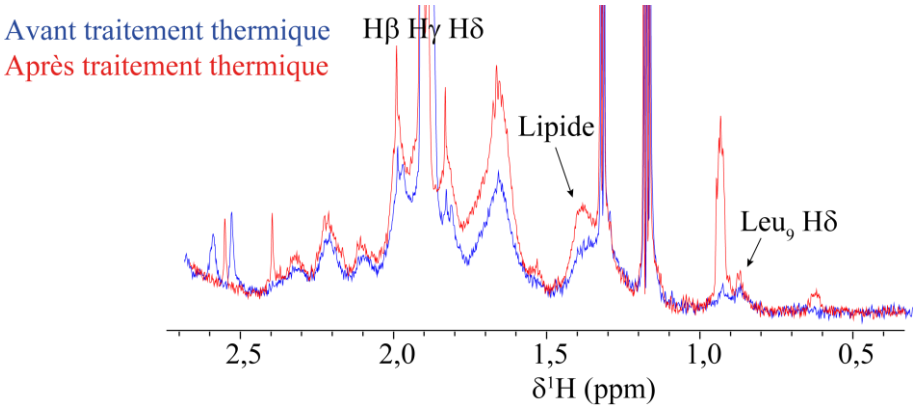


Figure 152 : Extraits des spectres RMN ^{1}H d'une solution de C16-K14P encapsulé avant et après un traitement thermique à 40 °C pendant 56 h. [C16-K14P] = 4,5 mM, [liposome] = 60 mg.mL^{-1}, 80 mM HEPES 100 mM NaCl pH 7,4, 5 °C, ^{1}H 800 MHz. E-CHOL12-C16-J1-T5.

Un premier échantillon de C16-K14P (E-CHOL12-C16-J1-T5) a été préparé par extrusion, conservé à température 5 °C puis chauffé à 35 °C pendant 3 semaines dans une étuve et n'a montré aucune variation d'intensité ou de déplacement chimique des signaux du peptide sur les spectres RMN 1D ^{1}H. A cette température, il est possible d'estimer la quantité de lipide de la bicouche en phase fluide à 5 % grâce aux graphiques de T_m des liposomes du Chapitre 1. Il n'y a donc pas suffisamment de discontinuité dans la bicouche des liposomes ou bien les liposomes ne sont pas suffisamment fluides pour permettre au peptide de traverser la membrane.

Un deuxième échantillon de C16-K14P a été préparé selon le même protocole puis chauffé pendant 56 h à 40 °C. Des spectres RMN 1D ^{1}H ont été enregistrés avant et après un traitement thermique à basse température, ainsi que pendant le traitement thermique à 40 °C. L'analyse de cette cinétique de relargage est présentée ci-dessous.

L'observation des spectres RMN 1D ^{1}H montre que les signaux correspondant à C16-K14P encapsulé sont beaucoup moins intenses (d'un facteur 4 à 5) dans le cas de liposomes extrudés que soniqués, alors que les rendements d'encapsulations sont identiques (100 %) pour les deux modes de préparation. Les liposomes extrudés sont composés de vésicules multi-lamellaires, contrairement aux liposomes soniqués qui sont uni-lamellaires. Il est donc possible que les peptides ancrés dans les liposomes extrudés entre deux bicouches d'un MLV donnent un signal plus large non détectable par RMN. Ou alors que l'extrusion facilite l'insertion des C16-K14P dans la membrane des liposomes, les signaux RMN visibles venant alors des peptides non insérés et sous forme de monomères ou de micelles dans la lumière des liposomes.

Les signaux du peptide sont présents sur le spectre RMN avant le traitement thermique (Figure 152). Après le traitement thermique, une augmentation de l'intensité des signaux du peptide de 60 % est visible pouvant correspondre à du peptide qui se détache de la membrane des liposomes, sous la forme de micelles car la concentration de peptide est supérieure à la CMC. Mais il est difficile de relier cette augmentation à une quantité de peptide relargué car il n'y a pas de variation des déplacements chimiques entre les signaux du peptide libre et encapsulé permettant de les différencier.

Un massif intense apparaît à 0,9 ppm. Ce signal pourrait correspondre aux signaux des CH_3 en bout de chaîne des phospholipides bien que le déplacement chimique de ce signal lorsque le peptide est libre est de 0,8 ppm. Il n'apparaît pas sur les spectres à 5° C après traitement thermique des liposomes extrudés vides, ni dans le cas de la cinétique de relargage de C16-K14P avec des liposomes soniqués. Il semblerait donc que ce signal soit lié à la présence des peptides et au mode de préparation des liposomes. Ce signal a pu être observé sur plusieurs échantillons et est donc reproductible. Il est relativement fin suggérant qu'il n'est pas lié au liposome. Sur le spectre TOCSY, le signal à 0,9 ppm corrèle avec un signal à 1,4 ppm. D'après l'attribution des signaux des phospholipides réalisée dans le Chapitre 2, ce signal pourrait appartenir aux chaînes carbonées des phospholipides. Cependant le signal de lipide à 1,2 ppm observé dans le cas des liposomes soniqués, n'est pas présent sur les spectres de liposomes extrudés. De plus ce signal ne montrait pas de couplage sur le spectre ^{1}H-^{1}H TOCSY contrairement au signal à 0,9 ppm présent sur les spectres de liposomes extrudés. Il y a donc peu de chance que ces signaux représentent les mêmes lipides.

L'acquisition des spectres RMN 1D ^{1}H pendant le traitement thermique à 40 °C montre que l'intensité des signaux du peptide augmente avec la température. Ainsi à haute température les peptides gagnent en fluidité et l'intensité de leurs signaux RMN augmente. Si le peptide est ancré dans la bicouche des liposomes, il est probable qu'à haute température, quand la bicouche se fluidifie, les interactions peptide

- liposome diminuent permettant au peptide de se décoller de la surface des liposomes et gagner en mobilité. Ces spectres protons à haute température permettent aussi de déterminer le temps nécessaire pour que le signal à 0,9 ppm apparaisse. Ainsi il faut 2 h au signal pour commencer à apparaître, puis il augmente en intensité au cours de la cinétique. Pour rappel le signal à 1,2 ppm observé sur les spectres de peptides encapsulés dans des liposomes soniqués après un traitement thermique apparaît dès le début de la cinétique, confirmant que ces deux signaux ne peuvent pas être relié au même phénomène.

La Figure 153 montre un signal dédoublé correspondant à dû sel d'acétate, contre ion du peptide. Son signal est relativement intense par rapport à d'autres spectres de K14P encapsulé, car contrairement aux liposomes chargés de K14P, les liposomes extrudés n'ont pas d'étape de centrifugation pour laver le tampon extérieur aux liposomes car le rendement d'encapsulation de C16-K14P est de 100 %. Ce contre ion est présent dans tous les lots de peptides. Il n'est pas censé perturber le processus. Les proportions des deux signaux évoluent avant et après le traitement thermique. Le signal à 1,89 ppm pourrait correspondre à l'acétate encapsulé et le signal à 1,91 ppm (*) à l'acétate à l'extérieur des liposomes. Il est intéressant de noter que l'acétate se trouve déjà à l'extérieur des liposomes avant le début du traitement thermique. Comme le DSS, cette petite molécule doit sûrement fuir à travers la membrane des liposomes même pendant le stockage des échantillons.

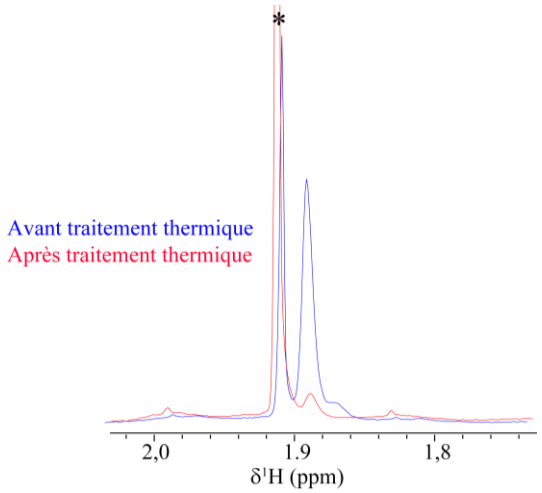


Figure 153 : Zoom du spectre RMN ^{1}H de la Figure 152. Signaux d'acétate d'une solution de C16-K14P encapsulé avant (bleu) et après (rouge) un traitement thermique à 40 °C pendant 56 h. [C16-K14P] = 4,5mM, [liposome] = 60 mg. mL^{-1}, HEPES 80 mM NaCl 100mM pH 7,4, 5 °C. ^{1}H 800 MHz. E-CHOL12-C16-J1-Tamb.

Ce dédoublement de signaux n'était pas présent dans toutes les préparations d'échantillons de C16-K14P encapsulé. La particularité de cet échantillon est qu'il n'a pas subi de cycles dilution-centrifugation car il avait déjà été mis en évidence que le taux d'encapsulation était de 100%. Ainsi les ions acétate sont éliminés au moment de ces cycles, ce qui confirme qu'ils fuient à travers la membrane même à basse température.

Pour conclure, la cinétique de relargage de C16-K14P dans des liposomes extrudés est très différente des liposomes soniqués. Tout d'abord, une augmentation de l'intensité des signaux du peptide est

observée en comparant les spectres avant et après un traitement thermique. La quantité de C16-K14P ancré dans la membrane ne semble pas augmenter après le traitement thermique contrairement aux cinétiques réalisées avec des liposomes soniqués. De plus aucun signal pouvant correspondre à du peptide relargué n'est observé *i.e.* avec déplacement chimique légèrement décalé par rapport aux peptides encapsulés. Il semble qu'un signal de lipide est présent sur le spectre après traitement thermique à 0,9 ppm. Ce déplacement chimique est différent de celui observé pour les lipides observés après traitement thermique dans le cas des liposomes soniqués. Ce signal avait été attribué à des lipides extraits des liposomes lors du traitement thermique. Il est possible qu'un mécanisme similaire ait lieu avec les liposomes extrudés. Cependant, les formes des signaux à 0,9 (multiplet) et 1,2 ppm (singulet) est trop différentes pour qu'elles correspondent aux mêmes lipides. Il est possible que les peptides n'extraient pas les mêmes lipides en fonction du mode de préparation des liposomes ou encore que les méthodes de préparation des liposomes n'aient pas le même impact sur les lipides. Ainsi la sonication pourrait par exemple casser des chaînes lipidiques créant de nouveaux lipides dans la formulation des liposomes.

5.4.2 DOSY

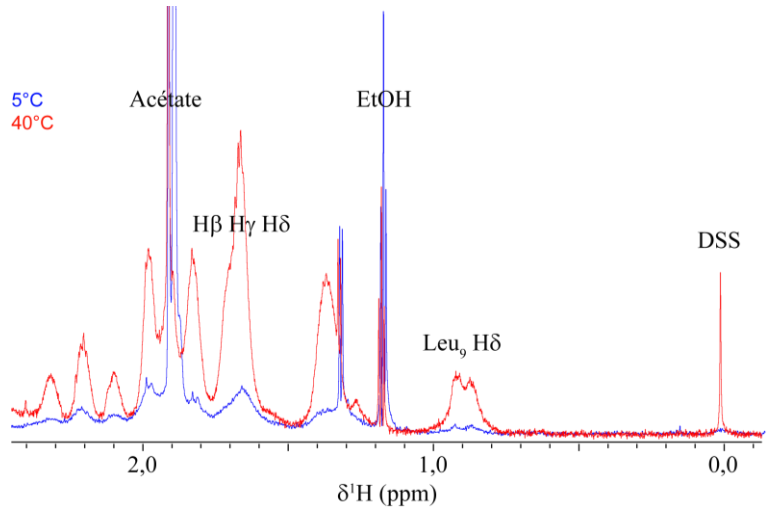


Figure 154 : Extraits de spectres RMN ^{1}H de C16-K14P encapsulé dans des liposomes extrudés à différentes températures. [C16-K14P] = 4,5 mM, [liposome] = 60 mg.mL^{-1}, HEPES 80 mM NaCl 100 mM pH 7,4, ^{1}H 800 MHz. E-CHOL12-C16-J1-Tamb.

Des acquisitions DOSY ont été enregistrées, avec un NS de 256 sur l'échantillon de C16-K14P encapsulés dans des liposomes extrudés avant et après le traitement thermique. Cependant les signaux du peptide sont très peu visibles sur les spectres 1D DOSY à 5 °C. Lorsque le peptide est ancré dans la bicouche des liposomes, son temps de corrélation devient aussi lent que celui du liposome, donc il donne des signaux peu intenses et larges qui n'apparaissent pas sur les spectres. De plus les différents délais utilisés dans la séquence d'impulsion DOSY font que les signaux ont relaxé avant le début de l'acquisition. Il n'est donc pas possible de mesurer de coefficient de diffusion du peptide.

À 40 °C, les signaux du peptide (Figure 154) sont présents sur les acquisitions DOSY. L'augmentation de la température réduit le temps de corrélation des molécules, permettant d'affiner et d'augmenter l'intensité des raies. Il est également possible qu'à température plus élevée, le peptide acquiert des degrés de liberté supplémentaires, la chaîne peptidique se décolle de la bicouche et donne ces signaux sur les spectres. Lors du traitement thermique le premier spectre DOSY n'est acquis qu'au bout de 2 h 30, ce temps étant alloué à des spectres protons, rapides, permettant de suivre l'évolution des spectres au début de la cinétique. Il est possible d'extraire deux coefficients de diffusion de ces spectres DOSY sur les signaux correspondant aux peptides : un coefficient de 7,1 ± 6,8 10^{-11} $m^2.s^{-1}$, correspondant au coefficient de diffusion des liposomes, et donc des peptides encapsulés, et un coefficient de 1,4 ± 0,3 10^{-9} $m^2.s^{-1}$ (les zones contenant les signaux d'acétate, l'HEPES ou l'EtOH ont été exclues des calculs), pouvant correspondre au coefficient de diffusion des peptides libres. Précédemment cette valeur était de l'ordre de 10^{-10} $m^2.s^{-1}$ pour les analyses à 5 °C, alors que la température d'analyse est ici de 40 °C. Une modification de la viscosité de l'échantillon due à la température peut expliquer des coefficients de diffusion plus rapides. Il est possible d'estimer la quantité de peptide avec le coefficient de diffusion lent par rapport à ceux possédant un coefficient de diffusion rapide. Ainsi sur la première acquisition DOSY réalisée à 40 °C, il y a environ 53 ± 8 % de peptide avec un coefficient de diffusion lent. La dernière acquisition réalisée à 40 °C, 50 h après la première acquisition, donne 50 ± 9 % de peptide avec un coefficient de diffusion lent. Les deux valeurs ne montrent pas de différence significative, laissant penser que l'échantillon n'évolue pas au cours du traitement thermique et que s'il y a du relargage celui-ci arrive au moment du choc thermique.

Cependant les expériences avec les liposomes soniqués avaient mis en évidence qu'il n'y avait pas de relargage de C16-K14P à 35 °C pendant plus de 100 h. La raison pour laquelle il pourrait y avoir du relargage dans le cas des liposomes extrudés mais pas soniqués n'est pas comprise.

5.5. Conclusion

Ce chapitre met en évidence les différences de cinétiques des liposomes en fonction de leurs modes de préparation. En effet la préparation des liposomes par extrusion permet de former des vésicules bi-lamellaires qui ralentissent le relargage. Les liposomes extrudés ont une polydispersité en taille plus étroite que les liposomes soniqués. Il est possible que la sonication favorise la formation de lysolipides, en cassant les liaisons esters des phospholipides, qui agiraient comme un détergent dans l'échantillon et accéléreraient le relargage du chargement des liposomes soniqués en participant à la rupture des membranes des liposomes.

L'utilisation de cholestérol dans une formulation de liposomes semble diminuer la température minimum nécessaire pour observer le relargage. Ceci peut s'avérer utile, car la température sous-cutanée de l'homme peut varier en fonction de sa corpulence, de la zone du corps observée et s'il a de la fièvre (Bierman, 1936). Cependant cela augmente aussi le risque d'avoir des fuites de PA pendant le stockage.

Du côté des peptides, l'utilisation d'une chaîne lipidique permet d'augmenter considérablement le taux d'encapsulation des peptides. Le taux d'encapsulation est de 100 % contrairement aux peptides non lipidés dont le taux d'encapsulation se trouve entre 30 et 50 % en fonction du mode de préparation. Un taux d'encapsulation de 100 % permet de contrôler plus facilement la quantité de peptide encapsulé et permet de supprimer les étapes de lavage de la phase externe des liposomes. De plus le relargage des peptides semble extrêmement ralenti, voire nul à une température de 40 °C et sur une échelle de temps de 2 jours. Les peptides sont réellement disponibles quand les liposomes sont dégradés.

Chapitre 6 : Conclusion générale et perspectives

6.1. Structure des peptides

Ce projet a dans un premier temps servi à étudier la structure de plusieurs peptides (K14P, C16-K14P, C11-K14P et C11F-K14P). En accord avec l'étude de Rainey et al. (Partie I - Chapitre 2) (Langelaan *et al.*, 2009; Shin, Chapman, *et al.*, 2017), les résultats obtenus par RMN ont montré que ces peptides ne sont pas structurés. Les résidus de proline présents dans la séquence de K14P aux positions 7 et 14 existent sous forme de 2 conformations (cis/trans). Les résultats RMN obtenus ont montré un ratio cis/trans de 25/75 pour Pro_{14}. Ainsi les résultats sont similaires alors qu'il y a de nombreuses différences entre les deux études : le motif MFP en C-terminal est présent sur tous les peptides de l'équipe de Rainey alors qu'il n'est pas présent sur K14P. Les tampons utilisés ne sont pas identiques dans ces deux études : ce travail a été réalisé avec un tampon HEPES à pH 7,4 alors que l'équipe de Rainey a réalisé ses expériences dans un tampon phosphate 20 mM à pH 5 (1 mM NaN_3, 1 mM DSS comme standard interne). Ceci montre que les configurations cis/trans du peptide semblent être peu affectées par le motif MFP en C-terminal de certains peptides ainsi que par le tampon ou le pH. Ces résultats montrent qu'il y a peu de différences entre les déplacements chimiques des peptides possédant des chaînes lipidiques différentes. Les variations les plus importantes sont observées pour Lys_1, l'acide aminé auquel sont

greffées les chaînes lipidiques. L'ajout d'une chaîne lipidique change l'environnement chimique de la Lys_1 et explique les variations de déplacements chimiques. En revanche, l'ajout de la chaîne ne modifie pas la structure du reste du peptide. La dernière information importante de cette étude structurale est la détermination de la CMC de ces peptides. Il semble que plus la chaîne lipidique des peptides est longue, plus la CMC est basse. De plus si les protons de la chaîne lipidique sont remplacés par des atomes de fluor, cette concentration limite est abaissée par rapport à la chaîne protonée de taille équivalente, en accord avec une plus grande hydrophobicité des atomes de fluor versus les atomes d'hydrogène.

Il est possible qu'utiliser des peptides déstructurés soit un avantage par rapport aux peptides structurés dans des formulations de liposomes, le peptide déstructuré aura un squelette flexible qui traversera peut-être plus facilement la bicouche des liposomes par rapport à un peptide structuré dont le squelette permettra moins de déformation et pourrait empêcher ou ralentir le relargage. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait tester un peptide structuré du même nombre d'acide aminé que K14P, avec le même nombre de charge en utilisant la même formulation de liposomes (DPPC/DMPG/CHOL). Ensuite, l'analyse des interactions entre les liposomes et C16-K14P, à concentration inférieure et supérieure à sa CMC, semblait montrer que les interactions peptide - liposome étaient favorisées par rapport à la formation de micelles. Ceci pourrait laisser penser que travailler au-dessus de la CMC n'a pas d'impact sur les interactions peptide - liposome et ne change donc pas le système. Cependant, au-dessus de la CMC, la formation de micelles est en compétition avec la formation d'interactions peptide-liposome. Leur formation pourrait entraîner une diminution du rendement d'encapsulation ou même ralentir la vitesse de relargage du peptide en limitant la quantité de peptide en contact avec la surface des liposomes.

6.2. Structure des liposomes

Parallèlement, la structure des liposomes a aussi pu être caractérisée. Plusieurs méthodes de préparation ont été étudiées : la sonication et l'extrusion. La première information à retenir est que le mode de préparation des échantillons a un impact sur la structure des liposomes en termes de taille, lamellarité, polydispersité. Ainsi les liposomes soniqués sont en moyenne plus petits que les liposomes extrudés. De plus les liposomes soniqués sont majoritairement uni-lamellaires contrairement aux liposomes extrudés qui sont hétérogènes en termes de lamellarité avec 40 % de bi-lamellaires. Ces observations ont pu être faites grâce aux mesures DLS, mais aussi aux images obtenues par cryo-TEM. Cependant ces données vont à l'encontre des données extraites de la littérature où Lapinski montre qu'il obtient des liposomes uni-lamellaires à partir de DOPC, quel que soit le mode de préparation (Lapinski *et al.*, 2007). Il a aussi été montré que la taille des liposomes dépendait énormément du type de phospholipides utilisés (Hope *et al.*, 1986). Il est donc probable que certains phospholipides favorisent la formation de MLV et d'autres de vésicules uni-lamellaires. Il avait déjà été montré que certains phospholipides influençaient la taille des liposomes. Par exemple Sriwongsitanont et Ueno ont montré qu'avec 0 mol% de DSPE-PEG2000

dans des liposomes composés majoritairement de EPC la taille des liposomes est de 200 nm, avec une préparation des liposomes par la méthode d'évaporation en phase inverse, alors qu'avec 40 mol% de DSPE-PEG200 les liposomes atteignent une taille de 50 nm (Sriwongsitanont and Ueno, 2004). La diminution de la taille des liposomes avec l'augmentation de la quantité de DSPE-PEG a aussi été observée lorsque les liposomes sont préparés par dispersion mécanique et lorsque les liposomes sont majoritairement composés de DMPC. L'encombrement stérique du PEG favoriserait la formation de petits liposomes. Ils montrent aussi que le rendement d'encapsulation augmente avec l'ajout de DSPE-PEG2000 avec un plateau à partir de 30 % de DSPE-PEG2000 dans la formulation. Ils expliquent ce résultat par l'ajout de phospholipides PEGylés, ce qui diminue le nombre de bicouches des liposomes par répulsions stériques, favorisant la présence de liposomes uni-lamellaires. Le plateau serait dû au fait qu'au-dessus d'une certaine concentration en phospholipides pégylés, ceux-ci tendent à former des micelles, ne permettant pas d'encapsuler la calcéine, hydrophile (Sriwongsitanont and Ueno, 2004). L'impact de la température sur les liposomes a pu être observé par RMN ^{1}H et ^{31}P. L'augmentation de l'intensité et l'affinement des signaux avec la température montrent que les molécules impliquées dans la bicouche des liposomes gagnent en mobilité, celle-ci passant d'un état gel à un état fluide.

Il a ensuite été possible de déterminer la T_m des liposomes par RMN ^{1}H et de mettre en avant que cette température dépende du mode de préparation des échantillons à composition de lipides identiques. Cette une méthode peut être très sensible et précise. Elle n'a été utilisée qu'une seule fois par l'équipe de Pentak (Pentak, 2014). Les liposomes soniqués ont des T_m plus basses que les liposomes extrudés. Les liposomes soniqués de ce projet avaient des T_m proches de 39 °C et de 25°C. Alors que les liposomes extrudés avaient des Tm au tour de 42 °C et de 51 °C. Sachant que la température sous cutanée est estimée à 35 °C, l'utilisation de la sonication pour diminuer la taille des liposomes semble être une méthode plus adéquate dans le cadre d'une administrations sous cutanée. Le risque de l'extrusion est de former des liposomes trop résistants à la température qui n'atteindraient pas leurs T_m et ne pourraient donc pas relarguer leurs chargements.

Les mesures de T_m ont aussi permis d'étudier l'impact du cholestérol sur les bicouches des liposomes. Ajouter du cholestérol à la formulation permet de diminuer la coopérativité des transitions permettant d'obtenir une gamme de température plus large où les bicouches se trouvent en phase gel et en phase liquide ordonnées. Ce résultat est en accord avec les données publiées dans la littérature montrant que le cholestérol augmente la fluidité de la bicouche de liposomes en dessous de la T_m et la diminue au-dessus (Coderch *et al.*, 2000) réduisant ainsi la coopérativité de la transition de phase. La zone de température où les lipides en phases fluide et gel se côtoient représente la zone où la bicouche des liposomes possède des irrégularités et a été définie comme la zone où les PA pouvaient relarguer des liposomes (Marsh, Watts and Knowles, 1976). D'après les images de microscopie électronique, il semblerait aussi que la présence de cholestérol permette de lisser la bicouche des liposomes et d'éviter la formation d'angle ou de cassure. L'utilisation de cholestérol dans les formulations de solution pour

des injections sous cutanées à l'avantage de s'affranchir des variations de températures entre les individus, en permettant le relargage de son contenu sur une gamme de température plus large.

6.3. Interactions peptide - liposome

Les interactions peptide - liposome ont aussi pu être étudiées. Les peptides de ce projet ont des interactions plus ou moins fortes avec les liposomes. Ils sont de charge globalement positive (+ 6) et de charge opposée à la charge des phospholipides avec une tête polaire chargée négativement comme le DMPG. Ils ont donc tendance à se coller sur la membrane des liposomes contenant ces phospholipides. Il a été montré que les interactions peptide – liposome sont majoritairement électrostatiques. Il est connu que ces interactions ont un impact sur le taux d'encapsulation des peptides (Weinstein and Leserman, 1984; Mayer *et al.*, 1986). Ainsi avec un tampon sans sel, autorisant plus d'interactions entre K14P et le liposome, le rendement d'encapsulation aurait peut-être été supérieur car le peptide se serait naturellement rapproché de la membrane des liposomes. En revanche la quantité de peptide collé à la surface extérieure des liposomes aurait été plus importante et ces peptides seraient certainement les premiers à se détacher et à être relargués, créant un « boost » au début de la cinétique de relargage. Si augmenter la quantité de charges opposées aux liposomes, permet d'augmenter le rendement d'encapsulation, il est aussi possible que cela diminue la vitesse de relargage du peptide. En effet en augmentant l'affinité peptide - liposome, la probabilité que le peptide se retrouve libre à l'extérieur des liposomes devrait aussi diminuer. Il serait donc intéressant d'observer l'effet de la charge sur le rendement d'encapsulation et la cinétique de relargage, à partir d'un peptide de taille fixée et une formulation de liposomes fixée. Ceci devrait permettre de définir une charge optimale, permettant d'augmenter le rendement d'encapsulation en concevant la cinétique de relargage adaptée à l'application du médicament. Cependant cette charge optimale sera difficilement applicable à d'autres systèmes. Les variations entre formulation de liposomes, même similaire, étant déjà très marquées.

Les peptides possédant une chaîne lipidique, quant à eux, s'ancrent dans la bicouche puis se structurent sur la surface des liposomes. Plusieurs peptides avec des chaînes lipidiques différentes ont été étudiés (C16, C11, C11F). L'étude montre une grande différence d'interaction peptide - liposome entre les peptides sans chaîne lipidique et avec chaîne lipidique. Les peptides avec une chaîne lipidique ont beaucoup plus d'affinités avec les liposomes que les peptides sans chaîne lipidique. En revanche, les interactions peptide - liposome dans le cas des peptides lipidiques sont relativement similaires, quelle que soit la chaîne lipidique greffée au peptide. La taille de la chaîne semble avoir peu d'impact sur les interactions peptide – liposome tout comme la substitution des atomes d'hydrogène par des atomes de fluor. En revanche la CMC de ces composés varie. Comme abordé ci-dessus, la CMC pourrait impacter le relargage des peptides en limitant la quantité de peptides pouvant entrer en contact avec la membrane des liposomes et être relargués. Il peut donc être intéressant de se servir des chaînes lipidiques pour faire varier la CMC des peptides et ainsi modifier leur cinétique de relargage. L'avantage d'utiliser une chaîne

fluorée est qu'elle permet d'utiliser la RMN du fluor 19 et ainsi d'observer des signaux caractéristiques du peptide sur une gamme de déplacements chimiques plus grande que la gamme de déplacement chimique du proton. De ce fait il y a moins de risque de superposition des signaux de la chaîne lipidique du peptide avec les signaux des acides aminés du peptide : la chaîne peut servir de sonde pour étudier le peptide. Ces différences d'interaction, entre peptides avec et sans chaîne lipidique expliquent les différences de rendement d'encapsulation. Les peptides contenant une chaîne lipidique vont s'accrocher aux phospholipides pendant la formation des membranes et être finalement presque encapsulés de façon « active » alors que les peptides sans chaîne lipidique vont pouvoir être encapsulés seulement parce qu'un certain volume de tampon, contenant du peptide, va se retrouver au centre des liposomes pendant leur formation. L'avantage des peptides avec une chaîne lipidique est de diminuer le nombre d'étapes de préparation. En effet, le taux d'encapsulation de 100 % fait qu'il n'est pas nécessaire de retirer les peptides non encapsulés, ce qui est un gain de temps en plus de limiter la perte de peptide, donc une réduction du coût de fabrication de ces médicaments. Pour les peptides sans chaîne lipidique, la méthode de préparation des liposomes a aussi un impact sur les rendements d'encapsulation. En effet, pour K14P, l'utilisation de l'extrusion permet d'encapsuler deux fois plus de peptide que la sonication. Pourtant la littérature (Chaize *et al.*, 2004) montre que les rendements d'encapsulation sont plus importants lorsque les liposomes sont uni-lamellaires par rapport aux multi-lamellaires, à quantité de lipides équivalente. Dans ce projet, cela peut s'expliquer par le fait que la sonication conduit à casser les membranes des liposomes de grande taille qui vont ensuite se réarranger pour former des liposomes de plus petite taille. Ceci laisse le temps aux peptides de sortir des liposomes. En revanche, pour l'extrusion, les liposomes de grande taille sont poussés à travers les pores d'une membrane manuellement ce qui donne le temps aux bicouches des liposomes de se réarranger lentement pour atteindre une taille leur permettant de traverser la membrane de l'extrudeur, entraînant ainsi moins de perte de peptides. La méthode couramment utilisée pour former les liposomes industriellement est la méthode d'homogénéisation à haute pression. Pour rappel, cette méthode consiste à envoyer un flux contenant des phospholipides et le PA contre une paroi sur laquelle les liposomes vont être projetés, se casser et ainsi réduire leur taille. Cette méthode semble plus proche de la sonication que de l'extrusion, suggérant que les rendements d'encapsulation risquent d'être plutôt faibles. D'où l'intérêt d'utiliser des liposomes avec une chaîne lipidique pour augmenter les interactions peptides membrane et les rendements d'encapsulation. Ce qui devrait être étudié plus en détail serait donc l'impact de la chaîne lipidique sur les interactions entre le peptide et son récepteur (APJ). Il se pose aussi la question du devenir du peptide lipidé dans un environnement biologique. Ce type de peptide a tendance à se coller facilement aux différents obstacles qui se trouvent sur son chemin, il pourrait donc ne jamais atteindre sa cible.

6.4. Différentiation des peptides libres et encapsulés dans les liposomes et cinétique de relargage

Avant de pouvoir suivre la cinétique de relargage du peptide il faut pouvoir différentier les molécules à l'intérieur et l'extérieur des liposomes. Les premiers spectres RMN ^{1}H ont rapidement mis en évidence que les peptides encapsulés et libres ont des déplacements chimiques légèrement différents permettant d'identifier leurs signaux dans les spectres. Des études avaient déjà mis en évidence des variations de déplacements chimiques entre une molécule encapsulée et libre avec ou sans l'ajout d'un complexe paramagnétique à l'extérieur des liposomes. L'équipe de Kantor a montré les variations de déplacements chimiques du chlorure de tétraméthylammonium encapsulé dans des vésicules d'un rayon de 30 nm contenant du DMPG et moins de 15 % d'acide myristique, en présence ou non de 20 mM de $K_3Fe(CN)_6$ (Prestegard and Kantor, 1978). L'ajout d'un complexe paramagnétique affectant les déplacements chimiques a aussi été testé, mais les résultats montrent que dans ce projet l'impact du complexe sur la relaxation des peptides est trop important réduisant considérablement l'intensité des signaux sur les spectres aux concentrations de l'agent nécessaire pour obtenir une variation de déplacement chimique.
Il est alors possible de suivre la cinétique de relargage des peptides avec les méthodes présentées ci-dessus. Les expériences de cinétiques de relargage permettent d'en apprendre plus sur les mécanismes impliqués dans le relargage des peptides. Les cinétiques observées étaient en deux étapes : une rapide, sûrement liée au choc thermique du passage de température ambiante à 35 – 40 °C, puis une étape lente correspondant à l'équilibration des peptides entre les différents compartiments ainsi qu'à la dégradation des liposomes. Il a aussi été montré que le relargage de K14P avait lieu à une température proche de la T_m des liposomes, quand la membrane augmente en fluidité. Des études avaient déjà mis en avant le fait que la perméabilité des membranes était due à la fluidité des bicouches (Shimanouchi *et al.*, 2009). La cinétique de relargage de K14P a été testée avec des liposomes soniqués et extrudés. Ainsi il a pu être mis en évidence que la préparation des échantillons a un impact sur la vitesse de relargage. Les liposomes soniqués (SUV) relarguent plus rapidement que les liposomes extrudés. Les liposomes soniqués sont en moyenne de taille inférieure aux liposomes extrudés et sont majoritairement uni-lamellaire contrairement aux liposomes extrudés qui comportent 40 % de bi lamellaire. Il semble donc que les liposomes de tailles plus petites uni-lamellaires permettent de relarguer leur cargo plus rapidement que les liposomes multi-lamellaires, où plusieurs couches doivent être traversées pour sortir des liposomes (Shimanouchi *et al.*, 2009). Augmenter le nombre de bicouches des liposomes permettrait donc potentiellement de ralentir le relargage des liposomes. Il est aussi possible que la sonication favorise la dégradation des liposomes. La sonication pourraient casser les liaisons ester des phospholipides et ainsi former des lysolipides ou des chaînes lipidiques isolées. Ces chaînes ne sont pas solubles dans le tampon aqueux et sédimenteraient dans l'échantillon. Cependant les lysolipides, composés d'une tête polaire et une chaîne carbonée, peuvent former des micelles. Ceux sont donc des

détergents. Ces détergents peuvent ensuite participer à la dégradation des liposomes. La méthode de préparation par extrusion ne semble pas pouvoir créer de lysolipides, ces échantillons ne devraient donc pas contenir de détergent. Les méthodes à l'échelle industrielle pour fabriquer les liposomes sont encore différentes par rapport aux méthodes utilisées en laboratoire. Ainsi il est probable que le relargage des peptides dans des liposomes préparés à l'échelle industrielle soit aussi différent. Il pourrait aussi être intéressant d'optimiser sur les méthodes de préparation et les structures des liposomes pour ajuster les vitesses de relargage des liposomes. Le type de PA a aussi une grande importance sur la cinétique de relargage. Les peptides contenant une chaîne lipidique semblent être relargués beaucoup plus lentement voire pas du tout sous l'effet d'un traitement thermique. Cela signifie que le peptide ne serait libéré qu'après dégradations des liposomes plutôt que par passage à travers la membrane. Cependant, la chaîne des lipides pourrait rester collée aux résidus de membranes de liposomes et ainsi ne jamais vraiment se relarguer ou être disponible pour interagir avec sa cible.

De plus il a été mis en évidence que la vitesse de relargage de molécules encapsulées dans les mêmes liposomes pouvait être très différentes, par exemple K14P, DSS et l'acétate. Il est difficile d'expliquer ces différences avec seulement ces trois molécules car elles ont des paramètres très différents : la charge et la taille entre autres. Ainsi plusieurs raisons peuvent expliquer les différences de cinétique de relargage. D'abord la taille des molécules, les molécules de faibles masses molaires pourraient peut-être traverser les membranes plus facilement car leur passage devrait moins perturber la membrane par rapport à une molécule de masse molaire supérieure. Ensuite la charge des molécules impacte les interactions avec les liposomes et donc a potentiellement un effet sur le relargage. Cette étude montre aussi que certaines molécules comme le DSS et peut être même le complexe paramagnétique, fuient même à température de conservation des liposomes. Ce qui poserait problème pour le stockage de la formulation.

6.5. Intérêt de la RMN pour étudier les associations peptide - liposome

Ce projet avait aussi pour but de déterminer l'intérêt de la RMN pour étudier les associations peptide - liposome. La RMN a permis d'étudier les objets séparément, de déterminer leurs structures puis d'étudier leurs associations. La structure des peptides a pu être déterminée par RMN 1D ^{1}H et même ^{19}F. La structure des liposomes peut être étudiée par RMN 1D ^{1}H et pour déterminer les T_m des liposomes. La RMN ^{31}P est aussi très utile pour obtenir des informations sur la bicouche de la membrane des liposomes et sur la taille des liposomes de manière indirecte. Cependant, dans ce projet les analyses ont été réalisées à l'aide d'une sonde RMN liquide. De meilleurs résultats, plus précis et plus rapides, auraient pu être obtenus en utilisant une sonde solide. La RMN a aussi montré qu'il était possible de suivre la cinétique de relargage de peptides encapsulés dans des liposomes par plusieurs méthodes. Les méthodes les plus simples à mettre en place étaient les spectres RMN 1D ^{1}H et DOSY. La RMN 1D ^{1}H a permis d'observer des variations entre les déplacements chimique du peptide libre et encapsulé. Les

acquisitions DOSY ont permis de mesurer la vitesse de diffusion des molécules présentes dans l'échantillon et il a été montré dans les chapitres précédents que le coefficient de diffusion des molécules à l'intérieur ou à l'extérieur des liposomes n'était pas le même. Au cours de la séquence RMN, pendant que les molécules diffusent, le peptide libre va pouvoir parcourir une distance beaucoup plus grande que le peptide encapsulé qui sera contraint par la diffusion du liposome lui-même. Une autre méthode testée consistait à utiliser à un complexe paramagnétique pour augmenter les variations de déplacements chimiques entre les peptides libres et encapsulés. Cependant le complexe paramagnétique utilisé n'était finalement pas adapté au système, à cause des interactions trop spécifiques entre le peptide et le complexe. La méthode pourrait peut-être mieux fonctionner si le PA était de masse moléculaire plus petite (< 500 Da). Une seconde proposition serait d'utiliser un complexe paramagnétique qui n'interagit ni avec les liposomes ni avec le PA, soit un complexe neutre. L'étude montre aussi qu'il est plus difficile d'étudier C16-K14P encapsulé, à une concentration supérieure à sa CMC, que K14P encapsulé. Deux raisons sont possibles : la formation des micelles qui change la relaxation du peptide ou bien la chaîne lipidique et ses interactions fortes avec le liposome. Finalement certaines publications affirment qu'il est possible que le champ magnétique des spectromètres affecte les liposomes et leurs cinétiques de relargage (Tenforde and Liburdy, 1988). Ceci remettrait en question l'intérêt d'utiliser la RMN pour cette application. D'autres publications affirment que le champ magnétique n'a pas d'impact sur les liposomes. Au cours de ce projet, aucune preuve permettant de trancher entre les deux affirmations n'a été trouvée.

6.6. Conclusion et perspectives

Pour conclure, ce projet a permis de mettre en évidence plusieurs paramètres qui influencent la cinétique de relargage des liposomes. Bien que les analyses aient été réalisées *in vitro*, il est probable que les phénomènes observés *in vitro* ont lieu aussi *in vivo*. Mais des composantes supplémentaires pourraient accélérer ou ralentir les cinétiques, par exemple les interactions avec des membranes biologiques ou des dégradations qui n'ont lieu qu'*in vivo*.

Tout d'abord il a été souligné que la méthode de préparation change la structure et la vitesse de relargage des peptides. Ainsi les liposomes préparés par sonication semblent plus adaptés à des applications où le but est de relarguer des PA rapidement. Pour obtenir un relargage plus lent il serait préférable d'utiliser des liposomes plus grands, multi-lamellaires préparés par extrusion par exemple. Pour échelonner encore plus le relargage, l'utilisation de peptides avec une chaîne lipidique semble adaptée. Le choix de la chaîne lipidique semble avoir peu d'importance car les interactions peptide - liposomes sont similaires quelle que soit la chaîne lipidique étudiée dans ce manuscrit. Cependant les chaînes étudiées avaient toutes un nombre d'atome de carbone égal ou inférieur aux chaînes du phopholipide principal du liposome (C16). Les résultats auraient pu être différents si une chaîne de taille supérieure à 16 atomes de carbone avait été étudiée mais les résultats présentés dans ce manuscrit laissent penser que C16-K14P

n'est pas relargué avec les liposomes (DPPC/DMPG/CHOL). Ensuite la taille et la charge des molécules semblent impacter les cinétiques de relargage, mais cette observation semble très dépendante du système et il paraît difficile d'obtenir des règles générales applicables dans toutes les situations.

Finalement l'utilisation de cholestérol permet d'élargir la gamme de température où les phases gel et liquide des liposomes se côtoient et ainsi d'élargir la zone de température où les PA peuvent sortir des liposomes. Ainsi les liposomes sans cholestérol sont certainement à privilégier pour les applications où température bien précise doit être atteinte. Pour des applications sous cutanées, où la température varie en fonction du patient, de son état, de la zone où le médicament est administré, l'utilisation de cholestérol semble recommandée pour pouvoir déclencher le relargage dans tous les cas.

Les prochaines étapes de ce projet pourraient être d'étudier de nouvelles formulations de liposomes pour déterminer l'impact de proportions différentes de lipides ou bien des lipides différents sur la cinétiques de relargage de molécules. L'étude de peptides plus longs que K14P, sans chaîne lipidique, permettrait de vérifier que la vitesse de relargage est plus lente qu'avec K14P. Faire varier la charge des PA utilisés pourrait aussi permettre de définir une charge optimale pour optimiser le rendement d'encapsulation et le relargage. Après cette étape il faudrait aussi vérifier si les variations de déplacements chimiques sont toujours visibles entre les PA encapsulés et libres quelle que soit leur taille. En effet, l'origine de ces différences de déplacements chimiques n'a pas été complétement comprise. La compréhension de ce phénomène permettrait de mieux interpréter la formation des liposomes ou leurs interactions avec les peptides. Finalement d'autres composés pourraient être ajoutés dans les échantillons pour rendre l'échantillon plus proche du milieu *in vivo* tels que de l'albumine de sérum bovin (BSA) ou encore des adjuvants ou des stabilisateurs typiquement présents dans les formulations de médicaments.

Annexe I. Attribution des spectres RMN 1D ^{1}H des phospholipides dans du chloroforme

Spectres RMN 1D ^{1}H et attributions du cholestérol, DMPG et DCCP réalisés par Amandine Coffinet (Sanofi, Vitry) :

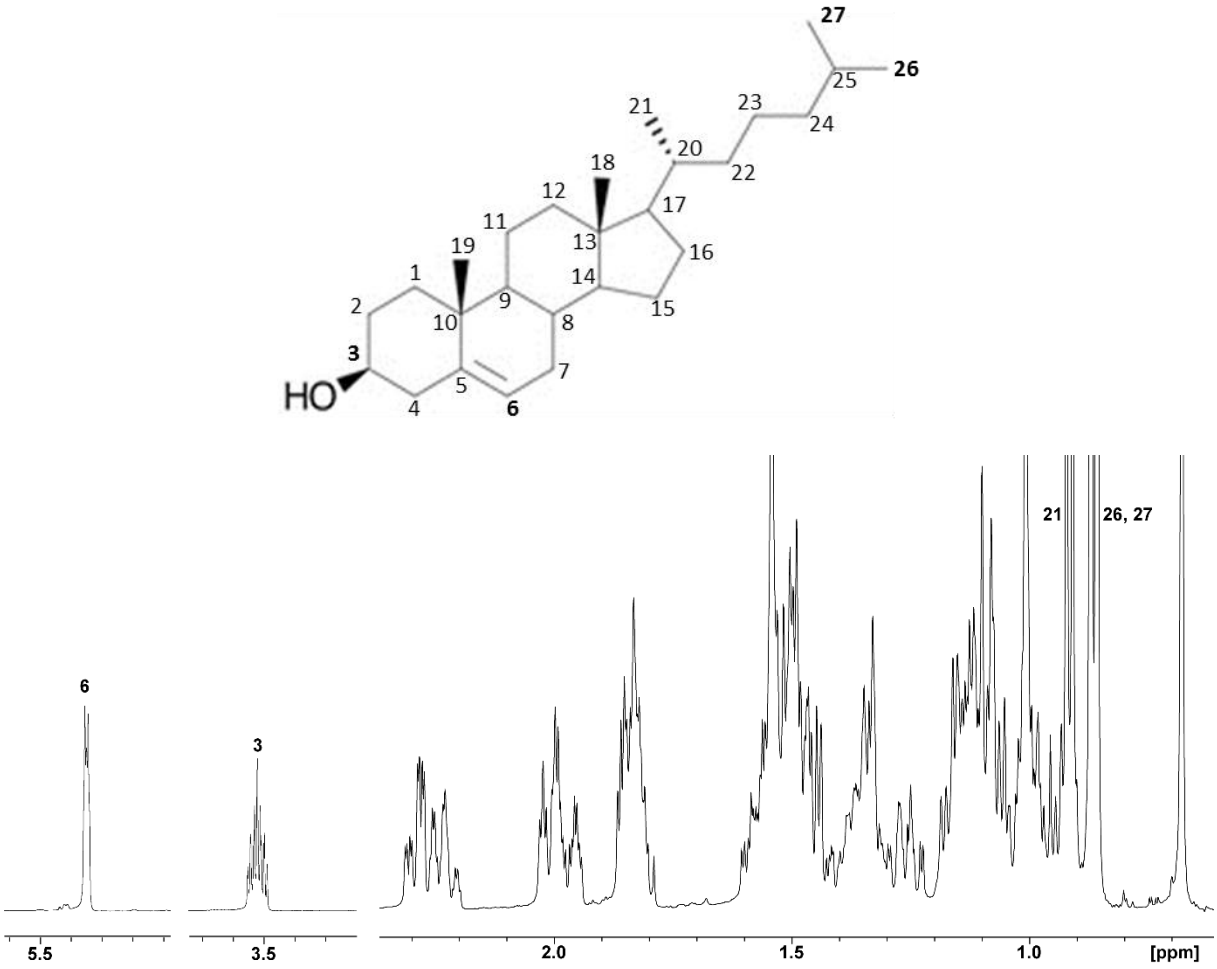


Figure 155 : Spectre ^{1}H du cholestérol dans $CDCl_3$.

Déplacements chimiques (ppm)	Multiplicité	Protons
0,68	singulet	18
0,86	doublet	26
0,87	doublet	27
0,92	doublet	21
0,93	multiplet	9
0,99	multiplet	14
1,00 et 1,34	multiplet	22
1,01	multiplet	19
1,08 et 1,58	multiplet	15
1,08 et 1,85	multiplet	1
1,09	multiplet	17
1,12	multiplet	24
1,15 et 1,34	multiplet	23

1,17 et 2,01	multiplet	12
1,26 et 1,83	multiplet	16
1,38	multiplet	20
1,46	multiplet	8
1,48	multiplet	11
1,50 et 1,84	multiplet	2
1,52	multiplet	25
1,55 et 1,97	multiplet	7
2,27	multiplet	4
3,52	multiplet	3
5,35	multiplet	6

Tableau 29 :Déplacements chimiques du cholestérol dans le chloroforme.

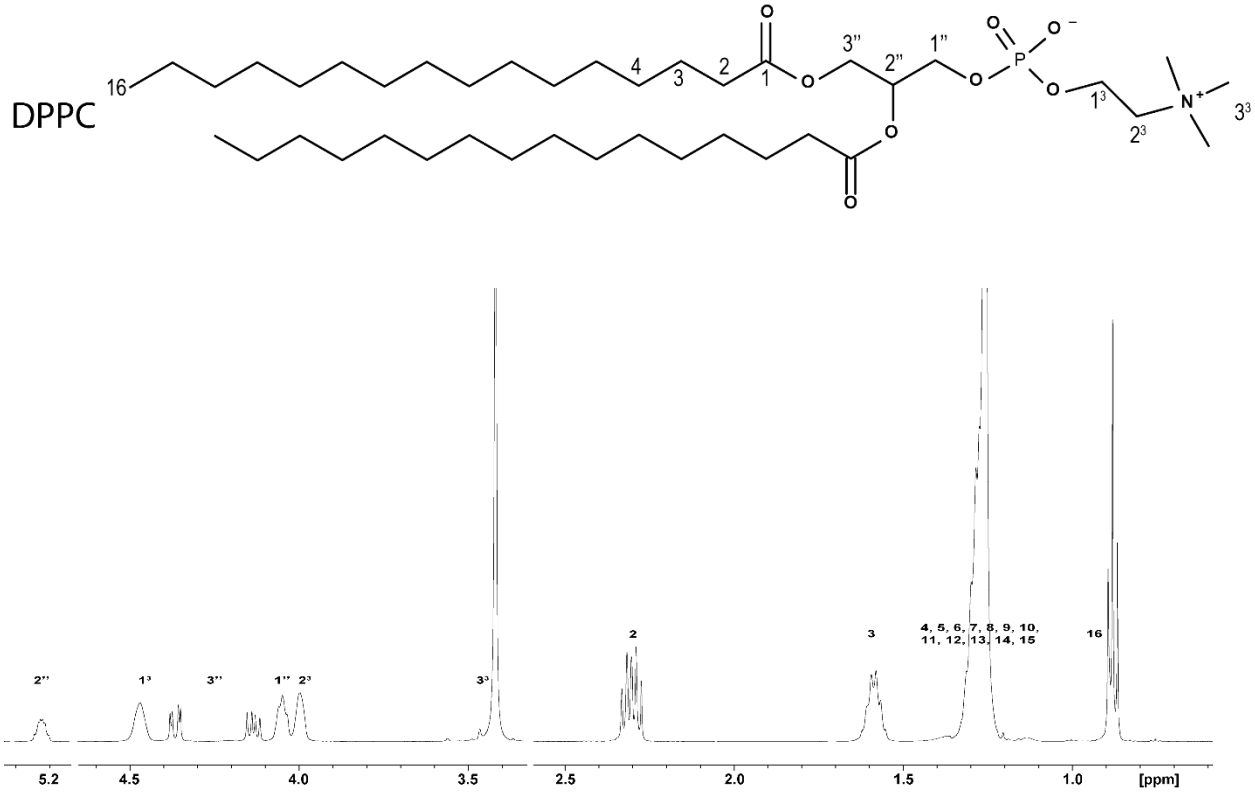


Figure 156 : Spectre RMN 1D ^{1}H du DPPC dans le chloroforme.

Déplacements chimiques (ppm)	**Multiplicité**	**Protons**
0,88	triplet	16
1,26	multiplet	4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14
1,29	multiplet	15
1,59	multiplet	3
2,30	multiplet	2
3,42	singulet	3^3
4,00	singulet	2^3
4,05	multiplet	1''
4,13 et 4,37	multiplet	3''
4,47	singulet	1^3
5,22	singulet	2''

Tableau 30 :Déplacements chimiques du DPPC dans le chloroforme.

DMPG

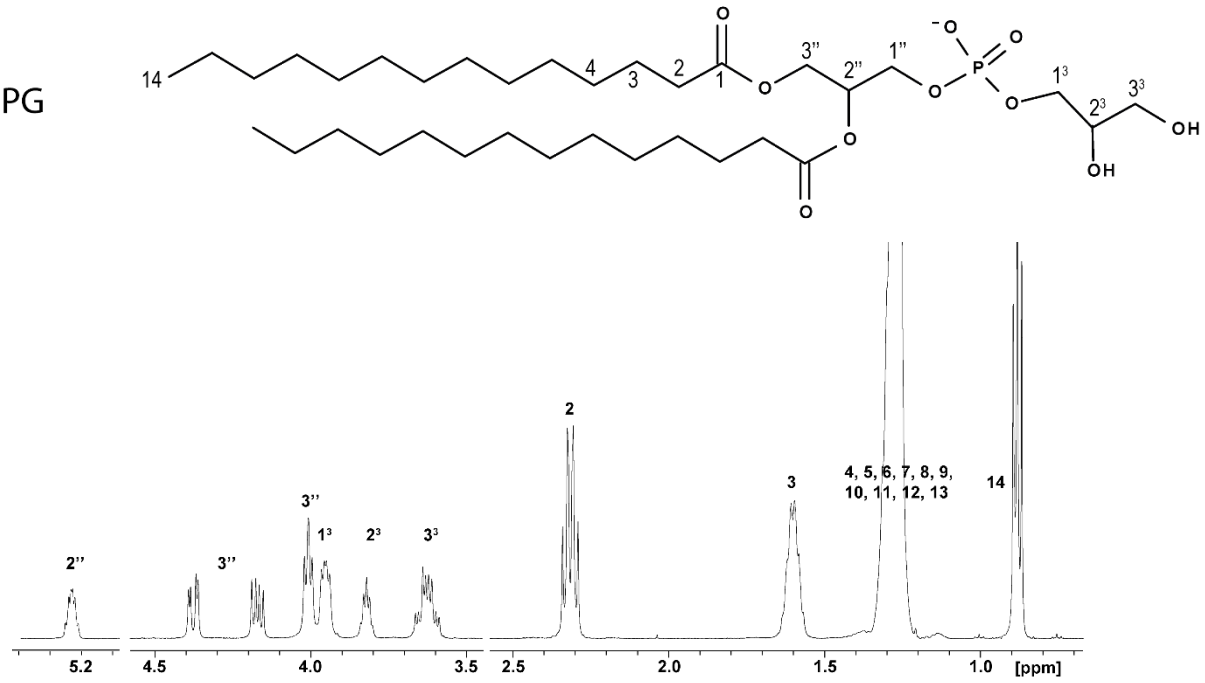


Figure 157 : Spectre RMN 1D ^{1}H du DMPG.

Déplacements chimiques (ppm)	**Multiplicité**	**Protons**
0,88	triplet	14
1,28	multiplet	4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13
1,60	multiplet	3
2,32	multiplet	2
3,63	multiplet	3^3
3,82	multiplet	2^3
3,95	multiplet	1^3
4,01	triplet	1''
4,38 et 4,17	doublet de doublet	3''
5,23	quintuplet	2''

Tableau 31 :Déplacements chimiques du DMPG dans le chloroforme.

Annexe II. Séquence DOSY modifiée

La séquence DOSY a été modifiée par Ewen Lescop, Christina Sizun et moi-même à partir d'une séquence écrite par Ludmila Guduff.

```
;CS_LGleddosy2d_esgp
;avance-version (07/04/03)
;2D sequence for diffusion measurement using stimulated echo and LED
;using bipolar gradient pulses for diffusion
;using 2 spoil gradients
;
;D. Wu, A. Chen & C.S. Johnson Jr., J. Magn. Reson. A 115, 260-264 (1995).
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

prosol relations=<triple>

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>


define list<gradient> diff=<Difframp>


"p2=p1*2"
"d12=20u"
"d30=30m"

"DELTA1=d20-p1*2-p2-p30*2-d16*2-p19-d16-p19-d16"
"DELTA2=d21-p19-d16"

"TAU=de+p1*2/3.1416"

"acqt0=-p1*2/3.1416"


1 ze
2 d1
3 d30
  4u BLKGRAD
  d1
  50u UNBLKGRAD

  p19:gp7*-1
  d16

  p1 ph1
```

```
  p30:gp6*diff
  d16
  p2 ph1
  p30:gp6*-1*diff
  d16
  p1 ph2
  p19:gp7
  d16
  DELTA1

  p19:gp8*-1
  d16

  p1 ph3
  p30:gp6*diff
  d16
  p2 ph1
  p30:gp6*-1*diff
  d16
  p1 ph4
  p19:gp8
  d16
  DELTA2
;  4u BLKGRAD
  p1 ph5
;fin dosy

;debut esgp
;  50u UNBLKGRAD
  p16:gp1
  d16 pl0:f1
  (p12:sp1 ph12:r):f1
  4u
  d12 pl1:f1

  p2 ph13

  4u
  p16:gp1
  d16
  TAU
  p16:gp2
  d16 pl0:f1
  (p12:sp1 ph14:r):f1
  4u
  d12 pl1:f1

  p2 ph15

  4u
  p16:gp2
  d16
```

```
;position de BLKGRAD ?

  go=3 ph31
  d1 mc #0 to 2 F1QF(igrad diff)
4u BLKGRAD
exit


ph1= 0
ph2= 0 0 0 0 0 0 0 0  2 2 2 2 2 2 2 2
ph3= 0 0 0 0 0 0 0 0  0 0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
ph4= 0 0 0 0 2 2 2 2  0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2 0 0 0 0 2 2 2 2 0 0 0 0
ph5= 0 0 0 0 0 0 0 0  0 0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2

ph12=0 1
ph13=2 3
ph14=0 0 1 1
ph15=2 2 3 3

ph31 = 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0 2 0 0 2 0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2


;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p1  : f1 channel -  90 degree high power pulse
;p2  : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p19: gradient pulse 2 (spoil gradient)
;p30: gradient pulse (little DELTA * 0.5)

;p12: f1 channel - 180 degree shaped pulse (Squa100.1000)   [2 msec]
;p16: homospoil/gradient pulse

;d1  : relaxation delay; 1-5 * T1
;d12: delay for power switching                  [20 usec]
;d16: delay for gradient recovery
;d20: diffusion time (big DELTA)
;d21: eddy current delay (Te)                    [5 ms]
;NS: 8 * n
;DS: 4 * m
;td1: number of experiments
;FnMODE: QF
;       use xf2 and DOSY processing

;use gradient ratio:    gp 6 : gp 7   : gp 8
;                    100  : -17.13 : -13.17

;for z-only gradients:
;gpz6: 100%
;gpz7: -17.13% (spoil)
;gpz8: -13.17% (spoil)

;for z-only gradients:
;gpz1: 31%
```

```
;gpz2: 11%

;; GRADIENTS FOR WATER SUPPRESSION
;use gradient ratio:    gp 1 : gp 2
;                       31 :   11

;use gradient files:
;gpnam6: SINE.100
;gpnam7: SINE.100
;gpnam8: SINE.100

;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100

;use AU-program dosy to calculate gradient ramp-file Difframp



;$Id: ledbpgp2s,v 1.6 2007/04/11 13:34:30 ber Exp $
```

Bibliographie

Abidin, R. S. (2016) *Murine polyomavirus vlp as a platform for cytotoxic t cell based influenza vaccine candidates*.

Accardo, A. and Morelli, G. (2015) 'Review peptide-targeted liposomes for selective drug delivery: Advantages and problematic issues', *Biopolymers*. doi: 10.1002/bip.22678.

Aime, S., Castelli, D. D. and Terreno, E. (2009) 'Lanthanide-Loaded Paramagnetic Liposomes as Switchable Magnetically Oriented Nanovesicles', *Methods in Enzymology*. doi: 10.1016/S0076-6879(09)64010-6.

Akbarzadeh, A. *et al.* (2013) 'Liposome: classification, preparation, and applications', *Nanoscale Research Letters*. doi: 10.1186/1556-276X-8-102.

Alpes, H. *et al.* (1986) 'Formation of large unilamellar vesicles using alkyl maltoside detergents', *BBA - Biomembranes*. doi: 10.1016/0005-2736(86)90231-2.

Amin, S., Rajabnezhad, S. and Kohli, K. (2009) 'Hydrogels as potential drug delivery systems', *Scientific Research and Essays*.

Arta, A. *et al.* (2018) 'Endothelial Protein C–Targeting Liposomes Show Enhanced Uptake and Improved Therapeutic Efficacy in Human Retinal Endothelial Cells', *Investigative Opthalmology & Visual Science*. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 59(5), p. 2119. doi: 10.1167/iovs.18-23800.

Arun, R., Ashok, K. C. K. and Sravanthi, V. V. N. S. S. (2008) 'Cyclodextrins as Drug Carrier Molecule: A Review', *Scientia Pharmaceutica 2008, Vol. 76, Pages 567-598*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 76(4), pp. 567–598. doi: 0.3797/scipharm.0808-05.

Bachmann, D., Brandl, M. and Gregoriadis, G. (1993) 'Preparation of liposomes using a Mini-Lab 8.30 H high-pressure homogenizer', *International Journal of Pharmaceutics*. doi: 10.1016/0378-5173(93)90422-C.

Bangham, A. D., De Gier, J. and Greville, G. D. (1967) 'Osmotic properties and water permeability of phospholipid liquid crystals', *Chemistry and Physics of Lipids*. doi: 10.1016/0009-3084(67)90030-8.

Barenholz, Y. *et al.* (1977) 'A Simple Method for the Preparation of Homogeneous Phospholipid Vesicles', *Biochemistry*. doi: 10.1021/bi00631a035.

Barnes, G. D. *et al.* (2013) 'Sustained cardiovascular actions of apj agonism during renin-angiotensin system activation and in patients with heart failure', *Circulation: Heart Failure*. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.111.000077.

Batzri, S. and Korn, E. D. (1973) 'Single bilayer liposomes prepared without sonication', *BBA - Biomembranes*. doi: 10.1016/0005-2736(73)90408-2.

Baxa, U. (2018) 'Imaging of liposomes by transmission electron microscopy', in *Methods in Molecular Biology*. doi: 10.1007/978-1-4939-7352-1_8.

Bhatnagar, R. S. and Gordon, J. I. (1997) 'Understanding covalent modifications of proteins by lipids: Where cell biology and biophysics mingle', *Trends in Cell Biology*. doi: 10.1016/S0962-8924(97)10044-7.

Bickel, U., Yoshikawa, T. and Pardridge, W. M. (2001) 'Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier', *Advanced Drug Delivery Reviews*. doi: 10.1016/S0169-409X(00)00139-3.

Bierman, W. (1936) 'The temperature of the skin surface', *Journal of the American Medical Association*. doi: 10.1001/jama.1936.02770140020007.

Bobo, D. *et al.* (2016) 'Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date', *Pharmaceutical Research*. doi: 10.1007/s11095-016-1958-5.

Boullerne, A. I. *et al.* (2014) 'Effects of peptide fraction and counter ion on the development of clinical signs in experimental autoimmune encephalomyelitis', *Journal of Neurochemistry*. doi: 10.1111/jnc.12664.

Brame, A. L. *et al.* (2015) 'Design, characterization, and first-in-human study of the vascular

actions of a novel biased apelin receptor agonist', *Hypertension*. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.05099.

Brodnitz, M. H. (1968) 'Autoxidation of Saturated Fatty Acids. A Review', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. doi: 10.1021/jf60160a001.

Brouillette, C. G. *et al.* (1982) 'Minimal Size Phosphatidylcholine Vesicles: Effects of Radius of Curvature on Head Group Packing and Conformation', *Biochemistry*. doi: 10.1021/bi00262a009.

Brumm, T. *et al.* (1992) 'Macroscopic orientation effects in broadline NMR-spectra of model membranes at high magnetic field strength: A method preventing such effects', *Biophysical Journal*. doi: 10.1016/S0006-3495(92)81909-4.

Bulbake, U. *et al.* (2017) 'Liposomal formulations in clinical use: An updated review', *Pharmaceutics*. doi: 10.3390/pharmaceutics9020012.

Cabeca, L. F. *et al.* (2009) 'Liposome-prilocaine interaction mapping evaluated through STD NMR and molecular dynamics simulations', *Journal of Physical Chemistry B*. doi: 10.1021/jp8069496.

Carpino, L. A. (1957) 'Oxidative Reactions of Hydrazines. IV. Elimination of Nitrogen from 1,1-Disubstituted-2-arenesulfonhydrazides', *Journal of the American Chemical Society*. doi: 10.1021/ja01573a050.

Cattel, L., Ceruti, M. and Dosio, F. (2003) 'From Conventional to Stealth Liposomes a new Frontier in Cancer Chemotherapy', *Tumori Journal*. SAGE PublicationsSage UK: London, England, 89(3), pp. 237–249. doi: 10.1177/030089160308900302.

Chaize, B. *et al.* (2004) 'Encapsulation of Enzymes in Liposomes: High Encapsulation Efficiency and Control of Substrate Permeability', in *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology*. doi: 10.1081/BIO-120028669.

Chandrasekaran, B., Dar, O. and McDonagh, T. (2008) 'The role of apelin in cardiovascular function and heart failure', *European Journal of Heart Failure*, 10(8), pp. 725–732. doi: 10.1016/j.ejheart.2008.06.002.

Chng, S. C. *et al.* (2013) 'ELABELA: A hormone essential for heart development signals via the apelin receptor', *Developmental Cell*. doi: 10.1016/j.devcel.2013.11.002.

Chonn, A. and Cullis, P. R. (1995) 'Recent advances in liposomal drug-delivery systems', *Current Opinion in Biotechnology*. doi: 10.1016/0958-1669(95)80115-4.

Chowhan, Z. ud din T., Yotsuyanagi, T. and Higuchi, W. I. (1972) 'Model transport studies utilizing lecithin spherules. I. Critical evaluations of several physical models in the determination of the permeability coefficient for glucose', *BBA - Biomembranes*. doi: 10.1016/0005-2736(72)90091-0.

Clark, R. J. *et al.* (2005) 'Engineering stable peptide toxins by means of backbone cyclization: Stabilization of the -conotoxin MII', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi: 10.1073/pnas.0504613102.

Coderch, L. *et al.* (2000) 'Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR. Relationship with percutaneous absorption', *Journal of Controlled Release*. doi: 10.1016/S0168-3659(00)00240-6.

Colletier, J. P. *et al.* (2002) 'Protein encapsulation in liposomes: Efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer', *BMC Biotechnology*. doi: 10.1186/1472-6750-2-9.

Cornish, J. *et al.* (1999) 'Trifluoroacetate, a contaminant in purified proteins, inhibits proliferation of osteoblasts and chondrocytes', *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. doi: 10.1152/ajpendo.1999.277.5.e779.

Da Costa, G. *et al.* (2007) 'NMR of molecules interacting with lipids in small unilamellar vesicles', *European Biophysics Journal*. doi: 10.1007/s00249-007-0186-7.

Craik, D. J. *et al.* (2013) 'The Future of Peptide-based Drugs', *Chemical Biology and Drug Design*. doi: 10.1111/cbdd.12055.

Cullis, P. R., De Kruyff, B. and Richards, R. E. (1976) 'Factors affecting the motion of the polar headgroup in phospholipid bilayers. A31P NMR study of unsonicated phosphatidylcholine liposomes', *BBA - Biomembranes*. doi: 10.1016/0005-2736(76)90388-6.

Curtius, T. (1882) 'Ueber einige neue der Hippursäure analog constituirte, synthetisch dargestellte Amidosäuren', *Journal für Praktische Chemie*. doi: 10.1002/prac.18820260112.

Curtius, T. (1904) 'Verkettung von Amidosäuren I. Abhandlung', *Journal für Praktische Chemie*. doi: 10.1002/prac.19040700103.

D 'orlyé, F. (2009) *Caractérisation physicochimique paelectropho ese capillaire de nanoparticules magnétiques, anioniques et cationiques : distribution de taille, densité de charge et coefficient de diffusion collectif*. Available at: https://pastel.archives-ouvertes.fr/pastel-00004679/document (Accessed: 13 February 2018).

Davies, J. S. (2003) 'The cyclization of peptides and depsipeptides', *Journal of Peptide Science*. doi: 10.1002/psc.491.

Davis, D. G. and Inesi, G. (1972) 'Phosphorus and proton nuclear magnetic resonance studies in sarcoplasmic reticulum membranes and lipids. A comparison of phosphate and proton group mobilities in membranes and lipid bilayers', *BBA - Biomembranes*. doi: 10.1016/0005-2736(72)90322-7.

Deamer, D. and Bangham, A. D. (1976) 'Large volume liposomes by an ether vaporization method', *BBA - Biomembranes*. doi: 10.1016/0005-2736(76)90483-1.

Demel, R. A., Bruckdorfer, K. R. and Van Deenen, L. L. M. (1972) 'The effect of sterol structure on the permeability of lipomes to glucose, glycerol and Rb+', *BBA - Biomembranes*. doi: 10.1016/0005-2736(72)90031-4.

Deveza, L. *et al.* (2015) 'Microfluidic Synthesis of Biodegradable Polyethylene-Glycol Microspheres for Controlled Delivery of Proteins and DNA Nanoparticles', *ACS Biomaterials Science and Engineering*. doi: 10.1021/ab500051v.

Dua, J. S., Rana, P. A. C. and Bhandari, D. A. K. (2012) 'Liposome : methods of preparation and applications', *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.

Dufourc, E. J., Smith, I. C. P. and Dufourcq, J. (1986) 'Molecular Details of Melittin-Induced Lysis of Phospholipid Membranes As Revealed by Deuterium and Phosphorus NMR', *Biochemistry*, 25(21), pp. 6448–6455. doi: 10.1021/bi00369a016.

Eeman, M. and Deleu, M. (2010) 'From biological membranes to biomimetic model membranes', *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*.

Enoch, H. G. and Strittmatter, P. (1979) 'Formation and properties of 1000-A-diameter, single-bilayer phospholipid vesicles.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1021/nn900419r.

European Medicines Agency (2012) *CHMP Safety Working Party's response to the PDCO regarding the use of PEGylated drug products in the paediatric population*. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/chmp-safety-working-partys-response-pdco-regarding-use-pegylated-drug-products-paediatric-population_en.pdf (Accessed: 19 September 2019).

Fan, X. *et al.* (2003) 'Structural and functional study of the apelin-13 peptide, an endogenous ligand of the HIV-1 coreceptor, APJ', *Biochemistry*. doi: 10.1021/bi030049s.

Fenske, D. B. and Cullis, P. R. (2005) 'Entrapment of small molecules and nucleic acid-based drugs in liposomes', *Methods in Enzymology*. doi: 10.1016/S0076-6879(05)91001-X.

Fischer, E. (1905) 'Synthese von Polypeptiden. IX. Chloride der Aminosäuren und ihrer Acylderivate', *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. doi: 10.1002/cber.190503801103.

Fischer, E. and Fourneau, E. (1901) 'Ueber einige Derivate des Glykocolls', *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. doi: 10.1002/cber.190103402249.

Foradada, M. *et al.* (2000) 'Chemical degradation of liposomes by serum components detected by NMR', *Chemistry and Physics of Lipids*. doi: 10.1016/S0009-3084(99)00118-8.

Fosgerau, K. and Hoffmann, T. (2015) 'Peptide therapeutics: Current status and future directions', *Drug Discovery Today*. doi: 10.1016/j.drudis.2014.10.003.

Fröhlich, M., Brecht, V. and Peschka-Süss, R. (2001) 'Parameters influencing the determination

of liposome lamellarity by 31P-NMR', *Chemistry and Physics of Lipids*. Elsevier, 109(1), pp. 103–112. doi: 10.1016/S0009-3084(00)00220-6.

Gabizon, A. *et al.* (1982) 'Liposomes as in Vivo Carriers of Adriamycin: Reduced Cardiac Uptake and Preserved Antitumor Activity in Mice1', *Cancer Research*, 42, pp. 4734–4739. Available at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/42/11/4734.full-text.pdf (Accessed: 9 May 2018).

Gabrielska, J. and Gruszecki, W. I. (1996) 'Zeaxanthin (dihydroxy-β-carotene) but not β-carotene rigidities lipid membranes: A 1H-NMR study of carotenoid-egg phosphatidylcholine liposomes', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. doi: 10.1016/S0005-2736(96)00152-6.

Gallová, J. *et al.* (2004) 'Effect of cholesterol on the bilayer thickness in unilamellar extruded DLPC and DOPC liposomes: SANS contrast variation study', *General Physiology and Biophysics*.

Gent, M. P. N. and Prestegard, J. M. (1976) 'Interaction of the polyene antibiotics with lipid bilayer vesicles containing cholesterol', *BBA - Biomembranes*. doi: 10.1016/0005-2736(76)90425-9.

Geraldes, C. F. G. ., Sherry, A. D. and Kiefer, G. E. (1992) 'The solution structure of Ln (DOTP)5− complexxes. A comparison of lanthanide-induced paramagnetic shifts with the MMX energy-minimized structure', *Journal of Magnetic Resonance (1969)*. Academic Press, 97(2), pp. 290–304. doi: 10.1016/0022-2364(92)90314-W.

Gerbier, R. *et al.* (2017) 'Development of original metabolically stable apelin-17 analogs with diuretic and cardiovascular effects', *FASEB Journal*. doi: 10.1096/fj.201600784R.

Gillet, A. *et al.* (2011) 'Skin penetration behaviour of liposomes as a function of their composition', *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. doi: 10.1016/j.ejpb.2011.01.011.

Gourdy, P. *et al.* (2018) 'Apelin administration improves insulin sensitivity in overweight men during hyperinsulinaemic-euglycaemic clamp', *Diabetes, Obesity and Metabolism*. doi: 10.1111/dom.13055.

Grabielle-Madelmont, C., Lesieur, S. and Ollivon, M. (2003) 'Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography', *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. doi: 10.1016/S0165-022X(03)00059-9.

Grit, M. *et al.* (1989) 'Hydrolysis of phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions', *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier, 50(1), pp. 1–6. doi: 10.1016/0378-5173(89)90173-7.

Grit, M. and Crommelin, D. J. A. (1993) 'Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability', *Chemistry and Physics of Lipids*. Elsevier, 64(1–3), pp. 3–18. doi: 10.1016/0009-3084(93)90053-6.

Guo, H. and Kim, J. C. (2015) 'Upper critical solution temperature behavior of cinnamic acid and polyethyleneimine mixture and its effect on temperature-dependent release of liposome', *International Journal of Pharmaceutics*. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.08.034.

Hamada, J. *et al.* (2008) 'Evaluation of novel cyclic analogues of apelin', *International Journal of Molecular Medicine*. doi: 10.3892/ijmm_00000054.

Han, J., Kim, N. and Kim, E. (2001) 'Trifluoroacetic acid activates ATP-sensitive K+ channels in rabbit ventricular myocytes', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi: 10.1006/bbrc.2001.5291.

Haramura, M. *et al.* (2001) 'Design and Synthesis of N-terminal Cyclic Motilin Partial Peptides: A Novel Pure Motilin Antagonist.', *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*. doi: 10.1248/cpb.49.40.

Haran, G. *et al.* (1993) 'Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases', *BBA - Biomembranes*. doi: 10.1016/0005-2736(93)90105-9.

Harrigan, P. R., Madden, T. D. and Cullis, P. R. (1990) 'Protection of liposomes during dehydration or freezing', *Chemistry and Physics of Lipids*. doi: 10.1016/0009-3084(90)90157-M.

Hatakeyama, H., Akita, H. and Harashima, H. (2013) 'The polyethyleneglycol dilemma: Advantage and disadvantage of PEGylation of liposomes for systemic genes and nucleic acids delivery to tumors', *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. doi: 10.1248/bpb.b13-00059.

Henriksen, I. *et al.* (1995) 'In vitro evaluation of drug release kinetics from liposomes by fractional dialysis', *International Journal of Pharmaceutics*, 119(2), pp. 231–238. doi: 10.1016/0378-5173(94)00403-R.

Hinton, D. P. and Johnson, C. S. (1994) 'Simultaneous measurement of vesicle diffusion coefficients and trapping efficiencies by means of diffusion ordered 2D NMR spectroscopy', *Chemistry and Physics of Lipids*. doi: 10.1016/0009-3084(94)90039-6.

Hope, M. J. *et al.* (1985) 'Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. Elsevier, 812(1), pp. 55–65. doi: 10.1016/0005-2736(85)90521-8.

Hope, M. J. *et al.* (1986) 'Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles', *Chemistry and Physics of Lipids*. doi: 10.1016/0009-3084(86)90065-4.

Iturrioz, X. *et al.* (2010) 'Identification and pharmacological properties of E339-3D6, the first nonpeptidic apelin receptor agonist', *FASEB Journal*. doi: 10.1096/fj.09-140715.

Ivanov, N. N. *et al.* (1985) 'Estimation of liposome integrity by 1H-NMR spectroscopy', *Analytical Biochemistry*. doi: 10.1016/0003-2697(85)90272-6.

Jahn, A. *et al.* (2004) 'Controlled Vesicle Self-Assembly in Microfluidic Channels with Hydrodynamic Focusing', *Journal of the American Chemical Society*. doi: 10.1021/ja0318030.

Jahn, A. *et al.* (2007) 'Microfluidic directed formation of liposomes of controlled size', *Langmuir*. doi: 10.1021/la070051a.

Japp, A. G. *et al.* (2008) 'Vascular Effects of Apelin In Vivo in Man', *Journal of the American College of Cardiology*. Journal of the American College of Cardiology, 52(11), pp. 908–913. doi: 10.1016/j.jacc.2008.06.013.

Japp, A. G. and Newby, D. E. (2008) 'The apelin–APJ system in heart failure: Pathophysiologic relevance and therapeutic potential', *Biochemical Pharmacology*. Elsevier, 75(10), pp. 1882–1892. doi: 10.1016/J.BCP.2007.12.015.

Jensen, J. E. *et al.* (2012) 'Cyclisation increases the stability of the sea anemone peptide APETx2 but decreases its activity at acid-sensing ion channel 3', *Marine Drugs*. doi: 10.3390/md10071511.

Jia, Z. Q. *et al.* (2012) 'Cardiovascular effects of a PEGylated apelin', *Peptides*. doi: 10.1016/j.peptides.2012.09.003.

Joanitti, G. A. *et al.* (2018) 'Optimizing Liposomes for Delivery of Bowman-Birk protease inhibitors—Platforms for multiple biomedical applications', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Elsevier. doi: 10.1016/J.COLSURFB.2018.04.033.

Johnson, S. M. *et al.* (1971) 'Single bilayer liposomes', *BBA - Biomembranes*. doi: 10.1016/0005-2736(71)90273-2.

Johnson, S. M. (1973) 'The effect of charge and cholesterol on the size and thickness of sonicated phospholipid vesicles', *BBA - Biomembranes*. doi: 10.1016/0005-2736(73)90022-9.

Jousma, H. *et al.* (1987) 'Characterization of liposomes. The influence of extrusion of multilamellar vesicles through polycarbonate membranes on particle size, particle size distribution and number of bilayers', *International Journal of Pharmaceutics*. doi: 10.1016/0378-5173(87)90139-6.

Kang, B. and Ceder, G. (2009) 'Battery materials for ultrafast charging and discharging', *Nature*. doi: 10.1038/nature07853.

Kim, S., Jacobs, R. E. and White, S. H. (1985) 'Preparation of multilamellar vesicles of defined size-distribution by solvent-spherule evaporation', *BBA - Biomembranes*. doi: 10.1016/0005-2736(85)90274-3.

Kimmerlin, T. and Seebach, D. (2005) '"100 years of peptide synthesis": Ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to β-peptide assemblies', *Journal of Peptide Research*. doi: 10.1111/j.1399-3011.2005.00214.x.

Kneidl, B. *et al.* (2014) 'Thermosensitive liposomal drug delivery systems: state of the art review', *International journal of nanomedicine*. doi: 10.2147/IJN.S49297.

Knudsen, L. B. (2010) 'Liraglutide: The therapeutic promise from animal models', *International Journal of Clinical Practice*. doi: 10.1111/j.1742-1241.2010.02499.x.

Kratz, F. (2008) 'Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles', *Journal of Controlled Release*. Elsevier, 132(3), pp. 171–183. doi: 10.1016/J.JCONREL.2008.05.010.

Kremer, J. M. H. *et al.* (1977) 'Vesicles of Variable Diameter Prepared by a Modified Injection Method', *Biochemistry*. doi: 10.1021/bi00636a033.

De Kruijff, B., Cullis, P. R. and Radda, G. K. (1975) 'Differential scanning calorimetry and31P NMR studies on sonicated and unsonicated phosphatidylcholine liposomes', *BBA - Biomembranes*. doi: 10.1016/0005-2736(75)90038-3.

Kumagai, A. K., Eisenberg, J. B. and Pardridge, W. M. (1987) 'Absorptive-mediated endocytosis of cationized albumin and a ??-endorphin-cationized albumin chimeric peptide by isolated brain capillaries. Model system of blood-brain barrier transport', *Journal of Biological Chemistry*.

Landon, C. D. *et al.* (2011) 'Nanoscale drug delivery and hyperthermia: The materials design and preclinical and clinical testing of low temperature-sensitive liposomes used in combination with mild hyperthermia in the treatment of local cancer', *Open Nanomedicine Journal*. doi: 10.2174/1875933501103010038.

Langelaan, D. N. *et al.* (2009) 'Structural insight into G-protein coupled receptor binding by apelin', *Biochemistry*. doi: 10.1021/bi801864b.

Lapinski, M. M. *et al.* (2007) 'Comparison of liposomes formed by sonication and extrusion: Rotational and translational diffusion of an embedded chromophore', *Langmuir*. doi: 10.1021/la7020963.

Lau, J. L. and Dunn, M. K. (2018) 'Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions', *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. doi: 10.1016/j.bmc.2017.06.052.

Lee, J. H. and Nan, A. (2012) 'Combination Drug Delivery Approaches in Metastatic Breast Cancer', *Journal of Drug Delivery*. doi: 10.1155/2012/915375.

Li, J. and Mooney, D. J. (2016) 'Designing hydrogels for controlled drug delivery', *Nature Reviews Materials*. doi: 10.1038/natrevmats.2016.71.

Li, S. *et al.* (2012) 'Novel multifunctional theranostic liposome drug delivery system: Construction, characterization, and multimodality MR, near-infrared fluorescent, and nuclear imaging', *Bioconjugate Chemistry*. doi: 10.1021/bc300175d.

Linseisen, F. M., Bayerl, S. and Bayerl, T. M. (1996) '2H-NMR and DSC study of DPPC-DODAB mixtures', *Chemistry and Physics of Lipids*. doi: 10.1016/0009-3084(96)02572-8.

Llu, L. and Yonetani, T. (1994) 'Preparation and characterization of liposome-encapsulated haemoglobin by a freeze-thaw method', *Journal of Microencapsulation*. doi: 10.3109/02652049409034258.

Lutsiak, M. E. C., Kwon, G. S. and Samuel, J. (2002) 'Analysis of peptide and lipopeptide content in liposomes', *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*.

Madden, T. D. *et al.* (1990) 'The accumulation of drugs within large unilamellar vesicles exhibiting a proton gradient: a survey', *Chemistry and Physics of Lipids*. Elsevier, 53(1), pp. 37–46. doi: 10.1016/0009-3084(90)90131-A.

Marsh, D., Watts, A. and Knowles, P. F. (1976) 'Evidence for Phase Boundary Lipid. Permeability of Tempo-choline into Dimyristoylphosphatidylcholine Vesicles at the Phase Transition', *Biochemistry*. doi: 10.1021/bi00661a027.

Martin, F. J. and Papahadjopoulos, D. (1982) 'Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles. An improved method for liposome targeting', *Journal of Biological Chemistry*.

Martins, L. *et al.* (2014) '1H NMR studies of binary and ternary dapsone supramolecular complexes with different drug carriers: EPC liposome, SBE-β-CD and β-CD', *Magnetic Resonance in Chemistry*. doi: 10.1002/mrc.4087.

Mason, J. M. (2010) 'Design and development of peptides and peptide mimetics as antagonists for therapeutic intervention', *Future Medicinal Chemistry*. doi: 10.4155/fmc.10.259.

Maurer, N. *et al.* (1998) 'Anomalous solubility behavior of the antibiotic ciprofloxacin encapsulated in liposomes: A 1H-NMR study', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. doi: 10.1016/S0005-2736(98)00125-4.

Maurer, N., Fenske, D. B. and Cullis, P. R. (2001) 'Developments in liposomal drug delivery systems', *Expert Opinion on Biological Therapy*. doi: 10.1517/14712598.1.6.923.

Mayer, L. D. *et al.* (1985) 'Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles', *BBA - Biomembranes*. doi: 10.1016/0005-2736(85)90084-7.

Mayer, L. D. *et al.* (1986) 'Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes', *Chemistry and Physics of Lipids*. Elsevier, 40(2–4), pp. 333–345. doi: 10.1016/0009-3084(86)90077-0.

Mayer, L. D., Hope, M. J. and Cullis, P. R. (1986) 'Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure', *BBA - Biomembranes*. doi: 10.1016/0005-2736(86)90302-0.

McKay, F. C. and Albertson, N. F. (1957) 'New Amine-masking Groups for Peptide Synthesis', *Journal of the American Chemical Society*. doi: 10.1021/ja01574a029.

McLaughlin, A. C. *et al.* (1975) 'Application of 31P NMR to model and biological membrane systems', *FEBS Letters*. doi: 10.1016/0014-5793(75)80719-8.

Mehn, D. *et al.* (2017) 'Analytical ultracentrifugation for analysis of doxorubicin loaded liposomes', *International Journal of Pharmaceutics*. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.03.046.

Merrifield, R. B. (1963) '**Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide**', *Journal of the American Chemical Society*. American Chemical Society , 85(14), pp. 2149–2154. doi: 10.1021/ja00897a025.

Mertins, O. *et al.* (2010) 'Interaction between phospholipids bilayer and chitosan in liposomes investigated by31P NMR spectroscopy', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.08.048.

El Messari, S. *et al.* (2004) 'Functional dissociation of apelin receptor signaling and endocytosis: Implications for the effects of apelin on arterial blood pressure', *Journal of Neurochemistry*. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02591.x.

Milsmann, M. H. W., Schwendener, R. A. and Weder, H. G. (1978) 'The preparation of large single bilayer liposomes by a fast and controlled dialysis', *BBA - Biomembranes*. doi: 10.1016/0005-2736(78)90225-0.

Milton Harris, J. and Chess, R. B. (2003) 'Effect of pegylation on pharmaceuticals', *Nature Reviews Drug Discovery*. doi: 10.1038/nrd1033.

Mishra, S. *et al.* (2018) 'Preparation, Properties and Application of Hydrogels: A Review', in. doi: 10.1007/978-981-10-6077-9_6.

Mohammed, A. R., Coombes, A. G. A. and Perrie, Y. (2007) 'Amino acids as cryoprotectants for liposomal delivery systems', *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. doi: 10.1016/j.ejps.2007.01.001.

Mosterd, A. and Hoes, A. W. (2007) 'Clinical epidemiology of heart failure.', *Heart*, 9(93), pp. 1137–1146. doi: 10.1136/hrt.2003.025270.

Mourtas, S. *et al.* (2007) 'Liposomal drugs dispersed in hydrogels. Effect of liposome, drug and gel properties on drug release kinetics', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 55(2), pp. 212–221. doi: 10.1016/j.colsurfb.2006.12.005.

Mozafari, M. R. (2005) 'Liposomes: an overview of manufacturing techniques', *Cellular & molecular biology letters*, 10(4), pp. 711–719.

Murza, A. *et al.* (2014) 'Stability and degradation patterns of chemically modified analogs of apelin-13 in plasma and cerebrospinal fluid', *Biopolymers - Peptide Science Section*. doi: 10.1002/bip.22498.

Nayeem, N. *et al.* (2010) 'Quaternary Structure of the Native GABAA Receptor Determined by Electron Microscopic Image Analysis', *Journal of Neurochemistry*. doi: 10.1046/j.1471-

4159.1994.62020815.x.

Needham, D. and Dewhirst, M. W. (2001) 'The development and testing of a new temperature-sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors', *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier, 53(3), pp. 285–305. doi: 10.1016/S0169-409X(01)00233-2.

Nishimura, K. *et al.* (2009) 'Population analysis of structural properties of giant liposomes by flow cytometry', *Langmuir*. doi: 10.1021/la902237y.

Nowbar, A. N. *et al.* (2019) 'Mortality From Ischemic Heart Disease', *Circulation. Cardiovascular quality and outcomes*. doi: 10.1161/CIRCOUTCOMES.118.005375.

O'Dowd, B. F. *et al.* (1993) 'A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11', *Gene*. Elsevier, 136(1–2), pp. 355–360. doi: 10.1016/0378-1119(93)90495-O.

Ø genda, L. (2016) *Light Scattering a brief introduction*. Available at: https://www.nbi.dk/~ogendal/personal/lho/LS_brief_intro.pdf.

Ohsawa, T., Miura, H. and Harada, K. (1985) 'Improvement of encapsulation efficiency of water-soluble drugs in liposomes formed by freeze-thawing method', *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 33(9), pp. 3945–3952. Available at: https://ac.els-cdn.com/0003986181903581/1-s2.0-0003986181903581-main.pdf?_tid=1544e71e-fc7c-4dbe-83f2-e631b6ee3c30&acdnat=1546513435_ffb16fc34a929f3c16d2992f60ab8d76.

Ohyanagi, F. *et al.* (2011) 'Safety of BLP25 Liposome Vaccine (L-BLP25) in Japanese Patients with Unresectable Stage III NSCLC after Primary Chemoradiotherapy: Preliminary Results from a Phase I/II Study', *Japanese Journal of Clinical Oncology*. Oxford University Press, 41(5), pp. 718–722. doi: 10.1093/jjco/hyr021.

Olson, F. *et al.* (1979) 'Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes', *BBA - Biomembranes*. doi: 10.1016/0005-2736(79)90085-3.

Otting, G. (2010) 'Protein NMR Using Paramagnetic Ions', *Annual Review of Biophysics*, 39(1), pp. 387–405. doi: 10.1146/annurev.biophys.093008.131321.

Papahadjopoulos, D. *et al.* (1973) 'Phase transitions in phospholipid vesicles Fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol', *BBA - Biomembranes*. doi: 10.1016/0005-2736(73)90314-3.

Papahadjopoulos, D. and Miller, N. (1967) 'Phospholipid model membranes. I. Structural characteristics of hydrated liquid crystals', *BBA - Biomembranes*. doi: 10.1016/0005-2736(67)90094-6.

Patra, J. K. *et al.* (2018) 'Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects', *Journal of Nanobiotechnology*. doi: 10.1186/s12951-018-0392-8.

Pawlikowska-Pawlęga, B. *et al.* (2013) 'FTIR, 1H NMR and EPR spectroscopy studies on the interaction of flavone apigenin with dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. doi: 10.1016/j.bbamem.2012.10.013.

Pentak, D. (2014) 'Alternative methods of determining phase transition temperatures of phospholipids that constitute liposomes on the example of DPPC and DMPC', *Thermochimica Acta*. doi: 10.1016/j.tca.2014.03.020.

Peppas, N. A. *et al.* (2000) 'Hydrogels in pharmaceutical formulations', *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. doi: 10.1016/S0939-6411(00)00090-4.

Peters, T. (1985) 'Serum Albumin', *Advances in Protein Chemistry*. doi: 10.1016/S0065-3233(08)60065-0.

Pick, U. (1981) 'Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures', *Archives of Biochemistry and Biophysics*. doi: 10.1016/0003-9861(81)90358-1.

Pintacuda, G. *et al.* (2007) 'NMR Structure Determination of Protein−Ligand Complexes by Lanthanide Labeling', *accounts of chemical research*. American Chemical Society, 40, pp. 206–212. doi: 10.1021/AR050087Z.

Pitkin, S. L. *et al.* (2010) 'Modulation of the apelin/APJ system in heart failure and atherosclerosis

in man', *British Journal of Pharmacology*. Blackwell Publishing Ltd, 160(7), pp. 1785–1795. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00821.x.

Portnoy, E. *et al.* (2011) 'Cetuximab-labeled liposomes containing near-infrared probe for in vivo imaging', *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. doi: 10.1016/j.nano.2011.01.001.

Powell, E. and Chow, L. Q. (2008) 'BLP-25 liposomal vaccine: a promising potential therapy in nonsmall-cell lung cancer', *Expert Review of Respiratory Medicine*. Taylor & Francis, 2(1), pp. 37–45. doi: 10.1586/17476348.2.1.37.

Pradhan, P. *et al.* (2008) 'A facile microfluidic method for production of liposomes', *Anticancer Research*. doi: 18507040.

Pramanick, S., Singodia, D. and Chandel, V. (2013) 'Excipient selection in parenteral formulation development', *Pharma Times*.

Prestegard, J. H. and Kantor, H. L. (1978) 'Rupture and transformation of lipid bilayer membranes at thermal phase transitions', *Cryobiology*. doi: 10.1016/0011-2240(78)90027-5.

Rance, M. and Byrd, R. A. (1983) 'Obtaining high-fidelity spin- 1 2 powder spectra in anisotropic media: Phase-cycled Hahn echo spectroscopy', *Journal of Magnetic Resonance (1969)*. doi: 10.1016/0022-2364(83)90190-7.

Riaz, M. *et al.* (2018) 'Surface functionalization and targeting strategies of liposomes in solid tumor therapy: A review', *International journal of molecular sciences*.

Roingeard, P. (2008) 'Viral detection by electron microscopy: past, present and future', *Biology of the Cell*. doi: 10.1042/bc20070173.

Ruozi, B. *et al.* (2011) 'AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: a comparative study.', *International journal of nanomedicine*. doi: 10.2147/IJN.S14615.

Saarinen-Savolainen, P. *et al.* (1997) 'Method for evaluating drug release from liposomes in sink conditions', *International Journal of Pharmaceutics*. doi: 10.1016/S0378-5173(97)00264-0.

Salim, M. *et al.* (2014) 'Amphiphilic designer nano-carriers for controlled release: From drug delivery to diagnostics', *MedChemComm*. doi: 10.1039/c4md00085d.

Schaefer, J. J., Ma, C. and Harris, J. M. (2012) 'Confocal Raman microscopy probing of temperature-controlled release from individual, optically-trapped phospholipid vesicles', *Analytical Chemistry*. doi: 10.1021/ac302346n.

Scherer, J. R. (1989) 'On the position of the hydro-phobic/philic boundary in lipid bilayers', *Biophysical Journal*. Cell Press, 55(5), pp. 957–964. doi: 10.1016/S0006-3495(89)82894-2.

Schieren, H. *et al.* (1978) 'Comparison of large unilamellar vesicles prepared by a petroleum ether vaporization method with multilamellar vesicles. ESR, diffusion and entrapment analyses', *BBA - General Subjects*. doi: 10.1016/0304-4165(78)90240-4.

Schiller, J. *et al.* (2007) '31P NMR Spectroscopy of Phospholipids: From Micelles to Membranes', *Current Analytical Chemistry*. doi: 10.2174/157341107782109635.

Schmidt, C. F., Barenholz, Y. and Thompson, T. E. (1977) 'A Nuclear Magnetic Resonance Study of Sphingomyelin in Bilayer Systems', *Biochemistry*. doi: 10.1021/bi00631a011.

Schwartz, M. A. and McConnell, H. M. (1978) 'Surface Areas of Lipid Membranes~', *Biochemistry*. doi: 10.1021/bi00598a014.

Schwendener, R. A. (2014) 'Liposomes as vaccine delivery systems: A review of the recent advances', *Therapeutic Advances in Vaccines*. doi: 10.1177/2051013614541440.

Scott, B. O. *et al.* (1996) 'Solid phase organic synthesis (SPOS): a novel route to diketopiperazines and diketomorpholines.', *Molecular diversity*. doi: 10.1007/BF01721328.

Severs, N. J. (2007) 'Freeze-fracture electron microscopy', *Nature Protocols*. doi: 10.1038/nprot.2007.55.

Sharma, A. and Sharma, U. S. (1997) 'Liposomes in drug delivery: Progress and limitations', *International Journal of Pharmaceutics*. doi: 10.1016/S0378-5173(97)00135-X.

Shimanouchi, T. *et al.* (2009) 'Calcein permeation across phosphatidylcholine bilayer membrane: Effects of membrane fluidity, liposome size, and immobilization', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*.

doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.05.014.

Shin, K., Sarker, M., *et al.* (2017) 'Apelin conformational and binding equilibria upon micelle interaction primarily depend on membrane-mimetic headgroup', *Scientific Reports*. doi: 10.1038/s41598-017-14784-0.

Shin, K., Chapman, N. A., *et al.* (2017) 'Bioactivity of the putative apelin proprotein expands the repertoire of apelin receptor ligands', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.05.017.

Smith, R. A., Bobko, M. A. and Lee, W. (1998) 'Solid-phase synthesis of a library of piperazinediones and diazepinediones via Kaiser oxime resin', *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. doi: 10.1016/S0960-894X(98)00428-4.

Smyth Templeton, N. and Lasic, D. D. (1999) 'New Directions in Liposome Gene Delivery', *Molecular biotechnology*, 11, pp. 175–180. Available at: https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF02915810.pdf (Accessed: 9 May 2018).

Sorli, S. C. *et al.* (2006) 'Therapeutic potential of interfering with apelin signalling', *Drug Discovery Today*. Elsevier Current Trends, 11(23–24), pp. 1100–1106. doi: 10.1016/J.DRUDIS.2006.10.011.

Sriwongsitanont, S. and Ueno, M. (2004) 'Effect of a PEG lipid (DSPE-PEG2000) and freeze-thawing process on phospholipid vesicle size and lamellarity', *Colloid and Polymer Science*. doi: 10.1007/s00396-003-1015-x.

Stang, M., Schuchmann, H. and Schubert, H. (2001) 'Emulsification in High-Pressure Homogenizers', *Engineering in Life Sciences*, 1(4), pp. 151–157. doi: 1618-0240/01/0410-0151.

Stark, B., Pabst, G. and Prassl, R. (2010) 'Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: Effects of cryoprotectants on structure', *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. doi: 10.1016/j.ejps.2010.08.010.

Storm, G. and Crommelin, D. J. . (1998) 'Liposomes: quo vadis?', *Pharmaceutical Science & Technology Today*. Elsevier Current Trends, 1(1), pp. 19–31. doi: 10.1016/S1461-5347(98)00007-8.

Sułkowski, W. W. *et al.* (2005) 'The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability', *Journal of Molecular Structure*. doi: 10.1016/j.molstruc.2004.11.075.

Svensson, O., Josefson, M. and Langkilde, F. W. (1999) 'Reaction monitoring using Raman spectroscopy and chemometrics', *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. doi: 10.1016/S0169-7439(99)00025-8.

Szardenings, A. K. *et al.* (1997) 'A simple procedure for the solid phase synthesis of diketopiperazine and diketomorpholine derivatives', in *Tetrahedron*. doi: 10.1016/S0040-4020(97)00218-4.

Szoka, F. J. (1980) 'Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes)', *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*. doi: 10.1073/pnas.73.11.3862.

Szoka, Francis and Papahadjopoulos, D. (1978) 'Biochemistry Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation (drug delivery/encapsulation/lipid vesicles/encapsulated macromolecules)', 75(9), pp. 4194–4198.

Szoka, F. and Papahadjopoulos, D. (1978) 'Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi: 10.1073/pnas.75.9.4194.

Tahara, Y. and Fujiyoshi, Y. (1994) 'A new method to measure bilayer thickness: Cryo-electron microscopy of frozen hydrated liposomes and image simulation', *Micron*. doi: 10.1016/0968-4328(94)90039-6.

Takeuchi, K. ichiro *et al.* (1996) 'Effect of zeta potential of cationic liposomes containing cationic cholesterol derivatives on gene transfection', *FEBS Letters*. doi: 10.1016/S0014-5793(96)01136-2.

Talsma, H. *et al.* (1987) 'Multilamellar or multivesicular vesicles?', *International Journal of Pharmaceutics*. doi: 10.1016/0378-5173(87)90023-8.

Tan, A. *et al.* (2015) 'Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery', *Frontiers in*

Pharmacology Front. Pharmacol, 6(6), pp. 2863389–286. doi: 10.3389/fphar.2015.00286.

Tatemoto, K. *et al.* (1998) 'Isolation and Characterization of a Novel Endogenous Peptide Ligand for the Human APJ Receptor', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press, 251(2), pp. 471–476. doi: 10.1006/BBRC.1998.9489.

Tatemoto, K. *et al.* (2001) 'The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism', *Regulatory Peptides*. Elsevier, 99(2–3), pp. 87–92. doi: 10.1016/S0167-0115(01)00236-1.

Tenforde, T. S. and Liburdy, R. P. (1988) 'Magnetic deformation of phospholipid bilayers: Effects on liposome shape and solute permeability at prephase transition temperatures', *Journal of Theoretical Biology*. doi: 10.1016/S0022-5193(88)80329-1.

Thunecke, F. *et al.* (1996) 'Kinetic study on the cis-trans isomerization of peptidyl-proline dipeptides', in *Journal of Chromatography A*. doi: 10.1016/0021-9673(96)00241-5.

Uekama, K., Hirayama, F. and Irie, T. (1998) 'Cyclodextrin Drug Carrier Systems', *Chemical Reviews*, 98, pp. 2045–2076. Available at: https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/cr970025p (Accessed: 14 February 2018).

Uhríková, D. *et al.* (2000) 'Small-angle neutron scattering study of the n-decane effect on the bilayer thickness in extruded unilamellar dioleoylphosphatidylcholine liposomes', *Biophysical Chemistry*. doi: 10.1016/S0301-4622(00)00211-8.

Urano, S. *et al.* (1993) 'Mobility and Molecular Orientation of Vitamin E in Liposomal Membranes as Determined by 19F NMR and Fluorescence Polarization Techniques', *Archives of Biochemistry and Biophysics*. doi: 10.1006/abbi.1993.1248.

Varga, Z. *et al.* (2012) 'Characterization of the PEG layer of sterically stabilized liposomes: A SAXS study', in *Chemistry and Physics of Lipids*. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2011.12.011.

Veber, D. F. *et al.* (1978) 'Conformationally restricted bicyclic analogs of somatostatin.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi: 10.1073/pnas.75.6.2636.

Vemuri, S. and Rhodes, C. . (1995) 'Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review', *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. Elsevier, 70(2), pp. 95–111. doi: 10.1016/0031-6865(95)00010-7.

Vickers, C. *et al.* (2002) 'Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M200581200.

Vorauer-Uhl, K. *et al.* (2000) 'Determination of liposome size distribution by flow cytometry', *Cytometry*. doi: 10.1002/(SICI)1097-0320(20000201)39:2<166::AID-CYTO10>3.0.CO;2-M.

Wan, Y., Angleson, J. K. and Kutateladze, A. G. (2002) 'Liposomes from novel photolabile phospholipids: Light-induced unloading of small molecules as monitored by PFG NMR', *Journal of the American Chemical Society*. doi: 10.1021/ja016874i.

Wang, M. and Kim, J. C. (2014) 'Light- and temperature-responsive liposomes incorporating cinnamoyl Pluronic F127', *International Journal of Pharmaceutics*. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.04.014.

Weinstein, J. N. and Leserman, L. D. (1984) 'Liposomes as drug carriers in cancer chemotherapy', *Pharmacology & Therapeutics*. Pergamon, 24(2), pp. 207–233. doi: 10.1016/0163-7258(84)90035-4.

Wishart, D. S. *et al.* (1995) '1 H, 13 C and 15 N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects', *Journal of Biomolecular NMR*. doi: 10.1007/BF00227471.

Witt, K. A. *et al.* (2001) 'Peptide drug modifications to enhance bioavailability and blood-brain barrier permeability.', *Peptides*. doi: 10.1016/S0196-9781(01)00537-X.

Wu, D. H., Chen, A. and Johnson, C. S. (1995) 'An Improved Diffusion-Ordered Spectroscopy Experiment Incorporating Bipolar-Gradient Pulses', *Journal of Magnetic Resonance, Series A*. doi: 10.1006/jmra.1995.1176.

Wuthrich, K. (1986) *NMR of proteins and nucleic acids*. Wiley.

Xu, W., Ling, P. and Zhang, T. (2013) 'Polymeric Micelles, a Promising Drug Delivery System to Enhance Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs', *Journal of Drug Delivery*. doi:

10.1155/2013/340315.

Xuan, T., Zhang, J. A. and Ahmad, I. (2006) 'HPLC method for determination of SN-38 content and SN-38 entrapment efficiency in a novel liposome-based formulation, LE-SN38', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. doi: 10.1016/j.jpba.2005.10.051.

Yang, S. T. *et al.* (2016) 'The role of cholesterol in membrane fusion', *Chemistry and Physics of Lipids*. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2016.05.003.

Yang, W. *et al.* (2019) 'Thermosensitive liposomal doxorubicin plus radiofrequency ablation increased tumor destruction and improved survival in patients with medium and large hepatocellular carcinoma: A randomized, double-blinded, dummy-controlled clinical trial in a single cent', *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. doi: 10.4103/jcrt.jcrt_801_18.

Yu, X. H. *et al.* (2014) 'Apelin and its receptor APJ in cardiovascular diseases', *Clinica Chimica Acta*. doi: 10.1016/j.cca.2013.09.001.

Zeisig, R. *et al.* (1998) 'Physical properties and pharmacological activity in vitro and in vivo of optimised liposomes prepared from a new cancerostatic alkylphospholipid', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. doi: 10.1016/S0005-2736(98)00171-0.

Zhang, X. M. *et al.* (2004) 'Determination of liposomal encapsulation efficiency using proton NMR spectroscopy', *Chemistry and Physics of Lipids*. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2003.09.013.

Zhen, E. Y., Higgs, R. E. and Gutierrez, J. A. (2013) 'Pyroglutamyl apelin-13 identified as the major apelin isoform in human plasma', *Analytical Biochemistry*. doi: 10.1016/j.ab.2013.07.006.

Zimmerman, S. S. and Scheraga, H. A. (1976) 'Stability of Cis, Trans, and Nonplanar Peptide Groups', *Macromolecules*. doi: 10.1021/ma60051a005.

Zumbuehl, O. and Weder, H. G. (1981) 'Liposomes of controllable size in the range of 40 to 180 nm by defined dialysis of lipid/detergent mixed micelles', *BBA - Biomembranes*. doi: 10.1016/0005-2736(81)90550-2.

université PARIS-SACLAY

ÉCOLE DOCTORALE
Innovation thérapeutique
du fondamental à l'appliqué
(ITFA)

Titre : Utilisation de la RMN pour la caractérisation structurale et cinétique d'associations peptide - liposome comme aide à la conception de formulation

Mots clés : Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), liposome, peptide, « Drug delivery systems » (DDS), relargage contrôlé, apeline

Résumé : L'encapsulation de principes actifs (PA) dans des liposomes est utilisée dans de nombreux domaines tels que les industries pharmaceutiques et cosmétiques. Les liposomes sont des « Drug delivery systems » (DDS) utilisés pour leur relargage contrôlé des PA. Pour augmenter l'efficacité de peptides comme PA, nous cherchons à optimiser des liposomes en jouant à la fois sur leur composition et la structure des peptides. Les paramètres à améliorer sont leurs interactions, l'efficacité d'encapsulation et la cinétique de relargage. Pour atteindre cet objectif, j'ai évalué l'intérêt de la spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) pour caractériser les peptides, les liposomes et leurs comportements pendant le relargage. Les peptides utilisés dans cette étude sont dérivés de l'apeline, qui a un intérêt pour la régulation homéostatique du système cardiovasculaire.

Les structures des liposomes et des peptides ainsi que leurs interactions ont été étudiées par RMN ^{1}H et ^{31}P et par cryo-TEM. J'ai montré que les méthodes de diffusion par RMN, en s'appuyant sur la taille apparente des molécules, permettent de différencier les compartiments internes et externes des liposomes et de suivre les cinétiques *in-situ* en temps réel de relargage de peptide, sans perturber le processus. Les cinétiques de relargage ont aussi été quantifiées par intégration spectrale de spectres RMN ^{1}H. J'ai aussi montré que la méthode de préparation des liposomes avait un impact sur leur structure, leur cinétique de relargage et leurs interactions avec des peptides. L'addition d'une chaîne lipidique augmente les interactions avec les liposomes, mais la longueur et le type de chaîne induisent peu de différences. Les outils de RMN mis en place pourront être étendus à d'autres PA et systèmes d'administration pour des applications pharmaceutiques et cosmétiques.

Title : Using NMR for the structural and kinetic characterization of peptide - liposome complexes to support formulation design

Keywords : Nuclear Magnetic Resonance (NMR), liposome, peptide, drug delivery system (DDS), controlled release, apelin

Abstract : The encapsulation of active ingredients (AI) in liposomes is used in several domains such as pharmaceutical and cosmetic industries. Liposomes are drug delivery systems (DDS) used for a controlled release of AIs. To increase the efficiency of peptide drugs, I aim at designing optimized peptide/liposomes formulation by playing both on their composition and peptide structure. Potential parameters to be improved are their interactions, encapsulation efficiency and release kinetics. To reach this goal, I explored the potentiality of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy to characterize peptides, liposomes and their behavior during release. The AIs used in this study are apelin-derived peptides that are of interest for homeostasis regulation of the cardiovascular system.

Liposome and peptide structures as well as their interactions were characterized by ^{1}H and ^{31}P NMR and cryo-TEM. I showed that diffusion NMR methods that report on the apparent size of molecules can discriminate between the inner and the outer space of liposomes and for release quantification *in-situ* and in real-time without perturbing the process. Moreover, ^{1}H NMR spectra were used to monitor and quantify peptide release kinetics by spectral integration. I showed that the preparation method of liposomes drastically impacts their structure, release kinetics and interactions with peptides. Addition of a lipid chain increases the interaction with the liposomes, but the type and length of the chain induce only few differences. This approach could certainly be extended to other AIs and DDSs used for pharmaceutical and cosmetic applications.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France